

**Molekulare Grundlagen der
Rab-Manipulation der Proteine DrrA und LidA
aus *Legionella pneumophila***

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
eines Doktors der Naturwissenschaften
der Fakultät für Chemie an der Technischen Universität Dortmund

angefertigt am
Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie

vorgelegt von

Stefan Schöbel, M.Sc.

aus Dortmund

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

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

Schoebel S, Oesterlin LK, Blankenfeldt W, Goody RS, Itzen A (2009)
RabGDI displacement by DrrA from *Legionella pneumophila* is a consequence of its guanine nucleotide exchange activity.
Mol Cell, 36 (6), 1060-72

Schoebel S, Blankenfeldt W, Goody RS, Itzen A (2010)
High-affinity binding of phosphatidylinositol 4-phosphate by *Legionella pneumophila* DrrA.
EMBO Rep, 11 (8), 598-604

Goody RS, Müller M, Schoebel S, Oesterlin LK, Blümer J, Peters H, Blankenfeldt W, Itzen A (2011)
The versatile Legionella effector DrrA.
Commun Integr Biol. 4(1), 72–74

Schoebel S, Cichy A., Goody RS, Itzen A (2011)
The protein LidA from Legionella is a Rab GTPase supereffector
P Natl Acad Sci USA, 108(44), 17945-50

Erster Gutachter: Prof. Dr. Roger S. Goody

Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Roland Winter

Inhalt

1. Zusammenfassung	1
2. Einleitung	3
2.1 Der vesikuläre Transport	3
2.2 RabGTPasen: Die Regulatoren des vesikulären Transports	5
2.2.1 Strukturelle Eigenschaften von RabGTPasen	9
2.2.2 Guanosinnukleotidaustauschfaktoren	12
2.2.3 Rab-Effektoren.....	15
2.2.4 Rab1 im vesikulären Transport zwischen ER und Golgi-Apparat	18
2.3 Phosphatidylinositolphosphate definieren die Membranidentität	21
2.3.1 Phosphatidylinositolphosphat-bindende Proteindomänen	23
2.3.2 Beispiel der PI3P-Bindung durch die FYVE-Domäne von EEA1	24
2.4 Legionella pneumophila	26
2.4.1 Der Legionellen-Infektionszyklus.....	27
2.4.2 Legionellenproteine manipulieren die Wirtszelle	29
2.4.3 DrrA: Ein Legionellenprotein mit GDF- und GEF-Aktivität.....	29
2.4.4 LidA, ein ungewöhnlicher Rab-Effektor	31
3. Zielsetzung der Arbeit	37
4. Ergebnisse	39
4.1 Die Kristallstruktur des Rab1b₃₋₁₇₄:DrrA₃₄₀₋₅₃₃-Komplexes	39
4.1.1 Bindungsstelle 1: DrrA bindet den P-Loop und Switch 2.....	41
4.1.2 Bindungsstelle 2: DrrA bindet Switch 1	43
4.1.3 Hydrophobe Kontakte zwischen Rab1b und DrrA.....	44
4.2 Die Kristallstruktur der GEF-Domäne von DrrA	46
4.3 DrrA ₃₄₀₋₅₃₃ induziert wesentliche strukturelle Änderungen in Rab1b	47
4.4 Der DrrA-katalysierte Nukleotidaustauschmechanismus	51
4.5 Analyse der in der Rab1b-Bindung involvierten Aminosäuren von DrrA.....	55
4.6 Die Kristallstruktur der P4M-Domäne von DrrA	57
4.6.1 Die P4M-Domäne stabilisiert die GEF-Domäne.....	60
4.6.2 Die P4M-Domäne bindet PI4P mit nanomolarer Affinität	61
4.6.3 Die PI4P-Bindung der P4M-Domäne ist unabhängig von der Rab1-Bindung.....	65
4.6.4 K568 ist entscheidend für die PI4P-Bindung der P4M-Domäne	65

4.7	LidA, ein außergewöhnlicher Rab-Effektor	68
4.7.1	LidA bindet Rab-Proteine mit enorm hoher Affinität	68
4.7.2	LidA ist ein generelles Rab-bindendes Protein	72
4.7.3	Die Kristallstruktur des Rab8a ₆₋₁₇₆ :GppNHp:LidA ₂₀₁₋₅₈₃ -Komplexes.....	75
4.7.3.1	Die Rab-Bindungsplattform von LidA.....	78
4.7.3.2	LidA bindet Rab8 auch außerhalb der nukleotidbindenden Bereiche	81
4.7.3.3	Die LidA und Rab8a bilden eine sehr große Kontaktfläche	85
4.7.4	Die Adenylylierung von Rab-Proteinen verringert die Affinität zu LidA.....	86
5.	Diskussion.....	91
5.1	Die Struktur der DrrA GEF-Domäne ermöglicht einen katalytisch effizienten Nukleotidaustausch.....	91
5.1.1	Der DrrA-katalysierte Nukleotidaustauschmechanismus.....	92
5.1.2	Die DrrA GEF-Domäne ist eine GEF-Domäne ist eine GEF-Domäne.....	93
5.1.3	Die GEF-Aktivität ist die Ursache der vermeintlichen GDF-Aktivität von DrrA...	94
5.1.5	GEFs sind potentiell in der Lage Rab-Proteine zu rekrutieren.....	96
5.2	Die biologische Relevanz der hohen Affinität der P4M-Domäne zu PI4P	97
5.2.1	Vergleich der P4M-Domäne mit anderen PI-bindenden Domänen	99
5.2.2	Struktureller Vergleich der P4M- und der ENTH-Domänen	100
5.2.3	Mögliche Anwendungen der P4M-Domäne von DrrA.....	102
5.3	Modell der DrrA vermittelten-Prozesse auf der LCV	103
5.4	LidA ist eine Rab-Falle	106
5.4.1	LidA ist ein Rab-Supereffektor	108
5.4.2	Implikationen der hohen Affinität von LidA zu Rab-Proteinen.....	111
5.4.3	Wird das Rab aus dem Komplex mit LidA wieder freigesetzt?.....	118
5.4.4	Die Herstellung eines Rab-bindungsdefizienten LidA ist schwierig.....	120
5.5	Darstellung der DrrA- und LidA-vermittelten Prozesse auf der LCV	121
6.	Ausblick.....	125
7.	Material und Methoden.....	127
7.1	Materialien	127
7.1.1	Chemikalien.....	127
7.1.2	Verbrauchsmaterialien	128
7.1.3	Molekularbiologische Kits.....	128

7.1.4	Chromatographiesäulen und –materialien	128
7.1.5	Geräte	129
7.1.6	Bakterienstämme	129
7.1.7	Verwendete Plasmide	130
7.1.8	Protein und Größenstandards	130
7.1.9	Sonstiges	131
7.1.10	Puffer und Lösungen	131
7.1.11	Nährmedien zur Anzucht von <i>Escherichia coli</i>	132
7.1.12	Oligonukleotide	132
7.2	Molekularbiologische Methoden	133
7.2.1	Isolation von Plasmid DNA aus <i>Escherichia coli</i>	133
7.2.2	Bestimmung von DNA-Konzentrationen	133
7.2.3	DNA Restriktionsverdau	133
7.2.4	Agarose-Gelelektrophorese	133
7.2.5	DNA Gel-Extraktion	134
7.2.6	DNA-Ligation	134
7.2.7	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	134
7.3	Mikrobiologische Methoden	136
7.3.1	Kultur und Anzucht von <i>Escherichia coli</i>	136
7.3.2	Herstellung und Transformation von elektrokompetenten <i>E. coli</i> Zellen	137
7.3.3	Herstellung von elektrokompetenten <i>Escherichia coli</i> Zellen	137
7.3.4	Transformation elektrokompetenter <i>Escherichia coli</i> Zellen mit Plasmid-DNA	137
7.3.5	Proteinexpression in <i>E. coli</i>	138
7.3.6	Zellaufschluss	138
7.4	Proteinbiochemische Methoden	139
7.4.1	Affinitätschromatographie	139
7.4.1.1	Nickelaffinitätschromatographie	139
7.4.1.2	Glutathionaffinitätschromatographie	139
7.4.2	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	140
7.4.3	Proteinkonzentrationsbestimmung	141
7.4.3.1	Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford	141

7.4.3.2	Proteinkonzentrationsbestimmung durch Absorptionsmessung.....	141
7.4.4	Konzentrierung der Proteine	142
7.4.5	Nukleotidaustausch an Rab-Proteinen	142
7.4.6	Herstellung des nukleotidfreiem Rab1b ₃₋₁₇₄ :DrrA ₃₄₀₋₅₃₃ Komplex	143
7.4.7	Präparative Größenausschlusschromatographie.....	143
7.5	Biophysikalische Methoden	143
7.5.1	Messung von schnellen Kinetiken mittels Stopped-flow.....	143
7.5.2	Isotherme Titrationskalorimetrie (ITC)	144
7.5.3	Circular-Dichroismus-Spektroskopie (CD-Spektroskopie)	145
7.5.4	Massenspektrometrie	145
7.6	Strukturbiologische Methode: Röntgenkristallographie	146
7.6.1	Proteinkristallisation	146
7.6.1.1	DrrA ₃₄₀₋₅₃₃	147
7.6.1.2	DrrA ₃₄₀₋₅₃₃ :Rab1b ₃₋₁₇₄	147
7.6.1.3	DrrA ₃₄₀₋₆₄₇	147
7.6.1.4	LidA ₂₀₁₋₅₈₃ :Rab8a ₆₋₁₇₆	147
7.6.2	Datenaufnahme	147
7.6.2	Datenprozessierung, Modellbau und Verfeinerung	152
8.	Literaturverzeichnis.....	155
9.	Anhang.....	171

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

% (v/v)	Volumenprozent
% (w/v)	Gewichtsprozent
A	Ampere
Å	Angström, 10^{-10} m
al.	lat.: alii
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
Bis Tris	Bis[2-hydroxyethyl]imino-Tris[hydroxymethyl]methan
C	Celsius
CD	Circulardichroismus
C-Terminus	Carboxyterminus der Proteinprimärsequenz
Da	Dalton (atomare Masseneinheit)
DLS	engl.: <i>dynamic light scattering</i>
DTE	Dithioerythritol
E. coli	Escherichia coli
EDTA	engl.: <i>ethylenediaminetetraacetic acid</i>
ESI-MS	Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometrie
g	Gramm
GAP	GTPase aktivierendes Protein
GDI	GDP Dissoziationsinhibitor
GDP	Guanosindiphosphat
GEF	Guaninnukleotidaustauschfaktor
GMP	Guanosinmonophosphat
GppNHp	nicht hydrolysierbares GTP-Analog
GSH	Gluthation
GST	Gluthation S-Transferase
GTP	Guanosintriphosphat
GXP	GDP oder GTP
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)-Piperazin-N'-2-Ethan-Sulfonsäure
HPLC	engl.: <i>high performance liquid chromatography</i>
IPTG	Isopropyl- β -Thiogalactosid
ITC	engl.: <i>isothermal titration calorimetry</i>
K	Kelvin
K_D	Dissoziationskonstante
kobs	beobachtete Geschwindigkeitskonstante
L	Liter
LB	engl.: <i>lysogeny broth</i>
LMW	engl.: <i>low molecular weight marker</i>
M = mol/L	Molar
m	Meter
Mant	Methylantraniloyl
MBP	engl.: <i>maltose-binding protein</i>
MPD	2-Methyl-2,4-Pentandiol

MW	engl.: <i>molecular weight</i>
MWCO	engl.: <i>Molecular Weight Cut Off</i>
Ni-NTA	Nickel-nitrilo-Triessigsäure
N-Terminus	Aminoterminus der Proteinprimärsequenz
OD	Optische Dichte
PAGE	engl.: <i>polyacrylamide gelelectrophoresis</i>
PBS	engl.: <i>phosphate buffered saline</i>
PCR	engl.: <i>polymerase chain reaction</i>
pdb	engl.: <i>protein data bank</i>
PEG	Polyethylenglykol
r.m.s.d.	engl.: <i>root mean square deviation</i>
RabF/RabSF	Rab-Familie/ Rab-Subfamilie
rpm	Rotationen pro Minute
RT	Raumtemperatur
S	Sekunde
SAD	engl.: <i>single wavelength anomalous dispersion</i>
SDS	engl.: <i>sodium dodecyl sulfate</i>
t	Zeit
TCEP	Tris(2-carboxyethyl)phosphin Hydrochlorid
TEV-Protease	Tobacco Etch Virus NIa Protease
V	Volt

Die Abkürzungen für Aminosäuren im Ein - und Dreibuchstabencode wurden gemäß der Empfehlungen der International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC) und der International Union of Biochemistry¹ verwendet.

1. Zusammenfassung

Das intrazelluläre, pathogene Bakterium *Legionella pneumophila* manipuliert die von Rab-Proteinen regulierten Transportprozesse der eukaryotischen Wirtszelle, um ein replikations-permissives Kompartiment zu bilden. Die Mitglieder der Rab-Familie sind essentielle Regulatoren des intrazellulären vesikulären Transports und haben die Funktion von molekularen Schaltern: Rab-Proteine befinden sich entweder inaktiv im Zytosol im Komplex mit dem Protein GDI (engl.: *GDP-dissociation inhibitor*, GDI) oder sie werden an eine Membran lokalisiert, wo sie nach der Aktivierung durch einen GEF (engl.: *guanine nucleotide exchange factor*, GEF) zusammen mit Rab-Effektoren die Prozesse des vesikulären Transportes koordinieren.¹

Die gezielte Manipulation von Rab1 durch die sekretierten Legionellenproteine DrrA und LidA führt zur Umleitung des Rab1-regulierten, frühen sekretorischen Transports an die bakterienenthaltende Vakuole (engl.: *legionella containing vacuole*, LCV). Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Analyse der molekularen Grundlagen der Rab-Manipulation durch die Legionellenproteine DrrA und LidA.

DrrA enthält eine bi-funktionale, zentrale GEF-Domäne, die eine Rekrutierung von Rab1 an die LCV und die anschließende Aktivierung von Rab ermöglicht. Die Strukturen der GEF-Domäne von DrrA und ihres Komplexes mit Rab1 wurden in dieser Arbeit bestimmt und zeigten eine noch nicht beobachtete Proteinfaltung der GEF-Domäne. Aus der Komplexstruktur konnte der DrrA-katalysierte Mechanismus der Rab1-Aktivierung abgeleitet werden. DrrA ist das erste bakterielle RabGEF, das charakterisiert wurde und es besitzt eine hohe katalytische Effizienz⁴. Basierend auf der Rab1:DrrA-Komplexstruktur konnten GEF-defiziente Aminosäure-substitutionen eingeführt werden, deren biochemische Analyse die Ableitung des enzymatischen Mechanismus ermöglichten. Diese Untersuchungen zeigten erstmals, dass die GEF-Aktivität von DrrA die Freisetzung von Rab1 aus dem Komplex mit GDI vermitteln kann.

Der Ort der DrrA-vermittelten Rekrutierung von Rab1 wird durch die Bindung von DrrA an die LCV bestimmt. Die C-terminale P4M-Domäne (PI4P binding of SidM/DrrA) verankert DrrA durch die Bindung von Phosphatidylinositol-4-Phosphat (PI4P) auf der LCV. Die Bestimmung der Affinität der P4M-Domäne zu PI4P ergab, dass die P4M-Domäne eine ungewöhnlich hohe Affinität zu PI4P besitzt ($K_D = 18 \text{ nM}$) und DrrA somit

Zusammenfassung

stabil mit der LCV assoziiert ist. Die Struktur der P4M-Domäne zeigte eine bisher für PIP-bindende Proteine noch nicht beobachtete Faltung. Durch die Identifizierung der PI4P-Bindungstasche und dem Vergleich der P4M-Domäne mit anderen PIP-bindenden Proteinen gelang die Erstellung eines realistischen Modells der Orientierung von DrrA und der DrrA-katalysierten Aktivierung von Rab1 auf der LCV.

Das Legionellenprotein LidA ist an der Rekrutierung von Vesikeln an die LCV beteiligt und zeichnet sich durch die für einen Rab-Effektor ungewöhnliche Eigenschaft aus, neben der aktiven Form auch die inaktive Form von Rab1 zu binden⁶. Auf der LCV interagiert LidA mit dem von DrrA rekrutiertem Rab1.

LidA interagiert mit einer Vielzahl unterschiedlicher Rab-Proteine sowohl in der aktiven, als auch zum Großteil in der inaktiven Form, aber nicht mit anderen kleinen GTPasen. Die Affinitäten von LidA zu Rab-Proteinen sind außergewöhnlich hoch und besitzen K_D -Werte im niedrigen nanomolaren bis femtomolaren Bereich. Die Strukturbestimmung des Komplexes aus aktiven Rab8a und LidA zeigte eine neuartige Proteinfaltung von LidA. Dieses Legionellenprotein unterscheidet sich zu humanen Rab-Effektoren durch eine wesentlich komplexere Art der Rab-Bindung und einer erstaunlich großen Kontaktfläche zum Rab, was mit der außergewöhnlichen hohen Affinität zu Rab-Proteinen korreliert.

Die Ergebnisse dieser Arbeit lieferten ein detailliertes Verständnis der molekularen Vorgänge der DrrA- und LidA-vermittelten Prozesse auf der LCV. Die Untersuchungen an DrrA zeigten erstmals, dass ein GEF in der Lage ist, die Dissoziation des Rab:GDI-Komplexes zu bewirken und führten zu der Hypothese, dass auch humane RabGEFs ähnliche Eigenschaften besitzen könnten. Die strukturellen und biochemischen Untersuchungen der P4M-Domäne belegen eine sehr stabile Assoziation von DrrA auf der LCV. Die Strukturbestimmung und biochemische Analyse der Rab-Bindungseigenschaften von LidA identifizierten dieses Protein als einen außergewöhnlichen Rab-Effektor mit außergewöhnlich hohen Affinitäten zu aktiven und inaktiven Rab-Proteinen. Diese besondere Eigenschaft impliziert die Rab-Effektor-untypischen Funktionen eines Rab- und/oder Vesikel-Rekrutierungsfaktors für LidA.

Die detaillierte molekulare Analyse der auf Rab-Proteine spezialisierten, bakteriellen Proteine DrrA und LidA lieferte neue Blickwinkel auf die Kontrolle eukaryotischer, vesikulärer Transportprozesse.

2. Einleitung

Viele bakterielle Parasiten haben Strategien entwickelt, eukaryotische Wirtszellen zu befallen und sich innerhalb dieser Wirtszelle unentdeckt von den Abwehrmechanismen zu vermehren. Die eukaryotische Zelle höherer Organismen unterscheidet sich von der prokaryotischen Zelle von Mikroorganismen durch eine komplexe Strukturierung in Form von Kompartimenten. Sämtliche Kompartimente, die durch vesikulären Transport miteinander verbunden sind, bilden das sogenannte Endomembransystem. Bakterien erlangen über Phagozytose Eintritt in das Endomembransystem. Nichtpathogene Bakterien werden gewöhnlich zum Abbau in das Lysosom transportiert. Im Gegensatz dazu haben pathogene Bakterien, wie zum Beispiel *Legionella pneumophila*, im Verlauf der Evolution Strategien entwickelt, den vesikulären Transport zu manipulieren, im Endomembransystem unterzutauchen und ein replikationspermissives Kompartiment zu bilden. Die evolutionäre Anpassung dieser Erreger an konservierte Signalwege ihrer Wirte stattete diese mit einem Repertoire von Proteinen aus, von denen einige Funktionen von Wirtsproteinen nachahmen und so unter anderem spezifisch vesikuläre Transportprozesse der Wirtszelle beeinflussen. Biochemische und strukturelle Untersuchungen dieser hochspezialisierten Proteine können daher wertvolle neue Erkenntnisse über bisher ungeklärte Aspekte eukaryotischer Transportprozesse liefern.

2.1 Der vesikuläre Transport

Die als Organellen bezeichneten Kompartimente des Endomembransystems sind von einer Doppellipidschicht umgeben und bilden vom Zytosol unabhängige chemische Reaktionsräume mit spezialisierten Funktionen. Zu den Organellen des Endomembransystems zählen die Plasmamembran, das endoplasmatische Retikulum (ER), der Golgi-Apparat, die äußere Kernhülle, frühe und späte Endosomen, Lysosomen und die Vakuole in pflanzlichen Zellen. Vesikel, kleine Transportbläschen, die von einer Doppellipidschicht umgeben sind, vermitteln den Austausch von Membranbestandteilen, Proteinen und Nährstoffen zwischen den Organellen. Der Materialtransport in eukaryotischen Zellen erfolgt entlang zweier Transport-routen. Auf dem exozytotischen Weg werden neu synthetisierte Proteine, ausgehend vom ER, über den Golgi-Apparat zum jeweiligen Zielorganell oder zur Plasmamembran transportiert. Über die

Einleitung

endozytische Transportroute wird von der Zelle aufgenommenes Material, wie Nährstoffe, Rezeptoren, aber auch Bakterien und Viren, über das endosomale Netzwerk (frühes Endosom, spätes Endosom) zum Abbau im Lysosom transportiert. Der Transport erfolgt sequentiell und erfordert die spezifische Erkennung des Vesikels mit der jeweiligen Zielmembran. Jedes Organell hat eine eigene Membranidentität, die durch eine Kombination von speziellen Lipiden, den Phosphoinositiden (PIs) und aktivierten Rab-Proteinen definiert wird. Diese Markermoleküle befinden sich auf der zytoplasmatischen Seite der Organellen und werden von Proteinen auf Vesikeln spezifisch erkannt. Die unterschiedlichen Membranidentitäten der Organellen bilden sozusagen das Leitsystem des zellulären Transports und ermöglichen einen sequentiellen Transport. Der vesikuläre Transport lässt sich grob in 4 Schritte unterteilen und ist in Abbildung 1 dargestellt:

1. Das Abschnüren des Vesikels von der Akzeptormembran
2. Der Transport des Vesikel
3. Das Anheften des Vesikels an die Zielmembran (engl.: tethering)
4. Die Fusion des Vesikels mit der Zielmembran

Die Regulation und Koordination der einzelnen Schritte des vesikulären Transportes übernehmen Proteine aus der Familie der Rab-Proteine. Rab-Proteine funktionieren als molekulare Schalter und steuern durch Wechselwirkungen mit sogenannten Rab-Effektor-Proteinen die lokale und temporäre Regulation der jeweiligen Transportprozesse.

Diese durch Rab-Proteine vermittelten Transportprozesse sind Angriffspunkte von vielen pathogenen Bakterien. Legionellen sind intrazelluläre Krankheitserreger, die ihre Pathogenität zum Teil dadurch erreichen, dass sie eine Vielzahl von löslichen, hochspezialisierten Proteinen in die Wirtszelle abgeben, die dort durch Interaktionen mit Wirtsproteinen die Signalwege der Wirtszelle, wie Apoptose und den vesikulären Transport massiv manipulieren. Die in dieser Arbeit untersuchten Legionellenproteine DrrA (engl.: defect in Rab1 recruitment A), auch SidM (engl.: substrate of Icm/Dot M) genannt, und LidA (engl.: lowered viability in the presence of dot A) sind an der Manipulation des Transports zwischen ER und Golgi beteiligt. Mithilfe dieser Proteine leiten Legionellen den Transport ausgehend vom ER direkt zum legionellenenthaltenden

Kompartiment um (engl.: *legionella containing vacuole*, LCV). Durch die Vergrößerung der LCV wird Platz für die Vermehrung der Legionellen geschaffen⁷.

Die Interaktionspartner beider Proteine in der Wirtszelle gehören zur Familie der Rab-Proteine. Auch Phosphoinositide spielen bei der DrrA, bzw. LidA vermittelten Umleitung des Transports vom ER zur LCV, eine entscheidende Rolle. Trotz intensiver Forschung sind manche Aspekte des vesikulären Transports noch nicht geklärt. Die Rekrutierung von Rab-Proteinen an eine spezifische Zielmembran, als auch der Ablauf des Anheftens von Vesikeln an die Zielmembran, sind bisher nicht vollständig verstanden. Die bakteriellen Proteine DrrA und LidA bewirken genau diese Prozesse und sind daher potentielle Kandidaten, um Einblicke in die biochemischen Abläufe und die zugrunde liegenden strukturellen Mechanismen zu liefern. Insbesondere die Tatsache, dass es sich bei beiden Proteinen um lösliche Proteine handelt, macht diese Proteine interessant für die biochemische und strukturelle Untersuchung. Die bisher identifizierten Proteine mit ähnlichen Eigenschaften ließen nur wenige biochemische und kaum strukturelle Untersuchungen zu, da diese schwierig in der Herstellung und in der Handhabung sind. Zum Teil handelt es sich bei diesen Proteinen um integrale Membranproteine. Zunächst wird auf die Rolle der Rab-Proteine als Regulatoren des vesikulären Transports eingegangen.

2.2 RabGTPasen: Die Regulatoren des vesikulären Transports

Rab-Proteine sind die Hauptregulatoren des vesikulären Transports in eukaryotischen Zellen. Mit über 60 Mitgliedern in humanen Zellen und 11 Mitgliedern in Hefen bilden Rab-Proteine die größte Unterfamilie der Ras-Superfamilie. Die Ras-Superfamilie der kleinen Guanosintriphosphatasen (GTPasen) besteht aus fünf Proteinfamilien, die sich in Sequenz und Funktion unterscheiden: Ras (Genexpression), Rac/Rho/Cdc42 (Organisation des Zellzytoskeletts), Ran (nuklearer Import), Sar1/Arf (Rekrutierung von Hüllproteinen/Modulierung der Membranlipidkomposition) und Rab (vesikulärer Transport)^{8,9}. Da die in dieser Arbeit untersuchten Legionellenproteine DrrA und LidA mit Rab-Proteinen interagieren, wird im Folgenden auf ihre Funktion, Regulation und Struktur eingegangen.

Einleitung

Rab-Proteine sind kleine Proteine mit einem Molekulargewicht von 20-25 kDa. Wie alle GTPasen binden Rab-Proteine Guanosinnukleotide und besitzen eine intrinsische Hydrolyseaktivität, die Guanosintriphosphat (GTP) in Guanosindiphosphat (GDP) und anorganisches Phosphat spaltet. Abhängig vom gebundenen Nukleotid liegt das Rab-Protein entweder aktiv (GTP-gebundenen) oder inaktiv (GDP-gebunden) vor. Beide Zustände unterscheiden sich in ihrer dreidimensionalen Struktur und bilden die strukturelle Grundlage der Funktion als molekulare Schalter. Unterschiedliche Rab-bindende Proteine erkennen spezifisch den inaktiven oder den aktiven Zustand des Rab-Proteins und regeln so entweder die Aktivität des Rab-Proteins oder initiieren verschiedene Transportprozesse. Abhängig vom Aktivierungszustand des Rab-Proteins und des gebundenen Rab-bindenden Proteins zirkulieren Rabs zwischen Membranen und dem Zytosol. Dieser Rab Zyklus ist in Abbildung 1 dargestellt.

Nach der Biosynthese von Rab-Proteinen, erfolgt im Zytosol die kovalente Verknüpfung von meist zwei hydrophoben Geranylgeranylketten über Thiolgruppen von Cysteinen am C-Terminus des Rab-Proteins, die das Rab-Protein in Membranen verankern. Diese Modifikation wird in einem ternären Komplex aus Rab-Protein, Rab Escort Protein (REP) und Geranylgeranyltransferase 2 (GGTase2) katalysiert¹⁰⁻¹². Anschließend wird das modifizierte Rab-Protein an seine Bestimmungsmembran transportiert. In der Membran verankert erfolgt die Aktivierung des Rab-Proteins durch Rab-Protein-spezifische Guaninnukleotidaustauschfaktoren (engl.: *guanine nucleotide exchange factor*, GEF).

Die Bindung eines GEFs an ein Rab-Protein induziert die Freisetzung des GDP aus dem Rab-Protein und führt zu einem nukleotidfreien Übergangszustand des Rab-Proteins. Die Bindung von GTP, welches zyotosolisch im Überschuss gegenüber GDP vorliegt, führt zur Aktivierung des Rab-Proteins.

Die GTP gebundene Konformation des Rab-Proteins wird spezifisch von Rab-Effektorproteinen erkannt und gebunden, die daraufhin die einzelnen Prozesse des vesikulären Transportes, wie das Abschnüren des Vesikels, den Vesikeltransport, das Anheften des Vesikels an die Ziellmembran oder die Fusion des Vesikels mit der Ziellmembran initiieren. Die Bindung von Rab-Effektoren an Rab-Proteine führt gleichzeitig zur Stabilisierung von Rab-Proteinen auf einer Membran. Zur Entfernung eines Rab-Proteins von

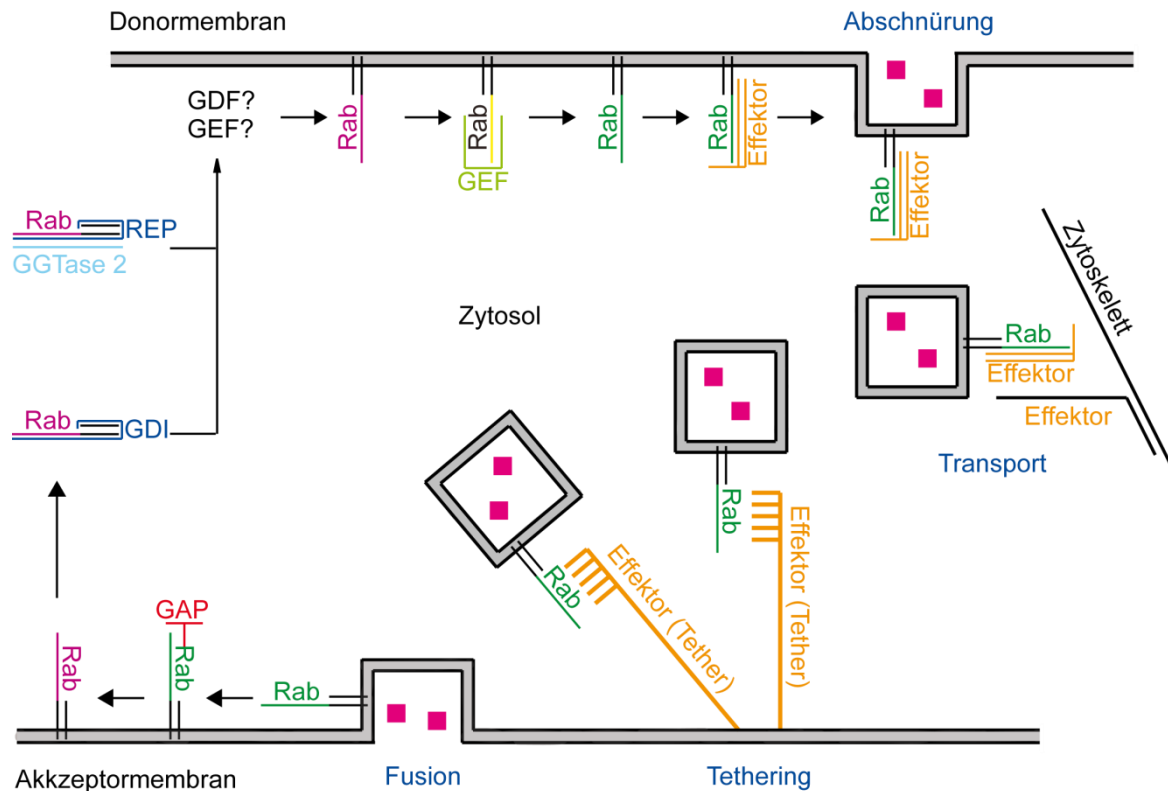


Abbildung 1 Darstellung des Rab-Zyklus und des vesikulären Transports. Neu-synthetisierte Rab-Proteine (lila) werden posttranslational modifiziert. Rab-Escortprotein (REP) (blau) und Geranylgeranyl Transferase 2 (GGTase2, hellblau) bilden einen ternären Komplex mit dem Rab-Protein und verknüpfen kovalent meist zwei Geranylgeranylreste an den C-Terminus des Rab-Proteins. Das modifizierte Rab-Protein wird an die Zielmembran transportiert, wo es über die Lipidanker in der Membran verankert wird. Der Mechanismus der Rab-Lokalisation ist unklar, GDF und GEF Proteine sind mögliche Kandidaten, die diesen Prozess kontrollieren. Guaninnukleotidaustauschfaktoren (GEF) katalysieren den Nukleotidaustausch von GDP zu GTP. Das GDP wird aus dem Rab-Protein verdrängt und das nukleotidfreie Rab (gelb) bindet, das im Zytosol im Überschuss vorliegende GTP. Das aktivierte Rab (dunkelgrün) kann mit einer Vielzahl von Rab-Effektoren (orange) interagieren, die wiederum wichtige Funktionen bei der Abschnürung, dem Transport, dem Anheften oder der Fusion von Vesikeln haben. Rab-Proteine werden durch GTPase aktivierende Proteine (GAP, rot) inaktiviert. Das inaktivierte Rab-Protein (lila) wird spezifisch von dem Protein GDP-Dissoziationsinhibitor (GDI) aus der Membran extrahiert. Durch die GDI-vermittelte Abschirmung der hydrophoben Geranylgeranylreste bildet GDI mit Rab einen löslichen Komplex und verbleibt im Zytosol oder wird an die Akzeptormembran zurücktransportiert.

einer Membran muss dieses zunächst inaktiviert werden. Das GTPase aktivierende Protein (GAP) stimuliert die normalerweise geringe Hydrolysegeschwindigkeit der RabGTPase und inaktiviert so das Rab-Protein. Das inaktive, GDP-gebundene Rab wird spezifisch vom Rab-GDP-Dissoziationsinhibitor (RabGDI) erkannt und aus der Membran extrahiert, dabei werden die hydrophoben Geranylgeranylketten vom RabGDI

Einleitung

abgeschirmt. In Form des löslichen Rab:GDP-RabGDI-Komplexes wird das Rab über einen zytosolischen Pool zurück zur Donormembran transportiert. Der Mechanismus der Rekrutierung eines Rab-Proteins an seine Zielmembran ist bisher nicht genau verstanden.

Die Geranylgeranylketten am C-Terminus des Rab-Proteins sind notwendig für die Membranverankerung, allerdings bestimmen sie nicht die zelluläre Lokalisation des Rabs. Die hypervariable Region ist ein ca. 30 Aminosäure langer Bereich am C-Terminus des Rabs, an dessen Ende die Lipidanker gebunden werden. Dieser Bereich weist die höchste Sequenzvariation bei Rab-Proteinen auf und es wurde vermutet, dass dieser Bereich wichtig für die spezifische Lokalisation von Rab-Proteinen ist¹³.

Neuere Untersuchungen zeigen, dass diese Region kein generelles Lokalisationssignal für RabGTPasen darstellt¹⁴. Aktuell sind Proteine mit GEF- oder GDF-Aktivität potentielle Kandidaten für die Rekrutierung von Rab-Proteinen an die jeweilige Zielmembran.

Um ein Rab aus dem Rab:RabGDI Komplex freizusetzen und an die Zielmembran zu rekrutieren, ist die Existenz von Proteinen mit einer GDI-Verdrängungsfaktor-Aktivität (engl.: *GDI-displacement factor*, GDF) postuliert worden^{15,16}.

Bisher konnte nur ein Protein mit dieser Aktivität identifiziert werden. Bei diesem Protein handelt es sich um das integrale Membranprotein Yip3 aus der Yip-Proteinfamilie (engl.: Ypt-interacting protein)¹⁷. Es wurde beschrieben, dass Yip3 in vitro die Dissoziation von Rab9 aus dem Rab-GDI Komplex aktiv katalysiert, damit das Rab anschließend in der Zielmembran verankert wird¹⁷. Bisher gibt es allerdings keine strukturellen oder mechanistischen Untersuchungen, die diesen Vorgang illustrieren. Die Yip Proteinfamilie besteht aus nur 8 Membranproteinen, die am ER und Golgi lokalisiert sind. Die Anzahl und Lokalisation der Yip-Proteine allein sind daher nicht ausreichend, um die über 60 Rab-Proteine spezifisch an verschiedene Wirkorte innerhalb der Zelle zu rekrutieren. Zudem ist die Anwesenheit eines GEFs an der Zielmembran notwendig, da inaktive Rabs GDI-vermittelt wieder aus der Membran entfernt werden.

Proteine mit GEF-Aktivität sind periphere Membranproteine und sind organellspezifisch lokalisiert. Bisher sind um die 30 RabGEFs identifiziert. Die meisten dieser GEFs sind spezifisch für ein bestimmtes Rab oder für verwandte Rabs¹⁸⁻²⁰. Der Ort der Rab-Aktivierung ist durch die Lokalisation des GEFs festgelegt und Rab-Effektoren initiieren nach erfolgter Aktivierung die jeweiligen Transportprozesse.

Die Aktivierung eines Rabs führt dazu, dass es nicht von GDI aus der Membran extrahiert wird, da GDI eine um 3 Größenordnungen geringere Affinität für das GTP-gebundene Rab besitzt⁵. Aufgrund der Membranlokalisation des GEFs ist die räumliche Nähe zur Membran gegeben und eine Verankerung der GTPase in die Membran durch die Insertion der Geranylgeranylanker ist denkbar. Der Vorgang der Rab Aktivierung im Rab:GDI-Komplex ist allerdings unklar²¹.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die GEF-Aktivität des Legionellenproteins DrrA ausreicht, ein Rab aus dem Rab:GDI Komplex freizusetzen. Um die strukturellen Grundlagen des Nukleotidaustauschmechanismus zu klären, wird zunächst auf die strukturellen Eigenschaften von Rab-Proteinen eingegangen.

2.2.1 Strukturelle Eigenschaften von RabGTPasen

Rab-Proteine sind globuläre Proteine und besitzen die für GTPasen typische Faltung, bestehend aus einem sechssträngigen β -Faltblatt, mit fünf parallelen und einem anti-parallelen Strang, umgeben von fünf α -Helices. Der hypervariable Bereich am C-Terminus aus etwa 30 Aminosäuren enthält in den meisten Rabs zwei Cysteine, über dessen Thiolgruppen posttranslational zwei Geranylgeranylketten kovalent gebunden werden, die das Rab-Protein in der Membran verankern. Die Grundlage für die Funktion als molekularer Schalter bilden die zwei Switchbereiche, die unter anderem die Nukleotidbindungstasche formen. Diese zwei Bereiche koordinieren die Phosphatgruppen von GDP und GTP und nehmen, abhängig vom gebundenen Nukleotid, unterschiedliche Konformationen ein (Abbildung 2).

Im inaktiven Zustand der RabGTPase sind die Switchbereiche ungeordnet. Im aktiven Zustand führen spezifische Interaktionen von Aminosäuren in den Switchbereichen mit dem γ -Phosphat des GTP zur Strukturierung dieser Bereiche und umschließen das GTP in der Nukleotidbindungstasche (Abbildung 2B und 2D). Diese Konformationsunterschiede ermöglichen die Erkennung durch Rab-bindende Proteine, die spezifisch das aktive oder das inaktive Rab-Protein binden.

Einleitung

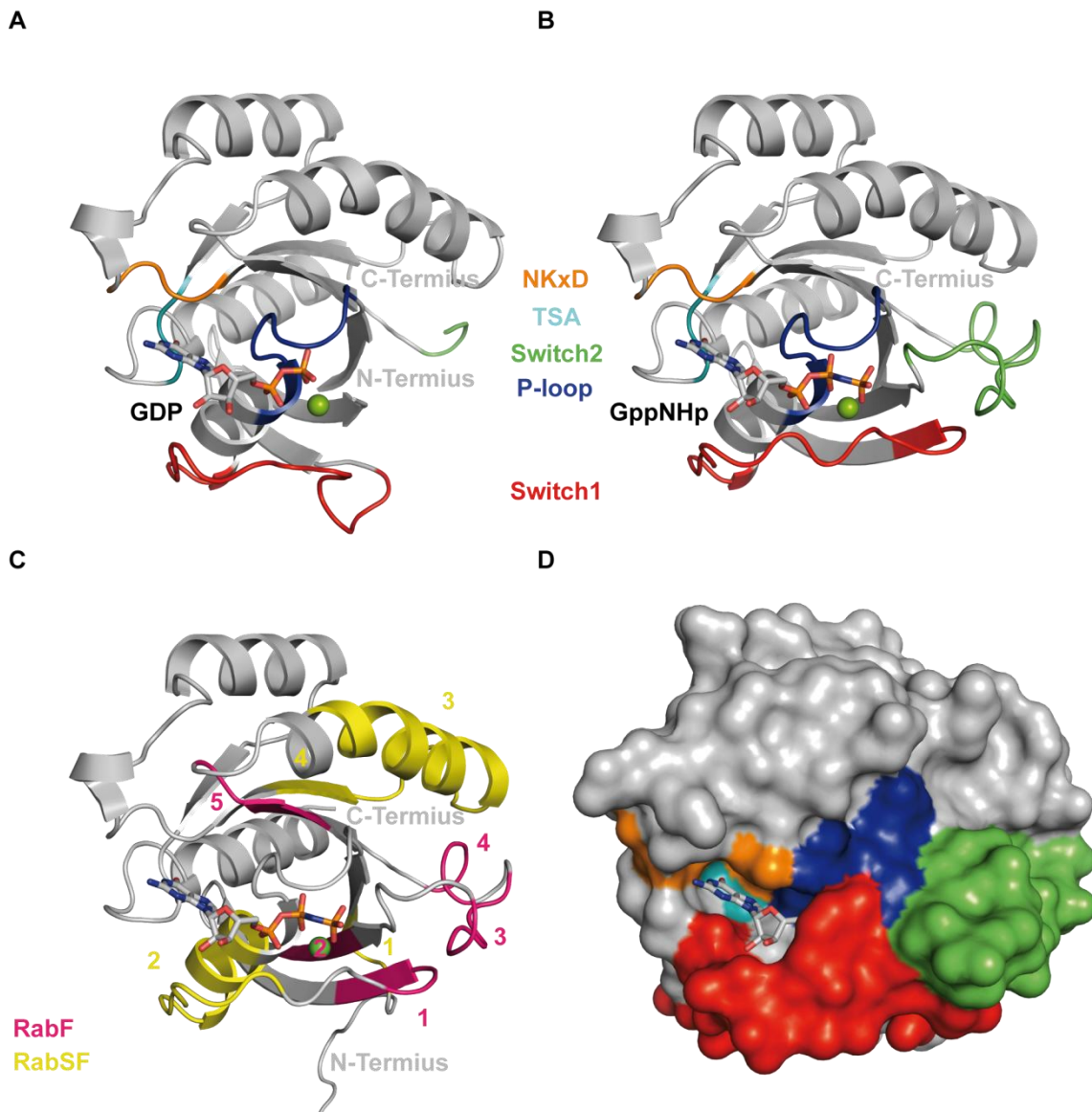


Abbildung 2: Strukturelle Merkmale von Rab-Proteinen, am Beispiel von Rab1. Kristallstrukturen von Rab1:GDP (pdb: 2FOL) und Ypt1:GppNHp (pdb: 1YZN, Ypt1 ist das Hefe-Homolog von Rab1, GppNHp ist ein nicht-hydrolysierbares GTP-Analog). **A)** Rab1 im GDP-gebundenen, inaktiven Zustand. Switch 2 ist nicht geordnet und daher nicht in der Kristallstruktur sichtbar. **B)** Rab1 im GTP-gebundenen, aktiven Zustand. Switch 2 nimmt eine geordnete Konformation durch die Bindung von GTP an. Die Nukleotidbindungstasche aus P-Loop, Switch 1 und Switch 2 ist geschlossen. GppNHp ist ein nicht-hydrolysierbares GTP Analog. Die für die Nukleotidbindung wichtigen Sequenzmotive (G1-5) sind markiert. Blau: P-Loop (G1), rot: Switch 1 (G2), grün: Switch 2 (G3), orange: NKxD (G4), hellblau: TSA (G5). **C)** Darstellung der RabF und RabSF Familienmotive. Die RabF-Motive sind nahe der Nukleotidbindungstasche lokalisiert. Die RabSF-Motive sind auf der Oberfläche des Rab-Proteins verteilt. **D)** Oberflächendarstellung des GTP-gebundenen, aktiven Rab1 zur besseren Darstellung der geschlossenen Nukleotidbindungstasche des aktiven Rab1.

Wichtige Aminosäuren für die Bindung und Hydrolyse der Guaninnukleotide in GTPasen befinden sich in den fünf konservierten Sequenzmotiven (G1-G5) auf den Schleifen

(engl.: loops) zwischen den α -Helices und den β -Faltblättern. Diese Bereiche sind entscheidend für die Nukleotidaffinität, die GTP-Hydrolyse und die Magnesiumkoordination. Das Magnesiumion ist notwendig für die hochaffine Bindung und die Hydrolyse des Guaninnukleotids. Es wird von Aminosäuren aus G1-G3 und dem β - und γ -Phosphat des Nukleotids koordiniert. G1 wird als P-Loop ($\beta 1/\alpha 1$) bezeichnet und enthält die Konsensussequenz GxxxxGK(S/T). Aufgrund der zwei konservierten Glycine nimmt der P-Loop eine hoch spezialisierte, starre Konformation ein, die auch nach der GTP-Hydrolyse keine Konformationsänderung erfährt. Der P-Loop umgibt dabei die α - und β -Phosphate des Nukleotids und es werden Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Amidfunktionen des Proteinrückgrates und den Phosphatsauerstoffen des Nukleotids ausgebildet^{22,23}. Das Lysin koordiniert mit der ϵ -Aminogruppe das β -Phosphat des GDP oder die β - und γ -Phosphate des GTP. Das Magnesiumion wird über die Hydroxylfunktion des Serin bzw. Threonins koordiniert. Die Amidfunktion des Threonins (G2) in Switch 1 kontaktiert das γ -Phosphat und wird im GTP-gebundenen Zustand vom Mg^{2+} koordiniert. Das Aspartat des DxxGQ-Motives in Switch 2 (G3) stabilisiert das Magnesiumion durch eine Wechselwirkung mit einem Wassermolekül, das Glycin interagiert über die Amidfunktion mit dem γ -Phosphat von GTP und das Glutamin ist ein katalytischer Rest für die intrinsische Hydrolyse-Reaktion. Mutationen des Serins, bzw. Threonins in ein Asparagin im P-Loop oder Leucin Substitutionen des Glutamin im DxxGQ-Motiv führen zu defekten RabGTPasen. Die NKxD (G4) und TSA (G5) Sequenzmotive sind für die Erkennung und Bindung der Guaninnukleotide beteiligt und ermöglichen die Diskriminierung zwischen Guaninnukleotiden und anderen Nukleotiden in der Zelle, wie zum Beispiel Adeninnukleotiden²⁴.

Trotz zahlreicher Kristallstrukturen von Rab-Proteinen im Komplex mit GEFs, GAPs und Rab-Effektoren gibt es bisher keine eindeutige Zuordnung der Aminosäuren von Seiten der Rab-Proteine, die die Spezifität der einzelnen Bindungspartner determinieren.

Auf der Primärsequenzebene gibt es die sogenannten Rab-Familien-Motive (RabF1-RabF5), anhand derer RabGTPasen von anderen Ras-ähnlichen GTPasen unterschieden werden können²⁵. Weiterhin gibt es die Rab-Subfamilien-Motive (RabSF1-RabSF-4), die die Unterteilung der RabGTPasen in zehn Subfamilien gemäß ihres Verwandtschaftsgrades ermöglichen²⁶. Die RabF-Motive liegen in den Switch-Bereichen

Einleitung

und dienen vermutlich der Erkennung von Rab-Regulatoren, wie GDI und REP. Die RabSF-Motive befinden sich auf unterschiedlichen Seiten der RabGTPasen-Oberfläche und sind wahrscheinlich für die spezifische Erkennung der RabGTPase durch entsprechende Rab-Effektoren, GEFs oder GAPs verantwortlich.

Ein weiteres Merkmal ist die sogenannte hydrophobe Triade, die aus den drei invarianten aromatischen Aminosäuren F45, W62 und Y77 (Rab8a)²⁷ besteht. Die Seitenkettenkonformationen dieser Aminosäuren von Rabs einer Subfamilie ähneln sich in der aktiven, GTP-gebundenen Form, aber unterscheiden sich unter Rab-Proteinen verschiedener Subfamilien. Es wird angenommen, dass diese strukturelle Plastizität eine wichtige Determinante für die Spezifität von Rab-Effektoren ist²⁷⁻²⁹ (siehe Rab-Effektoren, 2.2.3). Eine Ausnahme zu dieser Vermutung ist die Komplexstruktur des Effektorproteins OCRL1 mit Rab8a³⁰. Das zentrale W62 der hydrophoben Triade geht in dieser Struktur keine Kontakte zu OCRL1 ein und somit scheint die hydrophobe Triade in diesem Fall für die Beschreibung der Effektorbindung nicht notwendig zu sein (siehe 2.2.3, Abbildung 4).

Die Ursachen der strukturellen Heterogenität von aktivierten RabGTPasen sind daher vermutlich Substitutionen nicht-konservierter Aminosäuren innerhalb der konservierten Switchbereiche und/oder Substitutionen von Aminosäuren innerhalb des hydrophoben Proteinkerns. Um genauere Schlüsse für die Spezifität der Rab-Bindungspartner ziehen zu können, ist die Analyse weiterer Rab:Rab-Effektor-Kristallstrukturen nötig.

2.2.2 Guanosinnukleotidaustauschfaktoren

Die Regulation der lokalen und temporären Kontrolle der Aktivierung eines Rab-Proteins und dessen Aktivierungsdauer wird durch die Assoziation eines Rab-Proteins mit regulatorischen Proteinen, die für jedes Rab-Protein meist spezifisch sind, bestimmt. Die Aktivierung erfolgt durch Guaninnukleotidaustauschfaktoren und die Inaktivierung durch GAPs. Bisher bekannte Rab-GAPs besitzen eine TBC (Tre-2/Bub2/Cdc16)-Domäne, die die Hydrolyse des Guaninnukleotids durch einen Arginin-Glutamin-Zwei-Finger-Mechanismus katalysiert³¹. In menschlichen Zellen gibt es über 40 solcher Proteine, die vermutlich ausreichend für die regulierte Deaktivierung der über 60 Rab-Proteine sind³².

Die Identifikation und Strukturvorhersage von Proteinen mit GEF-Aktivität, basierend auf Aminosäuresequenzanalysen, ist allerdings kaum möglich, da sich diese Proteine auf primärer als auch tertiärer Strukturebene stark voneinander unterscheiden.

Zwei Ausnahmen bilden hier die Familien der DENN- und Vps9-Domänen-Proteine^{20,32}.

Die Proteine der DENN-Familie wurden kürzlich als eine humane GEF-Familie mit 17 Mitgliedern identifiziert, die spezifisch für 10 verschiedenen Rab-Proteine sind³³. Bisher konnten insgesamt über 30 verschiedene GEFs für 20 verschiedene Rab-Proteine identifiziert werden, die sich stark in ihrer Größe und Komplexität unterscheiden und meist spezifisch für ein Rab-Protein sind. Proteine mit GEF-Aktivität sind periphere Multidomänenproteine, die zum Teil durch Bindung von Phosphoinositiden zunächst mit Membranen assoziieren³⁴ und anschließend das entsprechende Rab-Protein aktivieren.

Die spontane Freisetzung von GDP bei Rab-Proteinen ist extrem langsam³⁵ und muss für die Aktivierung von Rab-Proteinen durch GEFs beschleunigt werden. Kinetische und thermodynamische Untersuchungen von GEFs verschiedener GTPase-Familien belegen einen allosterischen Kompletionsmechanismus für die Stimulation des Nukleotidaustausches, wobei das GEF mit dem Nukleotid um die Bindung an die GTPase kompetitiert³⁶⁻³⁸. Ausgehend von einem hochaffinen Komplex aus GTPase:GDP/GTP führt der Mechanismus der GEF-Reaktion zu einem instabilen, ternären GEF:GTPase:GXP-Komplex (GXP: GDP oder GTP). Die Freisetzung des Nukleotids führt zur Bildung eines binären, nukleotidfreien GEF:GTPase-Komplexes, der stabil in Abwesenheit von GDP/GTP ist. Die Bindung von GTP, welches in der Zelle gegenüber GDP im Überschuss vorliegt^{39,40}, führt zur Freisetzung des GEFs und zur Bildung des hochaffinen Komplexes aus GTPase:GTP. Die GTPase liegt nun im aktivierten Zustand vor. Die Bindung eines GEFs an eine GTPase verringert also die Affinität des Nukleotids zur GTPase, wodurch die Dissoziationsrate des Nukleotids erhöht wird und so der Nukleotidaustausch beschleunigt wird¹⁹.

Bisher wurden die katalytischen Domänen vier verschiedener GEFs im Komplex mit dem entsprechenden Rab-Protein strukturell charakterisiert. Der Vergleich dieser Strukturen zeigt, dass diese GEFs, die sich in ihrer dreidimensionalen Struktur voneinander unterscheiden, unterschiedliche Mechanismen der Rab-Erkennung und des Nukleotidaustausch verwenden. Dennoch lassen die strukturellen Veränderungen im

Einleitung

Rab-Protein, die durch das GEF induziert werden, eine Verallgemeinerung auf einen generellen GEF-katalysierten Nukleotidaustauschmechanismus zu (siehe Abbildung 3)^{18,19}. Generell induzieren GEFs strukturelle Veränderungen des Rab-Proteins, die zur Freisetzung des Nukleotids führen. Die GEF-Bindung induziert eine Öffnung der Nukleotidbindungstasche, wichtige Interaktionen zwischen den Phosphatgruppen des Nukleotids und den Aminosäuren des Rab-Proteins werden gestört, das Magnesiumion, das für die hohe Affinität des Nukleotids zum Rab-Protein notwendig ist, wird verdrängt und der P-Loop wird in seiner Konformation stabilisiert (Abbildung 3).

Die Kontaktfläche zwischen Rab-Protein und GEF wird hauptsächlich über Switch 2 gebildet. Die Öffnung der Nukleotidbindungstasche geht mit einer strukturellen Reorganisation von Switch 1 einher. Dabei wird das konservierte Phenylalanin/Tyrosin aus Switch 1 (F37 in Rab1), welches häufig die Guaninbase bedeckt, aus seiner ursprünglichen Position entfernt und führt vermutlich zur Bildung des instabilen GEF:GTPase:GDP-Komplexes.

Das Einführen von Aminosäuren in Bereiche der Mg^{2+} , bzw. Phosphatgruppen von Seiten des GEFs oder die GEF-induzierte Neupositionierung von Aminosäuren des Rab-Proteins, die in Interaktionen mit Mg^{2+} bzw. den Phosphatgruppen involviert sind, führen zur Freisetzung von GDP (Abbildung 3). Der P-Loop erfährt weder eine strukturelle Änderung durch die Bindung des GEFs mit dem Rab-Protein, noch durch die Freisetzung des Nukleotids und bleibt somit in der optimalen Konformation für die erneute Bindung eines Nukleotids. Eine besondere Rolle hat hierbei das P-Loop-Lysin (GxxxxGKS), welches im GTPase:GEF Komplex mit einer negativ geladenen Aminosäure des GEFs oder des DxxGQE (Switch 2) Motivs interagiert und so den P-Loop stabilisiert. Weiterhin bleibt das Aspartat des DxxGQE Motivs während der Katalyse in seiner Konformation unverändert und die für Mg^{2+} -Bindung wichtige Carboxylgruppe des Aspartats bleibt so in ihrer Position⁴¹.

Das Legionellenprotein DrrA ist das erste bekannte bakterielle RabGEF. DrrA ist spezifisch für Rab1 und weist weder Sequenzähnlichkeit zum Rab1-spezifischen GEF TRAPP2 aus Säugerzellen auf, noch zu anderen Proteinen. Ob dieses bakterielle GEF einen Mechanismus ähnlich der Säuger GEFs oder einen völlig neuen Mechanismus für den Nukleotidaustausch benutzt, wurde in dieser Arbeit untersucht. Zudem wurde DrrA als ein bifunktionales Protein mit GEF als auch GDF-Aktivität beschrieben. Beide

Aktivitäten sind in überlappenden Bereichen festgestellt worden^{6,42}. Damit scheint DrrA ein außergewöhnlicher Rab-Bindungspartner zu sein, der die Lokalisation und Aktivierung von Rab1 ermöglicht. Diese Kombination von GEF- und GDF-Aktivität in einem Protein ist bisher noch nicht beobachtet worden. DrrA ist somit ein ideales Modellprotein zur Untersuchung der Freisetzung von Rab1 aus dem Rab1:GDI-Komplex (GDF-Aktivität) und der Aktivierung von Rab1 durch Nukleotidaustausch.

