
GDI-Freisetzungsmechanismen: Nukleotidaustausch zur Regulation der Interaktion von prenylierten Rab-Proteinen und GDI

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)
des Fachbereichs Chemie
der Technischen Universität Dortmund

angefertigt am
Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie

vorgelegt von
Lena Katharina Oesterlin

September 2011

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Dezember 2008 bis August 2011 am Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie unter der Anleitung von Prof. Dr. Roger S. Goody und Dr. Aymelt Itzen durchgeführt.

Die Ergebnisse dieser Arbeit konnten in den folgenden Veröffentlichungen publiziert werden:

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

*geteilte Erstautorenschaft

Wu, Y.W., Oesterlin, L.K., Tan, K.T., Waldmann, H., Alexandrov, K. und Goody, R.S. (2010)
Membrane targeting mechanism of Rab GTPases elucidated by semisynthetic protein probes. *Nat. Chem. Biol.* 6, 534-540.

1. Gutachter: Prof. Dr. Roger S. Goody
2. Gutachter: Prof. Dr. Roland Winter

Für unsere Oma, von der wir es alles haben.

INHALTSVERZEICHNIS

Zusammenfassung	1
1 Einleitung	3
1.1 Vesikulärer Transport	3
1.2 Kleine guaninnukleotidbindende Proteine	4
1.3 Rab-Proteine	5
1.3.1 Regulation von Rab-Proteinen	8
1.3.1.1 Lokalisation von Rab-Proteinen	9
1.3.1.2 Aktivierung und Deaktivierung von Rab-Proteine	12
1.3.1.3 Modifikation der Rab-Regulation durch <i>Legionella pneumophila</i>	21
2 Zielsetzung	27
3 Material und Methoden	29
3.1 Material	29
3.1.1 Chemikalien	29
3.1.2 FPLC-Säulenmaterial und FPLC-/HPLC-Säulen	30
3.1.3 Proteine und Größenstandards	31
3.1.4 Molekularbiologische Kits	31
3.1.5 Sonstiges Material	32
3.1.6 Geräte	32
3.1.7 Puffer und Lösungen	34
3.1.8 Nährmedien	35
3.1.8.1 Nährmedien zur Anzucht von <i>Escherichia coli</i>	35
3.1.8.2 Nährmedien zur Anzucht von Insektenzellen	36
3.1.9 Bakterienstämme	36
3.1.10 Insektenzelllinien	36
3.1.11 Plasmide	37
3.1.12 Oligonukleotide	39
3.1.13 Viren	39
3.2 Molekularbiologische Methoden	39
3.2.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>Escherichia coli</i>	39
3.2.2 Bestimmung von DNA-Konzentrationen	39
3.2.3 Restriktionsverdau von DNA	39
3.2.4 Agarose-Gelelektrophorese	40
3.2.5 Extraktion von DNA-Fragmenten aus einem Agarose-Gel	40
3.2.6 Reinigung von DNA-Fragmenten	41
3.2.7 Ligation von Plasmid-DNA	41
3.2.8 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	41
3.2.8.1 Präparative PCR	42
3.2.8.2 Analytische PCR	42
3.2.8.3 Zielgerichtete Mutagenese von Plasmid-DNA	42
3.2.8.4 DNA-Sequenzierung	43

3.2.9 Erzeugung von Bacmid-DNA mit <i>Escherichia coli</i> DH10Bac	44
3.3 Mikrobiologische Methoden	45
3.3.1 <i>Escherichia coli</i>	45
3.3.1.1 Kultur und Anzucht	45
3.3.1.2 Herstellung und Transformation kompetenter <i>Escherichia coli</i> Zellen	46
3.3.2 Insektenzellen	47
3.3.2.1 Kultur und Anzucht	47
3.3.2.2 Bestimmung der Zellkonzentration	47
3.3.2.3 Transfektion von Insektenzellen mit Bacmid-DNA	48
3.3.2.4 Virusamplifikation	48
3.4 Biochemische Methoden	49
3.4.1 Proteinexpression in <i>Escherichia coli</i>	49
3.4.2 Proteinexpression in Insektenzellen	50
3.4.3 Isolierung von Proteinen mit einem Hexahistidinanker	51
3.4.3.1 Isolierung von DrrA und Rabin8	52
3.4.3.2 Isolierung von Rab-Proteinen	52
3.4.3.3 Isolierung von Ypt1	53
3.4.3.4 Isolierung von Sec2	53
3.4.3.5 Isolierung von GGTase-I alpha und beta und FTase-I alpha und beta	54
3.4.3.6 Isolierung von GDI	54
3.4.3.7 Isolierung von Connecdenn	55
3.4.4 <i>In vitro</i> Prenylierung von Rab-Proteinen	55
3.4.5 Nukleotidaustausch an Rab-Proteinen	56
3.4.6 Herstellung von nukleotidfreiem Rab1b:DrrA-Komplex	57
3.4.7 Adenylylierung	57
3.5 Proteinanalytische Methoden	58
3.5.1 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	58
3.5.2 Proteinkonzentrationsbestimmung	59
3.5.2.1 Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford	59
3.5.2.2 Proteinkonzentrationsbestimmung mit Absorptionsmessung	60
3.5.3 Massenspektrometrie	60
3.5.3.1 MALDI-TOF-Massenspektrometrie	60
3.5.3.2 Elektrosprayionisations-Massenspektrometrie (ESI-MS)	61
3.5.4 Analytische Gelfiltrationschromatographie	62
3.5.5 Umkehrphasenchromatographie	62
3.6 Biophysikalische Methoden	63
3.6.1 Messung von transienten Kinetiken mit Fluoreszenzspektroskopie	63
3.6.1.1 Messung von schnellen Kinetiken	63
3.6.1.2 Messung von langsamen Kinetiken	63
3.6.2 Gleichgewichtstitration	64
3.6.3 Isotherme Titrationskalorimetrie (ITC)	64
4 Ergebnisse	65
4.1 Biochemische Charakterisierung der Guaninnukleotidaustauschaktivität von DrrA	65
4.1.1 DrrA-katalysierte Nukleotidfreisetzung von Rab1b	66
4.1.2 Unabhängige Bestimmung der Affinität von DrrA für Rab1b:GDP	68

4.1.3 Bestimmung der Nukleotidaffinität des Rab1b:DrrA-Komplexes	69
4.1.4 Der Rab1b:DrrA:GDP-Interaktionszyklus	71
4.1.5 Spezifität von DrrA für Rab1b	72
4.1.6 Modifikation der Nukleotidaustauschaktivität von DrrA durch gezielte Mutation	74
4.2 Charakterisierung der GDI-Freisetzungsaktivität von DrrA	76
4.2.1 GDI-Freisetzung durch DrrA in Abwesenheit von Nukleotid	77
4.2.2 Nukleotidabhängigkeit der GDI-Freisetzung durch DrrA	78
4.2.3 Dissoziation des Rab1:GDI-Komplexes	82
4.2.4 Assoziation des Rab1:GDI-Komplexes	84
4.3 GDI-Freisetzung aus anderen Rab:GDI-Komplexen durch GEFs	85
4.3.1 Gleichgewichtstitration mit GDI	85
4.3.2 Freisetzung von GDI aus Rab:GDI-Komplexen	87
4.3.3 Bestimmung der Dissoziations- und Assoziationsgeschwindigkeitskonstanten von verschiedenen Rab:GDI-Komplexen	92
4.4 Modifikation von Rab-Proteinen durch DrrA-katalysierte Adenylylierung	96
4.4.1 DrrA-katalysierter Nukleotidaustausch an adenylyliertem Rab1	96
4.4.2 Modifikation der Rab:GDI-Interaktion durch Adenylylierung	97
5 Diskussion und Ausblick	105
5.1 DrrA-katalysierter Nukleotidaustausch	105
5.2 GDI-Freisetzung durch DrrA	107
5.3 Interaktion von verschiedenen Rab-Proteinen mit GDI	107
5.4 GDI-Freisetzung und Rab Lokalisation durch Nukleotidaustauschfaktoren	110
5.5 Modifikation der Rab:GDI-Interaktion	110
5.6 Rekrutierung von Rab-Proteinen durch Nukleotidaustausch	114
6 Literatur	119

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

mA	Milliampere
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumin</i>)
°C	Grad Celsius
ca.	circa
CHAPS	3-((3-Cholamidopropyl)dimethylammonio)-1-propansulfonat
cm	Zentimeter
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
kDa	Kilodalton
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DrrA	Defekt bei der Rab Rekrutierung A (<i>defect in rab recruitment A</i>)
DTE	Dithioerythritol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ESI-MS	Elektrosprayionisations-Massenspektrometrie
<i>et al.</i>	und andere (<i>et alii</i>)
FPLC	schnelle Protein-Flüssigchromatographie (<i>fast protein liquid chromatography</i>)
FTase	Farnesyltransferase
g	Gramm
µg	Mikrogramm
mg	Milligramm
ng	Nanogramm
GAP	GTPase aktivierendes Protein
GDP	Guanosindiphosphat
GDF	<i>GDI displacement factor</i>
GDI	Guaninnukleotid-Dissoziationsinhibitor
GEF	Guaninnukleotidaustauschfaktor (<i>guanine nucleotide exchange factor</i>)
gg	geranylgeranyl
GGTase	Geranylgeranyltransferase
GppNHp	Guanosin-5'-β,γ-imidotriphosphat
GTP	Guanosintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat

Hepes	4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethansulfonsäure
HPLC	Hochdruckflüssigkeitschromatographie (<i>high pressure liquid chromatography</i>)
IPTG	Isopropyl-Thio- β -D-Galactopyranosid
ITC	Isotherme Titrationskalorimetrie (<i>Isothermal Titration Calorimetry</i>)
dITP	Desoxyinosintriphosphat
l	Liter
μ l	Mikroliter
ml	Milliliter
LB	Luria Bertani
M	molar, Mol pro Liter
μ M	Mikromolar
mM	Millimolar
nM	Nanomolar
μ M	Pikomolar
mm	Millimeter
nm	Nanometer
mant	2'(3')-O-(N-methylantranoyl)
MALDI	Matrix-unterstützte Laserdesorption/Ionisation (<i>Matrix-assisted laser desorption/ionization</i>)
MBP	Maltose-Bindeprotein
MESNA	2-Mercaptoethansulfonat-Natrium
min	Minuten
MWCO	Ausschlussgröße in Molekulargewicht (<i>molecular weight cut-off</i>)
N-terminal	Amino-terminal
NBD	7-Nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl
OD _{600nm}	Optische Dichte bei 600 nm
P4M	Phosphatidylinositol-4-phosphat-Bindung von SidM
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PEG	Polyethylenglycol
PMSF	Phenylmethylnsulphonylfluorid
PRA	<i>Prenylated Rab Acceptor</i>

REP	Rab Eskort Protein
RNA	Ribonukleinsäure
mRNA	Boten-RNA (<i>messenger RNA</i>)
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>revolutions per minute</i>)
RRF	Rab Recycling Faktor
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecyl sulfat</i>)
Sf	<i>Spodoptera frugiperda</i>
SidM	Substrat des Icm/Dot Sekretionssystems M (<i>substrate of Icm/Dot M</i>)
t	Zeit (time)
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TCEP	Tris-(2-Carboxyethyl)-phosphin
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin
TFA	Trifluoressigsäure (<i>trifluoroacetic acid</i>)
TOF	Flugzeit (<i>time of flight</i>)
Tris	Tri-(hydroxymethyl)-aminomethan
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
U	Unit (Einheit der Enzymaktivität)
U.S.A.	Vereinigte Staaten von Amerika (<i>United States of America</i>)
V	Volt
v/v	Verhältnis Volumen/Volumen (<i>volume/volume</i>)
w/v	Verhältnis Gewicht/Volumen (<i>weight/volume</i>)
YIP	Ypt interagierendes Proteine (<i>Ypt Interacting Proteins</i>)

Zusammenfassung

Rab-Proteine regulieren als molekulare Schalter eine Vielzahl von intrazellulären Transportprozessen. Diese Regulation erfolgt in zwei miteinander verschalteten Zyklen. Im ersten Zyklus wechseln die Rab-Proteine zwischen einer membranständigen und einer cytoplasmatischen Lokalisation. Die Interaktion mit der Membran erfolgt durch die hydrophoben C-terminalen Prenylanker der Rab-Proteine, die – zur Erhöhung der Löslichkeit – im Cytoplasma von dem Protein GDI gebunden werden. Im zweiten Regulationszyklus werden die Rab-Proteine aktiviert bzw. deaktiviert und so die Interaktion mit Effektorproteinen und die Aktivierung von Signalkaskaden reguliert. Da die Aktivierung durch Nukleotidaustausch zu GTP und die Deaktivierung der Rab-Proteine durch Nukleotidhydrolyse in der Regel durch membranlokalisierte Proteine erfolgt, sind die zwei Regulationszyklen miteinander verschaltet. Die Aktivierung und Deaktivierung der Rab-Proteine wurde bis zum heutigen Zeitpunkt relativ detailliert charakterisiert, während wenige Daten zur Regulation der Rab-Lokalisation vorliegen. DrrA, ein Protein aus dem Bakterium *Legionella pneumophila*, wurde als dual funktionaler Faktor identifiziert, der sowohl die Lokalisation durch Dissoziation des Rab:GDI-Komplexes als auch die Aktivierung von Rab1 durch Nukleotidaustausch zu GTP beeinflussen kann (Machner und Isberg, 2007; Ingmundson *et al.*, 2007). Diese Aktivitäten wurden in dieser Arbeit näher charakterisiert und es konnte gezeigt werden, dass es sich nicht um zwei separate Aktivitäten handelt.

Die Charakterisierung der Nukleotidaustauschaktivität zeigte, dass DrrA ein sehr effektiver Nukleotidaustauschfaktor für Rab1 ist und es konnte gezeigt werden, dass diese Nukleotidaustauschaktivität die Basis für die in der Literatur beschriebene GDI-Freisetzungstätigkeit von DrrA ist. Aufgrund der Tatsache, dass die Affinität von GDI für GTP-gebundenes Rab deutlich geringer ist als für GDP-gebundenes Rab (Wu *et al.*, 2010), kann DrrA durch Nukleotidaustausch verhindern, dass nach einer Dissoziation des Rab1:GDI-Komplexes eine Reassoziierung erfolgt. Hierdurch verschiebt DrrA das Gleichgewicht zwischen GDI-gebundenem und freiem Rab-Protein und bewirkt so indirekt eine vollständige Dissoziation des Rab1:GDI-Komplexes. Um zu demonstrieren, dass dieser Freisetzungsmechanismus auf andere Rab-Proteine und ihre Nukleotidaustauschfaktoren übertragbar ist, wurde diese Studie systematisch auf weitere Rab-Proteine und ihre Nukleotidaustauschfaktoren erweitert. Der Nukleotidaustausch zu GTP nach der Dissoziation eines Rab:GDI-Komplexes konnte bei allen untersuchten Rab-Proteinen die Reassoziierung der Komplexe inhibieren und so eine Freisetzung der Rab-Proteine aus dem Komplex mit GDI bewirken. Diese Daten zeigen, dass der Regulationszyklus der Aktivierung von Rab-Proteinen den Lokalisationszyklus prinzipiell beeinflussen kann, und somit die Lokalisation der Rab-Proteine durch ihre Aktivierung beeinflusst werden kann.

1 Einleitung

1.1 Vesikulärer Transport

Die Entwicklung der Lichtmikroskopie zu Beginn des siebzehnten Jahrhunderts ermöglichte die Entdeckung von Mikroorganismen durch Antonie van Leeuwenhoek im Jahr 1676 (Dobell, 1932) und die ersten Beschreibungen von Zellen (Hooke, 1665). Etwa 200 Jahre später wurde erstmals über die Existenz von intrazellulären, strukturell abgegrenzten Bereichen in eukaryontischen Zellen berichtet. Robert Brown (1833) beschrieb zunächst die Existenz des Nukleus, und einige Jahre später wurden Mitochondrien als Bestandteil aller eukaryontischen Zellen identifiziert (Altmann, 1890). Die dritte im Lichtmikroskop sichtbare Organelle konnte 1898 von Camillo Golgi identifiziert werden, die Existenz des Golgi Apparats blieb aber bis zur Erfindung der Elektronenmikroskopie in den 50er Jahren umstritten (Farquhar und Palade, 1998). Die Elektronenmikroskopie machte nicht nur weitere Organellen sichtbar, die im Lichtmikroskop nicht erkennbar waren, sondern offenbarte auch die Existenz einer Vielzahl von Vesikeln. Diese – ausschließlich auf eukaryontische Zellen begrenzte – Kompartimentierung der Zelle ermöglicht die Bildung von unterschiedlichen Reaktionsräumen und die räumliche Begrenzung der Wirkung von verschiedenen Proteinen (van Meer *et al.*, 2008). Hierdurch kann ein deutlich höherer Grad der Regulation von biochemischen Prozessen im Vergleich zu prokaryontischen Zellen erreicht werden. Die Evolution des Nukleus z.B. ermöglichte die räumliche Trennung von Transkription und Translation, wodurch vermutlich eine größere Regulation und Komplexität der Proteinexpression durch Splicingprozesse ermöglicht wurde (Martin und Koonin, 2006).

Die verschiedenen Organellen weisen eine unterschiedliche Lipidzusammensetzung der sie umgebenden Membranen auf (van Meer *et al.*, 2008). Transportprozesse ermöglichen den stetigen Austausch von Material zwischen den verschiedenen Organellen und die Aufnahme und Abgabe von Material über die Plasmamembran. Um die räumliche Begrenzung der Organellen aufrecht zu erhalten, erfolgt der Transport durch die Abschnürung und die Fusion von Vesikeln. Der Prozess des Exports von Proteinen aus der Zelle – die Exocytose – wurde als erster vesikelvermittelter Transport bereits 1967 beschrieben (Jamieson und Palade, 1967). Das Gegenstück zur Exocytose ist die Endocytose. Bei diesem Prozess werden Bestandteile der extrazellulären Umgebung in die Zelle aufgenommen (Marsh und McMahon, 1999). Exocytose, Endocytose und der intrazelluläre Transport von Material zwischen den vielen verschiedenen Organellen unterliegt einer starken zeitlichen und räumlichen Kontrol-

le, die essentiell für die Funktion der Zelle ist. Die in dieser Arbeit untersuchten Proteine gehören zur Familie der Rab-Proteine, die eine zentrale Rolle bei der Regulation dieser Transportprozesse einnimmt (Hutagalung und Novick, 2011).

1.2 Kleine guaninnukleotidbindende Proteine

Die Rab-Proteine gehören zur Superfamilie der kleinen guaninnukleotidbindenden Proteine oder kleinen GTPasen (Takai *et al.*, 2001). Proteine dieser Superfamilie haben eine hohe Affinität für Guaninnukleotiddiphosphat und -triphosphat und agieren als molekulare Schalter in Zellen (Wennerberg *et al.*, 2005). Sie bestehen ausschließlich aus der für alle guaninnukleotidbindenden Proteine charakteristischen ca. 20 kDa großen G-Domäne, die aus fünf α -Helices und sechs β -Faltblättern aufgebaut ist (Abbildung 1-1). Die Proteine der Superfamilie weisen untereinander eine Sequenzhomologie von 30-60 % auf (Hall, 1990). Fünf hochkonservierte Bereiche – die G-Motive – interagieren mit dem Nukleotid (Abbildung 1-1, Bourne *et al.*, 1991). Das erste G-Motiv GxxxxGK(S/T) konnte bereits 1982 in Adenosintriphosphat (ATP) bindenden Proteinen als Walker A-Motiv identifiziert werden (Walker *et al.*, 1982). Es koordiniert die Phosphatgruppen des Nukleotids und wird aufgrund seiner Funktion als Phosphatbindeloop (P-loop) bezeichnet (Saraste *et al.*, 1990). Das G2 Motiv, ein hochkonserviertes Threonin, koordiniert zusammen mit dem G3 Motiv mit der Konsensussequenz DxxG ein für die Phosphatbindung essentielles Magnesiumion. G4 mit der Sequenz (N/T)KxD bindet die Nukleobase und ist für die Guaninnukleotidspezifität der kleinen GTPasen verantwortlich. Das letzte, relativ schwach konservierte G-Motiv ist in der letzten Schleife der kleinen GTPasen lokalisiert. Mit einem hochkonservierten Alanin interagiert es mit dem Nukleotid und stabilisiert außerdem Aminosäuren im G3 Motiv durch Wasserstoffbrückenbindungen (Bourne *et al.*, 1991).

Die Konformation von kleinen guaninnukleotidbindenden Proteinen variiert in zwei Bereichen, die als Switch I und Switch II bezeichnet werden, abhängig davon, ob Guanosindiphosphat (GDP) oder Guanosintriphosphat (GTP) in der Nukleotidbindungstasche vorliegt (Abbildung 1-1, Milburn *et al.*, 1990). Im GDP-gebundenen Zustand sind die Switch-Regionen strukturell flexibel. Im GTP-gebundenen Zustand sind die Switch Bereiche geordnet und ihre Konformation ist stark konserviert. Diese strukturellen Unterschiede bewirken eine starke Differenz in den Affinitäten der Effektorproteine für die GTP- bzw. GDP-gebundenen GTPa-

sen, wodurch die Funktion der GTPasen als molekulare Schalter ermöglicht wird (Herrmann *et al.*, 1995).

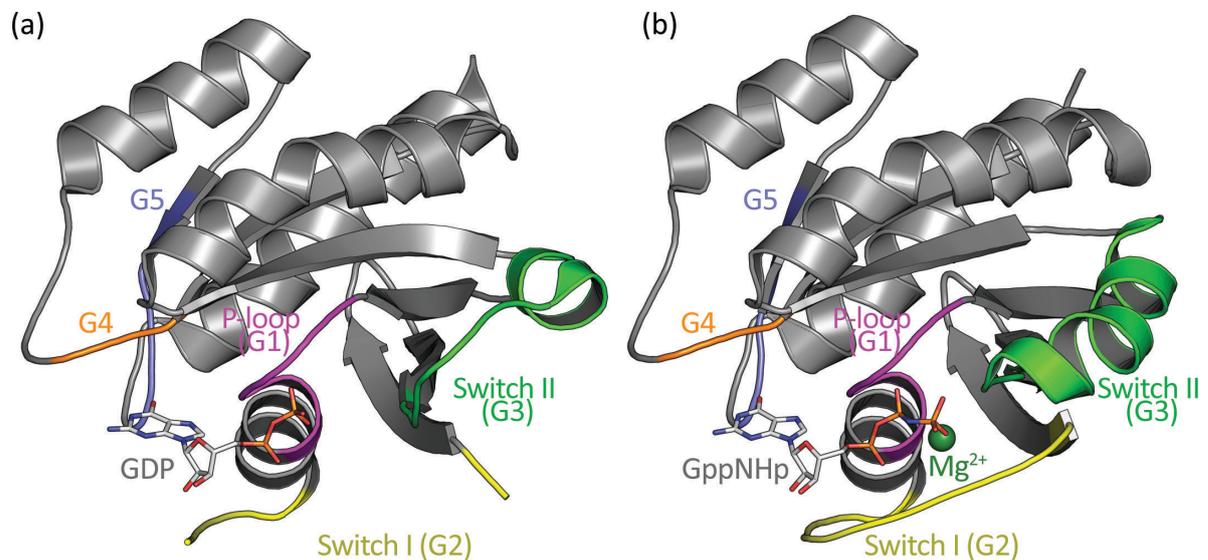


Abbildung 1-1: Strukturmodelle der kleinen GTPasen am Beispiel von Sec4:GDP (a, PDB ID: 1G16) und Sec4:GppNHp (b, PDB ID: 1G17) (Stroupe und Brunger, 2000)

Ein deutlicher Konformationsunterschied zwischen GDP- (a) und GTP-gebundener (b) Form der GTPase ist zu erkennen. Die im Text beschriebenen G-Motive sind farblich gekennzeichnet.

1.3 Rab-Proteine

Mit über 60 verschiedenen Proteinen im Menschen (Stenmark, 2009) und 11 in *S. cerevisiae* (Lazar *et al.*, 1997) stellt die Rab-Familie die größte Unterfamilie der Superfamilie der kleinen guaninnukleotidbindenden Proteine dar. Rab-Proteine spielen eine wichtige Rolle bei der Regulation des vesikulären Transports. Diese Transportprozesse können in verschiedene Schritte unterteilt werden, in denen eine genaue zeitliche und räumliche Regulation erforderlich ist (Bonifacino und Glick, 2004). Im ersten Schritt erfolgt die Ausstülpung und Freisetzung des Vesikels (*Budding*) – hier muss die Fracht des Vesikels sortiert werden und der Aufbau der Vesikelumhüllung (*Coat*) und die Abschnürung des Vesikels reguliert werden. Um die spätere Fusion des Vesikels mit der Zielmembran zu ermöglichen, erfolgt im zweiten Schritt im Cytoplasma der Abbau der Vesikelumhüllung, d.h. die Abtrennung der *Coat*-Proteine von den Vesikeln. Im dritten Schritt wird das Vesikel mit Hilfe des Cytoskeletts durch die Zelle transportiert und anschließend an die Zielmembran lokalisiert (*Tethering*). Eine starke Regulation der Interaktion mit Motorproteinen und eine exakte Erkennung der Zielmembran sind

in diesem Schritt essentiell. Anschließend erfolgt im letzten Schritt die Fusion des Vesikels mit der Zielmembran. Die Funktion der in dieser Arbeit verwendeten Rab-Proteine Rab1, Rab5, Rab35 und Sec4 – das zu Rab8 homologe Protein aus Hefe – in den einzelnen Schritten des Transports soll im Folgenden näher beschrieben werden.

Für Rab5 – das vermutlich am besten untersuchte Rab-Protein – wurde in allen oben beschriebenen Schritten des vesikulären Transports eine Funktion der GTPase identifiziert. Rab5 ist am endocytotischen Transport beteiligt und in Zellen auf der Plasmamembran, auf Clathrin-beschichteten Vesikeln und auf dem frühen Endosom lokalisiert (Chavrier *et al.*, 1990; Bucci *et al.*, 1992). Im ersten Schritt des vesikulären Transports ist Rab5 bei der Clathrin-abhängigen Endocytose essentiell für die Sortierung von Transferrin in Clathrin-beschichtete Vertiefungen (*clathrin-coated pits*) (McLauchlan *et al.*, 1998). Bei den entstandenen Vesikeln reguliert Rab5 den Abbau der Vesikelumhüllung durch Modifikation des Phosphatidylinositol-4,5-phosphat-Gehaltes der Clathrin-beschichteten Vesikel und indirekt durch Steuerung der μ 2-phosphorylierenden Kinase AAK1 mit Hilfe seines Nukleotid austauschfaktors h-RME6 (Semerdjieva *et al.*, 2008). Durch Regulation von Phosphatidylinositolkinasen reguliert Rab5 auch indirekt den Transport von Endosomen entlang der Mikrotubulis (Christoforidis *et al.*, 1999; Nielsen *et al.*, 1999). Die Regulation der Fusion von Vesikeln mit dem Endosom erfolgt direkt durch Interaktion von Rab5 mit diversen Effektoren (Grosshans *et al.*, 2006b). Auch bei der Fusion von Vesikeln scheint jedoch die Regulation der Phosphatidylinositolkomposition der Vesikel einen Einfluss auf die Rekrutierung von Effektoren zu haben (Lawe *et al.*, 2000).

Während Rab5 ein endocytotisches Rab-Protein ist, sind die anderen in dieser Arbeit untersuchten Proteine exocytotische Rab-Proteine. Rab1 reguliert den Transport vom Endoplasmatischen Retikulum zum *cis*-Golgi und Transportprozesse innerhalb des Golgi Komplexes (Baker *et al.*, 1990; Plutner *et al.*, 1991). Im letzten Jahr wurde zudem eine Funktion von Rab1 bei Transportprozessen in den *trans*-Golgi nachgewiesen (Sclafani *et al.*, 2010). Bei allen Transportprozessen wurden für Rab1 bisher im Wesentlichen Funktionen in den letzten Schritten des vesikulären Transports nachgewiesen. Der intrazelluläre Vesikeltransport entlang des Cytoskeletts wird von Rab1 vermutlich über MICAL Effektoren reguliert (Fischer *et al.*, 2005). Am Golgi Apparat interagiert Rab1 mit einer Vielzahl von Effektoren aus der Golgin-Familie (Satoh *et al.*, 2003; Weide *et al.*, 2001; Allan *et al.*, 2000; Beard *et al.*, 2005). Bei der Anheftung von COPI-Vesikeln an den Golgi hat der Rab1-Effektor p115 vermutlich eine

zentrale Rolle, da er den auf der Vesikelmembran lokalisierten Rab1-Effektor Giantin mit dem auf der Golgi-Membran lokalisierten Effektor GM130 verknüpft (Beard *et al.*, 2005; Sonnichsen *et al.*, 1998), wodurch die Assemblierung von SNAREpins und somit die anschließende Fusion der Vesikel ermöglicht wird (Shorter *et al.*, 2002). Beim Transport von COPII-Vesikeln verknüpft Rab1 die verschiedenen Transportschritte, indem es bereits während der Freisetzung des Vesikels aus dem Endoplasmatischen Retikulum p115 rekrutiert (Allan *et al.*, 2000). Hierdurch erfolgt die Assemblierung eines *cis*-SNARE-Komplexes, der das Vesikel bereits während der Entstehung für die Fusion mit dem Golgi programmiert (Moyer *et al.*, 2001).

Rab8 reguliert diverse Transportprozesse zur Zelloberfläche, wie z.B. den vesikulären Transport zur Dendritenoberfläche in Neuronen (Huber *et al.*, 1993a). Weiterhin ist Rab8 vermutlich in die Fusion von exocytotischen Vesikeln mit der Cillienmembran involviert (Nachury *et al.*, 2007) und spielt eine Rolle bei der Insulin-stimulierten Exocytose von GLUT4-Vesikeln (Sun *et al.*, 2010). In Epithelzellen reguliert Rab8 den Vesikeltransport vom *trans*-Golgi über das Recycling Endosom zur basolateralen Membran (Huber *et al.*, 1993b; Ang *et al.*, 2003; Henry und Sheff, 2008). Da Rab8 mit Myosin Vb (Roland *et al.*, 2007) und über einen Effektor mit Myosin VI interagiert (Sahlender *et al.*, 2005) und es weiterhin über MICAL-L2 vermutlich mit Aktin interagiert (Yamamura *et al.*, 2008; Terai *et al.*, 2006), wurde über eine Rolle von Rab8 beim Transport von Vesikeln spekuliert. In Epithelzellen konnte allerdings vor kurzem demonstriert werden, dass Rab8 keine Funktion bei der Entstehung von Vesikeln am Golgi und dem Transport dieser Vesikel zu haben scheint (Grigoriev *et al.*, 2011). Die Interaktion mit Elementen des Cytoskeletts könnte aber eine Rolle bei kurzen Transportprozessen zur Anheftung von Vesikeln an die Plasmamembran spielen. Die gleiche Studie zeigte, dass Rab8 eine wichtige Rolle bei der Anheftung von Vesikeln an die Plasmamembran und bei der Fusion von Vesikeln mit der Plasmamembran besitzt (Grigoriev *et al.*, 2011). Sec4, das Rab8-Homolog aus Hefe, reguliert durch Interaktion mit dem Exocyst-Komplex die Anheftung von Vesikeln an die Plasmamembran (Guo *et al.*, 1999). Weiterhin ist Sec4 durch Bildung eines ternären Komplex mit einem Effektor und einem t-SNARE-Protein vermutlich in die Fusion von Vesikeln mit der Plasmamembran involviert (Grosshans *et al.*, 2006a).

Rab35, eines der erst kürzlich näher beschriebenen Rab-Proteine, ist auf der Plasmamembran und dem endocytotischen Kompartiment lokalisiert und ist ein wichtiger Regulator des schnellen Recyclingtransportprozesses vom endocytotischen Kompartiment zur Plasmamem-

bran (Kouranti *et al.*, 2006; Allaire *et al.*, 2010). Über seinen Effektor Fascin kann Rab35 die Bildung von Aktinbündeln regulieren (Zhang *et al.*, 2009). Das zweite als Effektor identifizierte Protein – centaurin- β – reguliert die Aktivität einer anderen kleinen GTPase – Arf6 – und stellt daher ein interessantes Beispiel für die Koordination von verschiedener GTPase-Aktivitäten dar (Kanno *et al.*, 2010).

1.3.1 Regulation von Rab-Proteinen

Um die von Rab-Proteinen regulierten zellulären Prozesse zum richtigen Zeitpunkt und an der richtigen intrazellulären Membran zu aktivieren, muss die Lokalisation und Aktivierung der verschiedenen Rab-Proteine exakt koordiniert werden. Diese Regulation erfolgt in zwei miteinander verschalteten Zyklen und wird durch eine große Anzahl verschiedener Proteine gewährleistet (Abbildung 1-2). Die Verschaltung dieser zwei Zyklen, bestehend aus Lokalisation und Aktivierung, soll in dieser Arbeit näher untersucht werden.

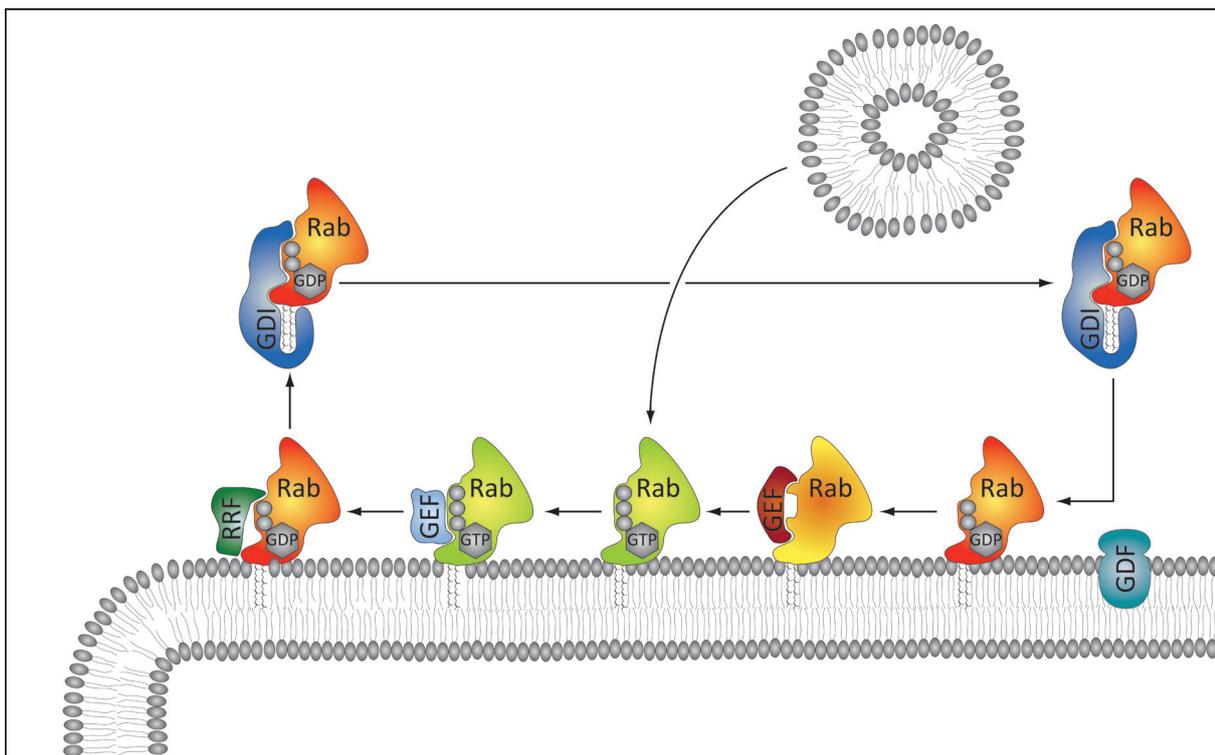


Abbildung 1-2: Regulation der Rab-Proteine

Die Aktivität der Rab-Proteine in der Zelle wird durch ihre Lokalisation (Abschnitt 1.3.1.1) und Nukleotidaustausch (Abschnitt 1.3.1.2) reguliert. Der Lokalisationszyklus der Rab-Proteine ist mit dem Regulationszyklus der Aktivierung verschaltet, da die Aktivierung und Deaktivierung der Rab-Proteine in der Regel durch membranlokalisierte Proteine erfolgt. (GDI: Guaninnukleotid-Dissoziationsinhibitor, GDF: *GDI Displacement Factor*, GEF: Guaninukleotidaustauschfaktor, GAP: GTPase aktivierendes Protein, RRF: Rab Recycling Faktor)

1.3.1.1 Lokalisation von Rab-Proteinen

Im ersten Regulationszyklus der Rab-Proteine wechseln die Rab-Proteine zwischen einer membranständigen und einer cytosolischen Lokalisation. Rab-Proteine liegen in der Zelle in der Regel mit C-terminalen Prenylankern vor. Diese Modifikation ermöglicht ihnen, mit Membranen zu interagieren (Khosravifar *et al.*, 1991; Kinsella und Maltese, 1992; Peter *et al.*, 1992). Die Prenylierung von Rab-Proteinen erfolgt durch das heterodimere Protein Geranylgeranyltransferase-II (GGTase-II), das auch Rab GGTase genannt wird (Moore *et al.*, 1991; Seabra *et al.*, 1992b). GGTase-II erkennt dabei im Unterschied zu anderen Prenyltransferasen nicht ausschließlich die C-terminale Erkennungssequenz eines Proteins, sondern benötigt zur Bindung des Substrats das Rab Eskort Protein (REP) (Andres *et al.*, 1993). Je nach C-terminaler Sequenz des Rab-Proteins erfolgt dann an den vorhandenen ein bis zwei Cysteinseitenketten eine Modifikation mit dem C₂₀-Isoprenoid Geranylgeranyl (Farnsworth *et al.*, 1991; Farnsworth *et al.*, 1994; Joberty *et al.*, 1993; Wilson *et al.*, 1998). Die in dieser Arbeit verwendeten Rab-Proteine Rab1 und Rab5 liegen in der Zelle mit zwei Isoprenoidmodifikationen vor (Farnsworth *et al.*, 1994), während Rab8 nur einfach prenyliert wird (Joberty *et al.*, 1993). Für Rab35 ist aufgrund der zwei C-terminalen Cysteine ebenfalls eine doppelte Modifikation zu erwarten (Farnsworth *et al.*, 1994). Nach der Prenylierung dissoziiert vermutlich zunächst die GGTase vom Rab:REP-Komplex (Rak *et al.*, 2004). Anschließend kann das Rab-Protein dann von REP auf einem bisher nicht genau untersuchten Weg an eine Membran übertragen werden (Alexandrov *et al.*, 1994).

Aufgrund der starken Hydrophobizität der Isoprenoidreste können die prenylierten Rab-Proteine nicht frei im Cytoplasma vorliegen. Zur Abschirmung der hydrophoben Gruppen liegen die Rab-Proteine daher im Cytoplasma in der Regel im Komplex mit einem weiteren Protein, dem Guaninnukleotid-Dissoziationsinhibitor (GDI), vor (Regazzi *et al.*, 1992). GDI zeigt eine relativ starke Struktur- und Sequenzhomologie mit REP (Abbildung 1-3, Seabra *et al.*, 1992a; Schalk *et al.*, 1996; Pylypenko *et al.*, 2003). Im Unterschied zu REP bindet es allerdings nur mit relativ geringer Affinität an unmodifizierte Rab-Proteine und kann Rab-Proteine nicht effektiv aus Membranen extrahieren (Araki *et al.*, 1990; Ullrich *et al.*, 1993). Die Fähigkeit von GDI, Rab-Proteine aus Membranen zu extrahieren ist nukleotidabhängig (Araki *et al.*, 1990). Diese Nukleotidabhängigkeit kann dadurch erklärt werden, dass die Affinität von GDI für GDP-gebundene Rab-Proteine mehrere Größenordnungen über der Affinität für die GTP gebundene Form liegt (Wu *et al.*, 2010). GDI hat somit eine wichtige Funktion

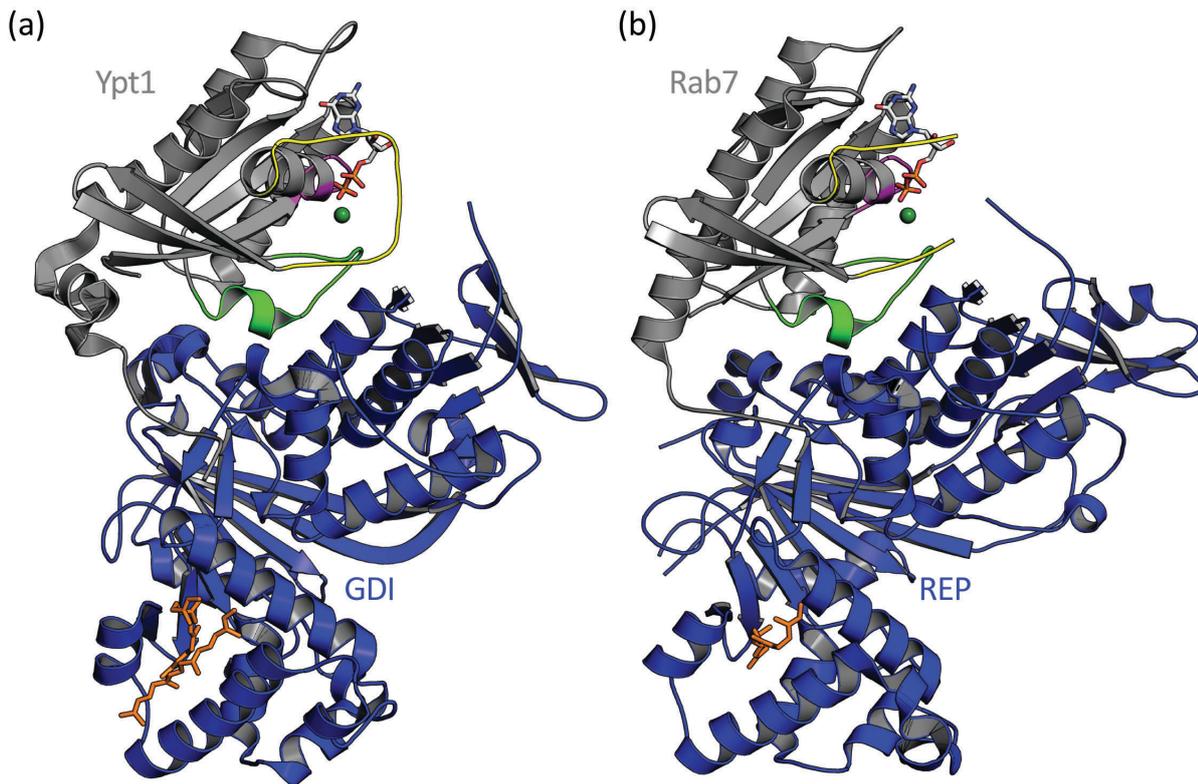


Abbildung 1-3: Kristallstrukturen von Ypt1-di-geranylgeranyl im Komplex mit GDI (a, PDB ID: 2BCG, Pylypenko *et al.*, 2006) und Rab7-geranylgeranyl im Komplex mit REP (b, PDB ID: 1VG0, Rak *et al.*, 2004)

REP und GDI sind in blau dargestellt und die gebundenen Rab-Proteine in grau. Switch I (gelb), Switch II (grün) und der P-loop (magenta) sind farblich hervorgehoben. Alle Proteine sind im Bändermodell dargestellt. GDP ist in Stabform dargestellt. Das Magnesiumion in der Nukleotidbindungstasche ist durch eine grüne Kugel dargestellt. Die in der Bindungstasche von GDI bzw. REP gebundenen Geranylgeranylreste sind in Stabform in orange dargestellt. Die Struktur der prenylierten C-terminalen Region der Rab-Proteine ist in beiden Kristallstrukturen aufgrund einer hohen Mobilität nicht aufgelöst. Eine starke strukturelle Ähnlichkeit zwischen GDI und REP ist deutlich zu erkennen.

bei der Regulation der Lokalisation der Rab-Proteine, da es inaktive Rab-Proteine aus der Membran entfernt und so ein cytosolisches Reservoir von Rab-Proteinen aufrechterhält (Abbildung 1-2). Ob GDI ohne einen Kofaktor in der Lage ist, prenylierte Rab-Proteine effektiv aus Membranen zu extrahieren, ist unklar, da alle bis zum heutigen Zeitpunkt beschriebenen Experimente zur Extraktion von Rab-Proteinen durch GDI mit natürlichen zellulären Membranen durchgeführt wurden, die eine Vielzahl von Proteinen und somit Kofaktoren enthalten können (Araki *et al.*, 1990; Ullrich *et al.*, 1993; Soldati *et al.*, 1993; Alory und Balch, 2003). Da die Bindung an die Prenylanker einen Großteil der Affinität von GDI für Rab-Proteine ausmacht, wäre aus thermodynamischer Sicht eine Extraktion ohne Kofaktor denk-

bar (Ignatev *et al.*, 2008). Luan *et al.* (1999) konnten allerdings nachweisen, dass die Lokalisation von GDI an Membranen Trypsin-sensitiv und somit vermutlich von einem Protein reguliert ist. Diese, durch einen speziellen Bereich von GDI – den mobilen Effektor-Loop – regulierte, Interaktion ist essentiell für die Extraktion von Rab-Proteinen aus der Membran (Luan *et al.*, 2000). Publikationen der letzten Jahre zeigen, dass es sich bei diesem als Rab Recycling Faktor (RRF) benannten Protein vermutlich um den Hsp90 Chaperon-Komplex handelt. Dieser wurde im Cytoplasma im Komplex mit GDI und Rab1 bzw. Rab3 und an Membranen im Komplex mit GDI nachgewiesen und eine Abhängigkeit dieser Bindung vom mobilen Effektor-Loop wurde demonstriert (Sasaki *et al.*, 1990; Balch und Chen, 2006). Die Extraktion von Rab3 aus synaptischen Vesikeln wird durch Hsp90-Inhibitoren, die die Dissoziation von GDI und Hsp90 verhindern, inhibiert (Sakisaka *et al.*, 2002). Die Extraktion von Rab1 aus Golgi-Membranen wird durch diese Inhibitoren ebenfalls signifikant reduziert (Balch und Chen, 2006).

Da die Prenylanker der Rab-Proteine von GDI gebunden werden, können sie nur nach der Dissoziation von GDI mit der Membran interagieren. Wie eine solche Regulation erreicht werden kann, ist bisher weitgehend unerforscht und Untersuchungen zu dieser Frage stehen im Fokus der vorliegenden Arbeit. Auf die bisher vorhandenen Daten zu diesem Thema soll im Folgenden näher eingegangen werden.

In ersten Versuchen zur Assoziation von Rab-Proteinen mit Membranen demonstrierten 1994 zwei Gruppen, dass die Membranassoziation der zwei endosomalen Rab-Proteine Rab5 und Rab9 von einem Nukleotidaustausch begleitet ist, wobei der Nukleotidaustausch kurz vor der Bindung der Rab-Proteine an die Membran erfolgt (Ullrich *et al.*, 1994; Soldati *et al.*, 1994). Aufgrund dieser Ergebnisse postulierten sie, dass vor der Aktivierung der Rab-Proteine ein sogenannter *GDI displacement factor* (GDF) die Dissoziation des Rab:GDI-Komplexes bewirkt. Martincic *et al.* (1997) identifizierten drei Jahre später ein Protein in Ratten – den *Prenylated Rab Acceptor 1* (PRA1) – das an prenylierte Rab-Proteine bindet. Dieses periphere Membranprotein liegt sowohl im Cytoplasma als auch an Membranen vor und besitzt neben einer relativ unspezifischen Bindungsaffinität für Rab-Proteine (Rab1, Rab3, Rab5, Rab6) (Janoueix-Lerosey *et al.*, 1995; Martincic *et al.*, 1997) eine schwache Bindungsaffinität für GDI (Hutt *et al.*, 2000). Es kann allerdings nicht in einem ternären Komplex mit Rab-Proteinen und GDI detektiert werden (Hutt *et al.*, 2000). In einem *in vitro* Extraktionsassay wurde nachgewiesen, dass ein Überschuss von PRA1 gegenüber GDI die Extraktion von Rab3

aus der Membran inhibiert (Hutt et al, 2000). Eine Familie von PRA1-Homologen, die sogenannten *Ypt Interacting Proteins* (YIP) aus Hefe, interagieren mit einer Vielzahl von Rab-Proteinen (Calero und Collins, 2002; Calero et al., 2002). Die Interaktion erfolgt, wie für PRA1, in Abhängigkeit von einer Prenylierung der Proteine (Calero und Collins, 2002; Calero et al., 2002) und für Sec4 konnte gezeigt werden, dass eine zweifache Geranylgeranylierung für die Interaktion essentiell ist (Calero et al., 2003). Für mehrere Rab-Proteine wurde außerdem bewiesen, dass ihre Lokalisation in humanen Zellen und in Hefe abhängig von einer zweifachen Geranylgeranyl-Modifikation ist (Gomes et al., 2003; Calero et al., 2003). In Kombination mit der Tatsache, dass bei einer Mutation von Yip1 in Hefe das eigentlich Golgi lokalisierte Ypt1 im Cytoplasma vorliegt, schlussfolgerten Calero et al. (2003), dass die Yip Proteine für die Lokalisation der Rabs und somit für die Abhängigkeit von einer Digeranylgeranylierung verantwortlich sind. Die Mislokalisierung von Ypt1 konnte allerdings von Barrowman et al. (2003) in Yip1 depletierten Hefezellen nicht bestätigt werden. Humanes Yip3/PRA1 ist in katalytischen Mengen in der Lage, in *in vitro* Assays einen Komplex aus Rab9 und GDI zu trennen. Weiterhin kann Yip3/PRA1 die Membranrekrutierung von Rab9 aus einem Komplex mit GDI bewirken (Sivars et al., 2003). Auch für die zwei anderen endosomalen Rabs, Rab5 und Rab7, zeigt Yip3/PRA1 eine vergleichbare Aktivität, während Yip3/PRA1 keine Aktivität gegenüber Rab1 und Rab2 im Komplex mit GDI aufweist (Sivars et al., 2003). Nach einer Reduktion der Yip3/PRA1-Konzentration durch RNAi ist die Menge membranassoziierten Rab9 in Zellen signifikant reduziert (Sivars et al., 2003).

In humanen Zellen wurden bisher 16 Mitglieder der Yip-Familie identifiziert werden (Pfeffer und Aivazian, 2004). Wie oben beschrieben, wurde bisher allerdings lediglich für ein Mitglied dieser Familie eine Funktion bei der Regulation der Rab:GDI-Interaktion nachgewiesen. Basierend auf den für Yip3/PRA1 beschriebenen Experimenten können keine Rückschlüsse auf die Wirkungsweise von Yip3/PRA1 gemacht werden. Es ist auch unklar, ob Yip3/PRA1 in der Lage ist, die Dissoziation des Rab:GDI-Komplexes zu beschleunigen.

1.3.1.2 Aktivierung und Deaktivierung von Rab-Proteine

Im zweiten Zyklus der Rab-Regulation wechseln die Rab-Proteine zwischen einer GTP-gebundenen und einer GDP-gebundenen Form. In der GTP-gebundenen, sogenannten aktiven, Form erfolgt die Interaktion mit Effektorproteinen und hierdurch die Aktivierung von Signaltransduktionsprozessen. Da die Aktivierung und Deaktivierung der Rab-Proteine in der

Regel nur an Membranen erfolgt, ist dieser Zyklus mit dem oben beschriebenen Lokalisationszyklus direkt verschaltet. Im Fokus dieser Arbeit steht die Frage inwieweit der Lokalisationszyklus durch die Aktivierung von Rab-Proteinen beeinflusst werden kann.

Rab-Proteine haben eine sehr geringe intrinsische Nukleotidhydrolyse- und Nukleotid austauschaktivität (Simon *et al.*, 1996). Zur genauen Steuerung der Effektorinteraktionen von Rab-Proteinen erfolgt die Aktivierung der Rab-Proteine, durch Austausch von GDP zu GTP, mit Hilfe von Guaninnukleotid austauschfaktoren (GEFs) und die Deaktivierung mit GTPase aktivierende Proteine (GAPs).

GAP-Proteine katalysieren die Deaktivierung der Rab-Proteine durch Hydrolyse von GTP, indem sie die relativ langsame intrinsische GTPase-Aktivität der Rab-Proteine beschleunigen. Mit Ausnahme von Rab3-GAP und LepB enthalten alle bisher identifizierten Rab-GAPs eine TBC-Domäne (Fukui *et al.*, 1997; Ingmundson *et al.*, 2007; Fukuda, 2011). TBC-Proteine stabilisieren den Übergangszustand der Nukleotidhydrolyse analog zu Ras-GAPs und Rho-GAPs (Scheffzek *et al.*, 1997; Rittinger *et al.*, 1997) durch Interaktion eines Arginins – dem sogenannten Argininfinger – mit den Sauerstoffatomen des β - und γ -Phosphats (Pan *et al.*, 2006). Im Unterschied zu anderen bekannten GAPs interagiert die TBC-Domäne außerdem durch einen Glutaminfinger mit dem γ -Phosphat (Abbildung 1-4 a, Pan *et al.*, 2006). Diese stabilisierende Interaktion erfolgt bei Ras- und Rho-GAPs durch das konservierte Glutamin des DxxG Motivs (Abbildung 1-4 b).

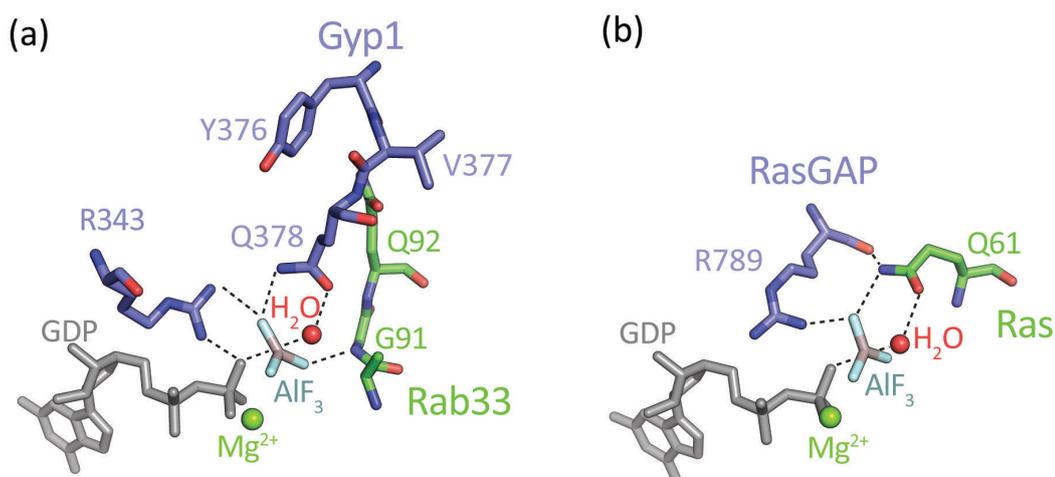


Abbildung 1-4: Rab33:Gyp1- (a, PDB ID: 2G77, Pan *et al.*, 2006) und Ras:RasGAP- (b, PDB ID: 1WQ1, Scheffzek *et al.*, 1997) Komplexe im Übergangszustand der GTP-Hydrolyse, der von GDP und Aluminiumfluorid initiiert wird

Die GTPasen sind in grün dargestellt und ihre GAP-Proteine in blau. Die Abbildung wurde adaptiert von Pan *et al.* (2006).

Im menschlichen Proteom wurden bisher 42 TBC-Proteine identifiziert und für einen nicht unwesentlichen Teil von ihnen wurde eine GAP-Aktivität nachgewiesen (Fukuda, 2011). Aufgrund der Tatsache, dass bei 70 % der identifizierten TBC-Proteine das katalytische Glutamin und der Argininfinger konserviert sind (Pan *et al.*, 2006), wird davon ausgegangen, dass ein Großteil der TBC-Proteine GAP-Aktivität für Rab-Proteine besitzen. Trotz dieser großen Anzahl an putativen Rab-GAPs, ist die räumliche und zeitliche Regulation der Deaktivierung der Rab-Proteine bisher allerdings nahezu vollständig unerforscht.

Im Unterschied zu den GTPase aktivierenden Proteinen zeigen die Guaninnukleotid austauschfaktoren kein einheitliches Strukturmotiv. Um die Freisetzung des Nukleotids zu beschleunigen, verwenden allerdings alle GEF-Proteine ähnliche Mechanismen (Vetter und Wittinghofer, 2001). Durch Konformationsänderungen im Bereich des Phosphatbindeloops und der Switch-Regionen wird die Nukleotidbindungstasche deformiert und so die Nukleotidaffinität verringert. Weiterhin wird durch die Bindung des GEFs die Magnesiumbindungsstelle sterisch blockiert oder deformiert. Trotz der strukturellen Divergenz der Rab-GEFs können einige wiederkehrende Domänen in den GEF-Proteinen identifiziert werden, auf die im Folgenden näher eingegangen wird.

Für verschiedene Mitglieder der Rab5-Subfamilie, bestehend aus Rab5a-c, Rab21, Rab22a und Rab31 (Rab22b) (Pereira-Leal und Seabra, 2001), wurde eine Aktivierung durch Proteine mit einer Vps9-Domäne beschrieben. Wie aus Tabelle 1-1 deutlich hervorgeht, wurde für einen Großteil der beschriebenen Vps9-Proteine eine GEF-Aktivität gegenüber Rab5 nachgewiesen. Es ist allerdings keinesfalls nachgewiesen, dass Rab5 in allen Fällen das native Substrat dieser GEF-Proteine ist, da ein Großteil der *in vitro*-Tests ausschließlich mit Rab5 und nicht den anderen Proteinen dieser Subfamilie durchgeführt wurden. Für Rabex-5, das ursprünglich als GEF von Rab5 identifiziert wurde (Horiuchi *et al.*, 1997), wurde beispielsweise in späteren Studien eine vergleichbare GEF-Aktivität gegenüber Rab21 nachgewiesen (Delprato *et al.*, 2004). RME-6 aus *Caenorhabditis elegans* wurde in einem *Two-Hybrid*-Assay als Interaktionspartner von Rab5 identifiziert und das humane Homolog von RME-6, RAP6, besitzt Nukleotid austauschaktivität gegenüber Rab5 (Sato *et al.*, 2005; Hunker *et al.*, 2006). Ausschließlich mit dem RME-6-Homolog aus *Mus musculus*, Gapex-5, wurde allerdings ein Nukleotid austauschassay mit Rab31 durchgeführt (Lodhi *et al.*, 2007). In diesem Versuch zeigte das Protein eine deutlich stärkere Nukleotid austauschaktivität gegenüber Rab31 als gegenüber Rab5 (Lodhi *et al.*, 2007).

Tabelle 1-1: Vps9-GEF-Proteine und ihre Rab Substrate		
GEF	Rab	
Rabex-5/Vps9	Rab5/Vps21 Rab21 & Rab22a*	Horiuchi <i>et al.</i> (1997), Hama <i>et al.</i> (1999) Delprato <i>et al.</i> (2004)
Rin1	Rab5	Tall <i>et al.</i> (2001)
Rin2	Rab5	Saito <i>et al.</i> (2002)
Rin3	Rab5	Kajiho <i>et al.</i> (2003)
Rin-like	Rab5, Rab22	Woller <i>et al.</i> (2011)
Als2	Rab5	Otomo <i>et al.</i> (2003)
Als2CL	Rab5	Hadano <i>et al.</i> (2004)
Varp	Rab21 & Rab5*	Zhang <i>et al.</i> (2006)
RME-6/Gapex5 /RAP6	Rab5 & Rab31	Sato <i>et al.</i> (2005), Lodhi <i>et al.</i> (2007), Hunker <i>et al.</i> (2006)

*: geringe Aktivität

In Abbildung 1-5 ist die Struktur der katalytischen Domäne von Rabex-5 im Komplex mit Rab21 dargestellt (Delprato und Lambright, 2007). Die Vps9-Domäne besteht aus 6 α -Helices, die sich in einer zuvor unbekanntenen Faltung zusammenlagern. Die N-terminale *Helical Bundle*-Domäne dient vermutlich der Stabilisierung der Vps9-Domäne.

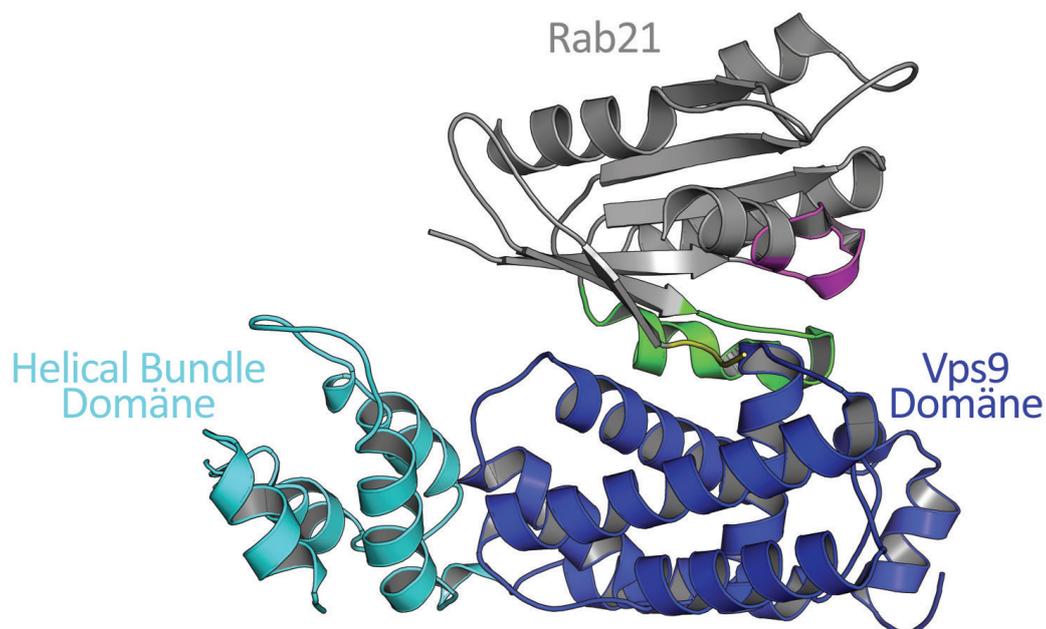


Abbildung 1-5: Struktur der Rabex-5 *Helical Bundle*- (hellblau) und Vps9-Domäne (dunkelblau) im Komplex mit Rab21 (grau) (PDB ID: 2OT3, Delprato und Lambright, 2007)

In Rab21 sind die Switch-Regionen und der P-loop farblich hervorgehoben (Switch I: gelb, Switch II: grün, P-loop: magenta).

Eine weitere Domäne, die in einer Reihe von Rab-GEFs identifiziert wurde, ist die DENN-Domäne. Die DENN-Domäne besteht aus drei Subdomänen, der uDENN (*upstream* DENN), der DENN und der dDENN (*downstream* DENN), die vom N-Terminus gesehen in dieser Reihenfolge angeordnet und durch variable Zwischenregionen miteinander verbunden sind (Levivier *et al.*, 2001). Im Menschen wurden bisher 18 Proteine mit einer DENN-Domäne (im Folgenden DENN-Proteine) identifiziert, die in 8 Subfamilien eingeteilt werden können (Marat *et al.*, 2011). Die Mitglieder der verschiedenen Subfamilien und die Rab-Proteine gegenüber denen eine GEF-Aktivität nachgewiesen wurde, sind in Tabelle 1-2 aufgelistet. In einer großen Studie mit 17 humanen DENN-Proteinen und 30 verschiedenen humanen Rab-Proteinen wurde nachgewiesen, dass alle DENN-Proteine GEF-Aktivität gegenüber Rabs zeigen und dass diese GEF-Aktivität relativ spezifisch für bestimmte Rab-Proteine ist (Yoshimura *et al.*, 2010). Ein Großteil der humanen DENN-Proteine sind Multidomänenproteine und in dieser Studie wurden nur Proteine der vollen Länge untersucht, so dass nicht

Tabelle 1-2: DENN-Proteine und ihre Rab Substrate			
Subfamilie	DENN-Proteine	Rabs	
DENND1	DENND1A / Connecdenn1	Rab35	Alllaire <i>et al.</i> (2010), Marat und McPherson (2010), Yoshimura <i>et al.</i> (2010)
	DENND1B / Connecdenn2	Rab35	Marat und McPherson (2010), Yoshimura <i>et al.</i> (2010)
	DENND1C / Connecdenn3	Rab35	Marat und McPherson (2010), Yoshimura <i>et al.</i> (2010)
DENND2	DENND2A-C	Rab1b [‡]	Yoshimura <i>et al.</i> (2010)
		Rab9a, Rab9b	Yoshimura <i>et al.</i> (2010)
DENND3	DENND3	Rab12	Yoshimura <i>et al.</i> (2010)
DENND4	DENND4A-C	Rab10	Yoshimura <i>et al.</i> (2010)
DENND5	DENND5A-B	Rab39	Yoshimura <i>et al.</i> (2010)
DENND6	DENND6A-B		bisher keine Daten vorhanden
MTMR5/13	MTMR5, MTMR13	Rab28	Yoshimura <i>et al.</i> (2010)
Rab3GEP/MADD	Rab3GEP / MADD	Rab3	Wada <i>et al.</i> (1997), Figueiredo <i>et al.</i> (2008)
		Rab27	Figueiredo <i>et al.</i> (2008), Yoshimura <i>et al.</i> (2010)

[‡] nur lange Isoform

sichergestellt ist, dass die GEF-Aktivität in allen Fällen auf die DENN-Domäne zurückzuführen ist. Für Connecdenn2 wurde z.B. in der längeren Isoform, die neben der DENN-Domäne noch weitere Domänen enthält, eine Nukleotidaustauschaktivität gegenüber Rab1b nachgewiesen, die mit der kurzen, nur die DENN-Domäne enthaltenden, Isoform nicht beobachtet wurde (Yoshimura *et al.*, 2010). Die bisher am ausführlichsten charakterisierte Subfamilie der DENN-Proteine besteht aus den Proteinen Connecdenn1-3. Die isolierten DENN-Domänen von allen drei Proteinen haben eine Nukleotidaustauschaktivität gegenüber Rab35 (Allaire *et al.*, 2010; Marat und McPherson, 2010), wobei die GEF-Aktivität von Connecdenn1 bis zu Connecdenn3 graduell abnimmt (Marat und McPherson, 2010). Die für Connecdenn3 beschriebene Aktivität ist allerdings sehr gering und konnte in einer anderen Untersuchung (Yoshimura *et al.*, 2010) nicht bestätigt werden.

Neben den zwei bisher beschriebenen relativ großen Familien der Vps9- und DENN-Domänen-Proteine wurde eine Reihe von weiteren strukturell nicht miteinander verwandten Nukleotidaustauschfaktoren von Rab-Proteinen identifiziert, die in Tabelle 1-3 aufgelistet sind. Die TRAPP-Komplexe sind die einzigen bisher identifizierten Rab-GEF-Proteine, bei denen mehr als zwei Proteine zur Bildung einer aktiven GEF-Domäne benötigt werden. In Hefe wurden bisher drei TRAPP-Komplexe identifiziert, die verschiedene Transportprozesse in der Zelle regulieren (Sacher *et al.*, 2001; Cai *et al.*, 2005; Lynch-Day *et al.*, 2010). Die Proteinkomplexe unterscheiden sich in ihrer Proteinzusammensetzung. Alle drei Komplexe enthalten TRAPPI bestehend aus sechs Proteinen (Bet3, Bet5, Trs20, Trs23, Trs31 und Trs33) als Kernkomplex (Sacher *et al.*, 2001). TRAPP II besteht aus weiteren drei Proteinen (Trs65, Trs120 und Trs130) (Sacher *et al.*, 2001), während zur Bildung von TRAPP III nur ein weiteres

Tabelle 1-3: Sonstige GEF-Proteine und ihre Rab Substrate

GEF	Rab	
TRAPP-Komplex	Ypt1 / Rab1	Wang <i>et al.</i> (2000), Jones <i>et al.</i> (2000), Sacher <i>et al.</i> (2001), Morozova <i>et al.</i> (2006) / Yamasaki <i>et al.</i> (2009)
	Ypt31/32*	Jones <i>et al.</i> (2000), Morozova <i>et al.</i> (2006)
Sec2	Sec4	Walch-Solimena <i>et al.</i> (1997)
Rabin3/Rabin8	Rab8	Hattula <i>et al.</i> (2002)
GRAB	Rab3a	Luo <i>et al.</i> (2001)
Ric1-Rgp1	Ypt6p	Siniosoglou <i>et al.</i> (2000)
Mon1-Ccz1	Ypt7	Nordmann <i>et al.</i> (2010)

*: umstritten

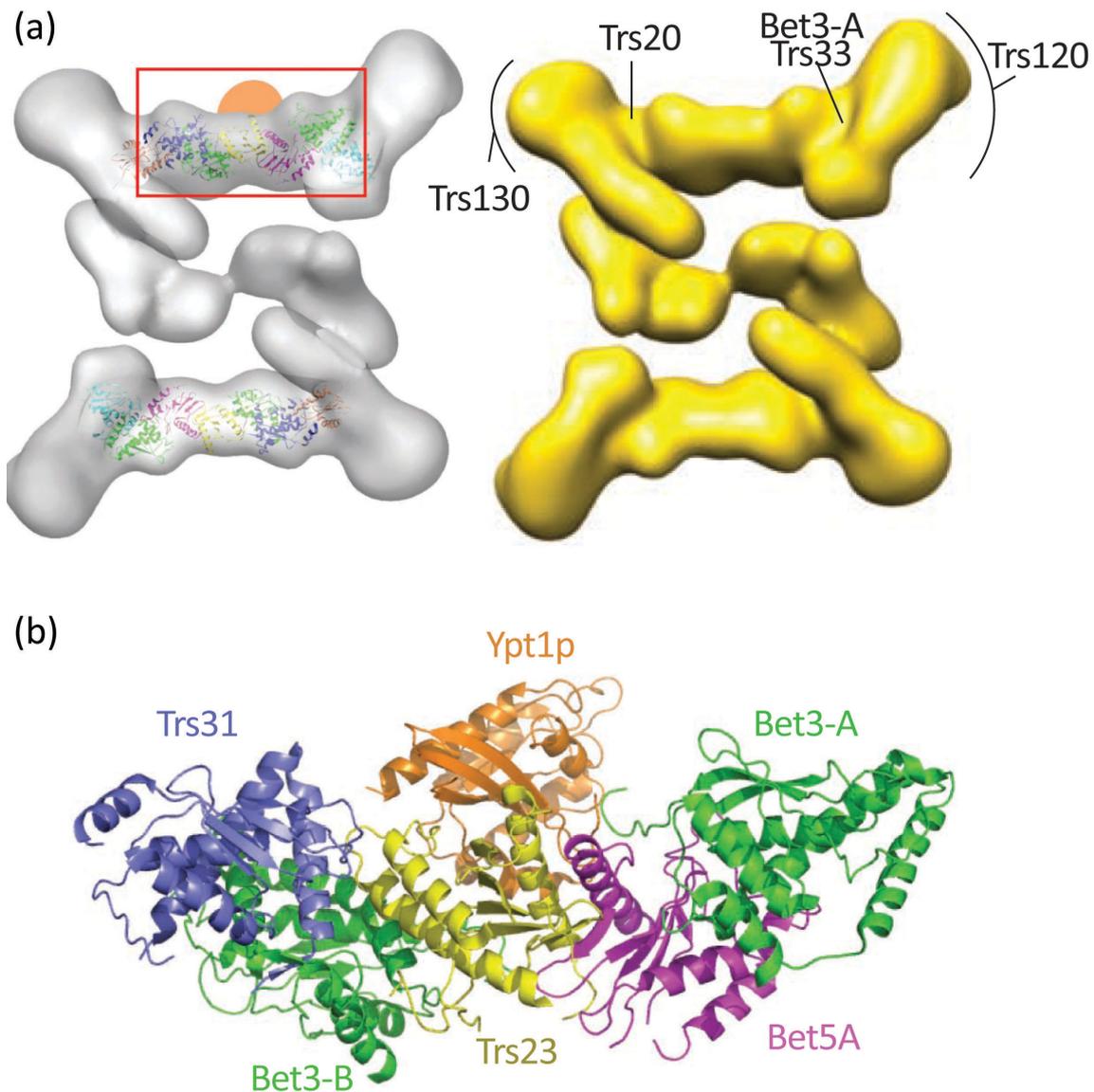


Abbildung 1-6: Struktur der TRAPP-Komplexe

(a) Elektronenmikroskopie-Struktur des TRAPP-II-Komplexes aus *S. cerevisiae* (grau) und schematische Darstellung der Lokalisation TRAPP-Untereinheiten (gelb). Die Struktur des TRAPP-I-Komplexes wurde in die grau dargestellte Elektronenmikroskopie-Struktur eingepasst. Der Bereich in dem Ypt1p basierend auf der in (b) dargestellten Kristallstruktur an den Komplex binden sollte, ist in orange dargestellt. Der Komplex liegt als Dimer vor. Abbildung adaptiert von Yip *et al.* (2010).

(b) Bändermodell der Kristallstruktur von einem Teil von TRAPP-I im Komplex mit Ypt1p (PDB ID: 3CUE, Cai *et al.*, 2008). Abbildung adaptiert von Yip *et al.* (2010).

Protein, Trs85, an den TRAPP-I-Kernkomplex bindet (Lynch-Day *et al.*, 2010). Alle drei TRAPP-Komplexe zeigen eine Nukleotidaustauschaktivität gegenüber Ypt1 – dem Rab1-Homolog aus Hefe (Wang *et al.*, 2000; Jones *et al.*, 2000; Sacher *et al.*, 2001; Lynch-Day *et al.*, 2010). Die Austauschaktivität des TRAPP-II-Komplexes für Ypt1 ist allerdings umstritten, da einige Grup-

pen ausschließlich eine Ypt31/32 GEF-Aktivität beschreiben (Jones *et al.*, 2000; Morozova *et al.*, 2006), die wiederum in anderen Studien nicht belegt werden konnte (Wang und Ferro-Novick, 2002). Das minimale Ypt1-GEF ist ein Proteinkomplex aus Bet3, Bet5, Trs23 und Trs31 (Kim *et al.*, 2006). In elektronenmikroskopischen Studien zeigt sich der TRAPP-II-Komplex als Dimer (Abbildung 1-6 a) (Yip *et al.*, 2010). In der Kristallstruktur des Komplexes mit Ypt1 interagieren Bet3, Bet5 und Trs23 direkt mit Ypt1 (Abbildung 1-6 b). Trs31 bewirkt durch Bindung an den Komplex vermutlich eine konformationale Änderung, die die Bindung von Ypt1 an den Komplex erst ermöglicht und ist daher essentiell für die Nukleotidaustauschaktivität (Cai *et al.*, 2008). Obwohl der TRAPP-Komplex von Hefe bis zum Menschen konserviert ist, scheint es im Menschen nur einen einzigen TRAPP-Komplex (TRAPP-II) zu geben, der vermutlich durch verschiedene Isoformen der Proteine variiert wird (Kummel *et al.*, 2008). Auch der humane TRAPP-Komplex besitzt eine Nukleotidaustauschaktivität gegenüber Rab1 (Yamasaki *et al.*, 2009).

Sec2 aus Hefe wurde als Nukleotidaustauschfaktor von Sec4, dem Rab8-Homolog aus Hefe, beschrieben (Walch-Solimena *et al.*, 1997) und ist unter den bisher biochemisch charakterisierten Nukleotidaustauschfaktoren für Rab-Proteine der katalytisch Effektivste (Itzen *et al.*, 2007). Die GEF-Domäne von Sec2 bildet ein Homodimer und ist zu einem langen, parallelen *coiled-coil* geformt, dessen Bindung an Sec4 zu den für GEFs klassischen Konformationsänderungen in den Switch-Regionen und dem P-loop führt (Abbildung 1-7, Dong *et al.*, 2007). In Säugerzellen wurden zwei Nukleotidaustauschfaktoren mit *coiled-coil*-Domänen und einer

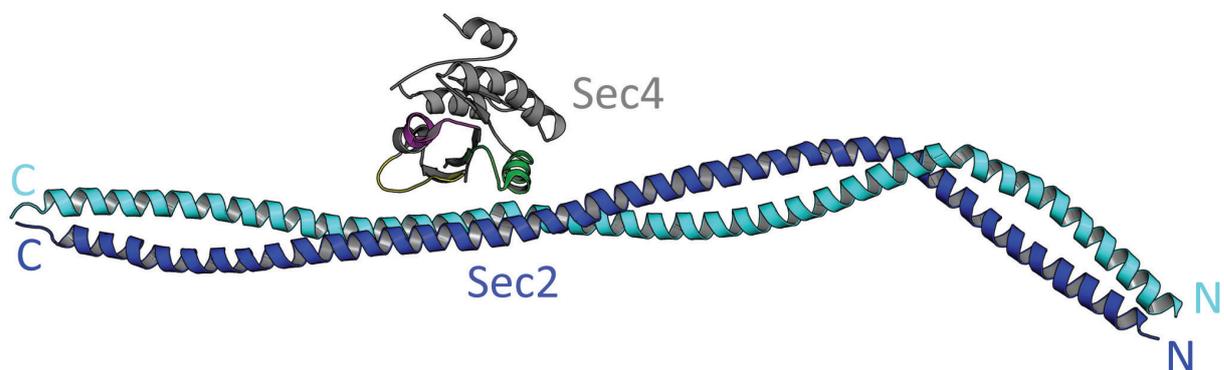


Abbildung 1-7: Bändermodell darstellung der Kristallstruktur des Sec2:Sec4-Komplexes (PDB ID: 1OCY, Dong *et al.*, 2007)

Das Sec2-Homodimer ist in zwei verschiedenen Blautönen dargestellt. In der grau dargestellten GTPase Sec4 sind Switch I (gelb), Switch II (grün) und der P-loop (magenta) farblich hervorgehoben.

Homologie zu Sec2 identifiziert. Für Rabin3, das ursprünglich als Bindungspartner von Rab3 beschrieben wurde (Brondyk *et al.*, 1995), wurde eine Nukleotidaustauschaktivität für Rab8 nachgewiesen und das humane Homolog von Rabin3 – Rabin8 – hat ebenfalls eine Nukleotidaustauschaktivität für Rab8 (Hattula *et al.*, 2002). GRAB wurde als Sec2-Homolog in Ratten identifiziert und besitzt Nukleotidaustauschaktivität gegenüber Rab3 (Luo *et al.*, 2001). Da mit GRAB und Rabin8 bereits zwei unterschiedliche *coiled-coil*-Proteine mit Nukleotidaustauschaktivität beschrieben wurden, ist es gut vorstellbar, dass noch weitere Nukleotidaustauschfaktoren mit *coiled-coil*-Domänen existieren.

Ein heterodimerer Proteinkomplex aus Hefe stellt neben den TRAPP-Komplexen einen weiteren Proteinkomplex mit GEF-Aktivität dar. Der Komplex aus Ric1 und Rgp1 katalysiert den Nukleotidaustausch an Ypt6p – dem Hefehomolog von Rab6 (Siniosoglou *et al.*, 2000). Ric1 und Rgp1 sind einzeln exprimiert sehr instabil und zeigen keine GEF-Aktivität. Da zudem beide Proteine in Deletionsstämmen ohne den Interaktionspartner ihre Lokalisation verlieren, ist davon auszugehen, dass sie als funktionelle Einheit agieren. Ob die direkte Interaktion mit Ypt6 allerdings durch eine oder beide Untereinheiten erfolgt, ist unklar.

Ein weiter Proteinkomplex, der als Nukleotidaustauschfaktor von Rab-Proteinen in der Literatur erwähnt wurde, ist der heterooligomere C-Vps/HOPS-Proteinkomplex, der eine wichtige Funktion bei der Fusion von Transportvesikeln mit der Vakuole besitzt (Rieder und Emr, 1997). Die HOPS-Komponente Vps39 wurde als Nukleotidaustauschfaktor von Ypt7 – dem Rab7-Homolog aus Hefe – beschrieben (Wurmser *et al.*, 2000). Jüngste Studien demonstrieren allerdings, dass die Nukleotidaustauschaktivität nicht durch Vps39, sondern durch den Mon1-Ccz1-Komplex bewirkt wird. Auch bei diesem heterodimeren Komplex besitzen die einzelnen Komponenten keine Nukleotidaustauschaktivität (Nordmann *et al.*, 2010).

Bis zum heutigen Zeitpunkt wurden somit insgesamt 32 Nukleotidaustauschfaktoren für Rab-Proteine identifiziert. Während für einige Rab-Proteine bereits mehrere Nukleotidaustauschfaktoren beschrieben wurden, konnten für andere Rab-Proteine bisher noch keine GEFs gefunden werden, so dass davon auszugehen ist, dass in den nächsten Jahren noch weitere Nukleotidaustauschfaktoren entdeckt werden. Alle bisher identifizierten Nukleotidaustauschfaktoren haben eine relativ große Substratspezifität und eine spezifische intrazelluläre Lokalisation. Hierdurch wird eine zielgenaue Aktivierung der verschiedenen Rab-Proteine ermöglicht.

1.3.1.3 Modifikation der Rab-Regulation durch *Legionella pneumophila*

Pathogene Organismen können neben den nativ in der Zelle vorhandenen Proteinen ebenfalls Proteine kodieren, die in der Lage sind die Regulation von Rab-Proteinen zu verändern. In den letzten Jahren wurden im Genom des Bakteriums *Legionella pneumophila* eine Reihe von Proteinen identifiziert, die die Rab-Proteinregulation modifizieren. Eine Untersuchung der Funktion dieser bakteriellen Proteine kann häufig helfen, das Verständnis für natürlich ablaufende intrazelluläre Regulationsprozesse zu erhöhen.

Legionella pneumophila ist ein Bakterium, das in der Regel Amöben infiziert (Rowbotham, 1980, 1983) und ubiquitär in wässrigen Systemen vorhanden ist (Morris *et al.*, 1979; Fliermans *et al.*, 1979). Es wurde als opportunistischer Erreger der Legionärskrankheit identifiziert (Brenner *et al.*, 1979). Menschen infizieren sich in der Regel durch Einatmen von Aerosolen, die mit Legionellen kontaminiert sind. Nach der phagozytotischen Aufnahme in die Alveolarmakrophagen befinden sich die Legionellen in einer Vakuole und verhindern die Fusion dieser Vakuole mit Lysosomen (Horwitz, 1983b). Um die Vakuole zur Replikation nutzbar zu machen, beginnt dann ein Umbau der Vakuole, bei dem zunächst Mitochondrien rekrutiert werden (Horwitz, 1983a). Im Folgenden vergrößert sich die Vakuole durch Fusion von Vesikeln und nach ungefähr vier Stunden können Ribosomen auf der Legionellenvakuole beobachtet werden (Horwitz, 1983a). Die Modifikation von intrazellulären Prozessen wird durch das Dot/Icm Sekretionssystem ermöglicht (Vogel *et al.*, 1998), mit dessen Hilfe eine Vielzahl von verschiedenen Proteinen in die Wirtszelle sekretiert werden (Heidtman *et al.*, 2009).

Bis zum heutigen Zeitpunkt wurden im Sekretom von *Legionella pneumophila* vier Proteine identifiziert, die mit Rab1 interagieren. DrrA (*Defect in Rab Recruitment*) bzw. SidM (*Substrate of Icm/Dot M*) ist das vermutlich am ausführlichsten charakterisierte Protein und wurde ursprünglich als GEF für Rab1 beschrieben (Machner und Isberg, 2006; Murata *et al.*, 2006). Die Lokalisation der Nukleotidaustauschaktivität war allerdings zwischen den bestehenden Publikationen umstritten, da Murata *et al.* (2006) ein Fragment von 451-647 Aminosäuren mit voller Nukleotidaustauschaktivität identifizierten, während Machner und Isberg (2007) ein Fragment von 317-545 Aminosäuren beschrieben, das für volle GEF-Aktivität essentiell war. Beide Gruppen publizierten etwa ein Jahr nach der Entdeckung der GEF-Aktivität, dass DrrA in der Lage wäre, als GDF zu agieren und den Rab1:GDI-Komplex zu dissoziieren. Allerdings bestand auch in diesem Fall keine Einigkeit über die Lokalisation der Domäne, die für

die GDF-Aktivität verantwortlich war. Während Machner und Isberg (2007) die GDF-Aktivität im gleichen Aminosäurebereich wie die GEF-Aktivität (Aminosäuren 317-545) identifizierten, beschrieben Ingmundson *et al.* (2007) eine separate Domäne von 1-500 Aminosäuren, die für die GDI-Freisetzung verantwortlich sei. Zu Beginn dieser Arbeit konnte Stefan Schöbel ein DrrA-Fragment mit den Aminosäuren 340-533 (DrrA₃₄₀₋₅₃₃) kristallisieren und die Struktur des Fragments im Komplex mit einem Rab1-Fragment (Aminosäuren 3-174, Rab1₃₋₁₇₄) bestimmen (Schoebel *et al.*, 2009). DrrA₃₄₀₋₅₃₃ umfasst eine einzelne Domäne bestehend aus acht α -Helices, die in zwei Lagen mit einem Winkel von ca. 90° zueinander angeordnet sind. Im Vergleich mit der Struktur von Ypt1, dem Rab1-Homolog aus Hefe, zeigt sich deutlich, dass die Bindung von DrrA an Rab1 starke Konformationsänderungen induziert (Abbildung 1-8 a). Durch die Konformationsänderung interferiert DrrA mit der Bindung des Nukleotids und des Magnesiumsions. Die Interaktion von DrrA₃₄₀₋₅₃₃ mit Rab1₃₋₁₇₄ erfolgt im Wesentlichen über zwei Bindungsstellen (Abbildung 1-8 b). In Bindungsstelle 1 erfolgt die Interaktion mit Switch II und dem P-loop. Die Interaktion in Bindungsstelle 2 bewirkt die Bildung von $\alpha 1'$ in Switch I des Rab-Proteins.

Neben der zentralen Domäne wurde seit Beginn dieser Arbeit die Struktur und Funktion der N- und der C-terminalen Domänen von DrrA charakterisiert (Brombacher *et al.*, 2009; Zhu *et al.*, 2010; Schoebel *et al.*, 2010; Muller *et al.*, 2010). Die C-terminale Domäne von DrrA enthält eine Phosphatidylinositolbindungsdomäne, die aufgrund ihrer Phosphatidyl-inositol-4-phosphat-Spezifität P4M-Domäne (Phosphatidylinositol-4-phosphat-Bindung von SidM) genannt wurde (Brombacher *et al.*, 2009). Die Domäne hat eine neuartige Faltung (Zhu *et al.*, 2010; Schoebel *et al.*, 2010) und die Bindung an das Phosphatidylinositol-4-phosphat ist mit 18,2 nM (di-C4-Phosphatidylinositol-4-phosphat) deutlich stärker als andere beschriebene Interaktionen (Schoebel *et al.*, 2010). Diese starke Bindung ermöglicht, trotz der vermutlich relativ geringen Phosphatidylinositol-4-phosphat-Konzentration in der Legionellenmembran, eine stabile Assoziation mit der Legionellenmembran, die durch die Veränderungen der Membranzusammensetzung im Verlauf der Legionelleninfektion modifiziert werden kann (Brombacher *et al.*, 2009; Schoebel *et al.*, 2010).

Die N-terminale Domäne von DrrA hat Nukleotidyltransferaseaktivität gegenüber Rab1 (Muller *et al.*, 2010). ATP und GTP können beide als Substrat der Nukleotidyltransferreaktion verwendet werden, wobei ATP gegenüber GTP deutlich bevorzugt wird (Muller *et al.*, 2010).

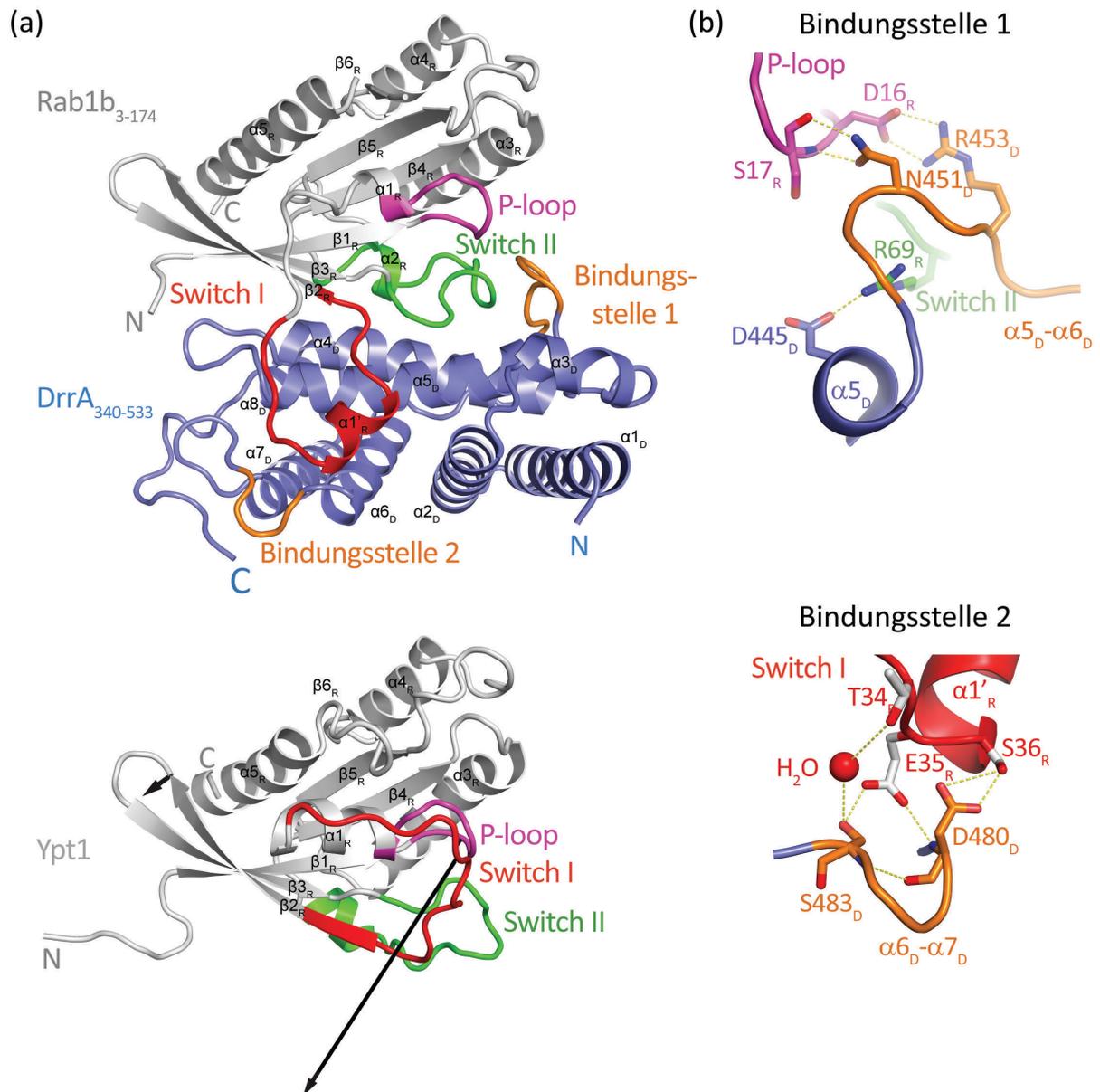


Abbildung 1-8: DrrA₃₄₀₋₅₃₃ im Komplex mit Rab1b₃₋₁₇₄ (Abbildung adaptiert von Schoebel *et al.*, (2009))

(a) Kristallstruktur des DrrA₃₄₀₋₅₃₃:Rab1b₃₋₁₇₄-Komplexes (3JZA, Schoebel *et al.*, 2009) im Vergleich mit Ypt1:GTP (1YZN, Eathiraj *et al.*, 2005). Die Bindung von DrrA führt zu einer Bewegung von Switch II und zu einer starken Konformationsänderung in Switch I.

(b) Detailansicht der Interaktion von DrrA mit dem Rab1 P-loop und Switch II (Bindungsstelle 1) und mit Switch I (Bindungsstelle 2)

Die spezifische Enzymaktivität ist dabei für die GppNHp gebundene Form von Rab1 etwa 275 Mal größer als für die GDP-gebundene Form (6,02 bzw. 0,022 $\mu\text{mol}_{\text{Produkt}}/\text{mg}_{\text{Enzym}}$ pro Minute) (Muller *et al.*, 2010). Die Modifikation von Rab1 erfolgt im Switch II an Tyrosin 77 und somit in einer Region, in der Rab1 mit GEFs, GAPs, GDI und vermutlich auch mit Effekto-

ren in Wechselwirkung tritt (Abbildung 1-9). Aufgrunddessen inhibiert die Adenylylierung die Stimulation der GTP-Hydrolyse durch das *S. cerevisiae* GAP Gyp1 und das humane GAP TBC1D20, sowie das *Legionella pneumophila* GAP LepB (Muller *et al.*, 2010). Weiterhin wird die Interaktion mit der Rab1-Bindungsdomäne des Effektors MICAL-3 durch die Modifikation behindert, während die Interaktion mit LidA aus *Legionella pneumophila* nicht deutlich beeinträchtigt wird (Muller *et al.*, 2010). Neben Rab1 kann DrrA auch Rab3a, Rab4b, Rab6a, Rab8a, Rab11a, Rab13, Rab14 und Rab37 modifizieren (Muller *et al.*, 2010). Eine substantielle Adenylylierung von Rab4, Rab6a, Rab8a und Rab14 wurde allerdings von Neunuebel *et al.* (2011) nicht bestätigt. Weiterhin zeigte diese Gruppe, dass Rab35 ebenfalls als Substrat der Adenylylierungsreaktion dient (Neunuebel *et al.*, 2011). Es ist allerdings unklar, inwieweit diese Rab-Proteine auch in infizierten Zellen modifiziert werden, da in infizierten *Dictyostelium discoideum* Zellen bisher nur Rab1a, Rab1d, Rab7a, Rab8a und Rab14 auf der Legionellenvakuole detektiert wurde (Urwyler *et al.*, 2009).

Die Deaktivierung von Rab1 auf der Legionellenvakuole erfolgt vermutlich durch das ebenfalls von *Legionella pneumophila* in die Wirtszelle sekretierte Rab1 spezifische GAP LepB (Ingmundson *et al.*, 2007). LepB kann ca. zwei Stunden nach der Infektion erstmals auf der Legionellenvakuole detektiert werden und von diesem Zeitpunkt an nimmt die Rab1 Menge auf der Legionellenvakuole deutlich ab, so dass vermutet werden kann, dass das Rab-Protein deaktiviert wird, um von GDI extrahiert werden zu können (Ingmundson *et al.*, 2007). Aufgrund der Tatsache, dass Rab1 und DrrA bereits 30 Minuten nach Infektion gemeinsam auf der Legionellenvakuole detektiert werden können, ist davon auszugehen, dass Rab1 zu diesem Zeitpunkt bereits adenylyliert wurde. Da die Deaktivierung von Rab1 nur ohne AMP-Modifikation erfolgen kann, muss das Rab-Protein somit deadenylyliert werden, um eine Deaktivierung zu ermöglichen. Kürzlich konnte nachgewiesen werden, dass diese Aufgabe von einem weiteren Protein aus *Legionella pneumophila* – SidD – übernommen wird (Tan und Luo, 2011; Neunuebel *et al.*, 2011). SidD wird analog zu LepB erst einige Stunden nach Infektion der Zellen aus der Legionellenvakuole sekretiert, so dass sein Erscheinen mit der Extraktion von Rab1 aus der Legionellenvakuole zusammenfällt (Tan und Luo, 2011; Neunuebel *et al.*, 2011). *In vitro* katalysiert SidD die Deadenylylierung von Rab1 und eine Mutation von SidD genau wie eine Mutation von LepB bewirkt, dass Rab1 deutlich länger auf der Legionellenvakuole detektiert werden kann (Neunuebel *et al.*, 2011).

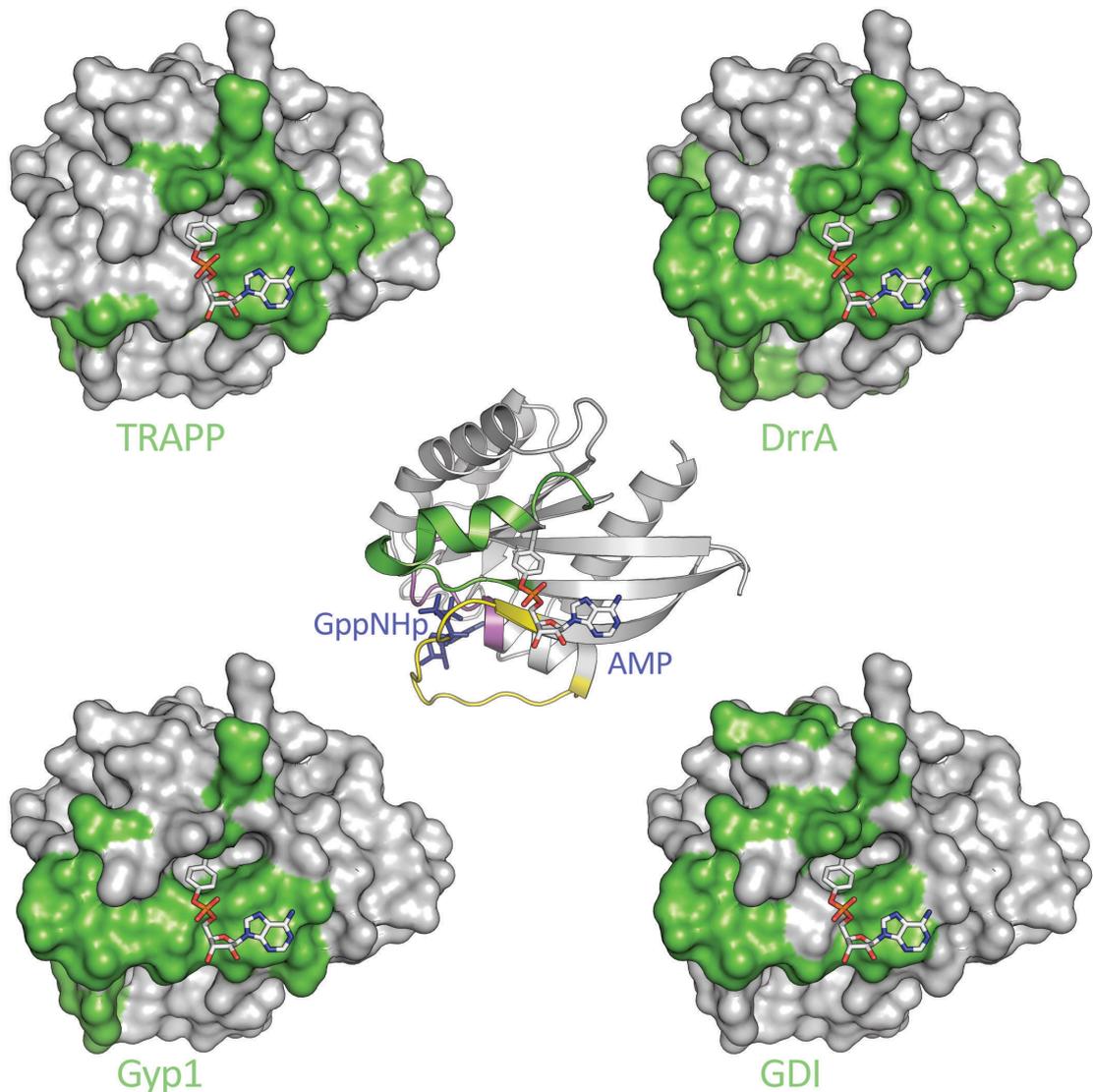


Abbildung 1-9: Struktur des GppNHp gebundenen Rab1-AMP (Zentrum) und Oberflächen-darstellungen der Struktur zur Illustration der Kontaktflächen der Interaktionen von Rab1 mit TRAPP, DrrA, Gyp1 und GDI (Abbildung adaptiert von Muller *et al.* (2010))

Aminosäuren, in denen Rab1 in den bekannten Kristallstruktur mit dem TRAPP-Komplex (PDB ID: 3CUE, Cai *et al.*, 2008) und mit DrrA (PDB ID: 3JZA, Schoebel *et al.*, 2009) interagiert, sind grün dargestellt. Die Interaktionsbereiche von Rab1 und Gyp1 wurden aus der Rab33:Gyp1-Komplexstruktur (PDB ID: 2G77, Pan *et al.*, 2006) und die Interaktionsfläche von Rab1 und GDI aus der Ypt1:GDI (PDB ID: 2BCG, Pylypenko *et al.*, 2006) abgeleitet. Das adenylylierte Tyrosin ist in Stabform dargestellt und befindet sich immer im Bereich der Interaktionsflächen.

Die Funktion von LidA, dem vierten Protein aus *Legionella pneumophila*, das mit Rab1 interagiert, wurde bis zum heutigen Zeitpunkt nicht eindeutig geklärt. LidA kann nach seiner Translokation in die Wirtszelle neben der Legionellenvakuole auch auf Membranen in der Umgebung der Vakuole detektiert werden (Conover *et al.*, 2003) und ist nach Überexpression in Säugerzellen auf Golgi-Membranen lokalisiert (Derre und Isberg, 2005). Die Interaktion

mit der Membran erfolgt vermutlich ähnlich wie bei DrrA durch Interaktion mit Phosphatidylinositol-3-phosphat oder Phosphatidylinositol-4-phosphat (Brombacher *et al.*, 2009). LidA interagiert mit Rab1, Rab6 und Rab8 und zeigt weder GEF- noch GAP-Aktivität gegenüber diesen Proteinen (Machner und Isberg, 2006). Mit Rab2, Rab4, Rab5, Rab7 und Rab11 kann keine Interaktion beobachtet werden (Machner und Isberg, 2006). Während eine Deletion von DrrA in *Legionella pneumophila* zu keinen signifikanten Defekten bei der Bildung der Replikationsvakuole führt, sind in LidA-defizienten Stämmen im Vergleich zu wildtypischen *Legionella pneumophila* Stämmen etwa doppelt so viele Bakterien nicht in der Lage, sich innerhalb der Wirtszelle zu vervielfältigen (Machner und Isberg, 2006). Die Deletion von LidA in *Legionella pneumophila* führt allerdings lediglich zu einer Verlangsamung der Rab1-Rekrutierung zur Legionellenvakuole, während in Legionellenstämmen ohne DrrA fast kein Rab1 auf der Legionellenvakuole detektiert werden kann (Machner und Isberg, 2006). Daher stehen die deutlichen Veränderungen bei der intrazellulären Replikation vermutlich nicht mit Rab1 in Verbindung. Die Struktur von LidA kann in großen Teilen als *coiled-coil* vorhergesagt werden – eine Struktur, die sich sehr häufig in Proteinen, die an der Membrananheftung von Vesikeln beteiligt sind (*Tethering*-Faktoren), nachgewiesen werden kann (Gillingham und Munro, 2003). p115 und GM130 – zwei *coiled-coil* Proteine, die als Effektoren von Rab1 identifiziert wurden – konnten nicht auf der Legionellenvakuole nachgewiesen werden (Derre und Isberg, 2004), so dass spekuliert werden kann, ob andere Proteine – evtl. LidA – ihre Funktion bei der Fusion von Vesikeln mit der Legionellenvakuole übernehmen. Da die Interaktion von LidA im Unterschied zu den anderen getesteten Proteinen nicht durch die Modifikation mit AMP inhibiert wird (Muller *et al.*, 2010), könnte das Protein als Effektor des adenylylierten Rab1 agieren.

Die oben beschriebenen *Legionella pneumophila* Proteine sind in der Lage, mit Rab1 zu interagieren und seine Aktivität, Lokalisation und Funktion in infizierten Zellen zu manipulieren und so die Fusion von Vesikeln aus dem Endoplasmatischen Retikulum mit der Membran der Legionellenvakuole zu bewirken (Kagan *et al.*, 2004). Obwohl keines der beschriebenen Proteine sehr wichtig für das intrazelluläre Überleben von *Legionella pneumophila* zu sein scheint, ist die Fusion mit intrazellulären Vesikeln vermutlich sehr wichtig für die Replikation von *Legionella pneumophila*. Aufgrund dieser Tatsache hat *Legionella pneumophila* eventuell weitere redundante Wege entwickelt, die Rekrutierung und Fusion mit intrazellulären Vesikeln zu ermöglichen.

2 Zielsetzung

Die Aktivität von Rab-Proteinen wird durch ihre intrazelluläre Lokalisation und ihren Nukleotidbindungsstatus reguliert. Da Rab-Proteine an ihrem C-Terminus mit Isoprenoidresten modifiziert sind, liegen sie aufgrund der starken Hydrophobizität dieser Reste im Cytoplasma in der Regel im Komplex mit dem Protein GDI vor. GDI bindet an die Prenylanker, so dass eine Insertion der Isoprenoidreste in Membranen erst nach der Dissoziation des Rab:GDI-Komplexes möglich ist. Die Regulation dieses Dissoziationsprozesses soll als Kernaspekt dieser Arbeit untersucht werden.

Zur Modifikation der Interaktion von Rab-Proteinen und GDI wurde in der Literatur über die Existenz von *GDI Displacement* Faktoren (GDF) spekuliert (Soldati *et al.*, 1994; Novick und Garrett, 1994) und für ein Protein – Yip3/PRA1 – konnte gezeigt werden, dass es einen Rab:GDI-Komplex katalytisch dissoziieren kann (Sivars *et al.*, 2003). Aufgrund dieser Ergebnisse wurde von einigen Gruppen postuliert, dass GDFs generell essentiell für die intrazelluläre Lokalisation von Rab-Proteinen sind (Pfeffer und Aivazian, 2004). Bisher ist allerdings vollkommen unklar, wie ein GDF die Dissoziation der Rab:GDI-Komplexe beeinflussen könnte.

Das bakterielle Protein DrrA aus *Legionella pneumophila* wurde als Protein mit GEF- und GDF-Aktivität für Rab1 beschrieben (Machner und Isberg, 2007; Ingmundson *et al.*, 2007) und es konnte gezeigt werden, dass DrrA in der Lage ist, Rab1 gezielt von seiner normalen subzellulären Lokalisation an andere intrazelluläre Membranen zu rekrutieren (Machner und Isberg, 2006; Murata *et al.*, 2006). Im Rahmen dieser Arbeit sollte die GEF- und GDF-Aktivität von DrrA thermodynamisch und kinetisch ausführlich charakterisiert werden, um Einblicke in die Funktionsweise von *GDI Displacement* Faktoren zu erlangen. Es sollte festgestellt werden, in welchen Domänen die verschiedenen Aktivitäten des Proteins lokalisiert sind und inwieweit Nukleotidaustausch und GDI-Freisetzung als separate Aktivitäten angesehen werden können. Nach einer Charakterisierung der GDF-Aktivität von DrrA sollte untersucht werden, ob die für DrrA beschriebene duale GEF- und GDF-Aktivität auch bei anderen Nukleotidaustauschfaktoren aus humanen Zellen beobachtet werden kann.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Chemikalien

Tabelle 3-1: Verwendete Chemikalien	
Hersteller	Chemikalien
AppliChem (Darmstadt, Deutschland)	Acrylamid 4K-Lösung (30 %, Mix 37,5:1), Ammoniumsulfat, Dikaliumhydrogenphosphat, Isopropyl - Thio - β - D -Galactopyranosid (IPTG), Methanol, Pepstatin A, Salzsäure (25 %)
Bacto Difco / Voigt Global Distribution Inc. (Lawrence, U.S.A.)	Bacto Agar, Bacto Trypton, Bacto Yeast Extract
Biomol GmbH (Hamburg, Deutschland)	Carbenicillin (Natriumsalz)
Calbiochem / Merck (Darmstadt, Deutschland)	Albumin Bovine Serum Fraction V (Fatty Acid Free, Nuclease- & Protease-free), Guandiniumchlorid
Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)	Adenosintriphosphat (ATP), Antipain, Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB), 3-((3-Cholamidopropyl) dimethylammonio)-1 - propan - sulfonat (CHAPS), Chloramphenicol, Glycin, Leupeptin, N, N, N', N' - Tetramethylethylendiamin (TEMED), Tri - (hydroxymethyl) - aminomethan (Tris)
Fermentas (St. Leon-Rot, Deutschland)	dNTPs 10 mM each
Fluka / Sigma-Aldrich (München, Deutschland)	Dichlormethan, L-Argininmonohydrochlorid, Noidet P-40 Substitute, Polyethylenglycol (PEG) 8000, Tetracyclin, Trifluoressigsäure (TFA), Tris-(2-Carboxyethyl)-phosphin (TCEP)
Gerbu (Gaiberg, Deutschland)	Ampicillin (Natriumsalz), Dithioerythritol (DTE), Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) (Dinatriumsalz), Glycerin, 4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethansulfonsäure (Hepes), Kanamycinsulfat, Natriumdodecylsulfat (SDS)
iNtRON Biotechnology (Sangdaewong-Dong, Korea)	RedSafe
Invitrogen (Darmstadt, Deutschland)	Agarose, CellFECTIN, Fötales Kälberserum hitzeinaktiviert
Jena Bioscience (Jena, Deutschland)	2' (3') - O - (N-methylantranoyl) (mant) - Guanosindiphosphat (mGDP), mant-Desoxyguanosindiphosphat (mdGDP), mant-Desoxyguanosintriphosphat (mdGTP), mant-Desoxyguanosin-5'- β,γ -imidotriphosphat (mdGppNHp)

Hersteller	Chemikalien
J. T. Baker / Mallinckrodt Baker B.V. (Deventer, Niederlande)	Essigsäure, Ethanol, Harnstoff, Kaliumchlorid, Kaliumdihydrogenphosphat, Magnesiumchlorid, Natronlauge (2M), 2-Propanol, Salzsäure (1M)
LGC Promochem (Wesel, Deutschland)	Acetonitril Optigrade
Merck (Darmstadt, Deutschland)	Dinatriumhydrogenphosphat, Imidazol
MP Biomedicals LLC (Illkirch, Frankreich)	Natriumdihydrogenphosphat
Pan-Biotech GmbH (Aidenbach, Deutschland)	Pluronic F-68, TC100 Insektenzellmedium
Serva (Heidelberg, Deutschland)	Ammoniumpersulfat (APS), Bromphenolblau (Natriumsalz), Coomassie Brilliant Blue R250, Dimethylsulfoxid (DMSO), Gentamicinsulfat, β -Mercaptoethanol, Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF), Sucrose, Triton X-100, X-Gal, Zinkchlorid
Sigma-Aldrich (München, Deutschland)	Chymostatin, Farnesylpyrophosphat Ammoniumsalz (Minimum 95 % TLC), Geranylgeranylpyrophosphat (Minimum 95 % TLC), L-Glutathion reduced, Guanosindiphosphat (GDP), Guanosintriphosphat (GTP), Guanosin-5'- β,γ -imidotriphosphat (GppNHp), Maltose Monohydrat, 2-Mercaptoethansulfonat-Natrium (MESNA), Natriumchlorid, Nickel(II)sulfathexahydrat, Orange G, Sinapinsäure, Tetrabutylammoniumbromid (99 %)
Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, U.S.A.)	Coomassie Protein Assay Reagent, Rinderserumalbumin (BSA)

Das verwendete NBD(7-Nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)-Farnesylpyrophosphat und NBD-Geranylpyrophosphat wurde von Dr. Anouk Stigter aus der Arbeitsgruppe von Prof. Herbert Waldmann (Max-Planck Institut für molekulare Physiologie, Dortmund, Deutschland) wie in Dursina *et al.* (2006) beschrieben synthetisiert und zur Verfügung gestellt.

3.1.2 FPLC-Säulenmaterial und FPLC-/HPLC-Säulen

Tabelle 3-2: Verwendete FPLC-Säulenmaterialien und FPLC-/HPLC-Säulen	
Hersteller	Säule / Säulenmaterial
Bischoff Analysetechnik und -geräte GmbH (Leonberg, Deutschland)	C ₁₈ Säule, Prontosil, 120-5-C18-AQ, 5 μ M; C ₁₈ Vorsäulen, Prontosil 120-3-C18-AQ, 3 μ M
Bio-Rad Laboratories GmbH (München, Deutschland)	Econo Column 5 cm · 10 cm

Hersteller	Säule / Säulenmaterial
GE Healthcare (München, Deutschland)	Glutathion 4 Sepharose fast flow, Hi-Load Superdex 75/200 16/60 & 26/60 prep grade, Superdex 200 10/30 GL, Superdex 75 10/30, Hi-Trap Chelating HP 1 ml and 5 ml columns
Grace Vydac (Hesperia, U.S.A.)	214 TP C4 Column, 150 mm · 6 mm
New England Biolabs (Ipswich, U.S.A.)	Amylose Resin, Chitin Beads
Qiagen (Hilden, Deutschland)	Ni-NTA Superflow Material

3.1.3 Proteine und Größenstandards

Tabelle 3-3: Verwendete Proteine und Größenstandards	
Hersteller	Protein / Größenstandard
Dortmund Protein Facility (Dortmund, Deutschland)	PreScission Protease, TEV-Protease, Rabex-5-Fragment Aminosäuren 132-397 (Rabex-5 ₁₃₂₋₃₉₇), Rab5a A109S T205A
Fermentas (St. Leon-Rot, Deutschland)	Gene Ruler 1 kb DNA Ladder, FastDigest Restriktionsenzyme, Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP), T4 DNA Ligase
GE Healthcare (München, Deutschland)	LMW Calibration Kit for SDS Electrophoresis, Protein mixture
Sigma-Aldrich (München, Deutschland)	REDTaq DNA-Polymerase
USB (Staufen, Deutschland)	Phosphodiesterase I, <i>Crotalus adamanteus</i> Gift

LidA wurde von Stefan Schöbel wie in Conover *et al.* (2003) beschrieben isoliert und zur Verfügung gestellt. Rab7-geranylgeranyl (Rab7-gg) wurde von Yaowen Wu wie in Wu *et al.* (2010) beschrieben hergestellt und zur Verfügung gestellt.