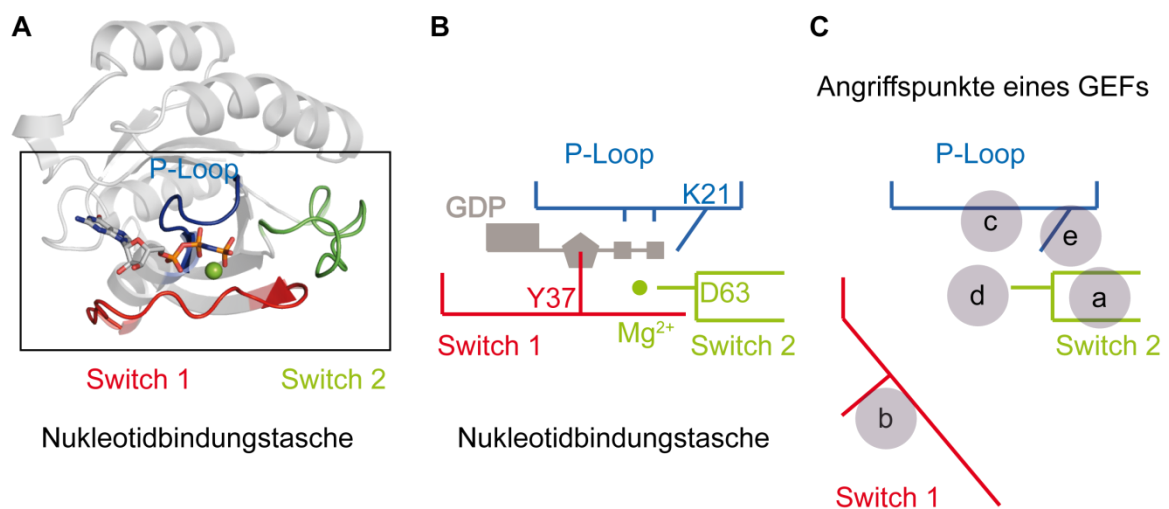


Abbildung 3: Schematische Darstellung des generellen GEF Mechanismus am Beispiel von Rab1. **A)** Bändermodelldarstellung von Rab1. Die Nukleotidbindungstasche wird aus P-Loop (blau), Switch 1 (rot) und Switch 2 (grün) gebildet. **B)** Schematische Darstellung der Nukleotidbindungstasche im GDP-gebundenen Zustand von Rab1. Grau: Guanosindiphosphat, blau: P-Loop, rot: Switch 1, grün: Switch 2. **C)** Angriffspunkte eines GEFs an einem Rab-Protein, die zur Freisetzung des Nukleotids führen. **a)** Die Hauptkontaktfläche zwischen Rab-Protein und GEF wird durch Switch 2 gebildet. **b)** Öffnung der Nukleotidbindungstasche, insbesondere durch eine strukturelle Reorganisation von Switch 1. Dabei wird meist das konservierte F/Y aus Switch 1 (F37 in Rab1), welches die Guaninbase bedeckt, aus seiner ursprünglichen Position entfernt. **c)** Störung der Interaktionen zwischen den Phosphatgruppen des Nukleotids und der Aminosäuren des Rab-Proteins. **d)** Verdrängung von Mg^{2+} und die Stabilisierung der Hydroxylgruppe des Aspartats aus Switch 2 (DxxGQE), welches das Mg^{2+} koordiniert. **e)** Die Stabilisierung des P-Loop-Lysins erfolgt entweder durch einen negativ geladenen Aminosäurerest aus Switch 2 (DxxGQE) des Rab-Proteins oder aus dem GEF. Blau: P-Loop, rot: Switch 1, grün: Switch 2, grüner Kreis: Magnesiumion.

2.2.3 Rab-Effektoren

Rab-Effektoren sind nach der Definition Proteine, die das aktivierte, GTP-gebundene Rab-Protein binden und dadurch zahlreiche Prozesse des vesikulären Transportes einleiten. Das Rab-Bindungsspektrum verschiedener Rab-Effektoren kann sehr

Einleitung

unterschiedlich sein. Manche Rab-Effektoren sind sehr spezifisch für ein einzelnes Rab (Cog4, INPPE5), andere Rab-Effektoren dagegen sind in der Lage, mit bis zu 16 verschiedenen Rab-Proteinen (OCRL (engl.: oculocerebrorenal syndrome of Lowe), INPP5B) zu interagieren⁴³. Andererseits interagieren einzelne Rab-Proteine auch mit einer Vielzahl von Rab-Effektoren, um die diversen Prozesse des vesikulären Transports zu bewerkstelligen. Rab-Effektoren sind zytosolische Proteine und bilden eine heterogene Gruppe von Proteinen mit geringer Sequenzähnlichkeit. Die Rekrutierung von Rab-Effektoren an den jeweiligen Wirkort erfolgt zum einen durch die Bindung eines Rab-Proteins über eine Rab-bindende Domäne (RBD) und/oder über spezifische Markermoleküle auf der Ziellmembran, wie beispielsweise Phosphoinositide^{44,45}. Die Rekrutierung von Rab-Effektoren definiert die funktionale Identität eines Kompartiments, da diese zusammen mit Rab-Proteinen die Prozesse des vesikulären Transportes steuern (siehe Abbildung 1)⁴⁶.

Die bisher strukturell charakterisierten Rab-Effektoren binden das entsprechende Rab-Protein hauptsächlich über eine (Rab3a:Rabphilin3A⁴⁷) oder zwei α -Helices⁴⁸⁻⁵³. Eine Ausnahme bilden die Rab-Effektoren OCRL und EEA1 (engl.: early endosomal antigen, Abbildung 4). OCRL bindet das Rab-Protein über ein β -Faltblatt und eine α -Helix³⁰. Die Rab-Bindung durch EEA1 erfolgt mittels eines Zink-Finger-Motives über 2 kleine β -Faltblätter und eine α -Helix⁵⁴. Die Effektoren interagieren meist mit Aminosäuren des Rab-Proteins aus Switch 2, dem Interswitch-Bereich und Switch 1, sowie mit Resten der hydrophoben Triade oder Aminosäuren in deren Nähe (Abbildung 4). Eine Ausnahme bildet auch hier OCRL. Das Tryptophan der hydrophoben Triade von Rab8 wird nicht von OCRL kontaktiert. Dies ist vermutlich der Grund, für das breite Rab-Bindungsspektrum von OCRL³⁰.

Die Kontakthelices der Effektoren, dessen Strukturen bekannt sind, sind parallel zur Kontakthelix von Rabphilin-3A angeordnet (GCC185, RILP, FIP2, FIP3) oder zeigen eine um etwa 45° dazu gedrehte (Rabaptin-5, Rabenosyn-5) Orientierung. Typisch für die Rab-bindenden Domänen der Rab-Effektoren sind *coiled coil* Strukturen. Diese bilden entweder homodimere *coiled coil* Strukturen mit einer 2:2 (*coiled coil*:Rab) Bindungsstöchiometrie (Rab6:GCC185⁵⁵, Rab5:Rabaptin-5⁴⁸, Rab11:FiP2⁵¹, Rab11:FIP3⁵⁶, Rab7:RILP⁵⁰) oder monomere, asymmetrische, helikale Haarnadeln mit einer 1:1 Bindungsstöchiometrie (Rab5:Rabenosyn-5⁵⁷, Abbildung 4).

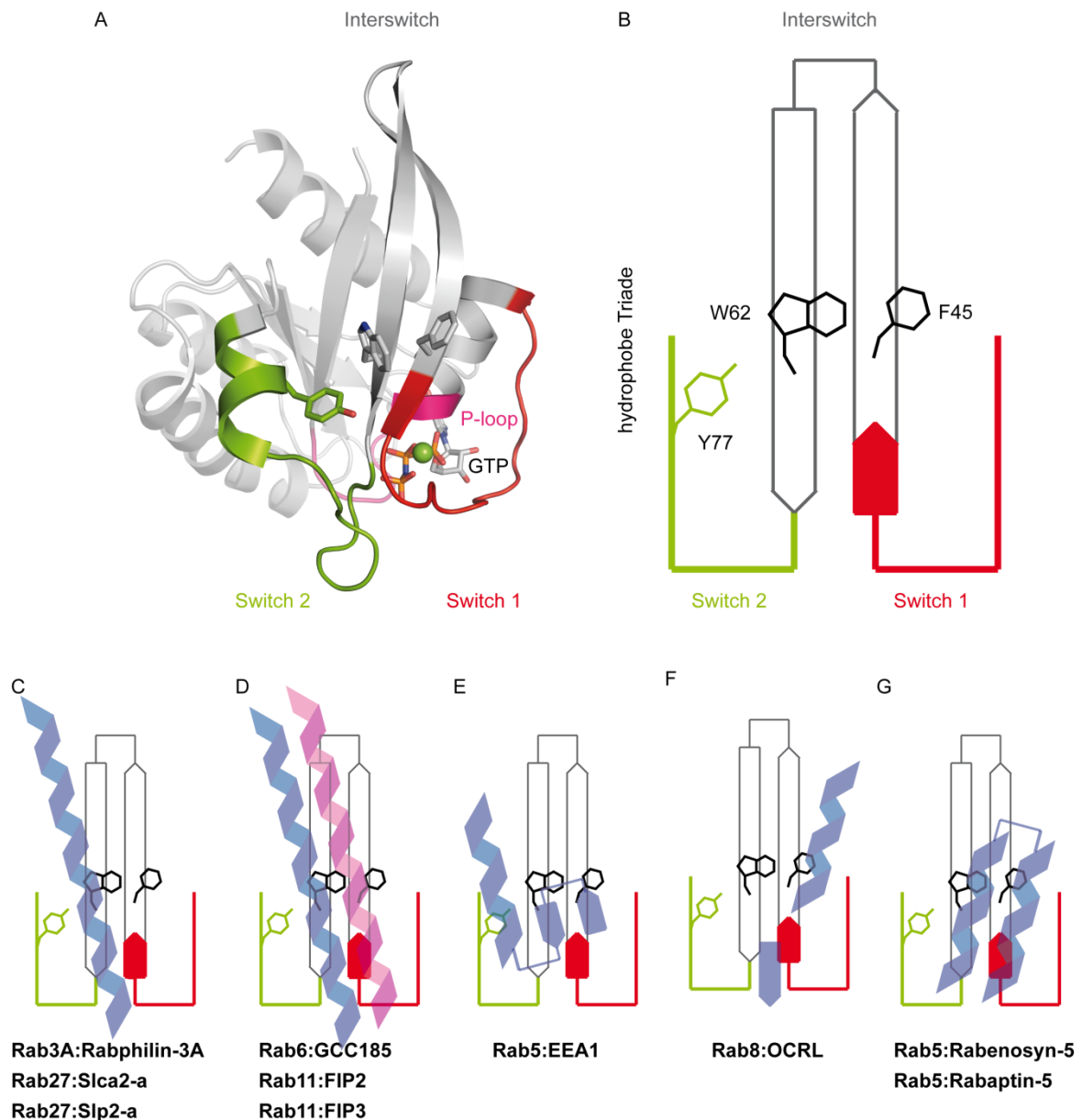


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Bindungsvarianten verschiedener Rab:Rab-Effektor Komplexe. **A)** Kristallstruktur von Rab1:GTP. Der Interswitch-Bereich (grau) verbindet Switch 1 (rot) und Switch 2 (grün). **B)** Schematische Darstellung der Strukturmerkmale und der Aminosäuren der hydrophoben Triade des Rab-Proteins, die in der Rab-Effektor-Bindung beteiligt sind. **C)** Rab3a:Rabphilin-3A, **D)** Rab6:GCC185, **E)** Rab5:EEA1, **F)** Rab8:OCRL, **G)** Der Rab5:Rabenosyn-Komplex zeigt eine 2:2 Bindungsstöchiometrie. Das zweite Rab5 ist der Übersichtlichkeit halber nicht dargestellt.

Einige der Rab-Effektoren besitzen zudem mehrere separate Bindungsdomänen für unterschiedliche kleine GTPasen. Rabaptin-5 hat N- und C-terminale *coiled coil* RBDs für Rab4 und Rab5⁵⁸. Rabenosyn-5 bindet Rab5 über einen C₂H₂-Zn²⁺-Finger am N-Terminus und bindet zusätzlich Rab4/14 und Rab5/22/24 über eine zentrale, bzw. C-terminale

Einleitung

Haarnadel RBD^{54,59,60}. FIP3 besitzt eine zentrale und C-terminale Bindungsdomäne für Arf6 und Rab11⁶¹. GCC185 besitzt RBDs für Rab6 und Rab9 nahe einer GRIP-Domäne, über die Arl1 bindet. Interessanterweise führt die Bindung von Rab6 an GCC185 zu einer erhöhten Affinität für Arf gegenüber GCC185, wohingegen die Bindung von Rab9 den entgegengesetzten Effekt hat⁵⁵. Rab6IP1 bindet Rab11 und Rab6⁶². OCRL besitzt eine RBD, die von 16 verschiedenen Rab-Proteinen gebunden werden kann⁴³. Die multivalenten Bindungseigenschaften mancher Effektoren lassen vermuten, dass diese Effektoren die Signalwege unterschiedlicher Transportwege kombinieren und koordinieren⁶³.

2.2.4 Rab1 im vesikulären Transport zwischen ER und Golgi-Apparat

Rab1 ist ein zentraler Regulator des frühen sekretorischen Transports in eukaryotischen Zellen und ist der Angriffspunkt mehrerer Legionellen T4SS-Substrate. Rab1 reguliert das Tethering und die Fusion von ER-Vesikeln mit dem ERGIC (engl.: endoplasmic reticulum Golgi intermediate compartment) und dem Golgi-Komplex und ist entscheidend für die Biogenese des Golgi-Apparats⁶⁴⁻⁶⁷.

Viele Rab1-Interaktionspartner des frühen sekretorischen Transports sind identifiziert, dennoch ist der Ablauf des Transports zwischen ER und Golgi noch nicht geklärt. Legionellen manipulieren gezielt diesen Transportabschnitt. Das Legionellenprotein DrrA rekrutiert Rab1 an die LCV und aktiviert es dort. Für das Legionellenprotein LidA wird vermutet, die Funktion eines Tetheringfaktors zu besitzen und zusammen mit Rab1 ER-Vesikel an die LCV zu rekrutieren, wodurch der Vesikeltransport zur LCV umgeleitet wird. Der Ablauf des Tetheringprozesses ist allerdings weder strukturell noch biochemisch untersucht.

Es existieren zwei Klassen von Tetheringfaktoren: Lange *coiled coil*-Proteine und große Komplexe aus mehreren Proteineinheiten⁶⁸. Fast alle Tetheringfaktoren interagieren mit Rab-Proteinen⁶⁹. Zur ersten Gruppe zählen p115 (Uso1p in Hefe), EEA1 (engl.: early endosome antigen1) und die Golgine. Zur zweiten Gruppe gehören der Exozyst, TRAPP1, TRAPP2, der COG-Komplex (engl.: conserved oligomeric Golgi), CORVET-Komplex (engl.: class C core vacuole endosome transport) und der HOPS-Komplex (homotypic fusion and vacuole protein sorting (HOPS)/vacuole protein sorting (VPS)). *Coiled coil*-

Tetheringfaktoren sind meist lange stabähnliche Moleküle und stellen den initialen Kontakt über eine größere Distanz zwischen dem Vesikel und der Zielmembran her.

Der Prozess des Anheftens wird meist durch die Interaktion von zwei oder drei verschiedenen Tetheringfaktoren eingeleitet. Das vesikelassoziierte Protein p115 interagiert beispielsweise mit dem am Golgi-lokalisierten Komplex aus dem Golgin GM130 und GRASP65⁶⁸. Diese drei Moleküle sind zudem Rab1-Effektoren^{65,70}.

Das Modell des Rab1-vermittelten Vesikeltransports vom ER zum Golgi ist in Abbildung 5 gezeigt. Rab1 wird am ER von einem bisher unbekanntem GEF aktiviert. Aktiviertes Rab1 rekrutiert p115 zur ER-Austrittsstelle (engl.: ER-exit sites, ERES)⁶⁷, wo das Vesikel in einem COPII-Hüllprotein vermittelten Prozess abgeschnürt wird. Auf dem Vesikel ist p115 anschließend für das Anheften des ER-Vesikels am ERGIC verantwortlich⁷¹. Nach erfolgter Fusion des Vesikels mit dem ERGIC wird vom ERGIC ein weiteres Vesikel abgeschnürt, das zum cis-Golgi transportiert wird.

Für den Transport vom ERGIC zum Golgi existieren zwei mögliche Szenarios: 1. Der TRAPP-Komplex aktiviert Rab1 am ERGIC und aktiviertes Rab1 bindet anschließend p115 am ERGIC. Das Abschnüren und der Transport vom ERGIC ist bisher noch unklar, aber erfolgt möglicherweise COP1-vermittelt. Das Anheften des Vesikels am cis-Golgi erfordert die Interaktion von Rab1:p115 mit GM130-GRASP65⁷². Im zweiten Szenario pendelt der GM130:GRASP65-Komplex zwischen ERGIC und cis-Golgi⁷³. Aktiviertes Rab1 auf dem ERGIC bindet den GM130-GRASP65-Komplex und induziert die Abschnürung eines Vesikels. Das Anheften am cis-Golgi erfolgt über die Wechselwirkung von GM130:GRASP65 mit dem Komplex aus p115, Rab1 und dem Transmembranprotein Giantin am cis-Golgi^{74,75}. Nach der Assoziation mit der Membran erfolgt in allen Fällen die SNARE-vermittelte Fusion, die die Katalyse von p115 benötigt^{76,77}.

Einleitung

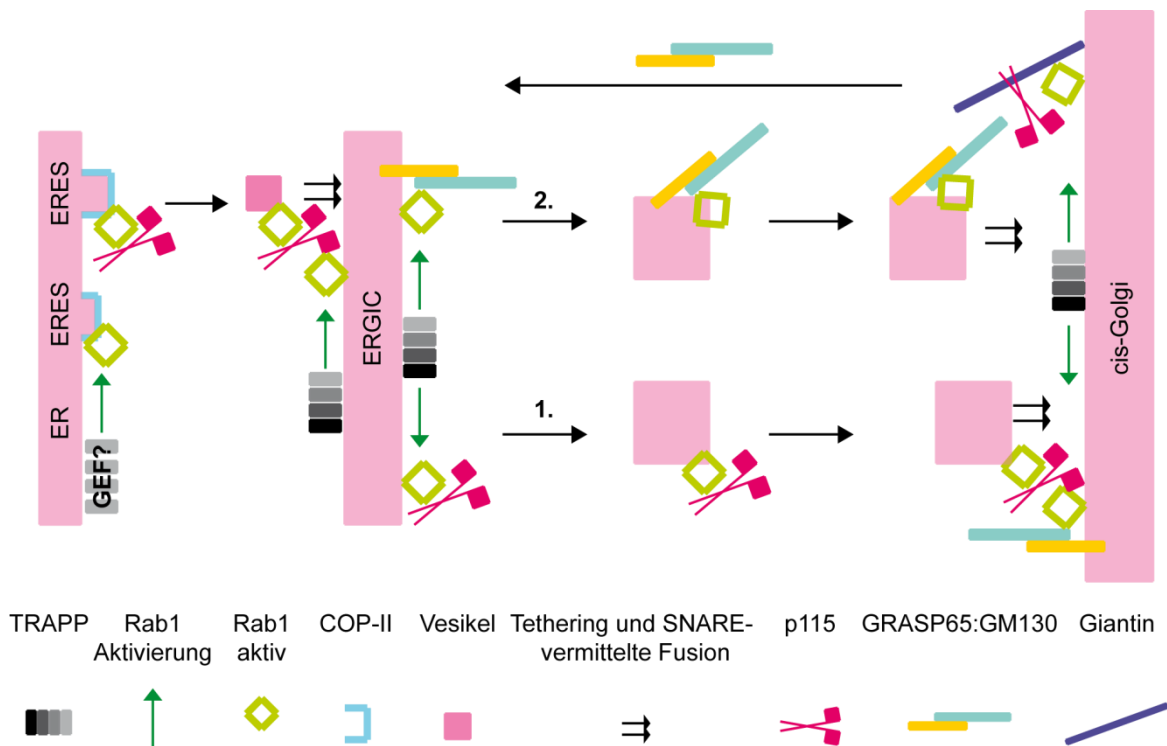


Abbildung 5: Darstellung des frühen sekretorischen Transports (von links nach rechts). Rab1 wird von einem bisher unbekanntem GEF am ER aktiviert und rekrutiert den Tetheringfaktor p115 zu ER-Austrittsstellen. In einem COP2-abhängigen Prozess kommt es zum Abschnüren des Vesikels. Rab1 wird am ERGIC durch den TRAPP-Komplex aktiviert und durch Interaktion mit p115 auf dem Vesikel wird dieser an das ERGIC geheftet und anschließend erfolgt die SNARE-vermittelte Fusion. Ausgehend vom ERGIC werden erneut Vesikel abgeschnürt und zum cis-Golgi transportiert. Hierbei existieren 2 mögliche Szenarios. **1)** TRAPP-aktiviertes Rab1 rekrutiert p115, das Vesikel wird abgeschnürt und am cis-Golgi erfolgt das Tethering durch Wechselwirkungen von p115 mit dem Komplex aus aktiviertem Rab1:GM130:GRASP65. **2)** Der GM130:GRASP65 pendelt zwischen ERGIC und cis-Golgi. Rab1 am ERGIC bindet GM130:GRASP65 und es kommt zur Abschnürung des Vesikels. Das Anheften des Vesikels erfolgt durch Wechselwirkungen von GM130 mit p115 und dem Transmembranprotein Giantin am cis-Golgi. ER:Endoplasmatisches Retikulum, ERES = engl.: ER-exit sites (ER-Austrittsstelle).

Tetheringfaktoren der Wirtszelle, wie p115 und GM130, sind bisher nicht auf dem legionellenhaltigen Kompartiment (LCV) identifiziert worden⁷⁸. Da das Legionellenprotein LidA an der Rekrutierung von ER-Vesikel involviert ist, wird angenommen, dass LidA die Funktion eines legionelleneigenen Tetheringfaktors hat. Der Ablauf des LidA-vermittelten Tetheringprozesses und die Erkennung des ER-Vesikel durch LidA sind noch unbekannt. LidA, wie auch DrrA, werden auf der LCV durch die Bindung von Phosphoinositiden verankert. Auf diese Glycerophospholipide wird im folgenden Kapitel eingegangen.

2.3 Phosphatidylinositolphosphate definieren die Membranidentität

Phosphoinositide (PIs) gehören zu der Gruppe der Glycerophospholipiden, die die Hauptbestandteile von eukaryotischen Membranen bilden. Unter den Glycerophospholipiden besitzen Phosphoinositide, trotz ihres geringen Anteil von weniger als 10% der totalen zellulären Phospholipide, eine bedeutende Rolle in der Generierung der individuellen Membranidentitäten von Organellen und sie besitzen u.a. eine Schlüsselrolle im vesikulären Transport. Die Rekrutierung von Komponenten der Transportmaschinerie an die entsprechenden Membranen wird unter anderem durch Phosphoinositide gewährleistet⁷⁹.

PIs sind phosphorylierte Derivate des Phosphatidylinositols, welches aus zwei hydrophoben Lipidketten und einem D-myo-Inositol besteht, die über zwei Ester, bzw. einem Phosphosäurediester mit Glycerin verknüpft sind. Sieben biologisch relevante Phosphatidylinositole werden durch reversible Phosphorylierungen/Dephosphorylierungen an den 3'-, 4'- und/oder 5'-Hydroxylgruppen des Inositols von PI-Kinasen/PI-Phosphatasen erzeugt.

PIs sind nicht homogen auf den Organellen verteilt, sondern ein organellspezifischer Satz aus PI-Kinasen und PI-Phosphatasen synthetisiert das für das jeweilige Organell charakteristische PI.

PI4P ist typisch für den exozytotischen Weg. Ein hoher PI4P-Gehalt und geringe Mengen PI(4,5)P₂ sind charakteristisch für den Golgi-Apparat. Die Plasmamembran besitzt einen hohen Gehalt an PI(4,5)P₂ und geringe Mengen PI4P. PI3P ist auf endozytotischen Organellen zu finden. PI3P kennzeichnet frühe Endosomen und internalisierte Vesikel in späten Endosomen. Späte Endosomen enthalten PI(3,5)P₂. Eine Mischung aus PI(3,4,5)P₃ und PI(4,5)P₂ ist typisch für phagozytotische Membranbereiche (Abbildung 6)⁷⁹. Die Verwendung der monophosphorylierten Lipide PI4P bzw. PI3P für den exozytotischen bzw. den endozytotischen Transportweg weist möglicherweise auf ein evolutionär bedingtes organisatorisches Prinzip des Membrantransport hin⁸⁰.

Einleitung

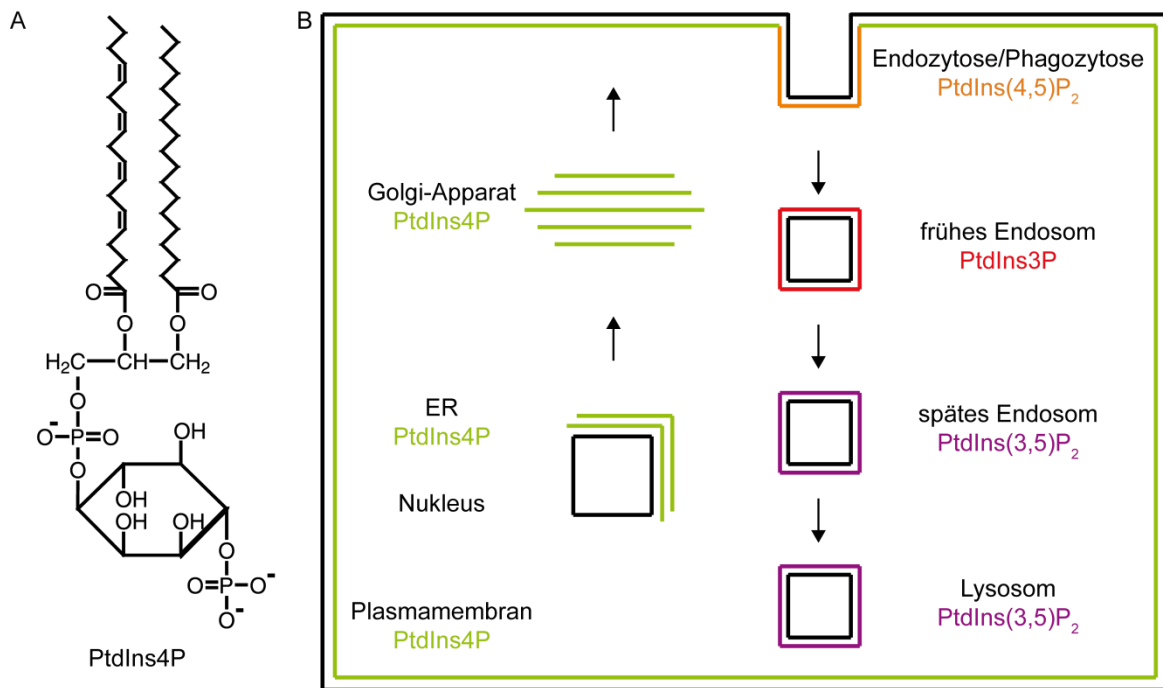


Abbildung 6: A) Darstellung von Phosphatidylinositol-4-phosphat (PI4P). B) Charakteristische Verteilung von Phosphoinositiden auf Organellen innerhalb der eukaryotischer Zelle. grün: Phosphatidylinositol-4-Phosphat, orange: Phosphatidylinositol-(4,5)-Diphosphat, rot: Phosphatidylinositol-3-Phosphat, lila: rot: Phosphatidylinositol-(3,5)-Diphosphat

Die Bildung der Membranidentität beruht auf der Anwesenheit von PI-metabolisierenden Enzymen auf dem jeweiligen Organell. Diese meist zytosolischen Enzyme werden häufig durch kleine GTPasen an das Organell rekrutiert oder aktiviert (Arf1 rekrutiert PI4K β zum Golgi-Komplex⁸¹; Rab5 aktiviert PI(3)Ks auf Endosomen⁸²). Auch GTPase-Effektorproteine können die Synthese und den Umsatz von PIs beeinflussen und PI-Pools an einer Membran stabilisieren (der Rab5-Effektor EEA1 bindet PI3P, das zuvor durch die PI3-Kinase, einem weiteren Effektor von Rab5 generiert wurde⁸³).

Der Phosphorylierungs-/Dephosphorylierungs-Zyklus von PIs könnte daher dem Zyklus der GTPasen untergeordnet sein, wodurch GTPasen möglicherweise die temporäre und lokale Kontrolle der PIs auf Organellen übernehmen⁷⁹.

Einige intrazelluläre Pathogene haben Strategien entwickelt, um dem üblichen zellulären Schicksal zu entgehen, indem sie den Abbau im Lysosom verhindern. Durch die Erzeugung einer Membranidentität, die sich von denen des frühen oder des späten Endosoms unterscheidet, wird die Fusion mit Lysosomen verhindert. Dem Pathogen gelingt auf diese Weise die Integration in das Endomembransystem der Wirtszelle und

bildet unerkannt von Abwehrmechanismen des Wirts ein replikationspermissives Kompartiment⁸⁴⁻⁸⁶.

Das pathogene Bakterium *Mycobacterium tuberculosis*, beispielsweise sekretiert nach erfolgter Phagozytose das Enzym SapM, das PI3P auf dem Phagosom dephosphoryliert und damit die endosomale Reifung verhindert. Auf diese Weise wird die Fusion mit dem Lysosom unterdrückt⁸⁷.

Salmonellen dagegen stoppen die Reifung zu einem späteren Zeitpunkt. Zunächst fusionieren weiterhin frühe Endosomen mit dem Phagosom und vergrößern so das Salmonellen enthaltende Kompartiment. Salmonellen sekretieren dann die Phosphatase SopB, welches wahrscheinlich PI(3,5)P₂ auf der Endosomenmembran dephosphoryliert, wodurch der PI3P-Gehalt auf der Membran aufrechterhalten wird. Dadurch wird der für das späte Endosomen charakteristische PI(3,5)P₂-Gehalt unterdrückt und die Fusion mit dem Lysosom kann nicht stattfinden⁸⁸.

PI4P ist ein Bestandteil der LCV und wird Icm/Dot-abhängig auf bislang unbekannte Weise gebildet⁸⁹. PI4P ist charakteristisch für das ER, den trans-Golgi und die Plasmamembran. Die LCV besitzt somit eine Membranidentität, die ähnlich zu Kompartimenten des frühen sekretorischen Weges ist. Einige der T4SS-Substrate werden durch die spezifische Bindung zu PI4P auf der LCV verankert⁹⁰. Legionellen nutzen bzw. modulieren den PI-Wirtsmetabolismus, um T4SS-Substrate auf der LCV zu verankern.

2.3.1 Phosphatidylinositolphosphat-bindende Proteindomänen

Intrazelluläre Membranen enthalten in unterschiedlichem Ausmaß anionische Lipide und können unspezifisch mit der Mehrheit der lipidbindenden Proteindomänen über kationische Oberflächenbereiche interagieren⁹¹. Lipidbindende Proteine haben in der Regel weitere Mechanismen der Membranassoziation, worüber die Wechselwirkung des Proteins mit der Membran kontrolliert wird. Die Assoziation von Proteinen mit Membranen kann beispielsweise relativ unspezifisch aufgrund von Ladung oder Krümmung erfolgen. Diese Assoziation führt potentiell zur Assoziation des Proteins mit allen intrazellulären Membranen. Die Spezifität einer solchen Bindung kann temporär durch die Anwesenheit eines für Bindung notwendigen sekundären Botenstoff, wie beispielsweise Ca²⁺, erhöht werden. Hat das Protein eine Präferenz für stark gekrümmte

Einleitung

Membranen, kann dies die lokale Spezifität einer unspezifischen Assoziation des Proteins mit einer Membran erhöhen⁹². Die häufigste Art der Assoziation eines Proteins mit einer Membran ist aber die spezifische Erkennung von seltenen Membranlipiden, beispielsweise die Kopfgruppe eines bestimmten Phosphoinositides⁷⁹. Die Rekrutierung der PI-bindenden Domäne an eine Membran, die das entsprechende PI enthält, wird durch den Ort und den Zeitpunkt der Synthese des PIs auf der Membran bestimmt. Die Membranassoziation von PI-bindenden Domänen erfolgt über eine Kombination aus spezifischer Erkennung der Kopfgruppe des Lipids, elektrostatischer Anziehung zur negativ geladenen Membranoberfläche und/oder der Penetration von hydrophoben Proteinbereichen in die Membran⁹³.

Mindestens 10 verschiedene lipidbindende Domänen, die sich in ihrer dreidimensionalen Struktur unterscheiden, binden Phospholipide auf Membranoberflächen. Dazu zählen die C1 (Zn²⁺-Finger), C2 (β -Sandwich), PH (β -Sandwich), FYVE (Zn²⁺-Finger), PX (α/β -Struktur), ENTH (α -helikales Solenoid), ANTH (α -helikales Solenoid), BAR (ausgedehnte α -helikale Bündel), FERM- (drei Unterdomänen aus α/β -Strukturen) und PDZ-(β -Sandwich) Domänen⁹².

Die FYVE- und PX-Domänen assoziieren spezifisch mit PI3P-positiven Membranen des endozytotischen Weges. Stellvertretend wird die Kristallstruktur der FYVE-Domäne aus EEA1 (engl.: early endosome antigen-1) im Komplex mit Ins(1,3)P₂ vorgestellt (Abbildung 7). EEA1 ist ein Tetheringfaktor und bindet PI3P und Rab5 auf Phagosomen und frühen Endosomen und vermittelt zusammen mit SNARE-Proteinen die homotypische Fusion von frühen Endosomen⁸³. Die gleichzeitige Bindung von Phosphoinositiden und aktivierter GTPasen lokalisiert periphere Membranproteine mit lipidbindender Domäne präzise an subzelluläre Kompartimente.

2.3.2 Beispiel der PI3P-Bindung durch die FYVE-Domäne von EEA1

FYVE-Domänen (**F**ab1, **Y**GL023, **V**ps27, **E**EA1) erkennen spezifisch und ausschließlich PI3P auf Endosomen, multivesikuläre Körpern und Phagosomen. Wie alle FYVE-Domänen ist auch die FYVE-Domäne von EEA1 eine Zn²⁺-Finger-Domäne aus etwa 70 Aminosäuren (Abbildung 7)⁹⁴. Die FYVE-Struktur besteht aus zwei β -Haarnadeln und einer kleinen C-terminalen α -Helix, die durch zwei Zn²⁺-Ionen zusammengehalten werden.

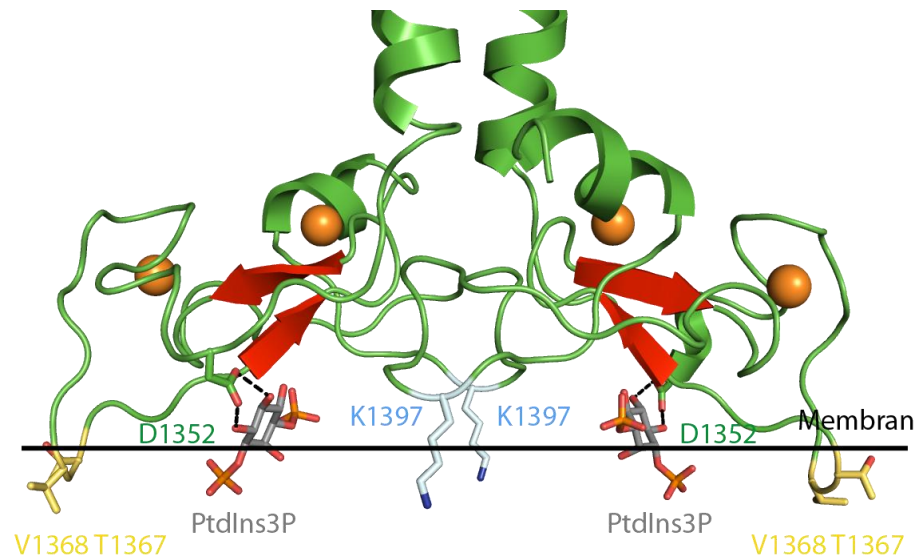


Abbildung 7: Kristallstruktur der dimerisierten FYVE-Domäne aus EEA1. grün: EEA1, gelb: Aminosäuren, die vermutlich in die Membran insertieren, hellblau: Lysinreste, die vermutlich mit der negativ geladenen Membran wechselwirken, orange: Zn^{2+} -Ionen, grau: Kopfgruppe von PI3P. PDB: 1JOC⁹⁴.

Die PI3P-Bindungstasche wird durch Aminosäuren eines konservierten Motivs (RR/KHHCR) im ersten β -Faltblatt gebildet. Die Aminosäuren dieser Sequenz bilden nahezu alle direkte Wasserstoffbrücken zwischen der FYVE-Domäne und PI3P. Diese PI3P-Bindungstasche in EEA1 ist gerade groß genug, um PI3P spezifisch zu binden. Die Bindung von di- oder triphosphorylierten PIs ist nicht möglich. Aspartat 1352 bildet in der Bindungstasche Wasserstoffbrücken zu den 5' und 6' Hydroxylgruppen des Inositols von PI3P und ermöglicht so die Diskriminierung zwischen PI3P und PI5P. Die Bindung von PI3P induziert eine strukturelle Änderung der FYVE-Domäne, so dass ein Loop der FYVE-Domäne die Membran penetriert, hierbei sind vermutlich die Reste T1367 und V1368 beteiligt. Es wird vermutet, dass K1397 unspezifisch über elektrostatische Wechselwirkungen mit der Membran interagiert. Eine effiziente endosomale Rekrutierung erfolgt jedoch, wie in den meisten Fällen der FYVE-Domänen, erst nach der Dimerisierung der FYVE-Domäne. Erst die multivalente Bindung mehrerer PI3P auf der Membran ermöglicht die korrekte Rekrutierung einiger FYVE-Domänen auf eine PI3P-positive Membran^{92,95,96}. Im Fall von EEA1 erfolgt die Dimerisierung über eine *coiled coil*-Domäne außerhalb der FYVE-Domäne. Die Rab5-Bindung erfolgt über einen weiteren

Einleitung

Zn²⁺-Finger, der 1300 Aminosäuren entfernt am N-Terminus von EEA1 liegt⁵⁹ (Abbildung 4).

2.4 Legionella pneumophila

Bei einem Treffen der American Legion in Philadelphia im Jahr 1976 erkrankten 182 Veteranen an grippeähnlichen Symptomen und Lungenentzündungen unbekannter Ursache. 29 der 182 erkrankten Veteranen verstarben⁹⁷. In den folgenden Monaten konnte ein Gram-negatives Bakterium als Verursacher der Epidemie identifiziert werden und erhielt den Namen *Legionella pneumophila*⁹⁸. Von den über 50 Legionella-Gattungen sind mindestens 24 mit Krankheiten beim Menschen assoziiert.

Legionellen sind, mit Ausnahme der im Erdboden vorkommenden Gattung *Legionella longbeachae*, ubiquitäre Frischwasserbakterien⁹⁹. Legionellen sind stäbchenförmige, Gram-negative, opportunistische Bakterien und leben in Symbiose mit einer Vielzahl von Protozoen, in denen sie sich intrazellulär vermehren¹⁰⁰.

Das aus evolutionärer Sicht breite Wirtsspektrum der prokaryotischen Legionellen umfasst einzellige Protisten und Säugermakrophagen und zeigt damit die Adaption des Bakteriums an konservierte Signalwege der eukaryotischen Wirtsspezies. Ideale Wachstumsbedingungen finden Legionellen in Warmwasseranlagen, Klimaanlage und Whirlpools bei Temperaturen von weniger als 70°C. Die Infektion erfolgt durch das Einatmen von legionellenhaltigen Aerosolen. In der Lunge werden Legionellen durch Phagozytose von Lungenmakrophagen aufgenommen. Es gibt zwei Krankheitsverläufe, nämlich die Legionärskrankheit, eine atypische, interstitielle Pneumonie mit Fieber und Durchfällen, die häufig immungeschwächte Menschen (Alkoholiker, HIV-Erkrankte) betrifft, sowie das Pontiac-Fieber, eine akute, respiratorische Erkrankung mit grippeähnlichen Symptomen, die meist nach sieben Tagen spontan ausheilt. Interessanterweise ist der Mensch als Wirt für das Bakterium eine Sackgasse, da bisher noch keine Mensch-zu-Mensch-Übertragung von Legionellen beobachtet wurde¹⁰¹.

2.4.1 Der Legionellen-Infektionszyklus

Erste elektronenmikroskopische Untersuchungen aus dem Jahr 1983 zeigten bereits, dass *Legionella pneumophila* die Reifung in Endosomen und den damit einhergehenden Abbau in Lysosomen umgeht (Abbildung 8). Es konnten keine Lysosomen-typische Markerproteine in der LCV nachgewiesen werden¹⁰² und die LCV erwies sich als resistenter gegen Ansäuerung im Vergleich zu Vakuolen von *Escherichia coli*¹⁰³. Nach der Aufnahme in eine phagozytotische Wirtszelle befindet sich die Legionelle in einer Vakuole, dessen Membran von der Plasmamembran stammt (Abbildung 8). Innerhalb der ersten fünf Minuten werden vom ER-stammende Vesikel an die LCV rekrutiert¹⁰⁴ und diese beginnen entlang der LCV-Membran abzuflachen. Nach 15 Minuten ist die LCV fast vollständig mit Vesikeln bedeckt, Mitochondrien sind in der Nähe der LCV lokalisiert und der Durchmesser der LCV-Membran nimmt von 70 Å auf 60 Å ab. Mit einer Membranschichtdicke von 60 Å entspricht die LCV-Membran dem typischen Durchmesser einer ER-Membran¹⁰⁵, zudem erhöht sich der PI4P-Gehalt auf der LCV und ähnelt damit der Lipidkomposition der ER Membran. Nach 4 Stunden enthält die LCV ER-assoziierte Proteine und Ribosomen sind in einem Abstand von etwa 100 Å zur LCV lokalisiert^{106,107}.

Ein auffälliges Merkmal der LCV sind äußerst stabile, dünne haarähnliche Verbindungen, über die die Vesikeln mit der LCV befestigt sind. Die genaue Funktion und Identität dieser Strukturen ist noch unbekannt¹⁰⁸. Die LCV reift somit während der Infektion zu einem Kompartiment mit einer Membranidentität ähnlich des ERs. Nach der Fusion mit dem endoplasmatischem Retikulum ist die LCV replikationskompetent (Abbildung 8)¹⁰⁹.

Einleitung

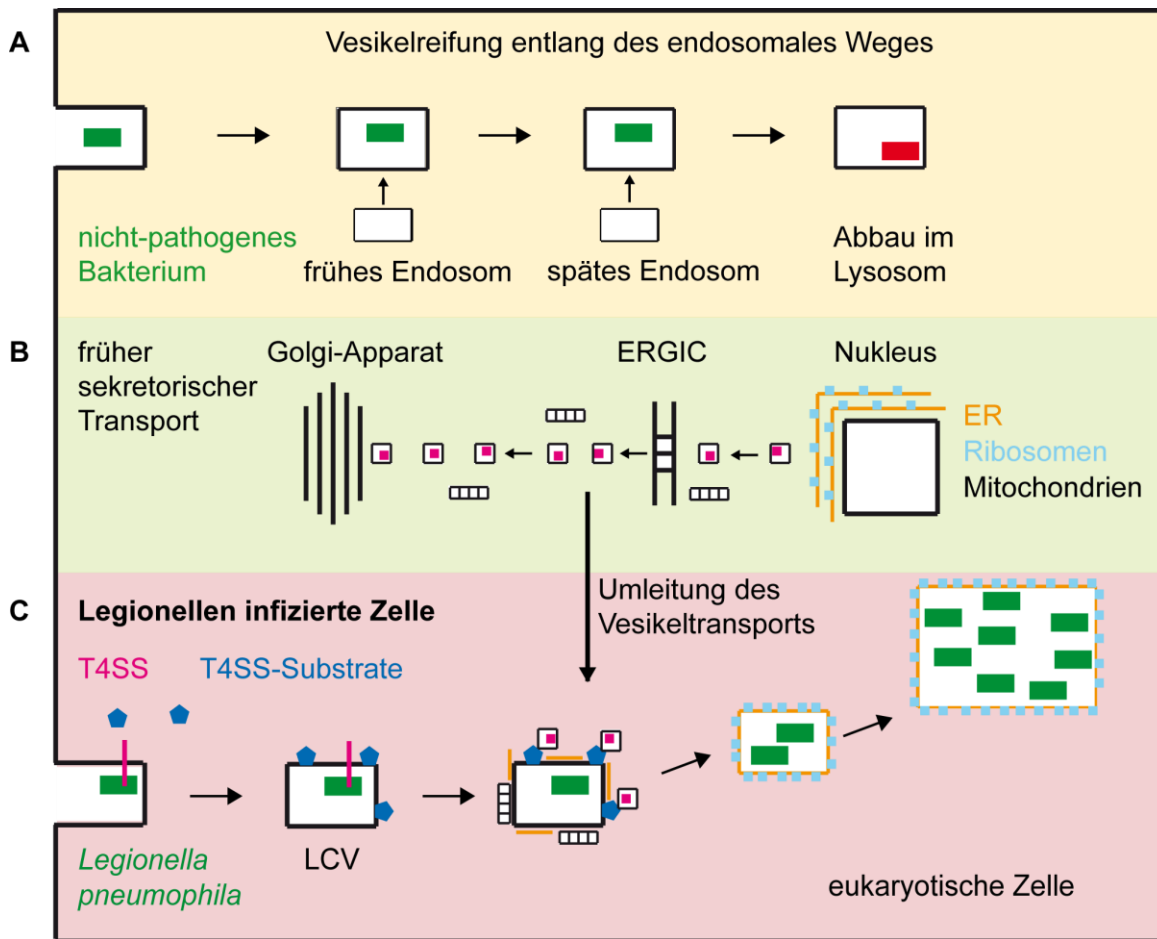


Abbildung 8: Schematische Darstellung der Vesikelreifung und des frühen sekretorischen Transportes in normalen Zellen und in legionelleninfizierten Zellen. **A)** Ein nicht-pathogenes Bakterium wird durch Phagozytose in die Zelle aufgenommen. Das Bakterium enthaltende Vesikel reift entlang des endosomalen Weges durch Fusion mit frühen und späten Endosomen. Im Lysosom erfolgt der Abbau des Bakteriums. grün: nicht-pathogenes Bakterium; rot: verdautes Bakterium **B)** Schematische Darstellung des frühen sekretorischen Transportes von rechts nach links. Neu synthetisierte Proteine und anderes Material werden vom ER zunächst vesikelvermittelt zum ER-Intermediate Kompartiment (ERGIC) und anschließend Golgi-Apparat transportiert. **C)** Infektionszyklus von *Legionella pneumophila*. Während der Aufnahme in die Zelle injiziert Legionella über das Typ 4 Sekretionssystem (T4SS) (pink) T4SS-Substrate (dunkelblau) in die Wirtszelle. Diese binden zum Teil auf der LCV (engl.: *Legionella containing vacuole*) und manipulieren den Wirtsstoffwechsel. Hier dargestellt ist die Manipulation des vesikulären Transports. T4SS-Substrate auf der LCV rekrutieren ER-Vesikel. Im Verlauf der Infektion dekorieren Mitochondrien, ER-Membranen und später Ribosomen die LCV. Die replikationspermissive LCV zeichnet sich durch eine ER-ähnliche Membranzusammensetzung aus, die letztendlich in das ER integriert.

2.4.2 Legionellenproteine manipulieren die Wirtszelle

Das Genom von Legionellen kodiert über 280 bisher identifizierte Proteine, von denen einige in der Manipulation von Signalwegen, der Apoptose und des vesikulären Transports der Wirtszelle involviert sind^{110,111}. Simultan zur Aufnahme in die Zelle werden diese Legionellenproteine über das Dot/Icm-Type-4-Sekretionssystem (T4SS) in die Wirtszelle injiziert. Das T4SS wird von 27 Genen kodiert und bildet einen Bakterien- und LCV-Membran durchspannenden Sekretionsapparat, der Proteine und DNA in die Wirtszelle transportiert¹¹¹.

Bei den T4SS-Substraten handelt es sich um lösliche Proteine. Einige dieser T4SS-Substrate interagieren mit Rab-Proteinen und sind beispielsweise in der Manipulation des Rab1-vermittelten frühen sekretorischen Weges zwischen ER und Golgi-Apparat involviert. Zusätzlich zu den Rab1-kontrollierten Transportprozessen scheinen noch weitere Transportrouten der eukaryotischen Zelle während einer Infektion mit Legionellen zur LCV umgeleitet zu werden, da auch Rab7 (späte Endosomen), Rab8 (Plasmamembran) und Rab14 (Lysosom) auf der LCV zu finden sind¹¹².

Einige der T4SS-Substrate von Legionellen sind in der Lage, den GDP/GTP-Zyklus von Rab1 zu steuern. Das Rab1-regulierende DrrA und der Rab1-Effektor LidA aus Legionellen werden im Folgenden beschrieben.

2.4.3 DrrA: Ein Legionellenprotein mit GEF- und GDF-Aktivität

Zu Beginn der vorliegenden Doktorarbeit wurde berichtet^{2,6}, dass das Legionellenprotein DrrA, auch SidM genannt, ein bifunktionales Protein mit GEF- und GDF-Aktivität für Rab1 sei, welches für die Rekrutierung von Rab1 an die LCV (GDF-Aktivität) und die dortige Aktivierung (GEF-Aktivität) verantwortlich ist (Abbildung 10).

Da der Mechanismus der Rekrutierung von Rab-Proteinen an die jeweilige Zielmembran bisher noch unklar ist, war DrrA damit sofort im Fokus für weitergehende biochemische und strukturelle Untersuchungen. DrrA ist nach Yip3 erst das zweite Protein, worüber berichtet wurde, dass es in der Lage sei, ein Rab-Protein an eine Zielmembran zu lokalisieren^{2,3,17}. DrrA ist im Gegensatz zum integralen Membranprotein Yip3 ein lösliches Protein und daher sehr gut geeignet, um den GDF-Mechanismus biochemisch und strukturell zu untersuchen. Weiterhin handelt es sich bei DrrA um das erste

Einleitung

bakterielle RabGEF, was die Frage aufwirft, ob DrrA einen ähnlichen Nukleotidaustauschmechanismus wie eukaryotische RabGEFs hat oder ob es einen effizienteren Nukleotidaustauschmechanismus benutzt, um mit den RabGEFs des Wirtes konkurrieren zu können.



Abbildung 9: Schematische Domänenstruktur von DrrA. Gelb: N-terminale Adenyltransferase-Domäne (Aminosäuren 1-340)¹¹³. Blau: zentrale GEF-Domäne (Aminosäuren 340-533). Grün: C-terminale PI4P-bindende Domäne (P4M) (Aminosäuren 533-647)⁸⁹.

DrrA hat ein Molekulargewicht von 73 kDa (647 Aminosäuren) und besitzt drei distinkte Domänen mit unterschiedlichen Funktionen. Der C-Terminus von DrrA enthält die P4M-Domäne (P4M, PI4P binding of SidM/DrrA), die die DrrA auf der PI4P-positiven LCV verankert¹¹⁴. Die P4M umfasst die Aminosäuren 544-647⁸⁹ und weist keine Sequenzähnlichkeit zu bekannten PI-bindenden Domänen auf. Die Kristallstruktur der P4M-Domäne und die Affinität der P4M zu PI4P wurden in dieser Arbeit bestimmt.

Die Rab1-spezifische GEF-Aktivität wurde zwischen den Aminosäuren 317-545³ und 451-647^{2,42} gezeigt. Der von Murata *et al.* bestimmte Bereich der GEF-Aktivität überlappt zu einem großen Teil mit der P4M-Domäne und konnte im Verlauf dieser Arbeit eingegrenzt werden.

Die vermeintliche GDF-Aktivität wurde von Murata *et al.* am N-Terminus zwischen den Aminosäuren 1-500 lokalisiert⁴² und von Machner und Isberg zwischen den Aminosäuren 317-545. Spätere Veröffentlichungen zeigten allerdings, dass der N-Terminus für eine Adenyltransferase-Domäne (ATase) kodiert (Aminosäuren 1-340). Damit überlappt die GDF-Aktivität mit dem Bereich der GEF-Aktivität. Ob DrrA überhaupt GDF-Aktivität besitzt, konnte in dieser Arbeit geklärt werden.

Die Adenyltransferase-Aktivität von DrrA katalysiert die posttranslationale, kovalente Verknüpfung einer Adenosinmonophosphat-Gruppe (AMP) an das Tyrosin 77 von Rab1 und weiteren Rab-Proteinen¹¹³. Das GTP-gebundene Rab-Protein ist dabei das bevorzugte Substrat. Diese Art der posttranslationalen Modifikation wurde bereits bei kleinen GTPasen der Rho-Familie durch Proteine mit einer Fic-Domäne beobachtet. Die Modifikation erfolgt an Y77 des Rab-Proteins. Y77 ist eine hochkonservierte Aminosäure

in Switch 2 und ist in der Bindung von Rab-Effektoren und Rab-Regulatoren (GEF, GAP) involviert. Die Adenylylierung von Rab1 blockiert die Interaktion mit den Rab1-spezifischen GAPs TBC1D20 aus Eukaryoten und LepB aus *Legionella pneumophila*. Auch die Interaktion mit dem eukaryotischen Rab1-Effektor MICAL-1 ist beeinträchtigt. Die Interaktion mit dem Legionellenprotein LidA wird durch die Adenylylierung dagegen nicht oder kaum beeinträchtigt¹¹³. Adenylyliertes Rab1, welches nicht mehr durch ein GAP inaktiviert werden kann, verbleibt so aktiv auf der LCV. Die Adenylylierung kann durch das Legionellenprotein SidD, welches Deadenylylierungsaktivität besitzt, wieder rückgängig gemacht werden. Die Interaktionen mit Rab-bindenden Proteinen ist somit wieder möglich¹¹⁵. Ein Übersichtsmodell der DrrA- und LidA-vermittelten Vorgänge an der LCV ist in Abbildung 10 gezeigt.

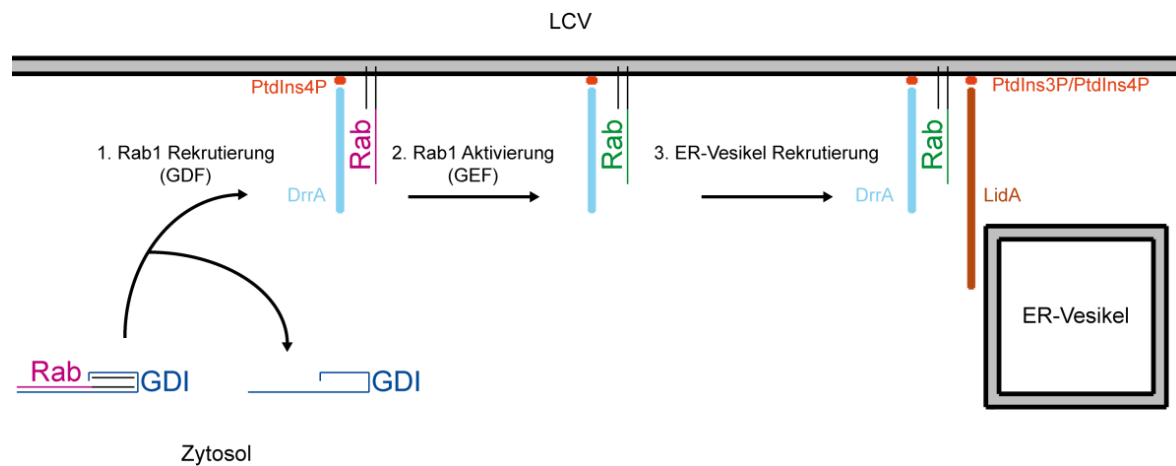


Abbildung 10: Schematische Darstellung der DrrA und LidA vermittelten Prozesse auf der LCV.

1) Die GDF-Aktivität von DrrA führt zur Freisetzung von Rab1 aus dem Rab1:GDI Komplex und rekrutiert Rab1 an die LCV. **2)** Rab1 wird durch die GEF-Aktivität von DrrA aktiviert. **3)** ER-Vesikel werden durch das Zusammenspiel von DrrA und LidA an die LCV rekrutiert. Blau: GDI, lila: inaktives Rab, grün: aktives Rab, orange: PI3P bzw. PI4P, hellblau: DrrA, braun: LidA.

2.4.4 LidA, ein ungewöhnlicher Rab-Effektor

LidA (engl.: lowered viability in the presence of dot A) hat ein Molekulargewicht von 83 kDa (729 Aminosäuren) und weist keine Aminosäuresequenzähnlichkeit zu bekannten Proteinen auf; auch ist die genaue Funktion von LidA ist noch unklar. LidA ist wichtig für das intrazelluläre Wachstum von Legionellen, die Bildung einer replikationspermissiven Vakuole und verhindert den Eintritt der LCV in das endosomale Netzwerk, wodurch der

Einleitung

Abbau von Legionellen im Lysosom umgangen wird¹¹⁶. Nach Aufnahme in Makrophagen assoziiert LidA stabil mit der zytoplasmatischen Seite der LCV, wo es im Bereich zwischen LCV und rekrutierten ER-Vesikeln lokalisiert¹¹⁶. Diese Tatsache lässt die Spekulation zu, ob LidA möglicherweise in der Struktur der haarähnlichen Verbindungen zwischen LCV und ER-Vesikeln involviert ist, die für die feste Verbrückung der ER-Vesikel mit der LCV sorgen¹¹⁶. Die Bindung von LidA an die LCV erfolgt über PI3P und/oder PI4P, mit einer höheren Affinität für PI3P⁸⁹. Die PI-bindende Domäne ist bisher nicht lokalisiert worden, befindet sich aber vermutlich am N- oder C-Terminus.



Abbildung 11: Schematische Domänenstruktur von LidA. Der zentrale Bereich (Aminosäuren 200-600, orange und gelb) lokalisiert in Überexpressionsexperimenten an das ERGIC, wo LidA vermutlich mit Rab1 interagiert. Dieser Bereich zeigt eine Wahrscheinlichkeit für drei *coiled coil*-Strukturen (CC1, CC2, CC3), die möglicherweise die Bindungsstellen für Rab-Proteine darstellen. In diesem Bereich gibt es eine interne Sequenzwiederholung (gelb) aus 123 AS bzw. 149 AS, mit einer Ähnlichkeit von etwa 35%. Die Funktion dieses Bereichs ist unbekannt. Die Funktionen des N- und C-Terminus (Aminosäuren 1-200 bzw. 600-729) sind noch unbekannt. Da LidA PI3P und PI4P bindet, befindet sich die PI-bindende Domäne in einem der beiden Termini.

Der zentrale Bereich (Aminosäuren 200-600) zeigt eine hohe Wahrscheinlichkeit für *coiled coil*-Strukturen (siehe Abbildung 11). In diesem Bereich gibt es zudem eine interne Sequenzwiederholung aus 123 und 149 Aminosäuren (Aminosäuren 282-405 bzw. 413-562; gelb in Abbildung 11), die eine Ähnlichkeit von etwa 35% untereinander besitzen. Sekundärstrukturvorhersagen für diese Bereiche zeigen α -helikale Strukturen mit Ausnahmen eines kurzen β -Faltblatt (FYLL); die Funktion dieser Bereiche ist unklar.

Die Expression der zentralen Region (200-600 AS) von LidA in Säugerzellen führt zur Lokalisation von LidA an das ERGIC¹¹⁶. Die LidA-Interaktionspartner am ERGIC sind nicht bekannt. Da die Interaktion von LidA mit Rab1 gezeigt wurde und Rab1 im Vesikeltransport zwischen ER und Golgi beteiligt ist, ist anzunehmen, dass Rab1 der LidA-Interaktionspartner am ERGIC ist.

Die Überexpression von LidA in *Saccharomyces cerevisiae* führt zu Sekretionsdefekten¹¹⁷ und zur Auflösung des Golgi-Apparates¹¹⁶. Dies wird bei einer Legionelleninfektion allerdings nicht beobachtet, was nahe legt, dass die LidA-Sekretion stark reguliert ist. Die

Überexpression dieses Konstrukts in COS1-Zellen, die zusätzlich mit Legionellen infiziert wurden (die Replikation von *Legionella pneumophila* in COS1 Zellen ähnelt der in Makrophagen-ähnlichen Zellen⁷⁸), zeigen ebenfalls eine Zerstörung des ERGIC und des Golgi-Apparates, jedoch ist das intrazelluläre Wachstum der Legionellen nicht beeinträchtigt¹¹⁸. Die Zerstörung der frühen sekretorischen Kompartimente scheint daher nicht das Wachstum der Legionellen zu beeinträchtigen. Der Grund dafür ist, dass die von Legionellen rekrutierten ER-Vesikel von ER-Austrittsstellen stammen¹¹⁹.

Entlang des sekretorischen Weges werden Vesikel an ER-Austrittsstellen abgeschnürt und fusionieren daraufhin mit dem ERGIC. Ausgehend vom ERGIC werden erneut Vesikel gebildet, die zum cis-Golgi transportiert werden (siehe 2.2.4). Legionellen greifen daher zum frühestmöglichen Zeitpunkt in den sekretorischen Vesikeltransport ein und sind deswegen vermutlich nicht in ihrem Wachstum und der LCV-Biogenese beeinträchtigt, wenn es zu Defekten am ERGIC und Golgi-Apparat kommt^{118,119}.

Es wird angenommen, dass LidA ein Rab1-Effektor ist, der an der Manipulation des Rab1-vermittelten Transports zwischen ER und Golgi involviert ist (Abbildung 10). Diese Vermutung beruht auf *in vitro* Experimenten, in denen gezeigt wurde, dass LidA die Rab1:GTP:DrrA-vermittelte Bindung von Vesikeln zusätzlich stimuliert⁶.

Tetheringfaktoren der Wirtszelle wie p115 und GM130, die auf dem ER-Vesikel und der Zielmembran durch Interaktion mit aktiviertem Rab1 beide Membranen überbrücken (siehe 1.6: Rab1 ER Transport), sind bisher nicht auf der LCV identifiziert worden. Daher wird über die Rolle von LidA als legionelleneigener-Tetheringfaktor spekuliert.

Zusätzlich zu Rab1 bindet LidA Rab6 und Rab8, wodurch LidA auch an der Manipulation des retrograden Transports vom Golgi-Apparat zum ER, innerhalb des Golgi-Apparats (Rab6) und des anterograden Transports vom Golgi zur Plasmamembran (Rab8), eine mögliche Rolle spielen könnte⁶. Eine Funktion als GAP oder GEF für LidA scheidet aus, da diese Aktivitäten zumindest für Rab1 nicht gezeigt werden konnten⁶. LidA bindet *in vitro* nicht nur das aktive, GTP-gebundene Rab1, sondern auch das inaktive, GDP-gebundene Rab1, mit einer höheren Affinität für das GTP-gebundene Rab1⁶. Diese Eigenschaft ist für einen Rab-Effektor ungewöhnlich, da Rab-Effektoren gemäß Definition das aktivierte Rab-Protein binden. Die bisher bekannten Ausnahmen zu dieser Regel sind INPP5E, Cog4 und Coronin3, die bevorzugt das GDP-gebundene Rab-Protein binden⁴³. Diese sind jedoch

Einleitung

weder strukturell, noch biochemisch näher auf ihre Rab-bindenden Eigenschaften charakterisiert worden. Ob LidA auch GDP-gebundenes Rab6 und Rab8 bindet und ob der Rab1:GDP:LidA-Komplex *in vivo* von Bedeutung ist, ist bisher nicht untersucht worden.

Die GDP- und GTP-gebundenen Formen eines Rab-Proteins unterscheiden sich hauptsächlich durch strukturelle Unterschiede in Switch 2 des Rab-Proteins (Abbildung 2), die in der GTP-gebundenen Konformation als Interaktionsfläche für Rab-Effektoren und Rab-Regulatoren (GEF, GAP) dienen. LidA bindet im Gegensatz zu dem humanen Rab-Effektor MICAL auch adenyliertes Rab1 im GDP- und GTP-gebundenen Zustand¹¹³. Auch hier wird das aktive, GTP-gebundene Rab1 von LidA bevorzugt gebunden. Die Adenylierung erfolgt an Y77 in Switch 2 und deutet somit daraufhin, dass Switch 2 vermutlich im Gegensatz zu den meisten Rab-Effektoren nicht die Hauptinteraktionsfläche für LidA ist.

Möglicherweise könnten andere oder zusätzliche Kontaktflächen auf Seiten des Rab-Proteins in der LidA-Interaktion beteiligt sein. Zusammen mit F45 und W62 aus dem Interswitch-Bereich bildet Y77 aus Switch 2 die hydrophobe Triade, die als eine Determinante für Rab-Effektoren vorgeschlagen wurde¹²⁰. Diese scheint, wie bereits bei dem Rab-Effektor OCRL gezeigt wurde, aufgrund der Modifikation von Y77 durch die Adenylierung nicht notwendigerweise in der Rab1:LidA-Interaktion involviert zu sein.

Da LidA Rab-Proteine unterschiedlicher Rab-Familien (Rab1/Rab6, Rab8) bindet, ist anzunehmen, dass die Rab-Subfamilienmotive auf der Oberfläche des Rab-Proteins ebenfalls an der LidA-Bindung involviert sind. Diese Eigenschaften implizieren eine noch nicht beobachtete Art der Rab-Erkennung durch LidA.

Die Funktion der DrrA katalysierten Adenylierung von Rab-Proteinen ist bisher noch nicht verstanden. Da DrrA auf der LCV gebunden ist, kann angenommen werden, dass die Adenylierung nur für Rab-Proteine, die auf der LCV lokalisiert sind, von Relevanz ist. Die Adenylierung von Rab1 beeinträchtigt nicht oder nicht stark die Bindung von LidA, wohingegen die Interaktionen zwischen adenyliertem Rab1 und Wirtsproteinen (MICAL (Rab1-Effektor), TBC1D20 (Rab1GAP)) oder dem Rab1-spezifischen Legionellen Rab1-GAP LepB stark beeinträchtigt oder inhibiert sind.

Die Adenylierung¹¹³ und Deadenylierung^{115,121} von Rab-Proteinen durch Legionellenproteine ist vermutlich ein lokal auf die LCV beschränkter und zeitlich

kontrollierter regulatorischer Mechanismus zur Inhibition von Wirts- und Legionellenproteinen, die mit Rabs interagieren.

3. Zielsetzung der Arbeit

Proteine aus Legionellen bieten die Möglichkeit, unterschiedliche molekulare Aspekte des vesikelvermittelten Transports eukaryotischer Zellen im Detail studieren zu können. Zu diesem Zweck wurden für die vorliegende Arbeit zwei unterschiedliche Legionellenproteine für strukturelle und biochemische Untersuchungen ausgewählt, die in verschiedene Prozesse der Regulation von Rab-Proteinen eingreifen: Der PI4P-Binder und Rab1-GEF DrrA, sowie der Rab-Effektor LidA.

DrrA ist ein bi-funktionales Protein mit GEF- und GDF-Aktivität gegenüber Rab1. Beide Eigenschaften sind in einer einzigen zentralen Region von DrrA lokalisiert.

Die Strukturbestimmung von DrrA sollte Hinweise auf den Mechanismus der GDF- und GEF-Aktivität liefern und zeigen, inwiefern der molekulare Mechanismus des DrrA-katalysierten Nukleotidaustausch vergleichbar mit dem eukaryotischer RabGEFs ist. Weiterhin sollte geklärt werden, wie zwei potentiell sehr unterschiedliche Aktivitäten (GEF und GDF) in einer einzigen Domäne untergebracht werden können.

Die Verankerung von DrrA auf der PI4P-positiven LCV erfolgt über seine C-terminale P4M-Domäne¹²², wodurch der Ort der Rab1-Rekrutierung bestimmt wird. Da die P4M-Domäne keine Aminosäuresequenzhomologie zu bekannten PI-bindenden Proteinen aufweist, sollte der Mechanismus der PI-4P-Bindung strukturell und biochemisch charakterisiert werden.

Das Legionellenprotein LidA ist ein Rab-Effektor, der an der Rekrutierung von ER-Vesikeln an die LCV beteiligt ist⁶. LidA ist ein ungewöhnlicher Rab-Effektor, weil LidA neben einem breiten Rab-Bindungsspektrum (Rab1, Rab6 und Rab8)⁶ nicht nur mit der aktiven Form von Rab1, sondern auch mit der inaktiven Form interagiert⁶. Letzteres ist ungewöhnlich für einen Rab-Effektor, da diese normalerweise nur das aktive, GTP-gebundene Rab binden.

Um die strukturelle Grundlage der außergewöhnlichen Rab-Bindungseigenschaften von LidA zu klären, sollten die Strukturen von verschiedenen Rab:LidA-Komplexen bestimmt werden. Die Bestimmung der Affinitäten von LidA und verschiedenen Rab-Proteinen, in der GDP- und GTP-gebundenen Form sollte Aufschluss über den bevorzugten Bindungspartner von LidA liefern.

4. Ergebnisse

Diese Arbeit umfasst die strukturelle und biochemische Charakterisierung der Legionellenproteine DrrA und LidA. Die Ergebnisse sind in drei Kapiteln unterteilt.

Im ersten Teil wird die Komplexstruktur von Rab1b und der Nukleotidaustausch-Domäne von DrrA in Hinsicht auf den durch DrrA katalysierten Nukleotidaustauschmechanismus analysiert⁴.

Der zweite Teil beinhaltet die Kristallstruktur der PI4P-bindenden-Domäne (P4M) aus DrrA und die Affinitätsbestimmung zwischen der P4M-Domäne und PI4P¹²³.

Im dritten Abschnitt werden die ungewöhnlichen Bindungseigenschaften des Rab-Effektors LidA und die Rab8a:GppNH:LidA-Komplexstruktur untersucht¹²⁴.

4.1 Die Kristallstruktur des Rab1b₃₋₁₇₄:DrrA₃₄₀₋₅₃₃-Komplexes

Die Grenzen des verwendeten DrrA-Konstrukts (DrrA₃₄₀₋₅₃₃), das für die Kristallisation eingesetzt wurde, basieren auf den Ergebnissen limitierter Proteolyse mit Trypsin (Aymelt Itzen).

Die Kristallstruktur des Rab1b₃₋₁₇₄:DrrA₃₄₀₋₅₃₃-Komplexes wurde mit einer Auflösung von 1.8 Å bestimmt (Abbildung 12, für Datenstatistiken siehe Material und Methoden, Tabelle 13). Rab1b zeigt die für GTPasen typische Faltung aus einem zentralen sechsblättrigen β -Faltblatt (β_{1R} - β_{6R}), welches von 5 α -Helices (α_{1R} - α_{5R}) umgeben ist (tiefgestelltes R: Rab1b₃₋₁₇₄, tiefgestelltes D: DrrA₃₄₀₋₅₃₃). Eine zusätzliche kurze, sechste α -Helix ($\alpha_{1'R}$) in Switch 1 wird durch Interaktionen mit DrrA₃₄₀₋₅₃₃ gebildet. Der Vergleich der GEF-Domäne mit einer Strukturdatenbank durch den DALI-Server¹²⁵ zeigte, dass es keine zur GEF-Domäne homologen Proteinstrukturen gibt und die GEF-Domäne daher eine noch nicht beschriebene, rein α -helikale Proteinfaltung besitzt. DrrA₃₄₀₋₅₃₃ bildet eine palettenähnliche Struktur aus acht α -Helices. Die Unterseite der Palette wird von den vier parallel angeordneten α -Helices α_{1D} , α_{2D} , α_{6D} und α_{7D} gebildet. Die Hauptinteraktionsfläche mit Rab1b₃₋₁₇₄ wird von den 2 parallelen α -Helices α_{4D} und α_{5D} der Oberseite gebildet, die senkrecht zu den Helices der Unterseite angeordnet sind. Die kurzen α -Helices α_{3D} und α_{8D} befinden sich an den Enden der α_{4D} und α_{5D} Helices.

Ergebnisse

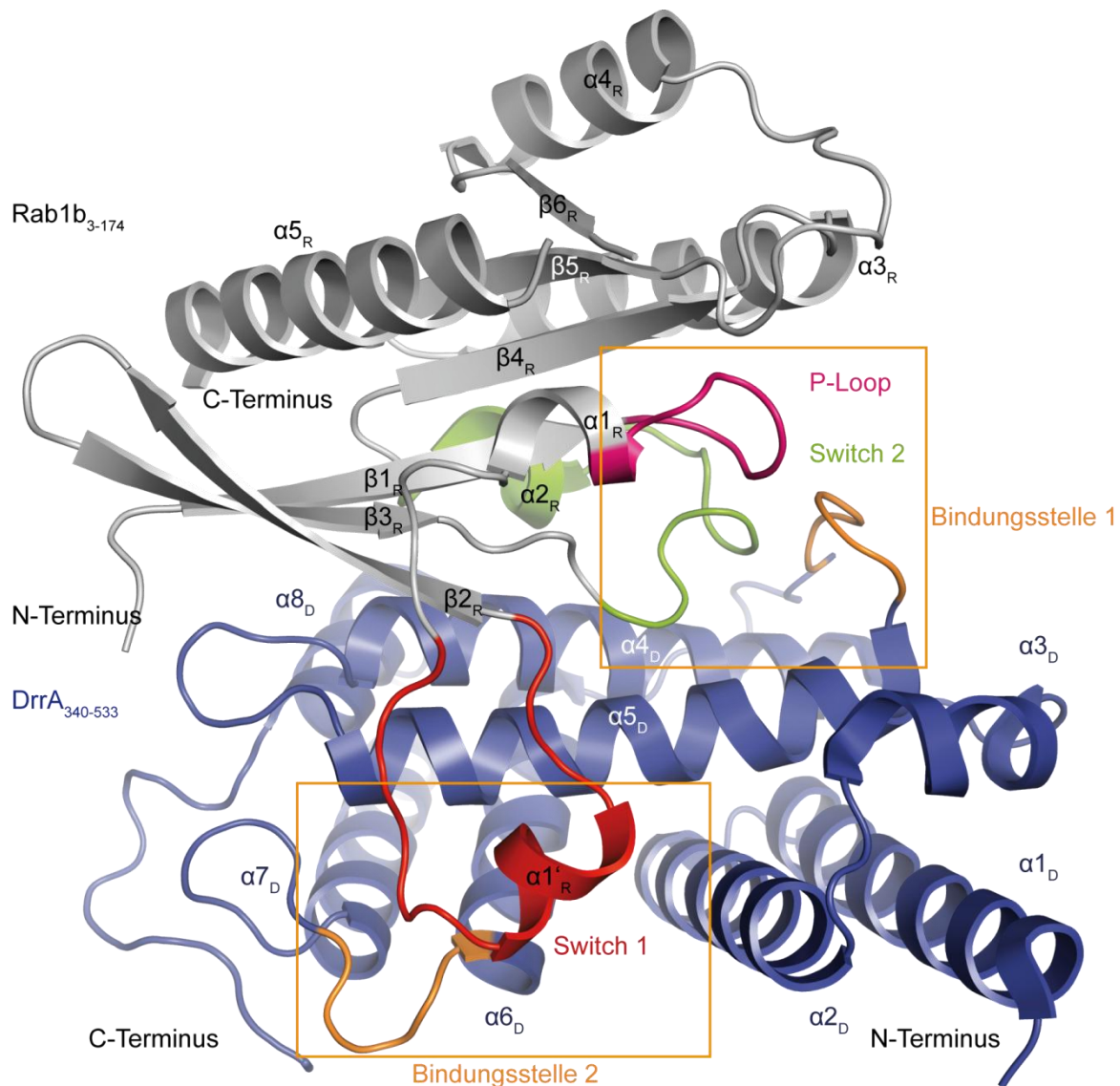


Abbildung 12: Kristallstruktur des Komplexes aus Rab1b₃₋₁₇₄ und der GEF-Domäne (DrrA₃₄₀₋₅₃₃) von DrrA mit einer Auflösung von 1,8Å. Die Struktur der GEF-Domäne (blau) besteht aus 8 α -Helices, die eine palettenähnliche Faltung einnehmen. Die α -Helices α_4_D , α_5_D bilden die Hauptkontaktfläche zu Rab1b₃₋₁₇₄. Die dazu senkrecht angeordneten α -Helices α_1_D , α_2_D und α_6_D , α_7_D bilden die Unterseite der Palette. Für den Nukleotidaustausch wichtige Aminosäurekontakte werden in zwei Bindungsstellen (orange) gebildet. In der Bindungsstelle 1 bilden Aminosäuren der Schleife α_5_D - α_6_D Kontakte zum P-Loop und Switch 2 aus, in der Bindungsstelle 2 werden Kontakte zwischen der Schleife α_6_D - α_7_D und Switch 1 ausgebildet. Die Interaktionen mit Switch 1 induzieren eine weite Öffnung der Nukleotidbindungstasche, wodurch die Freisetzung des Nukleotids ermöglicht wird.⁴

Die Rab1b₃₋₁₇₄:DrrA₃₄₀₋₅₃₃-Komplexstruktur zeigt Rab1b im nukleotidfreien Zustand mit einer weit geöffneten Nukleotidbindungstasche. Im Bereich des P-Loops ist zusätzliche Elektronendichte zu sehen, die vermutlich stellvertretend für ein Sulfation aus dem Kristallisationsansatz ist. Dieses Sulfation befindet sich relativ zum P-Loop in einer

Position, die normalerweise durch das β -Phosphat des Nukleotids besetzt wird. Ähnliches wurde auch in anderen GTPase:GEF-Komplexen beobachtet¹²⁶.

Die Bindung von DrrA₃₄₀₋₅₃₃ an Rab1b₁₋₁₇₄ als auch die Freisetzung des Nukleotids induziert unter anderem eine strukturelle Flexibilität der G4- und G5-Motive in Rab1b. Dadurch ist die korrekte Platzierung der Aminosäuren K122_R-K126_R und A152_R-K154_R in der Elektronendichte nicht möglich und diese Aminosäuren sind daher nicht im finalen Modell dargestellt.

DrrA₃₄₀₋₅₃₃ interagiert mit Rab1b₃₋₁₇₄ über die fünf α -Helices α 2_D, α 3_D, α 4_D, α 5_D, α 6_D und den 3 Schleifen α 4_D- α 5_D, α 5_D- α 6_D und α 6_D- α 7_D. Auf Seiten von Rab1b₁₋₁₇₄ wird die Interaktion mit DrrA₃₄₀₋₅₃₃ über den N-Terminus, den P-Loop, Switch 1 und Switch 2, den Interswitch-Bereich (β 2_R- β 3_R) sowie dem β -Faltblatt β 1_R vermittelt (Abbildung 12).

Die zwei Schleifen α 5_D- α 6_D und α 6_D- α 7_D von DrrA₃₄₀₋₅₃₃ bilden zwei Bindungsstellen, die für den DrrA-katalysierten Nukleotidaustausch entscheidend sind. Aminosäuren der Schleife α 5_D- α 6_D bzw. α 6_D- α 7_D interagieren mit denen für die Nukleotidbindung essentiellen Bereichen, nämlich dem P-Loop und Switch 2, bzw. mit Switch 1.

4.1.1 Bindungsstelle 1: DrrA bindet den P-Loop und Switch 2

Die Bindungsstelle 1 wird durch den P-Loop und Switch 2 von Rab1b mit der α 5_D- α 6_D-Schleife und den α -Helices α 3_D und α 5_D aus DrrA gebildet (Abbildung 13). Die Konformation des P-Loops wird durch polare Wechselwirkungen der Aminosäuren N451_D und R453_D aus der α 5_D- α 6_D-Schleife von DrrA mit den Aminosäuren D16_R und S17_R des P-Loops (**GDS**GVGKS) stabilisiert. R453_D und D16_R bilden eine Salzbrücke.

Diese Art der P-Loop Stabilisierung wurde in anderen Rab:GEF-Komplexen bisher nicht beobachtet. Anstelle einer Stabilisierung des gesamten P-Loops wurde lediglich die Stabilisierung des P-Loop-Lysins durch intra- (Sec2:Sec4¹²⁷) oder intermolekulare Interaktionen (Aspartat-Finger, Ypt1:TRAPP-Komplex¹²⁸; Glutamat-Finger, Rab21:Vps9-Komplex,¹²⁹) beobachtet.

Das P-Loop-Lysin von Rab1b im Rab1b:DrrA-Komplex wird durch eine intramolekulare Interaktion mit D63_R koordiniert. Damit liefert diese zusätzliche Bindung und Stabilisierung des P-Loops durch DrrA im Vergleich zu anderen GEFs einen

Ergebnisse

(energetischen) Beitrag, der sich vermutlich in der hohen Affinität von DrrA zum nukleotidfreien Rab1b und/oder in der hohen Effizienz des Nukleotidaustausches von DrrA widerspiegelt.

Die α_5 - α_6 -Schleife bildet zusammen mit den α -Helices α_3 und α_5 eine negativ geladene Tasche, in die die positiv geladene Guanidiniumgruppe von R69_R aus Switch 2 hineinragt und ein ausgeprägtes Netzwerk aus polaren Wechselwirkungen mit Aminosäuren der α_3 - und α_5 -Helix und der α_5 - α_6 -Schleife ausbildet. Die Guanidiniumgruppe von R69_R bildet auch eine Salzbrücke mit der Seitenkette von D445_D und interagiert mit den Carbonylsauerstoffen von L448_D, S449_D und E552_D. Weiterhin interagiert R69_R indirekt über Wassermoleküle mit der Carbonylgruppe von A441_D und der Seitenkette von R390_D. Der Carbonylsauerstoff von R69_R bildet eine weitere polare Interaktion mit dem Wasserstoff der Amidfunktion von A454_D. R69_R liegt zentral in Switch 2 (AGQERFRTITSSYYRG) und die zahlreichen polaren Interaktionen mit DrrA₃₄₀₋₅₃₂ stabilisieren somit Switch 2.

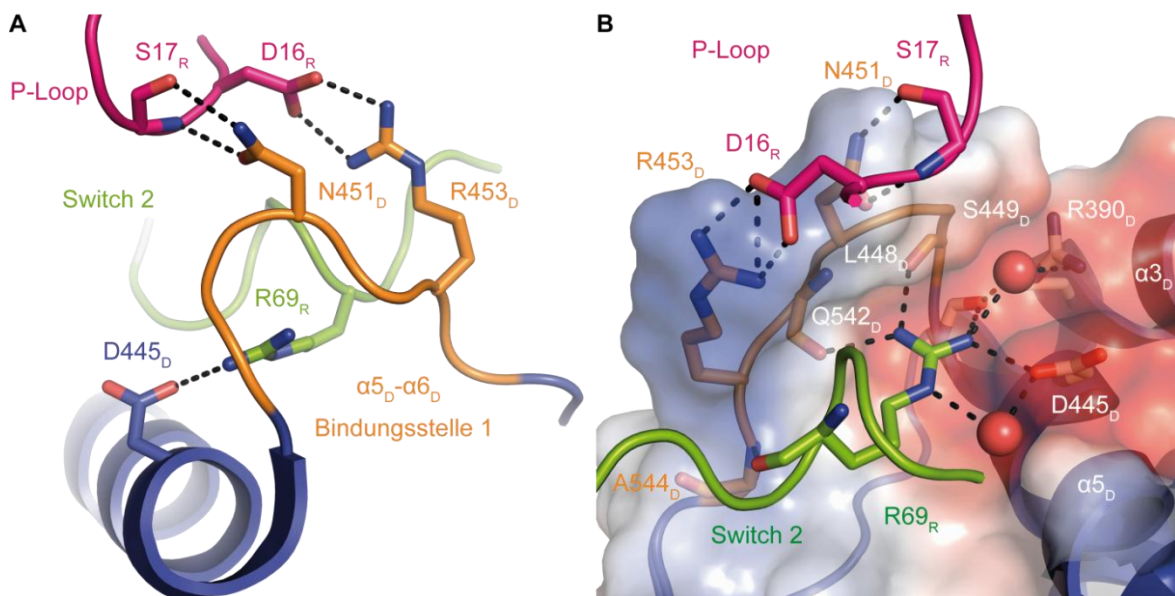


Abbildung 13: Darstellung der polaren Wechselwirkungen zwischen Rab1b₃₋₁₇₄ und DrrA₃₄₀₋₅₃₃ der Bindungsstelle 1. **A)** Direkte polare Interaktionen der Aminosäureseitenketten N451_D und R453_D der α_5 - α_6 -Schleife aus DrrA mit D16_R und S17_R von Rab1b stabilisieren die Konformation des P-Loops. **B)** R69_R aus Switch 2 ragt in eine negativ geladene Tasche von DrrA und bildet zahlreiche polare Interaktionen zu 2 Wassermolekülen (rote Kugeln) und weiteren Aminosäuren von DrrA aus. Gestrichelte Linien: polare Wechselwirkungen.

4.1.2 Bindungsstelle 2: DrrA bindet Switch 1

Die Bindungsstelle 2 wird durch Switch 1 von Rab1b und der α_{6D} - α_{7D} -Schleife und der α_{6D} -Helix von DrrA₃₄₀₋₅₃₃ gebildet. Switch 1 bindet den Bereich zwischen der α_{2D} - und α_{6D} -Helix und bildet so eine Schleife, wodurch die Nukleotidbindungstasche weit geöffnet wird. Die Aminosäuren T34_R, E35_R und S36_R bilden direkte und wasservermittelte polare Interaktionen mit S483_D und D480_D aus DrrA₃₄₀₋₅₃₃ (Abbildung 14A).

Die Seitenkette von Y37_R aus Rab1b₃₋₁₇₄ bindet in eine hydrophobe Tasche, die durch die Reste L432_D, A435_D, V436_D, F474_D und V478_D gebildet wird (Abbildung 14B). Die Konformation von Switch 1 wird zusätzlich durch polare Interaktionen der Carbonylsauerstoffe von V43_R, I41_R und T40_R mit den ϵ -Aminogruppen von K438_D und K380_D stabilisiert.

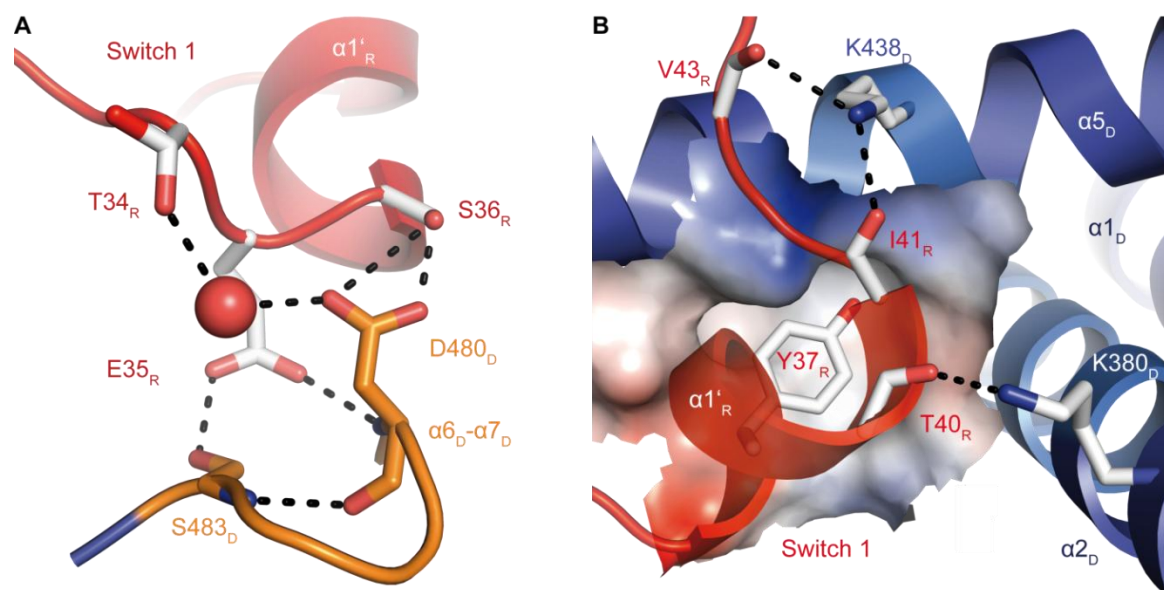


Abbildung 14: Darstellung der polaren und hydrophoben Wechselwirkungen zwischen Rab1b₃₋₁₇₄ und DrrA₃₄₀₋₅₃₃ der Bindungsstelle 2. A) Switch 1 von Rab1b wird auf der Oberfläche von DrrA₃₄₀₋₅₃₃ gebunden. B) Y37 von Rab1b bindet in eine hydrophobe Tasche von DrrA, die durch die Reste L432_D, A435_D, V436_D, F474_D und V478_D gebildet wird (der Übersichtlichkeit halber ist nur die, durch diese Reste gebildete Oberfläche dargestellt). Switch 1 wird in dieser Konformation weiterhin durch polare Interaktionen der Carbonylsauerstoffe von V43, I41 und T40 mit den ϵ -Aminogruppen von K438 und K380 von DrrA₃₄₀₋₅₃₃ stabilisiert. Rote Kugel: Wassermolekül. Gestrichelte Linien: polare Wechselwirkungen.

Ergebnisse

Die Aminosäuren D16_R und S17_R des P-Loops (GDSGVGKS), die von Aminosäuren aus DrrA in der Bindungsstelle 1 koordiniert werden, sind in Rab-Proteinen konserviert. Die in der Bindungsstelle 2 involvierten Aminosäuren E35_R und S36_R des zentralen Bereiches von Switch 1 (DDTYTESYISTIGVD) dagegen sind spezifisch für Rab1b.

Die wichtige Rolle dieser beiden Aminosäuren zeigt sich beim Vergleich mit dem Rab1-Hefe-Homolog Ypt1, welches auf Sequenzebene nahezu identisch zu Rab1 ist. Ypt1 unterscheidet sich unter anderem dadurch von Rab1b, dass es an diesen Positionen die Aminosäure N35_Y und D36_Y besitzt. DrrA bindet Ypt1 allerdings nicht und weist keine GEF-Aktivität für Ypt1 auf (siehe Gelfiltrationsdaten unter 4.5)⁴. Daher ist zu vermuten, dass die Aminosäuren E35_R und S36_R in Rab1b entscheidend für die Rab1-spezifische GEF-Aktivität von DrrA sind.

4.1.3 Hydrophobe Kontakte zwischen Rab1b und DrrA

Neben den polaren Wechselwirkungen in den Bindungsstellen 1 und 2 bilden hydrophobe Wechselwirkungen einen weiteren Beitrag zur Bindung von Rab1b und DrrA (Abbildung 15). Die hydrophoben Kontakte werden durch Aminosäuren aus Rab1b in Switch 1 (Y37_R, I38_R, I41_R, I43_R), Switch 2 (F70_R, Y77_R), im Interswitch (F45_R, W62_R) und am N-Terminus (Y5_R, L8_R) mit Aminosäuren der α_4 - α_5 - und α_5 - α_6 -Schleife (A421_D, L423_D bzw. L454_D) und den α -Helices α_4 (L406_D, W410_D), α_5 (L432_D, A435_D, V436_D, M439_D, M444_D) und α_6 (V478_D, F474_D) von DrrA₃₄₀₋₅₃₃ gebildet (Abbildung 15).

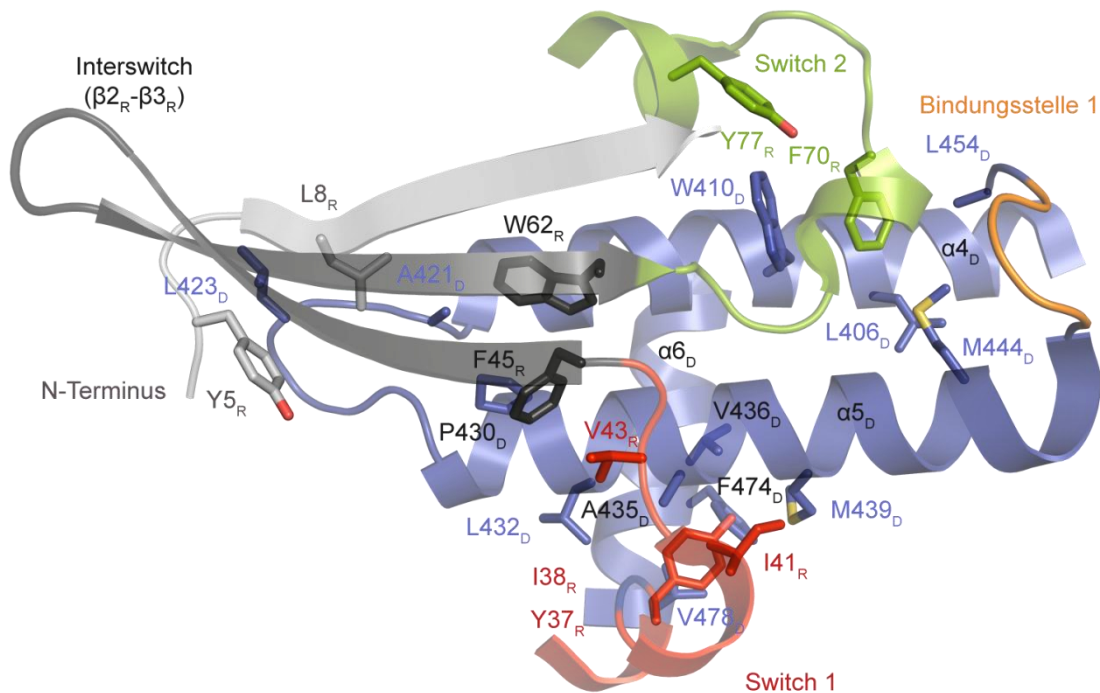


Abbildung 15: Darstellung der hydrophoben Kontakte zwischen Rab1b₃₋₁₇₄ und DrrA₃₄₀₋₅₃₃. Die Aminosäuren, die hydrophobe Kontakte auf Seiten von Rab1b zu DrrA ausbilden, befinden sich in Switch 1, Switch 2 und dem Interswitch-Bereich. In der Stabdarstellung sind die hydrophoben Aminosäuren gezeigt. Die Kolorierung entspricht der aus Abbildung 1. Rot: Switch 1, grün: Switch 2, schwarz: Interswitch-Bereich, orange: DrrA Schleife der Bindungsstelle 1, blau: DrrA₃₄₀₋₅₃₃.

Insgesamt beträgt die Kontaktfläche zwischen DrrA und Rab1b 1687 \AA^2 . Damit bildet die GEF-Domäne von DrrA, im Vergleich zu den vier bisher strukturell untersuchten Rab:GEF-Komplexen, die umfangreichste Kontaktfläche zu einem Rab-Protein. Im Ypt1:TRAPP-Komplex beträgt diese Fläche 1471 \AA^2 . Diese Fläche wird im Unterschied zum Rab1b₃₋₁₇₄:DrrA₃₄₀₋₅₃₃-Komplex nicht durch zwei Proteine, sondern aus fünf Proteinen gebildet¹²⁸ (Ypt1- und 4 TRAPP-Untereinheiten, pdb: 3CUE). Die nächst kleinere Kontaktfläche bildet der Komplex aus Rab21 mit der Vps9-Domäne aus Rabex-5¹²⁹ (1149 \AA^2 , pdb: 2OT3). Die Komplexe Sec4p:Sec2p¹²⁷ (pdb: 2OCY) und Rab8:Mss4¹³⁰ (pdb: 2FU5) bilden die kleinsten Kontaktflächen mit jeweils 1009 \AA^2 und 954 \AA^2 .

Die DrrA GEF-Domäne unterscheidet sich deutlich in ihrer Größe von der für GEF-Aktivität benötigten vier Untereinheiten des TRAPP-Komplexes. Trotz der geringen Größe ist DrrA in der Lage, eine umfangreichere Kontaktfläche zu Rab1b auszubilden, als die vier Untereinheiten des TRAPP-Komplexes. Diese effiziente, kompakte

Ergebnisse

Komplexbildung spiegelt sich ebenfalls in der Affinität von DrrA zu Rab1b wider. Die Affinität des nukleotidfreien Rab1:DrrA-Komplexes beträgt 3 pM^4 und für den nukleotidfreien Ypt1:TRAPP-Komplex beträgt die Affinität etwa 100 nM^{131} . Die Größe der Kontaktfläche scheint daher mit der Affinität des Rab:GEF-Komplexes zu korrelieren.

Im Folgenden wird die Kristallstruktur von DrrA₃₄₀₋₅₃₃ mit der Struktur von DrrA₃₄₀₋₅₃₃ aus dem Rab1b₃₋₁₇₃:DrrA₃₄₀₋₅₃₃ verglichen. Anschließend werden die durch die DrrA-Bindung induzierten Konformationsänderungen in Rab1b analysiert.

4.2 Die Kristallstruktur der GEF-Domäne von DrrA

Die Kristallstruktur der GEF-Domäne von DrrA konnte mit einer Auflösung von 1.8 \AA durch molekularen Ersatz gelöst werden (Datenstatistiken siehe Material und Methoden, Tabelle 14). Als Modell wurde die Struktur von DrrA₃₄₀₋₅₃₃ aus dem Rab1b₃₋₁₇₄:DrrA₃₄₀₋₅₃₃-Komplex verwendet. Die Überlagerung der DrrA₃₄₀₋₅₃₃-Struktur mit DrrA₃₄₀₋₅₃₃ aus dem Rab1b₃₋₁₇₄:DrrA₃₄₀₋₅₃₃-Komplex zeigt, dass die Strukturen nahezu identisch sind (Abbildung 16). Mit einer mittleren Standardabweichung von 0.95 \AA der $\text{C}\alpha$ -Atome unterscheidet sich die ungebundene Form der GEF-Domäne in ihrer Konformation kaum von der Rab-gebundenen Form. Damit besitzt die GEF-Domäne (DrrA₃₄₀₋₅₃₃) von DrrA eine rigide Struktur.

Die Bindung von DrrA an Rab1b induziert somit die konformationellen Änderungen in Rab1b, in dem die GEF-Domäne als Gerüst zur Entfaltung dient. Diese teilweise Entfaltung von Rab1b erleichtert so die Freisetzung des Guanosinnukleotids und ermöglicht den Nukleotidaustausch. Die durch DrrA induzierten strukturellen Veränderungen in Rab1b werden im Folgenden betrachtet.

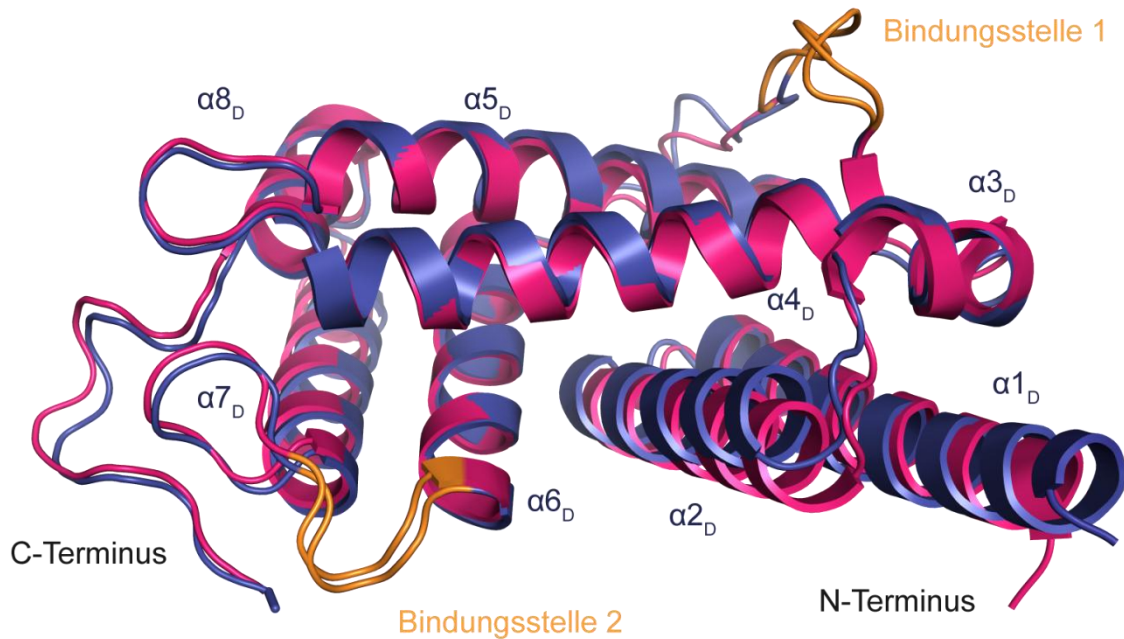


Abbildung 16: Die Überlagerung der Kristallstrukturen von DrrA₃₄₀₋₅₃₃ und DrrA₃₄₀₋₅₃₃ aus dem Rab1b₃₋₁₇₄:DrrA₃₄₀₋₅₃₃-Komplex zeigt die rigide Struktur der GEF-Domäne, die durch Bindung von Rab1b nahezu unverändert bleibt. DrrA₃₄₀₋₅₃₃ bildet daher ein rigides Gerüst, das der Entfaltung von Rab1 dient. Blau: DrrA₃₄₀₋₅₃₃, lila: GEF-Domäne aus der Rab1b₃₋₁₇₄:DrrA₃₄₀₋₅₃₃-Komplexstruktur, orange: Rab1b Bindungsstellen.

4.3 DrrA₃₄₀₋₅₃₃ induziert wesentliche strukturelle Änderungen in Rab1b

Die durch die DrrA-Bindung induzierten konformationellen Änderungen in Rab1b, sind am besten im direkten Vergleich mit dem freien, aktiven Rab1b¹¹³ (pdb:3NKV) zu erkennen (Abbildung 17). Bei der verwendeten Rab1-Struktur handelt es sich um die von DrrA adenylierte Form von Rab1b¹¹³. Trotz der AMP-Modifikation an Y77 (Switch 2) entspricht das adenylierte Rab1b in der Faltung einem aktiven Rab-Protein und konnte daher zum Vergleich verwendet werden.

Die Bindung von DrrA₃₄₀₋₅₃₃ induziert Konformationsänderungen in den nukleotidbindenden Motiven G1-G5, den α -Helices α_{1R} , α_{3R} und dem Interswitch-Bereich (β_{2R} - β_{3R} -Schleife) von Rab1b₃₋₁₇₄.

Ergebnisse

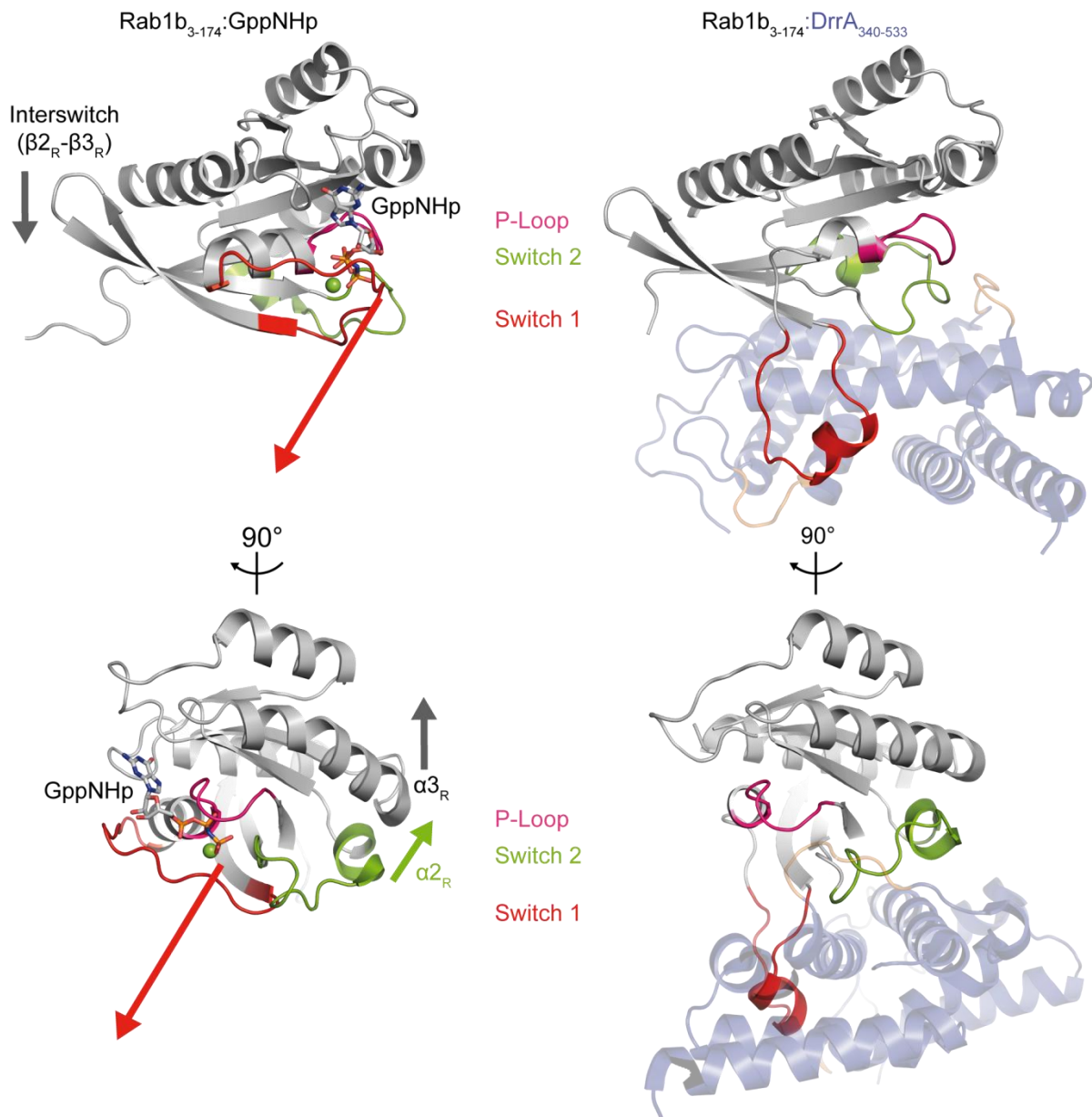


Abbildung 17: Der Vergleich von Rab1b:GppNHp mit Rab1b aus dem nukleotidfreien Komplex Rab1b:DrrA zeigt deutlich die durch DrrA induzierten strukturellen Änderungen in Rab1b. Die DrrA-Bindung induziert eine Abwärtsbewegung des Interswitch-Bereiches, der sich dadurch der GEF-Domäne nähert (oben links). Die größte strukturelle Änderung erfährt Switch 1, der eine Schleife auf der Oberfläche von DrrA ausbildet und so aus seiner ursprünglichen Position bewegt wird. Weiterhin kommt es zu Aufwärtsbewegungen von Switch 2, wodurch dieser näher an den P-Loop rückt und die α_{3R} -Helix gestreckt wird. **Links:** Rab1b₃₋₁₇₄:GppNHp, **rechts:** Rab1b₃₋₁₇₄ im Komplex mit DrrA₃₄₀₋₅₃₃. Die Pfeile zeigen die durch DrrA₃₄₀₋₅₃₃ induzierten Konformationsänderungen in Rab1 an. Grüne Kugel: Magnesiumion.⁴

Die größte strukturelle Änderung erfährt Switch 1, der komplett entfaltet wird und auf der DrrA-Oberfläche eine Schleife mit einer kleinen α -Helix bildet. Die Aminosäuren E35_R und S36_R aus Switch 1, die in der Bindungsstelle 1 involviert sind, werden dabei um 30 Å,

bzw. 27 Å von ihrer ursprünglichen Position versetzt. Dies führt zu einer enormen Öffnung der Nukleotidbindungstasche (Abbildung 14 und 17).

Der Vergleich von Switch 2 von Rab1b aus dem Komplex mit DrrA mit der GppNHp-gebundenen Form von Rab1b¹¹³ zeigt, dass die Bindung von DrrA₃₄₀₋₅₃₃ eine Aufwärtsbewegung von Switch 2 ($\alpha2_R$) um etwa 6 Å induziert, wodurch die zuvor gebogene Helix $\alpha3_R$ gestreckt wird und ebenfalls eine Aufwärtsbewegung erfährt. W410 aus DrrA₃₄₀₋₅₃₃ befindet sich dabei zwischen den aromatischen Aminosäuren F70_R und Y77_R aus Switch 2 (AGQERFRTITSSYYRG) von Rab1b₃₋₁₇₄. Diese hydrophoben Kontakte induzieren so wahrscheinlich die Aufwärtsbewegung von Switch 2 (Abbildung 18).

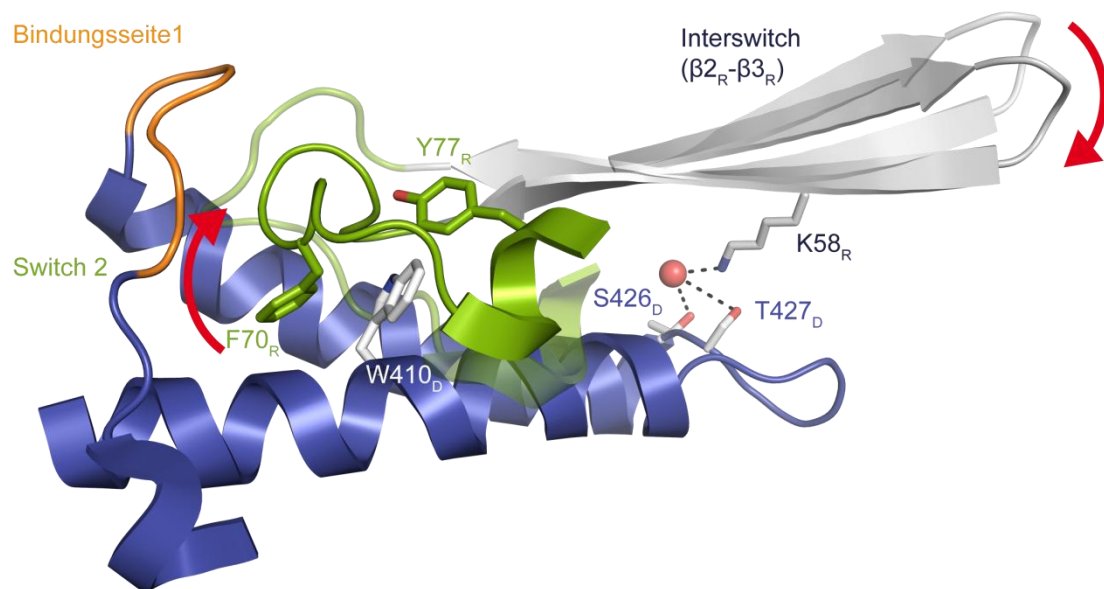


Abbildung 18: DrrA₃₄₀₋₅₃₃ induziert eine Anhebung von Switch 2 in Rab1b₃₋₁₇₄ und eine Abwärtsbewegung des Interswitch-Bereiches. W410_D aus DrrA₃₄₀₋₅₃₃ (blau) befindet sich zwischen den aromatischen Aminosäuren F70_R und Y77_R von Rab1b₃₋₁₇₄ (grau) aus Switch 2 (grün) und induziert die Aufwärtsbewegung von Switch 2. Die polaren, wasservermittelten Interaktionen von K59_R zu DrrA (S426_D, T427_D) bedingen vermutlich die Abwärtsbewegung des Interswitch-Bereiches. Die transparente Darstellung zeigt die Konformation des Interswitch-Bereiches im GppNHp-gebundenen Zustand (pdb:3NKV). Die roten Pfeile geben die Richtung der durch die DrrA-Bindung induzierten Bewegungen an. Rote Kugel: Wassermolekül.

Auf der gegenüberliegenden Seite in Rab1b bewegt sich der Interswitch-Bereich ($\beta2_R$ - $\beta3_R$ -Schleife) um etwa 4.8 Å abwärts auf DrrA₃₄₀₋₅₃₃ zu. Diese Konformation wird durch polare Wechselwirkungen zwischen K58_R und S426_D, T427_D aus DrrA₃₄₀₋₅₃₃ stabilisiert (Abbildung 18).

Ergebnisse

Im Vergleich zum GDP-gebundenen Zustand (pdb:2FOL) nimmt Switch 2 eine geordnete Konformation im Rab1b₃₋₁₇₄:DrrA₃₄₀₋₅₃₃-Komplex ein, indem R69_R ein intensives polares Netzwerk mit Aminosäuren aus DrrA bildet (Abbildung 14).

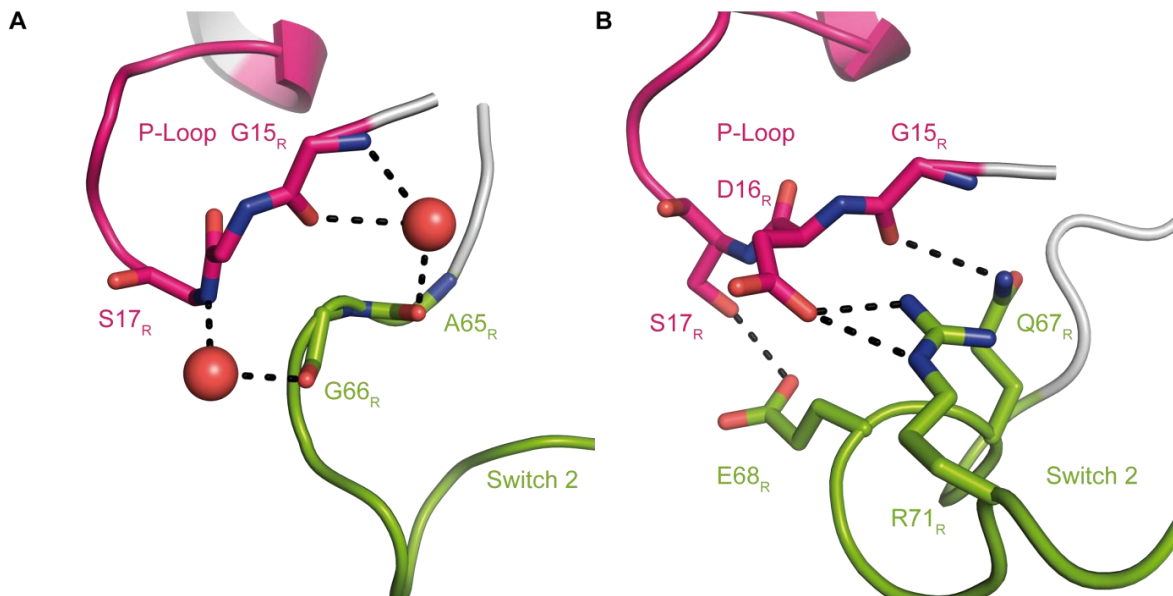


Abbildung 19: Vergleich der P-Loop und Switch 2-Interaktionen in der GTP-gebundenen und der nukleotidfreien Form von Rab1b. **A)** Ypt1:GppNHp als Modell für Rab1:GTP (Ypt1 ist das Rab1-Homolog aus Hefe. GppNHp ist ein nicht-hydrolysierbares GTP-Analog). Die N-terminalen Aminosäuren G66_R und A65_R aus Switch 2 interagieren indirekt über 2 Wassermoleküle mit S17_R und G15_R aus dem P-Loop. **B)** Im nukleotidfreien Rab1 interagieren die Seitenketten der Aminosäuren Q67_R, E68_R und R71_R aus dem zentralen Bereich von Switch 2 direkt mit den Aminosäuren G15_R, D16_R und S17_R des P-Loops. Rote Kugeln: Wassermoleküle.

Die Anhebung von Switch 2 führt zur direkten Interaktion der Seitenketten von Q67_R, R71_R und E68_R aus dem zentralen Bereich von Switch 2 (AGQERFRTITSSYYRG) mit den Aminosäuren G15_R, D16_R und S17_R des P-Loops (GDSGVGKS; Abbildung 19B). Dadurch unterscheidet sich Switch 2 in der nukleotidfreien Form von der GTP-gebundenen Form von Rab1, da der P-Loop nun nicht mehr nur indirekt über Wassermoleküle kontaktiert wird (GDSGVGKS; Abbildung 19A). Zusammen mit den Wechselwirkungen zwischen N451_D und R453_D mit S17_R und D16_R aus der Bindungsstelle 1, induziert die Bindung von DrrA₃₄₀₋₅₃₃ eine leichte Verschiebung des P-Loops um etwa 1,9 Å (Abbildung 14).

Zusammengefasst erfolgt die Bindung von Rab1b durch DrrA über Switch 2, Switch 1, den P-Loop und durch die Bindungsstelle 1 (α_5 - α_6 -Schleife), Bindungsstelle 2 (α_6 - α_7 -Schleife), die α_4 - und die α_5 -Helix von DrrA. Die DrrA-Bindung an Rab1b

induziert Änderungen der Rab1b-Struktur, wodurch Switch 2 eine geordnete Struktur annimmt, die wahrscheinlich den Nukleotidaustausch begünstigt und gleichzeitig den P-Loop in einer für die Nukleotidbindung wichtigen Konformation stabilisiert. Der Interswitch-Bereich nimmt eine gestreckte Konformation an, wodurch die Rab1b-Kontaktfläche zu DrrA und damit vermutlich auch die Affinität der Interaktion erhöht wird. Die Umlagerung von Switch 1 führt zur Öffnung der Nukleotidbindungstasche, wodurch die Nukleotidfreisetzung erleichtert wird.