3.1.4 Molekularbiologische Kits

Tabelle 3-4: Verwendete molekularbiologische Kits	
Hersteller	Kits
Applied Biosystems (Darmstadt, Deutschland)	BigDye Terminator v 3.1. Cycle Sequencing Kit
Qiagen (Hilden, Deutschland)	QIAprep Spin Miniprep Kit, QIAfilter Plasmid Midi Kit, QIAquick Gel Extraction Kit, QIAquick PCR Purification Kit, DyeEx 2.0 Spin Kit
Stratagene / Agilent Technologies (Waldbronn, Deutschland)	QuikChange II XL Site-Directed Mutagenesis Kit

3.1.5 Sonstiges Material

Tabelle 3-5: Sonstiges Material	
Hersteller	Material
Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)	Glaskugeln 2,85-3,45 mm, Zählkammer nach Neubauer
Becton, Dickinson and Company (Franklin Lakes, U.S.A.)	Falcon 6-well Platten, Falcon Petrischalen
Eppendorf (Hamburg, Deutschland)	0,5 ml, 1 ml und 2 ml Reaktionsgefäße
GE Healthcare (München, Deutschland)	NAP-5 Säulen, PD-10 Säulen, XK26/20 Säule
Hellma GmbH & Co. KG (Müllheim, Deutschland)	Quartz-Küvette 109.004F-Qs, 10 mm
Millipore Corporation (Billerica, U.S.A.)	Zentrifugenfilter Amicon Ultra Ultracel-10K/30K, Stirred Cells Model 8050 & 8200, Ultrafiltration Membranes YM-10/30
Nalgene Labware (Roskilde, Dänemark)	Bottle Top Filter
Nerbe (Winsen/Luhe, Deutschland)	Pipettenspitzen 1-10 µl, 20-200 µl 100-1000 µl
PeqLab Biotechnology GmbH (Erlangen, Deutschland)	Elektroporationsküvetten (2 mm)
Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)	sterile Plastikpipetten, Plastik-Küvetten, 15 ml und 50 ml Reaktionsgefäße
Spectrum Laboratories Inc. (Breda, Niederlande)	12-14.000 MWCO 4 Spectra/Por Dialyse Membran

3.1.6 Geräte

Tabelle 3-6: Verwendete Geräte	
Hersteller	Geräte
Agilent Technologies (Waldbronn, Deutschland)	Agilent 1100 HPLC system
Applied Biosystems (Darmstadt, Deutschland)	ABI PRISM 3130x1 Genetic Analyzer
Applied Photophysics Ltd (Surrey, Großbritannien)	Stopped-flow Gerät
Beckman Coulter, Inc. (Brea, U.S.A.)	Avanti J-20 XP Zentrifuge mit Rotor JLA 8.1000 & JA 25.50, DU650 Spektrophotometer, Optima L-70K Ultrazentrifuge mit Rotor 45 Ti
Binder GmbH (Tuttlingen, Deutschland)	Brutschrank
Bio-Rad Laboratories GmbH (München, Deutschland)	Power Pac Spannungsquelle, MicroPulser, Mini-Protean 3 SDS-PAGE System, Thermocycler PTC-200
Carl Zeiss Jena GmbH (Jena, Deutschland)	Axiovert 25 Mikroskop

Hersteller	Geräte
Eppendorf (Hamburg, Deutschland)	Eppendorf 5415 C & D Tischzentrifugen, Eppendorf 5810 R Zentrifuge, Thermomixer comfort
Fujifilm Holdings Corporation (Tokio, Japan)	Fluorescence Image Reader FLA-5000
GE Healthcare (München, Deutschland)	FPLC Äkta prime plus, Molecular Imager Gel Doc XR System
GFL – Gesellschaft für Labortechnik mbH (Burgwedel, Deutschland)	GFL 3033 Schüttelinkubator für Insektenzellen
Gilson, Inc. (Middleton, U.S.A.)	2,5 µl, 10 µl, 20 µl, 100 µl, 200 µl und 1 ml Pipetten
Horiba Jobin Yvon Inc. (Edison, U.S.A.)	FluoroMax-3
IKA Werke GmbH & Co. KG (Staufen, Deutschland)	RCT basic Heizplatte mit Magnetrührer
Ilmvac GmbH (Ilmenau, Deutschland)	Vakuum Membranpumpe
Infors AG (Bottmingen, Schweiz)	Schüttelinkubatoren
Kendro Laboratory Products GmbH (Langeselbold, Deutschland)	HERAsafe Sterilbank
Kern & Sohn GmbH (Balingen, Deutschland)	Kern 572 Präzisionswaage
Knick Elektronische Messgeräte GmbH & Co. KG (Berlin, Deutschland)	761 Calimatic pH Meter
Max-Planck Institut für molekulare Physiologie, Werkstatt (Dortmund, Deutschland)	Agarose-Gelkammer
Mettler-Toledo GmbH (Giessen, Deutschland)	Analysenwaage AM100
MicroCal / GE Healthcare (München, Deutschland)	iTC ₂₀₀
Microfluidics International Corporation (Newton, U.S.A.)	Microfluidizer
Millipore Corporation (Billerica, U.S.A.)	Milli-Q Wasseraufbereitungssystem
PeqLab Biotechnology GmbH (Erlangen, Deutschland)	NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer
Perseptive Biosystems / Applied Biosystems (Darmstadt, Deutschland)	Voyager-DE PRO BioSpectrometry Workstation, MALDI Platte
Qiagen (Hilden, Deutschland)	QiaCube
Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, U.S.A.)	Heraeus Kelvitron K Inkubator für die Anzucht von Insektenzellen, LCQ Advantage Max ESI-MS
Waagen Strathausen (Holzwickede, Deutschland)	Waage Kern 572
Waters Corporation (Milford, U.S.A.)	HPLC System (600 S Controller, 626 Pump, 717 plus Autosampler, 2487 Dual λ Absorbance Detector, Fraction Collector III)

3.1.7 Puffer und Lösungen

DNA Probenpuffer (5x)	30 % (w/v) Sucrose 20 % Glycerin 0,2 % Orange G
PBS	137 mM Natriumchlorid 2,68 mM Kaliumchlorid 10,1 mM Dinatriumhydrogenphosphat 1,76 mM Kaliumdihydrogenphosphat pH 7,4 mit HCl
SDS-PAGE-Sammelgelpuffer	0,5 M Tris HCl pH 6,8 0,4 % (w/v) SDS
SDS-PAGE-Trenngelpuffer	1,5 M Tris HCl pH 8,8 0,4 % (w/v) SDS
SDS-PAGE-Laufpuffer	25 mM Tris 0,19 M Glycin 0,1 % (w/v) SDS
SDS-PAGE Probenpuffer (2x)	100 mM Tris HCl pH 6,8 4 % (w/v) SDS 20 % Glycerin 0,2 % Bromphenolblau 5 % β -Mercaptoethanol
SDS-Gel Färbelösung	44 % (v/v) Ethanol 12 % (v/v) Essigsäure 0,15 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue R250
TAE (Tris-Acetat-EDTA)	40 mM Tris 20 mM Essigsäure 1 mM EDTA pH 8
TE	100 mM Tris pH 8,0 10 mM EDTA pH 8,0
CLAP	1 mg/ml Chymostatin 1 mg/ml Leupeptin 1 mg/ml Antipain 1 mg/ml Pepstatin A in DMSO

Die Puffer wurden, sofern nicht anders angegeben, mit entionisiertem destilliertem Wasser angesetzt.

3.1.8 Nährmedien

3.1.8.1 Nährmedien zur Anzucht von *Escherichia coli*

Die Anzucht von *E. coli* erfolgte mit den folgenden Nährmedien:

Luria-Bertani (LB)-Flüssigmedium	10 g/l Bacto-Trypton 10 g/l Natriumchlorid 5 g/l Hefe-Extrakt pH 7,2 mit Natronlauge
Luria-Bertani(LB)-Festagarplatten	10 g/l Bacto-Trypton 10 g/l Natriumchlorid 5 g/l Hefe-Extrakt 16 g/l Bacto-Agar pH 7,2 mit Natronlauge
GYT	10 % Glycerin 1,25 g/l Hefe-Extrakt 2,5 g/l Bacto-Trypton

Die Nährmedien in wurden mit entionisiertem Wasser angesetzt und zur Sterilisation bei 121 °C und 1 bar autoklaviert. Anschließend wurden die in Tabelle 3-7 aufgelisteten Zusätze in den angegebenen Konzentrationen zugesetzt. Die Lagerung der Nährmedien erfolgte bei 4 °C.

Tabelle 3-7: Zusätze für <i>E. coli</i> Nährmedien		
Antibiotikum	Konzentration in Flüssigmedium	Konzentration in Festagarplatten
Ampicillin	125 mg/l	-
Carbenicillin	-	125 mg/l
Chloramphenicol	34 mg/l	34 mg/l
Kanamycin	50 mg/l	50 mg/l
Tetracyclin	10 mg/l	10 mg/l
Gentamicin	7 mg/l	7 mg/l
IPTG	-	40 mg/l
X-Gal	-	100 mg/l

3.1.8.2 Nährmedien zur Anzucht von Insektenzellen

Das folgende Nährmedium wurde zu Anzucht von Insektenzellen verwendet:

Insektenzellmedium	TC100 Medium 10 % Fötale Kälberserum 1 % Pluronic F-68
--------------------	--

Zur Herstellung von einem Liter TC100 Medium wurden 22,09 g TC100 Medium in autoklaviertem entionisiertem Wasser gelöst. Nach der Zugabe von 0,35 g Natriumhydrogencarbonat wurde der pH-Wert mit 2 M Natronlauge auf 6,2 eingestellt. Die Lösung wurde mit einem Bottle top filter sterilfiltriert. Vor der Verwendung wurde dem Medium 10 % hitzeinaktiviertes fötales Kälberserum sowie 1 % Pluronic F-68 zugesetzt.

3.1.9 Bakterienstämme

Tabelle 3-8: Verwendete <i>E. coli</i> Stämme		
Stamm	Genotyp	Hersteller
BL21(DE3)	B F ⁻ dcm ompT, hsdS(r _B ⁻ , m _B ⁻) gal λ(DE3)	Novagen / Merck (Darmstadt, Deutschland)
BL21-CodonPlus(DE3)-RIL	B F ⁻ ompT hsdS(r _B ⁻ , m _B ⁻) dcm ⁺ Tet ^r gal λ(DE3) endA Hte [argU ileY leuW Cam ^r]	Stratagene / Agilent Technologies (Waldbronn, Deutschland)
DH10Bac	F ⁻ mcrA D(mrr- hsdRMS- mcrBC) f80lacZDM15 DlacX74 recA1 endA1 araD139 D(ara, leu) 7697 galU galK1- rpsL nupG / bMON 14272 / pMON7124	Invitrogen (Darmstadt, Deutschland)
XL1-Blue	recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17(r _K ⁻ , m _K ⁺) supE44 relA1 lac [F' proAB lacI _q ZΔM15 Tn10 (Tet ^r)]	Stratagene / Agilent Technologies (Waldbronn, Deutschland)

3.1.10 Insektenzelllinien

Tabelle 3-9: Verwendete Insektenzelllinien		
Zelllinie	Beschreibung	Hersteller
Sf21	Zelllinie aus dem Eierstockgewebe von <i>Spodoptera frugiperda</i>	Invitrogen (Darmstadt, Deutschland)

3.1.11 Plasmide

Tabelle 3-10: Verwendete Leervektoren	
Name	Eigenschaften
pET19mod	pET19 Vektor (Novagen / Merck, Darmstadt, Deutschland) zur Expression von Proteinen mit einem N-terminalen Hexahistidinanker modifiziert mit einer TEV-Protease-Schnittstelle zur Abtrennung des Hexahistidinankers vom Zielprotein
pET28a	Vektor von Novagen / Merck (Darmstadt, Deutschland) zur Expression von Proteinen mit einem N-terminalen oder C-terminalen Hexahistidinankers
pET28mod	pET28 Vektor (Novagen / Merck, Darmstadt, Deutschland) zur Expression von Proteinen mit einem N-terminalen Hexahistidinanker modifiziert mit einer TEV-Protease-Schnittstelle zur Abtrennung des Hexahistidinankers vom Zielprotein
pFastBacHTa	Plasmid von Invitrogen (Darmstadt, Deutschland) zur Herstellung von Bacmid-DNA in DH10Bac Zellen die zur Expression eines Proteins mit einem N-terminalen Hexahistidinanker in Insektenzellen verwendet werden kann
pGATEV	Vektor zur Expression von Proteinen mit einem N-terminalen Hexahistidin-Glutathion-S-Transferase-Anker mit einer TEV-Protease-Schnittstelle zur Abtrennung des Affinitätsankers (Kalinin <i>et al.</i> , 2001)
pMAL	pMAL-c4E Vektor (New England Biolabs, Ipswich, U.S.A.) zur Expression von Proteinen mit einem N-terminalen Maltose-Bindeprotein(MBP)-Affinitätsanker modifiziert mit einer TEV-Protease-Schnittstelle zur Abtrennung des MBP-Affinitätsankers
pOPINF	Plasmid vom Oxford Module Consortium (Oxford, Großbritannien) zur Expression von Proteinen mit einem N-terminalen Hexahistidinanker mit einer PreScission-Protease-Schnittstelle zur Abtrennung des Affinitätsankers

Tabelle 3-11: Verwendete Expressionsplasmide	
Name	Eigenschaften
2140_pMAL+Rab1b	pMAL Vektor zur Expression von Rab1b aus <i>Homo Sapiens</i> ; das verwendete Rab1b wurde von der Firma Mr. Gene GmbH (Regensburg, Deutschland) für die Expression in <i>E. coli</i> kodonoptimiert
2142_pMAL+Rab1b(3-174)	pMAL zur Expression von kodonoptimiertem trun-kiertem Rab1b Aminosäuren 3-174 Rab1b ₃₋₁₇₄
2143_pMAL+Rab1b_CVIM	pMAL zur Expression von kodonoptimiertem C-terminal modifiziertem Rab1b (CC wurde ersetzt durch CVIM)
2770_pMAL+Rab1b_CVIL	pMAL zur Expression von kodonoptimiertem C-terminal modifiziertem Rab1b (CC wurde ersetzt durch CVIL)

Name	Eigenschaften
2362_pET19mod+DrrA f.l.	pET19mod Vektor zur Expression von DrrA _{fl} aus <i>Legionella pneumophila</i>
2144_pET19mod+DrrA(340-533)	pET19mod zur Expression von trunkiertem DrrA Aminosäuren 340-533 (DrrA ₃₄₀₋₅₃₃)
2436_pET19mod+DrrA(340-533) N451A	pET19mod zur Expression von DrrA ₃₄₀₋₅₃₃ mit einer N451A Mutation
2437_pET19mod+DrrA(340-533) R453A	pET19mod zur Expression von DrrA ₃₄₀₋₅₃₃ mit einer R453A Mutation
2438_pET19mod+DrrA(340-533) N451A R453A	pET19mod zur Expression von DrrA ₃₄₀₋₅₃₃ mit den Mutationen N451A R453A
2937_pET19mod+DrrA(340-533) S483A	pET19mod zur Expression von DrrA ₃₄₀₋₅₃₃ mit einer S483A Mutation
2983_pET19mod+DrrA(340-533) D480A S483A	pET19mod zur Expression von DrrA ₃₄₀₋₅₃₃ mit den Mutationen D480A S483A
2929_pET19mod+DrrA f.l. N451A R453A D480A S483A	pET19mod zur Expression von DrrA _{fl} mit den Mutationen N451A R453A D480A S483A
1262_pET28mod+Ypt1	pET28mod zur Expression von Ypt1 einem Rab1-Homolog aus <i>S. cerevisiae</i>
2989_pET19mod+Sec4_CVIL	pET19mod zur Expression von C-terminal modifiziertem Sec4 (CC wurde ersetzt durch CVIL)
2997_pMAL+Rab5a_CVIL	pMAL zur Expression von C-terminal modifiziertem Rab5a (CCSN wurde ersetzt durch CVIL)
2991_pMAL+Rab35_CVIL	pMAL zur Expression von C-terminal modifiziertem Rab35 (CC wurde ersetzt durch CVIL)
1153_pET19mod+Sec2(1-165)	pET19mod zur Expression von Sec2 Aminosäuren 1-165 mit einem N-terminalen Hexahistidinanker (His-Sec2 ₁₋₁₆₅)
1780_pET19mod+Rabin8(153-237)	pET19mod zur Expression von Rabin8 Aminosäuren 153-237 (Rabin8 ₁₅₃₋₂₃₇)
0316_pGATEV+FTase alpha	pGATEV Vektor zur Expression der GGTase-I / FTase-I alpha-Untereinheit aus <i>Rattus norvegicus</i> in Fusion mit einem N-terminalen Hexahistidin-Glutathion-S-transferase-Anker
0309_pET28a+FTase beta	pET28a Vektor zur Expression von FTase-I beta aus <i>Rattus norvegicus</i> in Fusion mit einem N-terminalen Hexahistidinanker
0310_pET28a+GGTase-I beta	pET28a Vektor zur Expression von GGTase-I beta aus <i>Rattus norvegicus</i> in Fusion mit einem N-terminalen Hexahistidinanker
02915_pFastBacHTa+GDI-1	Plasmid zur Herstellung von Bacmid-DNA zur Expression von GDI-1 aus <i>Bos taurus</i> in Insektenzellen

3.1.12 Oligonukleotide

Alle verwendeten Oligonukleotide wurden von Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Deutschland) synthetisiert und mit der HPSF-Methode gereinigt.

3.1.13 Viren

Baculovirus zur Expression von Connecdenn(1-403) wurde von der Dortmund Protein Facility hergestellt und zur Verfügung gestellt. Der Virus wurde bei 4 °C gelagert und wie in 3.3.2.4 beschrieben amplifiziert.

3.2 Molekularbiologische Methoden

3.2.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus *Escherichia coli*

Plasmid-DNA wurde aus transformierten XL1-Blue Zellen isoliert. In kleinem Maßstab erfolgte die Isolierung mit dem QiaCube Protokoll 728 und den Materialien des Qiagen Spin Miniprep Kits. Größere Mengen Plasmid-DNA wurden mit den QIAfilter Plasmid Midi Kit nach dem „*Plasmid or Cosmid DNA Purification Using QIAfilter Plasmid Midi and Maxi Kits*“ Protokoll isoliert.

3.2.2 Bestimmung von DNA-Konzentrationen

Die Bestimmung der Konzentration von DNA erfolgte durch die Messung der Absorption bei 260 nm. Bei dieser Wellenlänge haben Nukleinsäuren ein Absorptionsmaximum aufgrund der aromatischen Ringe der Basen. Eine optische Dichte von 1 entspricht einer doppelsträngigen DNA-Konzentration von ca. 50 µg/ml. Die optische Dichte der DNA-Lösungen wurde gegen einen Puffernullwert mit einem NanoDrop ND-1000 Spektrophotometer bestimmt.

3.2.3 Restriktionsverdau von DNA

Restriktionsendonukleasen des Typs II und III ermöglichen die hydrolytische Spaltung von DNA-Molekülen an spezifischen Stellen.

Die Restriktion von Plasmiden erfolgte mit FastDigest Restriktionsenzymen von Fermentas (St. Leon-Rot, Deutschland) in dem vom Hersteller gelieferten Puffer. Ca. 400 ng DNA wur-

den in einem 60 µl Ansatz mit 2 µl Enzym versetzt und eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Die DNA wurde anschließend mittels Agarose-Gelelektrophorese (3.2.4) und anschließender Gelextraktion (3.2.5) isoliert oder wie unter 3.2.6 beschrieben gereinigt.

3.2.4 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Abschätzung der Größe von DNA-Fragmenten und zu ihrer präparativen Isolierung wurde die DNA mit horizontal-Elektrophorese in Agarose-Gelen nach ihrer Größe getrennt. Da die DNA durch die Phosphatgruppen am Rückgrat ein konstantes Masse-zu-Ladungsverhältnis aufweist, wird die DNA nach dem Anlegen eines elektrischen Feldes aufgrund des Molekularsiebeckeffekts nach ihrer Größe aufgetrennt.

Zur Auftrennung der DNA wurden 1 % (w/v) Agarose-Gele verwendet. Die Agarose wurde in heißem TAE Puffer gelöst. Zur Färbung der DNA wurde der Agaroselösung 5 µl RedSafe (iNtRON Biotechnology, Sangdaewong-Dong, Korea) pro 100 ml Agaroselösung zugesetzt. Es wurden ca. 0,5 cm dicke und 8,5 cm lange Gele gegossen, die nach dem Erstarren mit TAE-Puffer überschichtet wurden.

Zur Bestimmung der DNA-Größe wurde die Gene Ruler 1 kb DNA Ladder verwendet. Der DNA-Größenstandard wurde mit 100 µl 5x DNA Probenpuffer und 400 µl entionisiertem destilliertem Wasser verdünnt und 3-7 µl der Lösung wurden aufgetragen. DNA-Proben aus dem Restriktionsverdau wurden vor dem Auftragen ca. 1:5 mit 5x DNA Probenpuffer versetzt. PCR-Proben wurden nicht mit Probenpuffer versetzt, da die verwendete REDTaq Polymerase bereits Probenpuffer enthält. Die Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgte bei 100 V.

Die Detektion der DNA-Fragmente erfolgte mit UV-Licht mit dem Molecular Imager Gel Doc XR System (Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland), da das verwendete RedSafe mit DNA interkaliert und nach der Anregung mit UV-Licht fluoresziert.

3.2.5 Extraktion von DNA-Fragmenten aus einem Agarose-Gel

Die Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen erfolgte mit dem QIAquick Gel Extraction Kit nach dem Protokoll „*QIAquick Gel Extraction Kit Protocol using a microcentrifuge*“.

3.2.6 Reinigung von DNA-Fragmenten

Die Reinigung von DNA-Fragmenten nach der Restriktion erfolgte, wenn keine DNA-Fragmente mit einer Größe von über 100 Basenpaaren entfernt werden mussten, mit dem QIAquick PCR Purification Kit unter Nutzung des „*QIAquick PCR Purification Kit Protocol using a microcentrifuge*“ Protokolls.

3.2.7 Ligation von Plasmid-DNA

Bei der DNA-Ligation werden komplementäre Enden von DNA-Fragmenten kovalent miteinander verknüpft. Die Ligation erfolgte mit Ligase aus dem Phagen T4, die unter Nutzung von ATP als Energiequelle in Anwesenheit von Magnesium die Knüpfung einer Phosphorsäureesterbindung katalysiert.

Zur Ligation eines verdauten DNA-Fragmentes mit einem komplementär verdauten Vektor wurden in einem 10 µl Ansatz 50 ng Vektor mit einem 3- bis 4-fachen molaren Überschuss des DNA-Fragments und 1 U T4 DNA Ligase (Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland) in dem vom Hersteller empfohlenen Puffer für 3 Stunden bei 20 °C oder über Nacht bei 16 °C inkubiert. Zur Deaktivierung der Ligase wurde die Reaktionsmischung 10 Minuten bei 65 °C inkubiert.

3.2.8 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Bei der PCR können mit Hilfe einer hitzestabilen DNA-Polymerase ausgewählte Abschnitte einer DNA vervielfältigt werden. Die Reaktion besteht aus drei Schritten, die in Zyklen wiederholt werden. Im ersten Schritt wird das als Vorlage dienende doppelsträngige Ausgangsmaterial durch thermische Denaturierung in Einzelstränge getrennt. Im zweiten Schritt wird die Temperatur abgesenkt, um die Bindung von zum Ausgangsmaterial homologen Oligonukleotide an die einzelsträngige Vorlage zu ermöglichen. Im dritten Schritt baut die DNA-Polymerase mit Desoxynukleosidtriphosphaten ausgehend von den freien 3'-Hydroxylgruppen der Oligonukleotide einen zum Matrizenstrang komplementären Gegenstrang auf.

In dieser Arbeit wurde die Polymerasekettenreaktion zur Vervielfältigung von DNA-Fragmenten für die Klonierung, zur Analyse von Ligationsreaktionen, zur Mutation von Plasmid-DNA sowie zur Analyse der DNA Sequenzen von Plasmiden eingesetzt.

3.2.8.1 Präparative PCR

Zur Vervielfältigung von DNA-Fragmenten für den Restriktionsverdau und die anschließende Ligation wurde REDTaq DNA-Polymerase (Sigma-Aldrich, München, Deutschland) verwendet. Diese Taq Polymerase wird vom Hersteller mit einem roten Farbstoff versetzt, der es ermöglicht, das PCR-Produkt direkt auf Agarose-Gelen zu analysieren.

Es wurden 50 µl Reaktionsmischungen mit 20 ng DNA-Vorlage, je 50 pmol der beiden zur Template DNA homologen Primer, je 10 nmol der Desoxynukleosidtriphosphate dATP, dCTP, dGTP und dTTP sowie 2,5 U RedTaq DNA-Polymerase in dem vom Hersteller gelieferten Puffer angesetzt.

Die Reaktion erfolgte mit dem folgenden Programm in einem Thermocycler:

95 °C	2 Minuten		
95 °C	30 Sekunden	}	30 Zyklen
45-65 °C	30 Sekunden		
72 °C	1 Minute pro 1000 Basen		
72 °C	5 Minuten		
4 °C	unendlich		

3.2.8.2 Analytische PCR

Zur Analyse von Einzelkolonien nach der Transformation von Ligationsansätzen wurden kleine Proben einzelner Kolonien in 100 µl entionisiertem Wasser gelöst. 1 µl dieser Suspension wurde als Vorlagen-DNA in 10 µl die unter 3.2.8.1 beschriebene Reaktionsmischung gegeben. Die Oligonukleotide wurden so gewählt, dass sie die Ligationsregion des verwendeten Plasmids flankierten. Die Vervielfältigung der DNA erfolgte mit dem ebenfalls unter 3.2.8.1 beschriebenen Programm.

Nach der Vervielfältigung wurde die Größe der hergestellten DNA-Fragmente wie unter 3.2.4 beschrieben mit Agarose-Gelelektrophorese analysiert.

3.2.8.3 Zielgerichtete Mutagenese von Plasmid-DNA

Zur spezifischen Mutation von Plasmid-DNA wurde die QuikChange Technik verwendet. Bei der QuikChange PCR werden zwei homologe Oligonukleotide verwendet, die in ihrer Mitte die einzufügende Mutation enthalten. Ausgehend von diesen Oligonukleotiden erfolgt die Vervielfältigung der Plasmid-Vorlage. Die Plasmid-Vorlage kann anschließend, sofern sie aus

einem Bakterienstamm mit aktiver DNA-Adenin-Methylase (dam^+) isoliert wurde, mit der methylierungssensitiven Restriktionsendonuklease DpnI in kleine Fragmente zerschnitten werden.

Die PCR wurde mit dem QuikChange II XL Site-Directed Mutagenesis Kit von Stratagene (Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland) nach den Angaben des Herstellers in 50 μ l Reaktionsansätzen durchgeführt. Nach dem Verdau der Plasmid-Vorlage wurden 2 μ l des PCR-Ansatzes wie unter 3.3.1.2 beschrieben in elektrokompetente XL1-Blue Zellen transformiert.

3.2.8.4 DNA-Sequenzierung

Zur Analyse der Sequenz von Plasmid-DNA wurde die von Sanger *et al.* (1977) beschriebene Kettenabbruchmethode verwendet. Alle Reaktionen wurden mit dem BigDye Terminator v 3.1. Cycle Sequencing Kit durchgeführt. Im Ready Reaction Mix dieses Kits sind neben dATP, dCTP, dITP und dUTP fluoreszenzmarkierte Didesoxynukleosidtriphosphate enthalten. Weiterhin enthält die Reaktionsmischung eine Variante der Taq Polymerase, die durch Punktmutationen eine geringere Spezifität für Desoxynukleotide aufweist, um den Einbau von Didesoxynukleotiden zu erleichtern. Durch den Einbau der Didesoxynukleosidtriphosphate wird die Synthese des zum Matrizenstrang komplementären Gegenstrangs beendet, da für eine weitere Verlängerung des DNA-Strangs keine freie 3'-Hydroxylgruppe zur Verfügung steht. Hierdurch entstehen bei der PCR unterschiedlich lange DNA-Fragmente, die an ihrem 3' Ende einen Fluorophor tragen. Die DNA-Sequenz kann nach der Größenauftrennung mit Kapillarelektrophorese durch Detektion der verschiedenen Fluorophore mit Hilfe eines Lasers bestimmt werden.

Zur Sequenzierung wurden 500 ng bis 1 μ g der zu sequenzierenden DNA in einem 10 μ l Ansatz mit 4 μ l Terminator Ready Reaction Mix und 100 pmol Primer versetzt. Die Reaktion erfolgte mit dem folgenden Programm:

96 °C	2 Minuten	
96 °C	15 Sekunden	} 25 Zyklen
46 °C	15 Sekunden	
60 °C	4 Minuten	
4 °C	unendlich	

Nach Abschluss der Reaktion wurden die Sequenzierungsreaktion mit 4 µl entionisiertem Wasser versetzt und die überschüssige Oligonukleotide mit dem DyeEx 2.0 Spin Kit nach den Angaben des Herstellers entfernt. Die Proben wurden in einem Heizblock bei 99 °C getrocknet. Die Sequenzbestimmung erfolgte in der zentralen Einrichtung Biotechnologie des Max-Planck-Instituts für molekulare Physiologie (Dortmund, Deutschland) mit einem ABI PRISM 3130x1 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland). Die DNA-Sequenzen wurden anschließend mit dem Programm ClustalW (Larkin *et al.*, 2007) analysiert.

3.2.9 Erzeugung von Bacmid-DNA mit *Escherichia coli* DH10Bac

Das Bac-to-Bac[®] Baculovirus Expressionssystem von Invitrogen (Darmstadt, Deutschland) ermöglicht die Erzeugung von Bacmid-DNA in dem *E. coli* Stamm DH10Bac. Bacmid-DNA ist eine in *E. coli* replikationsfähige Form des Baculovirus-Genoms. Die Erzeugung dieser DNA basiert auf der von (Luckow *et al.*, 1993) entwickelten Methode der sequenzspezifischen Transposition.

In den FastBac Donorplasmiden wird das Zielgen direkt hinter den starken Polyhedrinpromotor aus dem *Autographa californica Nuclear Polyhedrosis Virus* kloniert. Der Polyhedrinpromotor und die Insertionsregion des Vektors sowie ein Gentamicinresistenzgen und ein SV-40 Polyadenylierungssignal sind in diesen Vektoren von Bindestellen des bakteriellen Transposons – Tn7L und Tn7R flankiert. Der Baculovirus Shuttle Vektor bMon14272 der DH10Bac Zellen enthält neben einem mini-F Replikon und einem Kanamycinresistenzmarker ein LacZ α kodierendes DNA Segment, das die chromosomale *lacZ* Deletion von DH10BacTM komplementiert. In diesen LacZ α kodierenden Bereich befindet sich die Bindestelle des bakteriellen Transposons – Tn7. Das Helferplasmid pMON7124, das sich ebenfalls in DH10BacTM Zellen befindet, besitzt neben einem Tetracyclinresistenzgen einen DNA-Bereich, der die Transposase kodiert. Nach der Transformation des Donorplasmids in DH10Bac Zellen erfolgt die sequenzspezifische Transposition des von den Erkennungssequenzen Tn7L und Tn7R flankierten Bereichs des Donorplasmids in das Bacmid bMON14272. Durch diese Transposition verliert bMON14272 die Fähigkeit, die *lacZ* Deletion zu komplementieren, so dass eine Selektion der Transformanten, in denen eine Transposition stattgefunden hat, mit Hilfe des Blau-Weiß-Tests möglich ist. Dieser Test macht sich die Eigenschaften der von dem *lacZ*-Gen kodierten β -Galaktosidase zu Nutze. β -Galaktosidase ist in der Lage, neben ihrem eigentlichen Substrat Laktose auch X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galactopyranosid) zu spalten. Bei

der Spaltung entsteht Galaktose und 5-Brom-4-chlor-indoxyl, das von Sauerstoff zum blauen 5,5'-Dibrom-4,4'-dichlor-indigo oxidiert wird (Horwitz *et al.*, 1964). Die eingesetzten Zellen können aufgrund der chromosomalen *lacZ* Deletion nur mit dem durch bMON14272 nach Induktion mit IPTG gebildeten α -Peptid eine funktionsfähige β -Galaktosidase erzeugen. Bei der Transposition von DNA in bMON14272 wird das α -Peptid durch die integrierte DNA unterbrochen, wodurch eine Komplementation der Deletion nicht mehr möglich ist. Auf Transformationsplatten mit X-Gal und IPTG sind die Zellkolonien weiß, in denen eine Transposition stattgefunden hat, während die Zellen, in denen das α -Peptid nicht durch die integrierte DNA unterbrochen wurde, blau gefärbt sind.

Die Isolierung von Bacmid-DNA aus DH10Bac Transformanten erfolgte mit dem Puffersystem des QIAprep Spin Miniprep Kits. Transformanten, in denen eine Transposition mit Hilfe des Blau-Weiß-Tests nachgewiesen konnte, wurden in 5 ml LB-Flüssigmedium mit Kanamycin, Tetracyclin und Gentamicin über Nacht bei 37 °C kultiviert. Die Zellen aus der Kultur wurden bei 13.200 rpm für 1 Minute sedimentiert und anschließend in 300 μ l Puffer P1 aufgenommen und die Suspension wurde mit 300 μ l Puffer P2 versetzt. Die Lösung wurde durch Invertieren gemischt und anschließend mit 300 μ l Puffer N3 versetzt. Nach einer 20-minütigen Inkubation auf Eis, während der mehrfach durch Invertieren gemischt wurde, wurde die Mischung bei 13.200 rpm für 20 Minuten zentrifugiert. Der Überstand nach der Zentrifugation wurde in 850 μ l Isopropanol überführt. Die Fällung der DNA erfolgte über Nacht bei -20 °C. Die DNA wurde anschließend durch eine 20-minütigen Zentrifugation bei 13.200 rpm sedimentiert und das Pellet wurde mit 70 % Ethanol gewaschen. Nach einer erneuten Zentrifugation (13.200 rpm, 5 Min) wurde das Pellet getrocknet und in 50 μ l TE Puffer aufgenommen.

3.3 Mikrobiologische Methoden

3.3.1 *Escherichia coli*

3.3.1.1 Kultur und Anzucht

Die verwendeten *E. coli* Stämme wurden auf LB-Festmedium oder in LB-Flüssigmedium angezogen. Festmedium wurde immer bei 37 °C inkubiert. Die Anzucht von Flüssigkulturen erfolgte bei 170-180 rpm.

3.3.1.2 Herstellung und Transformation kompetenter *Escherichia coli* Zellen

Um die Transformation von Plasmid-DNA in *E. coli* Zellen durch einen Spannungspuls zu ermöglichen, wurden die Zellen mit der folgenden Methode vorbereitet. Eine 1,5 Liter LB Flüssigkultur wurde mit einer Übernachtskultur angeimpft und bei 37 °C und 170-180 rpm inkubiert. Die Anzucht der Zellen erfolgte, sofern die Zellen über Resistenzmarker verfügten, in Anwesenheit von Antibiotika. Beim Erreichen einer OD_{600nm} von ca. 0,6 wurden die Zellen 15 Minuten bei 5000 rpm und 4 °C sedimentiert. Zur Entfernung von Mediumrückständen wurden die Zellen dreimal gewaschen – zunächst mit 1 Liter sterilem entionisiertem destilliertem Wasser und anschließend mit 0,9 l und 0,8 l 10 % Glycerin. Alle Zentrifugationen erfolgten für 15 Minuten bei 5000 rpm und 4 °C. Das gewaschene Pellet wurde in 45 ml 10 % Glycerin aufgenommen, in ein 50 ml Reaktionsgefäß überführt, und die Zellen wurden durch eine 15-minütige Zentrifugation bei 4000 rpm und 4 °C sedimentiert. Die Zellen wurden in GYT Medium resuspendiert ($3 \cdot 10^{11}$ Zellen / ml GYT), in 50 µl Aliquots in flüssigem Stickstoff gefroren und bei -80 °C gelagert.

Um Plasmid-DNA in die kompetenten *E. coli* Zellen zu transformieren, wurden die Zellen zunächst auf Eis aufgetaut. Anschließend wurden die Zellen mit 50-500 ng Plasmid-DNA bzw. 2 µl Ligationsansatz versetzt und in eine Elektroporationsküvette transferiert. Die Transformation der Zellen erfolgte in einem MicroPulser (Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland) durch einen starken Spannungspuls (Program Ec1: 1,8 kV). Nach dem Spannungspuls wurden die Zellen in 950 µl LB-Flüssigmedium für 45 Minuten bei 170-180 rpm und 37 °C inkubiert. Anschließend wurden 100 µl dieser Kultur auf einer LB-Festagarplatte verteilt, die zur Selektion der Zellen, die das transformierte Plasmid aufgenommen hatten, mit den entsprechenden Antibiotika versetzt war. Bei der Transformation von Ligationsansätzen wurde die verbliebene Zellkultur für 3 Minuten bei 3000 rpm zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 100 µl des Überstands resuspendiert und ebenfalls auf einer LB-Festagarplatte verteilt. Die Inkubation der Platten erfolgte bei 37 °C über Nacht im Brutschrank. Alle in dieser Arbeit verwendeten *E. coli* Zellstämme mit Ausnahme des Zellstamms DH10Bac wurden mit dieser Methode transformiert.

DH10Bac Zellen wurden mit einer nach Chung *et al.* (1989) modifizierten Methode transformiert. 100 ml LB-Flüssigmedium mit Kanamycin und Tetracyclin wurden mit 1 ml einer Übernachtskultur angeimpft und die Kultur wurde bei 37 °C inkubiert. Bei einer OD_{600nm} von 0,5-0,6 wurde die Kultur für 20 Minuten auf Eis gekühlt und die Zellen wurden anschließend

durch eine Zentrifugation für 5 Minuten bei 8000 rpm pelletiert. Das Zellpellet wurde in 10 ml eiskaltem TSS-Medium (10 % PEG 8000, 5 % DMSO, 50 mM Magnesiumchlorid in LB-Medium ohne Natronlauge) suspendiert und die Suspension wurde mit 1,5 ml Glycerin versetzt. Die Zellen wurden in 50 µl Aliquots in flüssigem Stickstoff gefroren und bei -80 °C gelagert.

Zur Transformation der DH10Bac Zellen wurden die Zellen auf Eis aufgetaut und mit 250 ng-2,5 µg pFastBacHTa Plasmid-DNA versetzt. Nach einer einstündigen Inkubation auf Eis wurden die Zellen für 1 Minute bei 42 °C einem Hitzeschock ausgesetzt. Anschließend wurden die Zellen mit 150 µl kaltem LB-Flüssigmedium versetzt.

Um die Transposition der Plasmid-DNA mit dem in den Zellen enthaltenen Donorplasmid zu ermöglichen, wurden die Zellen 5 Stunden bei 37 °C und 170-180 rpm inkubiert. Anschließend wurden drei verschiedene Verdünnungen der Zellkultur mit LB-Flüssigmedium hergestellt (1:10, 1:100 und 1:1000). 1 ml der Verdünnungen wurde für 1 Minute bei 13.200 rpm zentrifugiert, die Zellpellets wurden in 100 µl LB-Flüssigmedium resuspendiert und auf LB-Festagarplatten mit Kanamycin, Tetracyclin, Gentamicin, IPTG und X-Gal plattiert. Die Festagarplatten wurden für 2 Tage bei 37 °C inkubiert.

3.3.2 Insektenzellen

3.3.2.1 Kultur und Anzucht

Die Anzucht von Sf21 Zellen erfolgte in Insektenzellmedium in Petrischalen (10 ml Kulturen) oder in Suspensionskulturen bei einer Temperatur von 27 °C. Die Anzucht von Suspensionskulturen erfolgte bei 110 rpm. Alle zwei bis drei Tage wurde das Volumen der Kulturen durch Zugabe von Medium verdoppelt um eine Zelldichte von ca. $2 \cdot 10^6$ Zellen / ml nicht zu überschreiten.

3.3.2.2 Bestimmung der Zellkonzentration

Die Bestimmung der Zellkonzentration in Suspensionskulturen erfolgte unter dem Mikroskop mit einer Zählkammer nach Neubauer. In der Regel wurden die Kulturen zur Bestimmung der Konzentration 1:5 mit Insektenzellmedium verdünnt.

3.3.2.3 Transfektion von Insektenzellen mit Bacmid-DNA

Die Transfektion von Sf21 Zellen mit Bacmid-DNA bewirkt die Infektion der Zellen mit dem Baculovirus und somit die Produktion von infektiösen rekombinanten Baculoviren, die zur Amplifikation der Viruspartikel isoliert werden können.

In einer 6 *well*-Platte wurden jeweils $1 \cdot 10^6$ Zellen in 2 ml Insektenzellmedium ausgesät. Um eine Adhäsionskultur zu erzeugen, wurde die Platte bei 27 °C inkubiert. Nach einer Stunde wurde das Medium von den Zellen entfernt und der Transfektionsansatz wurde auf die Zellen getropft. Zur Herstellung des Transfektionsansatzes wurden 5 µl der isolierten Bacmid-DNA und 6 µl CellFECTIN mit jeweils 100 µl TC100 verdünnt und anschließend vereinigt. Nach 30-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde diese Mischung mit 800 µl TC100 Medium verdünnt und sofort zur Transfektion verwendet.

Nach einer 5-stündigen Inkubation bei 27 °C wurde der Transfektionsansatz von den Zellen entfernt. Die Zellen wurden anschließend mit 2 ml Insektenzellmedium überschichtet und für 3 Tage bei 27 °C im Brutschrank inkubiert. In diesem Zeitraum bilden sich in den Zellen rekombinante Baculoviruspartikel, die nach der erfolgreichen Infektion einer Zelle ins Medium freigesetzt werden. Zur Isolierung dieser Partikel wurden die Zellen mit dem Medium von der Platte abgeschwemmt und die Zellsuspension wurde in 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt. Die Zellen wurden durch eine 5-minütige Zentrifugation bei 3000 rpm sedimentiert und der Überstand mit den Viruspartikeln wurde abgenommen und bei 4 °C gelagert.

3.3.2.4 Virusamplifikation

Zur ersten Amplifikation der Viruspartikel wurden 10 ml Zellkultur mit einer Zellkonzentration von $1 \cdot 10^6$ Zellen / ml mit 1 ml Virusüberstand aus der Transfektion der Insektenzellen versetzt und in einer Petrischale bei 27 °C inkubiert. Nach 4 Tagen wurden die Zellen von der Platte gewaschen und durch eine 10-minütige Zentrifugation bei 2500 rpm sedimentiert. Der Überstand, der die Viruspartikel enthält, wurde bei 4 °C gelagert.

Die zweite Amplifikation der Viruspartikel erfolgte in 750 ml Suspensionskulturen ($1 \cdot 10^6$ Zellen / ml), die mit 7,5 ml des viralen Überstands der ersten Amplifikation infiziert wurden und für 4 Tage bei 27 °C und 110 rpm inkubiert wurden. Die Viruspartikel wurden wie oben beschrieben durch Zentrifugation isoliert.

Alle Amplifikationen erfolgten mit Zellen, die zuvor in frisches Insektenzellmedium aufgenommen wurden.

3.4 Biochemische Methoden

3.4.1 Proteinexpression in *Escherichia coli*

Die Expression von Proteinen in *E. coli* erfolgte in den in Tabelle 3-8 aufgelisteten Zellstämmen von pET-, pGATEV- und pMAL-Plasmiden (Tabelle 3-10), in die die Sequenz des Zielproteins hinter eine Promotorregion kloniert wurde (Tabelle 3-11). Neben dem zu exprimierenden Protein kodieren die Plasmide das LacI-Repressorprotein. Dieses Protein bindet als Tetramer zusammengelagert an lac-, tac- und trp-Promotoren und inhibiert so die Bindung der RNA-Polymerase an diese Promotoren. Isopropyl- β -D-Thiogalaktopyranosid (IPTG) bindet an den Repressor und induziert eine Konformationsänderung, die die Wechselwirkung mit dem Promotor stark abschwächt und so die Bindung der RNA-Polymerase und die Produktion der RNA ermöglicht. Der in dieser Arbeit verwendete pMAL-Vektor enthält einen tac-Promotor, so dass die Expression des Zielproteins durch IPTG direkt induziert werden konnte. Die anderen verwendeten Vektoren enthalten einen T7lac-Promotor, der auf einem von Studier und Moffat (1986) entwickelten Prinzip basiert. Dieser Promotor kann durch den Lac-Repressor inhibiert werden. Im Unterschied zum tac-Promotor wird dieser Promotor aber nicht von der *E. coli* RNA-Polymerase erkannt, sondern von der T7-RNA-Polymerase aus der Bakteriophage T7. Eine Expression der Zielproteine kann daher nur in *E. coli* Zellstämmen erfolgen, in denen die T7-RNA-Polymerase in das Genom integriert wurde. Um eine induzierbare Expression zu gewährleisten, erfolgt dies in (DE3)-Expressionsstämmen ebenfalls unter Kontrolle eines lac-Promotors. Dieser Promotor ermöglicht es die Fähigkeit der Bakteriophagen RNA-Polymerase auszunutzen, in relativ kurzer Zeit große Mengen mRNA zu synthetisieren.

Zur Expression der Proteine wurden die Expressionsstämme mit der Plasmid-DNA wie unter 3.3.1.2 beschrieben transformiert. Die verwendeten Expressionsstämme für die jeweiligen Plasmide sind in Tabelle 3-12 aufgelistet. Die transformierten Zellen wurden in LB-Flüssigmedium mit den zur Selektion benötigten Antibiotika angezogen und bis zum Erreichen einer OD_{600nm} von ca. 0,6 bei 37 °C inkubiert. Vor der Zugabe von 0,03 mM (Sec2), 0,2 mM (Ypt1, Rab1b, Rab5a, Rab35, DrrA, Rabin8), 0,3 mM (Sec4) oder 0,5 mM IPTG (FTase-I, GGTase-I) zur Induktion der Proteinexpression wurden die Zellen für 30 Minuten bei 4 °C

gekühlt. Die Expression erfolgte bei 180 rpm und 20 °C über Nacht bzw. bei Rab5a für 4 Stunden bei 37 °C. Die Zellen wurden durch 15-minütige Zentrifugationen bei 4000 rpm geerntet und mit PBS Puffer gewaschen. Die Zellen wurden bei -80 °C gelagert.

Die Anzucht von Zellen im 10 l und 30 l Maßstab erfolgte in Fermentern und wurde von der zentralen Einrichtung Biotechnologie des Max-Planck-Instituts für molekulare Physiologie (Dortmund, Deutschland) durchgeführt.

Tabelle 3-12: <i>E. coli</i> Proteinexpression		
Protein	Nummer des Expressionsplasmids (Tabelle 3-11)	Expressionsstamm
Rab1b	2140, 2142, 2143, 2770	BL21(DE3)
DrrA	2362, 2144, 2436, 2437, 2438, 2937, 1983, 2929	BL21-CodonPlus(DE3)-RIL
Sec4	2989	BL21-CodonPlus(DE3)-RIL
Ypt1	1262	BL21(DE3)
Rab5a	2997	BL21(DE3)
Rab35	2991	BL21-CodonPlus(DE3)-RIL
Sec2	1153	BL21-CodonPlus(DE3)-RIL
Rabin8	1780	BL21-CodonPlus(DE3)-RIL
GGTase-I $\alpha+\beta$	310, 316	BL21-CodonPlus(DE3)-RIL
FTase-I $\alpha+\beta$	309, 316	BL21-CodonPlus(DE3)-RIL

3.4.2 Proteinexpression in Insektenzellen

Zur Proteinexpression in Sf21 Insektenzellen wurden die Zellen mit Baculoviren infiziert. Nach der Infektion der Zellen mit den Viruspartikeln erfolgt in den Zellen die Expression der auf der viralen DNA kodierten Proteine zur Produktion weiterer Viruspartikel. Die in das Virusgenom integrierte DNA des zu exprimierenden Proteins wird aufgrund der Tatsache, dass sie hinter den viralen Polyhedrinpromotor kloniert wurde, ebenfalls transkribiert und anschließend translatiert.

Für die Proteinexpression wurden Zellkulturen mit einer Zellkonzentration von $2 \cdot 10^6$ Zellen / ml Kultur mit Baculovirus-Lösung infiziert (25 ml Viruslösung / Liter Zellkultur) und in Suspensionskulturen bei 27 °C inkubiert. Die Infektion der Zellen wurde mit dem Mikroskop überprüft. Nach 3 Tagen wurden die Zellen durch eine 20-minütige Zentrifugation bei 2500 rpm sedimentiert. Die Zellen wurden mit PBS Puffer gewaschen und die Zellpellets wurden bei -80 °C gelagert.

3.4.3 Isolierung von Proteinen mit einem Hexahistidinanker

Der Aufschluss von Expressionszellen erfolgte mit einem Microfluidizer. Die Zellen wurden aufgetaut und im Laufpuffer der ersten Säule vollständig resuspendiert (ca. 100 ml Puffer pro 25 g Zellen). Der Suspension wurde der Protease Inhibitor Mix (1:500) und 1 mM PMSF zugesetzt und die Zellen wurden dreimal durch den Microfluidizer gegeben. Zellreste, Membranbestandteile und Zellorganellen wurden durch eine 45-minütige Zentrifugation bei 25.000-30.000 rpm sedimentiert.

Zur ersten Anreicherung der Proteine wurde zunächst eine Affinitätschromatographie durchgeführt. Bei der Affinitätschromatographie nutzt man die spezifische Wechselwirkung zwischen einem Anker, der in Fusion mit dem Zielprotein exprimiert wird, und einem matrixgebundenen Liganden. Die in dieser Arbeit verwendeten Proteine wurden in Fusion mit einem Hexahistidinanker exprimiert und mit Nickelaffinitätschromatographie isoliert. Für die Affinitätschromatographie wurden 5 ml HiTrap Chelating HP Säulen, beladen mit zweiwertigem Nickel bzw. für größere Proteinmengen eine XK26/20 Säule, gefüllt mit 25 ml Ni-NTA Superflow Material, eingesetzt. Nach dem Auftragen des Zellysats und dem Waschen mit Puffer wurde die Säule mit Puffer mit 10-20 mM Imidazol gewaschen. Dieser Waschschrift dient dazu schwach an die Säulenmatrix gebundene Proteine zu entfernen. Die Elution des Zielproteins erfolgte durch Waschen mit einem Imidazolgradienten von 10-20 mM bis 500 mM Imidazol. Der Durchfluss der Säule wurde in Fraktionen gesammelt und die Absorption des Eluats bei 280 nm wurde während der gesamten Reinigung detektiert. Proteinhaltige Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE analysiert und Fraktionen, die das Zielprotein enthielten, wurden vereinigt.

Zur Entfernung des Imidazols aus dem Puffer und zur Verringerung der Salzkonzentration in der Proteinlösung wurde über Nacht bei 4 °C eine Dialyse gegen 4 l Puffer durchgeführt. Während der Dialyse erfolgte die proteolytische Abspaltung des Affinitätsankers mit TEV-Protease, der 27 kDa großen katalytischen Domäne des Nuclear Inclusion a Proteins aus dem *Tobacco Etch Virus*. Es wurde 1 mg TEV-Protease pro 30 mg Zielprotein eingesetzt. Zur Abtrennung des abgespaltenen Affinitätsankers und der mit einem Decahistidinanker fusionierten TEV-Protease wurde erneut eine Metallaffinitätschromatographie wie oben beschrieben durchgeführt. Die Elution des Affinitätsankers und der TEV-Protease erfolgte ohne Anwendung eines Gradienten mit 500 mM Imidazol. Das im Durchfluss vorhandene Zielprotein wurde mittels Ultrafiltration konzentriert. Mit der Ultrafiltration kann das Probenvolumen

ohne Veränderung der Pufferbedingungen verringert werden, indem die Pufferlösung durch einen Filter gepresst wird, dessen Porengröße eine Passage des Proteins verhindert. Die Konzentrierung der Proteine erfolgte mit Zentrifugenfiltern oder mit einer Druckkammer. Es wurden je nach Proteingröße Filter mit 10 kDa oder 30 kDa Ausschlussgröße gewählt.

Im letzten Schritt wurden die Proteine mittels Gelfiltrationschromatographie nach ihrer Größe getrennt. Die Trennung der Moleküle basiert auf der unterschiedlichen Permeation der Proteine in das poröse Säulenmaterial. Die Größe der Poren des Säulenmaterials bestimmt den Größenbereich, in dem die Säule eine effektive Trennung der Moleküle ermöglichen kann. Moleküle, die nicht in diese Poren eindringen können, wandern am schnellsten durch die Säule und eluieren alle zusammen im sogenannten Ausschlussvolumen der Säule. Kleinere Moleküle dringen in die Säulenmatrix ein und werden dadurch verzögert. Die kleinsten Moleküle werden am stärksten verzögert und eluieren somit zuletzt. Der Durchfluss der Säule wurde in Fraktionen gesammelt und die Absorption des Eluats bei 280 nm wurde detektiert. Fraktionen, die eine erhöhte Absorption bei 280 nm zeigten, wurden mittels SDS-PAGE analysiert und Fraktionen, die das Zielprotein enthielten, wurden vereinigt.

3.4.3.1 Isolierung von DrrA und Rabin8

Die Isolierung von DrrA_{fl} und Fragmenten von DrrA, sowie von Rabin8 erfolgte wie oben beschrieben mit zwei Metallaffinitätschromatographien und einer anschließenden Gelfiltration. Für den Zellaufschluss und die erste Affinitätschromatographie wurde mit 50 mM Hepes, 500 mM Lithiumchlorid, 2 mM β -Mercaptoethanol Puffer mit und ohne Imidazol durchgeführt. Der erste Waschschrift erfolgte mit 20 mM Imidazol. Bei der Dialyse und der zweiten Metallaffinitätschromatographie wurde 50 mM Hepes, 100 mM Natriumchlorid und 2 mM β -Mercaptoethanol verwendet. In der abschließenden Gelfiltrationschromatographie wurden 20 mM Hepes, 50 mM Natriumchlorid und 2 mM DTE verwendet. Für DrrA wurden Puffer mit einem pH Wert von 8,0 verwendet. Bei der Isolierung von Rabin8 wurde der pH Wert auf 7,5 eingestellt.

3.4.3.2 Isolierung von Rab-Proteinen

Die Isolierung von Rab1b, Rab5a, Rab35 und Sec4 erfolgte wie die Isolierung von DrrA (3.4.3.1), mit dem Unterschied, dass Rab5a und Rab35 bei einem pH von 7,5 isoliert wurden.

Um die Stabilität der GTPasen zu erhöhen wurde den Puffern 10 μM GDP und 1 mM Magnesiumchlorid zugesetzt. Bei der Dialyse wurde bei Sec4 und Rab1 auf Magnesiumchlorid verzichtet, um eine optimale Aktivität der TEV-Protease zu gewährleisten. Aufgrund der geringen Bindungsstärke von Rab1b an die Nickelmatrix erfolgte der erste Waschschrift bei der Metallaffinitätschromatographie bei der Isolierung von Rab1b mit 10 mM Imidazol. Zur Stabilisierung des Proteins wurde bei der Isolierung von Rab5a in Anwesenheit von 5 % Glycerin gearbeitet. Weiterhin wurde bei der zweiten Metallaffinitätschromatographie und der Gelfiltrationschromatographie Puffer mit 200 mM Natriumchlorid verwendet. Bei der Isolierung von Sec4 erfolgte die abschließende Gelfiltrationschromatographie mit 50 mM Hepes. Rab1b und Rab35 konnten mit Affinitätschromatographie und Gelfiltrationschromatographie nicht vollständig vom Hexahistidin-MBP-Anker getrennt werden. Daher wurde zusätzlich nach der Gelfiltrationschromatographie eine Affinitätschromatographie mit Amylose-Material in einer PD10 Säule durchgeführt. Die Reinigung wurde mit Gelfiltrationspuffer unter Gravitationsfluss durchgeführt. Säulengebundener Hexahistidin-MBP-Anker wurde mit Gelfiltrationspuffer mit 10 mM Maltose eluiert.