4.4 Der DrrA-katalysierte Nukleotidaustauschmechanismus

Die Voraussetzung für den Nukleotidaustausch in Rab-Proteinen ist die Abschwächung der Affinität für das Nukleotid. Die hochaffine Bindung eines Nukleotids in Rab-Proteinen erfordert die Anwesenheit eines Magnesiumions, welches das β - und γ -Phosphat des Nukleotids koordiniert. Die Bindung von Mg^{2+} erfolgt in Rab1b durch S22_R des P-Loops (GDSGVGKS) zusammen mit D63_R aus G3 (DxxGQE)^{132,133}, welches direkt mit S22_R und indirekt mit Mg^{2+} über ein Wassermolekül interagiert (Abbildung 20A). Ein weiteres wichtiges Element für die GDP/GTP-Bindung ist das P-Loop-Lysin (GDSGVGKS), welches das β - und γ -Phosphat des Nukleotids bindet (Abbildung 21A). GEFs im Allgemeinen induzieren Änderungen der Interaktionsabstände zwischen K21_R, S22_R, D63_R und GDP/GTP bzw. Mg^{2+} , um die Freisetzung des Nukleotids zu katalysieren. Dabei müssen die genannten Aminosäuren im Rab:GEF-Komplex in definierten Positionen stabilisiert werden, um eine effiziente Neubindung eines Nukleotids und die Stabilität des Proteins zu gewährleisten. Die Rab1b₃₋₁₇₄:DrrA₃₄₀₋₅₃₃-Struktur (Abbildung 20B) zeigt eine Umorientierung der Hydroxylgruppe von S22_R, wodurch die gemeinsame Koordination des Mg^{2+} -Ions mit D63_R nicht mehr möglich ist. Die Affinität zu GDP wird so durch die fehlende Magnesiumbindung geschwächt. Zusätzlich wird K21_R durch Bindung von DrrA₃₄₀₋₅₃₃ aus der β -Phosphat-koordinierenden Position bewegt und die Nukleotidaffinität wird so weiter geschwächt (Abbildung 21B).

Ergebnisse

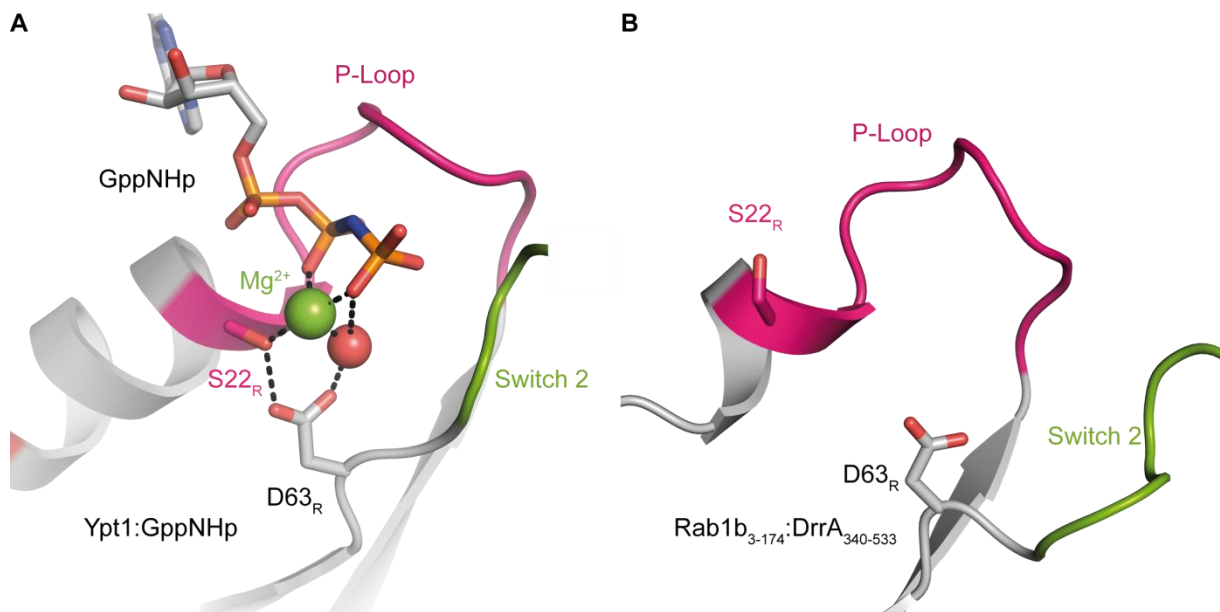


Abbildung 20: Vergleich der Mg²⁺-koordinierenden Aminosäuren von Rab1b vor und nach der Bindung von DrrA₃₄₀₋₅₃₃. **A)** Rab1:GppNHp als Modell für Rab1:GTP (pdb: 3NKV). D63_R koordiniert durch eine polare Interaktion mit einem Wassermolekül zusammen mit S22_R das Mg²⁺-Ion, welches das β- und γ-Phosphat des GTP-Analoges koordiniert. **B)** Im nukleotidfreien Rab1b₃₋₁₇₄:DrrA₃₄₀₋₅₃₃-Komplex kommt es zu einer Umorientierung der Seitenkette von S22_R, wodurch die Mg²⁺-Koordinierung nicht mehr möglich ist. Rote Kugel: Wassermolekül, grüne Kugel: Magnesiumion.

Die gestreckte Seitenkette von K21_R interagiert nun mit G15_R, D63_R und einem Wassermolekül, die wiederum von T64_R und D67_R aus Switch 2 gebunden werden. D63_R koordiniert im Rab1b₃₋₁₇₄:DrrA₃₄₀₋₅₃₃-Komplex somit nicht mehr indirekt das Magnesiumion, sondern hält die Seitenkette des P-Loop-Lysin (K21_R) in einer für die Nukleotidbindung vermutlich günstigen Konformation.

Der P-Loop wird im nukleotidfreien Zustand durch ein Wassermolekül stabilisiert, welches von den Wasserstoffen der Amidgruppen von K21_R, G20_R, V19_R und G18_R und dem Carbonylsauerstoff von G15_R koordiniert wird (Abbildung 21B).

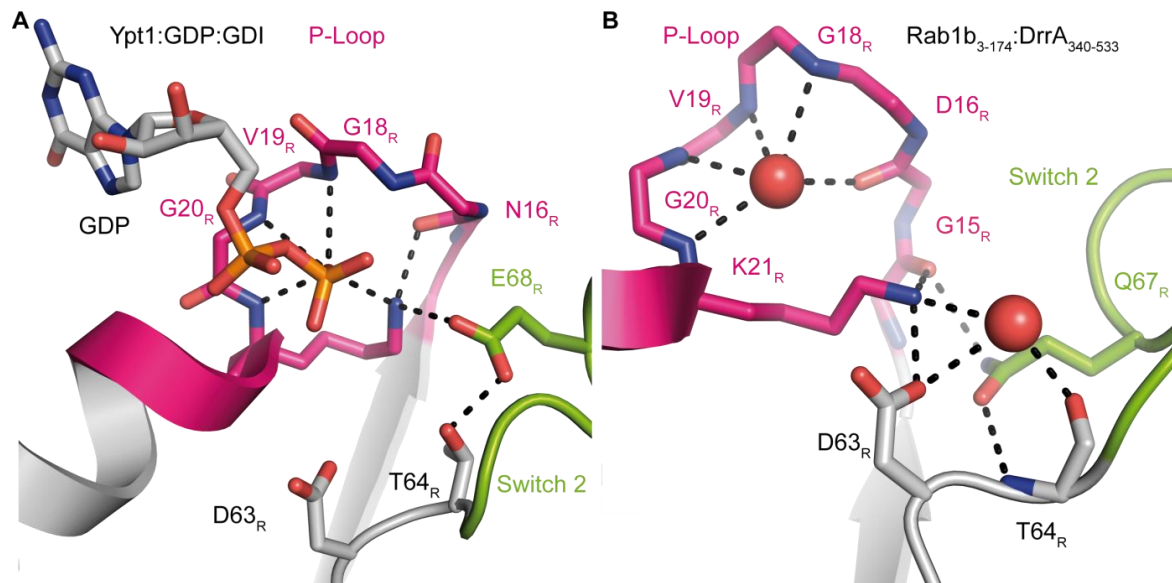


Abbildung 21: Vergleich der Stabilisierung des P-Loops vor und nach der Bindung von DrrA₃₄₀₋₅₃₃. **A)** Die Sauerstoffe am β -Phosphat von GDP koordinieren die Wasserstoffe der Amidgruppen von K21_R, G20_R und G18_R, den Carbonylsauerstoff von N16_R und die ϵ -Aminogruppe von K21_R. Die ϵ -Aminogruppe von K21_R koordiniert zudem die Seitenkette von E68_R aus Switch 2. (Ypt1:GDP:GDI wurde als Modell für Rab1:GDP verwendet; pdb: 2BCG) **B)** Die Stabilisierung des P-Loops erfolgt im Rab1b₃₋₁₇₄:DrrA₃₄₀₋₅₃₃-Komplex durch ein Wassermolekül, das von den Wasserstoffen der Amidfunktionen von K21_R, G20_R, V19_R, G18_R und durch den Carbonylsauerstoff von D16_R koordiniert wird. Das P-Loop-Lysin K21_R erfährt eine Umorientierung weg vom P-Loop und wird direkt von D63_R, G15_R und einem Wassermolekül koordiniert, die wiederum durch polare Interaktionen mit T64_R und D67_R aus Switch 2 koordiniert werden. Rote Kugel: Wassermoleküle.

Ein weiteres Merkmal der Rab1b₃₋₁₇₄:DrrA₃₄₀₋₅₃₃-Struktur, welches die Nukleotidbindung schwächt, ist die im Vergleich zur GDP- und GTP-gebundene Form veränderte Anordnung der Aminosäuren des NKxD-Motivs (G4). Diese Anordnung des NKxD-Motivs ist spezifisch für die Bindung von DrrA, da eine solche Konformationsänderung in anderen Rab:GEF-Komplexstrukturen nicht zu beobachten ist.

Die Aminosäuren des NKxD-Motivs in der β 5_R- α 4_R-Schleife sind wichtig für die Bindung der Guaninbase. In der nukleotidfreien Rab1b₃₋₁₇₄:DrrA₃₄₀₋₅₃₃-Struktur überlappen die Aminosäuren des NKxD-Motivs mit der Position, die eigentlich durch GDP (pdb:2BCG) oder GTP (pdb:3NKV) besetzt wird (Abbildung 22). Besonders auffällig ist die Position von K122_R, das normalerweise den Sauerstoff der Ribose des Guaninnukleotids koordiniert und zusätzlich mit den Carbonylsauerstoff von G18_R (P-Loop) wechselwirkt.

In der Rab1b₃₋₁₇₄:DrrA₃₄₀₋₅₃₃-Struktur ist K122_R um etwa 90° gedreht (roter Pfeil in Abbildung 22) und koordiniert nun T127_R und den Carbonylsauerstoff von D124_R der

Ergebnisse

α_4 - β_5 -Schleife. Wie diese Konformationsänderung durch die DrrA-Bindung in der α_4 - β_5 -Schleife induziert wird, ist aus der Struktur nicht ersichtlich. Diese Konformation scheint zunächst ungünstig für die Bindung eines GTP-Moleküls zu sein. N121_R (NKxD) unterscheidet sich allerdings kaum in der Konformation zum GDP- oder GTP-gebundenen Zustand und der P-Loop sowie Switch 2 werden durch die Bindung von DrrA in einer für die Nukleotidbindung günstigen Konformation stabilisiert. Dies lässt die Spekulation zu, ob die Bindung eines GTP-Moleküls zunächst durch die Bindung der Phosphatgruppen mit dem P-Loop stattfindet und die Anwesenheit der Guaninbase durch einen *induced-fit*-Mechanismus zum Umklappen der α_4 - β_5 -Schleife führt, wodurch die typische Koordination des Guaninnukleotids wieder möglich wird.

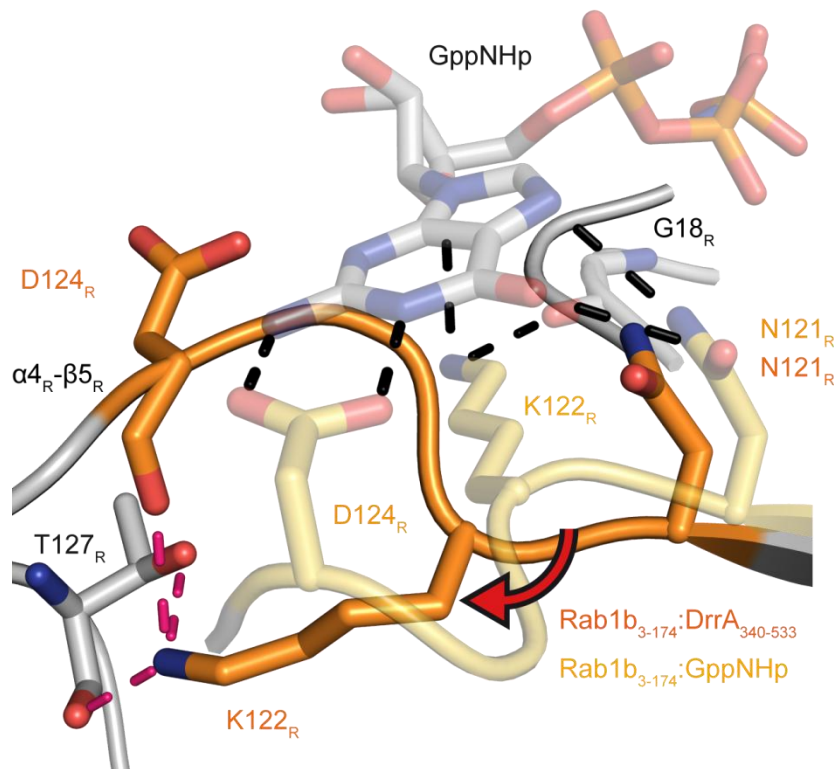


Abbildung 22: Die Aminosäuren des NKxD-Motivs nehmen in der Rab1b₃₋₁₇₄:DrrA₃₄₀₋₅₃₃ Struktur den Platz der Guaninbase ein. K122_R koordiniert in der Rab1b₃₋₁₇₄ Struktur den Sauerstoff der Ribose und G18 aus dem P-Loop (schwarze gestrichelte Linien). In der Rab1b₃₋₁₇₄:DrrA₃₄₀₋₅₃₃ ist K122_R um etwa 90° gedreht (roter Pfeil) und wird nun von T127_R und D124_R aus der α_4 - β_5 -Schleife koordiniert (pink gestrichelte Linien). In orange ist das NKxD Motiv der Rab1b₃₋₁₇₄:DrrA₃₄₀₋₅₃₃-Struktur gezeigt, in hellgelb ist die Koordination der Guaninbase durch die Aminosäuren des NKxD-Motivs der Rab1b₃₋₁₇₄:GppNHp-Struktur gezeigt.

4.5 Analyse der in der Rab1b-Bindung involvierten Aminosäuren von DrrA

Um den Einfluss der Aminosäuren aus Bindungsstelle 1 (N451_D, R453_D) und Bindungsstelle 2 (D480A_D, S483A_D) von DrrA auf die Bindung von Rab1b (P-Loop: D16_R, S17_R bzw. Switch 1: E35_R, S36_R) zu untersuchen, wurden DrrA-Konstrukte mit Alaninsubstitutionen an den Positionen N451_D, R453_D, D480A_D, S483A_D verwendet. Die DrrA-Konstrukte mit Einfach-, Doppel- oder Vierfachmutationen wurden mittels analytischer Gelfiltration auf ihre Rab1b-Bindungseigenschaften getestet (Abbildung 24).

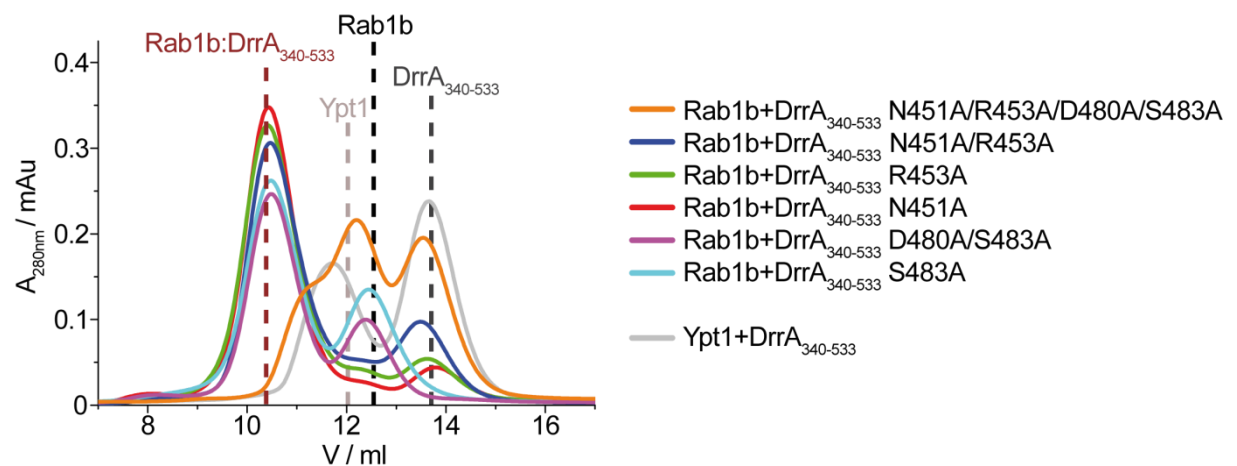


Abbildung 23: Vergleich der unterschiedlichen Alaninsubstitutionen in den Bindungsstellen 1 und 2 in Bezug auf ihre Eigenschaft Rab1b zu binden. Die Vierfachmutante (orange) ist nicht in der Lage, Rab1b zu binden. Die Doppelmutanten (blau, lila) und die Einfachmutanten (grün, rot, türkis) binden noch Rab1b. Ypt1, das Rab1b Homolog aus Hefe (grau), wird nicht von DrrA gebunden (siehe 1.1.2).

DrrA-Konstrukte mit einer Mutation (N451A_D, R453A_D, S483A_D) und mit Doppelmutationen in einer der zwei Bindungsstellen (N451A_D/R453A_D bzw. D480A_D/S483A_D) bilden Komplexe mit Rab1b (Abbildung 24: rot, grün, türkis, blau, lila). Das DrrA-Konstrukt, welches die vierfachmutation beinhaltet (N451A_D/R453A_D/D480A_D/S483A_D) bildete keinen Komplex mit Rab1b (Abbildung 23: orange). Die Rab1b-Bindung durch DrrA-Konstrukte mit einer oder zwei Mutationen in Bindungsstelle 1 oder Bindungsstelle 2 beeinträchtigt nicht die Komplexbildung; werden dagegen in beiden Bindungsstellen jeweils 2 Aminosäuren mutiert, verliert DrrA die Eigenschaft, Rab1b zu binden.

Ergebnisse

Parallel dazu wurden diese DrrA-Konstrukte von Lena Oesterlin auf ihre GEF-Aktivität, bezogen auf Rab1b, untersucht⁴. Diese Ergebnisse zeigten, dass die GEF-Aktivität der einzelnen DrrA-Konstrukte in der folgenden Reihenfolge abnahm: $S483A_D = D480A_D/S483A_D < N451A_D < R453A_D < N451A_D/R453A_D < N451A_D/R453A_D/D480A_D/S483A_D$.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die Mutationen einer Aminosäuren in der Bindungsstelle1 ($N451A_D$ und $R453A_D$) die GEF-Aktivität von DrrA stärker beeinträchtigen als die Mutationen in $S483_D$ oder $D480_D$ und $S483_D$ in Bindungsstelle2. Die Doppelmutante $N451A_D/R453A_D$ war nahezu katalytisch inaktiv.

Die Aminosäuren der Bindungsstelle1 ($N451_D$ und $R453_D$), die mit dem P-Loop interagieren, sind daher wichtiger für die GEF-Aktivität als die Aminosäuren der Bindungsstelle 2 ($D480A_D/S483A_D$), die an der strukturellen Umlagerung von Switch 1 involviert sind.

4.6 Die Kristallstruktur der P4M-Domäne von DrrA

Die 12 kDa große P4M-Domäne am C-Terminus von DrrA bindet PI4P⁸⁹. Proteinkonstrukte, die nur die minimale P4M-Domäne aus den Aminosäuren 544-647 beinhalten, zeigten nicht die volle Bindungsaktivität zu PI4P und waren instabil¹²². Daher wurde für die Kristallisation der P4M-Domäne ein Konstrukt verwendet, welches zur Stabilisierung der P4M-Domäne noch die GEF-Domäne enthielt. Die Struktur von DrrA₃₄₀₋₆₄₇, welches die GEF- und P4M-Domänen enthält, wurde mit einer Auflösung von 2,5 Å gelöst (Abbildung 24; für Datenstatistiken, siehe Material und Methoden, Tabelle 4).

Der Vergleich der P4M-Domänen-Struktur mit einer Strukturdatenbank durch den DALI-Server zeigte, dass die P4M keine Ähnlichkeit zu bekannten Phosphatidylinositolphosphat-bindenden Proteinen oder anderen Proteinfaltungen aufweist und somit eine noch nicht beobachtete, rein α -helikale Proteinfaltung besitzt.

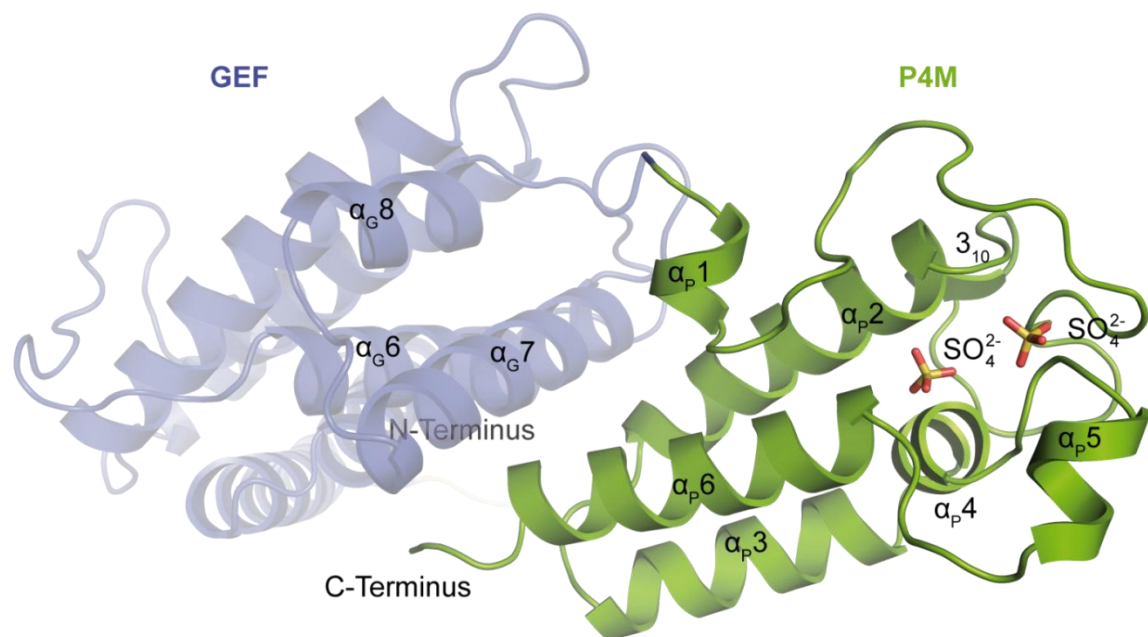


Abbildung 24: Die Kristallstruktur des DrrA₃₄₀₋₆₄₇ Konstrukts mit einer Auflösung von 2.5 Å zeigt die GEF- und die P4M-Domänen. Die P4M besitzt eine neue, rein α -helikale Proteinfaltung. Die GEF-Domäne ist in blau und die P4M-Domäne in grün dargestellt. Die Kristallstruktur der P4M enthält zwei Sulfationen (Stabdarstellung), die auf die Position der PI4P-Bindungstasche hindeuten.

Ergebnisse

Die P4M-Domäne besteht zu etwa 50% aus α -Helices (sechs α -Helices und einer 3_{10} -Helix) und 50% aus geordneten Schleifen. Die drei zentralen α -Helices α_2 , α_3 und α_6 sind senkrecht zu den Helices α_6 , α_7 und α_8 der GEF-Domäne angeordnet. Zwei Sulfationen aus dem Kristallisationspuffer befinden sich in einer positiv geladenen Tasche (Abbildung 25,26), die durch die α_1 - α_2 -Schleife, die α_4 - α_5 -Schleife und der α_6 -Helix gebildet wird.

Die Struktur der PI3P-bindenden $p47^{phox}$ -PX-Domäne¹³⁴ enthält ebenfalls zwei Sulfationen in einer positiv geladenen Tasche. Der Vergleich mit der PI3P-gebundenen $p40^{phox}$ PX-Domäne, zeigt, dass die Positionen der Phosphoratome mit denen des gebundenen PI3Ps übereinstimmen¹³⁴.

Daher kann angenommen werden, dass die positiv geladene Tasche der P4M-Domäne, die PI4P-Bindungstasche darstellt.

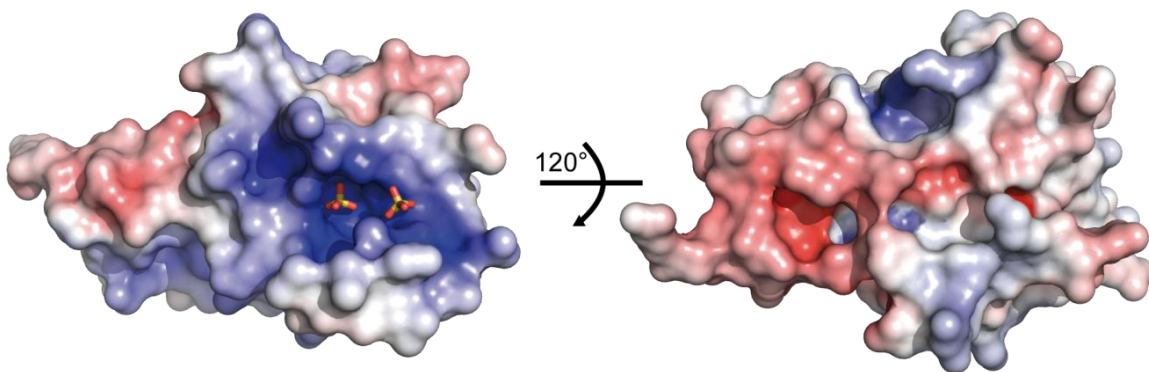


Abbildung 25: Darstellung des elektrostatischen Oberflächenpotentials der P4M. Zwei Sulfationen (Stabdarstellung) befinden sich in einer positiv geladenen Tasche, die vermutlich die PI4P-Bindungstasche darstellt.

Die Rückseite der Proteinoberfläche in Bezug auf die vermutete PI4P-Bindungstasche ist negativ geladen und hat so vermutlich eine abstoßende Wirkung auf die negativ geladene Membranoberfläche, wodurch die Orientierung von DrrA auf der Membran erleichtert wird.

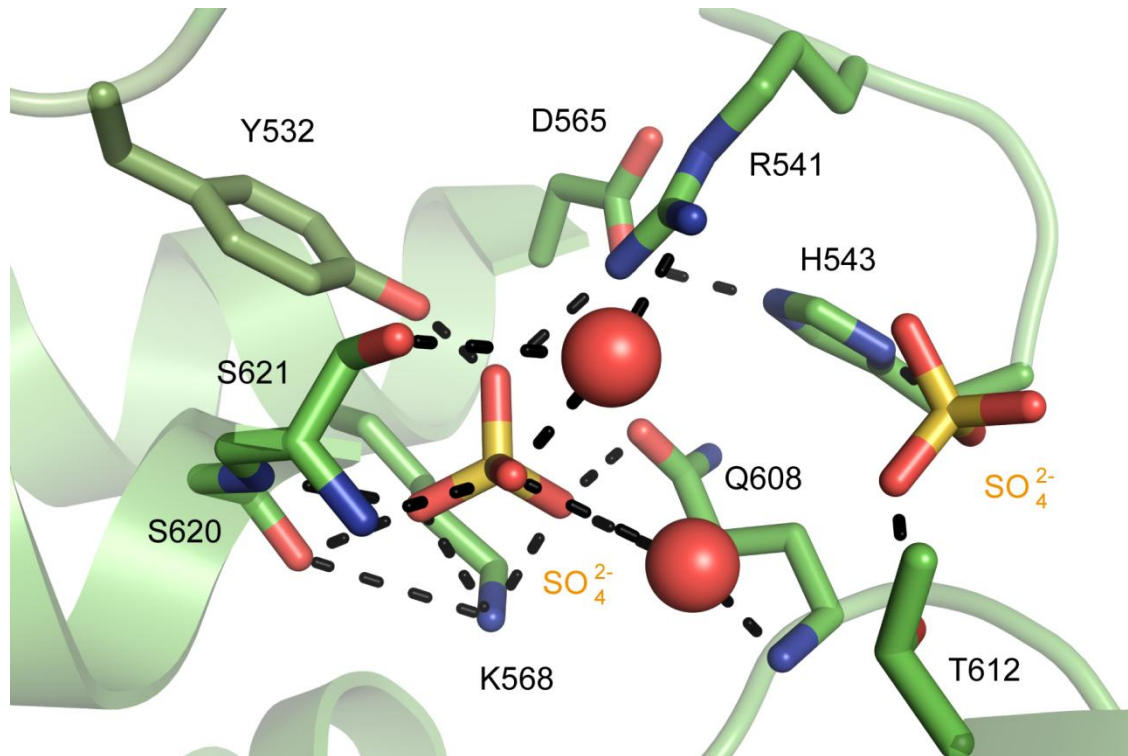


Abbildung 26: Darstellung der potentiellen PI4P-Bindungsstelle der P4M-Domäne. Die polaren Interaktionen zwischen zwei Sulfationen (Stabdarstellung), zwei Wassermolekülen (rote Kugeln) und ausgewählten Aminosäuren der P4M sind durch gestrichelte Linien dargestellt. Die Aminosäure K568 befindet sich an der tiefsten Stelle der positiv geladenen Tasche.

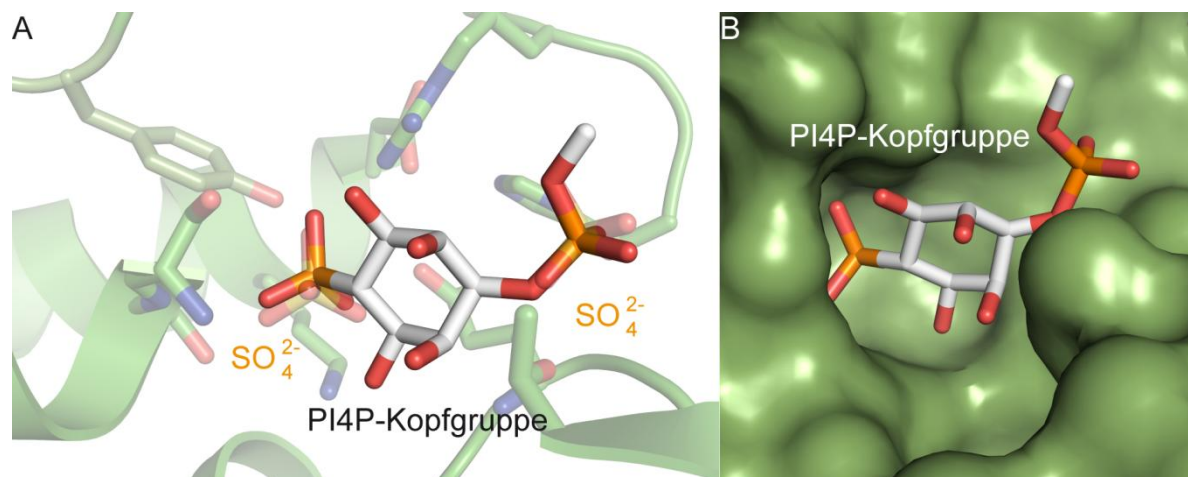


Abbildung 27: Modellierung der PI4P-Kopfgruppe in die P4M-Bindungstasche. **A)** Der Abstand beider Sulfationen entspricht dem Abstand der 1'- und 4'-Phosphatgruppen der PI4P-Kopfgruppe. Die Kopfgruppe eines PI4P-Moleküls wurde in die vermutete PI4P-Bindungsstelle modelliert und stellt eine mögliche Orientierung des PI4P in der P4M dar. **B)** Die Oberflächendarstellung der P4M zeigt, dass die potentielle PI4P-Bindungstasche ausreichend Platz für die PI4P-Kopfgruppe bietet. PI4P: Phosphatidylinositol-4-Phosphat.

Ergebnisse

Die polaren Interaktionen zwischen den Sulfationen und zwei Wassermolekülen in der positiv geladenen Tasche der P4M-Domäne ist in Abbildung 26 dargestellt. Das Sulfation in der Mitte der Tasche wird über die Seitenketten von Y532, S621, Q608 und K568 koordiniert. Zusätzliche wasservermittelte Kontakte erfolgen über die Seitenketten von R541, S620 und der Aminogruppe von Q608. Das zweite Sulfation wird über die Seitenkette von H543 und die Hydroxylgruppe von T612 koordiniert.

Der Abstand beider Schwefelatome beträgt 7,2 Å und entspricht dem gleichen Abstand der 1'- und 4'-Phosphoratome in PI4P. Basierend auf der Position der Sulfationen wurde ein PI4P-Molekül in die angenommenen PI4P-Bindungstasche modelliert. Abbildung 27 zeigt eine mögliche Orientierung eines PI4P-Moleküls in der PI-Bindungstasche von DrrA. Unter Berücksichtigung der Position der 4'-Phosphatgruppe scheint die Aminosäure K568 entscheidend für die Bindung von PI4P durch die P4M-Domäne zu sein, da sich diese Aminosäure am Boden der vermuteten PI4P-Bindungstasche befindet. Basierend auf dieser Annahme wurde ein neues DrrA₃₄₀₋₅₃₃-Konstrukt mit einer Alaninsubstitution an dieser Position hergestellt. Der Einfluss von K568A auf die Bindung von PI4P wurde mittels Fluoreszenzbindungsstudien durchgeführt, die unter 4.6.4 beschrieben werden.

4.6.1 Die P4M-Domäne stabilisiert die GEF-Domäne

Die Kristallstruktur der GEF-P4M-Domänen zeigt, dass es eine Vielzahl an intramolekularen Interaktionen zwischen den GEF- und P4M-Domänen gibt, die vermutlich die Faltung der P4M stabilisieren (Abbildung 28). Die α -Helix $\alpha_{\text{GEF}7}$ der GEF-Domäne bildet über vier Aminosäuren (N495, H496, Q502, R506) polare Interaktionen mit Aminosäuren der P4M in Helix $\alpha_{\text{P4M}1}$ (E528), $\alpha_{\text{P4M}2}$ (A582) und $\alpha_{\text{P4M}6}$ (E631, S635) aus. Insbesondere die Interaktion zwischen H496 und der $\alpha_{\text{P4M}1}$ Helix könnte wichtig für die Anordnung der Schleifen sein, die die potentielle PI4P Bindungstasche bilden (Abbildung 28).

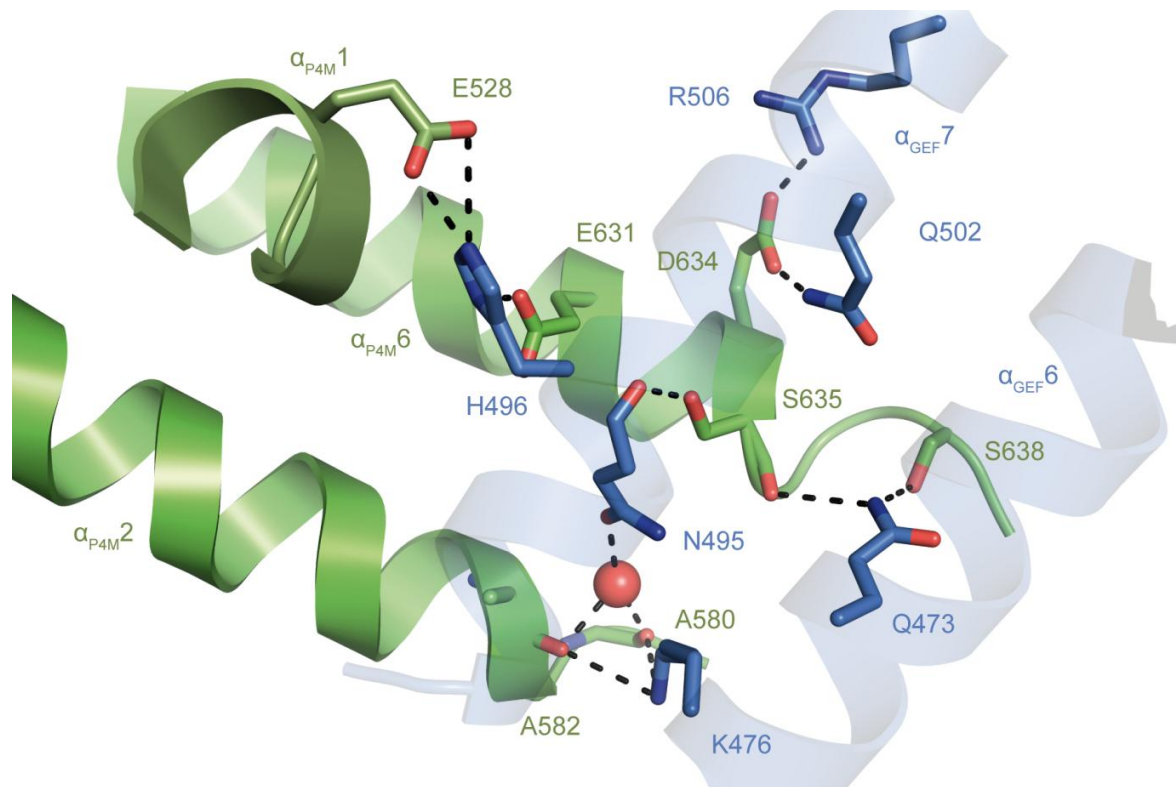


Abbildung 28: Ein ausgeprägtes Netzwerk an intramolekularen Interaktionen zwischen der P4M und GEF-Domäne in DrrA zeigen, dass für die korrekte Faltung der P4M vermutlich die α -Helices $\alpha_{\text{GEF}6}$ und $\alpha_{\text{GEF}7}$ benötigt werden. Die P4M ist in grün und die GEF-Domäne in blau dargestellt.

4.6.2 Die P4M-Domäne bindet PI4P mit nanomolarer Affinität

Die Affinitätsbestimmung von DrrA und PI4P wurden mittels isothermaler Titrationskalorimetrie (ITC) unter Verwendung des wasserlöslichen PI4P-Analogs di-C4-PI4P mit der Hilfe von Mark Wehner (Arbeitsgruppe Christian Herrmann, Ruhr-Universität Bochum) durchgeführt. Die ITC-Messung lieferte eine unerwartet hohe Affinität von DrrA zu di-C4-PI4P ($K_D = 30$ nM, Abbildung 29). Aufgrund der hohen Affinität ist die Bestimmung des K_D -Wertes sehr ungenau.

Ergebnisse

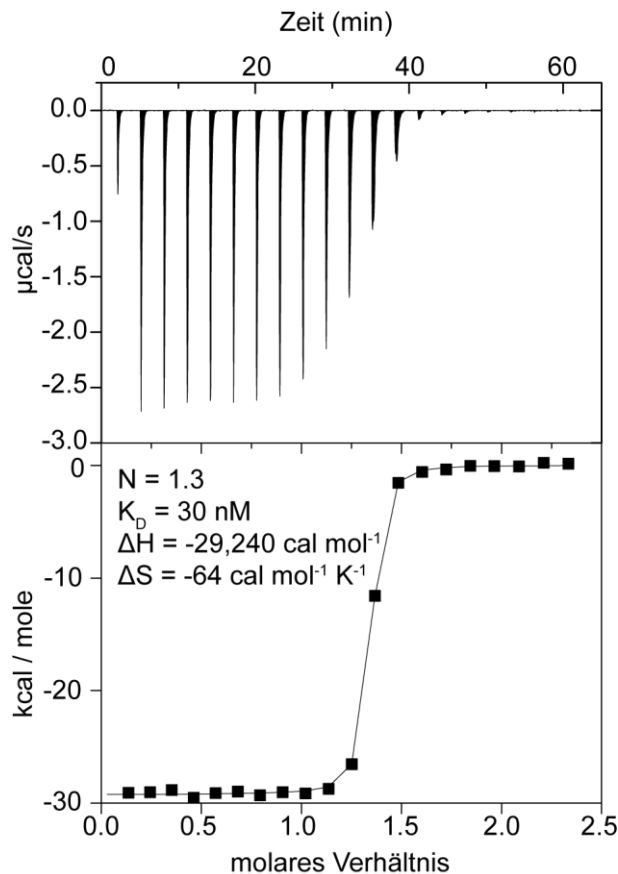


Abbildung 29: ITC-Messung zur Bestimmung der Affinität zwischen DrrA₃₄₀₋₆₄₇ und di-C4-PI4P. Die ITC-Titration von 50 μM di-C4-PI4P zu 5 μM DrrA₃₄₀₋₆₄₇ zeigt deutliche Peaks der Wärmetönung, die schnell in die Sättigung übergehen (oben). Die Anpassung der Integrale der Wärmetönung ergibt eine hohe Affinität von P4M und di-C4-PI4P mit einem K_D von 30 nM. PI4P: Phosphatidylinositol-4-Phosphat. Von den gemessenen Signalen wurden Signale der Kontrollmessungen (Puffer zu DrrA₃₄₀₋₆₄₇ bzw. di-C4-PI4P zu Puffer) subtrahiert.

Zur Überprüfung der ITC-Ergebnisse wurde die Bestimmung der Assoziationsraten- und Dissoziationsratenkonstanten (k_{on} bzw. k_{off}) von DrrA₃₄₀₋₆₄₇ durch Stopped-flow Messungen durchgeführt. Unter Verwendung des fluoreszenzmarkierten BODIPY-PI4P wurde die zeitabhängige Änderung der Fluoreszenzpolarisation in Abhängigkeit von der DrrA₃₄₀₋₆₄₇-Konzentration zur Bestimmung der Assoziationsratenkonstante gemessen. Die zeitabhängigen Assoziationskurven sind in Abbildung 30 dargestellt.

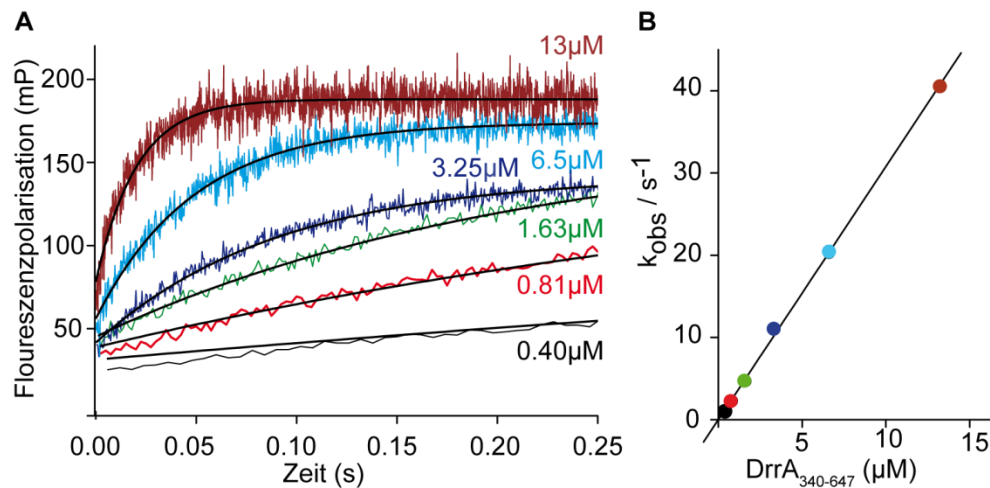


Abbildung 30: Bestimmung der Assoziationsratenkonstante. **A)** Die Assoziationskurven zeigen die Änderungen der Fluoreszenzpolarisation für 166 nM BODIPY-PI4P mit den angegebenen Konzentrationen von DrrA₃₄₀₋₆₄₇. **B)** Die Geschwindigkeitskonstanten pseudo-erster Ordnung k_{obs} der einzelnen Assoziationskurven aus A) sind gegen die jeweils verwendeten DrrA₃₄₀₋₆₄₇-Konzentrationen aufgetragen. Die Steigung der Ausgleichsgeraden ergibt eine Assoziationsratenkonstante (k_{on}) von $3,2 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$.

Die einzelnen Fluoreszenzpolarisationskurven ließen sich mit einer Exponentialfunktion erster Ordnung anpassen und die resultierenden Geschwindigkeitskonstanten pseudo-erster Ordnung k_{obs} wurden gegen die jeweils verwendeten DrrA₃₄₀₋₆₄₇-Konzentrationen aufgetragen (Abbildung 30B). Die Steigung der Ausgleichsgerade ergab eine Assoziationsratenkonstante (k_{on}) von $3,2 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$.

Zur Bestimmung der Dissoziationsratenkonstante wurde die Abnahme der Fluoreszenzpolarisation durch Verdrängung von BODIPY-PI4P aus dem Komplex mit DrrA₃₄₀₋₆₄₇ durch einen Überschuss von nicht fluoreszenzmarkierten di-C4-PI4P detektiert. Die Fluoreszenzpolarisationskurve ließ sich mit einer Exponentialfunktion erster Ordnung anpassen und ergab eine langsame Dissoziationsratenkonstante (k_{off}) von $0,016 \text{ s}^{-1}$ (Abbildung 31). Die Dissoziationsgleichgewichtskonstante (K_D ; $K_D = k_{off}/k_{on}$) für den Komplex aus DrrA:BODIPY-PI4P betrug damit 5 nM.

Ergebnisse

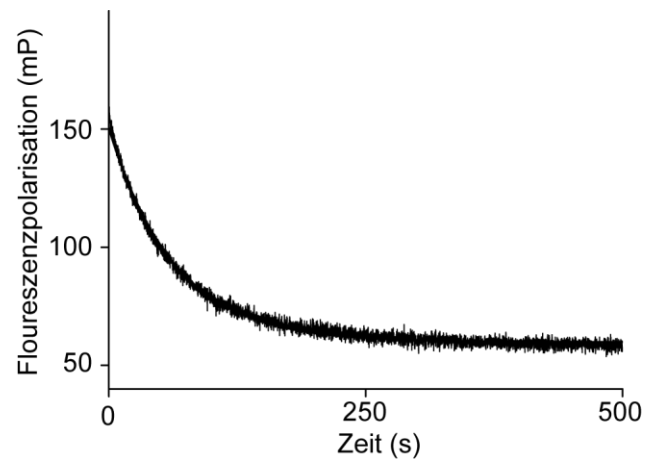


Abbildung 31: Die Kurve der Abnahme der Fluoreszenzpolarisation zeigt die Verdrängung des fluoreszenzmarkierten BODIPY-PI4P aus dem Komplex mit 0,4 μM DrrA₃₄₀₋₆₄₇ durch einen Überschuss von nicht fluoreszenzmarkierten di-C4-PIP (5 μM) und ergibt eine Dissoziationsratenkonstante (k_{off}) von 0,016 s^{-1} .

Die Stopped-flow Messungen, bei denen das fluoreszenzmarkierte BODIPY-PI4P verwendet wurde, ergaben eine 6fach höhere Affinität für DrrA₃₄₀₋₆₄₇ im Vergleich zur ITC-Messung, bei der di-C4-PI4P verwendet wurde. Um den Einfluss der Fluoreszenzgruppe auf die Affinität zu untersuchen, wurde ein Verdrängungsexperiment mit nicht-markiertem di-C4-PI4P durchgeführt. Die Verdrängung von BODIPY-PI4P aus dem Komplex mit DrrA₃₄₀₋₆₄₇ (200 nM) wurde nach Zugabe von 400 nM di-C4-PI4P beobachtet und gemäß eines einfachen Kompletionsmodells angepasst. Vom Endpunkt der Reaktion konnte so die Dissoziationskonstante (K_D) für nicht-markiertes di-C4-PI4P mit 18,2 nM bestimmt werden. Die kinetischen Konstanten wurden aus der zeitabhängigen Änderung der Fluoreszenzpolarisation berechnet ($k_{\text{on}} = 4,1 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, $k_{\text{off}} = 0,079 \text{ s}^{-1}$). Das Fehlen der Fluoreszenzgruppe führt somit zu einer vierfach schwächeren Bindung von di-C4-PI4P an die P4M im Vergleich zu BODIPY-PI4P. Dieses Ergebnis ist in sehr guter Übereinstimmung mit der Dissoziationsgleichgewichtskonstante zwischen P4M und di-C4-PI4P, die mittels ITC ermittelt wurde¹³⁵.

4.6.3 Die PI4P-Bindung der P4M-Domäne ist unabhängig von der Rab1-Bindung

Aufgrund der räumlichen Nähe der P4M zur GEF-Domäne wurde auch der Einfluss der Rab1b-Bindung auf die Affinität der P4M-Domäne zu PI4P untersucht. Dazu wurde die zeitabhängige Verdrängung von BODIPY-PI4P aus dem Komplex mit dem nukleotidfreien-Komplex aus Rab1b:DrrA₃₄₀₋₆₄₇ mit nicht-markiertem di-C4-PI4P gemessen. Die Messung zeigte keinen Unterschied in der Dissoziationsrate (Abbildung 32). Die Bindung von Rab1b an die GEF-Domäne hat somit keinen Einfluss auf die PI4P-Bindung der P4M-Domäne¹³⁵.

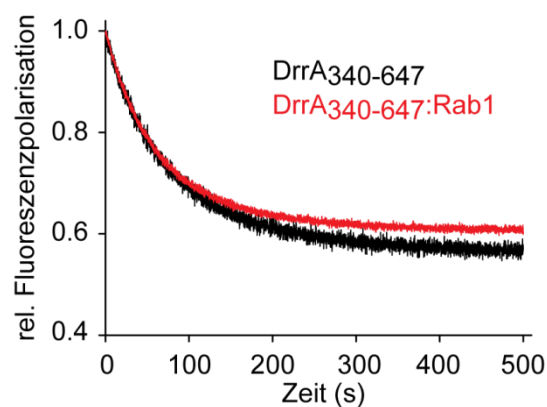


Abbildung 32: Rab1b hat keinen signifikanten Einfluss auf die Dissoziationsrate des Komplexes aus DrrA₃₄₀₋₆₄₇ und BODIPY-PI4P. BODIPY-PI4P wurde aus dem Komplex mit DrrA₃₄₀₋₆₄₇ (200 nM) bzw. mit dem nukleotidfreien Rab1b:DrrA₃₄₀₋₆₄₇-Komplex durch einen Überschuss von nicht-markiertem di-C4-PI4P (2 μ M) verdrängt (schwarze Kurve). Die Rate der Verdrängung von BODIPY-PI4P aus dem Komplex mit DrrA₃₄₀₋₆₄₇, bzw. Rab1b: DrrA₃₄₀₋₆₄₇ ist vergleichbar.

4.6.4 K568 ist entscheidend für die PI4P-Bindung der P4M-Domäne

Weiterhin wurde die Relevanz von Lysin 568, welches sich am Boden der positiv geladenen Tasche der P4M befindet auf die PI4P Bindung untersucht. Da angenommen wurde, dass das Sulfation im Inneren der Tasche möglicherweise die Position der 4'-Phosphatgruppe von PI4P nachahmen könnte und unter anderem von K568 koordiniert wird, wurde das Konstrukt DrrA₃₄₀₋₆₄₇K568A hergestellt. Zunächst wurden DrrA₃₄₀₋₆₄₇ und DrrA₃₄₀₋₆₄₇K568A mittels Schmelzpunktanalysen und Circular dichroismus (Abbildung 33) miteinander verglichen, um einen negativen Einfluss der Mutation auf die Faltung und die Stabilität des Proteins auszuschließen. Beide Analysen zeigten, dass die K568A

Ergebnisse

Mutation die Proteinstabilität nicht beeinträchtigte und die Faltung des Proteins erhalten blieb.

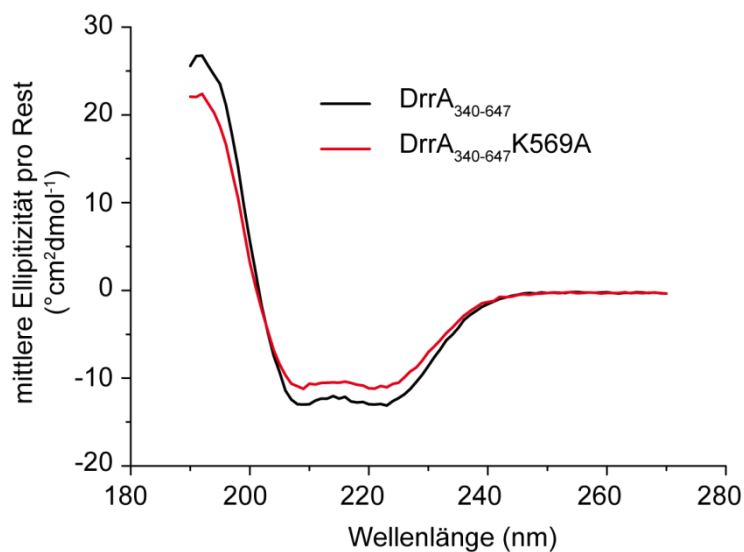


Abbildung 33: Die Analyse von DrrA₃₄₀₋₆₄₇ und DrrA₃₄₀₋₆₄₇K568A mittels Circular dichroismus zeigt ein nahezu identisches Spektrum und einen für α -helikale Proteine typischen Verlauf mit einem Minimum bei 222 nm.

Die Rolle von K568 der P4M-Domäne bei der PI4P-Bindung wurde anschließend mittels Fluoreszenzbindungsstudien untersucht. Der Vergleich der PI4P-Bindung von DrrA₃₄₀₋₆₄₇(K568A) mit DrrA₃₄₀₋₆₄₇ und DrrA₁₋₆₄₇ ist in Abbildung 34 dargestellt. Die Mutation von K569 zu Alanin führte zum vollständigen Verlust der PI4P-Bindung. Dieses Ergebnis bestätigt, dass die positiv geladene Tasche der P4M die Bindungstasche von PI4P ist und Lysin 568 entscheidend für Bindung von PI4P ist.

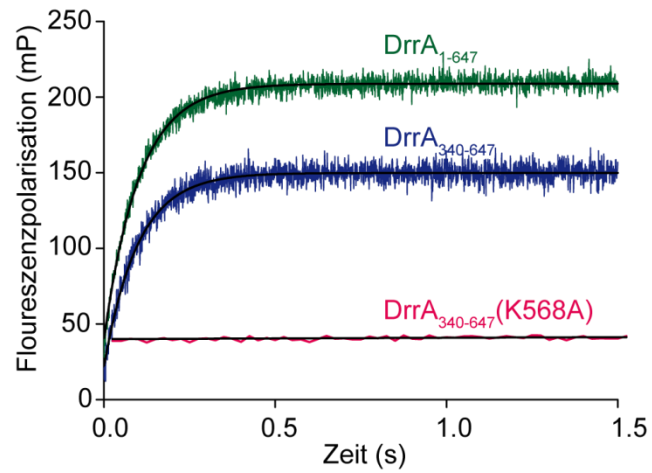


Abbildung 34: Die Alaninsubstitution von K568 führt zum Verlust der PI4P-Bindung an die P4M. Die Fluoreszenzpolarisationskurven zeigen die Assoziation von 166nM BODIPY-PI4P mit 6,5 μ M DrrA₃₄₀₋₆₄₇(K568A), DrrA₃₄₀₋₆₄₇ und DrrA₁₋₆₄₇.

4.7 LidA, ein außergewöhnlicher Rab-Effektor

Ein weiteres Projekt dieser Arbeit umfasst die biochemische und strukturelle Untersuchung des Legionellenproteins LidA. Es wurde beschrieben, dass LidA Rab1, Rab6 und Rab8 bindet. Außerdem wurde gezeigt, dass LidA ungewöhnlicherweise mit der aktiven als auch mit der inaktiven Form von Rab1 interagiert. Somit ist LidA ein ungewöhnlicher Rab-Effektor, da diese normalerweise nur die GTP-gebundene Form des Rab-Proteins mit hoher Affinität binden. Daher wurde zunächst untersucht, ob LidA die aktive, GTP-gebundene Form von Rab1 mit einer höheren Affinität als das inaktive, GDP-gebundene Rab1 bindet. Weiterhin wurde getestet, ob LidA auch die GDP-gebundenen Formen von Rab6 und Rab8 bindet und ob Unterschiede in den Affinitäten zur aktiven Form bestehen. Zusätzlich wurden neue Bindungspartner von LidA identifiziert.

4.7.1 LidA bindet Rab-Proteine mit enorm hoher Affinität

Zur Bestimmung der Affinität der einzelnen Rab-Proteine mit LidA sollten die Assoziations- und Dissoziationsratenkonstanten (k_{on} bzw. k_{off}) durch Stopped-flow Messungen bestimmt werden, deren Quotient ($K_D = k_{off}/k_{on}$) die Dissoziationsgleichgewichtskonstante ergibt. Zur Bestimmung der Assoziationsratenkonstante wurde unter Verwendung des jeweiligen fluoreszenzmarkierten Rab-Proteins die zeitabhängige Änderung des Fluoreszenzsignals durch Zugabe von zunehmenden LidA-Konzentrationen gemessen. Die verwendeten Rab-Proteine wurden zuvor mit den fluoreszenzmarkierten Nukleotiden mantGDP oder mantGppNHp beladen. Der Fluoreszenzmarker 2'(3')-O-(N-Methyl-anthraniloyl; mant) ist dabei kovalent an die 2'- oder 3'-Hydroxyposition der Ribosegruppe des Guanosinnukleotids gebunden. Die Bindung von LidA an das Rab-Protein führt zu einer Änderung der chemischen Umgebung des Fluoreszenzmarkers, wodurch eine Änderung des Fluoreszenzsignals induziert wird. Die zeitabhängigen Assoziationskurven für Rab6a:mGDP sind in Abbildung 35A gezeigt. Die einzelnen Kurven ließen sich mit einer Exponentialfunktion erster Ordnung anpassen und die resultierenden Geschwindigkeitskonstanten pseudo-erster Ordnung k_{obs} wurden gegen die jeweils verwendeten LidA Konzentrationen aufgetragen. Die Steigung der Ausgleichsgeraden ergibt die Assoziationsratenkonstante (k_{on}). Das Ergebnis für Rab6a:mGDP ist in

Abbildung 35B dargestellt. Die Assoziationsratenkonstante (k_{on}) für Rab6a:mGDP und LidA beträgt $3,5 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$.

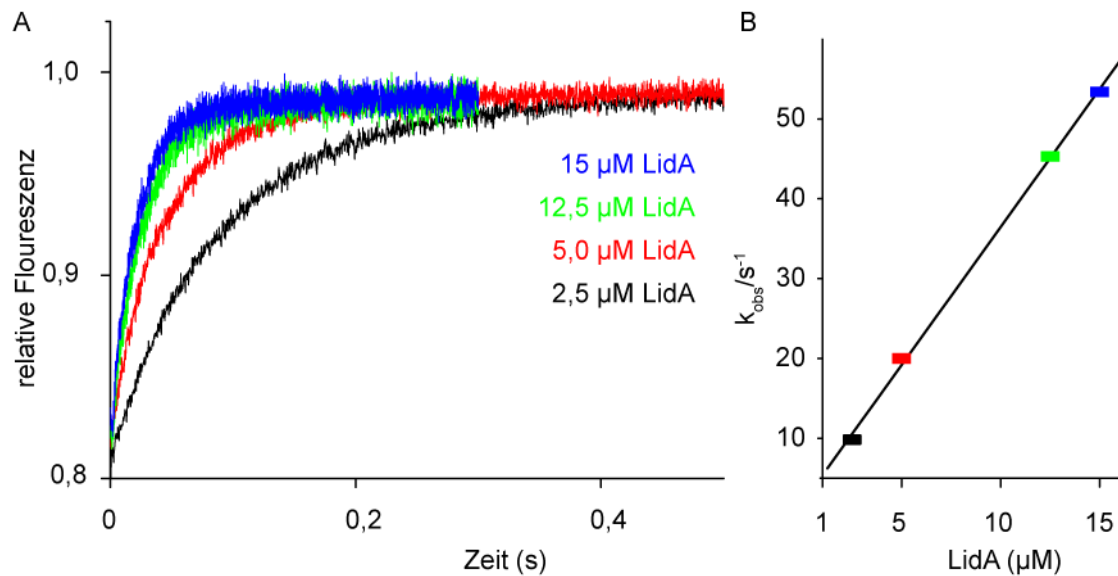


Abbildung 35: Die Bestimmung der Assoziationsratenkonstante ist exemplarisch für Rab6a:mGDP und LidA gezeigt. **A)** Die Assoziationskurven zeigen die zeitabhängige Änderung des Fluoreszenzsignals von Rab6a:mGDP durch Zugabe unterschiedlicher LidA Konzentrationen. **B)** Die Geschwindigkeitskonstanten pseudo-erster Ordnung k_{obs} der einzelnen Assoziationskurven aus A) sind gegen die jeweils verwendeten LidA-Konzentrationen aufgetragen. Die Steigung der Ausgleichsgeraden ergibt eine Assoziationsratenkonstante (k_{on}) von $3,5 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (siehe Tabelle 1).

Die Werte der Assoziationsratenkonstanten für LidA mit Rab1b:mGDP, Rab1b:mGppNHp, Rab6a:mGDP, Rab6a:mGppNHp, Rab8a:mGDP, bzw. Rab8a:mGppNHp sind in Tabelle 1 aufgelistet. Die Assoziationsratenkonstanten der jeweiligen Komplexe liegen alle in einem Bereich zwischen $3,5\text{-}13,2 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$.

Zur Bestimmung der Dissoziationsratenkonstante wurde die Abnahme der Fluoreszenzpolarisation für die Verdrängung des fluoreszenzmarkiertem Rab-Proteins aus dem Komplex mit RabXmantGXP:LidA durch einen Überschuss von nicht-fluoreszenzmarkierten Rab-Proteins beobachtet. Die Bestimmung der Dissoziationsratenkonstante für Rab1b und Rab8a war nicht möglich, da keine Verdrängung des fluoreszenzmarkierten Rab-Proteins aus dem RabXmantGXP:LidA-Komplex mit nicht-markiertem Rab-Protein über einen langen Zeitraum beobachtet werden konnte. Nur im Falle von Rab6:mGDP wurde eine Abnahme der

Ergebnisse

Fluoreszenzpolarisation durch Verdrängung mit einem Überschuss an Rab6a:GTP beobachtet (Abbildung 36).

Tabelle 1: Die Assoziationsratenkonstanten (k_{on}) der verschiedenen RabX:mGXP:LidA-Komplexe unterscheiden sich kaum voneinander und liegen alle in einem Bereich zwischen $3,5-13,2 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. Die Bestimmung der Dissoziationsratenkonstante (k_{off}) war nur für den Rab6a:mGDP:LidA-Komplex möglich, wodurch sich eine Affinität von 5,1 nM für den Rab6a:mGDP:LidA-Komplex ergibt. Der Vergleich der K_D -Werte von Rab6a:mGDP und LidA (volle Länge) bzw. LidA₂₀₁₋₅₈₃ zeigt keinen signifikanten Unterschied der K_D -Werte. Daher kann ein Einfluss der N- oder C-terminalen Domänen von LidA auf die Rab-Bindung ausgeschlossen werden. *: Die Messungen wurden mit LidA₂₀₁₋₅₈₃ durchgeführt (Adam Cichy); **: der K_D basiert auf einem geschätztem k_{off} ; n.b.: nicht beobachtbar.

Rab	$k_{on} (10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1})$	$k_{off} (\text{s}^{-1})$	$K_D (\text{nM})$
Rab1b:mGDP	12,1	n.b.	-
Rab1b:mGppNHp	9,0	n.b.	-
Rab6:mGDP	3,5	0,018	5,1
Rab6:mGDP*	9,8	0,046	4,9
Rab6:mGppNHp	5,6	n.b.	-
Rab6:mGppNHp*	4,6	$1,5 \cdot 10^{-4**}$	0,03**
AMP-Rab6:mGppNHp*	6,7	0,032	4,8
Rab8:mGDP	1,5	n.b.	-
Rab8mGppNHp	13,2	n.b.	-

Der Verlauf der Fluoreszenzpolarisationskurve für Rab6:mGDP wurde mit einer Exponentialfunktion erster Ordnung angepasst und ergab eine langsame Dissoziationsratenkonstante (k_{off}) von $0,018 \text{ s}^{-1}$. Die Dissoziationsgleichgewichtskonstante (K_D) für den Komplex aus Rab6:mGDP:LidA beträgt somit 5,1 nM.

Damit besitzt der Rab6a:mGDP:LidA-Komplex die bisher höchste Affinität für einen Rab:Rab-Effektor-Komplex (siehe Anhang, Tabelle 6). Dies ist erstaunlich, da der Rab6a:mGDP:LidA-Komplex der einzige LidA-Komplex ist, bei dem die Verdrängung des fluoreszenzmarkierten Rab-Proteins festgestellt werden konnte, d.h. im Vergleich zu Rab1b und Rab8a besitzt Rab6a:mGDP die geringste Affinität zu LidA. Die Affinitäten des

Rab6a:mGppNHp:LidA-Komplexes und der Komplexe zwischen Rab1b bzw. Rab8a mit LidA müssen daher noch deutlich höher liegen.

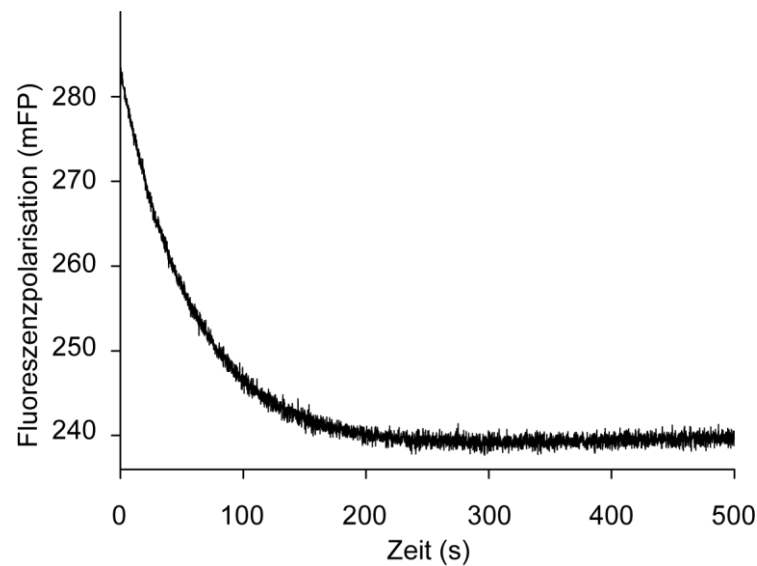


Abbildung 36: Die Kurve der Abnahme der Fluoreszenzpolarisation zeigt die Verdrängung des fluoreszenzmarkierten Rab6a:mGDP aus dem Komplex mit LidA durch einen Überschuss von nicht fluoreszenzmarkierten Rab6a:GTP. Die Steigung der Kurve entspricht der Dissoziationsratenkonstante k_{off} mit $0,018 \text{ s}^{-1}$. Eine Verdrängung des fluoreszenzmarkierten Rab-Proteins konnte nur für den Rab6a:mGDP-Komplex beobachtet werden. Die Affinitäten der anderen Komplexe müssen daher um einige Größenordnungen höher sein.

Die vollständige Verdrängung und damit die genaue Bestimmung der Dissoziationsratenkonstante k_{off} von Rab6:mantGppNHp aus dem Komplex mit LidA war nicht möglich. Aus der langsamen, initialen Abnahme des Fluoreszenzpolarisationssignals des Rab6:mantGppNHp-Komplexes und des Endpunkts der Reaktion für den Rab6:mantGDP-Komplex konnte jedoch die Dissoziationsgleichgewichtskonstante k_{off} mit $1,5 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ abgeschätzt werden (durchgeführt von Adam Cichy, Abbildung 37). Der K_D des Rab6:mantGppNHp:LidA-Komplexes beträgt somit etwa 30 pM. Die Affinität zwischen der inaktiven und aktiven Form von Rab6a und LidA unterscheidet sich somit um etwa zwei Größenordnungen. Bei diesem Experiment wurde anstatt des vollständigen LidA-Konstrukts, ein verkürztes LidA Konstrukt (LidA₂₀₁₋₅₈₃) verwendet, welches nur die Rab-Bindungsdomäne enthält und auch für die Kristallisation eingesetzt wurde. Der Vergleich der Affinität von Rab6:mGDP mit LidA und LidA₂₀₁₋₅₈₃, zeigt, dass die N- und C-terminale

Ergebnisse

Domänen von LidA keinen Einfluss auf die Bindung des Rab-Proteins haben (siehe Tabelle 1)¹²⁴.

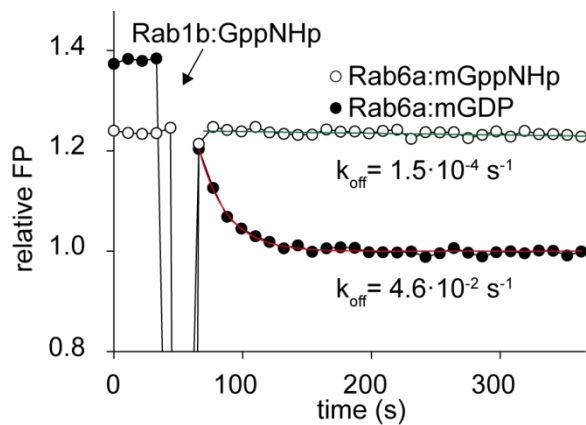


Abbildung 37: Der Vergleich der Fluoreszenzpolarisationskurven für die Verdrängung von fluoreszenzmarkierten Rab6a:mGDP bzw. Rab6a:mGppNHp aus dem Komplex mit LidA₂₀₁₋₅₈₃ zeigt, eine deutlich schnellere Verdrängung für Rab6a:mGDP ($k_{\text{off}} = 0,0046 \text{ s}^{-1}$) als für Rab6a:mGppNHp ($k_{\text{off}} = 1,5 \cdot 10^{-4}$). Die Dissoziationsratenkonstante für den Komplex aus Rab6a:mGppNHp:LidA₂₀₁₋₅₈₃ konnte anhand der langsamen, initialen Abnahme des Fluoreszenzpolarisationssignals und des Endpunkts der Reaktion für den Rab6:mantGDP Komplex abgeschätzt werden (Adam Cichy).

Da Rab1b:mGDP und Rab8a:mGDP nicht aus dem Komplex mit LidA verdrängt werden konnten, müssen ihre k_{off} Werte kleiner als $0,018 \text{ s}^{-1}$ sein. D.h., die Dissoziationsgleichgewichtskonstanten dieser Komplexe sind noch kleiner als 5 nM. Die aktive Form von Rab1b und Rab8a unterscheidet sich vermutlich ähnlich wie bei Rab6a um mindestens einen Faktor 100 zur inaktiven Form, was den Schluss nahelegt, dass Rab1b:GTP und Rab8a:GTP LidA mit einer Affinität, die im pikomolaren Bereich oder höher liegt, bindet. Diese enorm hohen Affinitäten von LidA für die inaktive und aktive Formen von Rab1b, Rab6 oder Rab8a ermöglichen LidA thermodynamisch mit jedem bisher bekannten Rab-bindenden Protein, welches Rab1, Rab6 oder Rab8 bindet, zu konkurrieren. Diese bisher noch nicht beobachtete Eigenschaft macht LidA zu einem Rab-Supereffektor.

4.7.2 LidA ist ein generelles Rab-bindendes Protein

Um herauszufinden, ob LidA auch weitere Rab-Proteine bindet, wurden Bindungsstudien mit weiteren Rab-Proteinen durchgeführt. Die verwendeten Rab-Proteine entsprechen

dem zu dieser Zeit verfügbaren Sortiment an Rab-Proteinen der Arbeitsgruppe Goody und sind nur eine Auswahl von Mitgliedern der Rab-Proteinfamilie.

Für die Bindungsstudien wurde in Stopped-flow Experimenten die Änderung der direkten Fluoreszenz durch Bindung von LidA an fluoreszenzmarkierte Rab-Proteine gemessen. Diese Experimente lieferten unerwartete Ergebnisse, die vermuten lassen, dass LidA ein generelles Rab-bindendes Protein ist (Abbildung 38).

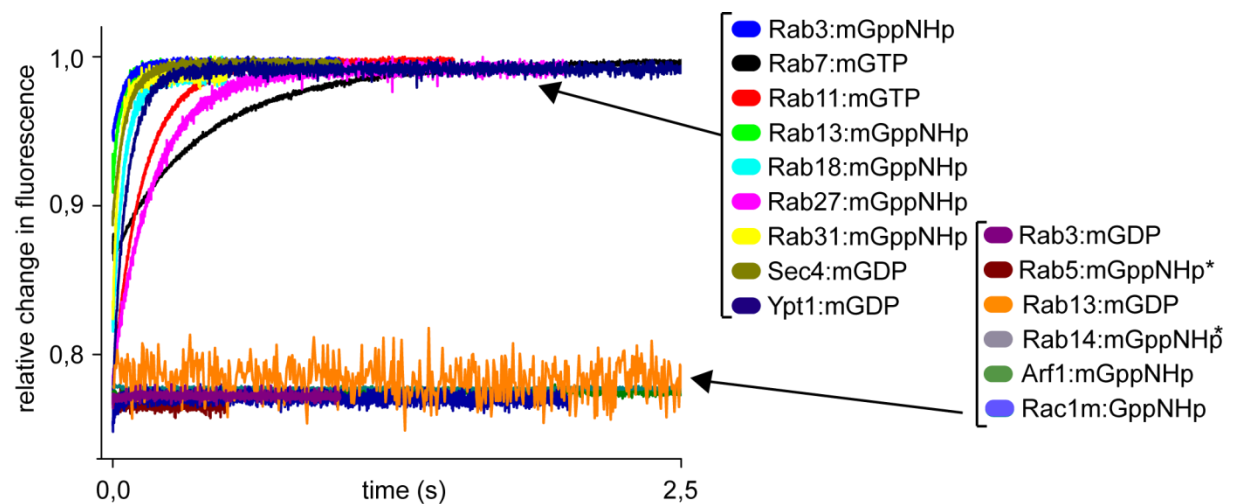


Abbildung 38: LidA bindet eine Vielzahl verschiedener Rab-Proteine. Insgesamt konnten 9 neue Rab-Bindungspartner identifiziert werden. Der Vergleich von Rab3:mGppNHp und Rab3:mGppNHp mit Rab3:mGppNHp und Rab3:mGppNHp zeigte die Präferenz des aktiven Rab-Proteins für die LidA-Bindung. Es kann angenommen werden, dass LidA ein generelles Rab-bindendes Protein ist. *: Rab5:GppNHp und Rab14:GppNHp konnten in späteren Gel-Filtrationsexperimenten doch als Bindungspartner von LidA identifiziert werden (siehe 4.7.2).

Zusätzlich zu den drei bisher identifizierten Rabs (Rab1b, Rab6a, Rab8a) wurden 10 weitere Rab-Proteine identifiziert, die von LidA gebunden werden. Diese sind Rab3:mGppNHp, Rab7m:GTP, Rab10:mGDP, Rab11:mGTP, Rab13:mGppNHp, Rab18:mGppNHp, Rab27:mGppNHp, Rab31:mGppNHp, sowie die Rab-Hefe Homologe Ypt1m:GDP (Rab1 Hefe-Homolog) und Sec4m:GDP (Rab8-Hefe-Homolog; Abbildung 39). Für die folgenden Rab-Proteine konnte in den Bindungsstudien keine Änderung der Fluoreszenz festgestellt werden: Rab3:mGDP, Rab5:mGppNHp, Rab13:mGDP und Rab14:mGppNHp (Abbildung 38).

Für die mGppNHp-beladenen Rab-Proteine Rab3 und Rab13 konnte die Bindung zu LidA nachgewiesen werden, für die GDP-beladenen Formen jedoch nicht. Daher ist anzunehmen, dass die inaktiven Formen von Rab3 und Rab13 mit einer viel geringeren

Ergebnisse

Affinität von LidA gebundenen werden, so dass die Bindung unter diesen Experimentbedingungen nicht festgestellt werden konnte.

Um zu untersuchen, ob LidA auch andere kleine GTPasen bindet, die nicht zur Rab-Proteinfamilie gehören, wurden die Proteine Arf1:mGppNHp (Arf-Proteinfamilie) und Rac1:mGppNHp (Rho-Proteinfamilie) getestet. Diese zeigten in den Bindungsstudien keine Bindung zu LidA, was vermuten lässt, dass LidA ausschließlich kleine GTPasen der Rab-Familie bindet.

Diese Ergebnisse zeigen, dass LidA eine Vielzahl an verschiedenen Rab-Proteinen bindet und die Bindung auch unabhängig vom gebundenen Nukleotid des Rab-Proteins ist.

Die Komplexbildung zwischen LidA und Rab5:GppNHp bzw. Rab14:mGppNHp konnte in den Fluoreszenzstudien nicht gezeigt werden. In Gelfiltrationsexperimenten konnten dagegen die Komplexbildung von LidA und Rab5:GppNHp, bzw. Rab14:mGppNHp festgestellt werden. Für die Fluoreszenzbindungsstudien und die Gelfiltrationsexperimente wurden unterschiedliche Rab5-Konstrukte verwendet. Entweder war das für die Fluoreszenz-bindungsstudien verwendete Rab5-Konstrukt defekt oder die Änderung der Fluoreszenz von Rab5:mGppNHp und Rab14:mGppNHp durch die Bindung von LidA war zu gering, um detektiert zu werden. Insgesamt konnten somit 11 Rab-Bindungspartner von LidA identifiziert werden.

Eine nochmalige Überprüfung der LidA-Bindung zu nicht-Rab-GTPasen (Ras, Ran, Rho, Arf/Sar) sollte durchgeführt werden, um auszuschließen, dass LidA außer Rab-Proteinen auch andere kleine GTPasen bindet. Insbesondere die Überprüfung der LidA-Bindung von Arf/Sar-GTPasen ist sinnvoll, da diese GTPasen ebenfalls im zellulären Transport wichtige Rollen übernehmen und von Legionellenproteinen manipuliert werden¹³⁶.

Die Bindungsstudien ergaben, dass LidA nicht nur mit einer großen Anzahl weiterer Rab-Proteine interagiert, sondern auch Rab-Proteine in der GDP- als auch GppNHp-gebundenen Form bindet. Diese ungewöhnlichen Bindungseigenschaften eines Rab-Effektors wurden bisher noch nicht beobachtet und lassen vermuten, dass LidA ein universelles Rab-bindendes Protein ist.

4.7.3 Die Kristallstruktur des Rab8a₆₋₁₇₆:GppNHp:LidA₂₀₁₋₅₈₃-Komplexes

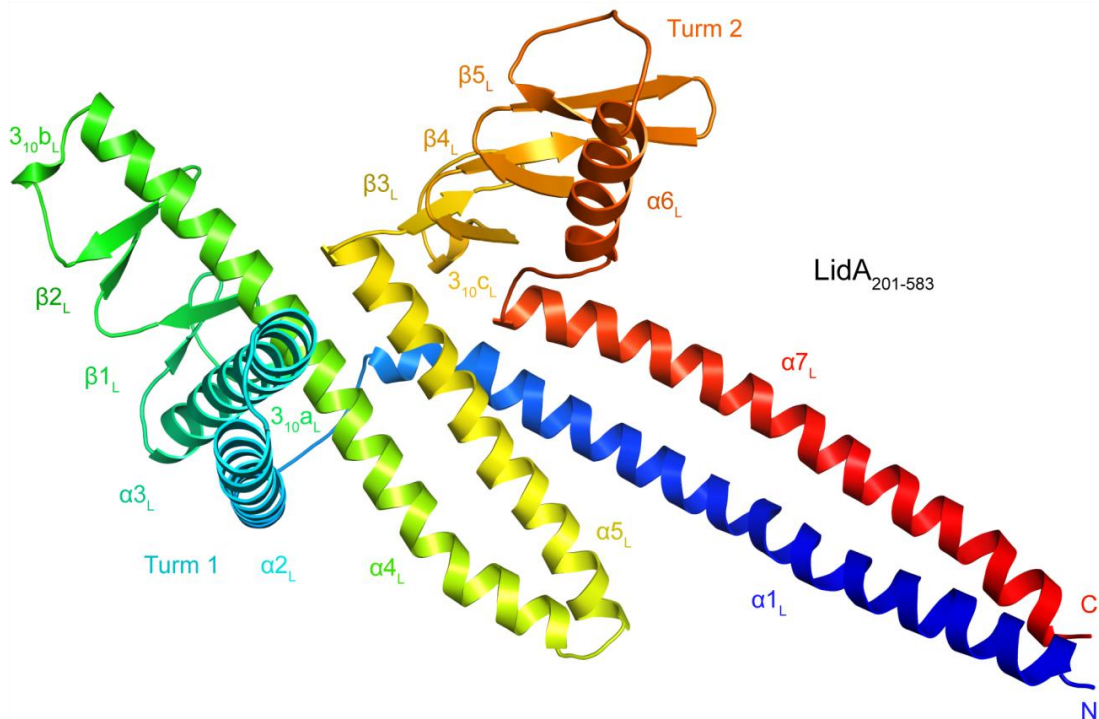
Die biochemische Untersuchung von LidA in Bezug auf dessen Rab-Bindungseigenschaften zeigte, dass LidA ein ungewöhnlicher Rab-Effektor ist, der mit sehr hoher Affinität inaktive und aktive Rab-Proteine bindet. Um die strukturelle Grundlage dieses außergewöhnlichen Rab-Effektors in Bezug auf die hohe Affinität und das breite Bindungsspektrum von Rab-Proteinen in der GDP- als auch GTP-gebundenen Form zu erklären, wurde versucht, die Strukturen von Rab-LidA-Komplexen mittels Röntgenstrukturanalyse zu bestimmen.

Die Kristallisation eines LidA:Rab-Komplexes bereitete Schwierigkeiten. Zahlreiche Kombinationen aus Rab1b-, Rab6a- oder Rab8a-Konstrukten in der GDP- oder GppNHp-Form und 10 verschiedenen LidA-Konstrukten in verschiedenen Proteinkonzentrationen wurden getestet. In einigen Bedingungen wuchsen Kristalle, die sich auch reproduzieren ließen, aber nur Kristalle von unzureichender Qualität für röntgenkristallographische Strukturbestimmung lieferten. Letztendlich konnten Datensätze von guter Qualität von Kristallen des Komplexes aus Rab8a₆₋₁₇₆ und LidA₂₀₁₋₅₈₃ aufgenommen werden.

Die Struktur des Komplexes, bestehend aus Rab8a₆₋₁₇₆:GppNHp und der zentralen Domäne von LidA (Aminosäuren 201-583), wurde mittels SAD mit einer Auflösung von 2.5Å gelöst (für Datenstatistiken siehe Material und Methoden, Tabelle 5). Der Vergleich der zentralen Domäne von LidA mit bekannten Proteinstrukturen durch den DALI-Server zeigte, dass die zentrale Domäne von LidA eine noch nicht beobachtete Proteinfaltung besitzt. LidA₂₀₁₋₅₈₃ besteht aus 7 α -Helices, 5 antiparallelen β -Faltblättern und 3 3_{10} -Helices (Abbildung 39). Vier dieser Helices bilden eine Plattform aus zwei antiparallelen *coiled-coil*-Strukturen (α_{1L} , α_{7L} und α_{4L} , α_{5L}), die die Rab-Bindungsplattform bilden. Senkrecht dazu angeordnet sind zwei turmähnliche Strukturen. Turm 1 wird aus den zwei α -Helices α_{2L} und α_{3L} (Aminosäuren 261-317) gebildet. Turm 2 besteht aus Helix α_{6L} (Aminosäuren 450-537) und 3 aufeinanderfolgenden β -Faltblättern (β_{3L} - β_{5L}), die ein sogenanntes β -Mäander-Motiv bilden. Die N- und C-Termini (α_{1L} , α_{7L}) weisen in die gleiche Richtung, was nahelegt, dass sich die beiden noch nicht charakterisierten terminalen Domänen (Aminosäuren 1-200 und 584-729) in räumlicher Nähe zueinander befinden.

Ergebnisse

A



B

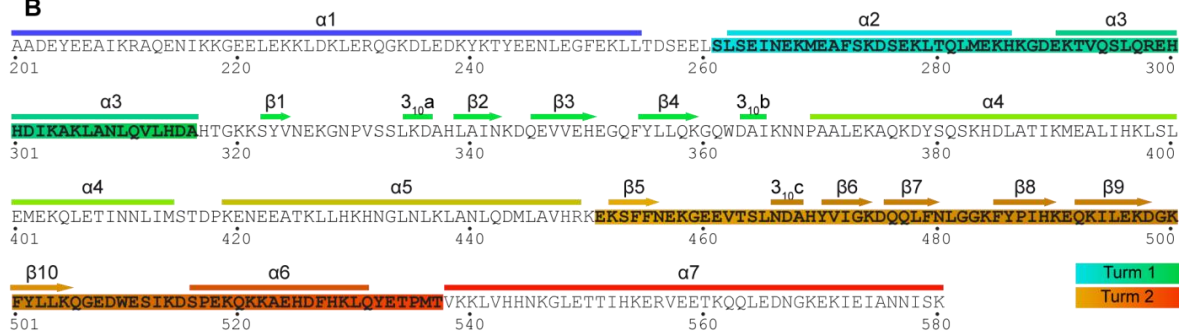


Abbildung 39: Übersicht der LidA₂₀₁₋₅₈₃ Struktur. (Rab8a₆₋₁₇₆ wurde aus Gründen der Übersicht nicht dargestellt). **A)** LidA₂₀₁₋₅₈₃ ist von blau (N-Terminus) bis rot (C-Terminus) koloriert. Die Rab-Bindungsplattform wird durch die α -Helices $\alpha 1_L$, $\alpha 4_L$, $\alpha 5_L$ und $\alpha 7_L$ gebildet. Senkrecht zur Rab-Bindungsplattform sind zwei turmähnliche Strukturen angeordnet. Turm 1 wird aus den zwei α -Helices $\alpha 2_L$ und $\alpha 3_L$ gebildet (Aminosäuren 261-317). Turm 2 besteht aus 3 aufeinanderfolgenden β -Faltblättern ($\beta 3_L$ - $\beta 5_L$), die ein sogenanntes β -Mäander-Motiv bilden und aus Helix $\alpha 6_L$ (Aminosäuren 450-537). Ein zweites β -Mäander-Motiv aus nur 2 aufeinanderfolgenden β -Faltblättern ($\beta 1_L$ - $\beta 2_L$) befindet sich zwischen den α -Helices $\alpha 3_D$ und $\alpha 4_D$. **B)** Darstellung der Aminosäuresequenz von LidA₂₀₁₋₅₈₃ mit den entsprechenden Sekundärstrukturelementen. Die Sequenzbereiche der turmähnlichen Strukturen sind markiert.

Rab8a₆₋₁₇₆:GppNHp besitzt die für GTPasen-typische Faltung aus einem zentralen sechsblättrigen β -Faltblatt, welches von 5 α -Helices umgeben ist (Abbildung 39).

Die Interaktionen zwischen Rab8a von LidA sind viel komplexer als bisher in Rab:Rab-Effektor-Strukturen beobachtet wurde. Die Unterseite von Rab8a, bestehend aus Switch

1, Switch 2 und dem Interswitch-Bereich bildet eine große Kontaktfläche zu den vier α -Helices α_{1R} , α_{4R} , α_{5R} und α_{7R} der Rab-Bindungsplattform von LidA. Zu beiden Seiten der Nukleotidbindungstasche von Rab8a, die aus Switch 1 und Switch 2 gebildet wird, befinden sich senkrecht zur Rab-Bindungsplattform Turm 1 und Turm 2, die so die Nukleotidbindungstasche blockieren. Die α -Helices α_{2R} (Turm 1) und α_{6R} (Turm 2) bilden zudem weitere Kontakte zu Rab8a oberhalb der Switch-Bereiche aus (siehe 4.7.3.2). Diese zusätzlichen Interaktionsflächen der Rab-Bindung durch einen Rab-Effektor sind bisher in anderen Rab:Rab-Effektor-Strukturen nicht beobachtet worden.

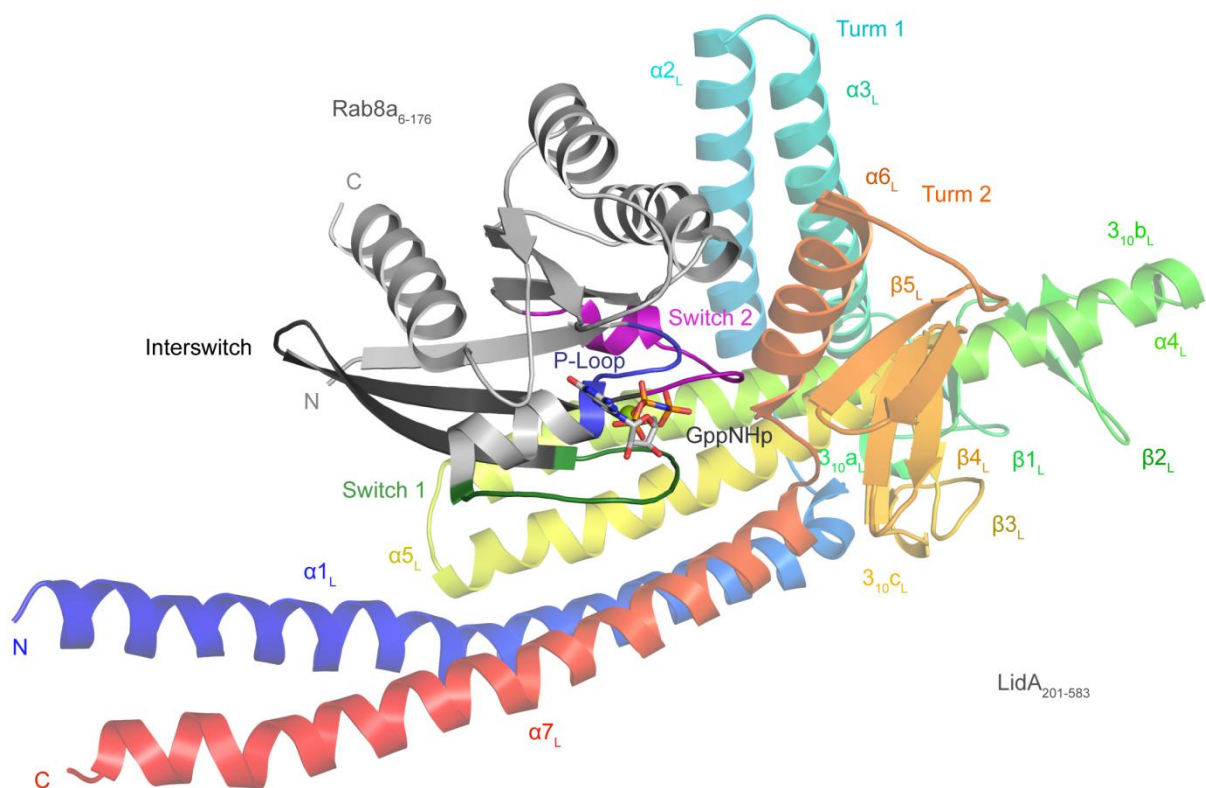


Abbildung 40: Kristallstruktur des Rab8a₆₋₁₇₆:GppNHP:LidA₂₀₁₋₅₈₃-Komplexes. Rab8a₆₋₁₇₆ (grau) bindet über Switch 1 (dunkelgrün), Switch 2 (lila) und dem Interswitch-Bereich (schwarz) die zwei anti-parallelen *coiled coil* Strukturen (α_{1L}/α_{7L} und α_{4L}/α_{5L}) von LidA₂₀₁₋₅₈₃. Senkrecht dazu angeordnet sind zwei turmähnliche Strukturen (Turm 1, Turm 2) die zusätzliche Kontakte zu Bereichen außerhalb der Switch-Bereiche ausbilden (diese Kontakte sind wegen der Übersicht hier nicht dargestellt; siehe Abbildung 41, 47). LidA₂₀₁₋₅₈₃ ist von blau (N-Terminus) bis rot (C-Terminus) koloriert. P-Loop: blau, Stabdarstellung; GppNHP, Kugel: Magnesiumion.

Eine Übersicht der Wechselwirkungen zwischen Rab8a₆₋₁₇₆ und LidA₂₀₁₋₅₈₃ ist in Abbildung 41 dargestellt. LidA und Rab8a sind in der Oberflächendarstellung, gemäß

Ergebnisse

ihrem elektrostatischen Oberflächenpotentials, koloriert. Auf die einzelnen Kontaktflächen wird im Folgenden eingegangen.

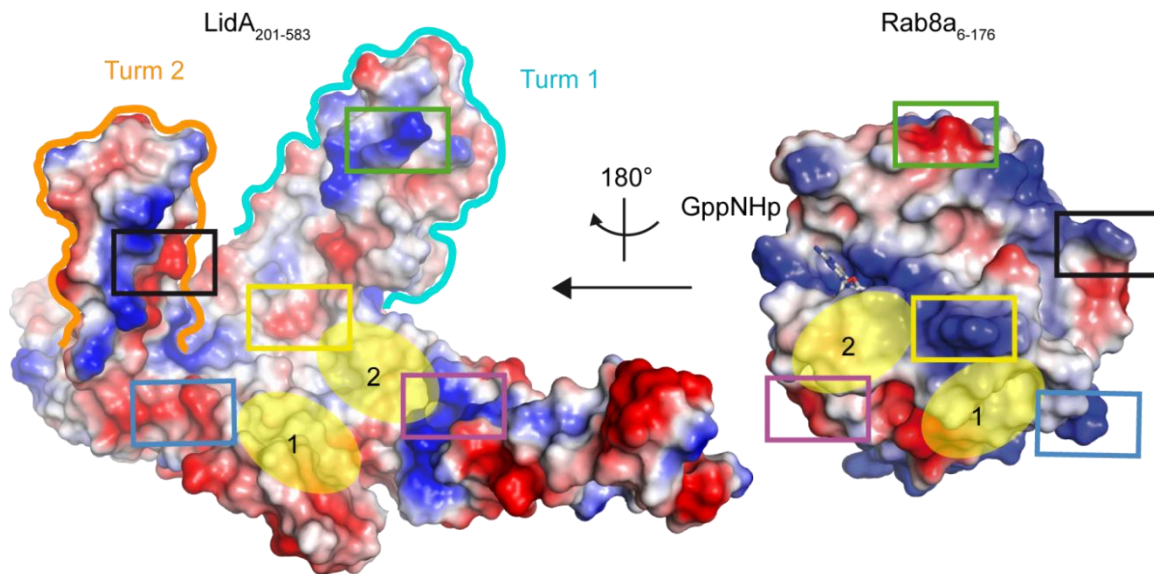


Abbildung 41: Übersicht der intermolekularen Interaktionen zwischen Rab8a₆₋₁₇₆:GppNHp und LidA₂₀₁₋₅₈₃. LidA₂₀₁₋₅₈₃ und Rab8a₆₋₁₇₆:GppNHp sind gemäß ihres elektrostatischen Oberflächenpotentials koloriert. Links: LidA₂₀₁₋₅₈₃, rechts: Rab8a₆₋₁₇₆:GppNHp, orange Umrandung: Turm 1, Umrandung türkis: Turm 2, bunte Rechtecke: polare Wechselwirkungen, gelbe Ovale: hydrophobe Bereiche.

4.7.3.1 Die Rab-Bindungsplattform von LidA

Der Großteil der Wechselwirkungen zwischen LidA und Rab8a besteht aus hydrophoben Kontakten zwischen Switch 1, Switch 2, dem Interswitch-Bereich von Rab8a und der Rab-Bindungsplattform (α_{1L} , α_{7L} , α_{4L} , α_{5L}) von LidA. Diese lassen sich in zwei hydrophobe Bereiche unterteilen (Abbildung 42). Der hydrophobe Bereich 1 umfasst die α -Helices α_{1L} , α_{4L} und α_{5L} (Y243_L, M402_L, I413_L, L428_L, L436_L, A439_L) und den Switch 1 von Rab8a. Der hydrophobe Bereich 2 umfasst die α_{6L} - α_{7L} -Schleife (Turm 2), die α -Helix α_{7L} (Y532_L, V538_L, L541_L, L548_L, I552_L) und Switch 1 und Switch 2 von Rab8a.

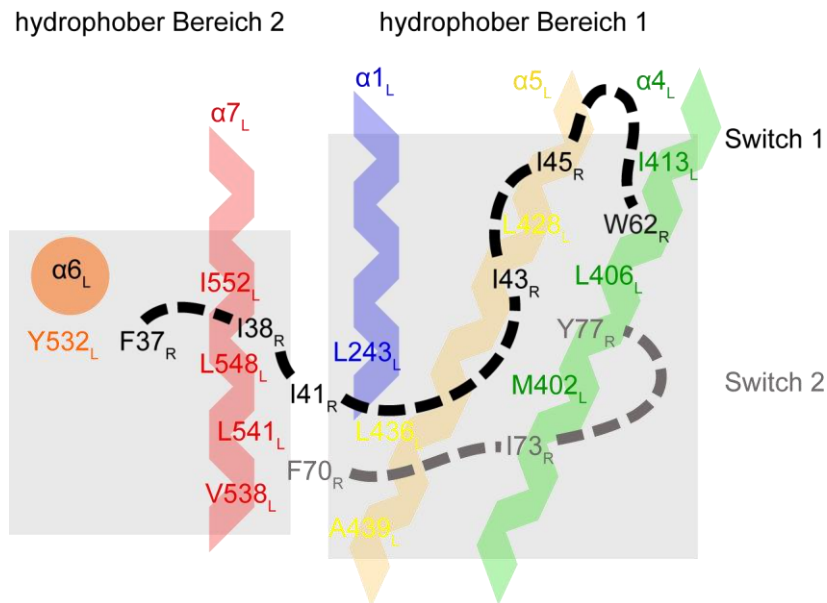


Abbildung 42: Schematische Darstellung der hydrophoben Bereiche von LidA. Die hydrophoben Kontakte im Bereich 1 werden zwischen den beiden Switch-Bereichen und den α -Helices $\alpha 1_L$, $\alpha 4_L$ und $\alpha 5_L$ gebildet. Der kleinere hydrophobe Bereich 2 beinhaltet hydrophobe Kontakte zwischen der α -Helix $\alpha 7_L$ und Switch 1. $I 41_R$ aus Switch 1 und $F 70_R$ aus Switch 2 bilden hydrophobe Kontakte zu beiden hydrophoben Bereichen aus. Die entsprechenden Aminosäuren von LidA und den Aminosäuren aus den Switch-Bereichen (Switch 1: schwarz, Switch 2: grau) sind angegeben.

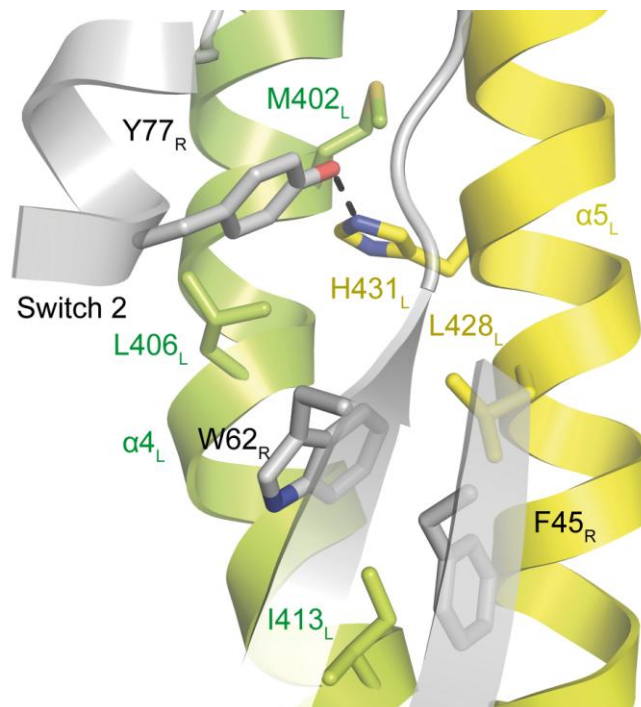


Abbildung 43: Die Aminosäuren der hydrophoben Triade ($F 45_R$, $W 62_R$, $Y 77_R$) von Rab8a bilden eine reißverschlussartige Packung mit hydrophoben Aminosäuren aus den α -Helices $\alpha 4_L$ und $\alpha 5_L$ von LidA.

Ergebnisse

Die Aminosäuren der hydrophoben Triade (F45_R, Y77_R, W62_R) von Rab8a interagieren mit M402_L, L406_L, I413_L, L428_L, H431_L des hydrophoben Bereiches 1 (Abbildung 42, 43) und sind paarweise, ähnlich einem Reißverschluss, angeordnet. Weitere Aminosäuren aus dem hydrophoben Bereich 1 interagieren mit Aminosäuren aus Switch 1 (I41_R, I43_R) und Switch 2 (F70_R, I73_R; Abbildung 42, 44).

Die Aminosäuren des hydrophoben Bereiches 2 interagieren hauptsächlich mit Switch 1 (F37_R, I38_R, I41_R). Eine Ausnahme bildet F70_R aus Switch 2 (Abbildung 44). Damit sind I41_R (Switch 1) und F70_R (Switch 2) die einzigen Aminosäuren aus Rab8a, die Kontakte zu beiden hydrophoben Bereichen ausüben.

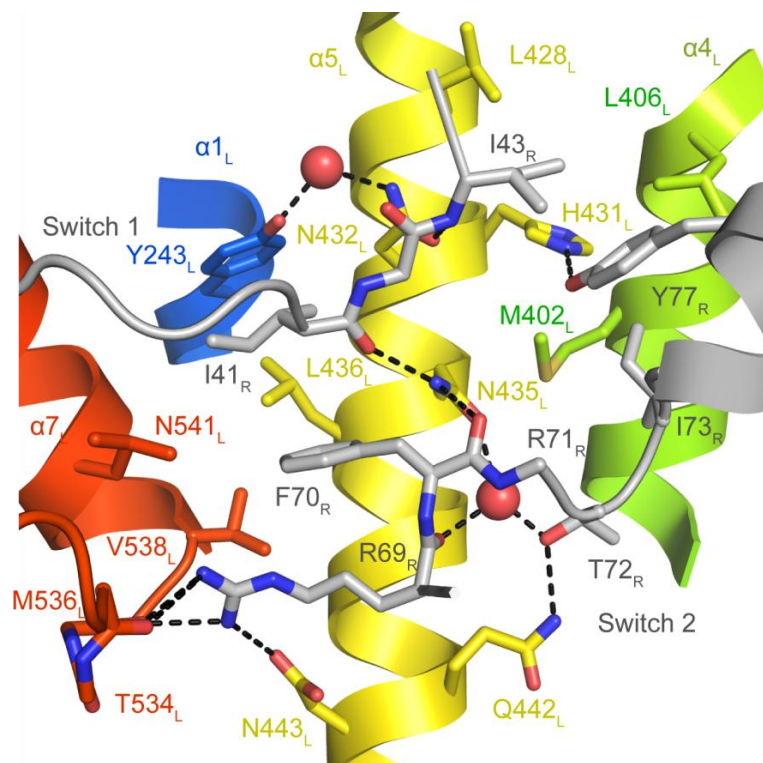


Abbildung 44: Im hydrophoben Bereich 1 wird durch polare und hydrophobe Wechselwirkungen eine Kontaktfläche zwischen Aminosäuren aus Switch 1 und Switch 2 von Rab8a und der Rab-Bindungsplattform (α_{1L} , α_{7L} , α_{4L} , α_{5L}) aus LidA ausgebildet.

Zusätzliche polare Interaktionen zwischen Rab8a und LidA innerhalb der hydrophoben Bereiche erweitern das Netzwerk der Wechselwirkungen. Die Koordinierung von Switch 2 (Y77_R, Y72_R, R69_R) durch LidA erfolgt durch Wechselwirkungen von Aminosäuren aus dem hydrophoben Bereich 1 (H431_L, Q442_L, D443_L) und Turm 2 (N443_L, T534_L, M536_L). Switch 1 wird durch wasservermittelte Kontakte (I38_R, S39_R) mit N545_L aus der α -Helix

$\alpha 7_L$ des hydrophoben Bereiches 2 (Abbildung 45) und durch polare Kontakte zwischen den Seitenketten von $N432_L$ und $N435_L$ aus $\alpha 5_L$ (hydrophober Bereich 1) und des Proteinrückgrates von $I41_R$ und $I43_R$ koordiniert (Abbildung 45).

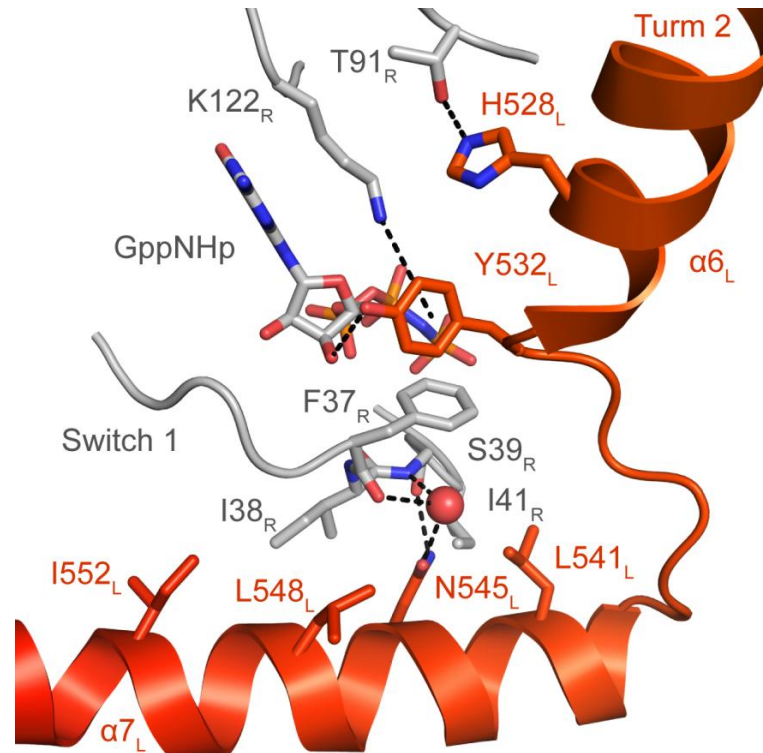


Abbildung 45: Darstellung der hydrophoben und polaren Wechselwirkungen zwischen Rab8a und LidA im hydrophoben Bereich 2. Oberhalb von Switch 1 bilden $Y532_L$ und $H528_L$ aus $\alpha 6_L$ polare Kontakte zur 2'-Hydroxylgruppe der Ribose von GppNHp, $K122_R$ und $T91$ aus der $\alpha 3_L$ - $\alpha 4_L$ -Schleife von Rab8a. Die Kolorierung von LidA entspricht Abbildung 40.

4.7.3.2 LidA bindet Rab8 auch außerhalb der nukleotidbindenden Bereiche

Rab-Effektoren binden das jeweilige Rab-Protein hauptsächlich über Switch 2 und den Interswitch-Bereich¹⁹. Switch 1 wird auch häufig von Rab-Effektoren gebunden, allerdings sind meist nur die C-terminalen Aminosäuren von Switch 1 in der Interaktion mit dem Rab-Effektor beteiligt (Abbildung 46).

Ergebnisse

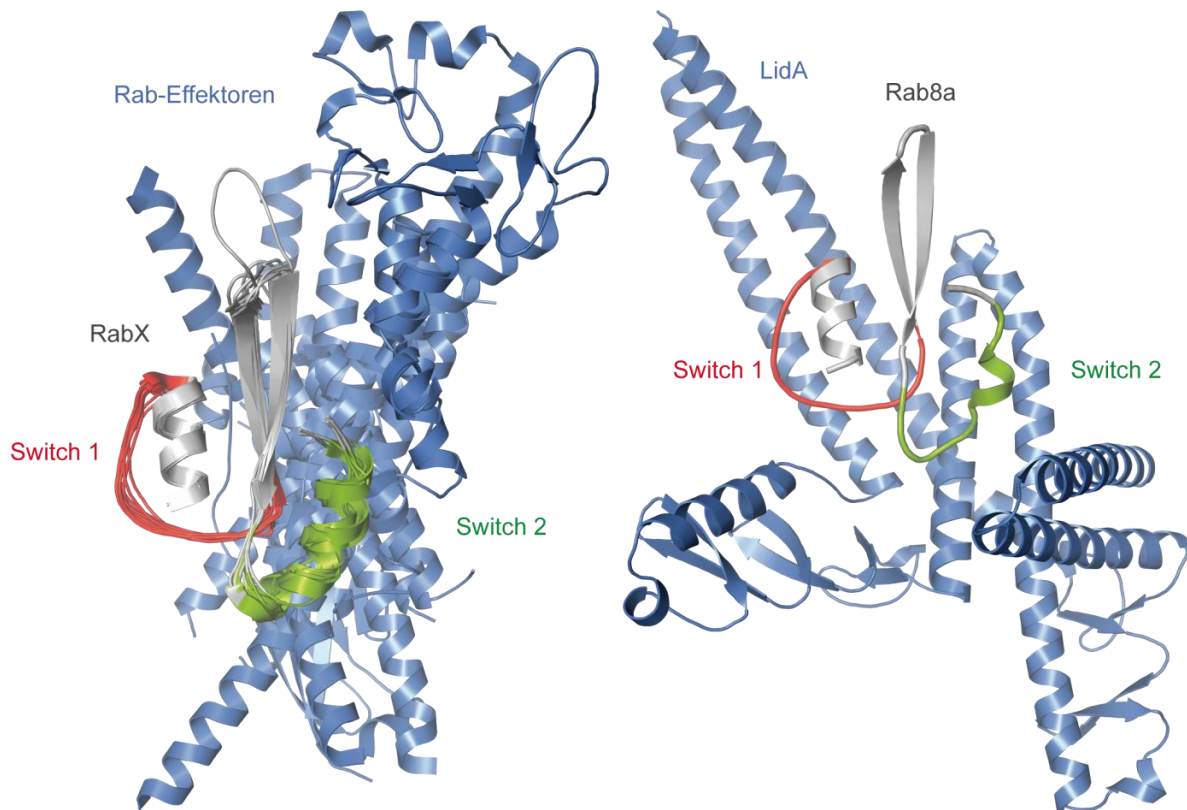


Abbildung 46: LidA unterscheidet sich von anderen Rab-Effektoren durch eine ausgeprägte Bindung von Switch 1 von Rab8a. Links: Die Überlagerung sämtlicher bisher strukturell bestimmter Rab:Rab-Effektor-Komplexe (Rab3a:Rabphilin-3A, pdb: 1ZBD; Rab22:Rabenosyn-5, pdb: 1Z0J; Rab11:FIP3, pdb: 2HV8; Rab27b:Slp, pdb: 2ZET; Rab6-GTP:GCC185, pdb: 3BBP; Rab7:RILP, pdb: 1YHN; Rab27a:Slp2a, pdb: 3BC1; Rab6:R6IP1, pdb: 3CWZ; Rab8:OCRL1, pdb: 3QBT; Rab5:Rabaptin5, pdb: 1TU3; Rab4:Rabenosyn-5, pdb: 1Z0K) zeigt, dass Switch 1 hauptsächlich am C-terminalen Ende von Rab-Effektoren gebunden wird. Rechts: Switch 1 von Rab8a wird durch LidA deutlich intensiver gebunden als von andere Rab-Effektoren. Grau: Rab-Protein, Rot: Switch 1; Grün: Switch 2; Blau: Rab-Effektoren.

LidA dagegen bildet im Vergleich zu sämtlichen bisher strukturell charakterisierten Rab-Effektoren zusätzlich polare und hydrophobe Interaktionen mit den zentralen Aminosäuren des Switch 1 aus (Abbildung 45, 46). Der Vergleich der bisherigen Rab:Rab-Effektor-Strukturen mit dem Rab8a:LidA-Komplex in Abbildung 46 zeigt deutlich die ausgeprägte Bindung von Switch 1 durch LidA. Dadurch unterscheidet sich LidA von bisherigen Rab-Effektoren insofern, dass die komplette Nukleotidbindungstasche von LidA umfasst wird.

Zusätzliche polare Kontakte außerhalb der Switch-Bereiche werden von LidA durch Aminosäuren aus Turm 1 und Turm 2 gebildet. Diese Bereiche auf Seiten des Rab-Proteins sind bisher weder in Rab:Rab-Effektor, Rab:GEF noch in Rab:GDI-Interaktionen

beschrieben worden und stellen somit noch nicht beobachtete Interaktionsflächen zwischen einem Rab-Protein und einem Rab-Effektor dar (Abbildung 47).

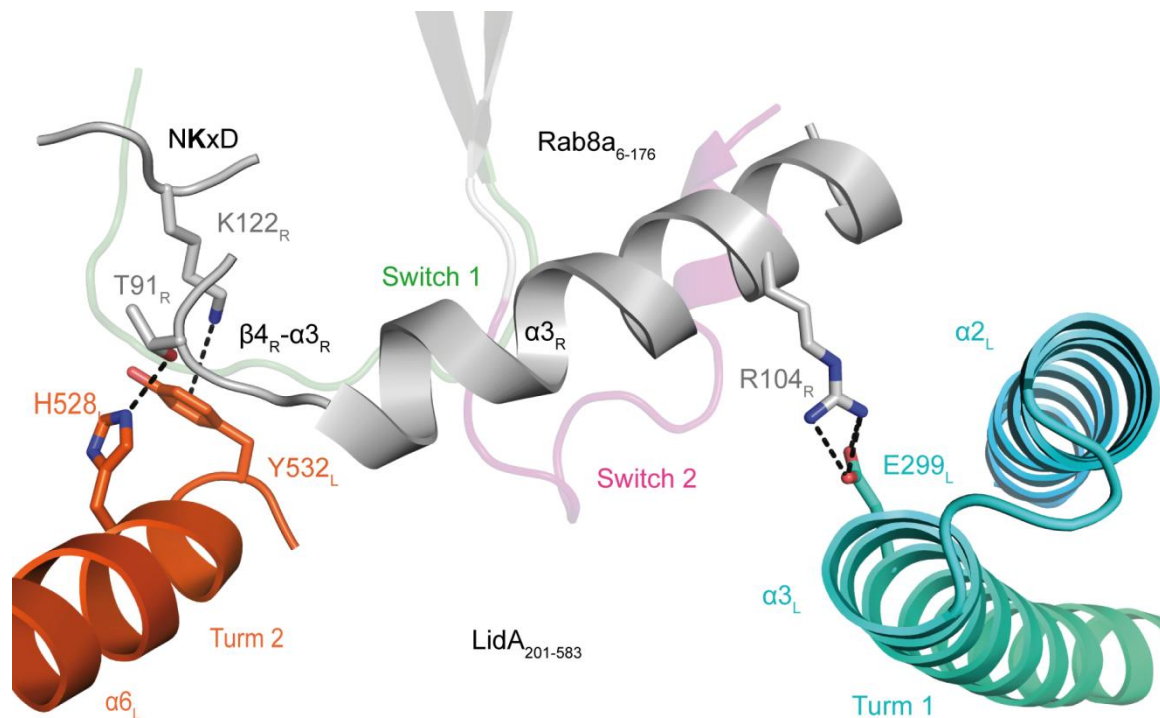


Abbildung 47: LidA bindet Rab8 zusätzlich außerhalb der nukleotidbindenden Bereiche. Bei der Bindung von Rab8a₆₋₁₇₆:GppNHp und LidA₂₀₁₋₅₈₃ sind Aminosäuren von Rab8a₆₋₁₇₆ außerhalb der Switch Bereiche beteiligt (NKxD-Motiv: K122_R, β4_R-α3_R-Schleife: T91_R, α3_R: R104_R), die mit Aminosäuren aus Turm 1 (E299_L) und Turm 2 (H528_L) von LidA interagieren. Diese Aminosäuren (Stabdarstellung) sind bisher nicht in Rab:Rab-Effektor-Interaktionen beobachtet worden. Grau: Rab8₆₋₁₇₆, grün Switch 1, lila: Switch 2, türkis: Turm 1, orange: Turm 2.