3.4.3.3 Isolierung von Ypt1

Der Aufschluss von Ypt1 Expressionszellen erfolgte in Anwesenheit von 1 % Triton X-100. Die erste Affinitätschromatographie wurde mit 50 mM Tris HCl pH 8, 500 mM Lithiumchlorid, 2 mM β -Mercaptoethanol, 1 mM Magnesiumchlorid, 10 μM GDP mit und ohne Imidazol durchgeführt. Der erste Waschschrift erfolgte mit 20 mM Imidazol. Bei der Dialyse und der anschließenden Metallaffinitätschromatographie wurde Puffer mit 25 mM Tris HCl pH 8, 100 mM Natriumchlorid, 2 mM β -Mercaptoethanol, 10 μM GDP verwendet. Die abschließende Gelfiltrationschromatographie wurde mit 20 mM Hepes pH 7,5, 50 mM Natriumchlorid, 2 mM DTE, 1 mM Magnesiumchlorid und 10 μM GDP durchgeführt.

3.4.3.4 Isolierung von Sec2

Sec2 wurde in Fusion mit einem Hexahistidinanker isoliert, da der Anker durch TEV-Protease nicht effektiv abgespalten werden konnte. Aufgrund dieser Tatsache wurde dem Protein keine TEV-Protease zugesetzt und es wurde nur eine Metallaffinitätschromatographie durchgeführt. Der Zellaufschluss erfolgte in Puffer mit 50 mM Natriumphosphat pH 7,5, 500 mM

Natriumchlorid und 5 % Glycerin. Nach dem Aufschluss wurden 1 % (w/v) CHAPS und 4 M Harnstoff zugesetzt und die Suspension wurde 20 Minuten bei 4 °C unter Rühren inkubiert. Die Metallaffinitätschromatographie erfolgte mit 25 mM Natriumphosphat pH 7,5, 500 mM Natriumchlorid, 5 % Glycerin und 4 M Harnstoff. Das Protein wurde mit einem linearen Gradienten von 0-500 mM Imidazol eluiert. Zur Entfernung des Harnstoffs wurde das Eluat gegen 10 mM Hepes pH 7,5, 100 mM Natriumchlorid und 5 % Glycerin dialysiert. Die abschließende Gelfiltrationschromatographie wurde ebenfalls in diesem Puffer durchgeführt.

3.4.3.5 Isolierung von GGTase-I alpha und beta und FTase-I alpha und beta

Die zwei Untereinheiten der GGTase-I/FTase-I wurden als Fusionsproteine mit ihren Affinitätsankern isoliert und daher nicht mit TEV-Protease verdaut. Die Isolierung der Fusionsproteine wurde, wie für Rabin8 beschrieben (3.4.3.1), durchgeführt, mit dem Unterschied, dass während der Dialyse keine TEV-Protease zugesetzt wurde, und dass daher keine zweite Metallaffinitätschromatographie erforderlich war. Die Dialyse wurde mit Gelfiltrationspuffer durchgeführt.

3.4.3.6 Isolierung von GDI

Der Aufschluss und die erste Metallaffinitätschromatographie wurden bei der Isolierung von GDI-1 in Natriumphosphatpuffer durchgeführt (50 mM Natriumphosphat pH 8, 300 mM Natriumchlorid, 2 mM β -Mercaptoethanol). Die Elution erfolgte mit zwei aufeinanderfolgenden Imidazolgradienten. Zunächst wurde die Säule mit 10 mM Imidazol gewaschen, dann wurde die Imidazolkonzentration in einem linearen Gradienten auf 100 mM Imidazol erhöht, die Säule wurde mit 100 mM Imidazol gewaschen und anschließend wurde die Imidazolkonzentration in einem linearen Gradienten auf 500 mM erhöht. Das Protein wurde während der proteolytischen Abspaltung des Hexahistidinankers in 25 mM Hepes pH 8, 100 mM Natriumchlorid, 1 mM EDTA und 2 mM β -Mercaptoethanol dialysiert. Nach der Dialyse wurde das Protein mit 2 mM Magnesiumchlorid versetzt. Die zweite Metallaffinitätschromatographie wurde mit Dialysepuffer mit 2 mM Magnesiumchlorid durchgeführt. Die Gelfiltrationschromatographie erfolgte mit 20 mM Hepes pH 7,5, 50 mM Natriumchlorid und 5 mM β -Mercaptoethanol.

3.4.3.7 Isolierung von Conneccden

Die Isolierung von Conneccden aus Insektenzellen erfolgte analog zur Isolierung von DrrA (3.4.3.1). Um starke Verunreinigungen aus den Insektenzellen bereits während der ersten Metallaffinitätschromatographie abtrennen zu können, wurde mit 150 mM Natriumchlorid und ohne Lithiumchlorid im Puffer gearbeitet. Der Waschschrift bei der Metallaffinitätschromatographie erfolgte aufgrund der schwachen Bindung von Conneccden an die Säulenmatrix mit 10 mM Imidazol. Die abschließende Gelfiltrationschromatographie erfolgte mit 20 mM Hepes pH 7,5, 100 mM Natriumchlorid und 1 mM TCEP.

3.4.4 *In vitro* Prenylierung von Rab-Proteinen

Einige kleine GTPasen werden in eukaryotischen Zellen posttranslational mit Farnesyl- oder Geranylgeranyl-Gruppen an C-terminalen Cysteinen modifiziert. Diese Modifikation kann durch drei verschiedene Prenyltransferasen katalysiert werden: Farnesyltransferase (FTase), Geranylgeranyltransferase-I und Rab Geranylgeranyltransferase (GGTase-I) oder Geranylgeranyltransferase-II (GGTase-II). Zur enzymatischen Prenylierung *in vitro* wurde in dieser Arbeit Farnesyltransferase und Geranylgeranyltransferase-1 verwendet. Farnesyltransferase und Geranylgeranyltransferase-1 sind sehr homologe Heterodimere. Sie erkennen Proteine mit einer C-terminalen CAAX-Erkennungssequenz (C: Cystein, A: Aliphatisch, X: variabel) als Substrat, wobei die Aminosäure an der X-Position primär entscheidet, welche der beiden Prenyltransferasen das Protein als Substrat erkennt (Reid *et al.*, 2004). Zur Prenylierung mit Farnesyltransferase wurde in dieser Arbeit eine CVIM CAAX-Erkennungssequenz verwendet, während Proteine, die mit Geranylgeranyltransferase modifiziert werden sollten, am C-Terminus, sofern nötig, zu einer CVIL CAAX-Erkennungssequenz modifiziert wurden.

Farnesyltransferase kann neben Farnesylpyrophosphat auch das fluoreszente Analogon NBD-Geranylpyrophosphat als Substrat erkennen, und Geranylgeranyltransferase-1 verwendet neben Geranylgeranylpyrophosphat auch NBD-Farnesylpyrophosphat als Substrat für die Prenylierung (Dursina *et al.*, 2006).

Bei den Prenylierungsreaktionen wurden Prenyltransferase, Rab-Protein und Substrat in einem Verhältnis von 0,5:1:5 mit einer möglichst hohen Endkonzentration für ca. 1,5 Stunden bei Raumtemperatur miteinander inkubiert. Geranylgeranyltransferase-1 wurde bei der Verwendung von NBD-Farnesylpyrophosphat vor der Zugabe des Rab-Proteins 30 Minuten bei Raumtemperatur mit dem Phosphoisoprenoid inkubiert.

Um Rab1b-f-NBD vollständig von Geranylgeranyltransferase-1 zu trennen, wurden mehrere aufeinanderfolgende Affinitätschromatographien durchgeführt. 1 ml Glutathion 4 Sepharose fast flow Material equilibriert mit 40 mM Hepes pH 7,2, 150 mM Natriumchlorid, 5 mM DTE, 2 mM Magnesiumchlorid und 5 % CHAPS wurde mit dem Reaktionsgemisch, das zuvor mit Equilibrierungspuffer auf 3 ml verdünnt wurde, für 1,5 Stunden unter stetiger Durchmischung bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurde der Durchfluss der Säule gesammelt und gegen 50 mM Hepes pH 7,2, 50 mM Natriumchlorid, 2 mM Magnesiumchlorid und 5 mM DTE dialysiert. Diese Isolierung wurde mit 2 ml Glutathion 4 Sepharose fast flow Material und 20 mM Hepes pH 7,2, 50 mM Natriumchlorid, 5 mM DTE, 2 mM Magnesiumchlorid und 10 µM GDP wiederholt. Verbliebene GGTase-I wurde mit Nickelaffinitätschromatographie aus dem Reaktionsansatz entfernt. Als Laufpuffer wurde 20 mM Hepes pH 7,2, 50 mM Natriumchlorid, 2 mM β-Mercaptoethanol, 2 mM Magnesiumchlorid und 10 µM GDP eingesetzt. Die Elution von Rab1 erfolgte mit 0 mM und 20 mM Imidazol.

Um Rab5a, Rab35 und Sec4 nach der Prenylierung von einem Großteil der GGTase zu befreien, wurde eine Gelfiltrationschromatographie mit einer Superdex 200 10/30 Säule durchgeführt. Nach der Durchführung der Prenylierungsreaktion wurde die Natriumchloridkonzentration im Reaktionsansatz auf 500 mM erhöht und die Lösung wurde mittels Ultrafiltration auf ein Volumen von 500 µl konzentriert. Vor der Gelfiltrationschromatographie, die mit 20 mM Hepes pH 7,2, 500 mM Natriumchlorid, 2 mM Magnesiumchlorid, 2 mM DTE und 10 µM GDP durchgeführt wurde, wurde die Lösung mit 5 % (w/v) CHAPS versetzt.

3.4.5 Nukleotidaustausch an Rab-Proteinen

In der Zelle liegt GTP im Überschuss gegenüber GDP vor (Vandyke *et al.*, 1977; Trahey und McCormick, 1987). Kleine GTPasen liegen daher vermutlich nach ihrer Synthese in der Zelle vermutlich zunächst in GTP-gebundener Form vor. Aufgrund der intrinsischen Nukleotidhydrolyseaktivität der kleinen GTPasen ist im aktiven Zentrum der isolierten Proteine allerdings in der Regel ausschließlich GDP vorhanden. Da ein Magnesiumion für die Bindung des Nukleotids in der Bindungstasche essentiell ist, kann durch die effektive Bindung des Magnesiums durch den Chelator EDTA die Affinität des Proteins für das Nukleotid deutlich gesenkt werden, wodurch eine erhöhte Nukleotidfreisetzungsrates erreicht werden kann. Durch Zugabe eines großen Überschusses des gewünschten Nukleotids kann der Nukleotidbindestatus des Proteins gezielt beeinflusst werden.

Der Nukleotidaustausch erfolgte in Anwesenheit eines 5-fachen Überschusses Nukleotid gegenüber Protein beim Austausch zu Nukleotiden mit einer mant-Gruppe. Beim Austausch zu GTP wurde ein 20-facher Überschuss Nukleotid eingesetzt. Zur Entfernung des Magnesiums aus der Nukleotidbindungstasche des Proteins wurde ein 5-facher Überschuss von EDTA gegenüber Magnesiumchlorid zugegeben. Die Reaktion wurde zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Entfernung von überschüssigem Nukleotid und EDTA wurden die Proteine anschließend mit einer NAP5 Säule nach der Beschreibung des Herstellers in Puffer mit 1 μ M Nukleotid und 1 mM Magnesiumchlorid überführt.

3.4.6 Herstellung von nukleotidfreiem Rab1b:DrrA-Komplex

Zur Herstellung von nukleotidfreiem Rab1b:DrrA-Komplex wurden äquimolare Mengen DrrA und Rab1b gemischt und mit 10 mM EDTA zur Chelatierung des für die Nukleotidbindung benötigten Magnesiums vermischt. Die Proteinmischung wurde für 1 Stunde bei Raumtemperatur und für weitere 2 Stunden auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Nukleotide mittels Gelfiltrationschromatographie mit 20 mM Hepes pH 8, 50 mM Natriumchlorid und 2 mM DTE Puffer entfernt. Bei der Isolierung des Rab1b:DrrA_{fl}-Komplexes wurde eine Superdex 200 Säule verwendet, während für den Rab1b:DrrA₃₄₀₋₅₃₃-Komplex eine Superdex 75 Matrix verwendet wurde.

3.4.7 Adenylylierung

Die N-terminale Adenylyltransferase-Domäne von DrrA katalysiert die Modifikation von Tyrosin 77 von Rab1b mit Adenosinmonophosphat (Muller *et al.*, 2010). Um den Einfluss dieser Adenylylierung zu untersuchen, wurde Rab1b mit DrrA_{fl} in Anwesenheit von ATP adenylyliert. Rab1b wurde mit DrrA_{fl} und ATP in einem Verhältnis von 10:1:25 für 1,5 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Abtrennung von DrrA_{fl} wurde anschließend eine Gelfiltrationschromatographie mit einer Superdex 75 Säule mit 20 mM Hepes pH 7,5, 50 mM Natriumchlorid, 1 mM Magnesiumchlorid, 2 mM DTE und 10 μ M GDP durchgeführt. Zur Überprüfung der Adenylylierungsreaktion wurde die Masse von Rab1b mit ESI-MS analysiert. Um einen stärkeren Grad der Adenylylierung zu erreichen, wurde die Reaktion gegebenenfalls wiederholt.

3.5 Proteinanalytische Methoden

3.5.1 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Analyse der Reinheit von Proteinen wurden die Proteine mit diskontinuierlicher Polyacrylamidgelelektrophorese in SDS-haltigen Gelen nach ihrer Größe aufgetrennt. Die Gele bestehen aus einem Sammelgel, das dazu dient, die Proteine möglichst konzentriert in das Trenngel einlaufen zu lassen, und einem Trenngel, das mit einer deutlich höheren Acrylamidkonzentration die Proteine aufgrund des Molekularsiebeffekts trennt.

Zur Auftrennung wurde das von Laemmli (1970) beschriebene System mit Tris und Glycin verwendet. Bei diesem System liegt der pH-Wert des Sammelgels mit 6,8 sehr nah am isoelektrischen Punkt des Glycins. Glycin hat daher im Sammelgel eine niedrigere elektrophoretische Mobilität und dient als Folgeion, während die Chlorid-Ionen eine hohe elektrophoretische Mobilität besitzen und somit als Leitonen fungieren. Das Sammelgel ist relativ weitporig, daher liegen die Mobilitäten der Proteine zwischen denen der Folge- und Leitonen. Beim Anlegen des elektrischen Feldes wandern die stärker geladenen Leitonen schneller als die Folgeionen. Hierdurch entsteht ein Feldstärkegradient, der dazu führt, dass die Ionen mit der höheren Mobilität gebremst werden, während die Ionen mit niedrigerer Mobilität beschleunigt werden. Hierdurch erreichen die Proteine gesammelt zwischen Folge- und Leitonen das Trenngel. Am Übergang zum engporigen Trenngel werden die Proteine aufgrund der höheren Acrylamidkonzentration abgebremst und dadurch zusätzlich gesammelt.

Das Trenngel hat einen pH-Wert von 8,8. Glycin ist bei diesem pH-Wert deutlich stärker geladen und überholt die Proteine beim Übergang von dem Sammelgel in das Trenngel. Die Proteine befinden sich nun in einem homogenen Feld und werden aufgrund ihrer unterschiedlichen elektrophoretischen Mobilität aufgetrennt.

In dieser Arbeit wurden 1 mm dicke 15 %-ige Gele verwendet, die in einer Mini Protean II Kammer gegossen wurden. Die genaue Zusammensetzung ist Tabelle 3-13 zu entnehmen.

Vor dem Auftragen wurden die Proteinlösungen mit 2x SDS-PAGE Probenpuffer versetzt und für 5 Minuten auf 95 °C erhitzt. Das im Probenpuffer enthaltene Natriumdodecylsulfat lagert sich in einem relativ konstanten Verhältnis zur Masse an die Proteine an. Hierdurch entstehen Mizellen mit einem konstanten Masse-zu-Ladungsverhältnis, die im Gel aufgrund ihrer Größe voneinander getrennt werden können.

Die Auftrennung erfolgte bei 60 mA für ca. 30 min. Als Größenstandard wurde das LMW Calibration Kit for SDS Electrophoresis von GE Healthcare verwendet. Eine Portion Größenstan-

dard wurde in 125 μ l Sammelgelpuffer, 375 μ l Wasser und 500 μ l 100 mM Tris HCl pH 6,8, 4 % (w/v) SDS, 20 % (v/v) Glycerin, 200 mM DTT und 0,5 % (w/v) Bromphenolblau aufgenommen. Pro Gelkammer wurden 10 μ l dieses Größenstandards aufgetragen.

Tabelle 3-13: 15 % SDS-Glycin Gele		
	Trenngel	Sammelgel
Gelpuffer	1,25 ml Trenngelpuffer	0,38 ml Sammelgelpuffer
Acrylamid 4K-Lösung (30 %) 37,5:1 (Acrylamid/Bisacrylamid)	2,5 ml	0,25 ml
Wasser	1,24 ml	0,88 ml
10 % APS	25 μ l	12 μ l
TEMED	2,5 μ l	1,5 μ l

Die Färbung der Proteine erfolgte für 5-10 Minuten in heißer SDS-Gel Färbelösung. Zur Entfernung von Coomassie Farbstoff, der nicht an die Proteine gebunden wurde, wurden die Gele mit 10 %iger Essigsäure heißer gewaschen.

Die Detektion von NBD-Fluoreszenz in den Gelen erfolgte mit dem Fluorescence Image Reader FLA-5000 vor der Färbung der Gele. Der Fluorophor wurde bei einer Wellenlänge von 473 nm angeregt. Die Detektion erfolgte mit einem 510 nm *cut-off* Filter.

3.5.2 Proteinkonzentrationsbestimmung

Die Bestimmung von Proteinkonzentrationen erfolgte mit Coomassie nach Bradford oder durch die Messung der Absorption bei 280 nm.

3.5.2.1 Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford

Die Bestimmung von Proteinkonzentrationen nach Bradford (1976) erfolgt mit Hilfe des Farbstoffs Coomassie Brilliantblau. Bei Interaktion mit Arginin und zum Teil auch mit den anderen positiv geladenen und unpolaren Aminosäuren in saurer Lösung erfolgt eine Verschiebung des Absorptionsmaximums dieses Farbstoffs von 465 nm zu 595 nm. Die Ursache hierfür ist vermutlich die Stabilisierung der unprotonierten anionischen Sulfatform des Farbstoffs. Durch die Absorptionsveränderung kann nach einer Kalibrierung der Färbelösung mit einem Standardprotein eine Proteinkonzentration bestimmt werden. Da die Absorptionsver-

änderung von der Aminosäurezusammensetzung des Proteins abhängig ist, ist die Genauigkeit der Konzentrationsbestimmung von der Ähnlichkeit der Proteine zum Eichprotein abhängig.

Alle Messungen erfolgten mit dem Coomassie Protein Assay Reagent Kit. 900 µl Coomassie Lösung wurden mit 100 µl Protein-Wasser-Mischung versetzt, 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, und die Absorption bei 595 nm im Vergleich zu einer Referenzprobe wurde bestimmt. Die Kalibrierung der Färbelösung erfolgte mit Rinderserumalbumin (BSA).

3.5.2.2 Proteinkonzentrationsbestimmung mit Absorptionsmessung

Die Konzentration von reinen Proteinlösungen wurde spektroskopisch bestimmt. Bei 280 nm absorbieren die aromatischen Aminosäuren Tryptophan und Tyrosin, sowie in geringerem Maß Phenylalanin. Die Absorptionskoeffizienten der isolierten Proteine können mit Hilfe der Absorptionskoeffizienten der einzelnen Aminosäuren ungefähr berechnet werden.

Die Absorptionsmessung erfolgte gegen einen Puffernullwert mit einem NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer.

Zur Bestimmung der Konzentration des Fluorophors NBD wurde die Absorption bei 481 nm gegen einen Nullwert bestimmt.

3.5.3 Massenspektrometrie

Massenspektrometer ermöglichen die genaue Bestimmung von Molekülmassen und bestehen aus einer Ionenquelle, in der die Analytmoleküle ionisiert werden, einem Massenanalysator, in dem die Ionen aufgrund ihrer Masse voneinander getrennt werden, und einem Detektor. In dieser Arbeit wurde sowohl MALDI-TOF Massenspektrometrie als auch ESI-MS gekoppelt mit Flüssigchromatographie zur Massenanalyse eingesetzt.

3.5.3.1 MALDI-TOF-Massenspektrometrie

Bei der Matrix-unterstützten Laserdesorptions/Ionisations (MALDI) Methode werden Analytmoleküle, die mit einer Matrix kokristallisiert wurden, durch einen intensiven Laserpuls im Hochvakuum ionisiert. Die entstandenen Ionen werden in einem elektrischen Feld beschleunigt und erreichen aufgrund ihrer unterschiedlichen Masse-zu-Ladungsverhältnisse unter-

schiedliche Geschwindigkeiten. Die im Flugzeitmassenspektrometer (TOF-Massenspektrometer) bestimmte Flugzeit der Ionen von der Ionisation bis zum Auftreffen auf den Detektor ermöglicht daher die Berechnung der Masse-zu-Ladungsverhältnisse der Analytmoleküle.

In dieser Arbeit wurde Sinapinsäure als Matrix eingesetzt. In einer 30 % Acetonitril, 0,2 % TFA Lösung wurde eine gesättigte Lösung mit Sinapinsäure hergestellt. 1 µl Matrix wurde mit 1 µl Proteinlösung mit einer Konzentration von ca. 1 mg/ml auf der MALDI-Platte gemischt und ca. 20 Minuten bei Raumtemperatur getrocknet. Die Bestimmung der Masse erfolgte mit einer Voyager-DE PRO BioSpectrometry Workstation (Perseptive Biosystems / Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland) und der Data Explorer Voyager Software. Die MALDI-TOF Analyse wurde zum Teil nach Proteinligationsreaktionen zur Bestimmung der Produktmasse eingesetzt.

3.5.3.2 Elektrosprayionisations-Massenspektrometrie (ESI-MS)

Die Überprüfung von Proteinmassen erfolgte in der Regel mit Elektrospray (ESI)-Massenspektrometrie. Geladene Analytmoleküle werden bei dieser Methode durch ein starkes elektrisches Feld zwischen dem Massenspektrometer und der Spitze einer Stahlkapillare, in der sich die Analytlösung befindet, desolvatisiert. Die Massenanalyse erfolgte mit einer Ionenfalle. In dieser Apparatur können Ionen durch Anlegen eines quadrupolaren Feldes in einer Potentialmulde gesammelt werden. Die Kopplung des quadrupolaren Feldes mit einem dipolaren Feld ermöglicht den gezielten Auswurf und somit die Detektion von Ionen mit genau definierten Masse-zu-Ladungsverhältnis.

In dieser Arbeit wurde ein LCQ Advantage Max ESI-MS (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, U.S.A.) gekoppelt mit einem Agilent 1100 HPLC System (Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland) verwendet. Um verschiedene Proteine voneinander zu trennen, wurde vor der Ionisation eine Umkehrphasenchromatographie mit einer 214 TP C4 Säule (Grace Vydac, Hesperia, U.S.A.) durchgeführt. Die Umkehrphasenchromatographie erfolgte mit einer konstanten Flussrate von 1 ml pro Minute mit den 0,1 % TFA in Wasser (Puffer A) bzw. Acetonitril (Puffer B). Nach der Injektion der Probe wurde zunächst für 5 Minuten mit einer Mischung aus 20 % Puffer B gespült. Anschließend wurden die Proteine mit einem 10 ml Gradienten von 20 % Puffer B bis 70 % Puffer B, gefolgt von einem 2 ml Gradient von 70 % auf 90 % Puffer B eluiert und danach mit 2 ml 90 % Puffer B gespült. Die Auswertung der

Daten erfolgte mit den Programmen XCalibur (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, U.S.A.) und MagTran (Zhang und Marshall, 1998).

3.5.4 Analytische Gelfiltrationschromatographie

Die Gelfiltrationschromatographie ermöglicht die Trennung von Proteinen nach ihrer Größe wie bereits unter 3.4.3 beschrieben. Mit Hilfe einer Kalibrierung kann mit ihr die ungefähre Größe eines Proteins oder Proteinkomplexes im nativen Zustand bestimmt werden und somit z.B. die Bildung eines Proteinkomplexes nachgewiesen werden.

Die analytische Gelfiltrationschromatographie wurde in dieser Arbeit zur Analyse von Komplexbildungen verwendet und wurde mit einer Superdex 75 10/30 Säule, equilibriert in 20 mM Hepes pH 8, 50 mM Natriumchlorid und 2 mM DTE, mit einer Laufgeschwindigkeit von 1 ml pro Minute durchgeführt. Die Gelfiltrationschromatographie wurde mit dem Waters HPLC System durchgeführt. Eluierende Proteine wurden durch die Messung der Absorption bei 280 nm detektiert.

3.5.5 Umkehrphasenchromatographie

Die Trennung von Molekülen in der Umkehrphasenchromatographie basiert auf der hydrophoben Interaktion der Analytmoleküle mit der unpolaren stationären Phase einer Chromatographiesäule. Je hydrophober die Probe ist, desto stärker interagiert sie mit der stationären Phase und desto später verlässt sie die Säule. Die stationäre Phase besteht meist aus Kieselgel, welches mit Alkylresten der Länge C₂ bis C₁₈ substituiert ist.

In dieser Arbeit wurde die Umkehrphasenchromatographie mit einer C₁₈ Säule durchgeführt um GTP, GDP, GMP und Guanin voneinander zu trennen. Die Chromatographie wurde mit dem Waters HPLC System mit einer Flussrate von 1 ml pro Minute durchgeführt und die Absorption des Eluats bei 254 nm wurde detektiert. Als Laufpuffer wurde 50 mM Kaliumphosphatpuffer mit 10 mM Tetrabutylammoniumbromid eingesetzt. Das positiv geladene quartäre Ammonium interagiert mit den negativ geladenen Phosphatgruppen, d.h. je mehr Phosphatgruppen ein Molekül besitzt, desto hydrophober wird es. Der Puffer enthält zudem Acetonitril, um die Polarität des wässrigen Lösungsmittels zu verringern und somit die Elutionskraft zu erhöhen. Je hydrophober die zu analysierenden Stoffe sind, desto weniger polar

muss das Lösungsmittel sein. Zur Auftrennung von GTP, GDP, GMP und Guanin wurde ein Puffer mit 8 % Acetonitril verwendet.

3.6 Biophysikalische Methoden

3.6.1 Messung von transienten Kinetiken mit Fluoreszenzspektroskopie

Die Fluoreszenzspektroskopie basiert darauf, dass photochemisch angeregte Moleküle durch die Emission eines Photons wieder in den energetischen Grundzustand gelangen können. Die emittierte Fluoreszenz hat eine höhere Wellenlänge als das zur Anregung verwendete Licht, da ein Teil der Anregungsenergie durch strahlungslose Relaxation abgegeben wird.

3.6.1.1 Messung von schnellen Kinetiken

Die Messung von schnellen Kinetiken erfolgte in dieser Arbeit mit dem Stopped-flow Gerät von Applied Photophysics Ltd (Surrey, Großbritannien). Die Anregung der Fluorophore erfolgte mit einer Xenon-Quecksilber-Lampe, verbunden mit einem Monochromator. Tryptophanfluoreszenz wurde bei einer Wellenlänge von 298 nm angeregt und die Emission wurde mit einem 320 nm *cut-off* Filter beobachtet. Die Anregung der mant-Gruppe erfolgte bei 366 nm und die Anregung von NBD erfolgte bei 437 nm. Emission wurde durch einen 420 nm bzw. 530 nm *cut-off* Filter detektiert. Pro Injektion wurden jeweils 50 µl der beiden Reaktanden verwendet. Alle Messungen wurden in 25 mM Hepes pH 8, 50 mM Natriumchlorid, 5 mM Magnesiumchlorid und 5 mM DTE bei 25 °C durchgeführt.

3.6.1.2 Messung von langsamen Kinetiken

Zur Messung von langsamen Kinetiken wurde das FluoroMax-3 von Horiba Jobin Yvon Inc. (Edison, U.S.A.) verwendet. Die Fluoreszenz der mant-Gruppe wurde bei einer Wellenlänge von 360 nm angeregt und die Emission bei 440 nm detektiert. Die Anregung von NBD erfolgte bei 479 nm und die Detektion bei 525 nm. Bei Messungen mit einer Länge von bis zu 10000 Sekunden wurde jede Sekunde ein Signal mit einer Integrationszeit von einer Sekunde aufgenommen. Bei Langzeitmessungen wurde alle 20 Sekunden für eine Sekunde ein Signal aufgenommen. Zwischen der Aufnahme der einzelnen Messpunkte erfolgte keine Anregung der Fluoreszenz. Alle Messungen wurden mit einer 10 mm Quartz-Küvette 109.004F-Qs der

Firma Hellma GmbH & Co. KG (Müllheim, Deutschland) durchgeführt. Nach jeder Zugabe wurde die Lösung für 30 Sekunden auf Stufe 4 gerührt. Als Messpuffer wurde 25 mM HEPES pH 8, 50 mM Natriumchlorid, 5 mM Magnesiumchlorid und 5 mM DTE verwendet. Alle Messungen wurden bei 25 °C durchgeführt.

3.6.2 Gleichgewichtstitration

Zur Bestimmung der Konzentration der prenylierten Rab-Proteine wurden Gleichgewichtstitrationen mit dem FluoroMax-3 durchgeführt. Die Messungen der NBD-Fluoreszenz erfolgte wie unter 3.6.1.2 für Messungen bis 10000 Sekunden beschrieben. Die in der Küvette vorgelegten Rab-Proteine wurden unter kontinuierlichem Rühren im Abstand von jeweils 200 Sekunden mit substöchiometrischen Mengen GDI versetzt. Die Höhe des jeweils erreichten Fluoreszenzplateaus wurde durch Mittelung der letzten 50 Datenpunkte vor erneuter Zugabe von GDI bestimmt. Die bestimmte Fluoreszenzänderung wurde mit einem Verdünnungsfaktor korrigiert.

3.6.3 Isotherme Titrationskalorimetrie (ITC)

Zur Bestimmung der thermodynamischen Parameter von Protein-Protein-Interaktionen wurden Isotherme Titrationskalorimetrie (ITC)-Messungen durchgeführt. Durch Messung der entstehenden Wärme bei der Bindung von zwei Proteinen aneinander kann in einem einzigen Experiment die Dissoziationskonstante K_D sowie die Bindungsenthalpie ΔH und die Stöchiometrie der Bindung n ermittelt werden. Die freie Enthalpie ΔG und die Entropieänderung ΔS können aus diesen Daten berechnet werden.

In dieser Arbeit wurden alle Messungen mit dem Mikrokalorimeter iTC₂₀₀ der Firma MicroCal/GE Healthcare (München, Deutschland) durchgeführt. In 300 μ l Proteinlösung in der Messzelle wurde in 16 Injektion im Abstand von 180 Sekunden jeweils 2 μ l Proteinlösung aus der Spritze injiziert. Bei der ersten Injektion wurden nur 0,5 μ l injiziert. Als Messpuffer wurde 50 mM HEPES pH 8, 50 mM Natriumchlorid, 5 mM Magnesiumchlorid, 1 mM TCEP und 500 μ M GDP verwendet. Alle Messungen wurden bei 25 °C durchgeführt. Zur Kontrolle wurde jeweils eine Messung durchgeführt, bei dem Protein in Puffer injiziert wurde.

4 Ergebnisse

4.1 Biochemische Charakterisierung der Guaninnukleotidaustauschaktivität von DrrA

DrrA aus *Legionella pneumophila* wurde als Nukleotidaustauschfaktor für Rab1 identifiziert und zeigt in Interaktionsanalysen mit verschiedenen Rab-Proteinen aus Gesamtzelllysat eine hohe Spezifität für Rab1 (Machner und Isberg, 2006). Zum Vergleich mit anderen Nukleotidaustauschfaktoren wurden die thermodynamischen und kinetischen Eigenschaften dieser Interaktion charakterisiert. Um sicherzustellen, dass es sich bei dem von Stefan Schöbel (Schoebel *et al.*, 2009) kristallisierten Fragment von DrrA mit den Aminosäuren 340-533 (DrrA₃₄₀₋₅₃₃) um die vollständige GEF-Domäne handelt, wurde neben dem gesamten DrrA Protein (DrrA_{fl}, DrrA *full length*) auch dieses DrrA-Fragment untersucht.

In Abbildung 4-1 ist das Reaktionsschema von Rab:GEF-Interaktionen gezeigt. K_{D1} , k_{-1} und k_{+1} beschreiben die Interaktion von Rab und GEF. K_{D3} charakterisiert die Affinität der Interaktion zwischen GEF-Protein und nukleotidgebundenem Rab, während K_{D4} die Affinität des nukleotidfreien Komplexes für Nukleotide charakterisiert. K_{D2} beschreibt die Affinität des Rab:GEF-Komplexes in Abwesenheit von Nukleotid. Abhängig von der charakterisierten Rab:GEF-Interaktion können die einzelnen Schritte noch weiter unterteilt werden.

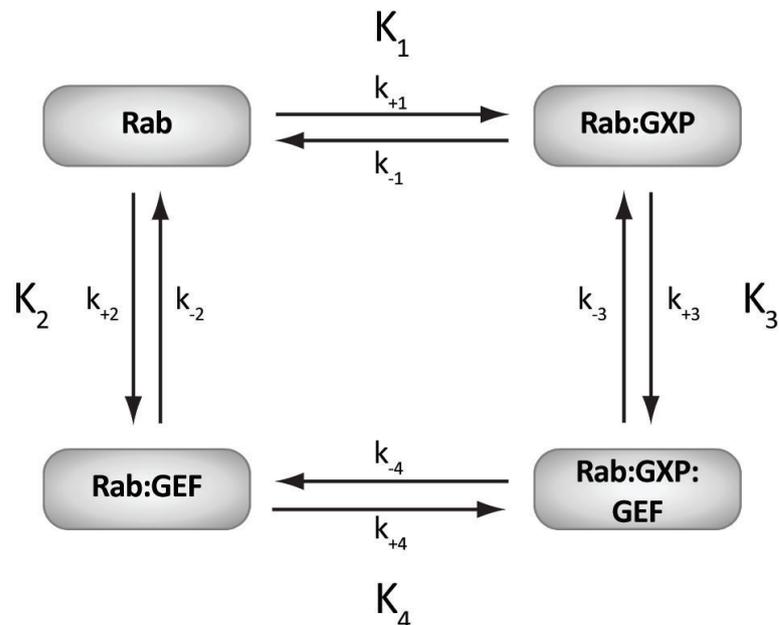


Abbildung 4-1: Schema zur Beschreibung der Interaktion von Rab-Proteinen mit Nukleotiden und Nukleotidaustauschfaktoren (GEFs)

K_1 , K_2 , K_3 und K_4 beschreiben die Gleichgewichtsassoziationskonstanten der einzelnen Interaktionen. k_{+x} und k_{-x} sind als die Assoziations- und Dissoziationsgeschwindigkeitskonstanten der einzelnen Reaktionen definiert. GXP steht für GTP oder GDP.

4.1.1 DrrA-katalysierte Nukleotidfreisetzung von Rab1b

Zur Charakterisierung von K_{D3} und k_{-4} wurde das fluoreszente GDP Derivat mant-Desoxyguanosindiphosphat (mdGDP) verwendet. Die Beladung von Rab1b mit mdGDP erfolgte wie unter 3.4.5 beschrieben. Die Freisetzung des mant-Fluorophors aus der Bindungstasche des Rab-Proteins kann aufgrund einer Fluoreszenzänderung direkt beobachtet werden.

Mit variierenden Konzentrationen von DrrA wurde die Nukleotidfreisetzung von 50 nM Rab1b:mdGDP in Anwesenheit von 100 μ M GDP mittels Stopped-flow durch die Messung der Fluoreszenzänderung der mant-Gruppe gemessen. Die resultierenden Kurven konnten mit einer einfach exponentiellen Funktion gefittet werden. Die beobachteten Geschwindigkeitskonstanten (k_{obs}) zeigen eine hyperbolische Abhängigkeit von der DrrA-Konzentration (Abbildung 4-2 a), die charakteristisch für eine Reaktion mit zwei Schritten ist (John *et al.*, 1990). Im ersten Schritt erfolgt die Assoziation von DrrA an den Rab1b:mdGDP-Komplex (K_3) und im zweiten geschwindigkeitsbestimmenden Schritt die Freisetzung des Nukleotids aus diesem Komplex (k_{-4}). Da die beobachtete Fluoreszenzänderung bei allen verwendeten DrrA-Konzentrationen eine einfach exponentielle Abhängigkeit von der Zeit aufweist, verändert sich die Fluoreszenz des mant-Fluorophors ausschließlich im zweiten Schritt dieser Reaktion. Unter der Annahme, dass die Einstellung des Gleichgewichts im ersten Schritt im Vergleich zum zweiten Schritt schnell ist, gilt die folgende Beziehung zwischen k_{obs} und der DrrA Konzentration ($[DrrA]$) (Esters *et al.*, 2001):

$$k_{obs} = \frac{k_{-4}}{1 + \frac{K_{D3}}{[DrrA]}} + k_{-1}$$

Die maximal stimulierbare Nukleotidfreisetzungsgeschwindigkeitskonstante (k_{-4}) beträgt für DrrA_{fl} 7,6 s^{-1} und für DrrA₃₄₀₋₅₃₃ 8,6 s^{-1} . Die Dissoziationskonstante des Rab:mantGDP:GEF-Komplexes (K_{D3}) ist für den Rab1b:DrrA_{fl}-Komplex mit 34,9 μ M sehr ähnlich wie für Rab1b:DrrA₃₄₀₋₅₃₃ (29,3 μ M). Die intrinsische mGDP-Dissoziationsrate von Rab1b k_{-1} ist deutlich zu klein, um mit dieser Methode exakt bestimmt werden zu können.

Um zu überprüfen, ob die maximal stimulierbare Nukleotidfreisetzungsgeschwindigkeitskonstante (k_{-4}) und die Affinität von DrrA für den Komplex aus Rab1b und Nukleotid (K_3) von dem gebundenen Nukleotid abhängt, wurde der Nukleotidaustausch von mdGppNHp zu GDP und von mdGTP zu GDP beobachtet. Die Freisetzung des Nukleotids wurde, wie oben beschrieben, durch Messung der mant-Fluoreszenz gemessen, und die beobachteten Geschwindigkeitskonstanten wurden gegen die DrrA-Konzentration aufgetragen (Abbildung 4-2 b).

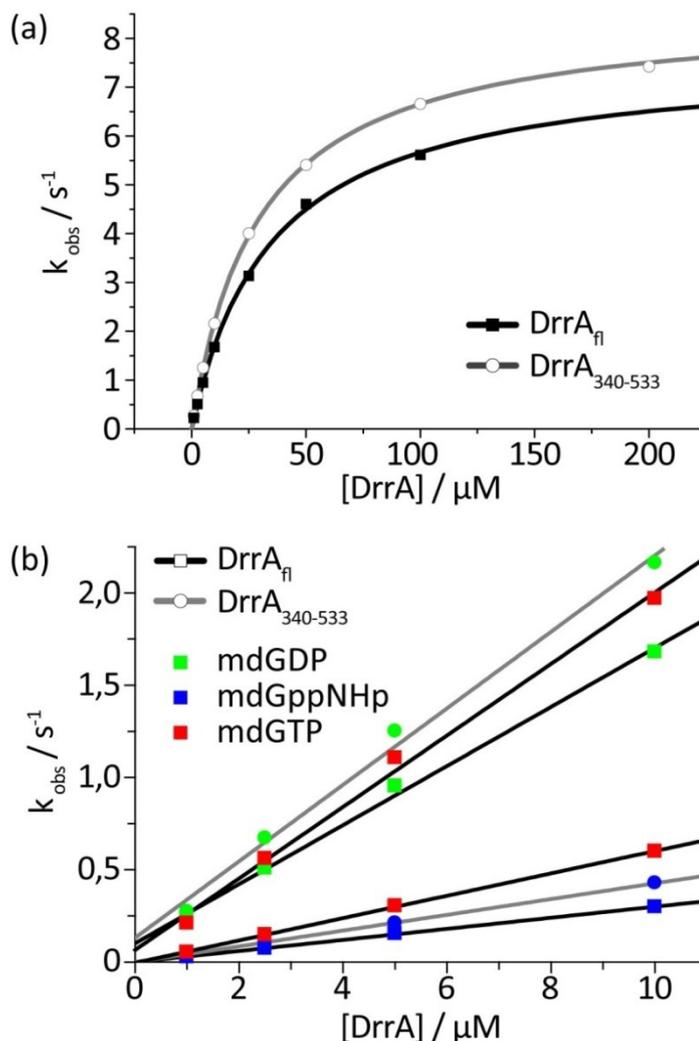


Abbildung 4-2: Freisetzung von mdGDP, mdGppNHp und mdGTP aus dem Rab1b-Komplex

50 nM Rab1b, beladen mit mdGDP (a&b), mdGppNHp (b) oder mdGTP (b), wurden mittels Stopped-flow mit verschiedenen Mengen DrrA_{fl} oder DrrA₃₄₀₋₅₃₃ in Anwesenheit von 100 μM GDP gemischt. Nukleotiddissoziation wurde durch Messung der Fluoreszenz der mant-Gruppe detektiert. Die beobachteten Geschwindigkeitskonstanten (k_{obs}) wurden gegen die verwendete DrrA-Konzentration aufgetragen. Aus dem hyperbolen Fit (a) konnten eine maximal stimulierbare Nukleotidfreisetzungsgeschwindigkeitskonstante (k_{-4}) von $7,6 \text{ s}^{-1}$ (DrrA_{fl}) bzw. $8,6 \text{ s}^{-1}$ (DrrA₃₄₀₋₅₃₃) und eine Dissoziationskonstante (K_{D3}) von $34,9 \mu\text{M}$ (DrrA_{fl}) bzw. $29,3 \mu\text{M}$ (DrrA₃₄₀₋₅₃₃) ermittelt werden. Die aus dem linearen Fit (b) ermittelten und die aus den Ergebnissen des hyperbolen Fits berechneten katalytischen Effizienzen können Tabelle 4-1 entnommen werden.

Tabelle 4-1: Katalytische Effizienz des DrrA-katalysierten Nukleotidaustauschs an Rab1b		
Rab	GEF	k_{-4}/K_{D3}
Rab1b:mdGDP	DrrA _{fl}	$2,2 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ($1,6 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (linearer Fit))
Rab1b:mdGDP	DrrA ₃₄₀₋₅₃₃	$2,9 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ($2,1 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (linearer Fit))
Rab1b:mdGppNHp	DrrA _{fl}	$3,0 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$
Rab1b:mdGppNHp	DrrA ₃₄₀₋₅₃₃	$4,3 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$
Rab1b:mdGTP	DrrA _{fl}	$6,1 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ & $1,9 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$

Leitet man die oben verwendete hyperbole Funktion nach der Konzentration von DrrA ab, so geht daraus hervor, dass für kleine DrrA-Konzentrationen die Steigung der Kurve gegen den Grenzwert k_{-4}/K_{D3} strebt:

$$\begin{aligned} \lim_{[DrrA] \rightarrow 0} \frac{\partial k_{obs}}{\partial [DrrA]} &= \lim_{[DrrA] \rightarrow 0} \frac{k_{-4} \cdot K_{D3}}{\left(1 + \frac{K_{D3}}{[DrrA]}\right)^2 \cdot [DrrA]^2} \\ &= \lim_{[DrrA] \rightarrow 0} \frac{k_{-4} \cdot K_{D3}}{([DrrA] + K_{D3})^2} = \frac{k_{-4}}{K_{D3}} \end{aligned}$$

Aus der Anfangssteigung der Kurven kann somit die katalytische Effizienz k_{-4}/K_{D3} ermittelt werden. In Tabelle 4-1 sind die berechneten katalytischen Effizienzen der verschiedenen Austauschreaktionen dargestellt.

Die katalytische Effizienz des Nukleotidaustauschs an Rab1b:mdGDP ist um einen Faktor fünf höher als bei Rab1b:mdGppNHp. D.h. es liegt eine leichte Präferenz für Rab1b:mdGDP als Substrat von DrrA vor. Für die Freisetzung von mdGTP zeigten die Observablen eine biexponentielle Abhängigkeit von der Zeit. Dies kann vermutlich dadurch erklärt werden, dass aufgrund der Hydrolyse des Nukleotids kleine Mengen des Rab-Proteins in mdGDP-gebundener Form vorlagen. Die katalytische Effizienz, die vermutlich dem Austausch von mdGTP zugeordnet werden kann, ist mit $6,1 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ um einen Faktor zwei größer als die katalytische Effizienz des Austauschs von mdGppNHp, so dass davon auszugehen ist, dass das nicht hydrolysierbare GTP-Analog GppNHp nur eine sehr leichte Veränderung der Austauschaktivität bewirkt. Die aus der Anfangssteigung ermittelte katalytische Effizienz des Nukleotidaustauschs an Rab1b:mdGDP liegt mit $1,6 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ bzw. $2,1 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ etwas niedriger als der Quotient, der aus den separat bestimmten Konstanten k_{-4} und K_{D3} berechnet werden kann ($2,2 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ bzw. $2,9 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$).

4.1.2 Unabhängige Bestimmung der Affinität von DrrA für Rab1b:GDP

Zur unabhängigen Bestimmung von K_{D3} und um den Einfluss der mant-Gruppe auf die Affinität des Rab1b:GDP:DrrA-Komplexes abschätzen zu können, wurden ITC-Messungen durchgeführt. Um sicherzustellen, dass ausschließlich die Bindung von DrrA an den Rab1b:GDP-Komplex gemessen wurde, wurde mit einem großen Überschuss von GDP (500 μM) im Puffer gearbeitet. In Abbildung 4-3 sind die Ergebnisse der ITC-Messungen zu sehen. DrrA_{fl} und DrrA₃₄₀₋₅₃₃ zeigen mit Dissoziationskonstanten von 7,9 μM und 7,0 μM wiederum sehr ähnli-

che Affinitäten für Rab1b:GDP. Die Affinität von DrrA für Rab1b:GDP liegt allerdings um einen Faktor 4-4,5 über der in Abschnitt 4.1.1 ermittelten Affinität für Rab1b:mdGDP. Eine Ursache hierfür könnten leichte sterische Hinderungen durch die mant-Gruppe bei der Bindung von DrrA sein.

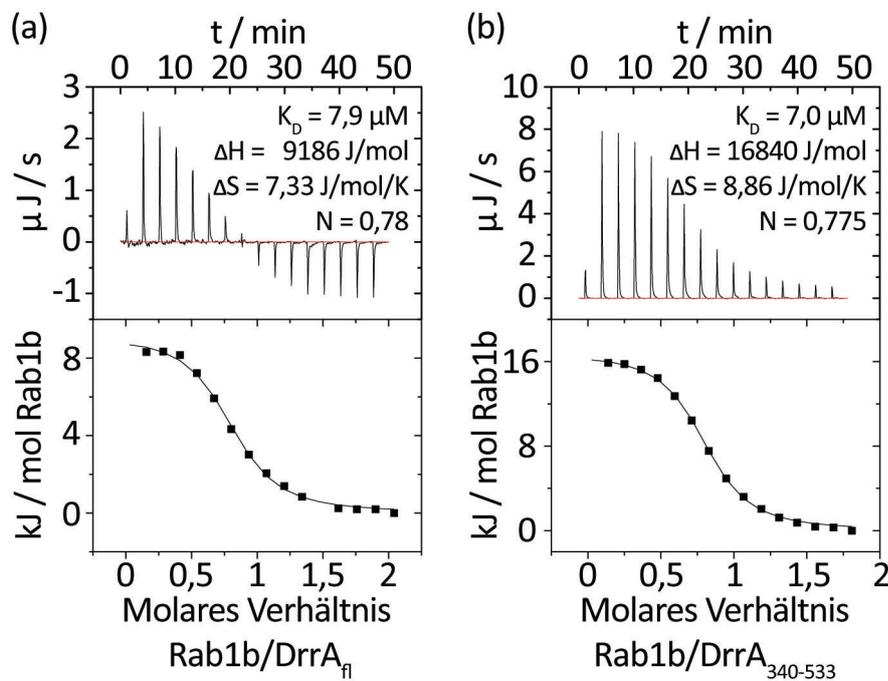


Abbildung 4-3: ITC-Messung zur Bestimmung der Affinität von DrrA für Rab1b:GDP

2,3 bzw. 2,5 mM Rab1b wurde zu 183 μM DrrA_{fi} (a) bzw. 221 μM DrrA₃₄₀₋₅₃₃ (b) titriert. Die Messungen wurden wie unter 3.6.3 beschrieben durchgeführt. Für den DrrA:Rab1b:GDP-Komplex konnte eine Dissoziationskonstante von 7,9 μM (DrrA_{fi}) bzw. 7,0 μM (DrrA₃₄₀₋₅₃₃) ermittelt werden.

4.1.3 Bestimmung der Nukleotidaffinität des Rab1b:DrrA-Komplexes

Die Affinität des nukleotidfreien Rab1b:DrrA-Komplexes für GDP konnte durch Messung der Kinetik der Tryptophanfluoreszenzänderung bei Zugabe von GDP bestimmt werden. 1 μM Rab1b:DrrA-Komplex wurde mittels Stopped-flow mit variierenden Konzentrationen GDP gemischt. Die Messung wurde zum Vergleich mit den Proteinen der vollen Länge (Rab1b:DrrA_{fi}-Komplex) und dem für die Strukturbestimmung verwendeten Rab1b₃₋₁₇₄:DrrA₃₄₀₋₅₃₃-Komplex durchgeführt. Die resultierenden Kurven zeigten einen einfach exponentiellen Verlauf. Die ermittelten k_{obs} -Werte wiesen eine hyperbolische Abhängigkeit von der GDP-Konzentration auf (Abbildung 4-4), die charakteristisch für einen Zweischrittmechanismus mit einem schnellen Vorgleichgewicht und einem darauffolgenden geschwindigkeitsbe-

stimmenden Schritt ist. Da dieser geschwindigkeitsbestimmende Schritt nicht der als relativ schnell definiert Zerfall des Rab1:GDP:DrrA Komplexes zu Rab1:GDP und DrrA sein kann (k_{-3}), muss ein Zwischenschritt bei dem Prozess der Nukleotidfreisetzung definiert werden. Der trimerer Komplex Rab1:GDP:DrrA kann somit in zwei unterschiedlichen Zuständen vorliegen (Rab1:GDP:DrrA & Rab1*:GDP:DrrA, Abbildung 4-5).

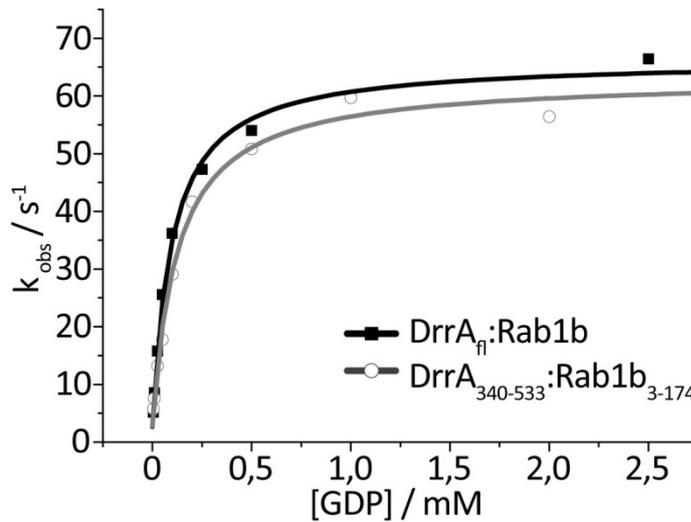


Abbildung 4-4: Konzentrationsabhängigkeit der Geschwindigkeitskonstanten der Bindung von GDP an den nukleotidfreien DrrA:Rab1b-Komplex

1 μM DrrA_{fi}:Rab1b bzw. DrrA₃₄₀₋₅₃₃:Rab1b₃₋₁₇₄ wurden mittels Stopped-flow mit verschiedenen Mengen GDP gemischt. Die Bindung des Nukleotids an den Komplex wurde durch die Messung der Tryptophanfluoreszenz detektiert. Die beobachteten Geschwindigkeitskonstanten (k_{obs}) wurden gegen die eingesetzten GDP-Konzentrationen aufgetragen. Aus den Messdaten konnte ein K'_{D4} von 96 μM und ein k_{+4} von 64 s^{-1} für den Komplex der vollen Länge ermittelt werden bzw. 125 μM und 60 s^{-1} für den Komplex mit verkürzten Proteinen.

Die Kurve kann analog zu der unter 4.1.1 vorgestellten Funktion mit der folgenden Funktion angepasst werden:

$$k_{\text{obs}} = \frac{k''_{+4}}{1 + \frac{K'_{D4}}{[\text{GDP}]}}$$

DrrA_{fi} und DrrA₃₄₀₋₅₃₃ zeigen auch in dieser Messung ein nahezu identisches Verhalten. Für den Rab1b:DrrA_{fi}-Komplex konnte eine Dissoziationskonstante für den ersten Schritt, bei dem das Nukleotid schwach gebunden wird (K'_{D4}), von 96 μM ermittelt werden. Für die geschwindigkeitsbestimmende Isomerisierungsreaktion wurde eine Geschwindigkeitskonstante (k''_{+4}) von 64 s^{-1} gemessen. Für den Rab1b₃₋₁₇₄:DrrA₃₄₀₋₅₃₃-Komplex wurden K'_{D4} mit 125 μM und k''_{+4} mit 60 s^{-1} bestimmt.

4.1.4 Der Rab1b:DrrA:GDP-Interaktionszyklus

Um den Interaktionszyklus von Rab1b mit DrrA und Nukleotid zu vervollständigen, kann K_{D4} mit den unter 4.1.3 beschriebenen Werten mit der folgenden Formel berechnet werden:

$$K_{D4} = \frac{K'_{D4}}{1 + \frac{k''_{+4}}{k''_{-4}}}$$

Für K_{D4} ergibt sich so ein Wert von $10,2 \mu\text{M}$, und k_{+4} kann daraus mit $7,5 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ berechnet werden, da k''_{-4} der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Nukleotidfreisetzungreaktion ist und somit k_{-4} entspricht. Die Affinität von Rab1b für mGDP (K_{D1}) kann analog zu K_{D4} mit den von Aymelt Itzen (Schoebel *et al.*, 2009) bestimmten Konstanten k''_{+1} , k''_{-1} und K'_{D1} berechnet werden.

Zur Bestimmung der Bindungsaffinität des nukleotidfreien Rab1b:DrrA-Komplexes (K_{D2}) in Abwesenheit von Nukleotid kann nun die folgende Formel verwendet werden (Goody und Hofmann-Goody, 2002):

$$\frac{K_{D1}}{K_{D4}} = \frac{K_{D2}}{K_{D3}}$$

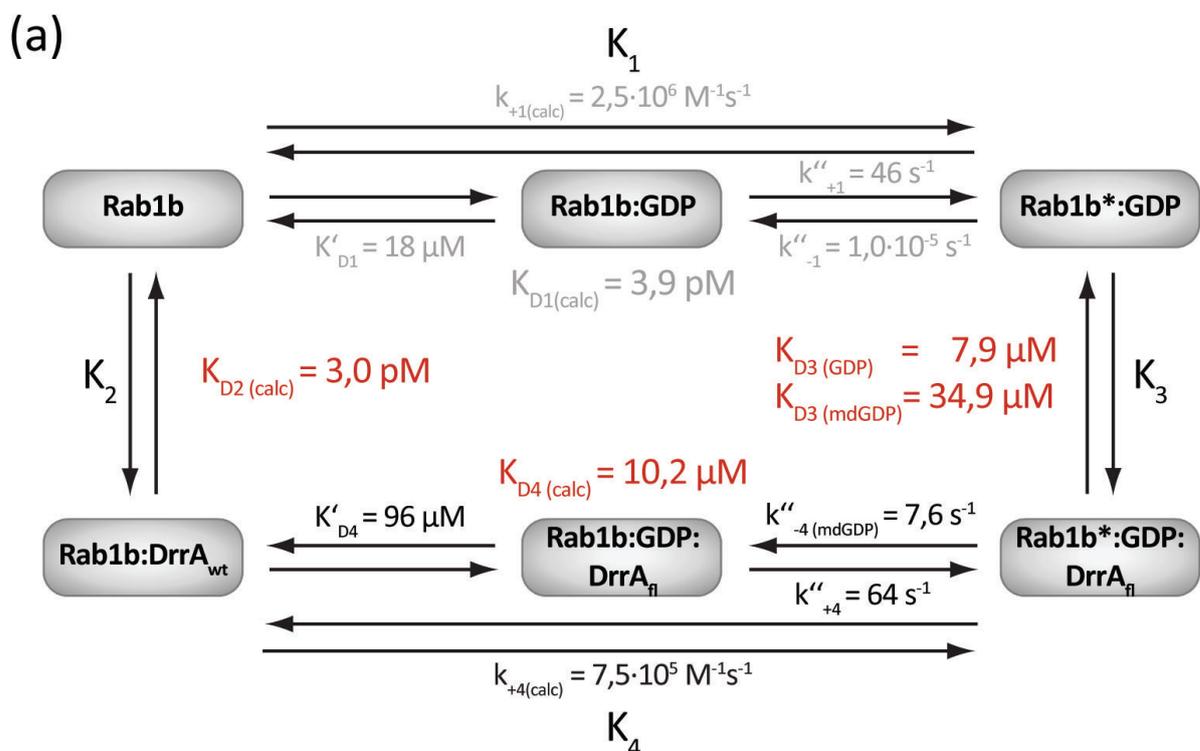


Abbildung 4-5: Thermodynamische und kinetische Parameter der Interaktion von Rab1b mit GDP und DrrA

Alle in dieser Arbeit gemessenen oder berechneten (calc) Werte sind in schwarz und rot dargestellt. K_{D2} wurde unter Verwendung des mit GDP bestimmten K_{D3} Wertes berechnet.

In Abbildung 4-5 sind alle berechneten und bestimmten kinetischen und thermodynamischen Konstanten der Rab1b:DrrA_{fl}-Interaktion dargestellt. Der unter Nutzung des mit GDP bestimmten K_{D3} Wertes berechnete K_{D2} von 3 pM zeigt, dass der Rab1b:DrrA-Komplex in Abwesenheit von Nukleotid eine sehr hohe Stabilität aufweist.

4.1.5 Spezifität von DrrA für Rab1b

In Untersuchungen zur Spezifität der Interaktion von DrrA mit Rab1 zeigte DrrA keine Nukleotidaustauschaktivität für Rab2, Rab5, Rab6, Rab7 und Rab18 und lediglich eine schwache Austauschaktivität gegenüber Rab35 (Murata *et al.*, 2006). In Komplexbildungsexperimenten mit Gesamtzelllysat von humanen histiozytischen Leukämiezellen konnte gezeigt werden, dass neben Rab2, Rab5, Rab6 und Rab7 auch Rab4, Rab8 und Rab11 nicht mit DrrA interagieren (Machner und Isberg, 2006).

Um die Spezifität von DrrA für Rab1 zu überprüfen, wurde der DrrA-katalysierte Nukleotidaustausch und das Bindungsverhalten von DrrA an Ypt1 gemessen. Ypt1, das Rab1-Homolog aus Hefe, zeigt ohne den hypervariablen C-Terminus 77 % Sequenzidentität mit der Sequenz von Rab1b und 86 % Sequenzhomologie. Die Nukleotidaustauschaktivität von DrrA für Ypt1 wurde analog zu der Aktivität für Rab1b mit mant-Guanosindiphosphat beladenem Ypt1 ermittelt (Abbildung 4-6 a). DrrA beschleunigt die Nukleotidaustauschrate von Ypt1 gegenüber der intrinsischen Austauschrate nur äußerst gering. In Gelfiltrationsanalysen (Abbildung 4-6 b) kann keine Komplexbildung zwischen DrrA und Ypt1 nachgewiesen werden. Die Elution von Ypt1 in Anwesenheit von DrrA erfolgt zwar mit einem leicht erniedrigten Elutionsvolumen und somit im Bereich einer geringfügig erhöhten Masse, was auf eine schwache Interaktion zwischen DrrA und Ypt1 hinweisen könnte, allerdings kann Ypt1 nicht im Komplex mit DrrA von der Gelfiltrationssäule eluiert werden. Da der Komplex aus DrrA und Rab1 mittels Gelfiltrationschromatographie isoliert werden kann, deutet dieses Ergebnis auf eine deutlich schwächere Bindungsaffinität von DrrA für Ypt1 hin.

In Abbildung 4-7 ist ein Aminosäuresequenzvergleich von Rab1a, Rab1b und Ypt1 dargestellt. Obwohl die Proteine eine sehr starke Homologie aufweisen, sind einige Aminosäuren, die sich in der Kristallstruktur von Rab1b und DrrA (Schoebel *et al.*, 2009) in der Kontaktfläche zwischen den Proteinen befinden, nicht konserviert. Obwohl Ypt1 eine sehr große Sequenzhomologie mit Rab1b aufweist, unterscheiden sich die Aminosäuren der zwei Bindungsstel-

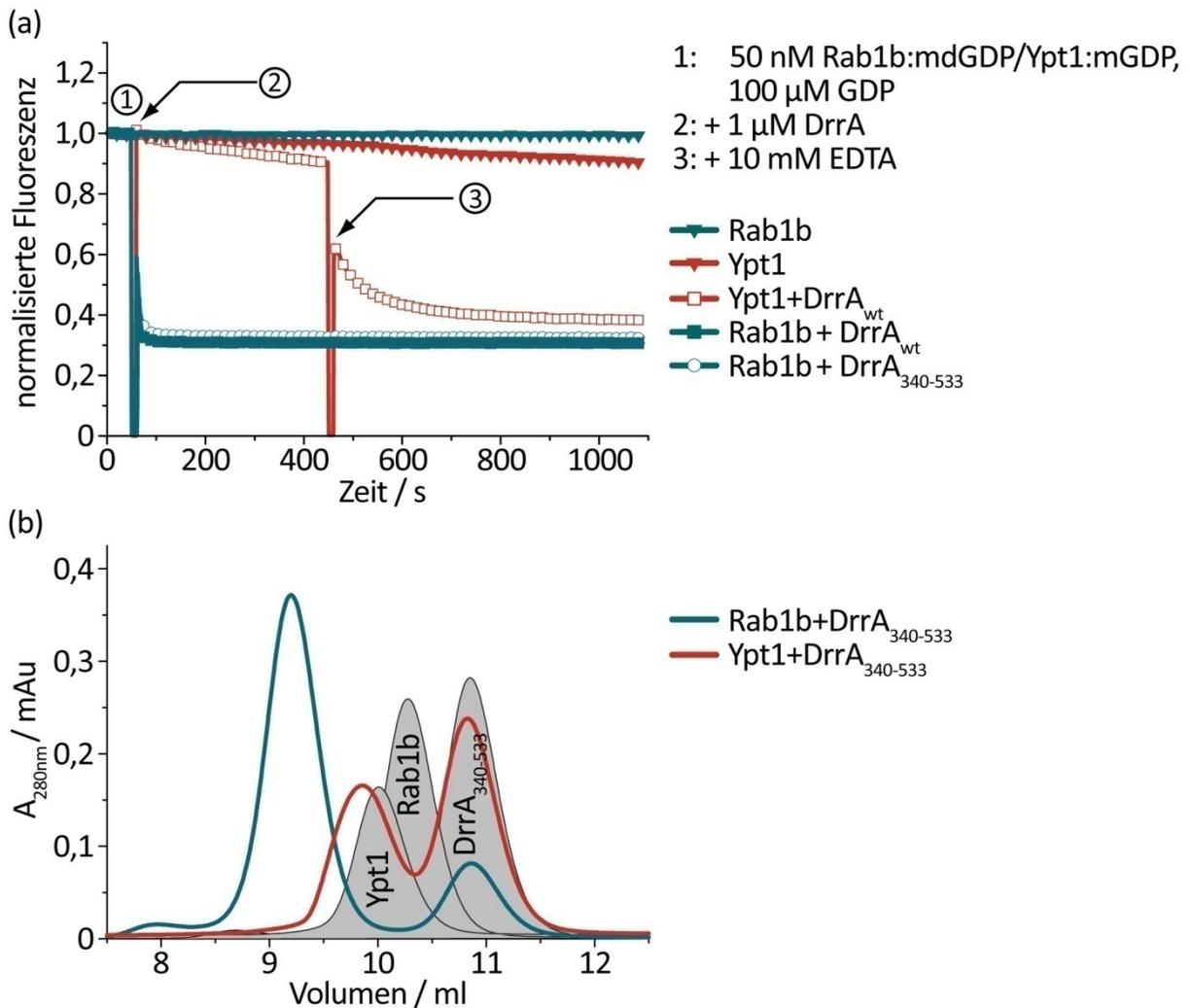


Abbildung 4-6: DrrA-katalysierter Nukleotidaustausch (a) an Ypt1 und Ypt1:DrrA-Komplexbildung (b)

- (a) DrrA-katalysierte und intrinsische Nukleotidfreisetzung aus 50 nM Ypt1:mGDP bzw. Rab1b:mdGDP-Komplex in Anwesenheit von 100 μ M GDP. Die Freisetzung von Nukleotid wurde durch Messung der Fluoreszenz der mant-Gruppe detektiert. Zur Bestimmung des Endpunkts der Nukleotidfreisetzung von Ypt1 wurde nach 450 s EDTA zugesetzt.
- (b) Analytische Gelfiltrationen zur Detektion von Komplexbildung zwischen DrrA₃₄₀₋₅₃₃ und Rab1b bzw. Ypt1. 150 μ g DrrA₃₄₀₋₅₃₃ wurde mit 100 μ g Rab1b bzw. Ypt1 in einem Volumen von 50 μ l gemischt. Die Gelfiltrationschromatographie wurde mit einer Superdex 75 10/30 Säule durchgeführt, und die Elution der Proteine wurde durch Messung der Absorption bei 280 nm detektiert. Das Elutionsverhalten von Ypt1, Rab1b und DrrA₃₄₀₋₅₃₃ ist durch die grauen Flächen dargestellt.

len der Rab1b:DrrA-Interaktion (D16, S17, E35, S36, Abbildung 1-8 b). Bindungsstelle 1 scheint mit lediglich einem relativ konservativen Aminosäureaustausch von Aspartat zu Asparagin etwas stärker konserviert zu sein als Bindungsstelle 2, in der Glutamat durch Asparagin und Serin durch Aspartat ersetzt ist. Aufgrund dieser relativ geringen Homologie der Bin-

dungsstellen ist es nicht erstaunlich, dass DrrA den Nukleotidaustausch an Ypt1 nur äußerst gering stimulieren kann, und die Ergebnisse bestätigen die Vermutung, dass die beiden identifizierten Bindungsstellen eine wichtige Rolle für die Nukleotidaustauschaktivität von DrrA spielen.

	10	20	30	40	50		
Rab1a	MSSMNPE	YDYLFKLLLLIG	DS	GVGKSCLLLR	FADDTYTESY	ISTIGVDFKI 50	
Rab1b	---MNPE	YDYLFKLLLLIG	DS	GVGKSCLLLR	FADDTYTESY	ISTIGVDFKI 47	
Ypt1	---MNSE	YDYLFKLLLLIG	NS	GVGKSCLLLR	SDDTYTNDY	ISTIGVDFKI 47	
	60	70	80	90	100		
Rab1a	RTIELDGKTI	KLQIWD	TAGQERFRTIT	SSYYR	GAHGII	VVYDVT	DQESFN 100
Rab1b	RTIELDGKTI	KLQIWD	TAGQERFRTIT	SSYYR	GAHGII	VVYDVT	DQESYA 97
Ypt1	KTVELDGKTV	KLQIWD	TAGQERFRTIT	SSYYR	RGSHGII	IIVYDVT	DQESFN 97
	110	120	130	140	150		
Rab1a	NVKQWLQEIDRY	ASENVN	KLLVGNKCDL	TTKKVVDYTT	AKEFADSLG	IPF 150	
Rab1b	NVKQWLQEIDRY	ASENVN	KLLVGNKSDL	TTKKVVDN	TTAKEFADSLG	IPF 147	
Ypt1	GVKMWLQEIDRY	ATSTVL	KLLVGNKCDL	KDKRVVEYD	VAKEFADANK	MPF 147	
	160	170	180	190	200		
Rab1a	LETSAKNATNVE	QSFMTMAAE	EIKKRMGPG	----	ATAGGAEKS	NVKIQSTP 196	
Rab1b	LETSAKNATNVE	QAFMTMAAE	EIKKRMGPG	----	AASGG-ERP	NLKIDSTP 192	
Ypt1	LETSALDSTNVE	DAFLTMARQ	IKESMSQQ	NLNETTQ	KKEDKGNV	NLKGQS 197	
Rab1a	VKQSGGGCC	205					
Rab1b	VKPAGGGCC	201					
Ypt1	LTNTGGGCC	206					

Abbildung 4-7: Aminosäuresequenzvergleich von Rab1a, Rab1b und Ypt1

Aminosäuren, die in allen drei Proteinen konserviert sind, sind in dunkelgrau unterlegt und Aminosäuren, die nur in zwei Proteinen konserviert sind, hellgrau. Aminosäuren, die in der Kristallstruktur von Rab1b und DrrA₃₄₀₋₅₃₃ mit DrrA interagieren, sind in rot dargestellt. Die Bindungsstellen 1 und 2 der Rab1b:DrrA-Interaktion sind mit Boxen markiert.

4.1.6 Modifikation der Nukleotidaustauschaktivität von DrrA durch gezielte Mutation

Um den Einfluss der Bindungsstellen 1 und 2 auf die Nukleotidaustauschaktivität von DrrA näher zu untersuchen, wurden die Aminosäuren N451 und R453 von DrrA, die sich in der Bindungsstelle 1 befinden, sowie die Aminosäuren D480 und S483 aus Bindungsstelle 2 einzeln und in unterschiedlichen Kombinationen zu Alanin mutiert. Zur Bestimmung der Nukleotidaustauschaktivität wurde nach Zugabe von Rab1b:mdGDP die Fluoreszenzänderung der

mant-Gruppe beobachtet (Abbildung 4-8 a). Wie bereits für Ypt1 beschrieben, wurde außerdem die Bildung des Rab1b:DrrA-Komplexes mit Gelfiltrationschromatographie untersucht (Abbildung 4-8 b).

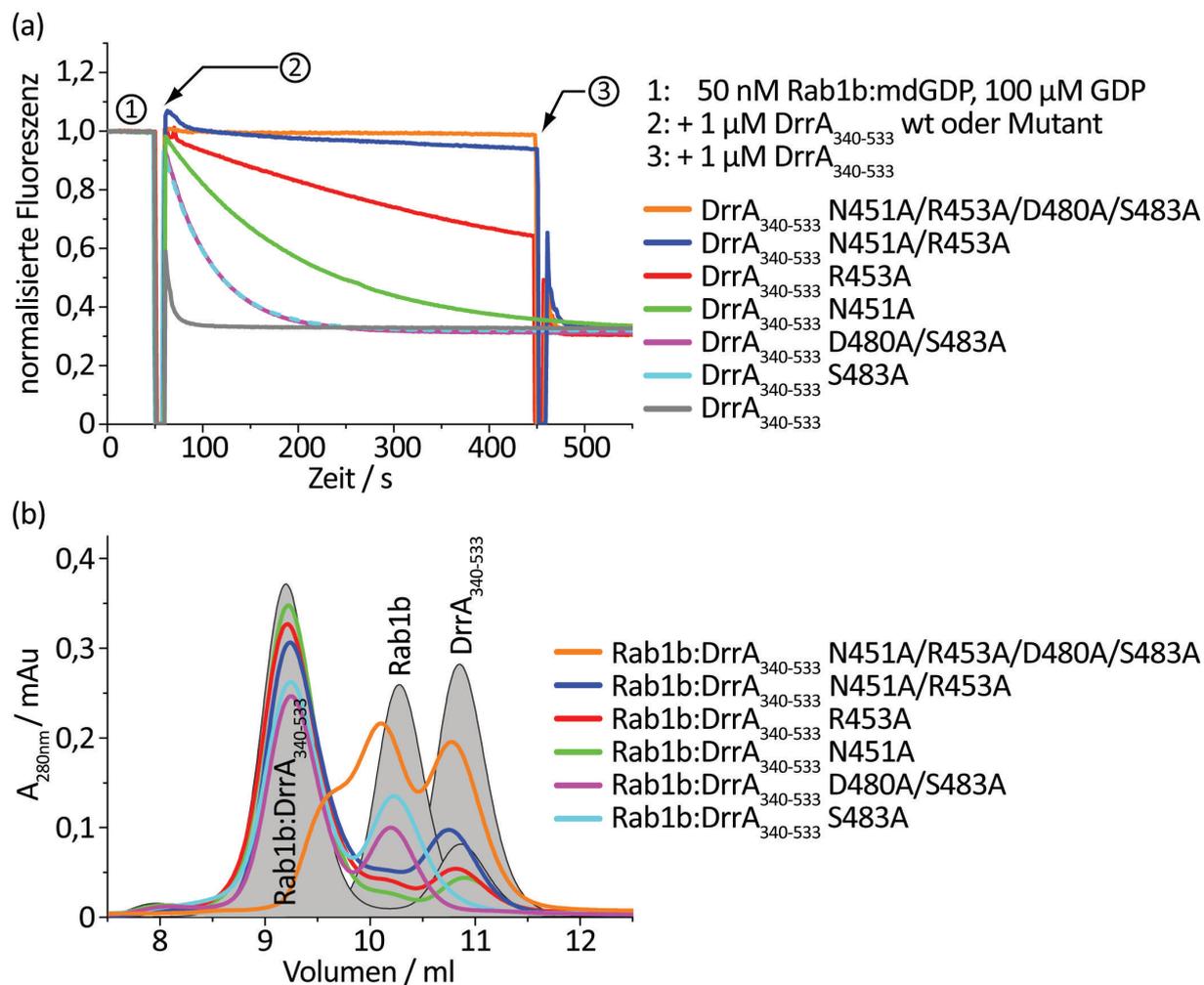


Abbildung 4-8: Nukleotidaustauschaktivität von DrrA-Mutanten (a) und Untersuchung der Komplexbildung dieser Mutanten mit Rab1b (b)

- (a) Die Nukleotidaustauschaktivität von verschiedenen DrrA₃₄₀₋₅₃₃-Mutanten (1 μM) für Rab1b:mdGDP (50 nM) wurde durch Messung der Fluoreszenz der mant-Gruppe bestimmt. Um sicherzustellen, dass das freigesetzte Nukleotid mdGDP nicht wieder von Rab1b gebunden wird, wurde die Messung in Anwesenheit von 100 μM GDP durchgeführt. Zur Bestimmung des Endpunkts des Nukleotidaustausch wurde bei den langsam austauschenden Mutanten nach 450 s wildtypisches (wt) DrrA₃₄₀₋₅₃₃ zugegeben.
- (b) Analyse der Komplexbildung von DrrA-Mutanten und Rab1b durch analytische Gelfiltrationschromatographie mit einer S75 10/30 Säule. 150 μg DrrA₃₄₀₋₅₃₃-Mutanten wurden mit 100 μg Rab1b in einem Volumen von 50 μl auf die Säule aufgetragen. Die Elution der Proteine wurde durch Messung der Absorption bei 280 nm detektiert. Das Elutionsverhalten von DrrA₃₄₀₋₅₃₃, Rab1b und dem wildtypischen Komplex aus diesen beiden Proteinen ist durch die grauen Flächen dargestellt.

Die Messung der Nukleotidaustauschaktivität der DrrA₃₄₀₋₅₃₃-Mutanten zeigt, dass die Bindungsstellen 1 und 2 einen deutlichen Einfluss auf die Nukleotidaustauschaktivität von DrrA besitzen. Die Mutationen in Bindungsstelle 2 (D480A, S483A) zeigen einen deutlich geringeren Einfluss auf die Aktivität als die Mutationen in Bindungsstelle 1 (N451A, R453A). Nach Mutation von beiden Aminosäuren in Bindungsstelle 1 zeigt DrrA nahezu keine Nukleotidaustauschaktivität mehr. Die Gelfiltrationsanalysen zeigen jedoch, dass auch diese Zweifachmutante noch im Komplex mit Rab1b eluiert werden kann. Lediglich die katalytisch vollständig inaktive Vierfachmutante kann nicht im Komplex mit Rab1b detektiert werden.

Die Aminosäuren N451 und R453 in Bindungsstelle 1 scheinen somit eine größere Bedeutung für die Nukleotidaustauschaktivität von DrrA zu haben als D480 und S483 in Bindungsstelle 2. Da Switch 1 bei der Interaktion mit DrrA mit einem relativen großen Oberflächenbereich interagiert, kann die Mutation von Resten in Bindungsstelle 2 eventuell durch andere Interaktionen kompensiert werden.

4.2 Charakterisierung der GDI-Freisetzungaktivität von DrrA

Im Jahr 2007 erschienen zwei Veröffentlichungen, die eine GDI-Freisetzungaktivität von DrrA für Rab1b beschreiben. Sowohl Machner und Isberg (2007) als auch Ingmundson *et al.* (2007) konnten in Pull-down Experimenten zeigen, dass DrrA Rab1 aus einem Rab1:GDI-Komplex freisetzt. Machner und Isberg (2007) zeigten außerdem, dass DrrA eine beschleunigte Inkorporation von GTP in Rab1 in Anwesenheit von GDI katalysiert. Da die Bindung von GDI an Rab-Proteine die Freisetzung von Nukleotid verhindert (Sasaki *et al.*, 1990), deutet dieses Ergebnis auf eine vorherige Dissoziation des Rab1:GDI-Komplexes hin. Um diese GDI-Freisetzungaktivität von DrrA näher zu charakterisieren, wurden in dieser Arbeit Rab-Proteine mit einer Farnesyl-NBD- bzw. Geranyl-NBD-Prenylgruppe eingesetzt. Diese Modifikationen ermöglicht es, die Dissoziation des Rab:GDI-Komplexes direkt und zeitaufgelöst zu verfolgen.

4.2.1 GDI-Freisetzung durch DrrA in Abwesenheit von Nukleotid

Zur Herstellung von Rab1b-farnesyl-NBD (Rab1b-f-NBD) wurde die C-terminale Sequenz von Rab1b zu CVIL mutiert, damit das Protein als Substrat von Geranylgeranyltransferase-1 erkannt wird. Die Prenylierung von Rab1b erfolgte *in vitro*, wie unter 3.4.4 beschrieben, mit Farnesyl-NBD.

In Abbildung 4-9 a sind die Emissionsspektren von Rab1b-f-NBD allein und im Komplex mit GDI dargestellt. Es ist deutlich zu erkennen, dass durch die Bindung von GDI an Rab1b-f-NBD die beobachtete Fluoreszenz der NBD-Gruppe um ca. 60 % ansteigt. Mit Hilfe der NBD-Modifikation an der Prenylgruppe kann somit die Bindung und Freisetzung von GDI direkt beobachtet werden. Zur Untersuchung der GDI-Freisetzung durch DrrA wurden zunächst 50 nM Rab1b-f-NBD in einer Küvette vorgelegt und mit 75 nM GDI versetzt. Nach Zugabe von 1 μ M DrrA_{fl} bzw. DrrA₃₄₀₋₅₃₃ fällt die gemessene NBD-Fluoreszenz nahezu auf den Ausgangswert (Abbildung 4-9 b). Dies zeigt deutlich, dass die Zugabe von DrrA zur Freisetzung von GDI aus dem Rab1:GDI-Komplex führt.

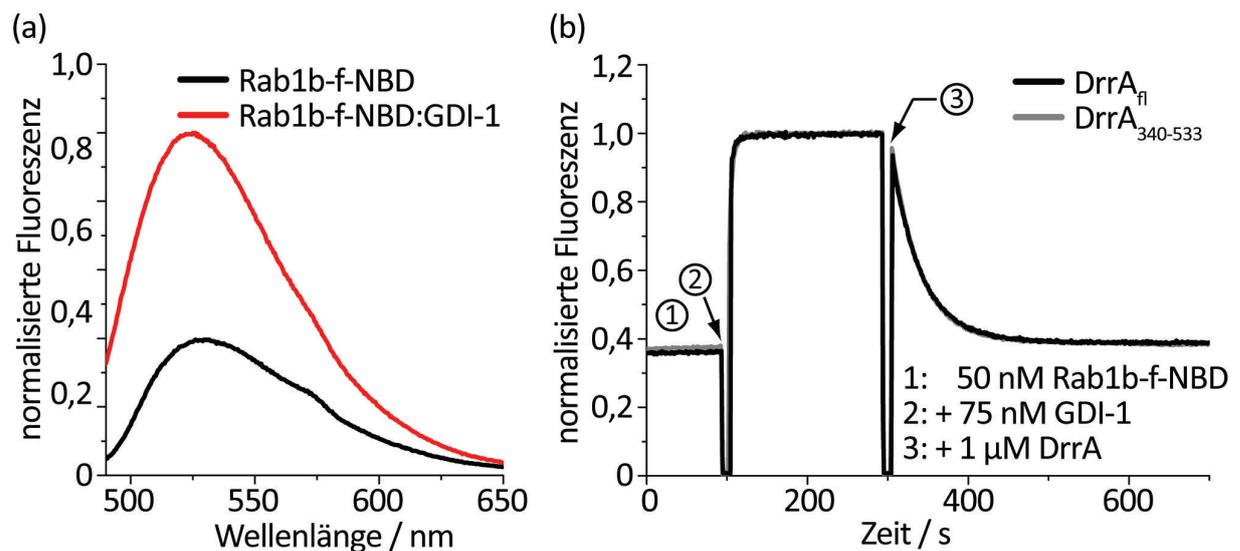


Abbildung 4-9: GDI-Bindung an Rab1-f-NBD

- (a) Das Emissionsspektrum 50 nM Rab1b-f-NBD und 50 nM Rab1b-f-NBD zusammen mit 75 nM GDI-1 wurde nach Anregung bei 479 nm gemessen. Die Emission wurde in 0,5 nm Schritten in einem Wellenlängenbereich von 490 nm bis 650 nm jeweils für 1 s detektiert.
- (b) 50 nM Rab1b-f-NBD wurden in einer Küvette zunächst mit 75 nM GDI-1 gemischt und anschließend mit 1 μ M DrrA_{fl} bzw. DrrA₃₄₀₋₅₃₃ versetzt. Die Bindung von GDI an Rab1b-f-NBD wurde durch Messung der NBD-Fluoreszenz detektiert. DrrA_{fl} oder DrrA₃₄₀₋₅₃₃ zeigen identische GDI-Freisetzungseigenschaften.

4.2.2 Nukleotidabhängigkeit der GDI-Freisetzung durch DrrA

Aufgrund der Tatsache, dass DrrA₃₄₀₋₅₃₃, ein Fragment, das ausschließlich die GEF-Domäne von DrrA umfasst, in gleichem Maße die Freisetzung von GDI bewirken kann wie DrrA_{fl}, stellt sich die Frage, inwieweit die Nukleotidaustauschaktivität von DrrA eine Bedeutung für die GDI-Freisetzung des Proteins hatte. Aus diesem Grund wurde die Nukleotidabhängigkeit der GDI-Freisetzung untersucht (Abbildung 4-10). Die GDI-Freisetzung wurde erneut durch Messung der NBD-Fluoreszenz detektiert.

In Abbildung 4-10 a ist die GDI-Freisetzung in Anwesenheit von 10 nM DrrA₃₄₀₋₅₃₃ dargestellt. Die Zugabe von DrrA führt zu einer 10 %igen Verringerung der Fluoreszenzintensität und somit im Vergleich zur Messung mit 1 µM DrrA (Abbildung 4-9 b) zu einer relativ geringen Fluoreszenzänderung. Substöchiometrische Mengen DrrA₃₄₀₋₅₃₃ können daher nur einen relativ kleinen Anteil des Rab1b:GDI-Komplexes dissoziieren. Die Zugabe von 100 µM GTP nach dem Erreichen eines Fluoreszenzplateaus und somit der Einstellung eines Gleichgewichts (Abbildung 4-10 a, 3) führt zu einer vollständigen Freisetzung des ursprünglich an Rab1b gebundenen GDIs, was auf eine Nukleotidabhängigkeit des GDI-Freisetzungprozesses hindeutet – nur in Anwesenheit von GTP kann ein DrrA₃₄₀₋₅₃₃-Molekül mehrere GDI-Moleküle aus der Bindung mit Rab1b freisetzen.

In Abbildung 4-10 b ist die Fluoreszenzänderung bei der Freisetzung von GDI durch Zugabe von 1 µM DrrA₃₄₀₋₅₃₃ in Anwesenheit von 100 µM GTP dargestellt. Durch anschließende Zugabe von 1 mM GDP (Abbildung 4-10 b, 3) steigt die Fluoreszenz der NBD-Gruppe auf den Wert, der vor der Zugabe von DrrA₃₄₀₋₅₃₃ gemessen wurde. Dies zeigt, dass GDI wieder an Rab1 bindet. Eine Zugabe von GDP im Überschuss gegenüber GTP kann daher die GDI-Freisetzung rückgängig machen. Weiterhin kann ein Überschuss GDP, wie in Abbildung 4-10 c zu sehen ist, die Freisetzung von GDI aus dem Rab1b:GDI-Komplex inhibieren. Die Zugabe von 1 µM DrrA₃₄₀₋₅₃₃ (Abbildung 4-10 c, 3) führt in Anwesenheit von 100 µM GDP zu keiner Fluoreszenzänderung. Nach Zugabe eines Überschusses von GTP gegenüber GDP (Abbildung 4-10 c, 4) erfolgt die Freisetzung von GDI aus dem Rab1b:GDI-Komplex.

Die Freisetzung von GDI aus dem Rab1b:GDI-Komplex durch DrrA zeigt somit eine klare Nukleotidabhängigkeit. Nur in Anwesenheit eines Überschusses von GTP zu GDP kann DrrA GDI aus dem Rab1b:GDI-Komplex freisetzen. In Abwesenheit von Nukleotid erfolgt eine GDI-Freisetzung durch DrrA₃₄₀₋₅₃₃ nur in einem *single turnover* Prozess. Diese Ergebnisse deuten auf eine Korrelation der Nukleotidaustauschaktivität mit der GDI-Freisetzungaktivität hin.

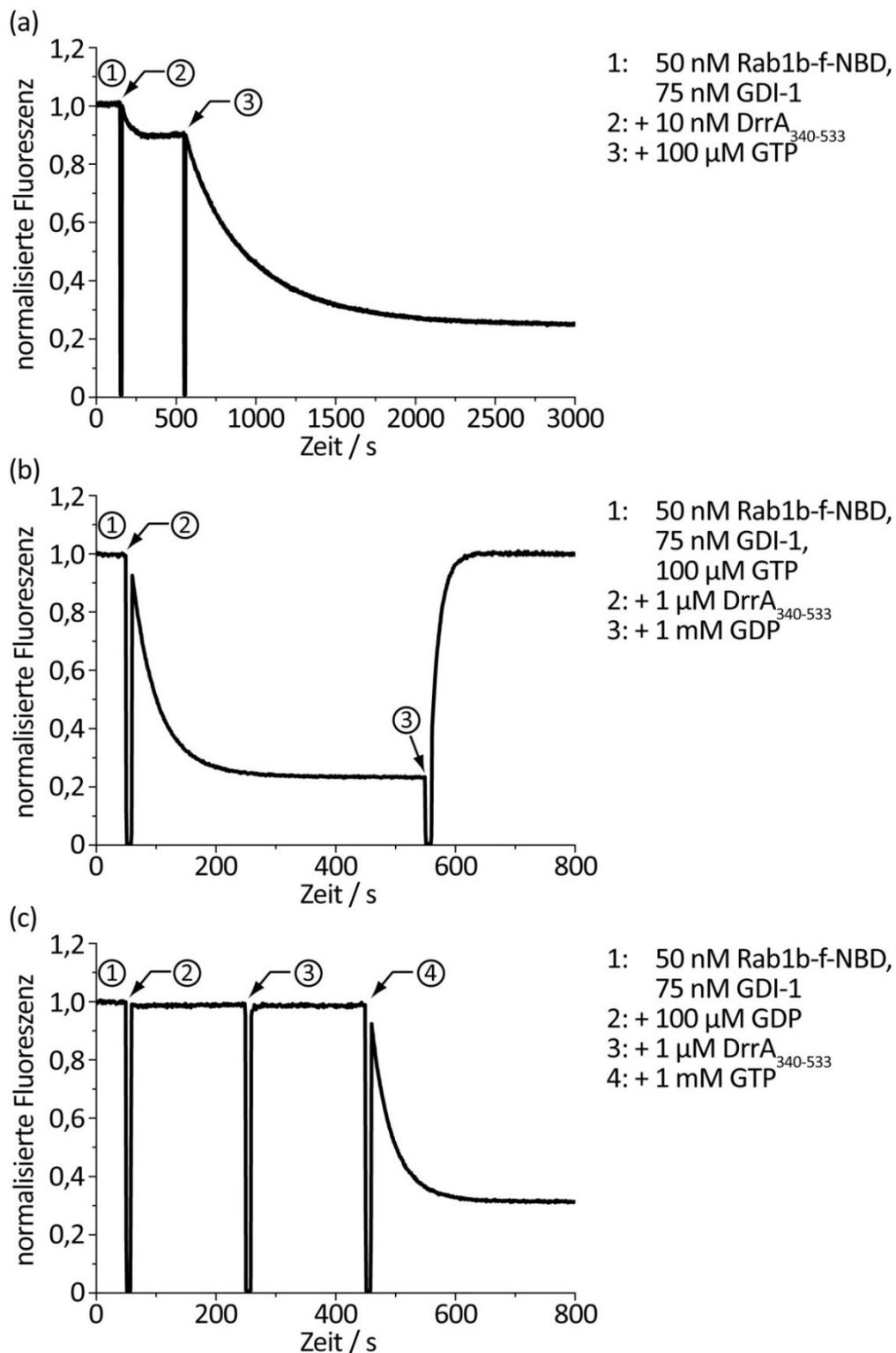


Abbildung 4-10: Nukleotidabhängigkeit der GDI-Freisetzung durch DrrA₃₄₀₋₅₃₃

- (a) GDI-Freisetzung in Anwesenheit von substöchiometrischen Mengen DrrA₃₄₀₋₅₃₃ (10 nM) mit anschließender Zugabe von 100 μM GTP.
- (b) Freisetzung von GDI durch 1 μM DrrA₃₄₀₋₅₃₃ in Anwesenheit von 100 μM GTP und Rückbindung von GDI nach Zugabe von 1 mM GDP.
- (c) Inhibition der GDI-Freisetzung durch 100 μM GDP und GDI-Freisetzung durch anschließende Zugabe von 1 mM GTP.

Um die Verbindung zwischen der GDI-Freisetzungsaktivität von DrrA und der Nukleotidaustauschaktivität von DrrA näher zu charakterisieren, wurden die bereits in 4.1.6 beschriebenen DrrA₃₄₀₋₅₃₃-Mutanten, die eine modifizierte Nukleotidaustauschaktivität aufweisen, verwendet. Zur Messung der GDI-Freisetzungsaktivität wurde in diesem Fall Rab1b-geranyl-NBD (Rab1b-g-NBD) eingesetzt. Die GDI-Freisetzung wurde, wie bereits für wildtypisches DrrA beschrieben, durch die Fluoreszenzänderung der NBD-Gruppe detektiert (Abbildung 4-11).

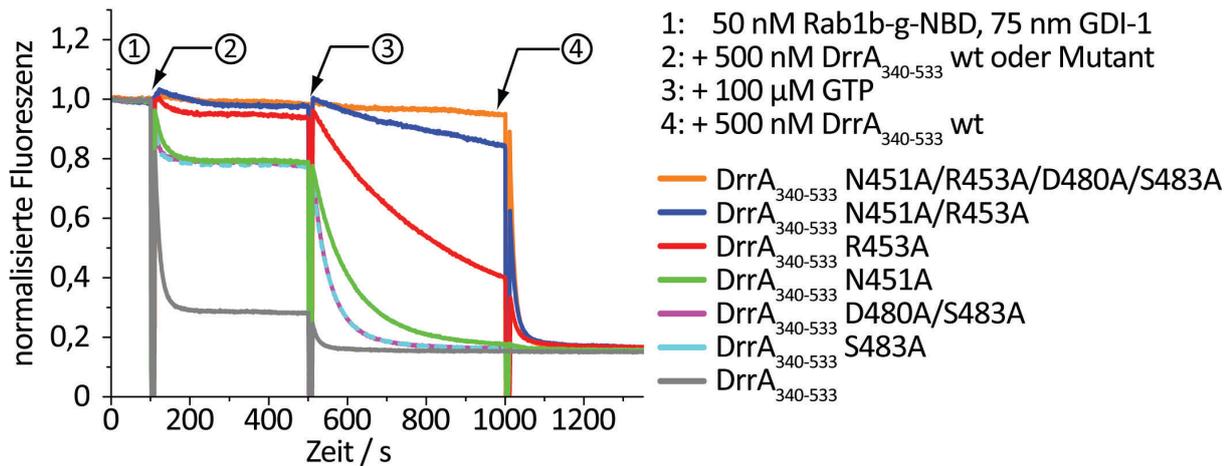


Abbildung 4-11: GDI-Freisetzungsaktivität der DrrA₃₄₀₋₅₃₃-Mutanten

Freisetzung von GDI aus dem Rab1:GDI-Komplex (50 nM Rab1b-g-NBD, 75 nM GDI-1) durch Zugabe von wildtypischem (wt) oder mutiertem DrrA₃₄₀₋₅₃₃ (500 nM). Nach Erreichen eines Fluoreszenzplateaus wurde 100 μM GTP zugegeben. Zur Bestimmung des Endpunkts der Austauschreaktion wurde nach 450 s 500 nM wildtypisches DrrA₃₄₀₋₅₃₃ zugegeben.

Alle DrrA₃₄₀₋₅₃₃-Mutanten zeigen eine geringere GDI-Freisetzungsaktivität als wildtypisches DrrA₃₄₀₋₅₃₃. In Abwesenheit von GTP kann durch die Mutanten eine geringere Menge des GDI gebundenen Rab1b-g-NBD freigesetzt werden als durch wildtypisches DrrA₃₄₀₋₅₃₃. Die Mutanten zeigen außerdem in Anwesenheit von GTP eine geringere GDI-Freisetzungsrage. Die GDI-Freisetzungsaktivität scheint dabei korreliert mit der Nukleotidaustauschaktivität – je geringer die Aktivität der Mutanten bei der Katalyse des Nukleotidaustauschs (Abbildung 4-8), desto geringer die GDI-Freisetzungsaktivität.

Yaowen Wu konnte zeigen, dass die Interaktion von GDI-1 mit Rab7-farnesyl-NBD (Rab7-f-NBD) in GDP-gebundener Form einen K_D Wert von 13 nM aufweist (Wu *et al.*, 2010). In GTP-gebundener Form hingegen kann die Affinität von GDI-1 für Rab7-f-NBD mit den zu erreichenden GDI-Konzentrationen nicht bestimmt werden (Wu *et al.*, 2010). Diese Ergebnisse

zeigen, dass die Affinität von GDI für GDP-gebundene Rab-Proteine um mehrere Größenordnungen über der Affinität für GTP-gebundenes Rab liegt. Die Nukleotidabhängigkeit der GDI-Freisetzungsaktivität von DrrA lässt sich daher durch eine drastische Veränderung der Affinität von GDI für Rab1b nach dem Austausch von GDP für GTP erklären. Da Nukleotid austauschfaktoren keine signifikante Präferenz für GDP oder GTP im Austauschprozess besitzen können (Goody und Hofmann-Goody, 2002), erfolgt der Austausch relativ zu den vorhandenen GDP/GTP-Konzentrationen. In Anwesenheit eines Überschusses von GTP (Abbildung 4-12 a) erfolgt nach der Freisetzung des ursprünglich gebundenen GDPs eine Bindung von GTP an den nukleotidfreien Rab1b:DrrA-Komplex und anschließend die Freisetzung von DrrA aus diesem Komplex. Das freie Rab1b:GTP bindet aufgrund der Affinitätsverringerung nicht mehr an GDI und liegt frei in Lösung vor. In Anwesenheit eines GDP-Überschusses wird das

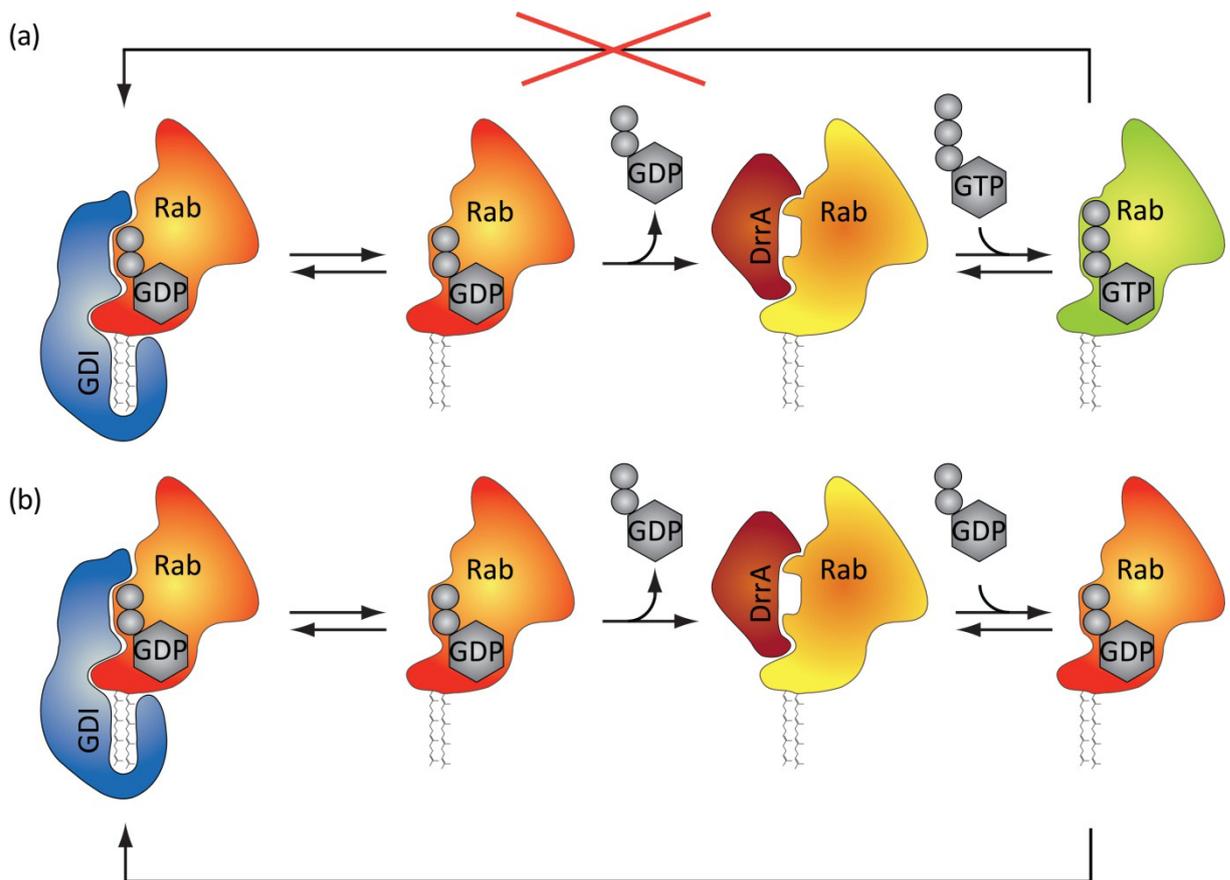


Abbildung 4-12: Schema zur Nukleotidabhängigkeit der GDI-Freisetzung

- (a) Nukleotidaustausch in Anwesenheit eines Überschusses von GTP gegenüber GDP. Das gebildete Rab1b:GTP bindet nicht an GDI und liegt somit freigesetzt in Lösung vor.
- (b) Nukleotidaustausch zu GDP. Das freigesetzte Rab1b:GDP bindet mit einer hohen Affinität an GDI und liegt somit im Komplex vor.

freigesetzte Nukleotid durch GDP ersetzt und Rab1b:GDP bindet an GDI. In Abwesenheit von Nukleotid stoppt die Reaktion nach der Bildung des äußerst stabilen nukleotidfreien Rab1b:DrrA-Komplexes ($K_{D2}=3 \text{ pM}$). Die Stabilität dieses nukleotidfreien Komplexes wird offensichtlich durch die Mutationen in Bindungsstelle 1 und 2 deutlich geschwächt, da ohne Zugabe von Nukleotid diese Mutanten nur noch die Dissoziation eines kleinen Anteils des Komplexes bewirken können (Abbildung 4-11, Plateau nach 2).

4.2.3 Dissoziation des Rab1:GDI-Komplexes

DrrA-katalysierter Nukleotidaustausch an Rab1b führt bei Austausch von GDP zu GTP zu einer drastischen Veränderung der Affinität von GDI-1 für Rab1b. Dieser Austauschprozess kann somit die beobachtete Freisetzung von GDI-1 erklären. Da Rab1b vor der Zugabe von DrrA im Komplex mit GDI vorliegt, gibt es drei mögliche Erklärungen für die Wirkweise von DrrA: (1) DrrA katalysiert den Nukleotidaustausch am Rab1b:GDI-Komplex, senkt hierdurch die Affinität des Komplexes und bewirkt somit gleichzeitig die Dissoziation des Komplexes, (2) DrrA katalysiert die Dissoziation des Rab1b:GDI-Komplexes mit einer separaten GDF-Aktivität und verhindert anschließend durch Nukleotidaustausch die Rückbindung von GDI an Rab oder (3) DrrA katalysiert den Nukleotidaustausch an freiem Rab1b, das nach Dissoziation von GDI in der Lösung vorliegt. In den ersten beiden Fällen würde DrrA die intrinsische Dissoziationsrate des Rab1b:GDI-Komplexes beschleunigen. Um dies zu überprüfen, wurde die intrinsische Dissoziationsrate des Rab1b-f-NBD:GDI-Komplexes bestimmt. Die Rückbindung von dissoziiertem Rab1b wurde durch die Zugabe von 200 nM Rab7-geranylgeranyl (Rab7-gg) verhindert, und die Dissoziation des Komplexes wurde wie bereits oben beschrieben durch Messung der NBD-Fluoreszenz bestimmt (Abbildung 4-13 a). Rab7-gg wurde zur Stabilisierung des Proteins im Komplex mit der GGTase-II β -Untereinheit eingesetzt. Durch die Anpassung einer einfach exponentiellen Funktion konnte für die intrinsische Dissoziation eine beobachtete Geschwindigkeitskonstante (k_{obs}) von $0,0277 \text{ s}^{-1}$ ermittelt werden.

LidA, ein Protein aus *Legionella pneumophila*, das nach der Infektion von Makrophagen ebenfalls an der Rekrutierung von neuen sekretorischen Vesikeln beteiligt ist (Machner und Isberg, 2006), hat eine hohe Affinität für Rab1b (Stefan Schoebel, unpublizierte Daten). Da LidA und GDI aufgrund von überlappenden Bindungsbereichen vermutlich nicht gleichzeitig an Rab1 gebunden sein können (Stefan Schoebel, unpublizierte Daten), LidA weder Nukleotidaustauschaktivität noch GTPase aktivierende Aktivität zeigt (Machner und Isberg, 2006)

und der LidA:Rab1b-f-NBD-Komplex eine andere Fluoreszenzausbeute zeigt als der Komplex mit GDI, kann die Dissoziation des Rab1b-f-NBD:GDI-Komplexes ebenfalls nach der Zugabe von LidA beobachtet werden (Abbildung 4-13 b). Es konnte genau wie bei der Dissoziationsmessung mit Rab7-gg eine beobachtete Geschwindigkeitskonstante (k_{obs}) von $0,0277 \text{ s}^{-1}$ ermittelt werden.

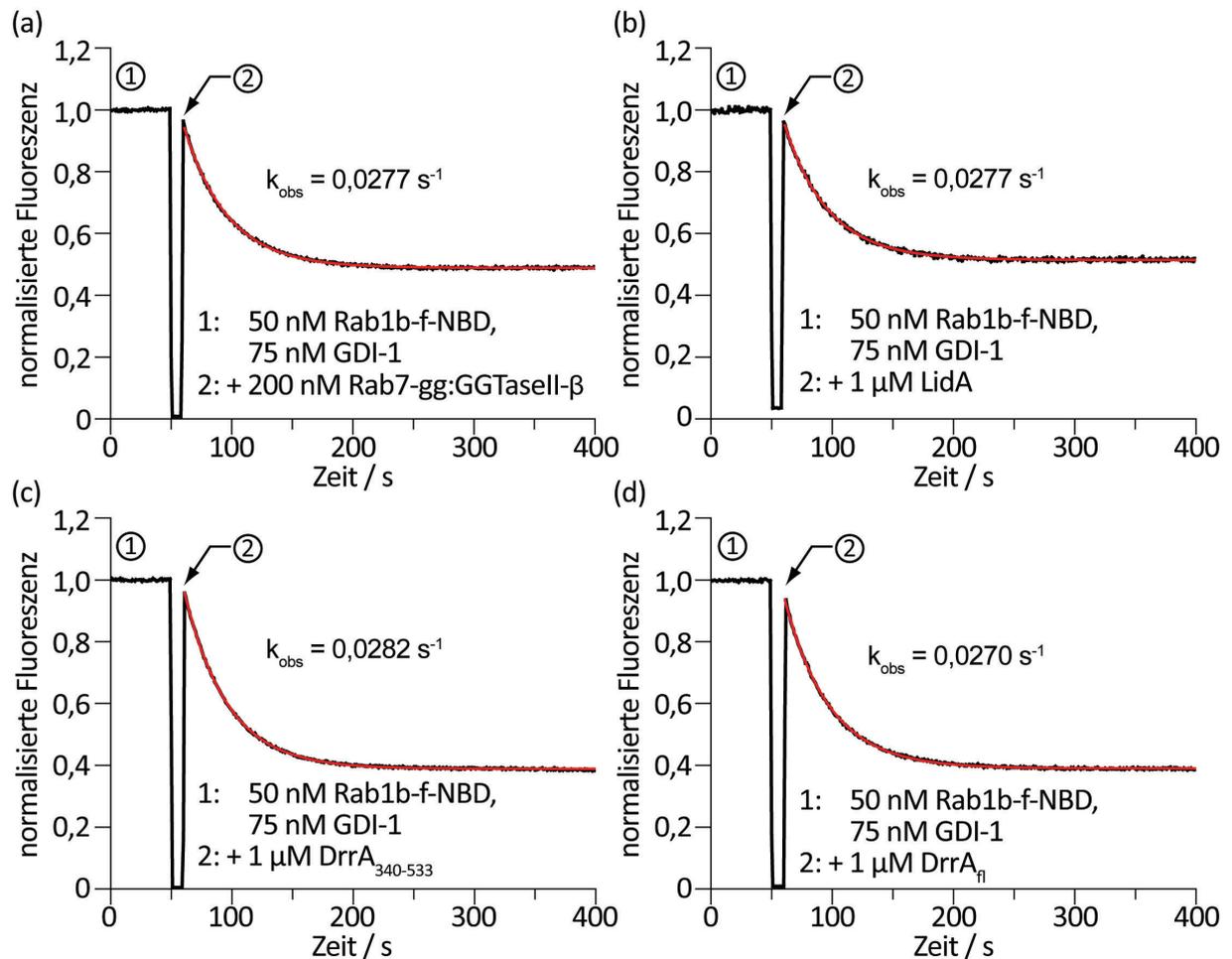


Abbildung 4-13: Dissoziation des Rab1b-f-NBD:GDI-1-Komplexes

- (a) Bestimmung der Geschwindigkeitskonstante der intrinsischen Dissoziation des Rab1b-f-NBD:GDI-1-Komplexes (50 nM Rab1b-f-NBD, 75 nM GDI-1) durch Zugabe von 200 nM Rab7-gg. Die beobachtete Geschwindigkeitskonstante wurde durch die Anpassung einer einfach exponentiellen Funktion ermittelt (rote Linie).
- (b) Bestimmung der Geschwindigkeitskonstante der intrinsischen Dissoziation des Rab1b-f-NBD:GDI-1-Komplexes (50 nM Rab1b-f-NBD, 75 nM GDI-1) durch Zugabe von 1 μM LidA. Die beobachtete Geschwindigkeitskonstante wurde durch die Anpassung einer einfach exponentiellen Funktion ermittelt (rote Linie).
- (c) Bestimmung der Geschwindigkeitskonstante der Dissoziation des Rab1b-f-NBD:GDI-1-Komplexes (50 nM Rab1b-f-NBD, 75 nM GDI-1) nach Zugabe von 1 μM DrrA_{340-533}. Die beobachtete Geschwindigkeitskonstante wurde durch die Anpassung einer einfach exponentiellen Funktion ermittelt (rote Linie).}

Diese beobachtete Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante entspricht der Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante bei der Dissoziation des Komplexes in Anwesenheit von DrrA₃₄₀₋₅₃₃ bzw. DrrA_{fl} (Abbildung 4-13 c & d, $k_{\text{obs}} = 0,0282 \text{ s}^{-1}$ & $0,0270 \text{ s}^{-1}$). DrrA ist somit nicht in der Lage, die intrinsische Dissoziation des Rab1b:GDI-Komplexes zu beschleunigen, sondern bindet lediglich an freies Rab1b, das von GDI dissoziiert vorliegt. Sofern kein weiteres Protein in der Zelle die Dissoziation des Rab1:GDI-Komplexes beschleunigt, wird die Geschwindigkeit der DrrA-katalysierten Aktivierung von Rab1 an der Membran der Legionellenvakuole von der Dissoziationsgeschwindigkeit des Rab1:GDI-Komplexes bestimmt. Da die Interaktion von Rab-Proteinen mit GDI primär über die Prenylanker erfolgt (Wu *et al.*, 2007) und Rab1 *in vivo* mit zwei Geranylgeranylankern modifiziert vorliegt, ist davon auszugehen, dass die Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante des nativen Komplexes geringer als die ermittelte Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante sein sollte. Für Rab7 konnte gezeigt werden, dass der k_{off} für die Dissoziation von GDI für Farnesyl-NBD-modifiziertes Rab7 um einen Faktor 10 höher ist als für zweifach Geranylgeranyl modifiziertes Rab7 mit einer C-terminalen Dansylgruppe (Wu *et al.*, 2010).

4.2.4 Assoziation des Rab1:GDI-Komplexes

Um die Affinität des verwendeten Rab1b-f-NBD für GDI zu bestimmen, wurde die Assoziationsgeschwindigkeitskonstante (k_{on}) bestimmt. Die Assoziation von GDI an Rab1b-f-NBD wurde mit variierenden GDI-Konzentrationen mittels Stopped-flow durch Messung der NBD-Fluoreszenzänderung gemessen. Die detektierten Kurven konnten mit einer einfach exponentiellen Funktion angepasst werden. Die resultierenden beobachteten Geschwindigkeitskonstanten (k_{obs}) zeigen eine lineare Abhängigkeit von der GDI-Konzentration (Abbildung 4-14).

Durch lineare Interpolation kann für die Interaktion von Rab1b-f-NBD mit GDI eine Assoziationsgeschwindigkeitskonstante (k_{on}) von $1,07 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ bestimmt werden. Mit der in Abschnitt 4.2.3 ermittelten Dissoziationsgeschwindigkeitskonstanten (k_{off}) von $0,0277 \text{ s}^{-1}$ kann nun eine Affinität von 2,6 nM für den Rab1b-f-NBD:GDI-Komplexes berechnet werden.

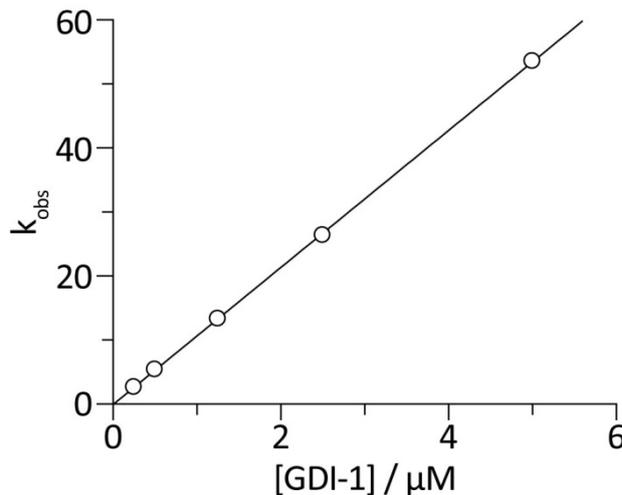


Abbildung 4-14: Bindung von GDI an Rab1b-f-NBD

50 nM Rab1b-f-NBD wurden mittels Stopped-flow mit verschiedenen Mengen GDI gemischt. Komplexbildung wurde durch die Messung der NBD-Fluoreszenz detektiert. Die beobachteten Geschwindigkeitskonstanten (k_{obs}) wurden gegen die eingesetzten GDI-Konzentrationen aufgetragen. Aus einem linearen Fit der Messdaten konnten ein k_{on} von $1,07 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ bestimmt werden.