Turm 1 und Turm 2 sind senkrecht zur Rab-Bindungsplattform angeordnet und umgeben die durch Switch 2 bzw. Switch 1 gebildete Nukleotidbindungstasche. Oberhalb von Switch 2 wird R104_R (α3_L) durch E299_L aus Turm 1 (α3_L) koordiniert. Aus Turm 2 bilden H528_L und Y532_L eine polare, bzw. Kation-Pi-Interaktion mit T91_R und K122_L oberhalb von Switch 1. Y532_L bildet zudem eine weitere polare Wechselwirkung mit der 2'-Hydroxylgruppe der Ribose des GppNHp-Moleküls (Abbildung 45).

Die Überlagerung der Strukturen von Rab1b:GppNHp (pdb: 1YZN) und Rab6a:GTP (pdb: 2GIL) mit Rab8a aus dem Komplex mit LidA zeigt, dass sich die Bindung von E299_L durch Aminosäuren der α3_L-Helix (RabSF Motiv 3) in den jeweiligen Rab-Proteinen

Ergebnisse

unterscheidet (Abbildung 48). Eine Interaktion von E299_L scheint durch Rab6a (hellgrün) nicht möglich zu sein, da sich an der Stelle von R104_{Rab8a} ein Aspartat (D109_{Rab6a}) befindet (Abbildung 48). Auch benachbarte Aminosäuren sind nicht geeignet mit E299_L zu interagieren. Die dadurch verringerte Anzahl an Interaktionen könnte gut mit der Beobachtung der geringeren Affinität von Rab6a zu LidA im Vergleich zu Rab8a übereinstimmen.

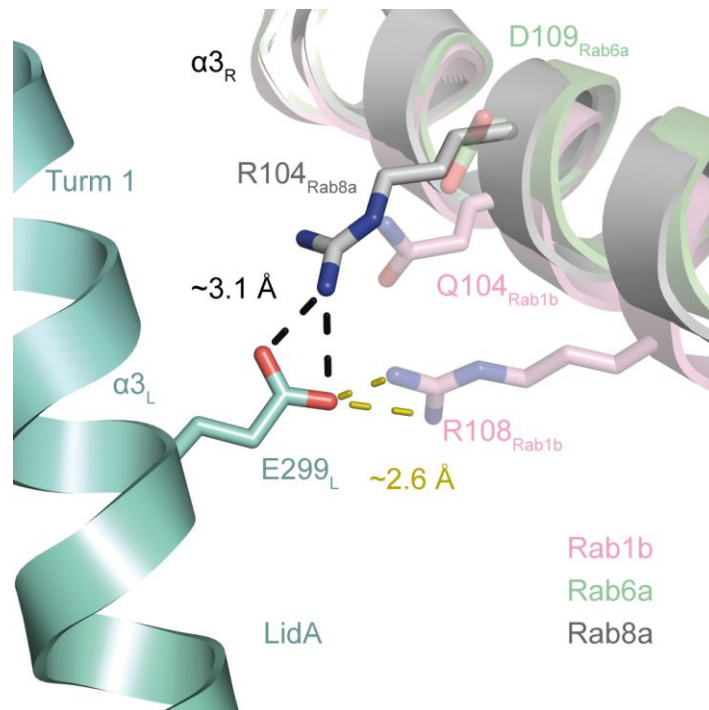


Abbildung 48: Die Überlagerung von Rab1b (hellgrün, pdb: 3NKV) und Rab6a (rosa, pdb: 2GIL) mit der Rab8a:LidA Struktur (grau bzw. türkis) zeigt, dass Rab6 vermutlich keine Interaktion zu E299_L ausübt. Rab1 dagegen könnte durch R108_{Rab1b} eine energetische günstigere Interaktion mit E299_L eingehen, wobei R108_{Rab1b} zusätzlich durch Q104_{Rab1b} stabilisiert werden könnte.

Rab1b dagegen könnte durch R108_{Rab1b} mit E299_L interagieren und zusätzlich durch Q104_{Rab1b} in seiner Konformation stabilisiert werden. Die Position von R108_{Rab1b} zu E299_L könnte zudem aufgrund eines geringeren Abstandes von 2,6 Å statt 3,1 Å zu einer stabileren Interaktion als im Rab8a:LidA Komplex führen, die einen positiven Beitrag zur Affinität leisten könnte.

Turm 1 ist ebenso wie Turm 2 über Schleifen mit der Rab-Bindungsplattform verbunden, so dass die Türme vermutlich eine gewisse Flexibilität besitzen, wodurch sich diese abhängig vom jeweils gebundenen Rab-Protein näher an dieses herabewegen könnten.

Die Affinität zum jeweiligen Rab könnte so erhöht werden, vorausgesetzt es können energetisch günstige Bindungen mit Aminosäuren in der α -Helix α_{3L} und der β_{4R} - α_{3R} -Schleife gebildet werden. Der Vergleich mit anderen RabX:GXP:LidA-Komplexstrukturen sollte in Zukunft weitere Informationen über die Wechselwirkungen der Türme aus LidA mit den Interaktionsflächen außerhalb der Switch Bereiche des Rab-Proteins liefern.

4.7.3.3 Die LidA und Rab8a bilden eine sehr große Kontaktfläche

Bisherige Rab:Rab-Effektor-Strukturen zeigten, dass Rab-Effektoren meist über eine oder zwei α -Helices das Rab-Protein über Switch 2 und den Interswitch-Bereich binden (siehe Einleitung, 2.2.3). LidA dagegen bindet Rab8a über eine Rab-Bindungsplattform, bestehend aus vier α -Helices und zwei weiteren dazu senkrecht angeordneten α -Helices auf beiden Seiten der Nukleotidbindungstasche. Insgesamt 6 α -Helices sind damit in der Bindung von Rab8a involviert. LidA umklammert so gewissermaßen das Rab-Protein, in dem zusätzlich Switch 1, die α -Helix3 und die β_{4R} - α_{3R} -Schleife von Rab8a gebunden werden. Die Rab8a-Bindung durch LidA resultiert so in einer, im Vergleich zu anderen Rab:Rab-Effektor-Strukturen, weitaus größeren Kontaktfläche auf Seiten von Rab8a. Die Kontaktoberfläche für Rab8a₆₋₁₇₆:LidA₂₀₁₋₅₈₃ beträgt 1568 Å² (Abbildung 49) und ist damit etwa 60% größer als die Kontaktfläche zwischen Rab8₆₋₁₇₆:GppNHp und OCRL1₅₄₀₋₆₇₈ (921 Å²)³⁰ (Abbildung 49); und fast doppelt so groß wie die Kontaktfläche des Rab6₈₋₁₉₅:GTP:RI6IP₇₀₇₋₁₁₄₅-Komplexes (798 Å²; Abbildung 49). Es ist naheliegend, dass die sehr große Kontaktfläche von Rab8a zu LidA mit der enorm hohen Affinität der Rab8a-LidA-Bindung korreliert.

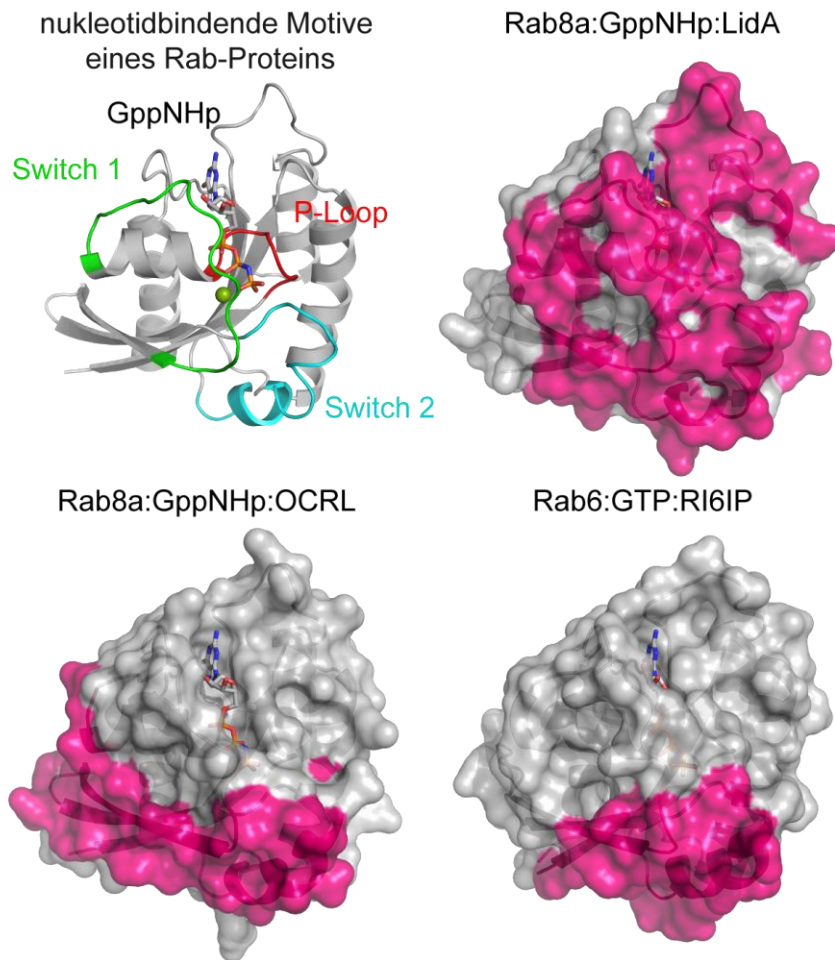


Abbildung 49: Der Vergleich der Kontaktflächen auf Seiten des Rab-Proteins von verschiedenen Rab:Rab-Effektor-Komplexen (oben rechts: Rab8a:LidA, links unten: Rab8a:OCRL, rechts unten: Rab6:RI6P) zeigt, dass LidA die größte Kontaktfläche auf dem Rab-Protein bildet. Auffällig ist auch, dass LidA im Vergleich zu OCRL und RI6P den kompletten Switch1-Bereich bindet. grau: Rab Oberfläche. Pink: Rab-Oberfläche, die in Kontakt mit dem Rab-Effektor ist. Links: Übersicht der nukleotidbindenden Strukturen eines Rab-Proteins, grün: Switch 1, Stabdarstellung: Guaninnukleotid (GppNHp), rot: P-Loop, türkis: Switch 2.

4.7.4 Die Adenylierung von Rab-Proteinen verringert die Affinität zu LidA

Rab1b und Rab8a können beide von dem Legionellenprotein DrrA an Tyrosin 77 adenyliert werden. Die Adenylierung von Y77_R in Rab1b zeigte in Gel-Filtrationsexperimenten keine Beeinträchtigung der Bindung zu LidA, ebenso wie auch die Bindung von AMP-Rab1b zu DrrA nicht beeinträchtigt wurde¹¹³. Die Überlagerung der an Y77 adenylierten Rab1b-Struktur (AMP-Rab1b)¹¹³ mit der Rab8a:LidA-Komplexstruktur (Abbildung 50) zeigt, dass die AMP-Gruppe mit einigen Aminosäuren (I413_L, L428_L, H431_L) und den α -Helices α 4_L und α 5_L von LidA, die in der Rab8a-Bindung beteiligt sind, kollidiert. Eine Orientierung der AMP-Gruppe, ähnlich der

AMP-Rab1b:GppNHp-Struktur, ist somit in einem Rab-LidA-Komplex nicht möglich. Y77_R aus Switch 2 ist zudem Teil der hydrophoben Triade und wird in der Rab8:LidA-Komplexstruktur (Abbildung 42, 43) durch polare und hydrophobe Kontakte mit den Aminosäuren M402_L, I406_L, H431_L aus α 4_L und α 5_L stabilisiert. Eine Unterbringung der AMP-Gruppe erfordert daher vermutlich eine Umorientierung von Switch 2, wodurch Y77 und die AMP-Gruppe aus der Kontaktfläche zwischen Rab und LidA herausbewegt wird (roter Pfeil in Abbildung 50, rechts). Eine mögliche Alternative wäre eine Abwärtsbewegung der α -Helices α 4_L und α 5_L, die eine Sandwich-ähnliche Anordnung der AMP-Gruppe zwischen Rab und LidA ermöglichen könnte (roter Pfeil in Abbildung 50, links). Beide Varianten führen zu der Annahme, dass die Einbringung der AMP-Gruppe an das Rab-Protein zu einer Verringerung der Interaktionen zwischen dem Interswitch-Bereich des Rab-Proteins und den α -Helices α 4_L und α 5_L von LidA führen, wodurch die Affinität des Komplexes verringert würde.

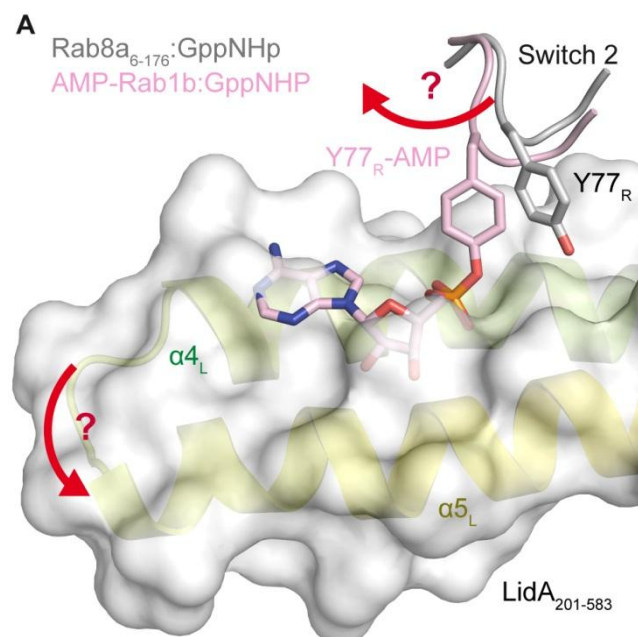


Abbildung 50: Die Überlagerung der AMP-Rab1b:GppNHp (pdb: 3NKV) Struktur mit der Rab8:LidA-Komplexstruktur zeigt die für die Bindung mit LidA sterisch ungünstige Anordnung der AMP-Gruppe. Strukturelle Änderungen (rote Pfeile), entweder in Switch 2 des Rab-Proteins oder eine Abwärtsbewegung der α -Helices α 4_L und α 5_L von LidA, sind vermutlich notwendig, um die AMP-Gruppe im Rab:LidA-Komplex unterzubringen.

Ergebnisse

Um dies zu überprüfen, wurden von Adam Cichy die Bestimmung der K_D -Werte von adenylylierten Rabs und LidA₂₀₁₋₅₈₃ durchgeführt¹²⁴.

Die Bestimmung der Affinität von AMP-Rab1b:GDP mit LidA₂₀₁₋₅₈₃ in ITC-Messungen ergaben ähnliche Ergebnisse wie die Messung von nicht-adenylylierten Rab1b:GDP mit LidA₂₀₁₋₅₈₃ ($K_D < 10$ nM). Daher ist anzunehmen, dass, falls die Affinität durch die AMP-Gruppe verringert wird, die Affinität des AMP-Rab1b:GDP:LidA₂₀₁₋₅₈₃-Komplexes noch immer zu hoch ist, um den K_D -Wert mittels ITC-Messungen genau zu bestimmen. Die Verdrängung des fluoreszenzmarkierten AMP-Rab1:mGDP aus dem Komplex mit LidA₂₀₁₋₅₈₃ war ebenfalls nicht feststellbar. Die Bindung hingegen konnte durch Bestimmung der Assoziationsraten bestätigt werden¹²⁴.

Die Bestimmung der Affinität gelang nur für den Komplex aus AMP-Rab6a:mGppNHp und LidA₂₀₁₋₅₈₃. Die AMP-Gruppe beschleunigte signifikant die Dissoziationsrate von AMP-Rab6a:mGppNHp aus dem AMP-Rab6a:mGppNHp:LidA-Komplex und ergab einen k_{off} von $0,032 \text{ s}^{-1}$. Der K_D -Wert betrug damit $4,8$ nM. Die Adenylylierung von Rab6a:GppNHp verringerte daher die Affinität für LidA₂₀₁₋₅₈₃ um etwa zwei Größenordnungen. Die Affinität von adenylylierten Rab6a:GppNHp zu LidA ist damit vergleichbar mit der Affinität von nicht-adenylyliertem Rab6a:mGDP zu LidA¹²⁴.

5. Diskussion

5.1 Die Struktur der DrrA GEF-Domäne ermöglicht einen katalytisch effizienten Nukleotidaustausch

Die zentrale GEF-Domäne von DrrA (DrrA₃₄₀₋₅₃₃) besitzt eine noch nicht beobachtete Proteinfaltung. Die GEF-Domäne besteht aus 8 α -Helices und bildet eine kompakte, palettenähnliche Struktur (Abbildung 12). Die GEF-Domäne besitzt eine rigide Struktur, die sich in ihrer Konformation nicht von der im Komplex mit Rab1 unterscheidet. Die Konformation von Rab1 im nukleotidfreien Komplex mit DrrA₃₄₀₋₅₃₃ dagegen unterscheidet sich deutlich von den Strukturen der GDP- und GTP-gebundenen Formen von Rab1 (Abbildung 17). Die DrrA-GEF-Domäne kann daher als ein Gerüstprotein bezeichnet werden, das durch die Bindung an Rab1, die für die Nukleotidaustauschreaktion notwendigen Konformationsänderungen im Rab1-Molekül induziert. Obwohl sich die Struktur der DrrA GEF-Domäne von anderen RabGEFs unterscheidet^{18,19}, basiert der DrrA-katalysierte Nukleotidaustausch durch DrrA auf den typischen Prinzipien eines RabGEFs.⁴

Die DrrA-Bindung induziert strukturelle Änderungen in Rab1, die die hochaffine Bindung von GDP/GTP vermindern und gleichzeitig Aminosäuren, die für die Koordination des Nukleotids notwendig sind, stabilisieren. So wird die Nukleotidfreisetzung erleichtert und die erneute Nukleotidbindung ermöglicht.

Das auffälligste strukturelle Merkmal des nukleotidfreien Rab1_{b3-174}:DrrA₃₄₀₋₅₃₃-Komplexes ist die weit geöffnete Nukleotidbindungstasche. Bereiche von Switch 1 werden dabei um 30 Å aus ihrer ursprünglichen Position bewegt, was sowohl die Freisetzung als auch die erneute Bindung von GDP/GTP erleichtert⁴. Auf Seiten von DrrA sind insbesondere zwei Schleifen (Bindungsstelle 1 und 2) auffällig, da sie die für die Nukleotidaustauschreaktion wichtigen Bereiche, nämlich den P-Loop und Switch 1 von Rab1, binden.

Die Schleife der Bindungsstelle 2 ist in der spezifischen Bindung und Stabilisierung von Switch 1 zur Öffnung der Nukleotidbindungstasche involviert. Die Aminosäuren S483_{DrrA} und D480_{DrrA} der Bindungsstelle 2 bilden Rab1-spezifische polare Kontakte zu den Aminosäuren T34_{Rab1} und S36_{Rab1} im zentralen Bereich von Switch 1 und tragen zur Spezifität von DrrA für Rab1 bei (siehe 4.1.2).

Diskussion

Die Aminosäuren N451_{DrrA} und R453_{DrrA} der Schleife in Bindungsstelle 1 bilden spezifische polare Kontakte zu den Aminosäuren S17_{Rab1} und D16_{Rab1} des P-Loops und stabilisieren dadurch dessen Konformation. Die große Anzahl polarer Kontakte von Aminosäuren aus DrrA zu R69_{Rab1} und die hydrophoben Kontakte zwischen F70_{Rab1}, Y77_{Rab1} in Switch 2 mit W410_{DrrA} bewirken eine Konformationsänderung von Switch 2, die sich von der Konformation der GTP-Form unterscheidet. Das Resultat ist die direkte Bindung des P-Loops durch Aminosäuren aus Switch 2 und die Stabilisierung des P-Loops. Desweiteren wird das P-Loop-Lysin K21_R durch D63_{Rab1} aus dem G3-Motiv (**DxxGQE**) koordiniert, wodurch der P-Loop in der nukleotidfreien Form stabilisiert wird (Ergebnisse 4.1.1).

Der Vergleich von Strukturen Ras-ähnlicher GTPasen im Komplex mit Guaninnukleotid-austauschfaktoren zeigt, dass insbesondere die direkte Bindung des P-Loops durch ein GEF mit einer hohen katalytischen Effizienz des Nukleotidaustausches korreliert¹⁹¹. Der P-Loop von Rab1b wird im Fall von DrrA sehr ausgeprägt direkt durch DrrA und zusätzlich von Switch 2 aus Rab1b gebunden. Die Vermutung, dass es sich daher bei DrrA um ein GEF mit hoher katalytischer Effizienz handelt, konnte durch biochemische Untersuchungen (Lena Oesterlin) belegt werden¹³⁷. DrrA ist ein katalytisch äußerst effizientes GEF, das die intrinsische Nukleotidaustauschrate von Rab1 um 5 Größenordnungen beschleunigt. Damit ist DrrA eines der katalytisch effizientesten GEFs für Rab-Proteine^{137,138}.

5.1.1 Der DrrA-katalysierte Nukleotidaustauschmechanismus

Die hochaffine Bindung eines Nukleotids in Rab-Proteinen erfordert die Anwesenheit eines Magnesiumions, welches das β - und γ -Phosphat des Nukleotids koordiniert. In Rab1b koordiniert das S22_R des P-Loops (**GDSGVGKS**) zusammen mit D63_R aus dem G3-Motiv (**DxxGQE**) indirekt über ein Wassermolekül, das Magnesiumion^{132,133}. Zudem werden die β - und γ -Phosphate des Nukleotids durch das P-Loop-Lysin (K21_R) (**GDSGVGKS**) gebunden.

Die DrrA Bindung an Rab1b induziert strukturelle Änderungen dieser Aminosäuren, um den Nukleotidaustausch zu katalysieren. Die Hydroxylgruppe von S22_R erfährt eine Umorientierung, wodurch die gemeinsame Koordination des Mg^{2+} -Ions mit D63_R nicht mehr möglich ist und so die Affinität zu GDP verringert wird. Das P-Loop-Lysin K21_R wird

durch die DrrA-Bindung aus der β -Phosphat-koordinierenden Position bewegt und interagiert nun mit D63_R, das zuvor an der Mg²⁺-Koordination beteiligt war. Das P-Loop-Lysin (K21_R) wird so in einer für die erneute Nukleotidbindung günstigen Konformation stabilisiert¹³⁹.

Eine Besonderheit des nukleotidfreien Rab1b₃₋₁₇₄:DrrA₃₄₀₋₅₃₃-Komplexes ist die Anordnung der Aminosäuren des G4-Motivs (NKxD), die die Bindungsstelle der Guaninbase blockiert. K122_{Rab1} (NKxD) interagiert normalerweise mit dem Ringsauerstoffatom der Ribose des Guaninnukleotids¹⁴⁰. Im Rab1b₃₋₁₇₄:DrrA₃₄₀₋₅₃₃-Komplex ist K122_{Rab1} um 90° aus der ursprünglichen Position weggedreht und wird von Aminosäuren der α_4 - β_5 -Schleife koordiniert (Ergebnisse 4.4). Eine solche Konformation von Aminosäuren des G4-Motivs wurde in anderen Rab:GEF-Komplexstrukturen bisher nicht beobachtet. Diese Konformation ist vermutlich vorteilhaft für die Stabilisierung des nukleotidfreien Rab-Proteins, erscheint aber zunächst ungünstig für die erneute Bindung eines GTP-Moleküls. Es kann aber spekuliert werden, dass die erneute Bindung eines GTP-Moleküls zunächst durch die Bindung der Phosphatgruppen mit dem P-Loop und einem Magnesiumion stattfindet und die Anwesenheit der Guaninbase dann durch einen *induced-fit*-Mechanismus zum Umklappen der α_4 - β_5 -Schleife führt, wodurch die typischen Wechselwirkungen mit dem Guaninnukleotid wieder ermöglicht werden.

Der DrrA-katalysierte Nukleotid austauschmechanismus ähnelt somit dem anderer eukaryotischer GEFs für Ras-ähnliche kleine GTPasen¹⁴¹, allerdings mit dem Unterschied, dass durch die DrrA-Bindung die K122_{Rab1}-Wechselwirkung mit der Ribose des Nukleotids verhindert wird. Die Nukleotidaffinität wird dadurch wahrscheinlich zusätzlich verringert und der nukleotidfreie Zustand von Rab1b wird so möglicherweise stabilisiert⁴.

5.1.2 Die DrrA GEF-Domäne ist eine GEF-Domäne ist eine GEF-Domäne

Nach Literaturergebnissen besitzt DrrA neben der GEF-Aktivität auch GDF-Aktivität und kann somit Rab1 aus dem Komplex mit GDI freisetzen^{2,3}. Die GDF-Aktivität wurde von Machner und Isberg im Aminosäurenbereich 317-545 lokalisiert und überlappt daher mit dem Bereich der GEF-Aktivität. Ingmundson *et al.* dagegen lokalisierten die GDF-Aktivität im Bereich der Aminosäuren 1-500. Während dieser Doktorarbeit wurde von Mueller *et*

Diskussion

al. im N-terminalen Bereich (Aminosäuren 1-340) von DrrA eine Adenylyltransferase-Domäne identifiziert. Der von Ingmundson *et al.* beschriebene Bereich der GDF-Aktivität wird dadurch auf den Bereich der Aminosäuren 340-500 reduziert und überlappt mit der GEF-Domäne.

In dieser Arbeit konnte der zentralen DrrA-Domäne (Aminosäuren 340-533) durch biochemische und strukturelle Untersuchungen eindeutig eine GEF-Aktivität zugeordnet werden. Die GEF-Aktivität von DrrA stellte sich zudem als Ursache der vermeintlichen GDF-Aktivität heraus⁴. Die beschriebene GDF-Aktivität^{2,6} von DrrA ist eine Fehlinterpretation der Konsequenzen der GEF-Aktivität von DrrA.

5.1.3 Die GEF-Aktivität ist die Ursache der vermeintlichen GDF-Aktivität von DrrA

Sollte DrrA die Funktion eines GDFs besitzen, müsste DrrA in der Lage sein, Rab1 aus dem Rab1:GDI-Komplex aktiv zu verdrängen. Der Vergleich der Rab1b₃₋₁₇₄:DrrA₃₄₀₋₅₃₃-Struktur mit der Ypt1:GDI-Komplexstruktur zeigt allerdings eindeutig, dass DrrA und GDI die gleichen Bindungsstellen auf Seiten des Rab-Proteins einnehmen, nämlich Switch 1 und Switch 2 (Abbildung 51).

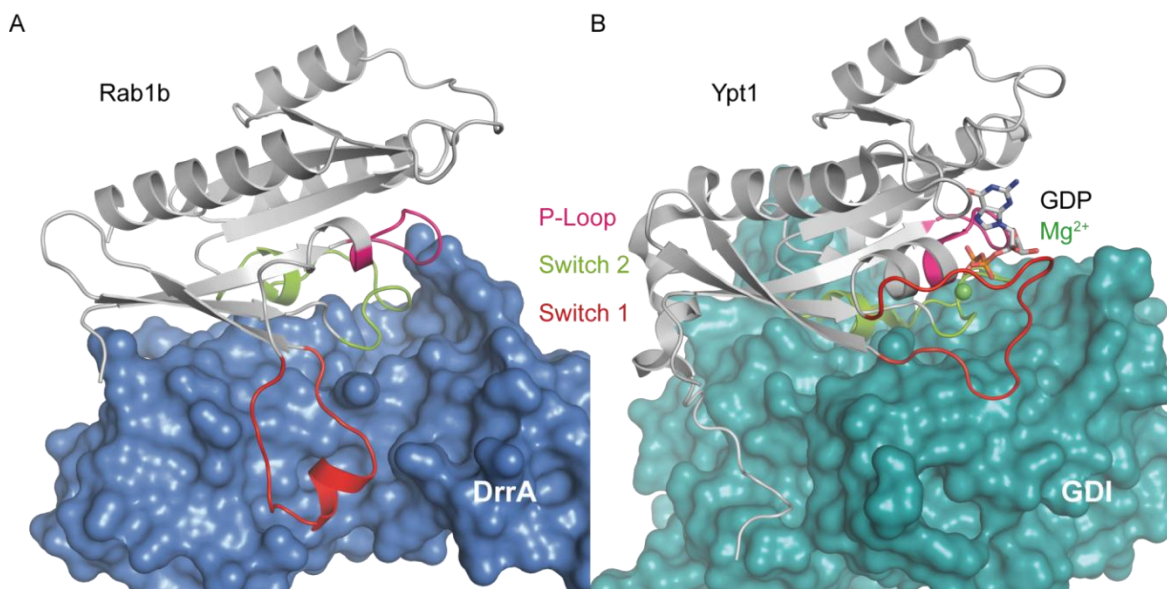


Abbildung 51: Vergleich der Kontaktflächen von Rab-Proteinen im Komplex mit DrrA und GDI. **A)** DrrA und **B)** GDI binden über Switch 2 und Switch 1 das Rab-Protein, wodurch die gleichzeitige Bindung von GDI und DrrA an das Rab-Protein nicht möglich ist. DrrA kann GDI nicht verdrängen. Die Bindung von DrrA an Rab1 ist somit erst nach der Freisetzung von Rab1 aus dem Komplex mit GDI möglich.

Die gleichzeitige Bindung von DrrA und GDI an Rab1 ist somit nicht möglich. DrrA kann daher erst dann Rab1 binden, sobald Rab1 aus dem Rab1:GDI-Komplex freigesetzt wurde.

In fluoreszenzbasierten Verdrängungsexperimenten (durchgeführt von Lena Oesterlin) konnte gezeigt werden, dass die GEF-Aktivität von DrrA die Ursache der postulierten GDF-Aktivität ist⁴. DrrA bildet in der Abwesenheit von GDP/GTP einen äußerst stabilen Komplex mit Rab1b, mit einem K_D -Wert von 3 pM^4 . Diese Affinität liegt mehrere Größenordnungen höher als die Affinität der Bindung zwischen Rab1b:GDP und GDI ($K_D = \text{nanomolar}$)^{4,5}. Somit ist DrrA durch die Bildung eines thermodynamisch stabileren Komplexes mit Rab1:GDP in der Lage, dieses aus dem Gleichgewicht mit GDI zu entfernen. Die Bindung von DrrA an Rab1b:GDP ist dabei abhängig von der spontanen Dissoziation von Rab1b und GDI.

Dieser Effekt führt jedoch noch nicht zu einer katalytischen Verdrängung von GDI aus dem Rab1b:GDP:GDI-Komplex, da eine äquivalente Konzentration von DrrA zu GDI nötig wäre, um eine komplette Verdrängung zu gewährleisten. Der Effekt, der dazu führt, dass Rab1b irreversibel aus dem Komplex mit GDI verdrängt wird, ist der sehr effiziente DrrA-katalysierte Nukleotidaustausch⁴. In der GTP-gebundenen Form von Rab1 ist die Affinität zu GDI so stark verringert, so dass die Reassoziierung von Rab1b:GTP an GDI nicht mehr stattfindet⁵. DrrA entfernt somit das freie Rab-Protein aus dem Gleichgewicht mit GDI-gebundenem Rab und bewirkt so die Dissoziation des Rab1:GDP:GDI-Komplexes.

Diese Experimente konnten durch die Verwendung der GEF-inaktiven DrrA-Doppelmutante (DrrA_{N451A/R453A}) bestätigt werden. Die GDI-Verdrängung durch DrrA ist in der Gegenwart von GTP in diesen Experimenten stark beeinträchtigt⁴.

Das Modell der GEF-basierten GDI-Verdrängung durch DrrA ist in Abbildung 52 dargestellt. Die GEF-Aktivität von DrrA ist ausreichend und notwendig, um prenyliertes Rab1b in Anwesenheit von GTP aus dem Gleichgewicht mit GDI zu entfernen⁴. Dieses Prinzip der Verdrängung von GDI aus dem Komplex mit Rab durch ein GEF sollte auch auf beliebige andere GEFs übertragbar sein. Basierend auf diesem Modell sollten daher katalytisch sehr effiziente GEFs Rab-Proteine schneller aus dem zytosolischen Rab:GDI-Komplex rekrutieren können als katalytisch weniger effiziente GEFs.

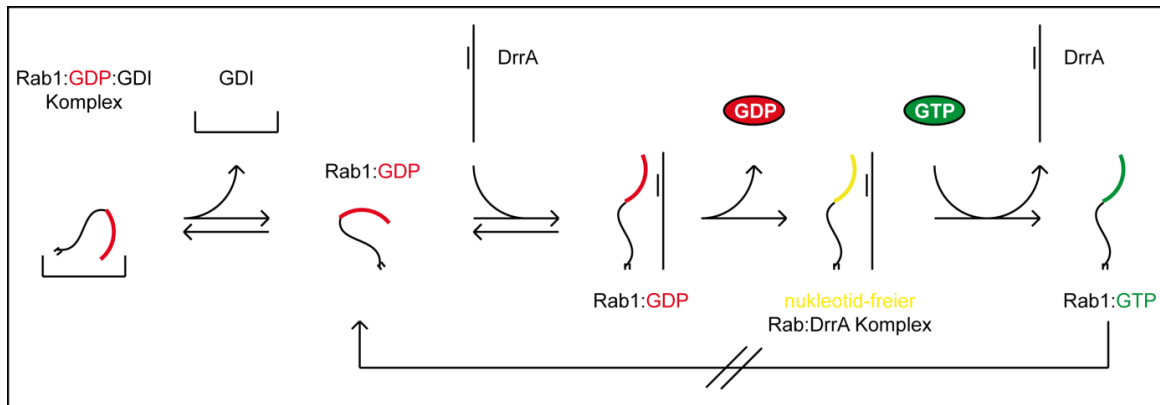


Abbildung 52: Rab1:GDP wird durch die GEF-Aktivität von DrrA aus dem Gleichgewicht mit Rab:GDP:GDI entfernt. Von links nach rechts: Im Zytosol befindet sich das inaktive, GDP-gebundene Rab-Protein im Komplex mit GDI. Rab:GDP dissoziiert spontan aus dem Komplex mit GDI aufgrund der intrinsischen Dissoziationsrate. Das freie, GDP-gebundene Rab kann von DrrA gebunden werden und die hohe katalytische Effizienz von DrrA bewirkt den Austausch von GDP gegen zytosolisches GTP. Die Affinität zu GTP-gebundenem Rab und GDI ist gering, so dass eine erneute GDI-Bindung nicht mehr möglich ist. Auf diese Weise wird GDI aufgrund der GEF-Aktivität von DrrA verdrängt.

Das physiologische GEF für Rab1 ist der TRAPP-Komplex, der in der Rekrutierung von Rab1 an den Golgi-Apparat beteiligt ist¹³¹. Dieser besitzt im Vergleich zu DrrA eine um einen Faktor 150 geringere katalytische Effizienz¹³¹. Rab1 wird auf der LCV für die Rekrutierung von ER-Vesikeln und das intrazelluläre Wachstum von Legionellen benötigt¹⁴². Wie oben beschrieben, sollte DrrA daher aufgrund der hohen katalytischen Effizienz in der Lage sein, erfolgreich mit dem TRAPP-Komplex um Rab1 zu konkurrieren und Rab1 an die LCV zu rekrutieren.

5.1.5 GEFs sind potentiell in der Lage Rab-Proteine zu rekrutieren

Der Mechanismus der Rekrutierung eines Rab-Proteins an seine Zielmembran ist bisher nicht genau verstanden. Es sind Proteine mit einer GDF-Aktivität postuliert worden, die die Dissoziation des Rab:RabGDI-Komplexes katalysieren und das Rab anschließend an die Zielmembran rekrutieren. Biochemisch und strukturell ist dieser Vorgang bisher kaum untersucht. Eine GDF-Aktivität konnte bislang nur für das integrale Membranprotein Yip3/PRA-1 gezeigt werden¹⁷.

Die von Lena Oesterlin durchgeführten biochemischen Untersuchungen zeigten, dass die GEF-Aktivität von DrrA einen Mechanismus für die Verdrängung von GDI darstellt⁴. Die vermeintliche GDF-Aktivität^{2,6} des Legionellenproteins DrrA konnte so auf die Nukleotid-austausch-Aktivität von DrrA zurückgeführt werden. Der Nukleotidaustausch zu GTP führt zu einer drastischen Verringerung der Affinität von Rab zu GDI^{5,143}. Das freie, GDP-gebundene Rab wird dadurch aus dem Gleichgewicht zwischen Rab:GDP:GDI und Rab:GDP entfernt. Die GEF-basierte Verdrängung von GDI aus dem Komplex mit Rab:GDP ist damit kein aktiver Prozess. Eine GDF-Aktivität ist somit thermodynamisch nicht notwendig, um die Dissoziation des Rab:GDP:GDI-Komplexes zu bewirken. Limitierend für die GEF-basierte Rekrutierung von Rab-Proteinen ist allein die intrinsische Dissoziation des Rab:GDI-Komplexes⁴. Diese ist mit einer Halbwertszeit von 7-100 s für den Rab1b:GDP:GDI relativ langsam (Lena Oesterlin)⁴. Die Notwendigkeit der Rekrutierung des gesamten zytosolischen Pools eines Rab-Proteins ist aber unwahrscheinlich, da bereits einige wenige aktive Rab-Proteine für die Bildung einer Rab-Membran-Domäne ausreichend sind¹⁴⁴. Die langsame Dissoziation von Rab aus dem Komplex mit GDI könnte daher ausreichend für eine biologische relevante Rekrutierung von Rab-Proteinen an eine Membran sein.

Weitere zelluläre Untersuchungen sind notwendig, um zu überprüfen, ob die GEF-Aktivität auch für die Rekrutierung anderer Rab-Proteine in der Zelle verantwortlich ist.

5.2 Die biologische Relevanz der hohen Affinität der P4M-Domäne zu PI4P

Die P4M-Domäne von DrrA besitzt eine bisher nicht beobachtete α -helikale Faltung, die PI4P mit einer äußerst hohen Affinität von 18,2 nM bindet. Die P4M-Domäne weist damit eine höhere Affinität zu PI4P auf als die PH-Domäne von OSBP (engl.: oxysterol-binding protein; $K_D = 40-100\text{nM}$)¹⁴⁵ und ist damit die PI-bindende Domäne mit der höchsten bekannten Affinität zu PI4P¹³⁵.

Im Unterschied zu den PH-Domänen von FAPP1 und FAPP2, die zusätzlich zu PI4P die GTP-gebundene Form der kleinen GTPase Arf1 auf dem Golgi binden¹⁴⁶ und der FYVE-Domäne von EEA1, die erst durch die Dimerisierung korrekt auf eine PI3P-positive Endosomenmembran rekrutiert wird^{92,95,96}, ist anzunehmen, dass DrrA aufgrund der

Diskussion

hohen Affinität der P4M-Domäne zu PI4P auf der LCV keinen weiteren Co-Rezeptor für eine stabile Assoziation mit dieser benötigt.

DrrA kann nur während der ersten 4 Stunden der Legionelleninfektion auf der LCV nachgewiesen werden². Es ist zu vermuten, dass DrrA entweder nach 4h gezielt von der LCV entfernt wird oder der PI4P-Gehalt der LCV während der LCV-Reifung reduziert wird. Zu einem geringen Anteil konnte DrrA im Verlauf der Legionelleninfektion auch auf der Plasmamembran nachgewiesen werden⁴². Eine Verringerung des PI4P-Gehaltes auf der LCV durch permanenten vesikulären Transport kann daher nicht ausgeschlossen werden. Aufgrund der hohen Spezifität⁸⁹ der P4M-Domäne und der passgenauen Form der P4M-Bindungstasche für PI4P¹³⁵ ist davon auszugehen, dass eine zusätzliche Phosphorylierung der 3'- oder 5'-Hydroxylgruppe des Inositolrings durch Kinasen als auch die Dephosphorylierung an der 4' Position durch Phosphatasen und erst recht die Abspaltung der Inositolkopfguppe durch Phospholipasen die DrrA Bindung auf der LCV beeinträchtigt, bzw. verhindert. Da die LCV beim Übergang in die Replikationsphase vermutlich Arf1-vermittelt mit dem ER fusioniert¹⁰⁹ und PI4P zudem die typische PI-Spezies auf dem ER ist⁷⁹, ist die Modifikation von PI4P auf der LCV aber eher unwahrscheinlich.

Alternativ könnte DrrA auf noch unbekannte Weise von der LCV entfernt werden. Eine Möglichkeit wäre der Ubiquitin-vermittelte Abbau von DrrA. Im Legionellengenom sind Proteine mit Sequenzähnlichkeiten zu F-Box Proteinen identifiziert worden, die für Ubiquitinligasen kodieren und aufgrund der Ubiquitinierung von Wirtsproteinen für die intrazelluläre Replikation von Legionellen wichtig sind^{147,148}. Legionellen besitzen zudem eigene regulatorische Proteine, die bestimmte Legionellenproteine unter Ausnutzung des Wirtsproteasoms gezielt ausschalten. Das Legionellenprotein LubX besitzt die Funktion einer E3-Ubiquitin-Ligase und manipuliert das Wirtsproteasom, wodurch der Abbau des Legionellenproteins SidH eingeleitet wird¹⁴⁹. Einen solchen Meta-Effektor, d.h. einen Effektor, der die Funktion eines anderen Effektors reguliert, ist für DrrA bisher allerdings noch nicht identifiziert worden.

PI4P ist typisch für die Membranidentität des Golgi-Apparates und bildet auch einen geringen Anteil der Phospholipide der Plasmamembran¹⁵⁰. Die durch Phagozytose aufgenommene Legionelle ist anfangs von einer plasmamembranähnlichen Membran umgeben und der PI4P-Gehalt der LCV ist daher vermutlich zunächst gering. PI4P wird im

Verlauf der Legionelleninfektion lcm/Dot-abhängig auf bislang unbekannt Weise gebildet⁸⁹. Simultan zur Legionellenaufnahme wird DrrA in die Wirtszelle sekretiert und wird vermutlich durch die räumliche Nähe zur LCV und der hohen Affinität von DrrA zu PI4P auf der LCV verankert⁸⁹. Die GEF-Aktivität von DrrA gewährleistet anschließend die Rekrutierung von Rab1 an die LCV⁴.

5.2.1 Vergleich der P4M-Domäne mit anderen PI-bindenden Domänen

Die P4M-Domäne ist spezifisch für PI4P⁸⁹, ermöglicht eine hochaffine Bindung von PI4P¹³⁵ und weist keine strukturellen Ähnlichkeiten zu anderen strukturell charakterisierten PI-bindenden Domänen auf (Abbildung 53).

Bisher sind fünf verschiedene Proteinfaltungen von phospholipidbindenden Domänen bekannt. Dazu zählen Zn²⁺-Finger-Strukturen (C1-Domäne der Proteinkinase C δ (PKC δ)¹⁵¹ und EEA1⁵⁴), β -Sandwich-Strukturen (PH-Domäne, der Phospholipase C δ 1 (PLC δ 1)¹⁵², gemischte α - β -Strukturen (PX-Domäne von p40^{phox} ¹³⁴), α -helikale Solenoid-Strukturen (Epsin ENTH-Domäne¹⁵⁴, AP180/CALM ANTH-Domäne¹⁵⁵) und β -Propeller Strukturen (PROPPIN-Domänen) ¹⁵⁷. Von letzteren konnte bisher keine atomare Struktur bestimmt werden. Die Proteinfaltung der P4M-Domäne von DrrA, die weder Sequenz- noch Strukturhomologie zu bekannten Proteinen besitzt, erweitert somit die phospholipidbindenden Domänen um eine weitere rein α -helikale Proteinfaltung.

Neben der P4M-Domäne von DrrA ist die P4C-Domäne (PI4P binding of SidC) von SidC und dessen Paralog SdcA als eine weitere PI4P-bindende Domäne im Legionellengenom identifiziert worden⁸⁹. SidC ist in der Rekrutierung von ER-Vesikeln involviert und wird auf der LCV über die Bindung zu PI4P verankert¹⁵⁸. Die P4C-Domäne besitzt weder Sequenzähnlichkeit zur P4M-Domäne noch zu anderen PI-bindenden Proteinen. In Bakterien konnten bisher weder Membranidentitäten, basierend auf Phosphoinositiden oder Phosphoinositid-Signalwege, wie sie in Eukaryoten existieren, identifiziert werden¹⁵⁹. Daher scheinen die P4M- und P4C-Domänen unabhängig voneinander durch die Adaption an die Wirtszelle entstanden zu sein.

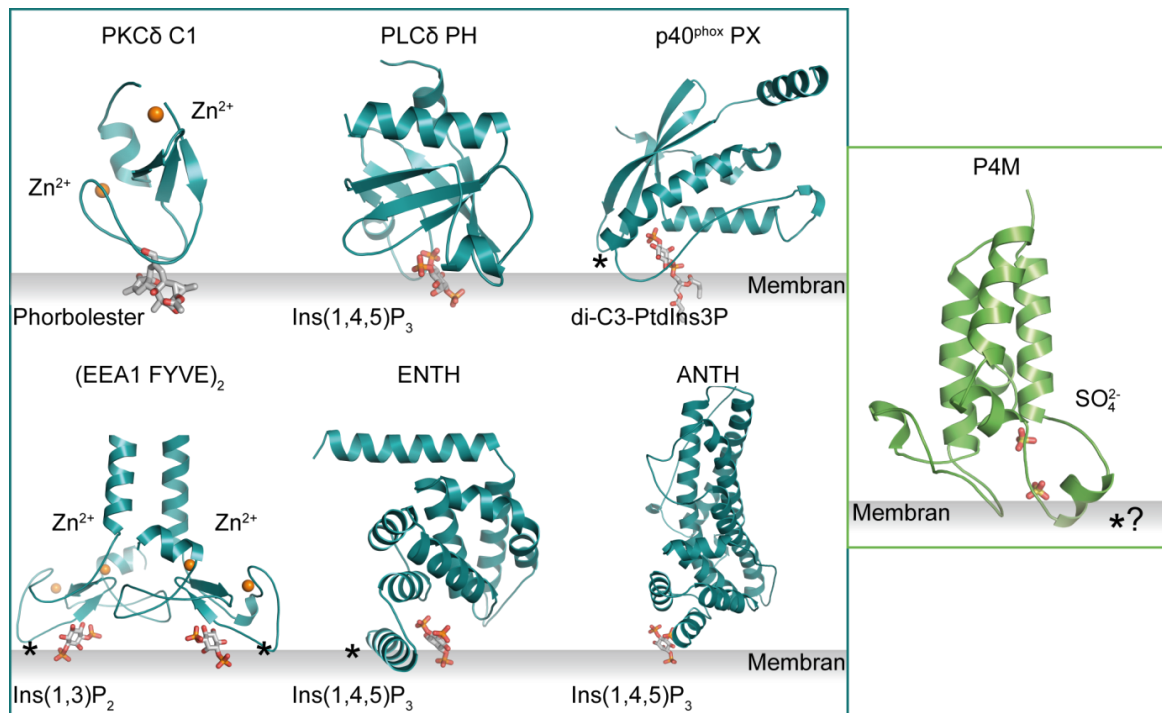


Abbildung 53: Darstellung der bekannten Proteinfaltungen von Phospholipid-bindenden Domänen (blau). rechts: Die P4M-Domäne (grün) von DrrA in einer möglichen Orientierung zur Membran. Die Membran ist durch die schattierten Balken angedeutet. Oben links, von links nach rechts: Die C1-Domäne der Proteinkinase C δ (PKC δ ; pdb: 1PTR) im Komplex mit Phorbol-1,3-Acetat¹⁵¹. Die PH-Domäne (Pleckstrin Homologie) der Phospholipase C δ 1 (PLC δ 1; pdb: 1MAI) im Komplex mit Inositol-(1,4,5)-Trisphosphat¹⁵². Die PX-Domäne (Phox-Homologie) von p40^{phox} mit Di-butanoylphosphatidylinositol 3-Phosphat (pdb: 1H6H) zeigt neben der Phosphoinositid-Bindungsstelle die Membran Insertionsschleife (Stern)¹³⁴. Unten links, von links nach rechts: Das Dimer der FYVE-Domäne (Fab1, YOTB, Vac1, EEA1) von EEA1 im Komplex mit Ins(1,3)P₂ (pdb: 1JOC) zeigt die Bindung der Kopfgruppe und die Bereiche, die vermutlich in die Membran inserieren¹⁵³ (Sterne). Die strukturell wichtige Zn²⁺-Ionen sind in orange dargestellt⁹⁶. Die Epsin ENTH-Domäne¹⁵⁴ (pdb: 1HOA) und die ANTH-Domäne (AP180/CALM; pdb: 1HFA)¹⁵⁵ bestehen beide aus α -helikalen Solenoid-Strukturen. Der ANTH-Domäne fehlt im Vergleich zur ENTH-Domäne die erste N-terminale Helix und der C-Terminus ist verlängert. Die ANTH-Domäne bindet Ins(1,4,5)P₃ über eine basische Proteinoberfläche aus zwei kleinen Helices. Die ENTH-Domäne bindet Ins(1,4,5)P₃ über eine N-terminale Helix (Sternchen), die erst durch die Lipidbindung geordnet wird. Diese amphipathische Helix inseriert vermutlich in die Membran¹⁵⁶.

5.2.2 Struktureller Vergleich der P4M- und der ENTH-Domänen

Die P4M- und die ENTH-Domänen¹⁵⁴ stellen α -helikale Proteinfaltungen dar, die keine strukturellen Ähnlichkeiten zueinander aufweisen (Abbildung 54). Die ENTH-Domäne besitzt am N-Terminus eine amphipathische Helix (α 0), die an der Membranbindung beteiligt ist¹⁵⁶. Diese Helix weist jedoch eine ähnliche Positionierung in Bezug auf die der Kopfgruppe des gebundenen Inositolphosphatidyl-Phosphat, wie die amphipathische α _p5-Helix der P4M-Domäne zu den gebundenen Sulfationen in der vermuteten PI-

Bindungstasche. Im Falle der ENTH-Domäne sind L6 und M10 der α_0 -Helix an der Membranpenetration beteiligt (Abbildung 54, links) und tragen so zu einer verringerten Dissoziation der ENTH-Domäne von der Membran bei¹⁵⁶. R114 gehört nicht zur PI-Bindungstasche, aber trägt durch die positive Ladung einen Beitrag zur unspezifischen, elektrostatischen Wechselwirkung mit der negativen Membran bei¹⁵⁶. Eine ähnliche Anordnung von Aminosäuren ist auch in der P4M-Domäne zu finden. R544 aus der α_{P4M1-2} -Schleife könnte an der Bindung an die negativ geladene Membran beteiligt sein und die zwei Leucine L610 und L614 der α -Helix α_{P4M5} , könnten über hydrophobe Wechselwirkungen mit der Lipiddoppelschicht interagieren, wodurch die α_{P5} -Helix in der Membranbindung beteiligt sein könnte.

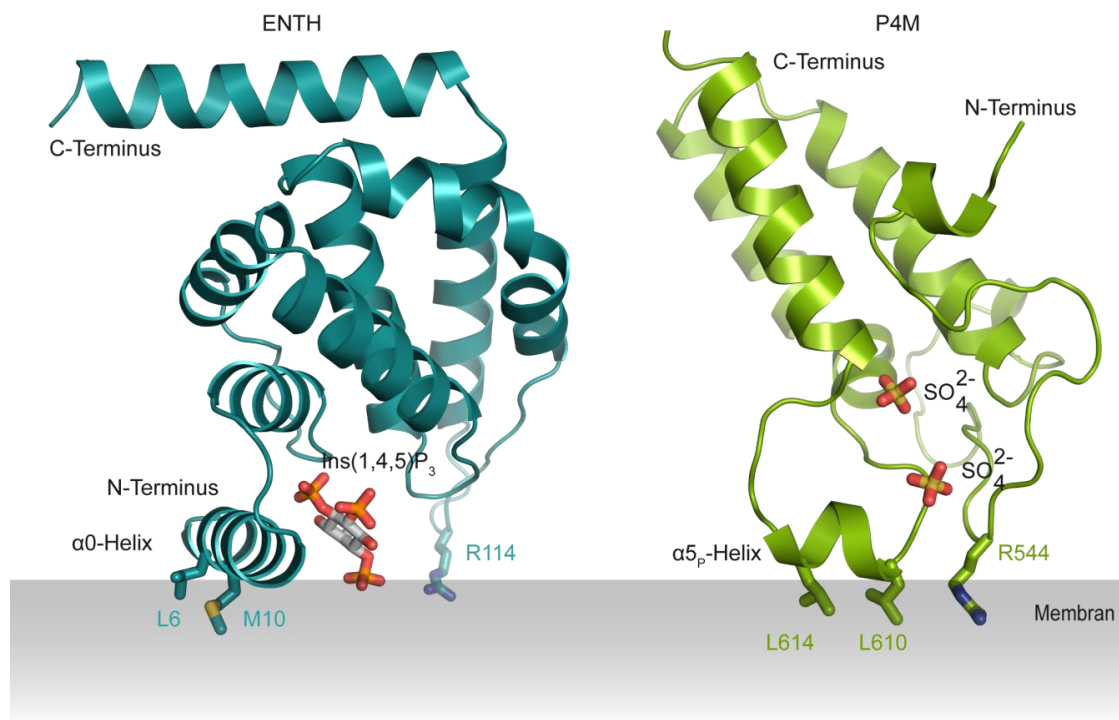


Abbildung 54: Strukturvergleich der P4M- und der ENTH-Domänen. Trotz fehlender struktureller Gemeinsamkeiten, ähnelt die α_{5p} -Helix der P4M in Bezug auf die Position der PI-Bindungstasche der amphipathischen α_0 -Helix der ENTH-Domäne, die an der Membranbindung beteiligt ist. Dies lässt vermuten, dass die α_{P5} -Helix in der Membranbindung beteiligt sein könnte. Die Membran ist durch den schattierten Balken angedeutet.

5.2.3 Mögliche Anwendungen der P4M-Domäne von DrrA

Für die PH-Domänen von OSBP (oxysterol binding protein) und von FAPP1 (four phosphate adaptor protein 1) ist gezeigt worden, dass diese PI4P-bindenden Domänen als Markerproteine für die räumliche Verteilung von PI4P innerhalb von Zellen verwendet werden können¹⁶⁰. Aufgrund der höheren Bindungsaffinität der P4M-Domäne zu PI4P¹³⁵, sollte die P4M-Domäne eine noch sensitivere Markierung von PI4P-positiven intrazellulären Membranen ermöglichen, als die PH-Domänen von OSBP und FAPP1.

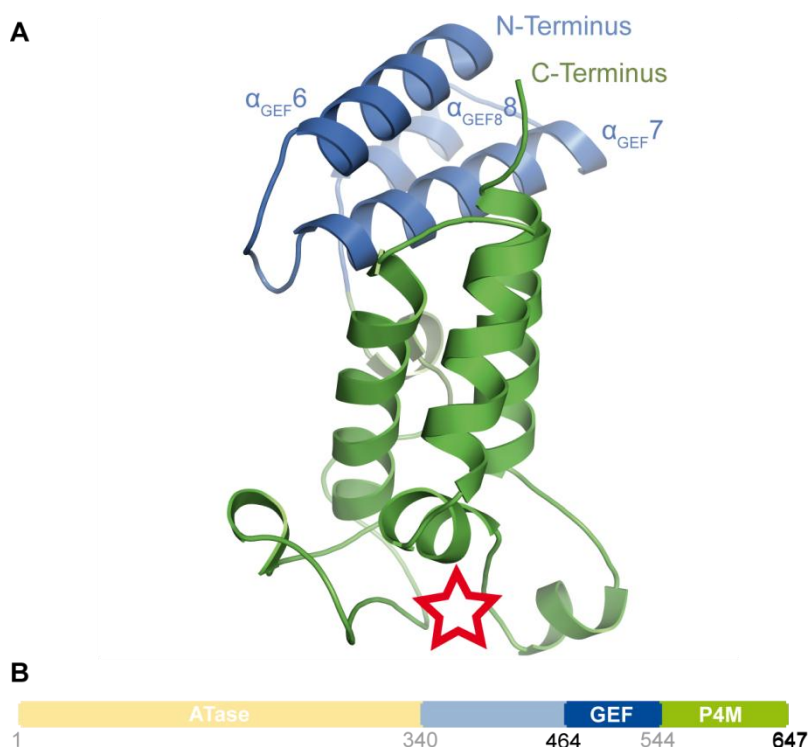


Abbildung 55: Die Struktur zeigt das P4M-Modell, welches vermutlich die minimale Größe mit maximaler PI4P Bindungsaktivität darstellt. A) In grün ist die von Brombacher *et al.* identifizierte, minimale P4M gezeigt. Intramolekulare Interaktionen zwischen der P4M-Domäne (grün) mit Aminosäuren aus den α -Helices $\alpha_{\text{GEF}6}$ und $\alpha_{\text{GEF}7}$ (blau) der GEF-Domäne stabilisieren vermutlich die Faltung der P4M-Domäne und tragen so zur maximalen PI4P-Bindungsaktivität bei. Die PI4P-Bindungstasche ist mit einem roten Stern gekennzeichnet. Die von Brombacher *et al.*, identifizierte minimale 12 kDa große P4M-Domäne vergrößert sich so auf 20 kDa (Aminosäuren 464-647), die vermutlich die vollständige PI4P-Bindungsaktivität besitzt. Beide Termini zeigen weg von der Membran und sind so für Modifikationen zugänglich. **B)** Domänenstruktur von DrrA (transparent) und des minimalen Konstrukts der P4M mit vermutlich maximaler Bindungsaktivität (Aminosäuren 464-647).

Brombacher *et al.* zeigten, dass die minimale P4M-Domäne nicht die maximale Bindungsaktivität zu PI4P enthält, da dieses Konstrukt im Vergleich zu Konstrukten mit einem verlängerten N-Terminus weniger stabil ist. Die in dieser Arbeit gelöste Kristallstruktur des Konstrukts, der GEF- und P4M-Domänen (Aminosäuren 340-647) zeigt, dass es eine Vielzahl an intramolekularen Interaktionen zwischen den C-terminalen α -Helices α_{GEF6} und α_{GEF7} der GEF-Domäne und der P4M-Domäne gibt, die vermutlich die Faltung der P4M stabilisieren. In Abbildung 55 ist das Modell der 20 kDa großen P4M-Domäne gezeigt, das zusätzlich die stabilisierenden α -Helices α_{GEF6} , α_{GEF7} und α_{GEF8} der GEF-Domäne enthält. Das DrrA-Konstrukt, bestehend aus den Aminosäuren 464-647, stellt daher vermutlich das minimale Konstrukt der P4M-Domäne mit vollständiger Bindungsaktivität dar. Die N- und C-Termini weisen, basierend auf der Modellorientierung aus Abschnitt 4.2.2, in Richtung Zytosol (Abbildung 55) und sollten somit für zusätzliche Modifikationen, wie beispielsweise die Anbringung eines Fluorophores oder eines Fusionsproteins zugänglich sein. Das P4M-Konstrukt aus den Aminosäuren 464-647 könnte somit wahrscheinlich als spezifischer und sehr sensibler, fluoreszenter Marker für PI4P-positive intrazelluläre Membranen oder als ein Lokalisationsanker für ein Fusionsprotein verwendet werden.

5.3 Modell der DrrA vermittelten-Prozesse auf der LCV

Basierend auf den Kristallstrukturen des Rab1:DrrA-Komplexes, der P4M-Domäne und dem funktionellen Vergleich der P4M-Domäne mit der ENTH-Domäne, wurde ein Modell der Bindung von DrrA auf der LCV erstellt (Abbildung 56). Durch die Bindung von PI4P auf der LCV-Membran über die P4M-Domäne erscheint eine senkrechte Orientierung von DrrA sinnvoll, da so auch die GEF-Domäne frei zugänglich für das freie, nicht GDI-gebundene Rab1 ist. Die hohe katalytische Effizienz des Nukleotidaustausches der GEF-Domäne führt zur GDP-Freisetzung von Rab1⁴. Der nukleotidfreie Übergangszustand des Rab1:DrrA-Komplexes ist in Abbildung 56 dargestellt. Die räumliche Nähe von Rab1 im Komplex mit der GEF-Domäne von DrrA zur LCV-Membran ermöglicht wahrscheinlich die Insertion der Geranylgeranyl-gruppen von Rab1 in die LCV-Membran und so die stabile Assoziation von Rab1 auf der LCV. Die im Zytosol etwa 10-fach höhere Konzentration von GTP gegenüber GDP führt zur GTP-Bindung von Rab1^{39,40} und zur Dissoziation des

Diskussion

Rab1:DrrA-Komplexes. Die Affinität von GDI zum Rab-Protein ist nur in der GDP-gebundenen Form sehr hoch⁵, so dass das GTP-gebundene Rab1 auf der LCV verbleibt und nicht von GDI extrahiert werden kann. Das GTP-gebundene, aktive Rab1 kann nun von der N-terminalen Adenyltransferase-Domäne von DrrA adenilyliert werden (Abbildung 56, rechts)¹¹³ oder mit anderen Rab-Effektoren auf der LCV, wie zum Beispiel LidA, interagieren⁶.

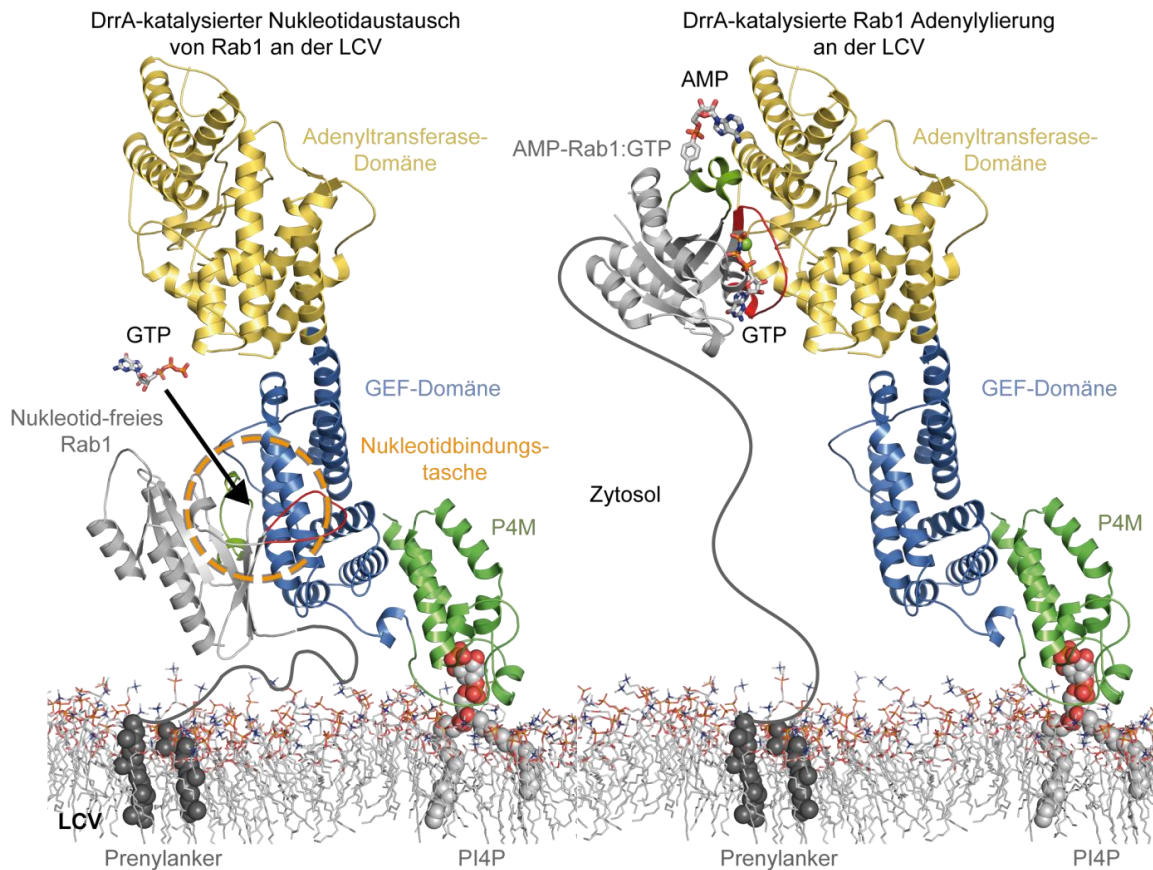


Abbildung 56: Modell der möglichen Orientierung von DrrA auf der LCV und der DrrA-katalysierten Aktivierung von Rab1 durch Nucleotidaustausch und nachfolgender Adenylierung. Durch die Bindung der P4M-Domäne (grün) an PI4P auf der LCV, ist DrrA senkrecht zur LCV-Membran orientiert, so dass die GEF-Domäne (blau) zugänglich für zytosolisches Rab1 ist. Im nucleotidfreien-Komplex mit DrrA ist Rab1 nahe der LCV-Membran, so dass die Insertion der Geranylgeranylanker in die LCV wahrscheinlich ist. Die Bindung von GTP führt zur Dissoziation von Rab1 aus dem Komplex mit DrrA und das aktive, GTP-gebundene Rab1 kann nun mit anderen Rab-Effektoren auf der LCV, wie beispielsweise LidA oder der Adenyltransferase-Domäne (gelb) von DrrA, interagieren. Gestrichelter gelber Kreis: Nucleotidbindungstasche von Rab1; grau: Rab1; grün:P4M; blau: GEF-Domäne; gelb: Adenyltransferase-Domäne; schwarze Kugeln: Geranylgeranylanker; graue Kugeln: PI4P; GTP: Guanosintriphosphat; graue Striche: LCV-Membran.

5.4 LidA ist eine Rab-Falle

Die Struktur von LidA zeichnet sich, im Vergleich zu anderen bisher strukturell charakterisierten Rab-Effektoren, durch eine weitaus komplexere Bindung des Rab-Proteins aus. LidA interagiert mit der Unter- und Vorderseite der Nukleotidbindungstasche von Rab8 über 4, bzw. 2 α -Helices. Statt der 1 oder 2 α -Helices (siehe 4.7.3.2)^{124,161}, die gewöhnlich an der Rab-Effektor-Interaktion mit einem Rab beteiligt sind, interagiert LidA über insgesamt 6 α -Helices, wodurch die gebildete Kontaktfläche zwischen Rab8 und LidA etwa doppelt so groß ist wie in anderen Rab:Rab-Effektor-Komplexen (siehe 4.7.3.3). LidA bildet die für einen Rab-Effektor typischen Interaktionen zu Rab8 über die hydrophobe Triade, den Interswitch-Bereich, Switch 2 und Switch 1 aus. Auffällig sind jedoch, im Vergleich zu anderen Rab-Effektoren, die vielfältigeren Kontakte zu Switch 1 durch LidA (siehe 4.7.3.2). Die Unterseite, der von Switch 1 und Switch 2 gebildeten Nukleotidbindungstasche, wird so durch LidA vollständig umschlossen (Abbildung 57, rechts). Das wahrscheinlich auffälligste, strukturelle Merkmal von LidA sind die zwei turmähnlichen Strukturen, die senkrecht zur Rab-Bindungsplattform angeordnet sind und die Nukleotidbindungstasche auf der Vorderseite von Rab8 umgeben. Die Türme befinden sich zu beiden Seiten der Front von Rab8 und bilden Interaktionsflächen mit Bereichen außerhalb der Nukleotidbindungstasche von Rab8 (α -Helix α_{3R} und β_{4R} - α_{3R} -Schleife (Rab-Subfamilien Motiv 3)). Diese Art der Rab-Bindung wurde hier zum erstenmal beobachtet. Die Rab-Bindung durch LidA erfolgt somit nicht ausschließlich durch die Bereiche des Rab-Proteins, deren Konformationen vom gebundenen Guanosin-nukleotid abhängig sind, sondern darüber hinaus durch Aminosäuren, oberhalb der Nukleotidbindungstasche, auf der Vorderseite von Rab8a. Die Nukleotidbindungstasche von Rab8a wird so durch die Bindung von LidA vollständig eingeschlossen. LidA umklammert förmlich Rab8a. Diese intensive Art der Rab-Bindung durch LidA ermöglicht wahrscheinlich die hochaffine Bindung verschiedener Rab-Proteine sowohl in der GDP-, als auch GTP-gebundenen Form.

Der Vergleich der Struktur von adenylyliertem Rab1b mit dem nicht-modifizierten Rab8a aus dem Komplex mit LidA zeigt, dass einige Aminosäuren der α -Helices α_{4L} und α_{5L} mit der AMP-Gruppe an Y77 von Rab1 kollidieren (Abbildung 50). Adenylylierte Rab-Proteine werden allerdings dennoch von LidA mit hoher Affinität gebunden¹²⁴. Daher kann

vermutet werden, dass die α -Helices α_{4L} und α_{5L} eine gewisse Flexibilität besitzen, so dass die Anwesenheit einer AMP-Gruppe nicht die Bindung des adenylierten Rab-Proteins verhindert (siehe 4.7.4). Im direkten Kontakt der α -Helices α_{4L} und α_{5L} befindet sich das β -Faltblatt β_{1R} (Rab Subfamilien Motiv 1) und der Interswitch-Bereich (β_{2R} , β_{3R} ; Rab-Familien Motiv 1 bzw. 2) von Rab8a. Die Aminosäurekomposition dieser Bereiche variiert in Rab-Proteinen. Im Fall der Flexibilität der α -Helices α_{4L} und α_{5L} könnte so der Abstand zu β_{1R} und zum Interswitch-Bereich des jeweiligen Rab-Proteins justiert werden, um eine optimale Bindung dieser Bereiche bei verschiedenen Rabs oder adenylierten Rabs zu ermöglichen (Abbildung 57, links).

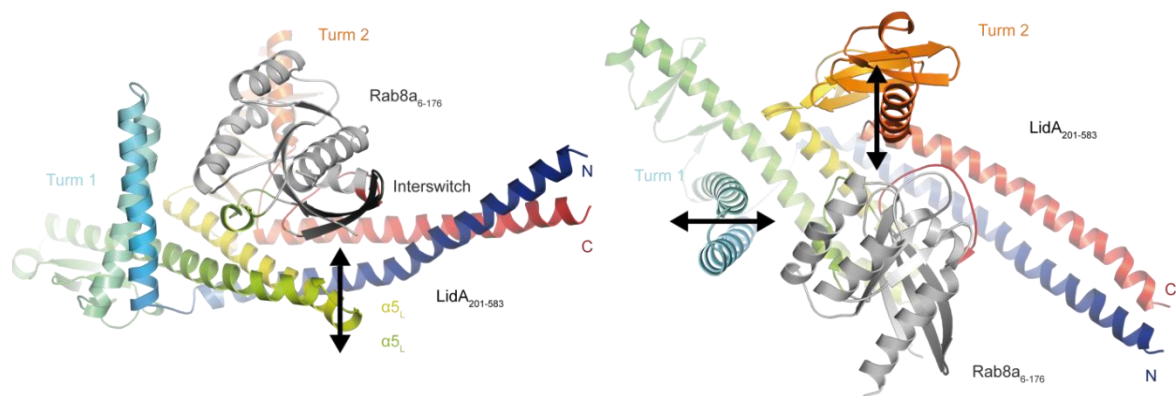


Abbildung 57: Strukturelle Hypothese der generellen Bindung von Rab-Proteinen durch LidA. Die Bindung von Rab8a durch LidA erfolgt von der Unterseite (Switch 1, Switch 2, Interswitch-Bereich) und der Vorderseite (α_{3R} , β_{4R} - α_{3R} -Schleife) von Rab8a. LidA umklammert gewissermaßen Rab8a. Im Falle einer strukturellen Flexibilität der α -Helices α_{4L} und α_{5L} und der Türme 1 und 2 (schwarze Pfeile) könnten diese Strukturelemente durch Variationen des Abstands zum jeweiligen Rab-Protein eine passgenaue Bindung des jeweiligen Rab-Proteins ermöglichen.

Die Türme 1 und 2 sind über Schleifen mit der Rab-Bindungsform verknüpft und besitzen daher wahrscheinlich eine gewisse strukturelle Flexibilität, so dass, abhängig vom dem zu bindenden Rab-Protein, der Abstand der Türme zum Rab-Protein variiert wird (Abbildung 57, rechts). Zwischen den Türmen befindet sich die aus Switch 1 und Switch 2 gebildete Nukleotidbindungstasche von Rab8, die sich in ihrer Konformation in der GDP-gebunden von der GTP-gebundenen Form des freien Rab-Proteins unterscheidet. Diese konformationellen Unterschiede der Nukleotidbindungstasche können vermutlich beim ersten Kontakt des Rab-Proteins mit LidA toleriert werden. Aufgrund der

Diskussion

zahlreichen Interaktionen zwischen Rab und LidA kann vermutet werden, dass das GDP-gebundene Rab-Protein durch die LidA-Bindung in die aktive Konformation gezwungen wird. Um diese Vermutung zu überprüfen, sind weitere Komplexstrukturen von LidA und verschiedenen Rab-Proteinen im GDP/GTP-gebundenen Zustand und in der adenylylierten Form nötig.

In Hinsicht auf die enorme Affinität von LidA zu Rab-Proteinen, kann die Struktur von LidA daher als eine Rab-Falle beschrieben werden, in der das Rab-Protein wahrscheinlich vergleichbar mit einem Schraubstock eingespannt wird.

5.4.1 LidA ist ein Rab-Supereffektor

Die große Kontaktfläche zwischen LidA und Rab resultiert vermutlich in der außergewöhnlich hohen Affinität. Die Bestimmung der Dissoziationskonstante konnte nur für die GDP-gebundene Form von Rab6a genau bestimmt werden ($K_D = 5,1 \text{ nM}$). Die Abschätzung der Affinität für den Komplex aus LidA und Rab6a:GTP lieferte eine um 2 Größenordnungen höhere Affinität mit einem K_D von etwa 30 pM. Die Bestimmung der Affinitäten für die GDP- und GTP-gebundenen Formen von Rab1b und Rab8a mit den verwendeten Methoden war nicht möglich. Die Freisetzung von Rab1b:mGDP oder Rab8a:mGDP aus dem Komplex mit LidA schien deutlich langsamer als für Rab6a:mGppNHp zu erfolgen. Die Dissoziationsratenkonstanten (k_{off}) von GDP-gebundenen Rab1b, bzw. Rab8a, sind daher vermutlich geringer als $1,5 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ (k_{off} , Rab6:mGppNHp:LidA). Die Dissoziationsgleichgewichtskonstanten beider Komplexe sollten somit niedriger als 30 pM (K_D , Rab6:mGppNHp:LidA) sein. Unter der Annahme, dass es zwischen der GDP- und GTP-gebundenen Form von Rab1b, bzw. Rab8a ebenso einen Affinitätsunterschied wie bei Rab6a:GDP und Rab6a:GTP gibt, sollte die Affinität von LidA für GTP-gebundenes Rab1b und Rab8a daher nochmals um etwa einen Faktor 100 größer sein. Damit läge die Affinität von LidA und aktivem Rab1b, bzw. Rab8a im niedrigen pikomolaren bis femtomolaren Bereich.

LidA besitzt die für Rab-Effektoren typische Eigenschaft, bevorzugt die GTP-gebundene Form des Rab-Proteins zu binden. Die enorm hohe Affinität für GTP-gebundene Rabs ist um mindestens 3 Größenordnungen höher als bei anderen Rab-Effektoren (siehe Anhang, Tabelle 17). Die sehr hohe Affinität von LidA für die GDP-gebundene Form von Rab-Proteinen, die sogar die Affinität anderer Rab-Effektoren für GTP-gebundene Rabs

übertrifft, ist extrem ungewöhnlich. LidA ist durch diese sehr hohe Affinität zu Rab-Proteinen allen bisher charakteristischen Rab-bindenden Proteinen thermodynamisch überlegen.

Neben den bekannten LidA-Bindungspartnern Rab1, Rab6 und Rab8, wurden in dieser Arbeit 9 weitere Rab-Proteine identifiziert¹²⁴, die größtenteils in der GTP- als auch in der GDP-Form von LidA gebunden wurden. Ein vergleichbar breites Rab-Bindungsspektrum wurde bisher nur für OCRL beobachtet, allerdings mit dem Unterschied, dass OCRL nur aktive Rab-Proteine bindet^{43,162} und diese auch nur mit mikromolarer Affinität. Basierend auf der OCRL:Rab8a-Komplexstruktur wurde die Ursache des breiten Rab-Bindungsspektrums in der fehlenden Bindung des Tryptophans der hydrophoben Triade von Rab8a durch OCRL vermutet³⁰, wodurch möglicherweise die Spezifität von OCRL für ein bestimmtes Rab-Protein verringert würde. Dies ist für LidA nicht der Fall, da LidA sehr ausgeprägte Kontakte mit der hydrophoben Triade von Rab8a ausbildet (siehe Ergebnisse 4.7.3.1, Abbildung 43). Der Grund des breiten Rab-Bindungsspektrums von LidA ist vermutlich die enorme Vielzahl an möglichen Interaktionen zu einem Rab-Protein.

Das breite Rab-Bindungsspektrum von LidA, zusammen mit der sehr hohen Affinität zu Rab-Proteinen in der GDP- und GTP-Form, macht LidA zu einem bisher einzigartigen Rab-Effektor, einem Rab-Supereffektor.

Ein Großteil der Rab-Effektoren bindet das jeweilige Rab-Protein mit einer Affinität im mikromolaren Bereich (siehe Tabelle 2, Anhang). Die Dissoziationsratenkonstanten des Rab8:OCRL-Komplexes sind beispielsweise relativ schnell³⁰, so dass die nachfolgende Bindung anderer Rab-Effektoren oder die Bindung eines GAPs möglich ist. Dadurch wird gewährleistet, dass die verschiedenen zellulären Transportprozesse, in denen das jeweilige Rab-Protein involviert ist, durchgeführt werden können und die Zirkulation des aktiven Rab-Proteins zwischen der Zielmembran und des inaktiven, GDI-gebundenen Rab-Pools im Zytosol aufrechterhalten wird. Aus der geschätzten Dissoziationsratenkonstante des LidA:Rab6a:GppNHp-Komplexes (siehe Ergebnisse, 4.7.1) ergibt sich eine Halbwertszeit ($\ln 2/k_{\text{off}}$) von mindestens 1h 17min. Für Rab1:GTP und Rab8:GTP ist aufgrund der noch langsameren Dissoziationsraten eine durchaus längere Halbwertszeit zu erwarten. LidA bildet somit Komplexe mit dem Rab-Protein, die

Diskussion

so stabil sind, dass eine Dissoziation des Rab-Proteins aus dem Komplex in einem physiologisch relevanten Zeitrahmen unwahrscheinlich ist. Aufgrund dieser sehr langsamen Dissoziation des Rab-Proteins aus dem Komplex mit LidA wird das Rab-Protein vermutlich so der Regulation durch andere Rab-bindende Proteine (Rab-Effektoren, GAPs, GDI) entzogen. Das Rab-Protein auf der LCV ist somit unter der Kontrolle von LidA.

Weiterhin konnte festgestellt werden, dass die N- und C-terminale Domänen von LidA keinen Einfluss auf die Rab-Bindung haben und die zentrale Rab-bindende Domäne von LidA (Aminosäuren 201-583) die volle Rab-Bindungsaktivität enthält (siehe 4.7.1).

Im Verlauf der Legionelleninfektion ist LidA neben der LCV auch auf dem ER, sowie an der Plasmamembran lokalisiert¹¹⁶. Ob LidA eine Funktion am ER oder an der Plasmamembran besitzt, ist nicht bekannt. Die hohe Affinität von LidA zu Rab1 (Rab1 ist in der Zelle am ER lokalisiert) und Rab8 (Rab8 ist in der Zelle an der Plasmamembran lokalisiert) sollte auch am ER und der Plasmamembran zu extrem stabilen Rab:LidA-Komplexen führen und so den vesikulären Transport an diesen Kompartimenten beeinflussen.

In dieser Arbeit wurde zudem gezeigt, dass LidA mindestens 12 verschiedene Rab-Proteine bindet und diese vermutlich auch mit einer sehr hohen Affinität bindet. Ob diese Kontakte auch *in vivo* relevant sind, ist aber aufgrund der unterschiedlichen Lokalisation der Rab-Proteine unklar⁸. Neben Rab1 sind bisher Rab7, Rab8 und Rab14 auf der LCV nachgewiesen worden¹¹². Somit gibt es insgesamt 3 weitere potentielle LidA-Bindungspartner (Rab7, Rab8, Rab14) in räumlicher Nähe zu LidA auf der LCV. Welche LidA:Rab-Komplexe auf der LCV während einer Legionelleninfektionen gebildet werden, ist nicht bekannt.

Die Überexpression von LidA in Hefe und COS1-Zellen führt zu Sekretionsdefekten und zur Fragmentierung des Golgi-Apparates^{117,163}. Diese Effekte werden ebenfalls bei Rab1-Mutanten beobachtet^{164,165}, so dass die Überexpression von LidA möglicherweise mit einer Beeinträchtigung der Rab1-Funktion zusammenhängt. In legionelleninfizierten Zellen dagegen werden diese Effekte nicht beobachtet, was nahelegt, dass die LidA-Sekretion stark reguliert ist und die LidA-Konzentration somit relativ gering sein muss. Bislang gibt es keine Angaben über die LidA-Konzentration in legionelleninfizierten Zellen. Die Dissoziationsgleichgewichtskonstante eines Proteinkomplexes entspricht der

Protein-konzentration bei der 50 % Komplexbildung vorliegt. Aufgrund der hohen Affinität von LidA zu Rab-Proteinen (nanomolar bis femtomolar) kann vermutet werden, dass selbst geringe LidA-Konzentrationen (nanomolar bis femtomolar) auf der LCV ausreichend sind, um LidA:Rab-Komplexe zu bilden. Im Gegensatz zu einer wahrscheinlich geringen LidA-Konzentration auf der LCV ist anzunehmen, dass die Rab1-Konzentration auf der LCV aufgrund der DrrA-vermittelten Rekrutierung von Rab1 steigt. Über die Rekrutierung der anderen Rab-Proteine (Rab7, Rab8, Rab14) an die LCV gibt es bisher keine Informationen. Sobald die Rab1:GTP-Konzentration höher als der K_D des Rab1:GTP:LidA Komplexes ist, sollte das Gleichgewicht zwischen freiem Rab1 auf der LCV und LidA-gebundenen Rab1 auf der LCV hin zum LidA:Rab1-Komplex verschoben werden. Da die Dissoziation des Rab-Proteins aus dem Komplex mit LidA extrem langsam ist und wahrscheinlich nicht in einem physiologisch relevanten Zeitfenster stattfindet, ist die strukturelle LidA Beschreibung einer Rab-Falle daher vermutlich auch im kinetischen Sinne zutreffend. Bei einer Erhöhung der Rab-Protein-Konzentration auf der LCV, sollte die wahrscheinlich geringe Konzentration von LidA auf der LCV durch die Bindung von Rab-Proteinen irgendwann gesättigt werden. Ab diesem Zeitpunkt der Sättigung könnten auch freie Rab-Proteine auf der LCV vorhanden sein, die mit anderen Rab-bindenden Proteinen (Rab-Effektoren, GAPs, GDI) interagieren können und nicht mehr unter der Kontrolle von LidA sind.

Über die Funktion von LidA auf der LCV kann bisher nur spekuliert werden. Da in bisherigen Untersuchungen keine katalytische Aktivität für LidA festgestellt werden konnte, beruht die Funktion von LidA in Bezug auf Rab-Proteine wahrscheinlich in der Bildung von extrem stabilen Komplexen mit Rab-Proteinen. LidA hat daher wahrscheinlich die Funktion einer Rab-Falle auf der LCV. Mögliche Implikationen dieser stabilen LidA:Rab-Komplexe werden im Folgenden beschrieben.

5.4.2 Implikationen der hohen Affinität von LidA zu Rab-Proteinen

Die außergewöhnlich hohe Affinität von LidA zu Rab-Proteinen impliziert untypische Rab-Effektor-Eigenschaften. Diese sind in Abbildung 58 dargestellt und werden im Folgenden beschrieben.

Diskussion

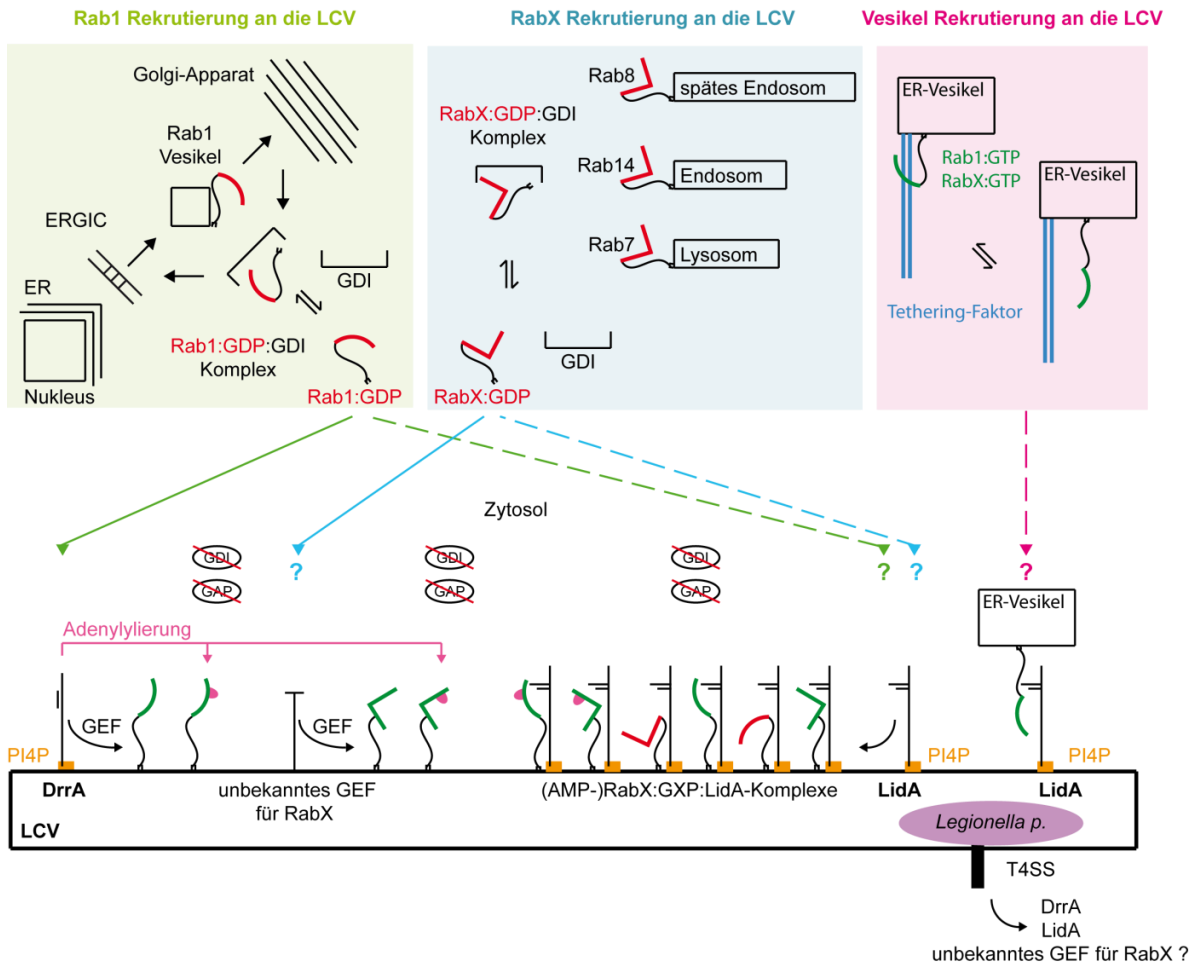


Abbildung 58: Modell der Rekrutierung von Rab-Proteinen und ER-Vesikeln an die LCV. Links oben: Rab1-Rekrutierung an die LCV: Zytosolisches Rab1-Protein liegt im Komplex mit GDI vor. Das Rab-Protein dissoziiert spontan aus dem Komplex mit GDI aufgrund der intrinsischen Dissoziationsrate. Nach der Translokation von DrrA in das Wirtszytosol erfolgt die DrrA-Bindung auf der LCV durch die Bindung der P4M-Domäne an PI4P. Freies-Rab1 bildet einen hochaffinen nukleotidfreien Komplex mit der GEF-Domäne von DrrA an der LCV-Membran (grüne Linie). Die hohe katalytische Effizienz der GEF-Domäne von DrrA⁴ und der zytosolische Überschuss an GTP gegenüber GDP¹⁶⁶ führen zum schnellen Nukleotidaustausch von GDP zu GTP in Rab1. Im aktiven, GTP-gebundenen Zustand ist die Affinität von Rab1 zu GDI zu gering⁵, als dass GDI Rab1 wieder binden und dieses von der LCV entfernen könnte. Durch die räumliche Nähe zur LCV wird Rab1 mittels der Geranylgeranylreste in die Membran verankert. Alternativ (grüne gestrichelte Linie) kann vermutet werden, dass aufgrund der enormen Affinität von LidA zu inaktiven, GDP-gebundenen Rab1, LidA durch die Komplexbildung mit RabX:GDP das freie-Rab aus dem Gleichgewicht mit GDI-gebundenem Rab entfernen könnte und so inaktive, GDP-gebundene Rab-Proteine an die LCV rekrutieren kann. **Mitte:** Das Modell der Rekrutierung der Rab-Proteine Rab7, Rab8 und Rab14¹¹² an die LCV, ist analog wie für die Rab1-Rekrutierung links. Die Voraussetzung für die GEF-vermittelte Rekrutierung ist das Vorhandensein eines bisher unbekanntes GEFs für Rab7, Rab8 und Rab14 auf der LCV (blaue Linie). Alternativ (blaue gestrichelte Linie) kann wie für Rab1 vermutet werden, dass LidA aufgrund der enormen Affinität zu inaktiven, GDP-gebundenen Rab-Proteinen, diese an die LCV rekrutieren kann. Aufgrund der hohen Affinität von LidA zu Rabs ist eine Kombination unterschiedlicher LidA:Rab-Komplexe auf der LCV möglich: LidA:AMP-Rab1:GTP, LidA:Rab1:GTP, LidA:AMP-RabX:GTP, LidA:RabX:GDP. **Rechts:** Rekrutierung von ER-Vesikeln an die LCV: Analog zum Rab:GDP:GDI-Komplex kann vermutet werden, dass Vesikel-lokalisierte Rab-Proteine in einem dynamischen Gleichgewicht

mit dem jeweiligen Rab-spezifischen Tetheringfaktor liegen, die entscheidend für den ersten Kontakt mit der Zielmembran sind. Es ist vermutet worden, dass LidA als ein Tetheringfaktor für die Rekrutierung von ER-Vesikel an die LCV verantwortlich ist. Folgende zwei Szenarien für die Vesikelbindung an die LCV sind möglich: LidA interagiert mit einem Komplex aus Rab-Protein und Tetheringfaktor auf dem Vesikel, wodurch das Vesikel an die LCV rekrutiert wird, oder die Dissoziation von Rab aus dem Komplex mit dem Tetheringfaktor ermöglicht die Tetheringfaktor-unabhängige Interaktion von LidA mit dem Vesikel-lokalisierten freien, GTP-gebundenen Rab-Protein. Ob weitere Faktoren nötig sind, das Vesikel mit der LCV zu verbinden, ist nicht bekannt.

5.4.2.1 Thermodynamisch und sterisch ist LidA in der Lage, Rabs an die LCV zu rekrutieren

Neben Rab1 sind auch Rab7, Rab8 und Rab14 auf der LCV nachgewiesen worden¹¹². Für diese Rab-Proteine sind bisher noch keine LCV-Rekrutierungsfaktoren identifiziert worden. Eine Möglichkeit der Rekrutierung dieser Proteine an die LCV wäre, analog zu DrrA, ein LCV-lokalisiertes GEF, welches durch den GDP- zu GTP-Austausch die erneute Bindung von GDI verhindert⁴ und so das Rab auf der LCV lokalisieren könnte. Theoretisch ist auch eine LidA-vermittelte Rekrutierung von Rab-Proteinen an die LCV möglich. Wie in Abbildung 59 zu sehen, überlappt die LidA-Bindungsstelle mit der GDI-Bindungsstelle auf Rab8a.

Im Gegensatz zu bisherigen Rab-Effektoren ist LidA in der Lage, auch GDP-gebundene Rab-Proteine mit hoher Affinität zu binden¹²⁴. LidA sollte daher mit GDI um die Bindung eines freien, GDP-gebundenen Rabs konkurrieren können. Der Vergleich der Affinitäten von LidA und GDI zu Rab-Proteinen zeigt (K_D : LidA = pikomolar bis nanomolar¹²⁴; K_D : GDI = nanomolar^{4,5}), dass LidA thermodynamisch stabilere Komplexe mit Rab-Proteinen bildet und somit in der Lage sein sollte, zytosolische, GDP-gebundene Rab-Proteine aus dem Gleichgewicht mit GDI zu entfernen und diese an die LCV zu rekrutieren. Neben DrrA könnte somit auch LidA in der Rekrutierung von Rab1, aber auch von Rab7, Rab8 und Rab14¹¹², an die LCV beteiligt sein.

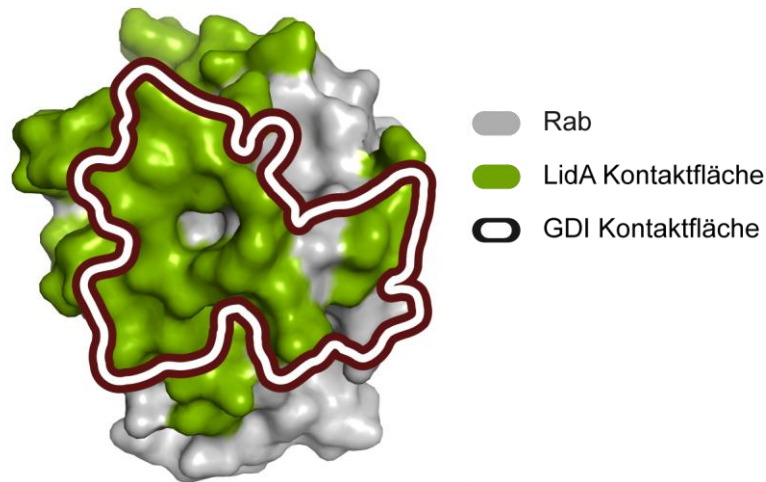


Abbildung 59: Die Bindungsstelle von GDI überlappt mit der von LidA. Eine gleichzeitige Bindung von LidA und GDI an ein Rab-Protein ist damit ausgeschlossen. Da LidA thermodynamisch stabilere Komplexe mit RabX:GDP als GDI bildet ist davon auszugehen, dass LidA in der Lage ist, freies, GDP-gebundenes Rab-Protein aus dem Gleichgewicht mit GDI zu entfernen und so das inaktive Rab-Protein an die LCV zu rekrutieren.

DrrA katalysiert den Nukleotidaustausch von GDP zu GTP von Rab1 und verhindert so aufgrund der niedrigen Affinität von aktivem Rab1:GTP zu GDI die Reassoziaton von Rab1:GTP und GDI. Rab1:GTP kann somit nicht durch GDI von der Membran entfernt werden und verbleibt auf der LCV^{4,5}. LidA dagegen besitzt keine katalytische Aktivität in Bezug auf Rab-Proteine. Nach der spontanen Dissoziation des RabX:GDP:GDI-Komplexes ist die Bildung des RabX:LidA-Komplexes auf der LCV möglich. Die Reassoziaton von GDI an inaktive Rabs würde hier durch die Bildung von extrem stabilen LidA:Rab-Komplexen verhindert.

Da LidA in der Lage ist, Komplexe mit verschiedenen Rabs, sowohl in der aktiven als auch inaktiven Form auf der LCV zu bilden, bleibt die Frage, wozu eine Anhäufung von potentiell inaktiven und aktiven Rab-Proteinen auf der LCV dient, wenn aufgrund der langsamen Dissoziation der Rabs aus dem Komplex mit LidA weitere Interaktionen der Rab-Proteine mit anderen Faktoren unwahrscheinlich sind.

5.4.2.2 LidA als Tetheringfaktor

Es wird vermutet, dass LidA als ein Tetheringfaktor zusammen mit DrrA auf der LCV an der Rekrutierung von ER-Vesikeln beteiligt ist⁶. Tetheringfaktoren bilden zusammen mit Rab-Proteinen initiale Kontakte zwischen der Akzeptor- und der Donormembran. Beim

Transport vom ER zum Golgi befindet sich Rab1:GTP auf dem ER-Vesikel im Komplex mit den Tetheringfaktoren p115 oder GM130:GRASP (siehe Einleitung 2.2.4). Der genaue Ablauf des Tetherings an die Golgi Membran ist allerdings unklar. Ebenso unklar ist die LidA-vermittelte Rekrutierung von ER-Vesikeln an die LCV. Die Interaktion zwischen LCV und ER-Vesikel könnte durch LidA oder einen Rab:LidA-Komplex auf der LCV mit einem Tetheringfaktor oder Rab1:Tetheringfaktor-Komplex auf dem ER-Vesikel erfolgen. Die Tetheringfaktoren p115 und GM130 konnten jedoch nicht auf der LCV nachgewiesen werden⁷⁸ und dies lässt die Spekulation zu, ob die Rekrutierung von ER-Vesikeln unabhängig von Wirts-Tetheringfaktoren erfolgt. Die Rab1:GTP:p115-, bzw. Rab1:GTP:GM130:GRASP-Komplexe auf dem ER-Vesikel liegen ebenso in einem dynamischen Gleichgewicht vor, wie beispielsweise der Rab1:GDP:GDI-Komplex. Unter dieser Bedingung befindet sich somit auch freies, GTP-gebundenes Rab1 auf dem ER-Vesikel, das aufgrund der intrinsischen Dissoziationsrate spontan aus dem Komplex mit p115 bzw. GM130:GRASP dissoziiert. Unter dieser Voraussetzung könnte (Rab-freies) LidA auf der LCV mit freiem, GTP-gebundenen Rab1 auf dem ER-Vesikel interagieren und einen stabilen Komplex bilden, wodurch die Anheftung des ER-Vesikels an die LCV möglich wäre. Ohne die zusätzliche Bindung von Rab1 an p115, bzw. GM130, ist die Bindungsaffinität dieser Tetheringfaktoren zur Vesikelmembran möglicherweise zu gering für eine stabile Assoziation mit der Vesikelmembran, so dass p115 oder GM130 vom Vesikel dissoziieren und daher nicht auf der LCV nachzuweisen sind.

LidA kann nach der Aufnahme in Makrophagen auf der zytoplasmatischen Seite der LCV nachgewiesen werden, wo es im Bereich zwischen der LCV und den rekrutierten ER-Vesikeln lokalisiert¹¹⁶. In legionelleninfizierten Zellen sind zwischen der LCV und den an die LCV rekrutierten ER-Vesikeln regelmässig angeordnete haarähnliche Verknüpfungen entdeckt worden, dessen molekulare Zusammensetzung noch unbekannt sind (Abbildung 60)¹⁰⁴. Diese Strukturen sind äußerst robust und sogar unter harschen Reinigungsbedingungen bei der Phagosomenreinigung bleiben Organellen wie ER, Mitochondrien und der Zellkern über diese Strukturen mit der LCV verbunden¹⁰⁴. In (nichtinfizierten) pflanzlichen^{167,168} und tierischen Zellen¹⁶⁹⁻¹⁷² konnten solche haarähnlichen Strukturen ebenfalls bei ER-Vesikeln, die an der Plasmamembran angeheftet sind, beobachtet werden¹⁰⁸. Allerdings ist weder die Funktion, noch ist die

Diskussion

molekulare Zusammensetzung dieser Strukturen identifiziert. Der Vergleich dieser Strukturen mit LidA ist somit nicht möglich.

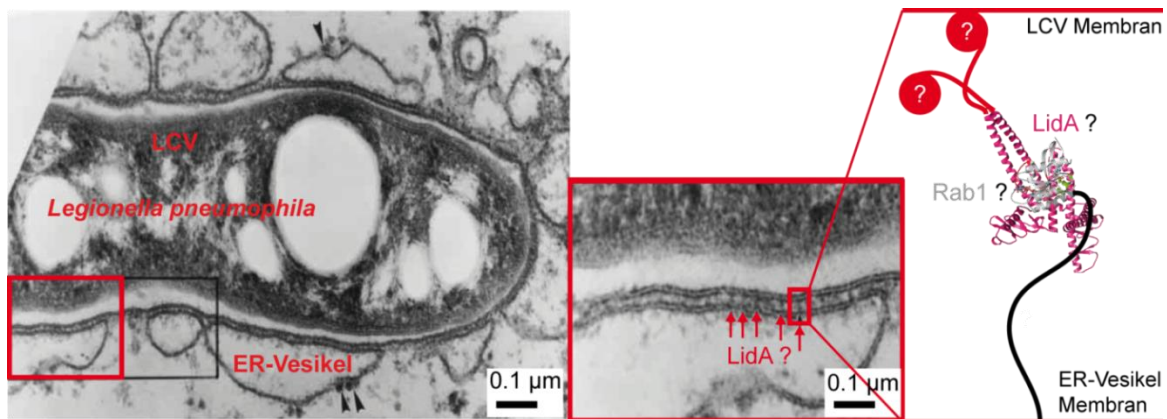


Abbildung 60: Längsschnitt des Bakteriums *Legionella pneumophila* innerhalb einer LCV, 15 Minuten nach der Infektion. Links: Die LCV ist mit ER-Vesikeln bedeckt, die dem rauhen-ER Typ entsprechen. Ribosome sind durch schwarze Pfeile markiert. Die Oberfläche der Vesikel, die zur LCV zeigen, ist abgeflacht; die gegenüberliegende Seite des Vesikels zeigt eine unregelmäßige Oberfläche. Mitte: Vergrößerung des rot-markierten Ausschnittes zur besseren Darstellung der kleinen haar-ähnlichen Kontakte zwischen der LCV und den ER-Vesikeln. Die roten Pfeile zeigen auf die haar-ähnlichen Strukturen, die die Vesikel mit der LCV verknüpfen. Die Strukturen sind äußerst robust und lassen die Spekulation zu, ob LidA aufgrund der potentiell stabilen Assoziation mit Rab-Proteinen auf dem ER-Vesikel in der Ausbildung dieser Strukturen beteiligt sein könnte. Rechts: Hypothetische Modell einer der haarähnlichen Strukturen aus LidA auf der LCV und Rab auf dem ER-Vesikel. schwarze Linie: C-Terminus des Rab-Proteins; rote Kreise: N- und C-terminale Domäne von LidA.¹⁰⁴

Die Lokalisation von LidA zwischen LCV und ER-Vesikel und die Bildung von extrem stabilen Komplexen mit Rab-Proteinen lassen den Verdacht zu, dass LidA in der Ausbildung dieser haarähnlichen Strukturen beteiligt sein könnte. Ob LidA möglicherweise diese noch unbekannt Strukturen der Wirtszelle für die Verankerung von ER-Vesikeln an die LCV ausnutzt oder die Funktion dieser Struktur an der Plasmamembran nachahmt kann bisher nur spekuliert werden.

Die Funktion von LidA könnte somit die stabile Rab-vermittelte Anheftung von ER-Vesikeln an die LCV sein. LidA hätte somit die Funktion eines Tetheringfaktors, der eine stabile Rab-vermittelte Anheftung von ER-Vesikel an die LCV katalysiert, ohne allerdings die Fusion der Membranen einzuleiten.

Um zu überprüfen, ob LidA an der Ausbildung dieser Strukturen zwischen LCV und ER-Vesikel eine Rolle spielt, müssten histologische Schnitte von legionelleninfizierten Zellen angefertigt werden und die Lokalisation von LidA in Bezug auf die haarähnlichen

Strukturen elektronenmikroskopisch, über die Markierung von LidA-Antikörpern, untersucht werden.

Zur Identifikation weiterer potentiellen LidA Bindungspartner des Wirtes, die an der Ausbildung der haarähnlichen Strukturen beteiligt sein könnten, könnte das Lysat von eukaryotischen Zellen (ideal wäre das Zelllysate von alveolaren Makrophagen) verwendet werden, um in Bindungsstudien mit immobilisiertem LidA oder dem Rab1:LidA-Komplex einen potentiellen Bindungspartner aus dem Lysat zu identifizieren.

5.4.2.3 Die LidA-Bindung verhindert die GAP-vermittelte Inaktivierung

LidA blockiert die Bindungsstelle auf dem Rab-Protein für GAPs. GAPs binden Rab-Proteine mit relativ schwacher Affinität (K_D : 20-200 μM ^{173,174}). Da LidA Rab-Proteine mit einer um 6 Größenordnungen höheren Affinität als GAPs bindet, ist die Inaktivierung von LidA-gebundenen Rab-Proteinen durch GAPs nicht möglich. Infolgedessen kann auch die GDI-vermittelte Entfernung des Rab-Proteins nicht mehr stattfinden. Das LidA-gebundene Rab-Protein verbleibt also im aktiven, GTP-gebundenen Zustand auf der LCV. Der Komplex aus LidA und aktivem Rab-Protein spielt wahrscheinlich eine Rolle in der Rekrutierung von ER-Vesikeln an die LCV oder möglicherweise in der Ausbildung der haarähnlichen Strukturen zwischen LCV und ER-Vesikeln (siehe 5.4.2.1).

5.4.2.4 LidA ist möglicherweise der einzige Bindungspartner von adenylierten Rabs auf der LCV

Die Modifikation von aktiven Rab-Proteinen durch die Adenylierung von DrrA auf der LCV verhindert die Bindung und die Regulation von Rab-bindenden Proteinen, mit Ausnahme von LidA¹¹³. Die Adenylierung von Rab6a:mantGppNHP führt zu einer Verringerung der Affinität zu LidA um 2-3 Größenordnungen¹²⁴, ähnliches ist auch für Rab1b und Rab8a wahrscheinlich. Trotz Adenylierung ist die Affinität von LidA noch immer im niedrigen nanomolaren Bereich für AMP-Rab6:GTP (K_D , AMP-Rab6:mGppNHP:LidA= 4,8 nM). Die Affinitäten für AMP-Rab1b:GTP und AMP-Rab8:GTP konnten aufgrund der sehr langsamen Dissoziation aus dem Komplex mit LidA nicht bestimmt werden und liegen daher mindestens im pikomolaren Bereich. Dies lässt vermuten, dass der Grund der hohen Affinität von LidA zu Rab-Proteinen möglicherweise

Diskussion

für die Tolerierung der AMP-Gruppe notwendig sein könnte, wodurch LidA der alleinige noch bindungsfähige Rab-Effektor für adenylierte Rabs auf der LCV sein könnte.

In aktuellen Arbeiten wurde das Legionellenprotein SidD identifiziert, welches Deadenylase-Aktivität besitzt und die AMP-Gruppe von adenylierten Rab1:GTP wieder entfernt^{115,121}. Ob SidD in der Lage ist die Deadenylierung an Rab1:GTP im Komplex mit LidA zu katalysieren oder ob Rab1:GTP zunächst freigesetzt werden muss, ist nicht bekannt.

Ingmundson *et al.* haben gezeigt, dass Rab1 nach den ersten 4 Stunden einer Legionelleninfektion wieder von der LCV verschwindet. Da die AMP-Modifikation des Rab-Proteins die Bindung eines GAPs verhindert¹¹³, ist die Deadenylierung die Voraussetzung dafür, dass Rab1 wieder durch ein GAP inaktiviert werden kann. Die Inaktivierung von Rab1:GTP würde vermutlich durch das Legionellen GAP LepB katalysiert werden². In der GDP-Form kann Rab1 wieder GDI-vermittelt von der Membran entfernt werden. Die Deadenylierung von AMP-Rab1:GTP führt allerdings nur dann potentiell zu einer GDI-vermittelten Entfernung von der LCV, wenn das deadenylierte Rab1:GTP nicht wieder von einem LidA auf der LCV gebunden wird. Dies kann nur der Fall sein, wenn wie unter 5.4.1 beschrieben, sämtliche LidA-Moleküle auf der LCV bereits mit Rab-Proteinen gesättigt sind.

Das Wirtsprotein Rab1 könnte alternativ auch durch einen Ubiquitin-vermittelten Abbau, der durch ein noch unbekanntes Legionellenprotein induziert wird, von der LCV entfernt werden (siehe 5.2)¹⁴⁷⁻¹⁴⁹. Bisher ist jedoch kein Legionellenprotein, das mit Rab1 interagiert, identifiziert worden, welches ein Kandidat für die Ubiquitinierung von Rab1 sein könnte. Ob die Ubiquitinierung auch für die Entfernung von Rab-Proteinen auf der LCV eine Rolle spielt, kann daher nur spekuliert werden.

5.4.3 Wird das Rab aus dem Komplex mit LidA wieder freigesetzt?

LidA bildet mit Rab-Proteinen quasi-irreversible Komplexe. Dies wirft die Frage auf, ob und wie eine Freisetzung der Rab-Proteine aus dem Komplex mit LidA möglich ist. Dies lässt die Spekulation zu, ob ein bisher unbekanntes Legionellenprotein, ein Rab-Freisetzungsfaktor (Rab-FF) existiert, der im Verlauf der Legionelleninfektion Rab1 aus dem Komplex mit LidA freisetzt.

LidA bindet über 4 α -Helices der Rab-Bindungsplattform das Rab-Protein über Switch 1, Switch 2 und den Interswitch-Bereich auf der Unterseite des Rab-Proteins. Charakteristisch für die LidA-Struktur sind die zwei turmähnlichen Strukturen auf beiden Seiten der Rab-Bindungsplattform, zwischen denen Rab8a gebunden ist (Abbildung 61, links). Gegenüber dem Rab-Protein befindet sich die α -Helix α_{4L} , zu dessen Seiten sich Turm 1 und Turm 2 befinden (Abbildung 61, rechts). Ein Rab-FF könnte auf der α -Helix α_{4L} binden (grüner Kreis in Abbildung 61, rechts) und durch Interaktionen mit Turm 1 und Turm 2 eine Konformationsänderung der Türme induzieren, die zur Verringerung der Kontakte zwischen Rab und LidA und damit zur Abnahme der Affinität von LidA zu Rab1 führen könnte. Dadurch könnte Rab1 aus dem Komplex mit LidA freigesetzt werden. Wie bereits oben beschrieben, sind beide Türme durch Schleifen mit der Rab-Bindungsplattform verbunden, so dass angenommen werden kann, dass beide LidA-Türme im Rab-freien Zustand eine gewisse Flexibilität besitzen. Ein Auseinanderbewegen (rote Pfeile in Abbildung 61, rechts) beider Türme durch die Bindung eines Rab-FFs könnte die Affinität zwischen Rab und LidA schwächen und die Rab-Freisetzung induzieren.

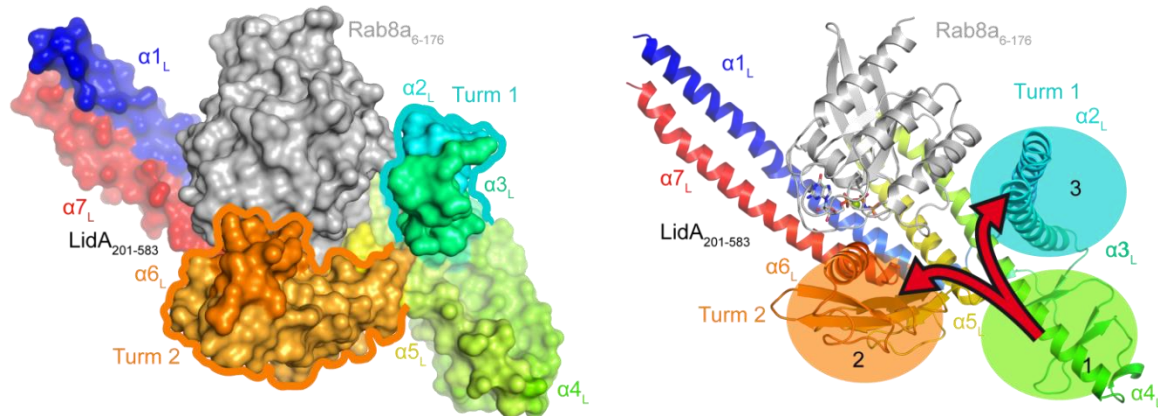


Abbildung 61: Oberflächendarstellung des Rab8a:LidA-Komplexes und die hypothetische Bindungsstelle eines potentiellen Rab-Freisetzungsfaktors. Links: Der Rab8a:LidA-Komplex ist in der Oberflächendarstellung gezeigt. Die Bindung von Rab8a durch LidA erfolgt von der Rab-Unterseite durch die α -Helices α_{1L} , α_{7L} , α_{4L} und α_{5L} und seitlich der Nukleotidbindungstasche durch die Türme 1 und 2. Rechts: Die enorm hohe Affinität von LidA zu Rab-Proteinen lässt vermuten, dass es einen weiteren Proteinfaktor geben muss, der das Rab-Protein aus dem Rab-LidA-Komplex freisetzt. Ein solcher LidA-Verdrängungsfaktor könnte an Position 1 (grüner Kreis) binden und durch Interaktion mit Turm 1 (türkis) und Turm 2 (orange) eine Konformationsänderung induzieren (rote Pfeile). Dadurch würde die Affinität von LidA zum Rab-Protein verringert und das Rab-Protein könnte aus dem Komplex mit LidA freigesetzt werden. Die Kolorierung von LidA ist von blau (N-Terminus) nach rot (C-Terminus); grau: Rab8a.

Die Existenz eines solchen Rab-FF ist jedoch fraglich, da ein solcher Faktor, aus thermodynamischer Sicht, mit einer noch höheren Affinität als ein Rab, den Rab:LidA-Komplex binden müsste, um das Rab aus dem Komplex mit LidA freizusetzen. Alternativ könnte ein Rab-FF auch proteolytisch die Freisetzung eines Rabs aus dem Komplex mit LidA bewirken. Bisher ist jedoch außer Rab-Proteinen kein weiterer Bindungspartner von LidA identifiziert worden.

Ein eventueller Rab-Freisetzungsfaktor sollte den Rab:LidA-Komplex erkennen. Daher könnte ein immobilisierter Rab-LidA-Komplex verwendet werden, um einen solchen Faktor aus Legionellenzelllysat oder Lysat eukaryotischer Zellen zu isolieren.

5.4.4 Die Herstellung eines Rab-bindungsdefizienten LidA ist schwierig

LidA ist aufgrund der hohen Affinität zu inaktiven, GDP-gebundenen Rab-Proteinen thermodynamisch in der Lage, das freie, GDP-gebundene Rab-Protein aus dem Gleichgewicht mit GDI zu entfernen (siehe 5.4.2.1) und an die LCV zu rekrutieren. Dies lässt die Spekulation zu, ob LidA die auf der LCV nachgewiesenen Rab-Proteine Rab1, Rab7, Rab8 und Rab14 an die LCV rekrutieren kann^{6,112}. Um diese Hypothese zu prüfen, ist die zelluläre Untersuchung der LidA-Interaktion mit Rab-Proteinen nötig. Ein Einfluss der bisher unbekanntenen N- und C-terminalen Domänen, sowie die mögliche Bindung eines unbekanntenen Proteins an die α -Helix4 von LidA gegenüber des Rab-Proteins, ist nicht auszuschließen und daher ist ein Rab-bindungsdefizientes LidA für solche Untersuchungen nötig.

Die Identifizierung einzelner Aminosäuren auf Seiten von LidA, die für die hohe Affinität der Rab-Bindung entscheidend sind, ist aufgrund der Vielzahl der Interaktionen zum Rab-Protein jedoch schwierig. Basierend auf der LidA-Struktur kann spekuliert werden, dass die LidA-Interaktion zu Rab-Proteinen über die Rab-Bindungsplattform (hydrophober Bereich 1 und 2) einen relativ ähnlichen Beitrag bei verschiedenen Rab-Proteinen leistet. Eine größere Variabilität der Interaktionen zwischen Rab-Proteinen und LidA ist bei den Interaktionen der Türme 1 und 2 mit der α -Helix3 und der β 4- α 3-Schleife zu erwarten.

Für die Herstellung eines Rab-bindungsdefizienten-LidA-Konstruktes müssten daher mehrere Mutationen in allen 3 Bereichen eingefügt werden. Die Erzeugung einer

Vielfachmutante ist jedoch problematisch, da möglicherweise die Stabilität des Proteins stark beeinträchtigt wird.

5.5 Darstellung der DrrA- und LidA-vermittelten Prozesse auf der LCV

Die Ergebnisse dieser Arbeit sind in Abbildung 62 noch einmal zusammenfassend dargestellt.