4.3 GDI-Freisetzung aus anderen Rab:GDI-Komplexen durch GEFs

Das Prinzip der GDI-Freisetzung durch Nukleotidaustausch (Abbildung 4-12), wie es für DrrA und Rab1b beobachtet werden kann, sollte auf alle Rab-Proteine und ihre Nukleotidaustauschfaktoren zutreffen, vorausgesetzt, dass alle Rabs die für Rab7 beobachteten signifikanten nukleotidabhängigen Affinitätsunterschiede zu GDI zeigen. Die Geschwindigkeit des Nukleotidaustauschs kann bei Nukleotidaustauschfaktoren, die eine geringere Effektivität besitzen als DrrA, die Dissoziationsgeschwindigkeit des Rab:GDI-Komplexes als geschwindigkeitsbestimmenden Schritt ablösen.

4.3.1 Gleichgewichtstitration mit GDI

Sec4, Rab5a und Rab35 mit einer C-terminalen CVIL Mutation wurden, wie unter 3.4.4 beschrieben, mit Hilfe von Geranylgeranyltransferase-1 mit Farnesyl-NBD prenyliert. Da die prenylierten Proteine nach der Gelfiltrationschromatographie mit Farnesyl-NBD, GGTase-I und eventuell zusätzlich mit kleinen Mengen unprenyliertem Substrat verunreinigt waren, wurde zur Bestimmung der Konzentration von Farnesyl-NBD-modifiziertem Protein eine Gleichgewichtstitration mit GDI, wie unter 3.6.2 beschrieben, durchgeführt. Aus den ermittelten Fluoreszenzänderungen kann die Konzentration der fluoreszenten Komponente ($[\text{Rab}]$) und die Gleichgewichtsdissoziationskonstante (K_D) durch eine Anpassung mit der folgenden Funktion ermittelt werden:

$$F = F_{\min} + \left((K_D + [\text{Rab}] + [\text{GDI}] - \sqrt{(K_D + [\text{Rab}] + [\text{GDI}]^2 - 4[\text{Rab}] \cdot [\text{GDI}]} \right) \frac{F_{\max} - F_{\min}}{2[\text{Rab}]}$$

[Rab] und [GDI] sind als die Gesamtkonzentration von Rab bzw. GDI in der Küvette definiert und F , F_{\min} und F_{\max} beschreiben das beobachtete Fluoreszenzsignal und die minimale und maximale beobachtete Fluoreszenz. Die oben genannte Funktion resultiert aus der Lösung der Definition der Gleichgewichtskonstanten als quadratische Gleichung

$$0 = [\text{Rab}:\text{GDI}]^2 - [\text{Rab}:\text{GDI}](K_D + [\text{Rab}] + [\text{GDI}]) + [\text{Rab}][\text{GDI}]$$

die in die Definition des beobachteten Signals F

$$\frac{[\text{Rab}:\text{GDI}]}{[\text{Rab}]} = \frac{F - F_{\min}}{F_{\max} - F_{\min}}$$

eingesetzt wird. Die Ergebnisse der Gleichgewichtstitration mit Sec4-farnesyl-NBD (Sec4-f-NBD), Rab5a-farnesyl-NBD (Rab5a-f-NBD) und Rab35-farnesyl-NBD (Rab35-f-NBD) sind in Abbildung 4-15 dargestellt. Rab35 zeigte bei der Titration starke Fluoreszenzänderung durch Mischvorgänge, so dass die Daten ohne die Einbeziehung einer Korrektur für diese Mischvorgänge nicht ausgewertet werden konnten. Jeder Mischvorgang wurde zunächst mit Zugabe von GDI ausgeführt und dann erneut ohne Zugabe von GDI. Zur Berechnung der tatsächlichen Fluoreszenzerhöhung wurde die Fluoreszenzänderung des Mischvorganges subtrahiert. Neben den aktiven Konzentrationen der fluoreszenten Proteine konnten die Gleichgewichtsdissoziationskonstanten der Interaktion mit GDI ermittelt werden. Die Interaktion von Sec4-f-NBD mit GDI hat eine Gleichgewichtsdissoziationskonstante von 2,9 nM, während die Anpassung der Funktion für die Interaktion von Rab5a-f-NBD und GDI eine Gleichgewichtsdissoziationskonstante von 11,7 nM ergibt. Die Affinität dieser zwei Komplexe liegt somit in einer ähnlichen Größenordnung wie die Affinität von Rab7-f-NBD für GDI-1, die mit 13 nM bestimmt wurde (Wu *et al.*, 2010). Für die Interaktion von Rab35-f-NBD mit GDI konnte eine Gleichgewichtsdissoziationskonstante von 1 nM bestimmt werden. Die Ursache für die Fluoreszenzänderung von Rab35-f-NBD bei Mischvorgängen kann eventuell in einer starken Instabilität von Rab35-f-NBD bei Mischvorgängen liegen, so dass die Proteinkonzentration während der Messung nicht stabil ist. Daher kann die in dieser Messung bestimmte Konzentration von Rab35-f-NBD nur als Maximalwert angesehen werden. Die Bestimmung der Affinität für GDI kann ebenfalls durch Konzentrationsänderung während der Messung beeinflusst sein und muss durch andere Messungen bestätigt werden.

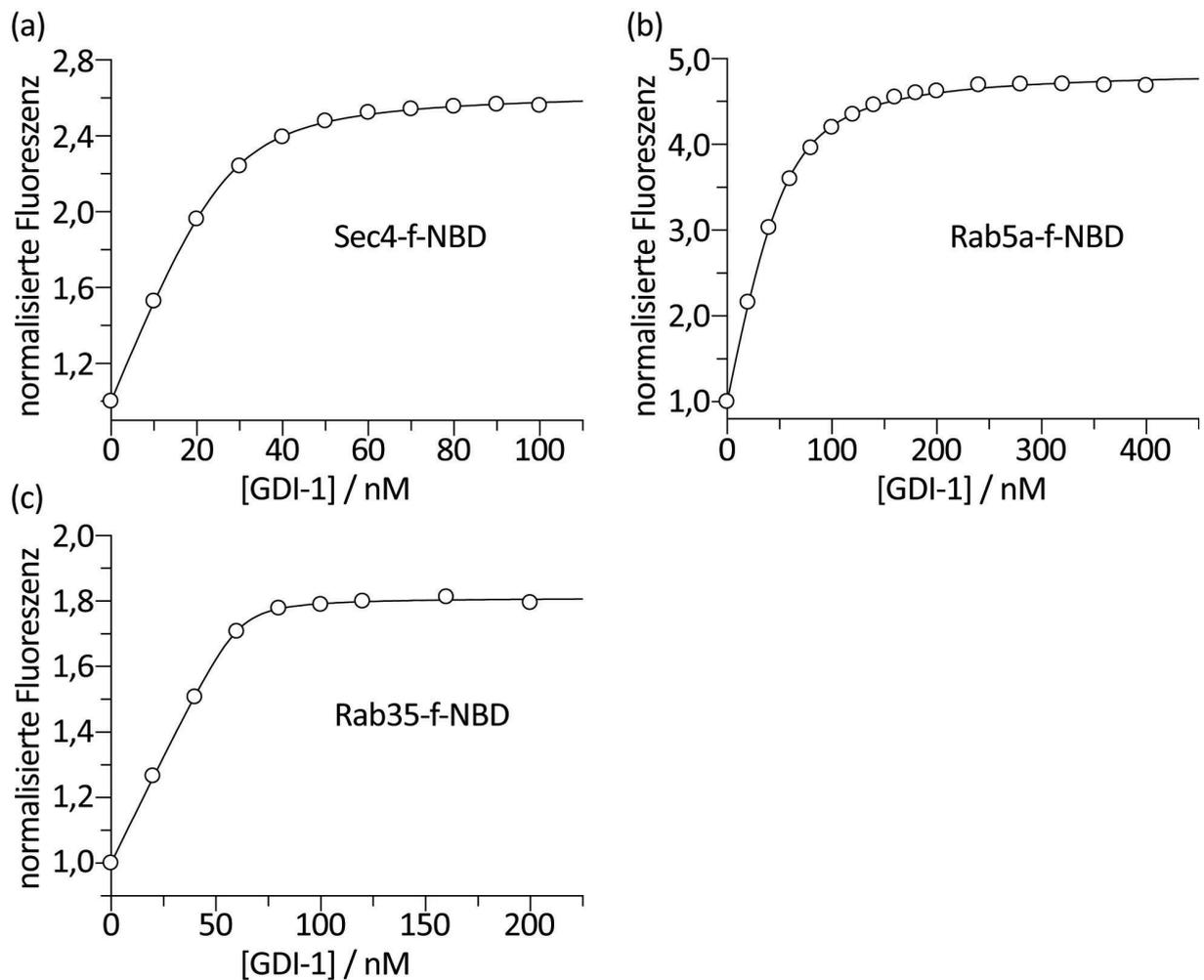


Abbildung 4-15: Gleichgewichtstitration mit Sec4-farnesyl-NBD (a), Rab5a-farnesyl-NBD (b) bzw. Rab35-f-NBD (c) und GDI-1

Sec4-f-NBD (a), Rab5a-f-NBD (b) bzw. Rab35-f-NBD wurden in der Küvette vorgelegt und mit substöchiometrischen Mengen GDI versetzt. Die normalisierte Fluoreszenz wurde gegen die GDI-1-Konzentration aufgetragen. Aus der Anpassung der oben beschriebenen quadratischen Gleichung ergibt sich für Sec4-f-NBD eine Gleichgewichtsdissociationskonstante von 2,9 nM und eine Sec4-f-NBD-Konzentration von 27,1 nM und für Rab5a-f-NBD eine Gleichgewichtsdissociationskonstante von 11,7 nM sowie eine Konzentration von 52,4 nM. Für Rab35-f-NBD ergibt sich eine ungefähre Gleichgewichtskonstante von 1 nM. Die Konzentration von Rab35-f-NBD ist ca. 61 nM.

4.3.2 Freisetzung von GDI aus Rab:GDI-Komplexen

Um das Prinzip der GDI-Freisetzung durch Nukleotidaustausch mit anderen Rab-Proteinen zu untersuchen, wurden Sec4 und sein Nukleotidaustauschfaktor Sec2, Rab5 mit dem Nukleotidaustauschfaktor Rabex5 und Rab35 mit dem Nukleotidaustauschfaktor Connecdenn gewählt. Von allen Nukleotidaustauschfaktoren wurden Fragmente verwendet, die ausschließlich die GEF-Domänen enthalten. Zunächst wurde für die bisher nicht näher charakterisierten

Nukleotidaustauschfaktoren Connecdenn und Rabex5 die katalytische Effizienz der GEF-Domänen ermittelt (Abbildung 4-16). Connecdenn zeigt mit $4,3 \cdot 10^4 - 1,5 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ eine relativ starke katalytische Effizienz, während der Rabex5-katalysierte Nukleotidaustausch an Rab5a mit $4,1 \cdot 10^3 - 2,9 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ deutlich langsamer erfolgt.

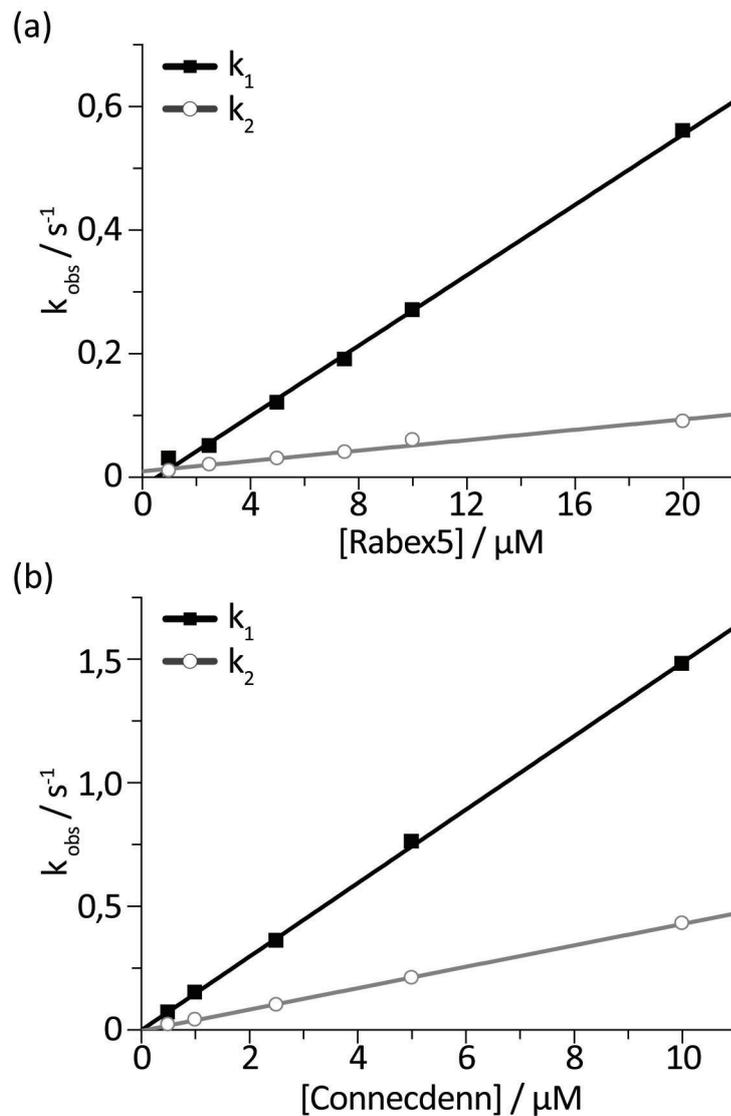


Abbildung 4-16: Bestimmung der katalytischen Effizienzen des Rabex5₁₃₂₋₃₉₇- (a) und Connecdenn₁₋₄₀₃-katalysierten Nukleotidaustauschs

50 nM Rab5a:mdGDP (a) bzw. 50 nM Rab35-CVIL:mdGDP (b) wurden mittels Stopped-flow mit verschiedenen Mengen Rabex5₁₃₂₋₃₉₇ (a) bzw. Connecdenn₁₋₄₀₃ (b) gemischt. Die beobachtete Fluoreszenzänderung der mant-Gruppe zeigte einen biexponentiellen Verlauf, so dass für jede Messung zwei beobachtete Geschwindigkeitskonstanten ermittelt werden konnten. Durch linearen Fit konnte die katalytische Effizienz k_4/K_{D3} der Nukleotidaustauschreaktionen ermittelt werden.

Um die GDI-Freisetzung zu beobachten, wurden, wie bereits für Rab1 beschrieben, Rab-Proteine mit Farnesyl-NBD prenyliert und die Fluoreszenz der NBD-Gruppe gemessen. Für alle modifizierten Rab-Proteine konnte eine signifikante Erhöhung der beobachteten Fluoreszenz nach Bindung von GDI detektiert werden (Abbildung 4-15). Zur Untersuchung der GDI-Freisetzung mit Nukleotidaustauschfaktoren wurden zunächst die fluoreszent markierten Rab-Proteine in der Küvette vorgelegt und mit GDI versetzt. Nach Erreichen einer stabilen Fluoreszenz wurde der Nukleotidaustauschfaktor zugesetzt, um die Einstellung eines Gleichgewichts zwischen Rab:GDI- und Rab:GEF-Komplexen in Abwesenheit von Nukleotid zu ermöglichen. Anschließend wurde zunächst GTP zugegeben, um eine vollständige Freisetzung von GDI zu bewirken. Um die erneute Bindung von GDI an das Rab-Protein zu bewirken, wurde nach Erreichen einer stabilen Fluoreszenz GDP zugesetzt, so dass es im Überschuss gegenüber GTP vorlag. Um den Einfluss der GEF-Aktivität auf die Reaktion zu untersuchen, wurde für Sec4 – ein Rab-Protein aus Hefe, das starke Homologie zu Rab8 besitzt – neben dem nativen Austauschfaktor Sec2 auch Rabin8, ein Nukleotidaustauschfaktor für Rab8 aus Säugerzellen, verwendet. Auch von diesem Nukleotidaustauschfaktor wurde ein Fragment verwendet, das ausschließlich die GEF-Domäne enthält. Die Ergebnisse der Messungen mit Sec4 sind in Abbildung 4-17 dargestellt. Ohne Zugabe von GTP kann mit dem Nukleotidaustauschfaktor Sec2 im Unterschied zu DrrA nur eine geringe und mit Rabin8 keine Freisetzung von GDI beobachtet werden. Da in Abwesenheit von Nukleotid die Bindung von GDI mit der Bindung der Nukleotidaustauschfaktoren kompetiert, begründet sich dieser Unterschied in den unterschiedlichen Affinitäten der Rab:GEF-Komplexe im Verhältnis zur Affinität der Rab:GDI-Komplexe in Abwesenheit von Nukleotid. Nach der Zugabe von GTP kann in Anwesenheit von Sec2 und Rabin8 GDI-Freisetzung beobachtet werden, es zeigen sich allerdings deutliche Geschwindigkeitsunterschiede bei der Freisetzung von GDI. Da Rabin8 eine deutlich schwächere Nukleotidaustauschaktivität gegenüber Sec4 besitzt, als Sec2 (Aymelt Itzen, unpublizierte Daten) zeigt dies analog zu den DrrA-Mutanten, dass die GDI-Freisetzungsgeschwindigkeit von der Nukleotidaustauschgeschwindigkeit abhängig ist. Nach der Zugabe von GDP kann mit beiden Nukleotidaustauschfaktoren die erneute Bindung von GDI beobachtet werden. Dies zeigt deutlich die Nukleotidabhängigkeit des GDI-Freisetzungsprozesses. In beiden Experimenten kann nach Zugabe von GDP die ursprüngliche Fluoreszenz nicht erreicht werden. Eine Ursache hierfür könnte eventuell die transiente Bindung der Nukleotidaustauschfaktoren in Anwesenheit von Nukleotid sein.

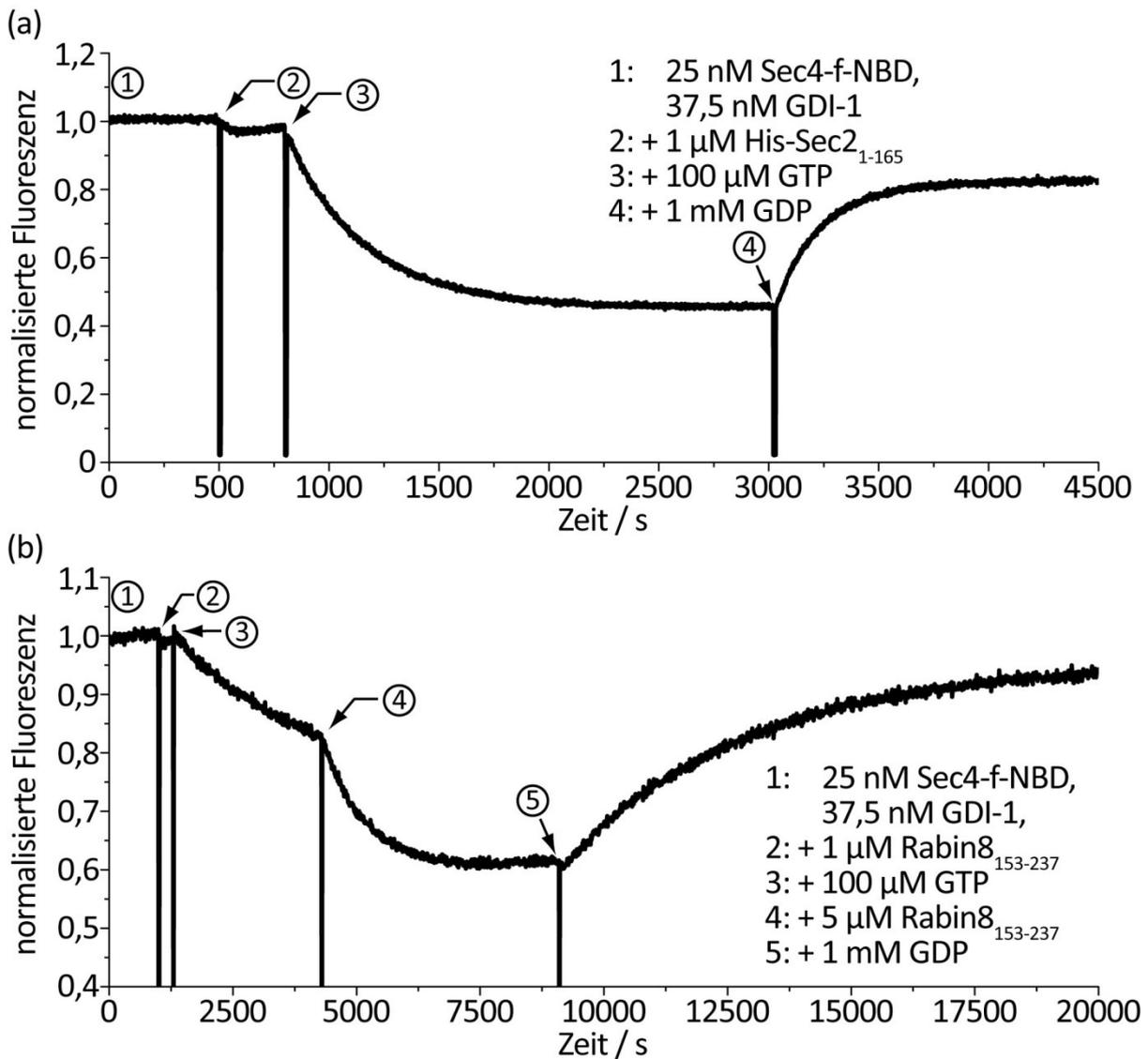


Abbildung 4-17: GDI-Freisetzung aus dem Sec4-f-NBD:GDI-1-Komplex durch Sec2₁₋₁₆₅ (a) und Rabin8₁₅₃₋₂₃₇ (b)

GDI-Freisetzung aus dem in der Küvette formierten Sec4-f-NBD:GDI-1-Komplex wurde durch Messung der NBD-Fluoreszenz detektiert. Nach Zugabe von 1 μ M Nukleotidaustauschfaktor und 100 μ M GTP konnte mit beiden GEF-Proteinen deutlich GDI-Freisetzung detektiert werden. Zur Beschleunigung der Freisetzung in Anwesenheit von Rabin8 wurde die Konzentration auf 6 μ M erhöht.

Die Ergebnisse der Messungen mit Rab5a und Rabex5 sowie mit Rab35 und Connecdenn sind in Abbildung 4-18 dargestellt. Nach der Zugabe von Rabex5 zum Rab5a-f-NBD:GDI-Komplex sinkt die Fluoreszenz um ca. 20 %. Aufgrund der relativ geringen Affinität des Rab5a-f-NBD:GDI-Komplexes, die in der Titration mit 11,7 nM bestimmt werden konnte, sind bei der Zugabe von Rabex5 mehr als 30 % des in der Küvette vorhandenen Rab5a-f-NBD nicht an GDI gebunden. Die Ursache für die Fluoreszenzänderung kann somit sowohl eine Freisetzung von

Rab5a-f-NBD aus dem Rab5a-f-NBD:GDI-Komplex sein als auch eine Bindung von Rabex5 an das nicht an GDI-1 gebunden vorliegende Rab5a-f-NBD. Nach der Zugabe von Connecdenn in Abwesenheit von GTP kann nur eine kleine Fluoreszenzänderung und somit eine sehr geringe Freisetzung von GDI aus dem Komplex mit Rab35-f-NBD beobachtet werden. Die Zugabe von GTP bewirkt in beiden Messung die Freisetzung von GDI-1 aus dem Rab:GDI-Komplex, die durch die Zugabe von GDP im Überschuss gegenüber GTP rückgängig gemacht werden kann.

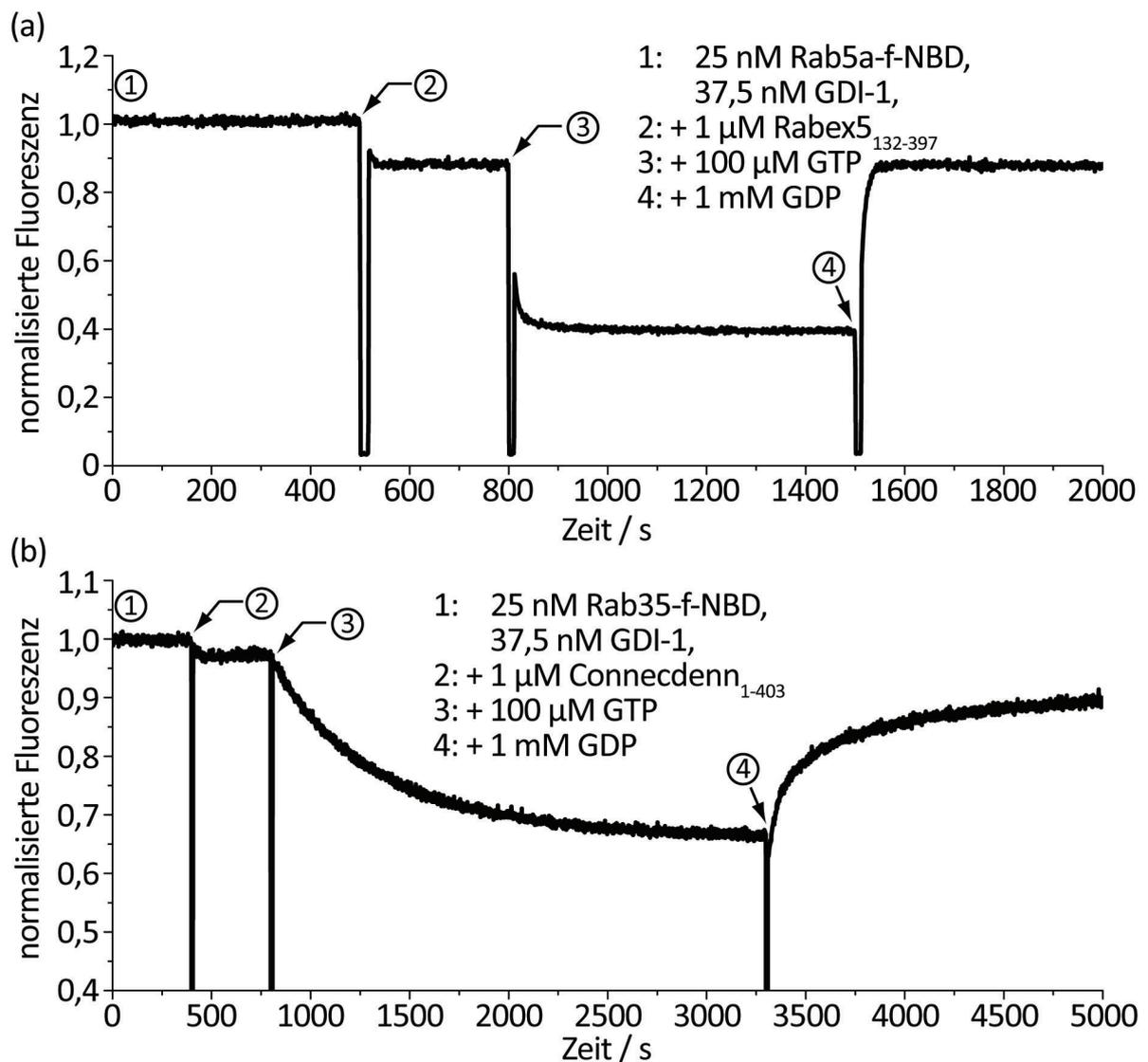


Abbildung 4-18: GDI-Freisetzung aus dem Rab5a-f-NBD:GDI-1-Komplex durch Rabex5¹³²⁻³⁹⁷ (a) und aus dem Rab35-f-NBD:GDI-1-Komplex durch Conneddenn¹⁻⁴⁰³ (b)

GDI-Freisetzung wurde durch Messung der NBD-Fluoreszenz detektiert. Es können starke Geschwindigkeitsunterschiede bei der Freisetzung von GDI aus den Rab:GDI-Komplexen beobachtet werden. Die Messung mit Rab35-f-NBD erfolgte zur Stabilisierung von Rab35 in Anwesenheit von 0,005 % n-Dodecyl-beta-D-maltosid und 150 mM NaCl.

Sowohl mit Rab5a und Rabex5 als auch mit Rab35 und Connecdenn erfolgt die GDI-Freisetzung nach der Zugabe von GTP deutlich schneller als für den Sec4-f-NBD:GDI-Komplex beobachtet. Die GDI-Freisetzung aus dem Rab5a-f-NBD-Komplex ist auch deutlich schneller als die gemessene Dissoziation des Rab1b-f-NBD:GDI-Komplexes. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass die Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante (k_{off}) des Rab5a-f-NBD:GDI-Komplexes deutlich über der Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante des Rab1b-f-NBD:GDI-Komplexes liegt. Die Ursache für die unterschiedlichen Freisetzungsgeschwindigkeiten kann, wie bereits für Sec4, Rabin8 und Sec2 und die DrrA-Mutanten gezeigt, in den unterschiedlichen Austauschaktivitäten der GEF-Proteine oder in signifikant unterschiedlichen geschwindigkeitsbestimmenden Dissoziationsgeschwindigkeitskonstanten der Rab:GDI-Komplexe liegen.

4.3.3 Bestimmung der Dissoziations- und Assoziationsgeschwindigkeitskonstanten von verschiedenen Rab:GDI-Komplexen

Um die Unterschiede zwischen den verschiedenen Rab:GDI-Komplexen näher zu untersuchen, wurden die Dissoziations- und Assoziationsgeschwindigkeitskonstanten von Sec4-f-NBD, Rab5a-f-NBD und Rab35-f-NBD und GDI-1 charakterisiert. Die Bestimmung der Assoziationsgeschwindigkeitskonstanten erfolgte wie bereits für den Rab1:GDI-Komplex unter 4.2.4 beschrieben. Die gemessenen Fluoreszenzänderungen konnten für die Assoziation von Rab5a und GDI mit einfach exponentiellen Funktionen angepasst werden, während die Anpassung im Fall von Sec4 und Rab35 mit doppelt exponentiellen Kurven erfolgte. Alle durch die Anpassungen ermittelten beobachteten Geschwindigkeitskonstanten zeigten eine lineare Abhängigkeit von der GDI-Konzentration (Abbildung 4-19). Die Bestimmung der Assoziationsgeschwindigkeitskonstanten erfolgte durch lineare Interpolation. Für Rab5a-f-NBD und GDI kann ein k_{on} von $1,0 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ermittelt werden. Diese Geschwindigkeitskonstante entspricht der für Rab1b-f-NBD ermittelten Assoziationsgeschwindigkeitskonstante ($1,1 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$). Die Assoziationsgeschwindigkeitskonstanten der Bindung von Rab35-f-NBD und GDI betragen $3,8 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ und $4,6 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. Die Bindung von GDI an Sec4-f-NBD ist mit $6,6 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ und $1,4 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ am langsamsten. Die Assoziationsgeschwindigkeitskonstanten variieren zwischen den einzelnen Rab-Proteinen um eine Größenordnung.

Es ist unklar, warum für Rab35-f-NBD und Sec4-f-NBD eine biexponentielle Fluoreszenzänderung bei der Assoziation von GDI beobachtet werden kann. Da beide Phasen eine konzentra-

tionsabhängige Veränderung der beobachteten Geschwindigkeitskonstanten zeigen, muss davon ausgegangen werden, dass die Rab-Proteine in zwei verschiedenen Zuständen mit GDI assoziieren können. Die schnellere Assoziationsreaktion zeigt dabei in beiden Fällen eine deutlich größere Fluoreszenzänderung (90 % Rab35-f-NBD und 70 % Sec4-f-NBD).

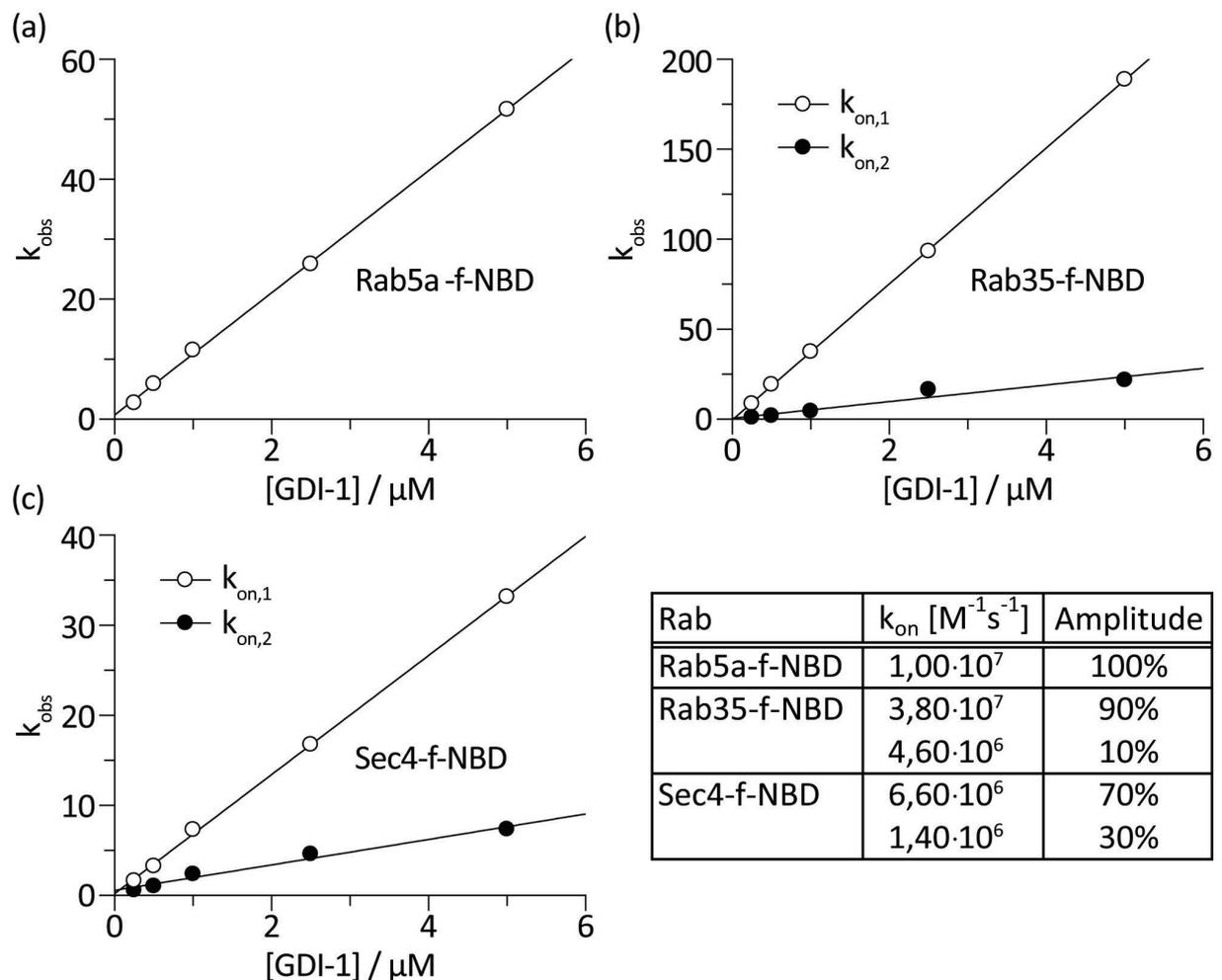


Abbildung 4-19: Bindung von GDI an Rab5a-f-NBD (a), Rab35-f-NBD (b) und Sec4-f-NBD (c)

25 nM Rab-Protein wurden mittels Stopped-flow mit verschiedenen Mengen GDI gemischt. Komplexbildung wurde durch Messung der NBD-Fluoreszenz detektiert. Die beobachteten Fluoreszenzänderungen konnten bei Rab5a-f-NBD mit einfach exponentiellen Funktionen angepasst werden, für Rab35-f-NBD und Sec4-f-NBD wurden biexponentielle Funktionen verwendet. Die Amplitude der ersten Phase betrug bei Rab35-f-NBD ca. 90 % der Gesamtamplitude und bei Sec4-f-NBD ca. 70 %. Die beobachteten Geschwindigkeitskonstanten (k_{obs}) wurden gegen die eingesetzten GDI-Konzentrationen aufgetragen, und aus linearen Fits wurden die in der Tabelle aufgetragenen Assoziationsgeschwindigkeitskonstanten ermittelt.

Die Dissoziationsgeschwindigkeitskonstanten der Rab:GDI-Komplexe können, wie bereits für Rab1b-f-NBD unter 4.2.3 beschrieben, durch kompetitive Bindung von freigesetztem GDI

durch ein anderes modifiziertes Rab-Protein bzw. durch Bindung des freigesetzten Rab-Proteins durch ein anderes Protein ermittelt werden. Rab35-f-NBD und Sec4-f-NBD zeigen wie Rab1 eine hohe Affinität für LidA, während Rab5a-f-NBD nicht von LidA gebunden werden kann (Stefan Schöbel, unpublizierte Daten). Die Dissoziation des Rab5a-f-NBD:GDI-Komplexes wurde daher durch die kompetitive Bindung von Rab7-gg bestimmt, während für Rab35-f-NBD und Sec4-f-NBD das deutlich einfacher zugängliche Protein LidA verwendet werden konnte. In Abbildung 4-20 sind die Messdaten zur Ermittlung der Dissoziationsgeschwindigkeitskonstanten der Rab:GDI-Komplexe dargestellt.

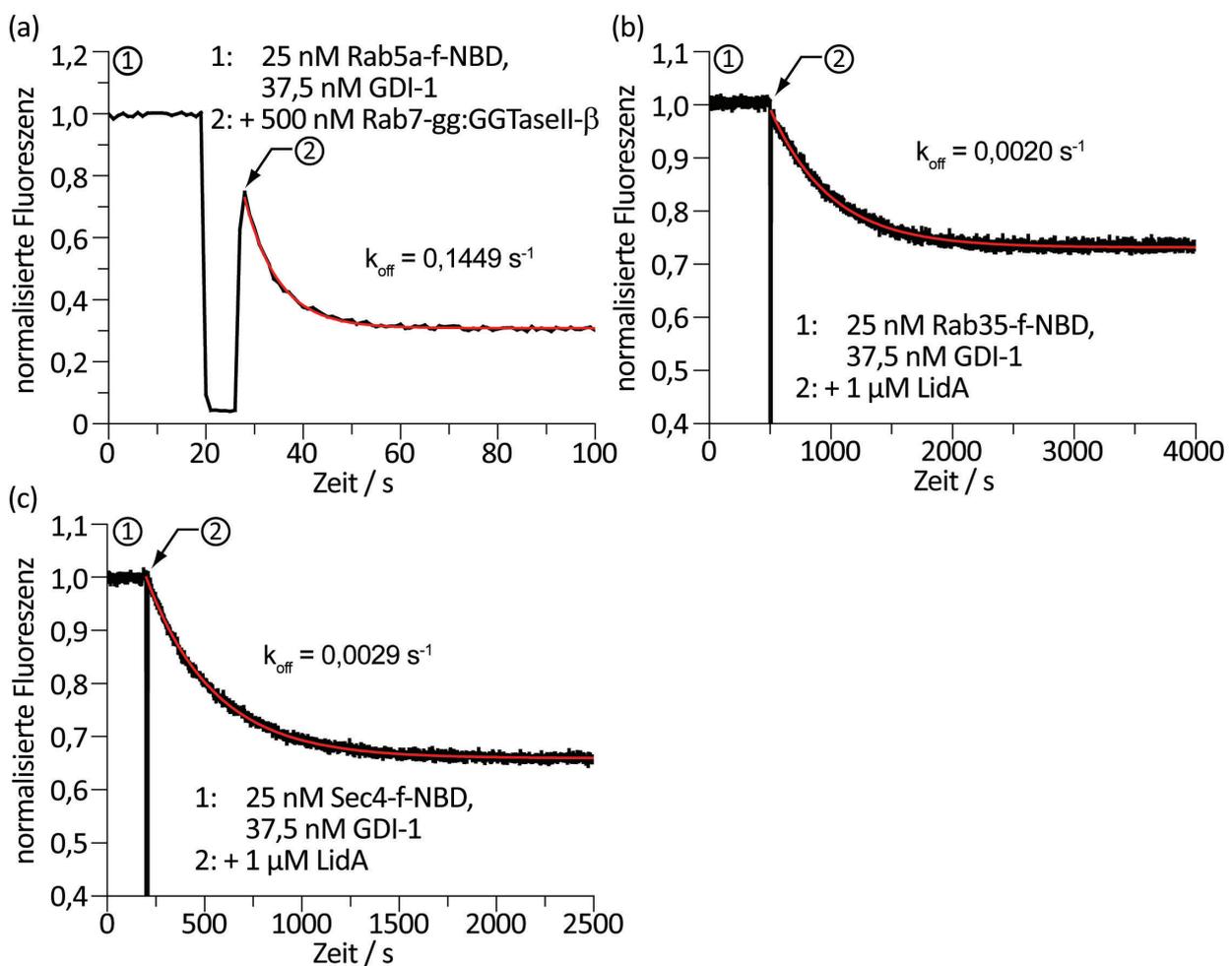


Abbildung 4-20: Dissoziation von Rab5a-f-NBD:GDI (a), Rab35-f-NBD:GDI (b) und Sec4-f-NBD:GDI (c)

Bestimmung der Dissoziationsgeschwindigkeitskonstanten der verschiedenen Rab:GDI-Komplexe (25 nM Rab, 37,5 nM GDI-1) durch Zugabe von 500 nM Rab7-gg (a) bzw. 1 μM LidA (b & c). Komplexdissoziation wurde durch Messung der NBD-Fluoreszenz detektiert. Die Dissoziationsgeschwindigkeitskonstanten wurden durch die Anpassung einer einfach exponentiellen Funktion ermittelt (rote Linie).

Die Messergebnisse zeigen deutliche Unterschiede zwischen den einzelnen Rab:GDI-Komplexen. Die Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante des Rab5a-f-NBD:GDI-Komplex ist mit $0,1449 \text{ s}^{-1}$ fünfmal größer als die für den Rab1b-f-NBD:GDI-Komplex ermittelte Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante ($0,0277 \text{ s}^{-1}$). Trotz der großen Homologie von Rab35-f-NBD und Rab1b-f-NBD zeigt Rab35-f-NBD mit $0,0020 \text{ s}^{-1}$ eine zehnfach geringere Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante als Rab1b-f-NBD. Die Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante des Sec4-f-NBD:GDI-Komplexes ist mit $0,0029 \text{ s}^{-1}$ in einer ähnlichen Größenordnung wie die Dissoziation des Rab35-f-NBD:GDI-Komplexes. Die Dissoziationsgeschwindigkeitskonstanten der verschiedenen Rab:GDI-Komplexe variieren somit um fast zwei Größenordnungen.

Aus den gemessenen Assoziations- und Dissoziationsgeschwindigkeitskonstanten können die Gleichgewichtsdissoziationskonstanten berechnet werden. Diese sind in Tabelle 4-2 im Vergleich zu den mittels Gleichgewichtstitration (4.3.1) bestimmten Werten dargestellt. Für Rab5a-f-NBD zeigt sich eine gute Übereinstimmung zwischen den zwei unabhängig ermittelten Gleichgewichtsdissoziationskonstanten. Bei Rab35-f-NBD und Sec4-f-NBD zeigen die berechneten Gleichgewichtsdissoziationskonstanten mit den $k_{on,2}$ Werten, die in den Messungen eine deutlich geringere Amplitude aufwiesen, eine bessere Übereinstimmung mit den aus der Titration ermittelten Gleichgewichtsdissoziationskonstanten. Bei weiteren Überlegungen darf aber nicht außer Acht gelassen werden, dass die Gleichgewichtstitration mit Rab35-f-NBD aufgrund der starken Korrekturen relativ ungenau sein könnte. Die ermittelten Affinitäten der Rab:GDI-Komplexe zeigen deutliche Unterschiede zwischen den verschiedenen Rab-Proteinen und eine Varianz der K_D -Werte von bis zu 3 Größenordnungen.

Tabelle 4-2: Gleichgewichtsdissoziationskonstanten der Rab:GDI-Komplexe		
Rab	k_{off} / k_{on}	K_D (Gleichgewichtstitration)
Rab5a-f-NBD	14,5 nM	11,7 nM
Rab35-f-NBD	52,6 pM ($k_{on,1}$) 0,43 nM ($k_{on,2}$)	ca. 1 nM
Sec4-f-NBD	0,44 nM ($k_{on,1}$) 2,1 nM ($k_{on,2}$)	2,9 nM

4.4 Modifikation von Rab-Proteinen durch DrrA-katalysierte Adenylylierung

Das Protein DrrA umfasst neben der im mittleren Bereich des Proteins lokalisierten Nukleotidaustauschdomäne eine N-terminale Phosphatidylinositol-4-phosphat-Bindungsdomäne (Brombacher *et al.*, 2009; Schoebel *et al.*, 2009) und eine C-terminale Adenylylierungsdomäne, die verschiedene Rab-Proteine an einem Tyrosin in Switch II mit einer Adenylyl- oder Guanylylgruppe modifizieren kann (Muller *et al.*, 2010). Die modifizierte Aminosäure der Rab-Proteine liegt in einem Bereich, in dem GDI mit Rab-Proteinen interagiert (Abbildung 1-9). Die Bindung der Nukleotidaustauschdomäne von DrrA an Rab1 erfolgt ebenfalls in diesem Bereich (Abbildung 1-9).

4.4.1 DrrA-katalysierter Nukleotidaustausch an adenylyliertem Rab1

Um zu untersuchen ob die Nukleotidaustauschaktivität von DrrA für Rab1 durch eine Adenylylierung verändert wird, wurde die DrrA-katalysierte Nukleotidfreisetzung aus den Komplex von adenylyliertem Rab1 mit mdGDP (Rab1-AMP:mdGDP), wie bereits für nicht modifiziertes Rab1 unter 4.1.1 beschrieben, beobachtet. Rab1 wurde hierfür zunächst, wie unter 3.4.7 beschrieben, modifiziert und gereinigt und anschließend, wie unter 3.4.5 beschrieben, mit mdGDP beladen. 50 nM Rab1b-AMP:mdGDP wurde in Anwesenheit von 100 μ M GDP mittels Stopped-flow mit variierenden Konzentrationen DrrA gemischt und Nukleotidfreisetzung wurde durch Messungen der Fluoreszenz der mant-Gruppe gemessen. Die resultierenden Kurven konnten, wie bereits für nicht adenylyliertes Rab1 beobachtet, mit einfach exponentiellen Funktionen angepasst werden. Für DrrA_{fl} wurden aufgrund der hohen benötigten Konzentrationen nur vier Datenpunkte aufgenommen. Diese zeigen wie erwartet eine Übereinstimmung mit den mit DrrA₃₄₀₋₅₃₃ aufgenommenen Messdaten. Die beobachteten Geschwindigkeitskonstanten der DrrA₃₄₀₋₅₃₃-katalysierten Reaktion zeigen wie für unmodifiziertes Rab1 die für eine Reaktion in zwei Schritten charakteristische hyperbolische Konzentrationsabhängigkeit (Abbildung 4-21).

Zur genauen Bestimmung der maximal stimulierbaren Nukleotidfreisetzungsgeschwindigkeit (k_{-4}) sollte die Hyperbole bis in den Sättigungsbereich durch Messpunkte definiert sein. Da dies aufgrund der hohen benötigten DrrA-Konzentrationen nicht möglich war, ist die Genauigkeit der unabhängigen Bestimmung von k_{-4} und K_{D3} begrenzt. Im Vergleich mit dem DrrA-katalysierten Nukleotidaustausch an unmodifiziertem Rab1 lässt sich aber sagen, dass die maximal stimulierbare Nukleotidfreisetzungsgeschwindigkeit deutlich erhöht ist. Die ge-

ringere Anfangssteigung zeigt außerdem, dass die katalytische Effizienz der Nukleotidaustauschreaktion für adenyliertes Rab1 deutlich geringer ist. Durch Anpassung der bereits unter 4.1.1 beschriebenen Formel kann eine maximal stimulierbare Nukleotidfreisetzungsgeschwindigkeit von $17,9 \text{ s}^{-1}$ ermittelt werden und eine Dissoziationskonstanten für den trimeren Rab1*:mdGDP:DrrA-Komplex von $214 \text{ }\mu\text{M}$. Beide Werte sind somit im Vergleich zum Nukleotidaustausch an nicht adenyliertem Rab1 ($8,6 \text{ s}^{-1}$ und $29,4 \text{ }\mu\text{M}$ bei DrrA₃₄₀₋₅₃₃) deutlich erhöht.

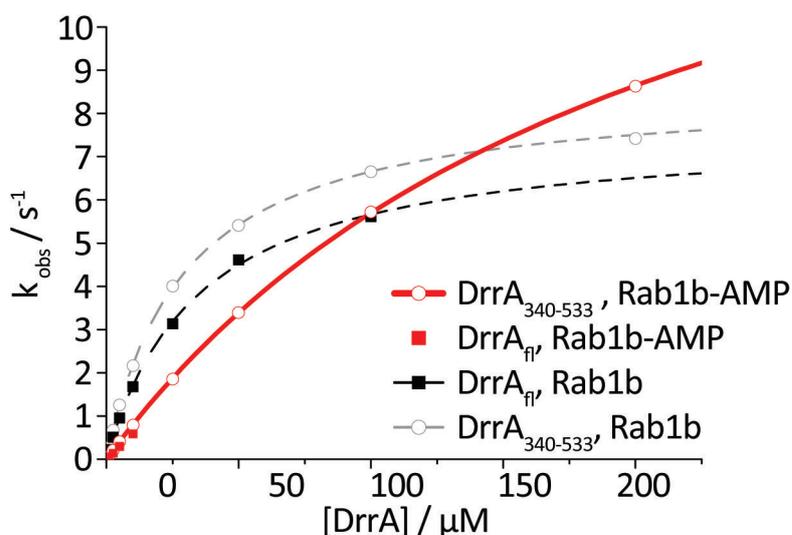


Abbildung 4-21: DrrA-katalysierter Nukleotidaustausch an Rab1b-AMP:mdGDP

50 nM Rab1b-AMP:mdGDP wurden mittels Stopped-flow mit verschiedenen Mengen DrrA_{fl} und DrrA₃₄₀₋₅₃₃ in Anwesenheit von $100 \text{ }\mu\text{M}$ GDP gemischt, und die beobachteten Geschwindigkeitskonstanten der Fluoreszenzänderung der mant-Gruppe wurden mit einfach exponentiellen Funktionen angepasst. Die verwendete DrrA-Konzentration wurde gegen die beobachteten Geschwindigkeitskonstanten aufgetragen. Zum Vergleich wurden die Messergebnisse des Nukleotidaustauschs an nicht adenyliertem Rab1 aus Abbildung 4-2 a dargestellt. Die beobachteten Geschwindigkeitskonstanten des DrrA_{fl}-katalysierten Nukleotidaustauschs zeigen eine Übereinstimmung mit den für DrrA₃₄₀₋₅₃₃ ermittelten Werten. Durch hyperbolen Fit kann für die DrrA₃₄₀₋₅₃₃-katalysierte Nukleotidaustauschreaktion an Rab1-AMP eine maximal stimulierbare Nukleotidfreisetzungsgeschwindigkeit (k_{-4}) von $17,9 \text{ s}^{-1}$ ermittelt werden und eine Dissoziationskonstante (K_{D3}) von $214 \text{ }\mu\text{M}$.

4.4.2 Modifikation der Rab:GDI-Interaktion durch Adenylierung

Die Adenylierung von Rab1 erfolgt an der Interaktionsoberfläche mit GDI. Um die Auswirkung der Modifikation auf die Interaktion zu untersuchen, wurde zunächst Rab1, wie unter 3.4.7 beschrieben, adenyliert und gereinigt und anschließend, wie unter 3.4.4 beschrieben,

mit Farnesyl-NBD modifiziert. Eine ESI-MS-Analyse des Proteins nach der Adenylierungsreaktion zeigte, dass keine vollständige Modifikation mit AMP erreicht wurde (Abbildung 4-22 a). Da die Modifikation von Rab zu keinen signifikanten Unterschieden bei der ESI-MS Analyse führt (Matthias Müller, persönliche Kommunikation), kann aufgrund der Größe der Peaks davon ausgegangen werden, dass ca. 4 % des vorliegenden Proteins nicht adenyliert wurden.

Die Messung der Assoziation von Rab1 und GDI erfolgte, wie bereits unter 4.2.4 für nicht modifiziertes Rab1 beschrieben, durch Mischung von 50 nM modifiziertem Rab1 mit variierenden GDI-Konzentrationen mittels Stopped-flow. Die beobachteten Geschwindigkeitskonstanten der Assoziationsreaktionen sind in Abbildung 4-22 b im Vergleich zur Assoziation von unmodifiziertem Rab1b-f-NBD dargestellt. Die beobachteten Geschwindigkeitskonstanten der Assoziationsreaktionen mit den verschiedenen GDI-Konzentrationen zeigen keine großen Unterschiede zwischen adenyliertem und nicht adenyliertem Rab1. Die Assoziationsreaktionen zeigen allerdings in der Stopped-flow-Messung deutlich unterschiedliche Amplituden. Die normalisierten Amplituden der Reaktion mit adenyliertem Rab1 haben lediglich eine Größe von 5-6 % der Amplitude von nicht modifiziertem Rab1b-f-NBD. Da ca. 4 % des vorliegenden Proteins nicht adenyliert wurden, ist davon auszugehen, dass in dieser Messung keine Bindung an Rab1-AMP-f-NBD beobachtet werden konnte. Zur Verifizierung dieses Ergebnisses wurde eine Adenylierungsreaktion mit Rab1b-f-NBD angesetzt. 100 μ l der 28,6 μ M Rab1b-f-NBD Lösung wurden mit 500 nM DrrA_{fl} N451A/R453A/D480A/S483A und 200 μ M ATP versetzt und bei 4 °C inkubiert. Die Assoziation von GDI mit dem in der Reaktionsmischung enthaltenen Rab1b-f-NBD wurde nach 24 und 48 Stunden mittels Stopped-flow gemessen. In Abbildung 4-22 c sind die gemessenen Fluoreszenzänderungen der Assoziation von GDI mit unmodifiziertem, 24 Stunden modifiziertem und 48 Stunden modifiziertem Rab1b-f-NBD dargestellt. Es ist zu erkennen, dass die Amplitude der Reaktion im Verlauf der Adenylierungsreaktion deutlich abnimmt, während die beobachteten Geschwindigkeitskonstanten unverändert bleiben. Dies zeigt, dass die Adenylierung von Rab1 durch DrrA zu einer sehr starken Verringerung der Affinität von Rab1 und GDI führt, so dass in den verwendeten Konzentrationsbereichen keine Interaktion von Rab1-AMP-f-NBD und GDI detektiert werden. Eine deutliche Amplitudenvergrößerung und somit eine Interaktion des modifizierten Proteins mit GDI kann selbst bei einer Konzentration von 25 μ M GDI-1 nicht beo-

bachtet werden, so dass davon ausgegangen werden kann, dass die Affinität des Komplexes durch die Modifikation von Rab1 um mindestens fünf Größenordnungen verringert wird.

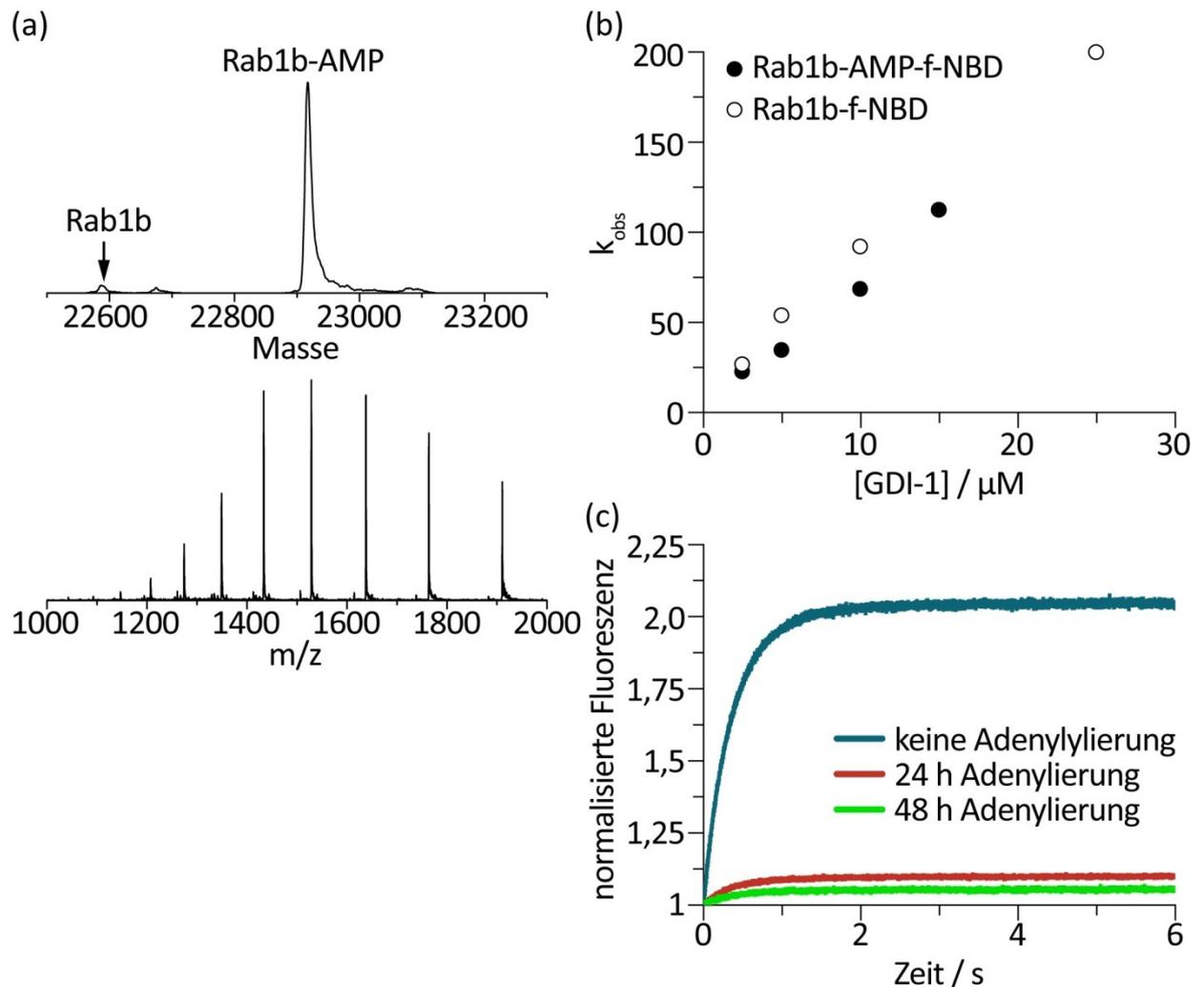


Abbildung 4-22: Bindung von GDI-1 und Rab1-AMP-f-NBD

- (a) ESI-MS-Analyse des adenylierten Rab1b-f-NBD vor der Prenylierungsreaktion. Ca. 4 % des Proteins konnten nicht adenyliert werden.
- (b) Beobachtete Geschwindigkeitskonstanten der Assoziation von GDI-1 mit adenyliertem und nicht adenyliertem Rab1b-f-NBD. 50 nM Rab1-AMP-f-NBD wurde mittels Stopped-flow mit variierenden Mengen GDI gemischt. Die durch Anpassung einer einfach exponentiellen Funktion an die detektierte Fluoreszenzänderung von NBD ermittelten Geschwindigkeitskonstanten (k_{obs}) wurden gegen die eingesetzten GDI-Konzentrationen aufgetragen. Zum Vergleich wurden die beobachteten Geschwindigkeitskonstanten der Assoziation von unmodifiziertem Rab1b-f-NBD mit GDI dargestellt.
- (c) Rab1-f-NBD wurde zur Adenylylierung 24 bzw. 48 Stunden mit 500 nM DrrA_{fl} N451A/R453A/D480A/S483A und 200 µM ATP bei 4 °C inkubiert. 50 nM des modifizierten Rab1-f-NBD und 250 nM GDI-1 wurde mittels Stopped-flow gemischt. Die gemessene Änderung der NBD-Fluoreszenz ist dargestellt. Die Messung wurde zum Vergleich mit unmodifiziertem Rab1-f-NBD durchgeführt.

DrrA kann somit durch zwei unterschiedliche Mechanismen die Interaktion von GDI mit Rab1 signifikant schwächen – Nukleotidaustausch und Adenylylierung. Um zu untersuchen, ob DrrA durch Adenylylierung von Rab1 eine GDI-Freisetzung katalysieren oder durch Verschiebung des Gleichgewichts, wie für den Nukleotidaustausch gezeigt, bewirken kann, wurde eine Adenylylierungsreaktion mit dem Rab1:GDI-Komplex durchgeführt (Abbildung 4-23). In Anwesenheit von einem Überschuss GDP, um eine Freisetzung von Rab1 durch Nukleotidfreisetzung zu verhindern, wurde DrrA_{fl} bzw. die GEF-Mutante DrrA_{fl} N451A/R453A/D480A/S483A mit dem Rab:GDI-Komplex vermischt. Nach einer Zugabe von ATP, das als Substrat der Adenylylierungsreaktion benötigt wird, konnte im beobachteten Zeitraum keine Freisetzung von Rab1 und somit keine Adenylylierung beobachtet werden. Die sehr kleinen Mengen Rab1, die von GDI dissoziiert vorliegen, können offensichtlich nicht effektiv adenylyliert werden. Neben der geringen Proteinmenge liegt der Grund hierfür vermutlich darin, dass GDP-gebundenes Rab1 im Vergleich zu GTP-gebundenem Rab1 mit einer fast 300-fach höheren spezifischen enzymatischen Aktivität das bevorzugte Substrat der Adenylylierungsreaktion ist (Muller *et al.*, 2010). Nach der Zugabe von GTP kann in Anwesenheit von GEF-aktivem DrrA_{fl} eine Freisetzung von GDI durch Adenylylierung beobachtet werden. Zunächst erfolgt nach der Zugabe von GTP, bedingt durch den zehnfachen Überschuss an GDP, bei ca. einem Zehntel des vorhandenen Rab1 ein Nukleotidaustausch zu GTP und somit eine dauerhafte Freisetzung von GDI, was durch den initialen steilen Abfall der Fluoreszenz beobachtet werden kann. Dieser GTP-gebundene Anteil der Rab-Proteine wird aufgrund der höheren spezifischen Aktivität von DrrA für Rab:GTP und aufgrund der Tatsache, dass keine Konkurrenz mit der Bindung von GDI mehr erfolgt und somit die für die Adenylylierung zur Verfügung stehende Proteinkonzentration erhöht wurde, effektiv adenylyliert. Nach der Adenylylierung kann keine Bindung an GDI mehr erfolgen, so dass auch nach dem erneuten Nukleotidaustausch zu GDP keine Rückbindung erfolgt. Durch kontinuierlichen Nukleotidaustausch und anschließende Adenylylierung wird schließlich eine vollständige Freisetzung von GDI bewirkt. In Anwesenheit der GEF-defizienten-Mutante von DrrA erfolgt eine Freisetzung von GDI erst nach Zugabe der Nukleotidaustauschdomäne von DrrA. Dies zeigt ebenfalls deutlich, dass ein Nukleotidaustausch unter diesen Bedingungen für die effektive Freisetzung von Rab1 durch Adenylylierung erforderlich ist. Die beobachteten GDI-Freisetzungen durch Adenylylierung zeigen eine vergleichbare Geschwindigkeit, unabhängig davon, ob der Nukleotidaustausch durch DrrA_{fl} oder DrrA₃₄₀₋₅₃₃ katalysiert wurde. Es scheint somit nicht entscheidend zu sein,

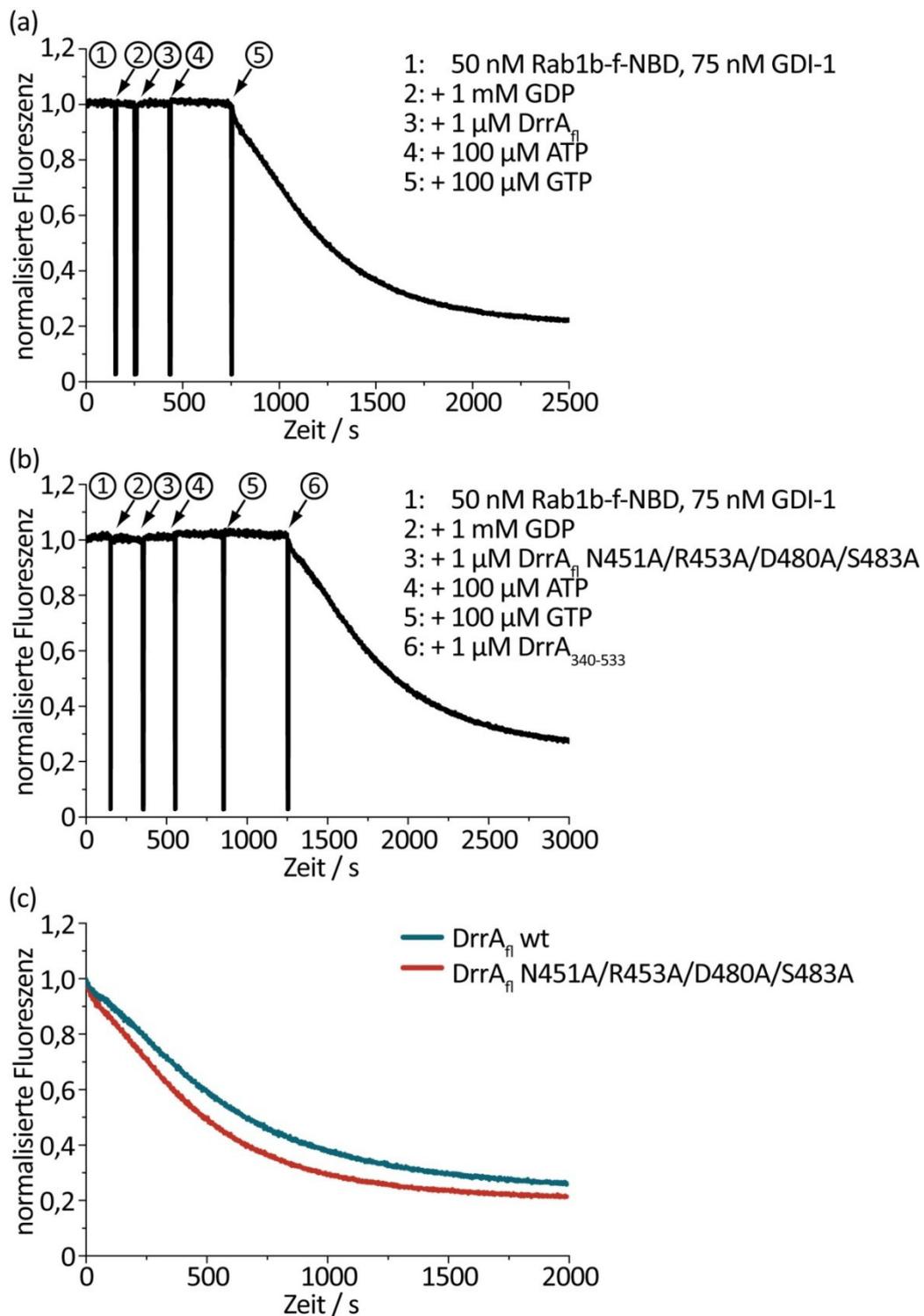


Abbildung 4-23: GDI-Freisetzung durch Adenylylierung von Rab1

GDI-Freisetzung durch Adenylylierung mit DrrA_{fl} (a) oder der GEF-Mutante DrrA_{fl} N451A/R453A/D480A/S483A (b). Komplexdissoziation wurde durch Messung der NBD-Fluoreszenz detektiert. Die Freisetzung von Rab1 aus dem Komplex mit GDI zeigt eine Abhängigkeit vom Nukleotidaustausch zu GTP. In Anwesenheit von DrrA_{fl} (a) erfolgt eine Freisetzung von Rab1 erst nach Zugabe von GTP, während in Anwesenheit der GEF-Mutante (b) eine Zugabe der GEF-Domäne (DrrA₃₄₀₋₅₃₃) benötigt wird, um eine Freisetzung von Rab1 zu ermöglichen. Beide GDI-Freisetzungsreaktionen zeigen nach Zugabe von GTP und Nukleotidaustauschfaktor vergleichbare Geschwindigkeiten (c).

dass die Adenylylierungs- und die Nukleotidaustauschdomäne auf dem gleichen Protein vorliegen (Abbildung 4-23 c).

DrrA kann neben einer Adenylylierung auch in Abwesenheit von ATP eine Guanylylierung unter Nutzung von GTP katalysieren (Muller *et al.*, 2010). Durch Guanylylierung kann ebenfalls eine Freisetzung von GDI bewirkt werden. Die geringere spezifische enzymatische Aktivität der Guanylylierung ist deutlich an der geringeren GDI-Freisetzungsgeschwindigkeit in Abwesenheit von ATP zu erkennen (Abbildung 4-24).

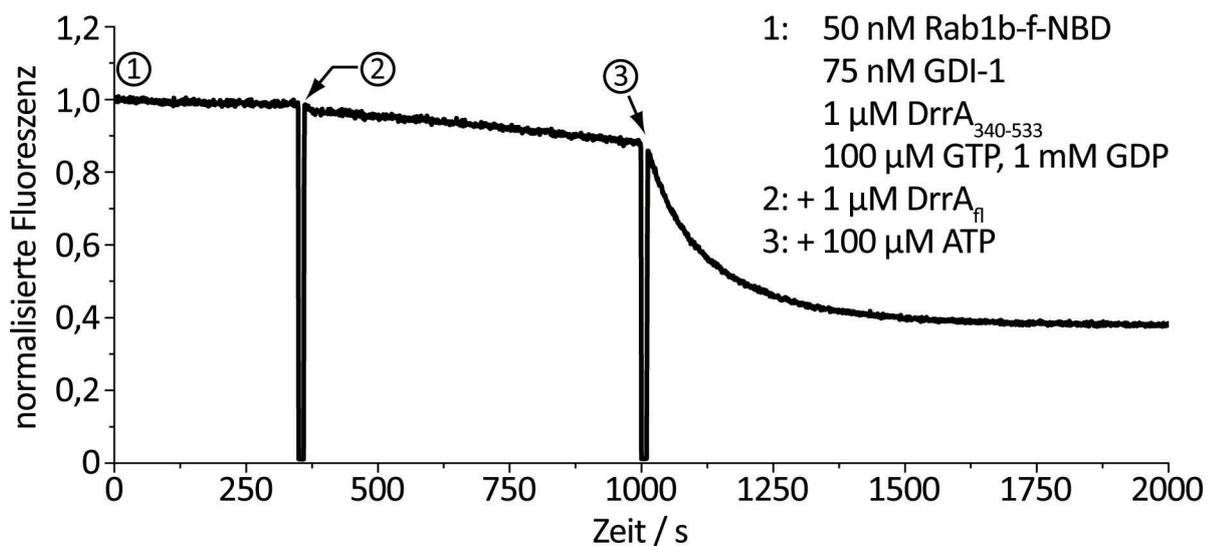


Abbildung 4-24: GDI-Freisetzung durch Guanylylierung von Rab1

In Abwesenheit von ATP erfolgt die Modifikation von Rab1 durch DrrA unter Verwendung von GTP als Substrat. GDI-Freisetzung wurde durch Messung der NBD-Fluoreszenz detektiert.

DrrA erkennt neben Rab1 verschiedene weitere Rab-Proteine als Substrat für die Adenylylierung. Rab8 wird als Substrat von DrrA erkannt, während Rab5a nicht von DrrA modifiziert werden kann (Muller *et al.*, 2010). In Anwesenheit von DrrA, Nukleotidaustauschfaktor, 100 μ M GTP und 1 mM GDP kann GDI aus dem Sec4:GDI-Komplex freigesetzt werden (Abbildung 4-25 a & b). Es ist daher davon auszugehen, dass Sec4 – das humane Homolog von Rab8 – ebenfalls von DrrA modifiziert werden kann und dass diese Modifikation auch zu einer signifikanten Verringerung der Bindungsaffinität von GDI führt. Die Abhängigkeit der GDI-Freisetzung von der Adenylylierungsreaktion zeigt sich deutlich darin, dass Rab5a, das nicht als Substrat der Adenylylierung erkannt wird, unter den gleichen Bedingungen nicht aus dem Komplex mit GDI freigesetzt werden (Abbildung 4-25 c).

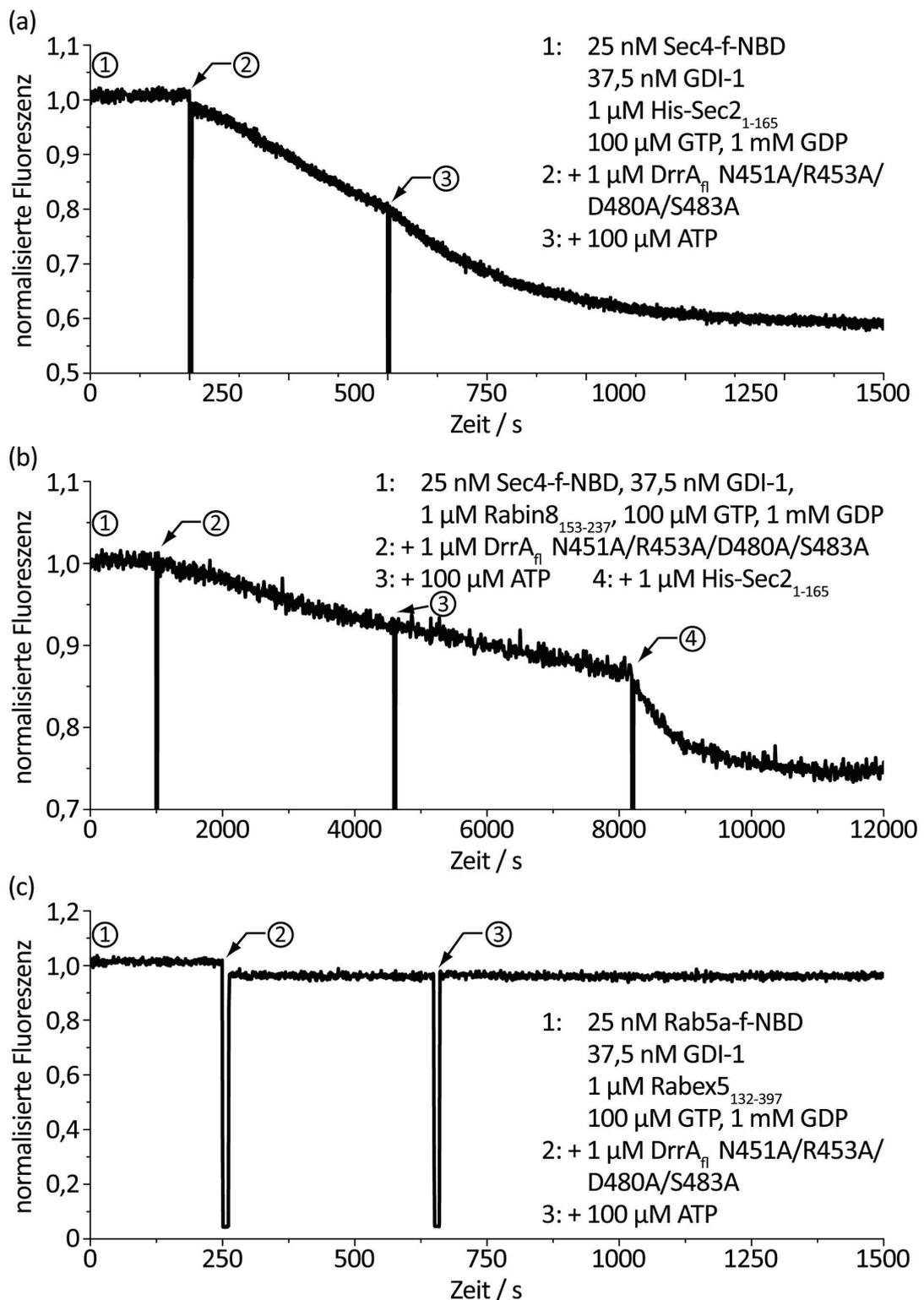


Abbildung 4-25: GDI-Freisetzung aus anderen Rab:GDI-Komplexen

Modifikation von Sec4-f-NBD in Anwesenheit von Sec2₁₋₁₆₅ (a, b) und Rabin8₁₅₃₋₂₃₇ (b). Die GDI-Freisetzung erfolgt in Anwesenheit von Rabin8₁₅₃₋₂₃₇ mit einer deutlich geringeren Geschwindigkeit als mit Sec2₁₋₁₆₅ als Nukleotidaustauschfaktor. Rab5a, das nicht von der Adenylylierungsdomäne modifiziert werden kann, kann unter vergleichbaren Bedingungen nicht aus dem Komplex mit GDI freigesetzt werden (c). NBD-Fluoreszenz wurde zur Detektion der GDI-Freisetzung gemessen.

Bei der Freisetzung von Sec4 wurden zwei verschiedene Nukleotid austauschfaktoren verwendet, die deutlich unterschiedliche katalytische Effizienzen für den Nukleotid austausch an Sec4 aufweisen und deren katalytische Effizienz deutlich geringer ist als die Nukleotid austauschaktivität von DrrA für Rab1. Bei der Verwendung von Sec2 als Nukleotid austauschfaktor zeigt sich nach der Zugabe von ATP eine geringe Beschleunigung der GDI-Freisetzungsrates, während in Anwesenheit des deutlich weniger effizienten Nukleotid austauschfaktors Rabin8 keine Beschleunigung der GDI-Freisetzungsgeschwindigkeit beobachtet werden kann. In diesem Fall ist die Geschwindigkeit der Nukleotid austauschreaktion aufgrund der geringen GEF-Aktivität von Rabin8 für Sec4 geschwindigkeitsbestimmend für die Adenylierungsreaktion, während bei der GDI-Freisetzung durch Adenylierung mit DrrA und Rab1 die Adenylierungsreaktion aufgrund der größeren GEF-Aktivität von DrrA unter diesen Versuchsbedingungen geschwindigkeitsbestimmend ist. Im Fall von Sec2 ist davon auszugehen, dass die Guanylierungsreaktion und der Nukleotid austausch mit einer vergleichbaren Geschwindigkeit erfolgen. Nach der Zugabe von ATP wird die Nukleotid austauschgeschwindigkeit geschwindigkeitsbestimmend, so dass die Zugabe von ATP lediglich zu einer geringen Beschleunigung der Reaktion führt. Diese Ergebnisse zeigen deutlich, dass die Adenylierungsdomäne von DrrA auch bei der Adenylierung von Sec4 eine Substratpräferenz für GTP-gebundenes Protein hat.

5 Diskussion und Ausblick

5.1 DrrA-katalysierter Nukleotidaustausch

Das Protein DrrA aus *Legionella pneumophila* wurde als erstes Protein beschrieben, das GEF- und GDF-Aktivität in einem Protein vereint (Machner und Isberg, 2007; Ingmundson *et al.*, 2007). Diese zwei beschriebenen Aktivitäten von DrrA wurden in dieser Arbeit näher charakterisiert. Die Ergebnisse der Untersuchung der Nukleotidaustauschaktivität sind in Abbildung 5-1 a dargestellt. Da in humanen Zellen bisher nur ein Nukleotidaustauschfaktor für Rab1 – der TRAPP-Komplex – identifiziert wurde und die Nukleotidaustauschaktivität des humanen Komplexes bis zum jetzigen Zeitpunkt nicht charakterisiert wurde, sind in Abbildung 5-1 b zum Vergleich die Daten dargestellt, die Chin *et al.* (2009) für das Rab1-Homolog aus Hefe – Ypt1 – mit dem TRAPPI-Komplex aus Hefe und GDP ermittelt haben. Während der K_{D3} der beiden Interaktionen, die die Affinität des GEFs für den Rab:GDP-Komplex beschreibt, eine vergleichbare Größe hat, unterscheiden sich die übrigen kinetischen Parameter der Nukleotidfreisetzung: der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Nukleotidfreisetzung (k_{-4}) ist für DrrA mit $7,6 \text{ s}^{-1}$ ungefähr um einen Faktor 50 schneller als für den TRAPPI-Komplex. Der signifikanteste Unterschied liegt allerdings in der Gleichgewichtsdissoziationskonstante der Rab:GEF-Komplexe in Abwesenheit von Nukleotid (K_{D2}), die für den Rab1:DrrA-Komplexe mit 3 pM fünf Größenordnungen geringer ist als bei dem Ypt1:TRAPPI-Komplex. Da die Nukleotidaffinität von Ypt1 nach den Messungen von Chin *et al.* (2009) drei Größenordnungen geringer ist als die Affinität von Rab1, wäre es denkbar, dass der TRAPP-Komplex aus humanen Zellen im Verlauf der Evolution eine stärkere Nukleotidaustauschaktivität entwickelt hat. Es ist allerdings davon auszugehen, dass DrrA eine noch höhere katalytische Aktivität und eine stärkere Affinität für Rab1 entwickelt hat, um in Legionellen-infizierten Zellen die Konkurrenz mit dem natürlichen Rab1-GEF zu erleichtern.

Die Nukleotidaustauschaktivität von DrrA ist mit einer katalytischen Effizienz von $2,2 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ und einem k_{-4} von $7,6 \text{ s}^{-1}$ ähnlich stark wie die Nukleotidaustauschaktivität von Sec2 für Sec4 (k_{-4} $15,3 \text{ s}^{-1}$ und k_{-4}/K_{D3} $3,1 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (Itzen *et al.*, 2007)). DrrA gehört somit zu den katalytisch effizientesten bisher beschriebenen Nukleotidaustauschfaktoren für Rab-Proteine. Die ebenfalls in dieser Arbeit charakterisierten Nukleotidaustauschfaktoren Connecdenn und Rabex5 zeigen mit $4,3 \cdot 10^4$ – $1,5 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (Connecdenn₁₋₄₀₃-Rab35) und $4,1 \cdot 10^3$ – $2,9 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (Rabex5₁₃₂₋₃₉₇-Rab5a) geringere katalytische Effizienzen als DrrA, wobei

Conneccden ein deutlich stärkerer Nukleotidaustauschfaktor für Rab35 ist als Rabex5 für Rab5a.

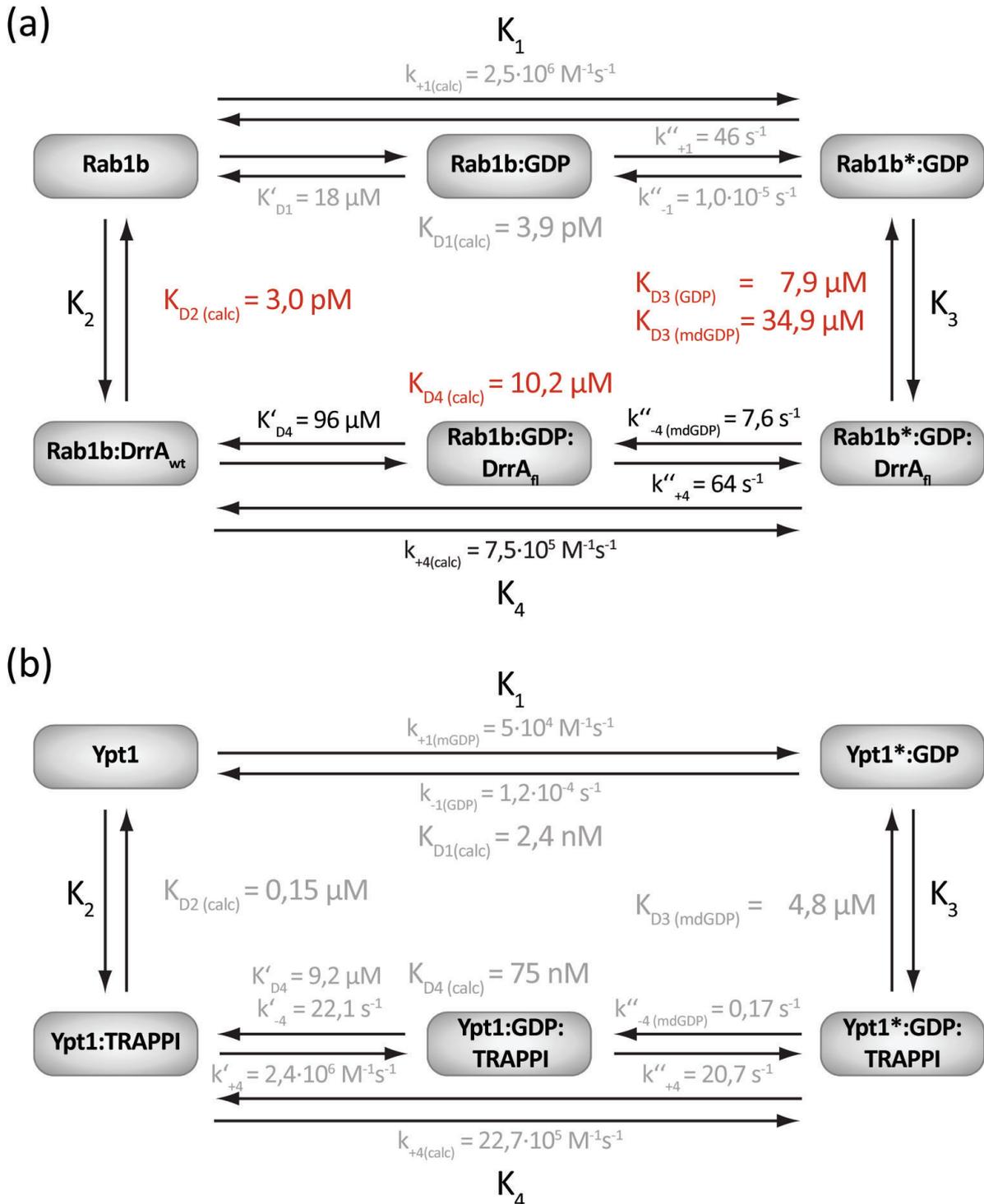


Abbildung 5-1: Thermodynamische und kinetische Parameter der Interaktion von Rab1b mit GDP und DrrA (a) im Vergleich mit der Interaktion von Ypt1 mit TRAPPI und GDP (b)

Die in dieser Arbeit ermittelten oder berechneten (calc) Werte sind in schwarz und rot dargestellt. $K_{D2(\text{calc})}$ in (a) wurde unter Verwendung des mit GDP bestimmten K_{D3} Wertes berechnet. Die in (b) dargestellten Messwerte sind von Chin *et al.* (2009) und bestehen aus den Daten, die ohne globales Fitting ermittelt wurden.

5.2 GDI-Freisetzung durch DrrA

Die in der Literatur beschriebene GDF-Aktivität von DrrA wurde in dieser Arbeit näher untersucht, und es konnte eindeutig gezeigt werden, dass die Freisetzung von GDI auf dem von DrrA katalysierten Nukleotidaustausch zu GTP basiert. Der Nukleotidaustausch zu GTP verringert die Affinität von GDI für Rab1 sehr stark, so dass eine Reassoziierung des Rab:GDI-Komplexes nach dem Nukleotidaustausch nicht erfolgt (Abbildung 4-12). Der DrrA-katalysierte Nukleotidaustausch erfolgt dabei ausschließlich nach der Dissoziation des Rab:GDI-Komplexes, so dass die Geschwindigkeit der GDI-Freisetzung von der spontanen Dissoziation von Rab und GDI abhängig ist. Da die Deletion von DrrA in *Legionella pneumophila* eine nahezu vollständige Inhibition der Rab1-Rekrutierung zur Legionellenvakuole bewirkt (Machner und Isberg, 2006), ist DrrA mit großer Wahrscheinlichkeit für die Rekrutierung von Rab1 aus dem Rab1:GDI-Komplex verantwortlich. Eine ektopische Expression von DrrA in Säugerzellen führt zu einer Mislokalisierung von Rab1 an der Plasmamembran, an der auch DrrA lokalisiert werden kann (Murata *et al.*, 2006). Da an der Plasmamembran aufgrund der natürlichen intrazellulären Lokalisation von Rab1 kein GDF für Rab1 zu erwarten wäre, ist davon auszugehen, dass die für DrrA *in vitro* beobachtete GDI-Freisetzung durch Nukleotidaustausch auch *in vivo* zu einer Lokalisation von Rab1 an die Membran führt, an der DrrA lokalisiert ist. Dies bedeutet, dass DrrA durch seine Nukleotidaustauschaktivität die spezifische Rekrutierung von Rab1 an eine Membran bewirken kann.

5.3 Interaktion von verschiedenen Rab-Proteinen mit GDI

Rab7 im Komplex mit GDP zeigt eine um mehrere Größenordnungen höhere Affinität für GDI im Vergleich zu Rab7:GTP (Wu *et al.*, 2010). Sofern diese nukleotidabhängigen Affinitätsunterschiede für anderen Rab-Proteine zutreffen, kann aus thermodynamischen Gesichtspunkten jeder Nukleotidaustausch zu GTP und somit jeder Nukleotidaustauschfaktor die Freisetzung von Rab-Proteinen aus dem Rab:GDI-Komplex und somit auch die intrazelluläre Lokalisation eines Rab-Proteins an einer spezifischen Membran bewirken. Da die Geschwindigkeit der GDI-Freisetzung in diesem Fall von der spontanen Dissoziation des Rab:GDI-Komplexes abhängig ist, wurden in dieser Arbeit die Dissoziationsgeschwindigkeitskonstanten und Affinitäten von verschiedenen Rab:GDI-Komplexen bestimmt. Da die Membranrekrutierung von Rab1 aus dem Rab1:GDI-Komplex durch DrrA-katalysierten Nukleotidaustausch erfolgen

kann, sollte überprüft werden, ob sich die Interaktion von Rab1 mit GDI deutlich von anderen Rab-Proteinen unterscheidet.

Zur Charakterisierung der Rab:GDI-Interaktion wurden Rab-Proteine eingesetzt, die mit Farnesyl-NBD (C_{15}) modifiziert waren. Diese C-terminale Modifikation ist deutlich weniger hydrophob als die in Zellen beschriebene doppelte Modifikation mit Geranylgeranyl(C_{20})-Gruppen, wodurch eine bessere Löslichkeit der Rab-Proteine erreicht werden kann. Basierend auf den für Rab7 ermittelten Daten, sollten sich die Affinitäten der zweifach Geranylgeranylierten nicht sehr stark von Farnesyl-NBD-modifizierten Rab-Proteinen unterscheiden (4,5 nM vs. 13 nM, Wu *et al.*, 2010). Zur Bestimmung der Affinität von Rab7-digeranylgeranyl wurde allerdings eine C-terminale Aminosäure mit einer Dansylgruppe modifiziert, und es kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Affinität hierdurch beeinflusst wurde. Im Gegensatz zur relativ gleichbleibenden Affinität ist die Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante des zweifach prenylierten Rab7 bei der Interaktion mit GDI um ca. einen Faktor zehn geringer als bei Farnesyl-NBD-modifizierten Rab7 ($0,0034 \text{ s}^{-1}$ vs. $0,031 \text{ s}^{-1}$). Daher kann vermutet werden, dass die in dieser Arbeit für Rab-Proteinen mit einer Farnesyl-NBD-Modifikation ermittelten Dissoziationsgeschwindigkeitskonstanten der Rab:GDI-Komplexe, aufgrund der geringeren Hydrophobizität der Farnesyl-NBD-Gruppe im Vergleich zu zwei Geranylgeranylresten, etwas größer als die der nativ modifizierten Proteine sind.

In Tabelle 5-1 sind die in dieser Arbeit ermittelten kinetischen Parameter der Interaktion von GDI mit verschiedenen Rab-Proteinen zusammengefasst. Die Dissoziationsgeschwindigkeitskonstanten der verschiedenen Rab:GDI-Komplexe weisen erstaunliche Unterschiede auf und variieren über zwei Größenordnungen, wodurch sich die Affinitäten der einzelnen Komplexe ebenfalls um mehrere Größenordnungen unterscheiden. Während Rab35 mit einer sehr hohen Affinität an GDI bindet (52,6 pM-0,43 nM), ist die Interaktion von Rab5 mit GDI mit einer Gleichgewichtsdissoziationskonstante von 14,5 nM deutlich schwächer. Die Ursache für die unterschiedlichen Affinitäten liegt dabei im Wesentlichen in den Differenzen der Dissoziationsgeschwindigkeitskonstanten.

Bis zum heutigen Zeitpunkt wurde neben Rab7 lediglich die Affinität des Rab9:GDI-Komplexes und des Rab3:GDI-Komplexes untersucht (Shapiro und Pfeffer, 1995; Schalk *et al.*, 1996). Auch in diesen Messungen zeigte sich, dass es offenbar deutliche Unterschiede zwischen den verschiedenen Rab:GDI-Komplexen gibt, da unter gleichen Bedingungen für den

Tabelle 5-1: Geschwindigkeitskonstanten und Affinitäten der Rab:GDI-Interaktionen				
Rab	$k_{\text{off}} [\text{s}^{-1}]$	$k_{\text{on}} [\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}]$	$k_{\text{off}} / k_{\text{on}}$	K_D (Gleichgewichtstitration)
Rab1b-f-NBD	0,0277	$1,1 \cdot 10^7$	2,6 nM	-
Rab5a-f-NBD	0,1449	$1,0 \cdot 10^7$	14,5 nM	11,7 nM
Rab35-f-NBD	0,0020	$3,8 \cdot 10^7$	52,6 pM ($k_{\text{on},1}$)	ca. 1 nM
		$4,6 \cdot 10^6$	0,43 nM ($k_{\text{on},2}$)	
Sec4-f-NBD	0,0029	$6,6 \cdot 10^6$	0,44 nM ($k_{\text{on},1}$)	2,9 nM
		$1,4 \cdot 10^6$	2,1 nM ($k_{\text{on},2}$)	

Rab3:GDI Komplex mit 450 nM eine deutlich geringere Affinität als für den Rab9:GDI-Komplex (50 nM) ermittelt wurde (Shapiro und Pfeffer, 1995; Schalk *et al.*, 1996). Aufgrund der Tatsache, dass in den beschriebenen Messungen Detergenz verwendet wurde, das die Interaktion von Rab und GDI abschwächt (Shapiro und Pfeffer, 1995), sind die so ermittelten Affinitäten erwartungsgemäß deutlich geringer als die in dieser Arbeit ermittelten Affinitäten.

Die biologische Relevanz der Affinitätsunterschiede liegt eventuell in den variierenden C-terminalen Sequenzen der Rab-Proteine begründet. Der C-Terminus von Rab35 ist mit acht Lysinen und zwei Argininen, denen lediglich zwei Aspartate gegenüberstehen, sehr stark positiv geladen, während die anderen in dieser Arbeit untersuchten Rab-Proteine eine relativ geringe Nettoladung in der hypervariablen Region besitzen. Die starke positive Ladung des C-Terminus von Rab35 sollte, analog zur Polylysinsequenz von K-Ras, spezifisch die Assoziation mit der Plasmamembran verstärken (Leventis und Silvius, 1998; Roy *et al.*, 2000). Hierdurch wäre für eine effektive Extraktion durch GDI eine höhere Affinität des Rab:GDI-Komplexes erforderlich.

Sowohl die Affinität von Rab1 für GDI als auch die Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante der Interaktion ähneln den für Rab7-f-NBD ermittelten Werten und liegen im Vergleich zu den anderen Rab-Proteinen in einem intermediären Bereich. Basierend auf den kinetischen Parametern der Interaktion der verschiedenen Rab-Proteine mit GDI, sollte daher neben Rab1 auch für andere Rab-Proteine ein intrazellulärer Lokalisationsmechanismus, basierend auf Nukleotidaustausch, möglich sein.

5.4 GDI-Freisetzung und Rab Lokalisation durch Nukleotidaustauschfaktoren

Neben der Dissoziationsgeschwindigkeitskonstanten der Rab:GDI-Interaktion ist die Nukleotidabhängigkeit der Rab:GDI-Affinitäten sowie die katalytische Effizienz und Affinität des Nukleotidaustauschfaktors für die Effektivität der GDI-Freisetzung durch Nukleotidaustauschfaktoren relevant, worauf im Folgenden näher eingegangen wird.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Sec4, Rab5 und Rab35 ebenfalls aus einem Komplex mit GDI durch Nukleotidaustausch zu GTP freigesetzt werden und dass diese Proteine somit analog zu Rab7 einen nukleotidabhängigen Affinitätsunterschied bei der Bindung von GDI aufweisen. Analog zu den Experimenten mit den DrrA-Nukleotidaustauschmutanten zeigen auch die verschiedenen Rab:GEF-Komplexe eine Abhängigkeit der beobachteten GDI-Freisetzungsgeschwindigkeit von der katalytischen Effizienz des Nukleotidaustauschfaktors. Die Dissoziation des Sec4-f-NBD:GDI-Komplexes erfolgt in Anwesenheit von 1 μ M Sec2 sehr viel schneller als in Anwesenheit des katalytisch deutlich weniger aktiven Rabin8 in der gleichen Konzentration (Abbildung 4-17). Unter den gewählten Konzentrationsbedingungen erfolgte daher nicht bei jedem von GDI dissoziierten Sec4-Molekül ein Nukleotidaustausch, so dass die GEF-Aktivität die Geschwindigkeit der GDI-Freisetzung bestimmte. Bei der Messung der GDI-Freisetzung aus dem Rab5- bzw. Rab35-Komplex zeigt sich unter den gleichen Bedingungen eine Limitierung der GDI-Freisetzungsgeschwindigkeit durch die spontane Dissoziationsrate der Rab:GDI-Komplexe (Abbildung 4-18). Dies zeigt sich deutlich darin, dass die GDI-Freisetzung aus dem Rab5:GDI-Komplex durch Rabex5 deutlich schneller ist als die GDI-Freisetzung aus dem Rab35:GDI-Komplex, obwohl Connecdenn eine deutlich stärkere katalytische Nukleotidaustauschaktivität aufweist als Rabex5. Die Geschwindigkeit der Freisetzung von Rab-Proteinen aus dem Komplex mit GDI durch GTP-Beladung ist somit von der katalytischen Effizienz der Nukleotidaustauschfaktoren und der Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante der Rab:GDI-Komplexe abhängig.

5.5 Modifikation der Rab:GDI-Interaktion

Das Gleichgewicht zwischen membrangebundenen und cytosolischen Rab-Proteinen kann innerhalb der Zelle durch mehrere posttranslationalen Modifikationen moduliert werden, wodurch die Menge der für den Nukleotidaustausch verfügbaren Rab-Proteine gesteuert werden kann.

In einer Studie von Steele-Mortimer *et al.* (1993) wurde nachgewiesen, dass die mit Rab5 und Rab4 in der Zelle assoziierten GDI-Moleküle in einer phosphorylierten Form mit zum Teil mehreren Phosphatgruppen vorliegen. Es ist allerdings unklar, an welchen Resten das isolierte GDI modifiziert ist und inwieweit die Phosphorylierungen einen Einfluss auf die Aktivität von GDI gegenüber Rab-Proteinen haben. Für zwei Kinasen wurde allerdings gezeigt, dass sie eine Phosphorylierung von GDI katalysieren, die die Membran-Cytoplasma-Verteilung von Rab-Proteinen beeinflusst. Durch die Proteinkinase p38 α kann die Membranextraktionsfähigkeit von GDI-1 für Rab5 deutlich gesteigert werden (Cavalli *et al.*, 2001). Diese verstärkte Extraktionsfähigkeit von GDI deutet auf eine erhöhte Affinität von GDI für Rab5 hin. Da in dieser Arbeit nur mit unmodifiziertem GDI gearbeitet wurde, stellt dies eventuell die Ursache für die in dieser Arbeit ermittelte verhältnismässig niedrige Affinität des Rab5a-f-NBD:GDI-Komplexes, dar. Durch Phosphorylierung von GDI könnte eventuell die Affinität des Rab5:GDI-Komplexes deutlich gesteigert werden.

Während die p38 α Phosphorylierung vermutlich an S121 erfolgt (Cavalli *et al.*, 2001), wurde für die Serum- und Glucocorticoid-induzierbare Kinase 1 (SGK1) gezeigt, dass sie die Phosphorylierung von GDI-1 an S213 katalysiert (Liu *et al.*, 2010). Auch diese Phosphorylierung steigert die cytoplasmatisch Rab:GDI Menge – in diesem Fall für Rab4 (Liu *et al.*, 2010). Weiterhin wurde für GDI-2 eine Tyrosinphosphorylierung berichtet, die zu einer Steigerung der cytoplasmatischen Rab4:GDI-Komplekonzentration führt (Shisheva *et al.*, 1999). Es ist unklar, wie die Phosphorylierung von GDI das Gleichgewicht zwischen cytoplasmatischen und membrangebundenen Rab-Proteinen beeinflussen kann. Für GDI-2 konnte allerdings gezeigt werden, dass die Mutation von Tyrosin 249 zu Valin zu einer selektiven Veränderung der Membranextraktionsfähigkeit von GDI für verschiedene Rab-Proteine führt, d.h. einige Rab-Proteine wurden mit einer geringeren Effektivität als zuvor extrahiert und für andere Rab-Proteine zeigt sich eine gesteigerte Extraktionsfähigkeit (Shisheva *et al.*, 1999). Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass kleine Veränderungen der Oberfläche von GDI, z.B. auch durch posttranslationale Modifikationen, potenziell die Affinität von GDI für Rab-Proteine – eventuell sogar selektiv für einige spezifische Rab-Proteine – verändern können.

Neben der posttranslationalen Modifikation von GDI wurden außerdem verschiedene Modifikationen an Rab-Proteinen beschrieben. Im Verlauf der Mitose werden Rab1a und Rab4 durch Cdk1 phosphoryliert (Bailly *et al.*, 1991). Bei Rab4 bewirkt die C-terminale Modifikation mit einer Phosphatgruppe, die nach dem Ende der Zellteilung wieder entfernt wird, eine

Erhöhung der cytoplasmatischen Konzentration von Rab4 (Bailly *et al.*, 1991; van der Sluijs *et al.*, 1992), während bei Rab1 die cytoplasmatische Konzentration durch die Phosphorylierung leicht verringert wird (Bailly *et al.*, 1991). Phosphorylierung von Rab6 durch Protein Kinase C (PKC) führt wiederum zu einer Erhöhung der cytoplasmatischen Konzentration (Fitzgerald und Reed, 1999).

Mechanismen, die zur Veränderung der Lokalisation von Rab-Proteinen aufgrund von Phosphorylierungen führen, wurden bisher noch nicht näher untersucht. Es kann aber eindeutig gezeigt werden, dass die Phosphorylierung von Rab und GDI eine potentiell reversible Modifikation darstellt, die zur Modulation der cytoplasmatischen Rab Menge von Zellen genutzt wird.

In dieser Arbeit wurden mit Ausnahme von Rab5 ausschließlich Rab-Proteine verwendet, deren Sequenz mit zwei Cysteinen endet. Ca. 30 % der humanen Rab-Proteine enden allerdings mit einem C-terminalen CXC-Motiv, das nach der Prenylierung in der Zelle als Substrat einer Carboxymethylierungsreaktion dient (Smeland *et al.*, 1994). Auch bei Rab-Proteinen, die ein C-terminales CaaX-Motiv aufweisen, das keine zwei direkt aufeinanderfolgenden Cysteine wie Rab5 (CCSN) enthält, erfolgt nach der proteolytischen Abspaltung des aaX-Motivs eine C-terminale Carboxymethylierung durch die Methyltransferase Icmt (Leung *et al.*, 2007). Bei einer Deletion dieser Methyltransferase in Säugerzellen zeigen Rab-Proteine, die als Substrat des Enzyms dienen, eine intrazelluläre Umverteilung mit erhöhten Rab:GDI-Komplexkonzentrationen im Cytoplasma (Leung *et al.*, 2007). Diese Konzentrationserhöhung ist auf eine verstärkte Membranextraktion durch GDI zurückzuführen (Leung *et al.*, 2007), was entweder auf eine Verstärkung der Interaktion des Rab-Proteins mit GDI oder auf eine Verringerung der Affinität des Rab-Proteins für die Membran aufgrund der fehlenden hydrophoben Modifikation zurückzuführen ist. Da es sich bei der Carboxymethylierung um einen potenziell reversiblen Vorgang handelt (Chelsky *et al.*, 1985), wäre es möglich, dass mit Hilfe der Carboxymethylierung die im Cytoplasma an GDI gebundene verfügbare Menge eines speziellen Rab-Proteins reguliert werden kann.

In zukünftigen Studien sollte *in vitro* näher untersucht werden, inwieweit die posttranslationalen Modifikationen die Interaktion verschiedener Rab-Proteine mit GDI verändern und ob diese Modifikationen die Dissoziationsgeschwindigkeit der Rab:GDI-Komplexes und somit die Zugänglichkeit der Rab-Proteine für den Nukleotidaustausch verändern. Die bisher beschriebenen Phosphorylierungen von Rab-Proteinen und GDI sind in der Regel nicht dauerhaft ak-

tiv, sondern werden als kurzzeitige zelluläre Antwort auf spezifische Bedingungen aktiviert. Daher ist davon auszugehen, dass keine dauerhafte Phosphorylierung der Proteine vorliegt und die in dieser Arbeit ermittelten Affinitäten und Dissoziationsgeschwindigkeitskonstanten *in vivo* relevant sind. Die Phosphorylierung von GDI durch p38 α stellt eventuell einen Sonderfall dar, da diese Kinase ohne spezielle extrazelluläre Stimuli aktiv zu sein scheint (Cavalli *et al.*, 2001). Im Rahmen dieser Arbeit wurde daher versucht, den Einfluss dieser Phosphorylierung auf die Interaktion von Rab und GDI zu untersuchen. Eine Phosphorylierung von GDI mit aktiver p38 α Kinase konnte allerdings nicht reproduziert werden. In Zukunft sollte die Affinität von Rab5 und auch anderen Rab-Proteinen für eine Oberflächenmutante von GDI, die die beschriebene Phosphorylierung imitiert, näher untersucht werden.

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die DrrA-katalysierte Adenylylierung von Rab-Proteinen die Freisetzung von Rab aus dem Rab:GDI-Komplex bewirkt, da sie die Affinität des Rab:GDI-Komplexes um mindestens 5 Größenordnungen reduziert. Auch diese Freisetzung von GDI erfolgt ohne Beschleunigung der Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante des Rab:GDI-Komplexes, d.h. dass lediglich vom Rab:GDI-Komplex freigesetzte Rab-Proteine als Substrat der Adenylylierung dienen können. Die Adenylylierung dient in Legionellen infizierten Zellen vermutlich im Wesentlichen dazu, die Rab-Proteine auf der Legionellenvakuole zu fixieren, da Deaktivierung des Rab-Proteins durch ein GAP-Protein und die Extraktion durch GDI verhindert wird. Eventuell wird durch die Modifikation auch die Interaktion mit weiteren Effektorproteinen beeinflusst.

Es ist unklar, ob das einzige bisher beschriebene GDF-Protein, Yip3/PRA1, in der Lage ist, die Dissoziationsgeschwindigkeit von Rab:GDI-Komplexen zu erhöhen. Dies scheint aufgrund der Tatsache, dass es nicht in einem ternären Komplex mit Rab und GDI nachgewiesen werden kann, fraglich (Hutt *et al.*, 2000). Weiterhin kann die Assoziation von Rab9 aus einem Rab9:GDI-Komplex an endosomale Membranen, die Yip3/PRA1 enthalten sollten, durch die Zugabe von GDI inhibiert werden (Soldati *et al.*, 1994). Auch dies zeigt, dass Yip3/PRA1 vermutlich nicht die Dissoziation des Rab9:GDI-Komplexes beschleunigen kann. Die Tatsache, dass Yip3/PRA1 in katalytischen Mengen einen Rab9:GDI-Komplex dissoziieren und die Reassoziierung des Komplexes verhindern kann (Sivars *et al.*, 2003), deutet auf eine Modifikation der Interaktion hin, die durch eine Veränderung der Rab:GDI-Interaktionsfläche erfolgen kann. Dies lässt vermuten, dass die in dieser Arbeit für DrrA ermittelten Mechanismen der

GDI-Freisetzung durch Adenylylierung eventuell Parallelen zu der beschriebenen GDI-Freisetzung durch Yip3/PRA1 aufweisen.

DrrA kann Rab-Proteine durch Adenylylierung modifizieren und dadurch ihre Reassoziaton mit GDI nach einer erfolgten Komplexdissoziation inhibieren. Durch Einführen der posttranslationalen Modifikation ist DrrA so prinzipiell, ähnlich wie Yip3/PRA1, in der Lage, in katalytischen Mengen Rab:GDI-Komplexe zu dissoziieren.

Während die Adenylylierung durch DrrA allerdings primär an aktivierten Rab-Proteinen erfolgt, würde Yip3/PRA1 vermutlich GDP-gebundene Rab-Proteine modifizieren. Durch die membranständige Modifikation von Rab-Proteinen könnte Yip3/PRA1 ein membranlokalisiertes Rab-Reservoir erzeugen, dass durch Demodifikation zur GEF-katalysierten Aktivierung freigegeben werden könnte. Dieses Reservoir würde eine Entkopplung der relativ langsamen Rab:GDI-Komplexdissoziation von der Aktivierung ermöglichen.

Die GDI-Freisetzung durch Adenylylierung kann nicht als *GDI Displacement* Faktor-Aktivität in ihrem ursprünglichen Sinn betrachtet werden, da DrrA nicht mit dem Rab:GDI-Komplex in Wechselwirkung tritt, sondern nach der spontanen Dissoziation des Rab:GDI-Komplexes die Reassoziaton des Komplexes durch Modifikation der Interaktionsfläche verhindert. Kinasen könnten einen ähnlichen Mechanismus zur Modifikation der intrazellulären Rab Verteilung nutzen.

5.6 Rekrutierung von Rab-Proteinen durch Nukleotidaustausch

Es ist unklar, ob die intrazellulären Konzentrationsbedingungen eine ausreichende Rekrutierung von Rab-Proteinen durch Nukleotidaustausch in einem für die Signaltransduktion angemessenen Zeitrahmen generell ermöglichen und ob die spontane Dissoziation der Rab:GDI-Komplexe, mit oder ohne posttranslationale Modifikationen, ausreichend membranrekrutierbare Rab-Proteine zur Verfügung stellt. Bei den Überlegungen hierzu sollte in Betracht gezogen werden, dass in der Zelle zur Initiation eines Signaltransduktionsprozesses die Rekrutierung von allen vorhandenen Molekülen eines bestimmten Rab-Proteins sicher nicht sinnvoll wäre, da hierdurch keine inaktive Fraktion im Cytosol verbleiben würde, die in weiteren Signaltransduktionsprozessen aktiviert werden könnte. Die Interaktion mit GDI kann daher sicherstellen, dass dem GEF nur kleine Mengen des Rab-Proteins zur Verfügung stehen, um eine vollständige Aktivierung des gesamten zellulären Rab-Pools zu verhindern.

Für verschiedene GEF-Proteine wurde *in vivo* nachgewiesen, dass ihre Aktivität für die Lokalisation der Rab-Proteine essentiell ist. Die endosomale Lokalisation des Rab35-Homologs in *Caenorhabditis elegans* Zellen, die eine Mutation im Connecdenn-Homolog *rme-4* aufweisen, ist z.B. deutlich gestört (Sato *et al.*, 2008). Weiterhin führt die Depletion des Rab21-GEF-Proteins Varp durch siRNA zu einer diffusen cytoplasmatischen Verteilung von Rab21 (Zhang *et al.*, 2006). Auch die Deletion von Ric1 in Hefezellen – einem Teil des Ric1-Rgp1-GEF-Komplexes – führt zur Mislokalisierung seines Substrats Ypt6 (Siniosoglou *et al.*, 2000). Eine diffuse cytoplasmatische Verteilung von Sec2 in Hefezellen, die durch die Deletion des C-Terminus des Proteins ausgelöst werden kann, führt zu einer Mislokalisierung von Sec4 (Ortiz *et al.*, 2002). Die natürliche Lokalisation des Ypt31 Effektors Sec2, kann durch die Expression von Ypt31 regeneriert werden, und diese Relokalisation von Sec2 führt zu einer partiellen Regenerierung der Sec4 Lokalisation (Ortiz *et al.*, 2002). Die endoplasmatische Lokalisation von endogen exprimiertem Rab5 S34N – einer Nukleotidbindungsmutante, die eine erhöhte GDP-Affinität aufweist – kann durch die gleichzeitige Expression von Rabex-5 erreicht werden (Mattera und Bonifacino, 2008). Diese Membranlokalisation von Rab5 ist allerdings von der Membranlokalisation von Rabex-5 abhängig (Mattera und Bonifacino, 2008).

Für den Mon1-Ccz1-Komplex, der in einer weiteren Rab-Kaskade als Rab5-Effektor Rab7 aktiviert, wurde sogar ein Zusammenhang mit der Dissoziation von GDI nachgewiesen (Kinchen und Ravichandran, 2010). Die endogene Expression von Mon1a und Ccz1 und somit die Erhöhung der intrazellulären GEF-Konzentration führte zu geringeren Rab7:GDI-Komplexkonzentration, während die Inhibition der Membranrekrutierung des GEFs durch Expression einer Rab5-Bindungsmutante von Mon1 oder Expression von Rab5 S34N zu einer deutlichen Erhöhung der Rab7:GDI-Komplexkonzentration führte (Kinchen und Ravichandran, 2010).

Die Lokalisation der Nukleotidaustauschfaktoren scheint somit in vielen Fällen für die Lokalisation von Rab-Proteinen essentiell, und die in dieser Arbeit gezeigten Experimente demonstrieren, dass dies auf den Nukleotidaustausch zu GTP und die damit verbundene Verringerung der Affinität für GDI zurückzuführen ist. Diese Relevanz des Nukleotidaustauschs zeigt sich auch bei der Assoziation von Rab5 mit Membranen von permeabilisierten Zellen nach Inkubation mit einem Rab5:GDI-Komplex, da in Anwesenheit von 1 mM GDP die Membranassoziation von Rab5 deutlich eingeschränkt ist (Ullrich *et al.*, 1994). Auch die Lokalisation

von Rab9, aus einem Rab9:GDI-Komplex, an endosomalen Membranen scheint ohne Nukleotidaustausch trotz der potenziellen Anwesenheit von Yip3/PRA1 nicht möglich, da ein Überschuss GDP die Rekrutierung in einem *in vitro* Assay inhibierte (Soldati *et al.*, 1994).

Aus thermodynamischer Sicht zeigen die in dieser Arbeit ermittelten Daten, dass jeder Nukleotidaustauschfaktor die Dissoziation des Rab:GDI-Komplexes durch Nukleotidaustausch zu GTP bewirken kann. Dies bedeutet, dass die korrekte Lokalisation der Rab-Proteine innerhalb der Zelle prinzipiell durch die Lokalisation der GEF-Proteine gesteuert werden kann, da der Nukleotidaustausch zu GTP die Membranextraktion durch GDI verhindert. Die große Anzahl der relativ spezifischen Nukleotidaustauschfaktoren, die eine feste intrazelluläre Lokalisation aufweisen, könnte die korrekte Lokalisation der Rab-Proteine ermöglichen.

Obwohl die oben beschriebenen *in vivo* Daten aus der Literatur zeigen, dass die korrekte Lokalisation der Nukleotidaustauschfaktoren in vielen Fällen für die Membranrekrutierung der Rab-Proteine essentiell ist, muss dies nicht in allen Fällen bedeuten, dass eine korrekte Lokalisation des GEF-Proteins und der Nukleotidaustausch zu GTP hinreichend für die Rekrutierung des Rab-Proteins ist. *In vivo* Studien mit Rab27 zeigen, dass durch die spezifische Mutation von Bindungsstellen, die die Interaktion mit dem Nukleotidaustauschfaktor Rab3GEP nicht verändern, die Lokalisation von Rab27 durch Rab3GEP inhibiert werden kann (Tarafter *et al.*, 2011). Obwohl auch in dieser Veröffentlichung gezeigt wurde, dass der Nukleotidaustausch essentiell für die Lokalisation von Rab27 ist, zeigt das Ergebnis deutlich, dass andere Faktoren die Zugänglichkeit der Rab-Proteine für den Nukleotidaustausch und somit die Lokalisation beeinflussen können. Der Nukleotidaustausch mit den in dieser Arbeit untersuchten GEF-Proteinen erfolgte ausschließlich nach Dissoziation der Rab-Proteine von GDI. Aufgrund der relativ variablen Dissoziationsgeschwindigkeiten muss die Interaktion von Rab und GDI in der Zelle vermutlich durch mehrere Modifikationen individuell reguliert werden, so dass die Menge der Rab-Proteine, die für die Aktivierung zur Verfügung steht, je nach Situation variiert werden kann. Diese Modifikationen wären ebenso wie der Nukleotidaustausch für die Membranlokalisation von Rab-Proteinen essentiell. Sofern die Modifikation allerdings im Cytoplasma erfolgt, beeinflusst sie nicht die Lokalisation der Rab-Proteine an einer spezifischen Zielmembran. Diese Zielmembran würde dann durch den Nukleotidaustauschfaktor definiert. Neben einer cytoplasmatischen Modifikation wäre auch eine membranständige Modifikationsaktivität für Rab-Proteine zur Verringerung der Rab:GDI-Affinität, wie sie in dieser Arbeit für DrrA demonstriert werden konnte, denkbar. Dieser Mechanismus würde

ebenfalls die Lokalisation von Rab-Proteinen an einer speziellen Membran bewirken. Ob andere Proteine wie z.B. Yip3/PRA1, ähnlich wie DrrA eine membranspezifische Modifikation der Rab-Proteine bewirken und so neben dem Nukleotidaustausch als weitere Faktoren die intrazelluläre Lokalisation von Rab-Proteinen beeinflussen können, sollte in Zukunft näher untersucht werden.

6 Literatur**Alexandrov, K., Horiuchi, H., Steelemortimer, O., Seabra, M.C. und Zerial, M. (1994)**

Rab escort protein-1 is a multifunctional protein that accompanies newly prenylated Rab proteins to their target membranes. *EMBO J.* 13, 5262-5273.

Allaire, P.D., Marat, A.L., Dall'Armi, C., Di Paolo, G., McPherson, P.S. und Ritter, B. (2010)

The Connecdenn DENN Domain: A GEF for Rab35 Mediating Cargo-Specific Exit from Early Endosomes. *Mol. Cell* 37, 370-382.

Allan, B.B., Moyer, B.D. und Balch, W.E. (2000)

Rab1 recruitment of p115 into a *cis*-SNARE complex: programming budding COPII vesicles for fusion. *Science* 289, 444-448.

Alory, C. und Balch, W.E. (2003)

Molecular evolution of the Rab-escort-protein/guanine-nucleotide-dissociation-inhibitor superfamily. *Mol. Biol. Cell* 14, 3857-3867.

Altmann, R. (1890)

Die Elementarorganismen und ihre Beziehungen zu den Zellen. *Veit und Comp., Leipzig.*

Andres, D.A., Seabra, M.C., Brown, M.S., Armstrong, S.A., Smeland, T.E., Cremers, F.P.M. und Goldstein, J.L. (1993)

cDNA cloning of component A of Rab geranylgeranyl transferase and demonstration of its role as a Rab escort protein. *Cell* 73, 1091-1099.

Ang, A.L., Folsch, H., Koivisto, U.M., Pypaert, M. und Mellman, I. (2003)

The Rab8 GTPase selectively regulates AP-1B-dependent basolateral transport in polarized Madin Darby canine kidney cells. *J. Cell Biol.* 163, 339-350.

Araki, S., Kikuchi, A., Hata, Y., Isomura, M. und Takai, Y. (1990)

Regulation of reversible binding of *smg* p25A, a *ras* p21-like GTP-binding protein, to synaptic plasma-membranes and vesicles by its specific regulatory protein, GDP dissociation inhibitor. *J. Biol. Chem.* 265, 13007-13015.

Bailly, E., Mccaffrey, M., Touchot, N., Zahraoui, A., Goud, B. und Bornens, M. (1991)

Phosphorylation of two small GTP-binding proteins of the Rab family by p34^{cdc2}. *Nature* 350, 715-718.

Baker, D., Wuestehube, L., Schekman, R., Botstein, D. und Segev, N. (1990)

GTP-binding Ypt1 protein and Ca-2+ function independently in a cell-free protein transport reaction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 355-359.

Balch, W.E. und Chen, C.Y. (2006)

The Hsp90 chaperone complex regulates GDI-dependent Rab recycling. *Mol. Biol. Cell* 17, 3494-3507.

Barrowman, J., Wang, W., Zhang, Y.Y. und Ferro-Novick, S. (2003)

The Yip1p-Yif1p complex is required for the fusion competence of endoplasmic reticulum-derived vesicles. *J. Biol. Chem.* 278, 19878-19884.

Beard, M., Satoh, A., Shorter, J. und Warren, G. (2005)

A cryptic Rab1-binding site in the p115 tethering protein. *J. Biol. Chem.* 280, 25840-25848.

Bonifacino, J.S. und Glick, B.S. (2004)

The mechanisms of vesicle budding and fusion. *Cell* 116, 153-166.

Bourne, H.R., Sanders, D.A. und McCormick, F. (1991)

The GTPase superfamily - conserved structure and molecular mechanism. *Nature* 349, 117-127.

Bradford, M.M. (1976)

Rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.

Brenner, D.J., Steigerwalt, A.G. und McDade, J.E. (1979)

Classification of the Legionnaires' disease bacterium - *Legionella pneumophila*, genus novum, species nova, of the family *Legionellaceae*, familia nova. *Ann. Intern. Med.* 90, 656-658.

Brombacher, E., Urwyler, S., Ragaz, C., Weber, S.S., Kami, K., Overduin, M. und Hilbi, H. (2009)

Rab1 guanine nucleotide exchange factor SidM is a major phosphatidylinositol 4-phosphate-binding effector protein of *Legionella pneumophila*. *J. Biol. Chem.* 284, 4846-4856.

Brondyk, W.H., McKiernan, C.J., Fortner, K.A., Stabila, P., Holz, R.W. und Macara, I.G. (1995)

Interaction cloning of Rabin3, a novel protein that associates with the Ras-Like GTPase Rab3a. *Mol. Cell. Biol.* 15, 1137-1143.

Brown, R. (1833)

On the organs and mode of fecundation in orchidae and asclepiadea. *Trans. Linnean Soc. Lond.* 16, 685-742.

Bucci, C., Parton, R.G., Mather, I.H., Stunnenberg, H., Simons, K., Hoflack, B. und Zerial, M. (1992)

The small GTPase Rab5 functions as a regulatory factor in the early endocytic pathway. *Cell* 70, 715-728.

Cai, H.Q., Zhang, Y.Y., Pypaert, M., Walker, L. und Ferro-Novick, S. (2005)

Mutants in trs120 disrupt traffic from the early endosome to the late Golgi. *J. Cell Biol.* 171, 823-833.

Cai, Y.Y., Chin, H.F., Lazarova, D., Menon, S., Fu, C.M., Cai, H.Q., Sclafani, A., Rodgers, D.W., De La Cruz, E.M., Ferro-Novick, S. und Reinisch, K.M. (2008)

The structural basis for activation of the Rab Ypt1p by the TRAPP membrane-tethering complexes. *Cell* 133, 1202-1213.

Calero, M., Chen, C.Z., Zhu, W.Y., Winand, N., Havas, K.A., Gilbert, P.M., Burd, C.G. und Collins, R.N. (2003)

Dual prenylation is required for Rab protein localization and function. *Mol. Biol. Cell* 14, 1852-1867.

Calero, M. und Collins, R.N. (2002)

Saccharomyces cerevisiae Pra1p/Yip3p interacts with Yip1p and Rab proteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 290, 676-681.

Calero, M., Winand, N.J. und Collins, R.N. (2002)

Identification of the novel proteins Yip4p and Yip5p as Rab GTPase interacting factors. *FEBS Lett.* 515, 89-98.

Cavalli, V., Vilbois, F., Corti, M., Marcote, M.J., Tamura, K., Karin, M., Arkinstall, S. und Gruenberg, J. (2001)

The stress-induced MAP kinase p38 regulates endocytic trafficking via the GDI:Rab5 complex. *Mol. Cell* 7, 421-432.

Chavrier, P., Parton, R.G., Hauri, H.P., Simons, K. und Zerial, M. (1990)

Localization of low molecular weight GTP binding-proteins to exocytic and endocytic compartments. *Cell* 62, 317-329.

Chelsky, D., Ruskin, B. und Koshland, D.E. (1985)

Methyl-esterified proteins in a mammalian cell line. *Biochemistry* 24, 6651-6658.

Chin, H.F., Cai, Y.Y., Menon, S., Ferro-Novick, S., Reinisch, K.M. und De La Cruz, E.M. (2009)

Kinetic analysis of the guanine nucleotide exchange activity of TRAPP, a multimeric Ypt1p exchange factor. *J. Mol. Biol.* 389, 275-288.

Christoforidis, S., Miaczynska, M., Ashman, K., Wilm, M., Zhao, L.Y., Yip, S.C., Waterfield, M.D., Backer, J.M. und Zerial, M. (1999)

Phosphatidylinositol-3-OH kinases are Rab5 effectors. *Nat. Cell Biol.* 1, 249-252.

Chung, C.T., Niemela, S.L. und Miller, R.H. (1989)

One-step preparation of competent *Escherichia coli* - transformation and storage of bacterial cells in the same solution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 2172-2175.

Conover, G.M., Derre, I., Vogel, J.P. und Isberg, R.R. (2003)

The *Legionella pneumophila* LidA protein: a translocated substrate of the Dot/Icm system associated with maintenance of bacterial integrity. *Mol. Microbiol.* 48, 305-321.

Delprato, A. und Lambright, D.G. (2007)

Structural basis for Rab GTPase activation by VPS9 domain exchange factors. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 14, 406-412.

Delprato, A., Merithew, E. und Lambright, D.G. (2004)

Structure, exchange determinants, and family-wide Rab specificity of the tandem helical bundle and Vps9 domains of Rabex-5. *Cell* 118, 607-617.

Derre, I. und Isberg, R.R. (2004)

Legionella pneumophila replication vacuole formation involves rapid recruitment of proteins of the early secretory system. *Infect. Immun.* 72, 3048-3053.

Derre, I. und Isberg, R.R. (2005)

LidA, a translocated substrate of the *Legionella pneumophila* type IV secretion system, interferes with the early secretory pathway. *Infect. Immun.* 73, 4370-4380.

Dobell, C. (1932)

Antony van Leeuwenhoek and his "little animals." *Harcourt, Brace and Co., New York.*

Dong, G., Medkova, M., Novick, P. und Reinisch, K.M. (2007)

A catalytic coiled-coil: structural insights into the activation of the Rab GTPase Sec4p by Sec2p. *Mol. Cell* 25, 455-462.

Dursina, B., Reents, R., Delon, C., Wu, Y.W., Kulharia, M., Thutewohl, M., Veligodsky, A., Kalinin, A., Evstifeev, V., Ciobanu, D., Szedlaczek, S.E., Waldmann, H., Goody, R.S. und Alexandrov, K. (2006)

Identification and specificity profiling of protein prenyltransferase inhibitors using new fluorescent phosphoisoprenoids. *J. Am. Chem. Soc.* 128, 2822-2835.

Eathiraj, S., Pan, X.J., Ritacco, C. und Lambright, D.G. (2005)

Structural basis of family-wide Rab GTPase recognition by Rabenosyn-5. *Nature* 436, 415-419.

Esters, H., Alexandrov, K., Iakovenko, A., Ivanova, T., Thoma, N., Rybin, V., Zerial, M., Scheidig, A.J. und Goody, R.S. (2001)

Vps9, Rabex-5 and DSS4: proteins with weak but distinct nucleotide-exchange activities for Rab proteins. *J. Mol. Biol.* 310, 141-156.

Farnsworth, C.C., Kawata, M., Yoshida, Y., Takai, Y., Gelb, M.H. und Glomset, J.A. (1991)

C terminus of the small GTP-binding protein *smg* p25A contains two geranylgeranylated cysteine residues and a methyl ester. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 6196-6200.

Farnsworth, C.C., Seabra, M.C., Ericsson, L.H., Gelb, M.H. und Glomset, J.A. (1994)

Rab geranylgeranyl transferase catalyzes the geranylgeranylation of adjacent cysteines in the small GTPases Rab1a, Rab3a, and Rab5a. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 11963-11967.

Farquhar, M.G. und Palade, G.E. (1998)

The Golgi apparatus: 100 years of progress and controversy. *Trends Cell Biol.* 8, 2-10.

Figueiredo, A.C., Wasmeier, C., Tarafder, A.K., Ramalho, J.S., Baron, R.A. und Seabra, M.C. (2008)

Rab3GEP is the non-redundant guanine nucleotide exchange factor for Rab27a in melanocytes. *J. Biol. Chem.* 283, 23209-23216.

Fischer, J., Weide, T. und Barnekow, A. (2005)

The MICAL proteins and Rab1: a possible link to the cytoskeleton? *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 328, 415-423.

Fitzgerald, M.L. und Reed, G.L. (1999)

Rab6 is phosphorylated in thrombin-activated platelets by a protein kinase C-dependent mechanism: effects on GTP/GDP binding and cellular distribution. *Biochem. J.* 342, 353-360.

Fliermans, C.B., Cherry, W.B., Orrison, L.H. und Thacker, L. (1979)

Isolation of *Legionella pneumophila* from nonepidemic-related aquatic habitats. *Appl. Environ. Microbiol.* 37, 1239-1242.

Fukuda, M. (2011)

TBC proteins: GAPs for mammalian small GTPase Rab? *Bioscience Rep.* 31, 159-168.

Fukui, K., Sasaki, T., Imazumi, K., Matsuura, Y., Nakanishi, H. und Takai, Y. (1997)

Isolation and characterization of a GTPase activating protein specific for the Rab3 subfamily of small G proteins. *J. Biol. Chem.* 272, 4655-4658.

Gillingham, A.K. und Munro, S. (2003)

Long coiled-coil proteins and membrane traffic. *Biochim. Biophys. Acta: Mol. Cell Res.* 1641, 71-85.

Gomes, A.Q., Ali, B.R., Ramalho, J.S., Godfrey, R.F., Barral, D.C., Hume, A.N. und Seabra, M.C. (2003)

Membrane targeting of Rab GTPases is influenced by the prenylation motif. *Mol. Biol. Cell* 14, 1882-1899.

Goody, R.S. und Hofmann-Goody, W. (2002)

Exchange factors, effectors, GAPs and motor proteins: common thermodynamic and kinetic principles for different functions. *Eur. Biophys. J.* 31, 268-274.

Grigoriev, I., Yu, K.L., Martinez-Sanchez, E., Serra-Marques, A., Smal, I., Meijering, E., Demmers, J., Peranen, J., Pasterkamp, R.J., van der Sluijs, P., Hoogenraad, C.C. und Akhmanova, A. (2011)

Rab6, Rab8, and MICAL3 cooperate in controlling docking and fusion of exocytotic carriers. *Curr. Biol.* 21, 967-974.

Grosshans, B.L., Andreeva, A., Gangar, A., Niessen, S., Yates, J.R., Brennwald, P. und Novick, P. (2006a)

The yeast Igl family member Sro7p is an effector of the secretory Rab GTPase Sec4p. *J. Cell Biol.* 172, 55-66.

Grosshans, B.L., Ortiz, D. und Novick, P. (2006b)

Rabs and their effectors: achieving specificity in membrane traffic. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103, 11821-11827.

Guo, W., Roth, D., Walch-Solimena, C. und Novick, P. (1999)

The exocyst is an effector for Sec4p, targeting secretory vesicles to sites of exocytosis. *EMBO J.* 18, 1071-1080.

Hadano, S., Otomo, A., Suzuki-Utsunomiya, K., Kunita, R., Yanagisawa, Y., Showguchi-Miyata, J., Mizumura, H. und Ikeda, J.E. (2004)

ALS2CL, the novel protein highly homologous to the carboxy-terminal half of ALS2, binds to Rab5 and modulates endosome dynamics. *FEBS Lett.* 575, 64-70.

Hall, A. (1990)

The cellular functions of small GTP-binding proteins. *Science* 249, 635-640.

Hama, H., Tall, G.G. und Horazdovsky, B.F. (1999)

Vps9p is a guanine nucleotide exchange factor involved in vesicle-mediated vacuolar protein transport. *J. Biol. Chem.* 274, 15284-15291.

Hattula, K., Furuholm, J., Arffman, A. und Peranen, J. (2002)

A Rab8-specific GDP/GTP exchange factor is involved in actin remodeling and polarized membrane transport. *Mol. Biol. Cell* 13, 3268-3280.

Heidtman, M., Chen, E.J., Moy, M.Y. und Isberg, R.R. (2009)

Large-scale identification of *Legionella pneumophila* Dot/Icm substrates that modulate host cell vesicle trafficking pathways. *Cell. Microbiol.* 11, 230-248.

Henry, L. und Sheff, D.R. (2008)

Rab8 regulates basolateral secretory, but not recycling, traffic at the recycling endosome. *Mol. Biol. Cell* 19, 2059-2068.

Herrmann, C., Martin, G.A. und Wittinghofer, A. (1995)

Quantitative analysis of the complex between p21(Ras) and the Ras-Binding domain of the human Raf-1 protein kinase. *J. Biol. Chem.* 270, 2901-2905.

Hooke, R. (1665)

Micrographia: or some physiological descriptions of minute bodies made by magnifying glasses with observations and inquiries thereupon. *Jo, Martyn and Ja. Allestry, Printers to the Royal Society, London.*

Horiuchi, H., Lippe, R., McBride, H.M., Rubino, M., Woodman, P., Stenmark, H., Rybin, V., Wilm, M., Ashman, K., Mann, M. und Zerial, M. (1997)

A novel Rab5 GDP/GTP exchange factor complexed to Rabaptin-5 links nucleotide exchange to effector recruitment and function. *Cell* 90, 1149-1159.

Horwitz, J.P., Klundt, I., Darooge, M.A., Curby, R.J., Fisher, B.E., Mauricio, J., Tomson, A.J. und Chua, J. (1964)

Substrates for cytochemical demonstration of enzyme activity. I. Some substituted 3-indolyl-beta-D-glycopyranosides. *J. Med. Chem.* 7, 574-575.

Horwitz, M.A. (1983a)

Formation of a novel phagosome by the Legionnaires' disease bacterium (*Legionella pneumophila*) in human monocytes. *J. Exp. Med.* 158, 1319-1331.

Horwitz, M.A. (1983b)

The Legionnaires' disease bacterium (*Legionella pneumophila*) inhibits phagosome-lysosome fusion in human monocytes. *J. Exp. Med.* 158, 2108-2126.

Huber, L.A., Dehoop, M.J., Dupree, P., Zerial, M., Simons, K. und Dotti, C. (1993a)

Protein transport to the dendritic plasma membrane of cultured neurons is regulated by Rab8p. *J. Cell Biol.* 123, 47-55.

Huber, L.A., Pimplikar, S., Parton, R.G., Virta, H., Zerial, M. und Simons, K. (1993b)

Rab8, a small GTPase involved in vesicular traffic between the TGN and the basolateral plasma membrane. *J. Cell Biol.* 123, 35-45.

Hunker, C.M., Galvis, A., Kruk, I., Giambini, H., Veisaga, M.L. und Barbieri, M.A. (2006)

Rab5-activating protein 6, a novel endosomal protein with a role in endocytosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 340, 967-975.

Hutagalung, A.H. und Novick, P.J. (2011)

Role of Rab GTPases in membrane traffic and cell physiology. *Physiol. Rev.* 91, 119-149.

Hutt, D.M., Da-Silva, L.F., Chang, L.H., Prosser, D.C. und Ngsee, J.K. (2000)

PRA1 inhibits the extraction of membrane-bound Rab GTPase by GDI1. *J. Biol. Chem.* 275, 18511-18519.

Ignatev, A., Kravchenko, S., Rak, A., Goody, R.S. und Pylypenko, O. (2008)

A structural model of the GDP dissociation inhibitor Rab membrane extraction mechanism. *J. Biol. Chem.* 283, 18377-18384.

Ingmundson, A., Delprato, A., Lambright, D.G. und Roy, C.R. (2007)

Legionella pneumophila proteins that regulate Rab1 membrane cycling. *Nature* 450, 365-369.

Itzen, A., Rak, A. und Goody, R.S. (2007)

Sec2 is a highly efficient exchange factor for the Rab protein Sec4. *J. Mol. Biol.* 365, 1359-1367.

Jamieson, J.D. und Palade, G.E. (1967)

Intracellular transport of secretory proteins in pancreatic exocrine cell. I. Role of peripheral elements of the Golgi complex. *J. Cell Biol.* 34, 577-596.

Janoueix-Lerosey, I., Jollivet, F., Camonis, J., Marche, P.N. und Goud, B. (1995)

Two-hybrid system screen with the small GTP-binding protein Rab6. Identification of a novel mouse GDP dissociation inhibitor isoform and two other potential partners of Rab6. *J. Biol. Chem.* 270, 14801-14808.

Joberty, G., Tavitian, A. und Zahraoui, A. (1993)

Isoprenylation of Rab proteins possessing a C-terminal CaaX motif. *FEBS Lett.* 330, 323-328.

John, J., Sohmen, R., Feuerstein, J., Linke, R., Wittinghofer, A. und Goody, R.S. (1990)

Kinetics of interaction of nucleotides with nucleotide-free H-ras p21. *Biochemistry* 29, 6058-6065.

Jones, S., Newman, C., Liu, F.L. und Segev, N. (2000)

The TRAPP complex is a nucleotide exchanger for Ypt1 and Ypt31/32. *Mol. Biol. Cell* 11, 4403-4411.

Kagan, J.C., Stein, M.P., Pypaert, M. und Roy, C.R. (2004)

Legionella subvert the functions of Rab1 and Sec22b to create a replicative organelle. *J. Exp. Med.* 199, 1201-1211.

Kajiho, H., Saito, K., Tsujita, K., Kontani, K., Araki, Y., Kurosu, H. und Katada, T. (2003)

RIN3: a novel Rab5 GEF interacting with amphiphysin II involved in the early endocytic pathway. *J. Cell Sci.* 116, 4159-4168.

Kalinin, A., Thoma, N.H., Iakovenko, A., Heinemann, I., Rostkova, E., Constantinescu, A.T. und Alexandrov, K. (2001)

Expression of mammalian geranylgeranyltransferase type-II in *Escherichia coli* and its application for *in vitro* prenylation of Rab proteins. *Protein Expression Purif.* 22, 84-91.

Kanno, E., Ishibashi, K., Kobayashi, H., Matsui, T., Ohbayashi, N. und Fukuda, M. (2010)

Comprehensive screening for novel Rab-binding proteins by GST pull-down assay using 60 different mammalian Rabs. *Traffic* 11, 491-507.

Khosravifar, R., Lutz, R.J., Cox, A.D., Conroy, L., Bourne, J.R., Sinensky, M., Balch, W.E., Buss, J.E. und Der, C.J. (1991)

Isoprenoid modification of Rab proteins terminating in CC or CXC motifs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 6264-6268.

Kim, Y.G., Raunser, S., Munger, C., Wagner, J., Song, Y.L., Cygler, M., Walz, T., Oh, B.H. und Sacher, M. (2006)

The architecture of the multisubunit TRAPP I complex suggests a model for vesicle tethering. *Cell* 127, 817-830.

Kinchen, J.M. und Ravichandran, K.S. (2010)

Identification of two evolutionarily conserved genes regulating processing of engulfed apoptotic cells. *Nature* 464, 778-783.

Kinsella, B.T. und Maltese, W.A. (1992)

Rab GTP-binding proteins with three different carboxyl-terminal cysteine motifs are modified *in vivo* by 20-carbon Isoprenoids. *J. Biol. Chem.* 267, 3940-3945.

Kouranti, I., Sachse, M., Arouche, N., Goud, B. und Echard, A. (2006)

Rab35 regulates an endocytic recycling pathway essential for the terminal steps of cytokinesis. *Curr. Biol.* 16, 1719-1725.

Kummel, D., Oeckinghaus, A., Wang, C.C., Krappmann, D. und Heinemann, U. (2008)

Distinct isocomplexes of the TRAPP trafficking factor coexist inside human cells. *FEBS Lett.* 582, 3729-3733.

Laemmli, U.K. (1970)

Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.

Larkin, M.A., Blackshields, G., Brown, N.P., Chenna, R., McGettigan, P.A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I.M., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J.D., Gibson, T.J. und Higgins, D.G. (2007)

Clustal W and clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 23, 2947-2948.

Lawe, D.C., Patki, V., Heller-Harrison, R., Lambright, D. und Corvera, S. (2000)

The FYVE domain of early endosome antigen 1 is required for both phosphatidylinositol 3-phosphate and Rab5 binding - critical role of this dual interaction for endosomal localization. *J. Biol. Chem.* 275, 3699-3705.

Lazar, T., Gotte, M. und Gallwitz, D. (1997)

Vesicular transport: how many Ypt/Rab-GTPases make a eukaryotic cell? *Trends Biochem. Sci.* 22, 468-472.

Leung, K.F., Baron, R., Ali, B.R., Magee, A.I. und Seabra, M.C. (2007)

Rab GTPases containing a CAAX motif are processed post-geranylgeranylation by proteolysis and methylation. *J. Biol. Chem.* 282, 1487-1497.

Leventis, R. und Silviu, J.R. (1998)

Lipid-binding characteristics of the polybasic carboxy-terminal sequence of K-ras4B. *Biochemistry* 37, 7640-7648.

Levivier, E., Goud, B., Souchet, M., Calmels, T.P.G., Mornon, J.P. und Callebaut, I. (2001)

uDENN, DENN, and dDENN: indissociable domains in Rab and MAP kinases signaling pathways. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 287, 688-695.

Liu, W.H., Yuen, E.Y. und Yan, Z. (2010)

The stress hormone corticosterone increases synaptic alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA) Receptors via serum- and glucocorticoid-inducible kinase (SGK) regulation of the GDI-Rab4 complex. *J. Biol. Chem.* 285, 6101-6108.

Lodhi, I.J., Chiang, S.H., Chang, L., Vollenweider, D., Watson, R.T., Inoue, M., Pessin, J.E. und Saltiel, A.R. (2007)

Gapex-5, a Rab31 guanine nucleotide exchange factor that regulates Glut4 trafficking in adipocytes. *Cell Metab.* 5, 59-72.

Luan, P., Balch, M.E., Emr, S.D. und Burd, C.G. (1999)

Molecular dissection of guanine nucleotide dissociation inhibitor function *in vivo* - Rab-independent binding to membranes and role of Rab recycling factors. *J. Biol. Chem.* 274, 14806-14817.

Luan, P., Heine, A., Zeng, K., Moyer, B., Greasely, S.E., Kuhn, P., Balch, W.E. und Wilson, I.A. (2000)

A new functional domain of guanine nucleotide dissociation inhibitor (alpha-GDI) involved in Rab recycling. *Traffic* 1, 270-281.

Luckow, V.A., Lee, S.C., Barry, G.F. und Olins, P.O. (1993)

Efficient generation of infectious recombinant baculoviruses by site-specific transposon-mediated insertion of foreign genes into a baculovirus genome propagated in *Escherichia coli*. *J. Virol.* 67, 4566-4579.

Luo, H.R., Saiardi, A., Nagata, E., Ye, K.Q., Yu, H.B., Jung, T.S., Luo, X.J., Jain, S., Sawa, A. und Snyder, S.H. (2001)

GRAB: a physiologic guanine nucleotide exchange factor for Rab3A, which interacts with inositol hexakisphosphate kinase. *Neuron* 31, 439-451.

Lynch-Day, M.A., Bhandari, D., Menon, S., Huang, J., Cai, H.Q., Bartholomew, C.R., Brumell, J.H., Ferro-Novick, S. und Klionsky, D.J. (2010)

Trs85 directs a Ypt1 GEF, TRAPP III, to the phagophore to promote autophagy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107, 7811-7816.

Machner, M.P. und Isberg, R.R. (2006)

Targeting of host Rab GTPase function by the intravacuolar pathogen *Legionella pneumophila*. *Dev. Cell* 11, 47-56.

Machner, M.P. und Isberg, R.R. (2007)

A bifunctional bacterial protein links GDI displacement to Rab1 activation. *Science* 318, 974-977.

Marat, A.L., Dokainish, H. und McPherson, P.S. (2011)

DENN domain proteins: regulators of Rab GTPases. *J. Biol. Chem.* 286, 13791-13800.

Marat, A.L. und McPherson, P.S. (2010)

The Connecdenn family, Rab35 guanine nucleotide exchange factors interfacing with the clathrin machinery. *J. Biol. Chem.* 285, 10627-10637.

Marsh, M. und McMahon, H.T. (1999)

Cell biology - the structural era of endocytosis. *Science* 285, 215-220.

Martin, W. und Koonin, E.V. (2006)

Introns and the origin of nucleus-cytosol compartmentalization. *Nature* 440, 41-45.

Martincic, I., Peralta, M.E. und Ngsee, J.K. (1997)

Isolation and characterization of a dual prenylated Rab and VAMP2 receptor. *J. Biol. Chem.* 272, 26991-26998.

Mattera, R. und Bonifacino, J.S. (2008)

Ubiquitin binding and conjugation regulate the recruitment of Rabex-5 to early endosomes. *EMBO J.* 27, 2484-2494.

McLauchlan, H., Newell, J., Morrice, N., Osborne, A., West, M. und Smythe, E. (1998)

A novel role for Rab5-GDI in ligand sequestration into calthrin-coated pits. *Curr. Biol.* 8, 34-45.

Milburn, M.V., Tong, L., Devos, A.M., Brunger, A., Yamaizumi, Z., Nishimura, S. und Kim, S.H. (1990)

Molecular switch for signal transduction - structural differences between active and inactive forms of protooncogenic Ras proteins. *Science* 247, 939-945.

Moores, S.L., Schaber, M.D., Mosser, S.D., Rands, E., Ohara, M.B., Garsky, V.M., Marshall, M.S., Pompiano, D.L. und Gibbs, J.B. (1991)

Sequence dependence of protein isoprenylation. *J. Biol. Chem.* 266, 14603-14610.

Morozova, N., Liang, Y.H., Tokarev, A.A., Chen, S.H., Cox, R., Andrejic, J., Lipatova, Z., Sciorra, V.A., Emr, S.D. und Segev, N. (2006)

TRAPP II subunits are required for the specificity switch of a Ypt-Rab GEF. *Nat. Cell Biol.* 8, 1263-1269.

Morris, G.K., Patton, C.M., Feeley, J.C., Johnson, S.E., Gorman, G., Martin, W.T., Skaliy, P., Mallison, G.F., Politi, B.D. und Mackel, D.C. (1979)

Isolation of the Legionnaires' disease bacterium from environmental samples. *Ann. Intern. Med.* 90, 664-666.

Moyer, B.D., Allan, B.B. und Balch, W.E. (2001)

Rab1 interaction with a GM130 effector complex regulates COPII vesicle *cis*-Golgi tethering. *Traffic* 2, 268-276.

Muller, M.P., Peters, H., Blumer, J., Blankenfeldt, W., Goody, R.S. und Itzen, A. (2010)

The *Legionella* effector protein DrrA AMPylates the membrane traffic regulator Rab1b. *Science* 329, 946-949.

Murata, T., Delprato, A., Ingmundson, A., Toomre, D.K., Lambright, D.G. und Roy, C.R. (2006)

The *Legionella pneumophila* effector protein DrrA is a Rab1 guanine nucleotide-exchange factor. *Nat. Cell Biol.* 8, 971-977.

Nachury, M.V., Loktev, A.V., Zhang, Q., Westlake, C.J., Peranen, J., Merdes, A., Slusarski, D.C., Scheller, R.H., Bazan, J.F., Sheffield, V.C. und Jackson, P.K. (2007)

A core complex of BBS proteins cooperates with the GTPase Rab8 to promote ciliary membrane biogenesis. *Cell* 129, 1201-1213.

Neunuebel, M.R., Chen, Y., Gaspar, A.H., Backlund, P.S., Yergey, A. und Machner, M.P. (2011)

De-AMPylation of the small GTPase Rab1 by the pathogen *Legionella pneumophila*. *Science* 333, 453-456.

Nielsen, E., Severin, F., Backer, J.M., Hyman, A.A. und Zerial, M. (1999)

Rab5 regulates motility of early endosomes on microtubules. *Nat. Cell Biol.* 1, 376-382.

Nordmann, M., Cabrera, M., Perz, A., Brocker, C., Ostrowicz, C., Engelbrecht-Vandre, S. und Ungermann, C. (2010)

The Mon1-Ccz1 Complex is the GEF of the late endosomal Rab7 homolog Ypt7. *Curr. Biol.* 20, 1654-1659.

Novick, P. und Garrett, M.D. (1994)

Vesicular transport - no exchange without receipt. *Nature* 369, 18-19.

Ortiz, D., Medkova, M., Walch-Solimena, C. und Novick, P. (2002)

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.

Otomo, A., Hadano, S., Okada, T., Mizumura, H., Kunita, R., Nishijima, H., Showguchi-Miyata, J., Yanagisawa, Y., Kohiki, E., Suga, E., Yasuda, M., Osuga, H., Nishimoto, T., Narumiya, S. und Ikeda, J.E. (2003)

ALS2, a novel guanine nucleotide exchange factor for the small GTPase Rab5, is implicated in endosomal dynamics. *Hum. Mol. Genet.* 12, 1671-1687.

Pan, X.J., Eathiraj, S., Munson, M. und Lambright, D.G. (2006)

TBC-domain GAPs for Rab GTPases accelerate GTP hydrolysis by a dual-finger mechanism. *Nature* 442, 303-306.

Pereira-Leal, J.B. und Seabra, M.C. (2001)

Evolution of the Rab family of small GTP-binding proteins. *J. Mol. Biol.* 313, 889-901.

Peter, M., Chavrier, P., Nigg, E.A. und Zerial, M. (1992)

Isoprenylation of Rab proteins on structurally distinct cysteine motifs. *J. Cell Sci.* 102, 857-865.

Pfeffer, S. und Aivazian, D. (2004)

Targeting Rab GTPases to distinct membrane compartments. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 5, 886-896.

Plutner, H., Cox, A.D., Pind, S., Khosravifar, R., Bourne, J.R., Schwaninger, R., Der, C.J. und Balch, W.E. (1991)

Rab1b regulates vesicular transport between the endoplasmic reticulum and successive Golgi compartments. *J. Cell Biol.* 115, 31-43.

Pylypenko, O., Rak, A., Durek, T., Kushnir, S., Dursina, B.E., Thomae, N.H., Constantinescu, A.T., Brunsveld, L., Watzke, A., Waldmann, H., Goody, R.S. und Alexandrov, K. (2006)

Structure of doubly prenylated Ypt1 : GDI complex and the mechanism of GDI-mediated Rab recycling. *EMBO J.* 25, 13-23.

Pylypenko, O., Rak, A., Reents, R., Niculae, A., Sidorovitch, V., Vioaca, M.D., Bessolitsyna, E., Thoma, N.H., Waldmann, H., Schlichting, I., Goody, R.S. und Alexandrov, K. (2003)

Structure of Rab escort protein-1 in complex with Rab geranylgeranyltransferase. *Mol. Cell* 11, 483-494.

Rak, A., Pylypenko, O., Niculae, A., Pyatkov, K., Goody, R.S. und Alexandrov, K. (2004)

Structure of the Rab7 : REP-1 complex: Insights into the mechanism of rab prenylation and choroideremia disease. *Cell* 117, 749-760.

Regazzi, R., Kikuchi, A., Takai, Y. und Wollheim, C.B. (1992)

The small GTP-binding proteins in the cytosol of insulin-secreting cells are complexed to GDP dissociation inhibitor proteins. *J. Biol. Chem.* 267, 17512-17519.

Reid, T.S., Terry, K.L., Casey, P.J. und Beese, L.S. (2004)

Crystallographic analysis of CaaX prenyltransferases complexed with substrates defines rules of protein substrate selectivity. *J. Mol. Biol.* 343, 417-433.

Rieder, S.E. und Emr, S.D. (1997)

A novel RING finger protein complex essential for a late step in protein transport to the yeast vacuole. *Mol. Biol. Cell* 8, 2307-2327.

Rittinger, K., Walker, P.A., Eccleston, J.F., Smerdon, S.J. und Gamblin, S.J. (1997)

Structure at 1.65 Å of RhoA and its GTPase-activating protein in complex with a transition-state analogue. *Nature* 389, 758-762.

Roland, J.T., Kenworthy, A.K., Peranen, J., Caplan, S. und Goldenring, J.R. (2007)

Myosin Vb interacts with Rab8a on a tubular network containing EHD1 and EHD3. *Mol. Biol. Cell* 18, 2828-2837.

Rowbotham, T.J. (1980)

Preliminary report on the pathogenicity of *Legionella pneumophila* for freshwater and soil amoebae. *J. Clin. Pathol.* 33, 1179-1183.

Rowbotham, T.J. (1983)

Isolation of *Legionella pneumophila* from clinical specimens via amoebae, and the interaction of those and other isolates with amoebae. *J. Clin. Pathol.* 36, 978-986.

Roy, M.O., Leventis, R. und Silvius, J.R. (2000)

Mutational and biochemical analysis of plasma membrane targeting mediated by the farnesylated, polybasic carboxy terminus of K-ras4B. *Biochemistry* 39, 8298-8307.

Sacher, M., Barrowman, J., Wang, W., Horecka, J., Zhang, Y.Y., Pypaert, M. und Ferro-Novick, S. (2001)

TRAPP I implicated in the specificity of tethering in ER-to-Golgi transport. *Mol. Cell* 7, 433-442.

Sahlender, D.A., Roberts, R.C., Arden, S.D., Spudich, G., Taylor, M.J., Luzio, J.P., Kendrick-Jones, J. und Buss, F. (2005)

Optineurin links myosin VI to the Golgi complex and is involved in Golgi organization and exocytosis. *J. Cell Biol.* 169, 285-295.

Saito, K., Murai, J., Kajiho, H., Kontani, K., Kurosu, H. und Katada, T. (2002)

A novel binding protein composed of homophilic tetramer exhibits unique properties for the small GTPase Rab5. *J. Biol. Chem.* 277, 3412-3418.

Sakisaka, T., Meerlo, T., Matteson, J., Plutner, H. und Balch, W.E. (2002)

Rab-alpha GDI activity is regulated by a Hsp90 chaperone complex. *EMBO J.* 21, 6125-6135.

Sanger, F., Nicklen, S. und Coulson, A.R. (1977)

DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 5463-5467.

Saraste, M., Sibbald, P.R. und Wittinghofer, A. (1990)

The P-loop - a common motif in ATP- and GTP-binding proteins. *Trends Biochem. Sci.* 15, 430-434.

Sasaki, T., Kikuchi, A., Araki, S., Hata, Y., Isomura, M., Kuroda, S. und Takai, Y. (1990)

Purification and characterization from bovine brain cytosol of a protein that inhibits the dissociation of GDP from and the subsequent binding of GTP to *smg* p25A, a *ras* p21-like GTP-binding protein. *J. Biol. Chem.* 265, 2333-2337.

Sato, K., Sato, M., Liou, W., Pant, S., Harada, A. und Grant, B.D. (2008)

Regulation of endocytic recycling by *C. elegans* Rab35 and its regulator RME-4, a coated-pit protein. *EMBO J.* 27, 1183-1196.

Sato, M., Sato, K., Fonarev, P., Huang, C.J., Liou, W. und Grant, B.D. (2005)

Caenorhabditis elegans RME-6 is a novel regulator of RAB-5 at the clathrin-coated pit. *Nat. Cell Biol.* 7, 559-569.

Satoh, A., Wang, Y., Malsam, J., Beard, M.B. und Warren, G. (2003)

Golgin-84 is a Rab1 binding partner involved in Golgi structure. *Traffic* 4, 153-161.

Schalk, I., Zeng, K., Wu, S.K., Stura, E.A., Matteson, J., Huang, M.D., Tandon, A., Wilson, I.A. und Balch, W.E. (1996)

Structure and mutational analysis of Rab GDP-dissociation inhibitor. *Nature* 381, 42-48.

Scheffzek, K., Ahmadian, M.R., Kabsch, W., Wiesmuller, L., Lautwein, A., Schmitz, F. und Wittinghofer, A. (1997)

The Ras-RasGAP complex: structural basis for GTPase activation and its loss in oncogenic Ras mutants. *Science* 277, 333-338.

Schoebel, S., Blankenfeldt, W., Goody, R.S. und Itzen, A. (2010)

High-affinity binding of phosphatidylinositol 4-phosphate by *Legionella pneumophila* DrrA. *EMBO Rep.* 11, 598-604.

Schoebel, S., Oesterlin, L.K., Blankenfeldt, W., Goody, R.S. und Itzen, A. (2009)

RabGDI displacement by DrrA from *Legionella* is a consequence of its guanine nucleotide exchange activity. *Mol. Cell* 36, 1060-1072.

Sclafani, A., Chen, S.L., Rivera-Molina, F., Reinisch, K., Novick, P. und Ferro-Novick, S. (2010)

Establishing a role for the GTPase Ypt1p at the late Golgi. *Traffic* 11, 520-532.

Seabra, M.C., Brown, M.S., Slaughter, C.A., Sudhof, T.C. und Goldstein, J.L. (1992a)

Purification of component A of Rab geranylgeranyl transferase - possible identity with the choroideremia gene product. *Cell* 70, 1049-1057.

Seabra, M.C., Goldstein, J.L., Sudhof, T.C. und Brown, M.S. (1992b)

Rab geranylgeranyl transferase - a multisubunit enzyme that prenylates GTP-binding proteins terminating in Cys-X-Cys or Cys-Cys. *J. Biol. Chem.* 267, 14497-14503.

Semerdjieva, S., Shortt, B., Maxwell, E., Singh, S., Fonarev, P., Hansen, J., Schiavo, G., Grant, B.D. und Smythe, E. (2008)

Coordinated regulation of AP2 uncoating from clathrin-coated vesicles by Rab5 and hRME-6. *J. Cell Biol.* 183, 499-511.

Shapiro, A.D. und Pfeffer, S.R. (1995)

Quantitative analysis of the interactions between prenyl Rab9, GDP dissociation inhibitor-Alpha, and guanine nucleotides. *J. Biol. Chem.* 270, 11085-11090.

Shisheva, A., Chinni, S.R. und DeMarco, C. (1999)

General role of GDP dissociation inhibitor 2 in membrane release of Rab proteins: Modulations of its functional interactions by *in vitro* and *in vivo* structural modifications. *Biochemistry* 38, 11711-11721.

Shorter, J., Beard, M.B., Seemann, J., Dirac-Svejstrup, A.B. und Warren, G. (2002)

Sequential tethering of Golgins and catalysis of SNAREpin assembly by the vesicle-tethering protein p115. *J. Cell Biol.* 157, 45-62.

Simon, I., Zerial, M. und Goody, R.S. (1996)

Kinetics of interaction of Rab5 and Rab7 with nucleotides and magnesium ions. *J. Biol. Chem.* 271, 20470-20478.

Siniooglou, S., Peak-Chew, S.Y. und Pelham, H.R.B. (2000)

Ric1p and Rgp1p form a complex that catalyses nucleotide exchange on Ypt6p. *EMBO J.* 19, 4885-4894.

Sivars, U., Aivazian, D. und Pfeffer, S.R. (2003)

Yip3 catalyses the dissociation of endosomal Rab-GDI complexes. *Nature* 425, 856-859.

Smeland, T.E., Seabra, M.C., Goldstein, J.L. und Brown, M.S. (1994)

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. USA* 91, 10712-10716.

Soldati, T., Riederer, M.A. und Pfeffer, S.R. (1993)

Rab GDI: a solubilizing and recycling factor for Rab9 protein. *Mol. Biol. Cell* 4, 425-434.

Soldati, T., Shapiro, A.D., Svejstrup, A.B.D. und Pfeffer, S.R. (1994)

Membrane targeting of the small GTPase Rab9 is accompanied by nucleotide exchange. *Nature* 369, 76-78.

Sonnichsen, B., Lowe, M., Levine, T., Jamsa, E., Dirac-Svejstrup, B. und Warren, G. (1998)

Role for giantin in docking COPI vesicles to Golgi membranes. *J. Cell Biol.* 140, 1013-1021.

Steele-Mortimer, O., Gruenberg, J. und Clague, M.J. (1993)

Phosphorylation of GDI and membrane cycling of Rab proteins. *FEBS Lett.* 329, 313-318.

Stenmark, H. (2009)

Rab GTPases as coordinators of vesicle traffic. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 10, 513-525.

Stroupe, C. und Brunger, A.T. (2000)

Crystal structures of a Rab protein in its inactive and active conformations. *J. Mol. Biol.* 304, 585-598.

Studier, F.W. und Moffatt, B.A. (1986)

Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J. Mol. Biol.* 189, 113-130.

Sun, Y., Bilan, P.J., Liu, Z. und Klip, A. (2010)

Rab8A and Rab13 are activated by insulin and regulate GLUT4 translocation in muscle cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107, 19909-19914.

Takai, Y., Sasaki, T. und Matozaki, T. (2001)

Small GTP-binding proteins. *Physiol. Rev.* 81, 153-208.

Tall, G.G., Barbieri, M.A., Stahl, P.D. und Horazdovsky, B.F. (2001)

Ras-activated endocytosis is mediated by the Rab5 guanine nucleotide exchange activity of RIN1. *Dev. Cell* 1, 73-82.

Tan, Y. und Luo, Z.Q. (2011)

Legionella pneumophila SidD is a deAMPyase that modifies Rab1. *Nature* 475, 506-509.

Tarafder, A.K., Wasmeier, C., Figueiredo, A.C., Booth, A.E.G., Orihara, A., Ramalho, J.S., Hume, A.N. und Seabra, M.C. (2011)

Rab27a targeting to melanosomes requires nucleotide exchange but not effector binding. *Traffic* 12, 1056-1066.

Terai, T., Nishimura, N., Kanda, I., Yasui, N. und Sasaki, T. (2006)

JRAB/MICAL-L2 is a junctional Rab13-binding protein mediating the endocytic recycling of occludin. *Mol. Biol. Cell* 17, 2465-2475.

Trahey, M. und McCormick, F. (1987)

A cytoplasmic protein stimulates normal N-ras p21 GTPase, but does not affect oncogenic mutants. *Science* 238, 542-545.

Ullrich, O., Horiuchi, H., Bucci, C. und Zerial, M. (1994)

Membrane association of Rab5 mediated by GDP-dissociation inhibitor and accompanied by GDP/GTP exchange. *Nature* 368, 157-160.

Ullrich, O., Stenmark, H., Alexandrov, K., Huber, L.A., Kaibuchi, K., Sasaki, T., Takai, Y. und Zerial, M. (1993)

Rab GDP dissociation inhibitor as a general regulator for the membrane association of Rab proteins. *J. Biol. Chem.* 268, 18143-18150.

Urwyler, S., Nyfeler, Y., Ragaz, C., Lee, H., Mueller, L.N., Aebersold, R. und Hilbi, H. (2009)

Proteome analysis of *Legionella* vacuoles purified by magnetic immunoseparation reveals secretory and endosomal GTPases. *Traffic* 10, 76-87.

van der Sluijs, P., Hull, M., Huber, L.A., Male, P., Goud, B. und Mellman, I. (1992)

Reversible phosphorylation - dephosphorylation determines the localization of Rab4 during the cell cycle. *EMBO J.* 11, 4379-4389.

van Meer, G., Voelker, D.R. und Feigenson, G.W. (2008)

Membrane lipids: where they are and how they behave. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9, 112-124.

Vandyke, K., Robinson, R., Urquilla, P., Smith, D., Taylor, M., Trush, M. und Wilson, M. (1977)

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.

Vetter, I.R. und Wittinghofer, A. (2001)

Signal transduction - the guanine nucleotide-binding switch in three dimensions. *Science* 294, 1299-1304.

Vogel, J.P., Andrews, H.L., Wong, S.K. und Isberg, R.R. (1998)

Conjugative transfer by the virulence system of *Legionella pneumophila*. *Science* 279, 873-876.

Wada, M., Nakanishi, H., Satoh, A., Hirano, H., Obaishi, H., Matsuura, Y. und Takai, Y. (1997)

Isolation and characterization of a GDP/GTP exchange protein specific for the Rab3 subfamily small G proteins. *J. Biol. Chem.* 272, 3875-3878.

Walch-Solimena, C., Collins, R.N. und Novick, P.J. (1997)

Sec2p mediates nucleotide exchange on Sec4p and is involved in polarized delivery of post-Golgi vesicles. *J. Cell Biol.* 137, 1495-1509.

Walker, J.E., Saraste, M., Runswick, M.J. und Gay, N.J. (1982)

Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *EMBO J.* 1, 945-951.

Wang, W. und Ferro-Novick, S. (2002)

A Ypt32p exchange factor is a putative effector of Ypt1p. *Mol. Biol. Cell* 13, 3336-3343.

Wang, W., Sacher, M. und Ferro-Novick, S. (2000)

TRAPP stimulates guanine nucleotide exchange on Ypt1p. *J. Cell Biol.* 151, 289-295.

Weide, T., Bayer, M., Koster, M., Siebrasse, J.P., Peters, R. und Barnekow, A. (2001)

The Golgi matrix protein GM130: a specific interacting partner of the small GTPase Rab1b. *EMBO Rep.* 2, 336-341.

Wennerberg, K., Rossman, K.L. und Der, C.J. (2005)

The Ras superfamily at a glance. *J. Cell Sci.* 118, 843-846.

Wilson, A.L., Erdman, R.A., Castellano, F. und Maltese, W.A. (1998)

Prenylation of Rab8 GTPase by type I and type II geranylgeranyl transferases. *Biochem. J.* 333, 497-504.

Woller, B., Luiskandl, S., Popovic, M., Prieler, B.E.M., Ikonge, G., Mutzl, M., Rehmann, H. und Herbst, R. (2011)

Rin-like, a novel regulator of endocytosis, acts as guanine nucleotide exchange factor for Rab5a and Rab22. *Biochim. Biophys. Acta: Mol. Cell Res.* 1813, 1198-1210.

Wu, Y.W., Oesterlin, L.K., Tan, K.T., Waldmann, H., Alexandrov, K. und Goody, R.S. (2010)

Membrane targeting mechanism of Rab GTPases elucidated by semisynthetic protein probes. *Nat. Chem. Biol.* 6, 534-540.

Wu, Y.W., Tan, K.T., Waldmann, H., Goody, R.S. und Alexandrov, K. (2007)

Interaction analysis of prenylated Rab GTPase with Rab escort protein and GDP dissociation inhibitor explains the need for both regulators. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104, 12294-12299.

Wurmser, A.E., Sato, T.K. und Emr, S.D. (2000)

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.

Yamamura, R., Nishimura, N., Nakatsuji, H., Arase, S. und Sasaki, T. (2008)

The interaction of JRAB/MICAL-L2 with Rab8 and Rab13 coordinates the assembly of tight junctions and adherens junctions. *Mol. Biol. Cell* 19, 971-983.

Yamasaki, A., Menon, S., Yu, S., Barrowman, J., Meerloo, T., Oorschot, V., Klumperman, J., Satoh, A. und Ferro-Novick, S. (2009)

mTrs130 is a component of a mammalian TRAPP II complex, a Rab1 GEF that binds to COPI-coated vesicles. *Mol. Biol. Cell* 20, 4205-4215.

Yip, C.K., Berscheminski, J. und Walz, T. (2010)

Molecular architecture of the TRAPP II complex and implications for vesicle tethering. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 17, 1298-1304.

Yoshimura, S., Gerondopoulos, A., Linford, A., Rigden, D.J. und Barr, F.A. (2010)

Family-wide characterization of the DENN domain Rab GDP-GTP exchange factors. *J. Cell Biol.* 191, 367-381.

Zhang, J., Fonovic, M., Suyama, K., Bogoy, M. und Scott, M.P. (2009)

Rab35 controls actin bundling by recruiting fascin as an effector protein. *Science* 325, 1250-1254.

Zhang, X.J., He, X., Fu, X.Y. und Chang, Z.J. (2006)

Varp is a Rab21 guanine nucleotide exchange factor and regulates endosome dynamics. *J. Cell Sci.* 119, 1053-1062.

Zhang, Z.Q. und Marshall, A.G. (1998)

A universal algorithm for fast and automated charge state deconvolution of electrospray mass-to-charge ratio spectra. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 9, 225-233.

Zhu, Y.Q., Hu, L.Y., Zhou, Y., Yao, Q., Liu, L.P. und Shao, F. (2010)

Structural mechanism of host Rab1 activation by the bifunctional *Legionella* type IV effector SidM/DrrA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107, 4699-4704.

Danksagungen

Mein Dank gilt:

Prof. Dr. Roger S. Goody. Er hat mich in einer schwierigen Situation in seine Gruppe aufgenommen und mir ein faszinierendes und funktionierendes Projekt anvertraut. Sein großes Interesse an dieser Arbeit und viele anregende Diskussionen haben mich sehr begeistert.

Prof. Dr. Roland Winter für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Dr. Aymelt Itzen für die Betreuung dieser Arbeit und den nicht nur fachlichen sondern auch menschlichen Rat, den er mir in den letzten Jahren sehr oft gegeben hat.

Nathalie Bleimling für die tägliche Unterstützung im Laboralltag und die Präparation von einer Vielzahl der verwendeten Proteine.

Stefan Schöbel und Matthias Müller für die gute Zusammenarbeit am DrrA Projekt und viele anregende Diskussionen.

der Arbeitsgruppe Goody, für eine Arbeitsatmosphäre die viele Labortage erheitert hat.

Dr. Anouk Stigter und Prof. Dr. Herbert Waldmann für die Präparation und Bereitstellung von NBD-Farnesylpyrophosphat und NBD-Geranylpyrophosphat.

der IMPRS in Chemical Biology, Waltraud Hofmann-Goody, Christa Hornemann und Prof. Dr. Martin Engelhard für die finanzielle Förderung und ihre Unterstützung.

meiner Familie und meinen Freunden, die mich immer unterstützt und aufgefangen haben und mit Rat und Tat die letzten Jahre begleitet haben.

Eidesstattliche Erklärung

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

Dortmund, 19.09.2011

Lena Oesterlin