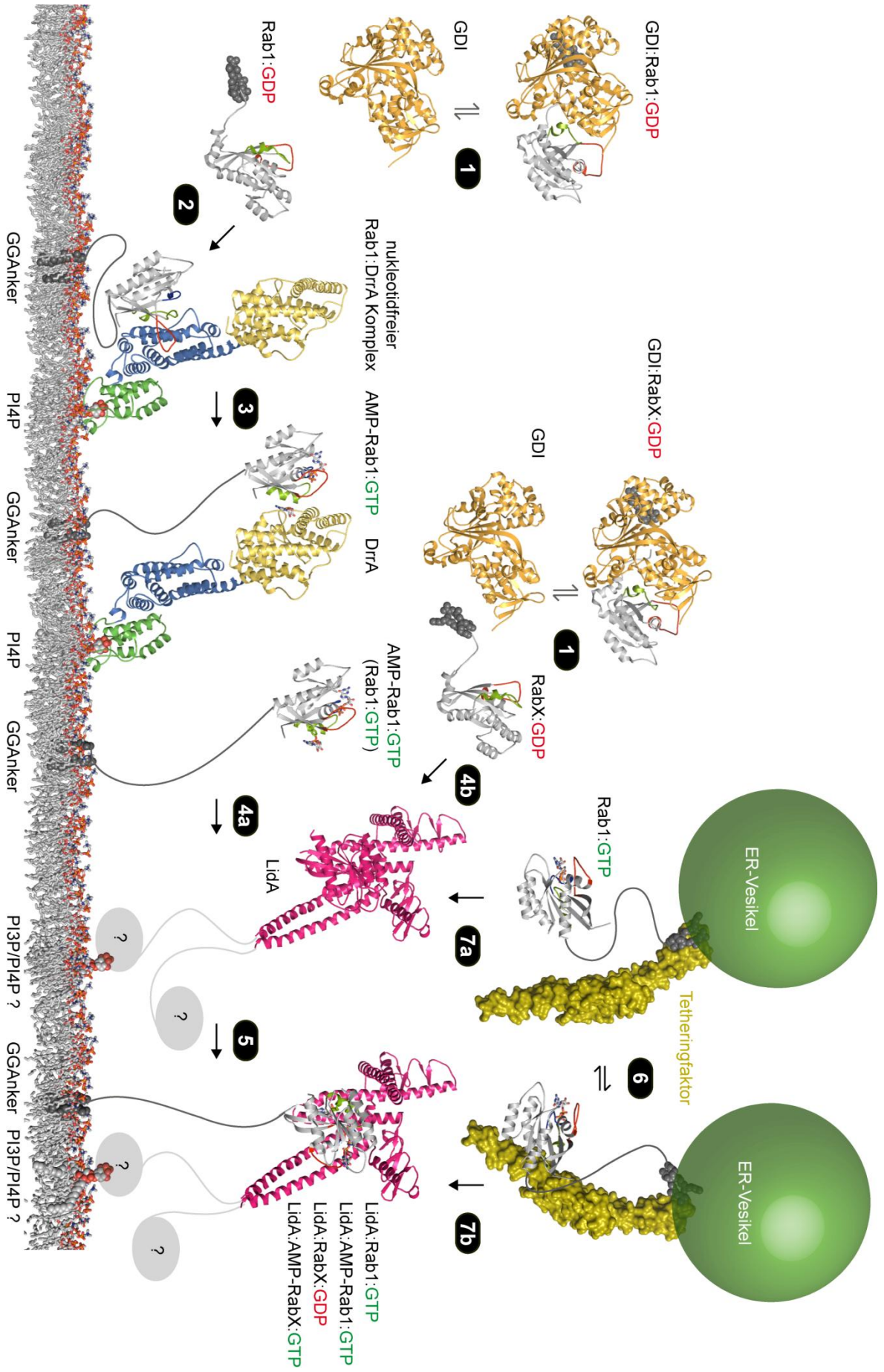


Abbildung 62: Übersichtsmodell der DrrA- und LidA-vermittelten Prozesse auf der LCV. Von links nach rechts: **1)** Zytosolisches, GDP-gebundenes Rab-Protein liegt im Komplex mit GDI vor. Das Rab-Protein dissoziiert spontan aus dem Komplex mit GDI aufgrund der intrinsischen Dissoziationsrate. **2)** Nach der Translokation von DrrA in das Wirtszytosol erfolgt die DrrA Bindung durch die Bindung der P4M-Domäne an PI4P auf der LCV. Freies-Rab1 bildet einen nukleotidfreien-Komplex mit der GEF-Domäne von DrrA an der LCV-Membran. Die hohe katalytische Effizienz der GEF-Domäne von DrrA⁴ und der zytosolische Überschuss an GTP gegenüber GDP^{39,40} führen zum schnellen Nukleotidaustausch von GDP zu GTP in Rab1. Im aktiven, GTP-gebundenen Zustand ist die Affinität von Rab1 zu GDI zu gering⁵, als dass GDI Rab1 wieder binden und dieses von der LCV entfernen könnte. Durch die räumliche Nähe zur LCV wird Rab1 mittels der Geranylgeranylreste in der Membran verankert. Alternativ könnte die Rab1 Rekrutierung auch wie unter 4b beschrieben stattfinden. **3)** Das aktive, GTP-gebundene Rab1 ist ein Substrat der N-terminalen Adenyltransferase-Domäne von DrrA, welche Rab1 an Y77 kovalent mit einer AMP-Gruppe modifiziert. Die Adenylylierung von Rab1 verhindert die Bindung durch GAPs und somit die Inaktivierung von Rab1 auf der LCV. Auch die Interaktion mit Rab-Effektoren der Wirtszelle ist beeinträchtigt. LidA ist bislang der einzige Rab-Effektor, der trotz der AMP-Modifikation noch mit Rab1 interagiert¹¹³. **4a)** LidA ist die über N- oder C-terminale Domäne an PI3P oder PI4P auf der LCV gebunden. Die Funktion der anderen terminalen Domäne ist unbekannt. LidA kann adenyliertes Rab1:GTP und nicht modifiziertes Rab1:GTP mit hoher Affinität auf der LCV binden¹²⁴. **4b)** Die enorme Affinität von LidA sogar zu inaktiven, GDP-gebundenen Rab-Proteinen lässt vermuten, dass LidA durch die Komplexbildung mit RabX:GDP das freie Rab aus dem Gleichgewicht mit GDI-gebundenem Rab entfernen kann und so inaktive, GDP-gebundene Rab-Protein an die LCV rekrutieren könnte. **5)** Aufgrund der hohen Affinität von LidA zu Rabs ist eine Kombination unterschiedlicher LidA:Rab-Komplexe auf der LCV möglich: LidA:AMP-Rab1:GTP, LidA:Rab1:GTP, LidA:AMP-RabX:GTP, LidA:RabX:GDP. **6)** Analog zum Rab:GDP:GDI-Komplex kann vermutet werden, dass Vesikel-lokalisierte Rab-Proteine in einem dynamischen Gleichgewicht mit dem jeweiligen Rab-spezifischen Tetheringfaktor auf dem Vesikel liegen. LidA ist an der Rekrutierung von ER-Vesikeln an die LCV beteiligt. Folgende zwei Szenarien für die Vesikelbindung an die LCV sind möglich. **7a)** LidA (auf der LCV) interagiert mit Rab1:GTP:Tetheringfaktor-Komplex auf dem Vesikel, wodurch das Vesikel an die LCV rekrutiert wird. **7b)** Die Dissoziation von Rab aus dem Komplex mit dem Tetheringfaktor ermöglicht die Tetheringfaktor-unabhängige Interaktion von LidA auf der LCV mit dem Vesikel-lokalisiertem Rab-Protein. Ob weitere Faktoren nötig sind, den Vesikel mit der LCV zu verbinden, ist nicht bekannt.

6. Ausblick

Die Arbeiten der vorliegenden Dissertation dienen der Erforschung der molekularen Grundlagen der Rab-Manipulation durch die Proteine DrrA und LidA aus *Legionella pneumophila* und zeigen neue Blickwinkel auf die Kontrolle des Rab-regulierten vesikulären Transportes.

Das bakterielle GEF-Protein DrrA katalysiert den Nukleotidaustausch und damit die Aktivierung von Rab1, die eine effektive Dissoziation des Rab:GDI Komplexes bewirkt. Dies führt zu der interessanten Hypothese, dass humane RabGEFs die Dissoziation eines Rab:GDI-Komplexes bewirken und damit die spezifische Rekrutierung von Rabs an intrazelluläre Membranen induzieren können. Zur Überprüfung dieser Hypothese sollten zellbiologische Untersuchungen angestrebt werden, um den Einfluss von RabGEFs auf die Lokalisation von Rab-Proteinen in vivo zu testen.

Anhand eines Aminosäuresequenzvergleichs der P4M-Domäne von DrrA mit Proteinen des Legionellengenoms können zwei weitere Proteine (lpg1101, lpg2603) mit einer P4M-Domäne am C-Terminus identifiziert werden. Die Funktion dieser Proteine ist noch unbekannt, doch aufgrund der potentiellen PI4P-Bindung, scheint eine Rolle dieser Proteine auf der LCV wahrscheinlich. Ob diese Proteine ebenfalls eine Rolle in der Rab-Regulation besitzen, sollte in biochemischen Untersuchungen getestet werden.

LidA ist ein außergewöhnlicher Rab-Effektor, der durch die enorm hohe Affinität zu Rabs aus thermodynamischer Sicht potentiell in der Lage ist quasi-irreversible Komplexe mit Rab-Proteinen zu bilden, Rab-Proteine aus dem Zytosol zu rekrutieren oder mit vesikelständigen Rab-Proteinen zu interagieren und dadurch Vesikel zu rekrutieren.

Die Rab8a:LidA-Struktur bietet die ideale Voraussetzung zur Herstellung eines Rab-bindungs-defizienten LidA-Konstrukts. Mit Hilfe dieses Konstruktes sollte in zellbiologischen Experimenten untersucht werden, ob die LidA-Interaktion mit Rab-Proteinen notwendig ist, um die LCV-lokaliserten Rab-Proteine Rab1, Rab6, Rab7, Rab8 und Rab14 und Vesikel an die LCV zu rekrutieren.

7. Material und Methoden

7.1 Materialien

7.1.1 Chemikalien

Tabelle 2: Chemikalien

Chemikalien	Hersteller
Acrylamid 4K-Lösung (30 %, Mix 37,5:1), Ammoniumsulfat, Dikaliumhydrogenphosphat, Isopropyl- β -D-Thiogalactopyranosid (IPTG), Methanol, Salzsäure (25%)	AppliChem (Darmstadt, Deutschland)
Carbenicillin	Biomol GmbH (Hamburg, Deutschland)
Chloramphenicol, N, N, N', N' – Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
dNTPs	Fermentas (St. Leon-Rot, Deutschland)
Ampicillin (Natriumsalz), Dithioerythritol (DTE), Ethylendiamin-tetraessigsäure (EDTA) (Dinatriumsalz), 4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1- ethan-sulfonsäure (Hepes), Kanamycinsulfat, Natriumdodecylsulfat (SDS)	Gerbu (Gaiberg, Deutschland)
RedSafe	iNtRON Biotechnology (Sangdaewong-Dong, Korea)
Agarose	Invitrogen (Darmstadt, Deutschland)
Ethanol, Kaliumdihydrogenphosphat, Magnesiumchlorid, Natronlauge (2M), 2-Propanol, Salzsäure (1M)	J. T. Baker / Mallinckrodt Baker B.V. (Deventer, Niederlande)
2' (3') - O - (N-methylanthranoyl) (mant) - Guanosindiphosphat (mGDP)	Jena Bioscience (Jena, Deutschland)
Dinatriumhydrogenphosphat, Imidazol	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Natriumdihydrogenphosphat	MP Biomedicals LLC (Illkirch, Frankreich)
Ammoniumpersulfat (APS), Bromphenolblau (Natriumsalz), Coomassie Brilliant Blue R250, Gentamicinsulfat, β -Mercaptoethanol, Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Serva (Heidelberg, Deutschland)
L-Glutathion reduced, Guanosindiphosphat (GDP), Guanosintriphosphat (GTP), Guanosin-5'- β , γ - imidotriphosphat (GppNHp), Natriumchlorid	Sigma-Aldrich (München, Deutschland)
Phosphatidylinositol-4-Phosphat-diC4 (PI(4)P- diC4) BODIPY® TMR Phosphatidylinositol 4- phosphate	Echelon über MobiTec, Göttingen

7.1.2 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 3: Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Hersteller
Roth (Karlsruhe)	Dialysemembranen
Greiner Bio-one (Frickenhausen) Corning Life Sciences (Lowell, USA)	Kristallisationsplatten 96-fach
MP Biomedicals (Solon, USA)	Kristallisationsplatten 24-fach
Qiagen (Hilden) Hampton Research, (Aliso Viejo, USA)	Kristallisationscreens
Roth (Karlsruhe)	Parafilm
Millipore Amicon (Witten)	Ultrafiltrationseinheiten
Sartorius Stedim (Aubagne, Frankreich)	Vivacell250 Ultrafiltrationseinheiten

7.1.3 Molekularbiologische Kits

Tabelle 4: Molekularbiologische Kits

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

7.1.4 Chromatographiesäulen und –materialien

Tabelle 5: Chromatographiesäulen und –materialien

Säule/Säulenmaterial	Hersteller
Glutathion 4 Sepharose fast flow, Hi-Load Su-perdex 75/200 16/60 & 26/60 prep grade, Su-perdex 200 10/30 GL, Superdex 75 10/30, Hi-Trap Chelating HP 1 ml und 5 ml Säulen	GE Healthcare (München, Deutschland)
Amylose Resin, Chitin Beads	New England Biolabs (Ipswich, USA)

7.1.5 Geräte

Tabelle 6: Geräte

Gerät	Hersteller
Avanti J-20 XP Zentrifuge, Rotor JLA 8.1000 & JA 25.50	Beckman Coulter, Inc. (Brea, USA)
FPLC Äkta prime plus	GE Healthcare (München, Deutschland)
HPLC System (600 S Controller, 626 Pump, 717 plus Autosampler, 2487 Dual λ Absorbance De-tector, Fraction Collector III)	Waters Corporation (Milford, USA)
Kristallisationsroboter Art Robbins Phoenix	Dunn Labortechnik (Asbach, Deutschland)
Kristallisationsroboter Mosquito Crystal	Ttp Labtech (Melbourn, Hertfordshire, UK)
Microfluidizer M-110S	Microfluidics Corp. (Newton, UK)
Mikrokalorimeter iTC200	MicroCal / GE Healthcare (München, Deutschland)
NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer	PeqLab Biotechnology GmbH (Erlangen, Deutschland)
Power Pac Spannungsquelle, MicroPulser, Mini-Protean 3 SDS-PAGE System, Thermocycler PTC-200	Bio-Rad Laboratories GmbH (München, Deutschland)
QiaCube	Qiagen (Hilden, Deutschland)
Stopped-flow	Applied Photophysics Ltd (Surrey, Großbritannien)
Visualisierungs- und Inkubationseinheit Rock-Imager	Formulatrix (Waltham, USA)

7.1.6 Bakterienstämme

Tabelle 7: Bakterienstämme

Stamm	Genotyp	Hersteller
XL1-Blue	recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17(r_K^- , m_K^+) supE44 relA1 lac [F' proAB lacI _q Δ M15 Tn10 (Tet ^r)]	Stratagene / Agilent Technologies (Deutschland)
BL21(DE3)	F- ompT hsdS (rB-mB-) dcm gal (DE3)	Novagen / Merck (Deutschland)
BL21-CodonPlus(DE3)-RIL	B F ⁻ ompT hsdS(rB ⁻ mB ⁻) dcm ⁺ Tet ^r gal λ (DE3) endA Hte [argU ileY leuW Cam ^r]	Stratagene / Agilent Technologies (Deutschland)

7.1.7 Verwendete Plasmide

Tabelle 8: Verwendete Plasmide

Plasmid	exprimiertes Protein
2144_pET19mod_DrrA(340-533)	DrrA ₃₄₀₋₅₃₃
2436_pET19mod_DrrA(340-533)N451A	DrrA ₃₄₀₋₅₃₃ N451A
2437_pET19mod_DrrA(340-533)R453A	DrrA ₃₄₀₋₅₃₃ R453A
2438_pET19mod_DrrA(340-533)N451A/R453A	DrrA ₃₄₀₋₅₃₃ N451A/R453A
2937_pET19mod_DrrA(340-533)S483A	DrrA ₃₄₀₋₅₃₃ S483A
2983_pET19mod_DrrA(340-533)D480A S483A	DrrA ₃₄₀₋₅₃₃ D480A S483A
2929_pET19mod_DrrA N451A/R453A/D480A/S483A	DrrA ₃₄₀₋₅₃₃ N451A/R453A/D480A/S483A
2701_pET19mod_DrrA (340-647)	DrrA ₃₄₀₋₆₄₇
2518_pGEX-4T-1_LidA_noMut	LidA ₁₋₇₂₉
2441_pGEX-6P-1_M-LidA	LidA ₁₈₉₋₆₀₀
2541_pOPINF_LidA_201-583	LidA ₂₀₁₋₅₈₃
2548_pOPINF_LidA_242-539	LidA ₂₄₂₋₅₃₉
2547_pOPINF_LidA_219-383	LidA ₂₁₉₋₃₈₃
2549_pOPINF_LidA_253-539	LidA ₂₅₃₋₅₃₉
2550_pOPINF_LidA_322-493	LidA ₃₃₂₋₄₉₃
2699_pOPINF_LidA_254-426	LidA ₂₅₄₋₄₂₆
2700_pOPINF_LidA_254-404	LidA ₂₅₄₋₄₀₄
2545_pOPINF_LidA_191-327	LidA ₁₉₁₋₃₂₇
2142_pMAL_Rab1b(3-174)	Rab1b ₃₋₁₇₄
937_pET19Rab6aΔN12ΔC33	Rab6a ₋₇₂₉
2443_pET19Rab8a(6-176)	Rab8a ₄₋₁₇₆

7.1.8 Protein und Größenstandards

Tabelle 9: Proteine und Größenstandards

Protein / Größenstandard	Hersteller
PreScission Protease, TEV-Protease	Dortmund Protein Facility (Dortmund, Deutschland)
Gene Ruler 1 kb DNA Ladder, FastDigest Restriktionsenzyme, Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP), T4 DNA Ligase	Fermentas (St. Leon-Rot, Deutschland)
LMW Calibration Kit for SDS Electrophoresis	GE Healthcare (München, Deutschland)
REDTaq DNA-Polymerase	Sigma-Aldrich (München, Deutschland)

7.1.9 Sonstiges

Tabelle 10: Sonstiges

	Hersteller
0,5 ml, 1 ml und 2 ml Reaktionsgefäße	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
NAP-5 Säulen, PD-10 Säulen	GE Healthcare (München, Deutschland)
Zentrifugenfilter Amicon Ultra Ultracel-10K/30K	Millipore Corporation (Billerica, U.S.A.)
Pipettenspitzen 1-10 µl, 20-200 µl 100-1000 µl	Nerbe (Winsen/Luhe, Deutschland)
Elektroporationsküvetten (2 mm)	PeqLab Biotechnology GmbH (Erlangen, Deutschland)
12-14.000 MWCO 4 Spectra/Por Dialyse Membran	Spectrum Laboratories Inc. (Breda, Niederlande)

7.1.10 Puffer und Lösungen

DNA Probenpuffer (5x)

30 % (w/v) Sucrose
20 % Glycerin
0,2 % Orange G

TAE (Tris-Acetat-EDTA)

40 mM Tris
20 mM Essigsäure
1 mM EDTA pH 8

PBS

137 mM NaCl
2,68 mM KCl
10,1 mM Na₂HPO₄
1,76 mM KH₂PO₄
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

CLAP

1 mg/mL Chymostatin
1 mg/mL Leupeptin
1 mg/mL Antipain
1 mg/mL Pepstatin A
in DMSO

Die Puffer wurden mit entionisiertem, destilliertem Wasser angesetzt.

7.1.11 Nährmedien zur Anzucht von Escherichia coli

Luria-Bertani (LB)-Flüssigmedium

10 g/L Bacto-Tryptone
10 g/L NaCl
5 g/L Hefe-Extrakt
pH 7,2

Luria-Bertani(LB)-Festagarplatten

10 g/L Bacto-Trypton
10 g/L NaCl
5 g/L Hefe-Extrakt
16 g/L Bacto-Agar
pH 7,2

GYT

10 % Glycerin
1,25 g/L Hefe-Extrakt
2,5 g/L Bacto-Tryptone

M9 minimal Medium

12,8 g/L Na₂HPO₄
3,0 g/L KH₂PO₄
0,5 g/L NaCl
1,0 g/L NH₄Cl
pH 7,4

Zugabe der filter-sterilisierten Lösung bestehend aus:

2.0 g Glukose
0.4940 g/L MgSO₄•7H₂O
0.0152 g/L CaCl₂•2H₂O
0.0100 g/L Thiamine
0.0100 g/L FeSO₄•7H₂O

in 50 mL ddH₂O auflösen und in das autoklavierte Medium geben.

Die entsprechenden Antibiotika (Tabelle 10) wurden dem jeweiligen Nährmedium zugesetzt

Tabelle 11: Antibiotika

Antibiotikum	Konzentration
Ampicillin	125 mg/L
Carbenicillin	125 mg/L
Chloramphenicol	34 mg/L
Kanamycin	50 mg/L

7.1.12 Oligonukleotide

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

7.2 Molekularbiologische Methoden

7.2.1 Isolation von Plasmid DNA aus *Escherichia coli*

Plasmid-DNA wurde aus transformierten XL1-Blue Zellen isoliert. Die Isolation der DNA erfolgte manuell unter Verwendung des Qiagen Spin Minip-Prep Kits oder mit dem QiaCube Protokoll 728.

7.2.2 Bestimmung von DNA-Konzentrationen

Die Konzentrationsbestimmung der Plasmid-DNA erfolgte durch die Messung der Absorption bei 260 nm mit einem NanoDrop ND-1000 Spektrophotometer.

7.2.3 DNA Restriktionsverdau

Restriktionsenzyme sind Endonukleasen, die doppelstränge DNA an spezifischen, meist palindromischen Sequenzen hydrolytisch spalten. Der Restriktionsverdau von Plasmiden und PCR-generierten DNA-Konstrukten erfolgte mit FastDigest Restriktionsenzymen von Fermentas (St. Leon-Rot, Deutschland). 400 ng Plasmid-DNA bzw. 200 ng PCR-Konstrukt wurden in einem 60 µL Ansatz mit 2 µL des jeweiligen Enzyms versetzt und für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Die geschnittene DNA wurde anschließend mittels Agarose-Gelelektrophorese und anschließender Gelextraktion isoliert.

7.2.4 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese wird zur Größenbestimmung und zur Reinigung von DNA verwendet. Die DNA ist aufgrund des Phosphatrückgrates negativ geladen, wodurch mit zunehmender Größe auch die Ladung zunimmt. Unterschiedlich große DNA-Moleküle können so in Agarosegelen durch Anlegen eines elektrischen Feldes aufgrund des Molekularsiebeffekts nach ihrer Größe getrennt werden.

Es wurden 1 % (w/v) Agarose-Gele zur Trennung der DNA verwendet, denen der DNA-interkalierende Farbstoff RedSafe (iN-tRON Biotechnology, Sangdaewong-Dong, Korea)

zugesetzt wurde, um die DNA durch UV-Licht im Molecular Imager Gel Doc XR System (Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland) sichtbar zu machen. Zur Größenbestimmung wurde der Größenstandard Gene Ruler 1 kb DNA Ladder von Fermentas verwendet (St. Leon-Rot, Deutschland).

7.2.5 DNA Gel-Extraktion

DNA-Fragmente aus den Agarose-Gelen wurde unter Verwendung des QIAquick Gel Extraction Kit extrahiert.

7.2.6 DNA-Ligation

Zwei mit dem gleichen Restriktionsenzym geschnittene DNA-Fragmente können durch das Enzym Ligase unter ATP-Verbrauch kovalent durch Bildung einer Phosphorsäure-esterbindung miteinander verknüpft werden.

Für die Ligation wurde in einem 10 µL Ansatz 25 ng geschnittener Vektor und ein 3-facher molarer Überschuss des komplementär dazu geschnittenen DNA-Fragments zusammen mit 1 U T4 DNALigase (Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland) in dem vom Hersteller empfohlenen Puffer für eine Stunde bei 20 °C oder bei 16°C über Nacht inkubiert. Der Ansatz wurde anschließend bei 65 °C für 15 min zur Deaktivierung der Ligase inkubiert.

7.2.7 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (engl.: polymerase chain reaction, PCR) dient zur Vervielfältigung und zur Mutagenese von DNA-Molekülen. Ein PCR-Zyklus besteht aus drei Schritten, die mehrmals wiederholt werden. Die DNA wird im ersten Schritt durch Erhitzen denaturiert, um Einzelstrang-DNA-Moleküle zu bilden. Im zweiten Schritt wird durch die Verringerung der Temperatur die Hybridisierung der Primer mit komplementären Bereichen auf den DNA-Einzelsträngen ermöglicht. Im dritten Schritt bindet die DNA-Polymerase die Primer auf der DNA und verknüpft kovalent Desoxynukleosidtriphosphaten mit den 3'-Enden der Primer zum Matrizenstrang und vervollständigt so die Einzelstrang-DNA zu einem Doppelstrang.

Die Polymerase-Kettenreaktion wurde zur Vervielfältigung von DNA-Fragmenten für die Klonierung, der Analyse der Ligationsreaktion, zur Mutagenese und für die DNA-Sequenzierung verwendet.

7.2.7.1 Präparative PCR

Für die DNA-Vervielfältigung wurde die REDTaq DNA-Polymerase (Sigma-Aldrich, München, Deutschland) verwendet.

Ein typischer 50 µl Reaktionsansatz beinhaltet 20 ng DNA-Vorlage, jeweils 50 pmol der beiden Primer, je 10 nmol dNTPs (dATP, dCTP, dGTP und dTTP), 10 µl RedTaq Puffer und 2,5 U RedTaq DNA-Polymerase. Die Reaktion erfolgte mit dem folgenden Programm in einem Thermocycler:

96 °C	2 Minuten	
96 °C	30 Sekunden	
45-65 °C	30 Sekunden	30 Zyklen
72 °C	1 Minute pro 1000 Basen	
72 °C	5 Minuten	
4 °C	unendlich	

7.2.7.2 Analytische PCR (Kolonie PCR)

Die Überprüfung der Ligation wurde durch Kolonie-PCR überprüft. Nach der Transformation von Ligationsansätzen wurden einzelne bakterielle Kolonien als DNA-Vorlage mit einem sterilen Zahnstocher in einen 10 µl PCR-Reaktionsansatz überführt. Die Zusammensetzung des Reaktionsansatzes entspricht dem der präparativen PCR. Es wurden Plasmid-spezifische Primer, die die Ligationsenden flankierten, verwendet. Das DNA-Produkt wurde mittels Agarose-Gelelektrophorese überprüft.

7.2.7.3 Zielgerichtete Mutagenese von Plasmid-DNA

Die Polymerase-Kettenreaktion wurde zur Mutagenese von Plasmid-DNA verwendet. Das Primer Design, sowie die Durchführung, erfolgte gemäß des QuikChange II XL Site-Directed Mutagenesis Kit von Stratagene (Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland). Die Plasmid-Vorlage des PCR-Ansatz wurde anschließend durch einen

Material und Methoden

Verdau mit DpnI entfernt. Elektrokompente XL1-Blue Zellen wurden anschließend mit 2 µl des PCR-Ansatzes transformiert.

7.2.7.4 DNA-Sequenzierung

Die Analyse der Plasmid-DNA Sequenz erfolgt durch die von Sanger¹⁷⁵ beschriebene Kettenabbruchmethode. Die Sequenzierungs-PCR wurde mit dem BigDye Terminator v 3.1. Cycle Sequencing Kit Applied Biosystems (Darmstadt, Deutschland) durchgeführt.

Ein 10 µL Reaktionsansatz der Sequenzierung beinhaltete 500 ng bis 1 µg DNA, 4 µL Terminator Ready Reaction Mix und 100 pmol Primer. Die Reaktion erfolgte mit dem folgenden Programm in einem Thermocycler:

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

Überschüssige Oligonukleotide der Sequenzierungsreaktion wurden mithilfe des DyeEx 2.0 Spin Kit Applied Biosystems (Darmstadt, Deutschland) entfernt. Nach der Trocknung der Proben in einem Heizblock bei 99 °C erfolgte die Sequenzbestimmung durch die Sequenzierungseinrichtung des Max-Planck-Institutes für molekulare Physiologie.

7.3 Mikrobiologische Methoden

7.3.1 Kultur und Anzucht von *Escherichia coli*

Für die Vervielfältigung von Plasmid-DNA oder zur Überexpression von rekombinanten Proteinen wurden die XL1-Blue Zellen, bzw. die Expressionsstämme BL21(DE3) und BL21(DE3) Codon Plus RIL auf LB-Festmedium oder in LB-Flüssigmedium angezogen.

7.3.2 Herstellung und Transformation von elektrokompetenten *E. coli* Zellen

Kompetente Bakterien besitzen die Fähigkeit DNA, die frei im umgebenden Medium vorliegt, aufzunehmen. In dieser Arbeit wurde die Elektroschocktransformation verwendet, um Plasmid-DNA in elektrokompetente Bakterien zur Vervielfältigung von Plasmid-DNA und zur Überexpression von Proteinen zu übertragen.

7.3.3 Herstellung von elektrokompetenten *Escherichia coli* Zellen

1L LB-Medium wurde mit einer 1ml Übernachtskultur des jeweiligen *E.coli*-Stamms angeimpft und das entsprechende Antibiotikum wurden hinzugegeben (BL21(DE3) Codon Plus RIL: Chloramphenicol). Die Kultur wurde bei 37°C und 170-180 rpm bis zum Erreichen einer OD_{600nm} von 0.5 inkubiert und anschließend bei 4°C für 15 min bei 5000 rpm zentrifugiert. Die Bakterien wurden daraufhin dreimal gewaschen, um restliche Salze und Mediumrückstände zu entfernen. Im ersten Waschschrift wurden die Zellen mit 1 Liter eiskalten, sterilen, entionisierten Wasser gewaschen. Für den zweiten und dritten Waschschrift wurde sterile 0.5 L 10 % Glycerin verwendet. Die Zentrifugationsschritte erfolgten für 15 Minuten bei 5000 rpm und 4 °C. Das gewaschene Bakterienpellet wurde anschließend mit 45 ml sterilen 10 % Glyzerin aufgenommen in einem 50 ml Reaktionsgefäß resuspendiert und erneut bei 4000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Die Zellen wurden anschließend in GYT Medium resuspendiert und in 50 µl Aliquots ($3 \cdot 10^{11}$ Zellen/mL GYT) in flüssigem Stickstoff gefroren und bei -80 °C gelagert.

7.3.4 Transformation elektrokompetenter *Escherichia coli* Zellen mit Plasmid-DNA

Das Anlegen eines hohen elektrischen Feldes für kurze Zeit führt zur Bildung transienter Membranporen in der Zellmembran von *E. coli*, wodurch Plasmide in das Bakterium gelangen können. Ein 50 µl Aliquot der kompetenten Bakterienzellen wurden 50-200 ng Plasmid-DNA bzw. 2 µl Ligationsansatz hinzugefügt und in eine Elektroporationsküvette überführt. In einem MicroPulser (Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland) wurden die Bakterienzellen durch einen starken Spannungspuls (Program Ec1: 1,8 kV) mit der DNA transformiert. Die transformierten Zellen wurden in 800 µl LB-Flüssigmedium bei 37°C für 45 Minuten und 170-180 rpm inkubiert und 150 µl

Material und Methoden

Bakteriensuspension auf einer LB-Festagarplatte mit dem entsprechenden Antibiotikum ausplattiert und bei 37 °C über Nacht im Wärmeschrank inkubiert.

7.3.5 Proteinexpression in *E.coli*

Für die Überexpression von rekombinanten Proteinen wurden die Expressionsstämme BL21(DE3) und BL21(DE3) Codon Plus RIL verwendet. Zur Expression der Proteine wurden die transformierten Expressionsstämme in, mit dem entsprechendem Antibiotikum versetzten LB-Medium, bis zum Erreichen einer OD_{600nm} von 0.6 bei 37°C und 170 rpm inkubiert. Die Expression erfolgte bei 170 rpm über Nacht bei 20°C durch die Zugabe von 0.2 mM IPTG.

Für die Expression der Selenomethionin-markierten Proteine wurde die Übernachtskultur der transformierten Bakterienzellen zunächst pelletiert und M9 Minimalmedium resuspendiert. Mit dem Bakterienpellet wurde dann 1 L M9 Minimalmedium angeimpft und die Bakterien bei 37°C und 170rpm bis zum Erreichen einer OD_{600nm} von 0.5 angezogen. Zur Inhibition der Methioninbiosynthese wurden pro Liter jeweils 100 mg Lysin, Threonin, Phenylalanin, 50 mg Leucin, Isoleucine, Valin und 60 mg Selenium-L-Methionin hinzugegeben. Die Induktion erfolgte 15 Minuten später mit 0.2 mM IPTG bei 20°C über Nacht.

Die Zellen wurden bei 4000 rpm für 15 min zentrifugiert, mit PBS Puffer gewaschen und ein weiteres Mal bei 4000 rpm für 15 min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Weiterverarbeitung bei -80°C gelagert.

7.3.6 Zellaufschluss

Der Aufschluss der in Lysepuffer resuspendierten Zellen erfolgte mit einem Mikrofluidizer. Die Bakteriensuspension wird dabei bei einem Druck von 800 bar durch eine enge Kapillare geführt. Dabei wird die Zellmembran zerstört, so dass die zytosolische Fraktion von Zellresten, Membranbestandteilen und Zellorganellen durch Zentrifugation für 30 min bei 25000-30000 rpm bei 4°C getrennt werden kann.

7.4 Proteinbiochemische Methoden

7.4.1 Affinitätschromatographie

Die Affinitätschromatographie ermöglicht Proteine, basierend auf spezifischen, reversiblen Interaktionen, zwischen den Proteinen und der Chromatographie-Matrix voneinander zu trennen. Die in dieser Arbeit verwendeten Proteine wurden als Fusionsproteine mit einem Hexahistidin- oder einem GST- (Glutathion-S-Transferase) Affinitätsanker hergestellt.

7.4.1.1 Nickelaffinitätschromatographie

Für die Proteinreinigung durch Nickelaffinitätschromatographie wurden 5 ml HiTrap Chelating HP Säulen verwendet, die mit zweiwertigem Nickel beladen sind. Zwei der sechs Ligandenbindungsstellen des Ni²⁺-Ions sind frei zugänglich und können mit den Histidin-resten des Hexahistidinankers am Protein Chelatkomplexe ausbilden. Nach dem Auftragen des Zellysats wurde die Säule zunächst mit Puffer gewaschen. Unspezifisch gebundene Proteine wurden durch erneutes Waschen mit Puffer und 20 mM Imidazol von der Säule entfernt. Die Elution des Zielproteins erfolgte durch einem Imidazolgradienten mit 20 mM bis 500 mM Imidazol. Imidazol konkurriert dabei mit dem Hexahistidinanker um die Bindungsstellen des Nickels auf der Säule. Die Elution des Proteins wurde durch die Änderung der Absorption bei 280 nm verfolgt. Mittels SDS-PAGE wurden die Fraktionen auf Reinheit und Proteingehalt geprüft, entsprechende Fraktionen vereint und per Dialyse über Nacht bei 4°C von Imidazol befreit. Während der Dialyse wurde gleichzeitig durch Zugabe von TEV-Protease (engl.: Tobacco Etch Virus, TEV) der Hexahistidinanker proteolytisch abgespalten. Eine erneute Nickelaffinitätschromatographie diente zur Abtrennung des geschnittenen Affinitätsankers und der mit einem Decahistidinanker fusionierten TEV-Protease.

7.4.1.2 Glutathionaffinitätschromatographie

Material und Methoden

Bei der Glutathionaffinitätschromatographie wird die Eigenschaft der hohen Affinität der Glutathion-S-Transferase (GST) zu Glutathion (GSH) genutzt. Das zu reinigende Protein wird als GST-Fusionsprotein hergestellt und wird von Glutathion, das mit einem Oxiran-Linker kovalent an Sepharose gekoppelt ist auf der Säule gebunden.

Das Zelllysat wurde mit einer Flussrate von 2 mL/min auf eine zuvor äquilibrierte Säule (1xPBS, pH 7.5) aufgetragen und mit Laufpuffer gewaschen (1xPBS, pH 7.5). Die Elution des Fusionsproteins erfolgte mit GSH-haltigem Puffer (50 mM Tris, pH 7.5, 150 mM NaCl und 10 mM GSH). Mittels SDS-PAGE wurden die gesammelten Fraktionen auf Reinheit und Proteingehalt geprüft, entsprechende Fraktionen wurden vereint.

7.4.2 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Analyse der Reinheit und Zusammensetzung der Proteinproben erfolgte von der nach Laemmli eingeführten Verfahren der Natriumdodecylsulfat (SDS) Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE)¹⁷⁶. Dodecylsulfationen lagern sich an Proteine an, denaturieren diese und verleihen dem Protein, abhängig von dessen Größe, eine negative Ladung. Proteingemische können durch Anlegen eines elektrischen Feldes in einem Polyacrylamidgel entsprechend ihrer Größe getrennt werden. Die Größenbestimmung erfolgt durch einen Molekulargewichtstandards (LMW Calibration Kit for SDS Electro-phoresis, GE Healthcare).

Es wurden 15 %ige SDS-PAGE-Trenngele zur Analyse der Proteine verwendet, die von einem 5%igen Sammelgel überlagert wurden (Tabelle 11) und in einer BioRad Mini-Protean-II System Kassette gegossen wurden.

Tabelle 12: Zusammensetzung eines 15 % SDS Polyacrylamidgels.

	Trenngel	Sammelgel
Sammelgelpuffer	-	0,38 mL
Trenngelpuffer	1,25 mL	-
Acrylamid 4K-Lösung (30 %) 37,5:1 (Acrylamid/Bisacrylamid)	2,5 mL	0,25 mL
ddH ₂ O	1,24 mL	0,88 mL
10 % APS	25 µL	12 µL
TEMED	2,5 µL	1,5 µL

Die Proben wurden vor dem Auftragen bei 95°C für 3 min inkubiert. Bei einer konstanten Spannung von 200 V konnten die Proteine getrennt und in einer Färbelösung gefärbt werden. Der Farbstoff Coomassie-Brilliant-Blau R-250 lagert sich an basische und aromatische Aminosäureseitenketten an und färbt so die Proteine unspezifisch an. Das Gel wurde anschließend wieder entfärbt, wobei die Proteine als blaue Banden im Gel sichtbar werden.

Zur Färbung der Proteine im Gel wurde dieses für 2 min SDS-Gel Färbelösung gekocht. Der nicht-gebundene Farbstoff im Gel wurde durch 10 minütiges Schütteln in Essigsäure (10 %) entfernt.

7.4.3 Proteinkonzentrationsbestimmung

Die Bestimmung von Proteinkonzentrationen erfolgte über die Bradford-Methode¹⁷⁷ oder durch Absorptionsmessung bei 280 nm.

7.4.3.1 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Bei der Bestimmung der Proteinkonzentrationen nach Bradford¹⁷⁷ bindet der Farbstoff Coomassie Brilliantblau G-250 Arginin und Seitenketten von basischen und aromatischen Aminosäuren in saurer Lösung. Dadurch kommt es zu einer Verschiebung des Absorptionsmaximums des Farbstoffes von 465 nm zu 595 nm.

Die Proteinkonzentrationsbestimmung erfolgte mit dem Coomassie Protein Assay Reagent Kit (Pierce, Rockford, IL, USA). 900 µl Coomassie Lösung wurden mit 100-X µl Wasser und X µL Protein gemischt. Nach 10 minütiger Inkubationszeit bei Raumtemperatur wurde die Absorption bei 595 nm im Vergleich mit einer zuvor erstellten BSA-Eichgerade verglichen und die Proteinkonzentration ermittelt.

7.4.3.2 Proteinkonzentrationsbestimmung durch Absorptionsmessung

Die Proteinkonzentration wurde auch durch die Absorptionsmessung eines Proteins bei 280 nm bestimmt. Der Extinktionskoeffizient des jeweiligen Proteins wurde anhand der Aminosäuresequenz mithilfe des Programms Protparam des Internetserver Expasy

(<https://us.expasy.org>) ermittelt und die Messungen wurden in einem Nanodrop DN-1000 UV-Spektrometer (Thermo Scientific) durchgeführt.

7.4.4 Konzentrierung der Proteine

Die Konzentrierung der Proteinlösungen erfolgte mit Ultrafiltrationseinheiten (Millipore Amicon). Die Membran dieser Einheiten enthalten Poren definierter Größe, so dass Moleküle, die größer als die Poren sind, zurückgehalten werden und kleinere Moleküle die Membran passieren. Das Protein verbleibt so oberhalb der Membran und kann durch Zentrifugation (4°C, 3000 rpm) angereichert werden.

7.4.5 Nukleotidaustausch an Rab-Proteinen

Aufgrund der intrinsischen GTP-Hydrolyseaktivität von RabGTPasen, liegen diese nach ihrer Reinigung meist in der GDP-gebundenen Form vor. Der Austausch von GDP zu GTP, GppNHp oder Mant-Nukleotiden kann durch die Zugabe des Chelators EDTA und einem Überschuss des gewünschten Nukleotids erreicht werden. Die Affinität der RabGTPase zum Nukleotid wird durch den Entzug von Magnesium durch EDTA um mehrere Größenordnungen verringert und das ursprünglich gebundene Nukleotid wird so freigesetzt. Durch Zugabe von Magnesium wird das Rab-Protein mit dem Nukleotid, das im Überschuss vorliegt beladen.

EDTA wurde dem Rab-Protein in einem fünffachen Überschuss, bezogen auf die Magnesiumchlorid-Konzentration, hinzugefügt. Das gewünschte Nukleotid wurde in einem 20fachen Überschuss gegenüber der Rab-Proteinkonzentration hinzugefügt und für 2h bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde ein zweifacher Überschuss an Magnesiumchlorid gegenüber der eingesetzten EDTA-Konzentration eingesetzt, um die Nukleotidbindung wieder zu stabilisieren. Das überschüssige Nukleotid und EDTA wurde mit einer NAP-5 Gelfiltrationssäule (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Schweden), nach Herstellerangaben, in einem Puffer mit 10 µM Nukleotid und 1mM Magnesiumchlorid entfernt.

7.4.6 Herstellung des nukleotidfreien Rab1b₃₋₁₇₄:DrrA₃₄₀₋₅₃₃ Komplex

Der nukleotid-freie Rab1b₃₋₁₇₄:DrrA₃₄₀₋₅₃₃ wurde unter Verwendung äquimolarer Mengen DrrA₃₄₀₋₅₃₃ und Rab1b₃₋₁₇₄ in Gegenwart von 10 mM EDTA für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend mittels Gelfiltrationschromatographie (Superdex 76) gereinigt (Puffer: 20 mM Hepes pH 8, 50 mM Natriumchlorid und 2 mM DTE).

7.4.7 Präparative Größenausschlusschromatographie

Die Trennung von Proteinen erfolgt bei der Größenausschlusschromatographie (auch Gelfiltration) aufgrund ihres Stokeschen Radius. Hierbei wird eine poröse Matrix (Sephadex) verwendet, wodurch die Retentionszeit eines Proteins, abhängig von dessen Größe und der Fähigkeit des Proteins in die Poren zu diffundieren, ist. Große Moleküle können nicht in die Poren eindringen und haben demnach einen kürzeren Weg durch die Matrix als kleinere Proteine, die sich in den Poren aufhalten können.

Abhängig von der Größe und der Menge der Proteinprobe wurde die Superdex 75 16/60, die Superdex 75 26/60 oder die Superdex 200 16/60 (GE Healthcare) Gelfiltrationssäule verwendet. Die Gelfiltration wurde als letzter Schritt der Proteinreinigung durchgeführt und ermöglichte gleichzeitig den Pufferwechsel in einen Niedrigsalzpuffer, der für die Kristallisation verwendet wurde. Die gesammelten Fraktionen wurden gelelektrophoretisch untersucht, vereint und konzentriert.

7.5 Biophysikalische Methoden

7.5.1 Messung von schnellen Kinetiken mittels Stopped-flow

In dieser Arbeit wurde das Stopped-flow Gerät von Applied Photophysics Ltd (Surrey, Großbritannien) verwendet, um die Interaktion von Phosphatidylinositol-4-phosphat mit DrrA und die Wechselwirkungen zwischen Rab-Proteinen und LidA zu untersuchen. Bei der Stopped-flow-Methode werden zwei Proteinlösungen sehr schnell miteinander gemischt und die Reaktion zweier Komponenten kann unter Verwendung von Fluoreszenzspektroskopie im Millisekunden- bis Minutenbereich verfolgt werden.

Material und Methoden

Die Anregung der BODIPY TMR Gruppe erfolgte bei 546 nm und die Anregung der mant-Gruppe erfolgte bei 366 nm. Die Emission wurde durch einen 420 nm bzw. 570 nm *cut-off* Filter detektiert. Pro Injektion wurden jeweils 50 μ l der beiden Reaktanden verwendet. Die Messungen wurden in 20 mM Hepes pH 8, 50 mM Natriumchlorid und 2 mM DTT (DrrA-PI4P) oder 20 mM Hepes pH 7.5, 50 mM Natriumchlorid, 1 mM Magnesiumchlorid und 2 mM DTT 1 mM Magnesiumchlorid (LidA:RabX:mGXP) bei 25 °C durchgeführt.

Die Fluoreszenzkurven wurden mit einer Exponentialfunktion erster Ordnung unter Verwendung des von Applied Photophysis mitgelieferten Programmpaketes angepasst.

7.5.2 Isotherme Titrationskalorimetrie (ITC)

Die thermodynamischen Parameter der DrrA-PI4P Interaktion wurden durch die isothermale Titrationskalorimetrie (engl.: isothermal titration calorimetry, ITC) bestimmt.

In einem ITC-Experiment wird die Wärmeänderung der Reaktion zweier Komponenten gemessen. Aus der Wärmeänderung kann die Änderung der Enthalpie bestimmt werden. Wird das Integral der Wärmeänderung gegen das molare Verhältnis beider Komponenten aufgetragen, kann aus dem Kurvenverlauf einer Bindung die Dissoziationskonstante K_D und die Stöchiometrie bestimmt werden. Aus diesen thermodynamischen Parametern lassen sich dann die Änderungen der freien Energie ΔG^0 und der Entropie ΔS^0 bestimmen.

$$\Delta G^0 = \Delta H^0 - T\Delta S^0$$

$$\Delta G^0 = -RT \ln K$$

Die ITC-Experimente wurden mit einem iTC₂₀₀ (Microcal) durchgeführt. Die Messzelle wurde mit 250 μ L Proteinlösung (5 μ M DrrA₃₄₀₋₆₄₇ in 20mM HEPES, pH 8.0, 50mM NaCl, 1mM TCEP) befüllt und die Injektionen von jeweils 2 μ L 50 μ M di-C4-PI4P (20mM HEPES, pH 8.0, 50mM NaCl, 1mM TCEP) erfolgten in einem Intervall von 3 min. Alle Messungen wurden bei 25 °C durchgeführt. In einer Kontrollmessung wurde di-C4-PI4P in den Puffer injiziert und dieses Spektrum von der eigentlichen Messung abgezogen. Die Datenauswertung erfolgte mit dem Programm Origin (Version 7.0, MicroCal)

7.5.3 Circular-Dichroismus-Spektroskopie (CD-Spektroskopie)

Mittels CD-Spektroskopie kann der Anteil der Sekundärstrukturelemente bestimmt werden. Die CD-Spektroskopie wurde verwendet, um die Faltung des Proteins DrrA₃₄₀₋₆₄₇ mit DrrA₃₄₀₋₆₄₇K568A zu vergleichen.

Die Amidbindungen eines Proteins (aber auch aromatische Seitenketten und Disulfidbindungen) sind optisch aktive Verbindungen und in der Proteinsekundärstruktur (α -Helices, β -Faltblätter) regelmäßig angeordnet. Diese Eigenschaft ermöglicht die Untersuchung durch CD-Spektroskopie. Links- und rechts-zirkular polarisiertes Licht wird unterschiedlich stark durch die Wechselwirkung mit optisch aktiven Moleküle absorbiert. Die Überlagerung des linken und des rechten Anteils ist nun nicht mehr linear, sondern elliptisch. Diese Eigenschaft wird als Circular-Dichroismus (CD) bezeichnet. Durch Auftragen der mittleren Elliptizität pro Aminosäure (engl.: *mean residue ellipticity*; $\text{deg}\cdot\text{cm}^2\cdot\text{dmol}^{-1}$) gegen die Wellenlänge können Hinweise auf die Faltung eines Proteins erhalten werden.

Die CD-Spektren wurden in einem Wellenlängenbereich von 250 bis 190 nm bei 20°C aufgenommen. Die Proteine wurden bei einer Konzentration von 5 μM , verdünnt in 5 mM KPi Puffer pH 7,4 in einer 2 mm Quarzküvette gemessen. Die Messungen erfolgten bei einem konstanten Stickstofffluss von 3 L/min mit einer Integrationszeit von 1 s und einer Schrittweite von 1 nm. Das Programm ORIGIN 7.0 diente zur Auswertung der Daten und die Sekundärstruktur wurde durch Algorithmen des Servers Dichroweb überprüft¹⁷⁸.

7.5.4 Massenspektrometrie

Die Überprüfung der Massenbestimmung der verwendeten Proteine erfolgte mit der Methode der Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometrie (ESI-MS). Mit dieser Methode können Proteine unzersetzt in die Gasphase transferiert werden. Die Proteinprobe wird zunächst durch Umkehrphasenchromatographie mittels einer C4 Säule entsalzt und anschließend durch eine Metallkapillare geleitet. Zwischen der Kapillare und dem Massenspektrometer ist ein starkes elektrisches Feld angelegt. Sobald die elektrostatischen Kräfte der angelegten Spannung größer als die Oberflächenspannung der Probe ist, entsteht ein *Taylor-cone* an der Spitze der

Material und Methoden

Kapillaren, aus dem die ionisierten Proteine als Aerosole austreten und sich elektrophoretisch zum Massenspektrometer hinbewegen und dabei desolvatisiert werden. Die Massenanalyse erfolgt in einer Ionenfalle, die eine genaue Bestimmung des Masse-Ladungsverhältnisses ermöglicht.

In dieser Arbeit wurde ein LCQ Advantage Max ESI-MS (Thermo Fisher Scientific Inc.) zusammen mit einem Agilent 1100 HPLC System (Agilent Technologies) verwendet. Die Auswertung erfolgte mit den Programmen Xcalibur 2.0.7 und MagTran1.02.

7.6 Strukturbiologische Methode: Röntgenkristallographie

Die Strukturen der Proteine DrrA₃₄₀₋₅₃₃, DrrA₃₄₀₋₆₄₇ und der Proteinkomplexe DrrA₃₄₀₋₅₃₃:Rab1b₃₋₁₇₄ und LidA₂₀₁₋₅₈₃:Rab8a₆₋₁₇₆ konnten durch die Methode der Röntgenkristallographie bestimmt werden.

Aufgrund der sehr umfangreichen Theorie der Röntgenkristallographie wird auf diese Methode hier nicht näher eingegangen. Es werden lediglich die experimentellen Bedingungen zur Bestimmung der Strukturen beschrieben.

7.6.1 Proteinkristallisation

Die Kristallisation der diversen Proteinproben erfolgte nach der *sitting-drop* Methode in 96-well Platten (Greiner). Der Mosquito und der Art Robbins Phoenix Kristallisationsroboter wurden zum Ansetzen der Kristallisationsversuche verwendet. Initiale Kristallisationsbedingungen konnten in Kristallisationsscreens der Firma Qiagen (JCSG core I–IV, Protein Complex, PACT) identifiziert werden.

Die Optimierung der Kristallisationsbedingungen durch Veränderung des pH-Wertes, der Salzkonzentration und der Präzipitantkonzentration erfolgte in 24-well Platten (Linbro). Nach der *hanging-drop* Methode wurden bei einem Reservoirvolumen von 500 µL Tropfen mit einem Volumen von 1-2 µL angesetzt. Durch Verwendung von Additiven (Spermidin) konnten die Kristalle des Rab8a₆₋₁₇₆:LidA₂₀₁₋₅₈₃ Komplexes zusätzlich optimiert werden. Alle Kristalle wuchsen bei 20°C.

7.6.1.1 DrrA₃₄₀₋₅₃₃

Native DrrA₃₄₀₋₅₃₃ Kristalle (10 mg/ml DrrA₃₄₀₋₅₃₃ in 20 mM HEPES (pH 8.0), 50mM NaCl und 2mM Dithiothreitol) wuchsen in 21% Polyethylenglykol 3350 und 0.25 M Natriumsulfat.

7.6.1.2 DrrA₃₄₀₋₅₃₃:Rab1b₃₋₁₇₄

Native und Selenomethion-haltige Rab1b₃₋₁₇₄:DrrA₃₄₀₋₅₃₃ Kristalle (20 mg/mL Rab1b₃₋₁₇₄:DrrA₃₄₀₋₅₃₃ in 20 mM HEPES (pH 8.0), 50mM NaCl und 2mM Dithiothreitol) wuchsen in 35% Polyethylenglykol 600 und 0.1 M Natriumcitrat (pH 5.75).

7.6.1.3 DrrA₃₄₀₋₆₄₇

Native und Selenomethion-haltige DrrA₃₄₀₋₆₄₇ Kristalle (20 mg/mL DrrA₃₄₀₋₆₄₇ in 20mM HEPES (pH 8.0), 50mM NaCl und 2mM Dithiothreitol) wuchsen in 12% (w/v) Polyethylenglykol 4000, 20% (v/v) Glycerol, 0.16M Ammoniumsulfat und 0.1 M Natriumacetat (pH 4.8).

7.6.1.4 LidA₂₀₁₋₅₈₃:Rab8a₆₋₁₇₆

Native und Selenomethion-haltige (nur LidA₂₀₁₋₅₈₃ enthielt Selenomethionin) LidA₂₀₁₋₅₈₃:Rab8a₆₋₁₇₆ Kristalle (45 mg/ml in 20 mM HEPES pH 8.0, 50 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 10 µM GppNHp, 2 mM Dithioerythritol) wuchsen in 50% (v/v) MPD, 10 mM Spermidin und 0.1 M Natriumcacodylat (pH 5.6).

7.6.2 Datenaufnahme

Sämtliche Kristalle wurden am institutseigenen Röntgengenerator (Rigaku MAR Generator) zunächst auf die Fähigkeit Röntgenstrahlen zu beugen getestet. Geeignete Kristalle wurden an der *Swiss Light Source* (SLS) in Villigen, Schweiz, an den Röntgenquellen X10SA und X06SA vermessen. Die Datenstatistiken der DrrA₃₄₀₋₅₃₃⁻, DrrA₃₄₀₋₅₃₃:Rab1b₃₋₁₇₄⁻, DrrA₃₄₀₋₆₄₇:Rab1b₃₋₁₇₄ und LidA₂₀₁₋₅₈₃:Rab8a₆₋₁₇₆-Kristalle sind in den folgenden Tabellen aufgelistet.

Tabelle 13: Datenstatistiken zur Aufnahme und Verfeinerung des nativen und des Selenomethionin-haltigen Rab1b₃₋₁₇₄:DrrA₃₄₀₋₅₃₃ Kristalls.

	Rab1b ₃₋₁₇₄ :DrrA ₃₄₀₋₅₃₃ (Se-SAD) ^a	Rab1b ₃₋₁₇₄ :DrrA ₃₄₀₋₅₃₃ (nativ)
Datenaufnahme		
Röntgenquelle	SLS X10SA	SLS X10SA
Raumgruppe	P6 ₃ 22	P6 ₃ 22
Zelldimensionen		
a, b, c (Å)	100,52, 100,52, 147,55	100,76, 100,76, 146,36
α, β, γ	90, 90, 120	90, 90, 120
Wellenlänge	0,9862	1,0001
Auflösung (Å) *	30-2,8 (2,9-2,8)	30-1,8 (1,9-1,8)
R _{merge}	4,0 (14,3)	6,3 (40,3)
I/σ(I)	31,8 (12,2)	22,0 (4,7)
Vollständigkeit	99,3 (100)	98,1 (97,1)
Redundanz	22,8 (22,2)	13,5 (9,4)
Verfeinerung		
Auflösung (Å)		30-1,8 (1,85-1,8)
Anzahl der Reflexe		38512 (2732)
R _{work}		20,1 (25,4)
R _{free}		23,4 (28,4)
Anzahl der Atome		
Protein		2850
Ligand/Ion		5
Wasser		246
B-Faktoren		
Protein		22
Ligand/Ion		73
Wasser		29
Rmsd		
Bindungslänge (Å)		0,024
Bindungswinkel (°)		1,829
PDB Code		3JZA

a: Die SAD-Datastatistiken beziehen sich auf die nicht-vereinten Friedel-Paare.

Tabelle 14: Datenstatistiken zur Aufnahme und Verfeinerung des nativen DrrA₃₄₀₋₅₃₃ Kristalls.

DrrA₃₄₀₋₅₃₃ (nativ)	
Datenaufnahme	
Röntgenquelle	SLS X10SA
Raumgruppe	P6 ₂
Zelldimensionen	
a, b, c (Å)	126,34, 126,34, 35,93
α, β, γ	90, 90, 120
Wellenlänge	1,0075
Auflösung (Å) *	30-1,8 (1,9-1,8)
R _{merge}	8,9 (46,0)
I/σ(I)	21,3 (4,0)
Vollständigkeit	99,3 (99,3)
Redundanz	5,9 (5,5)
Verfeinerung	
Auflösung (Å)	30-1,8 (1,85-1,8)
Anzahl der Reflexe	29177 (2125)
R _{work}	16,9 (22,4)
R _{free}	19,8 (26,2)
Anzahl der Atome	
Protein	1561
Ligand/Ion	225
Wasser	
B-Faktoren	
Protein	17
Ligand/Ion	
Wasser	27
Rmsd	
Bindungslänge (Å)	0,034
Bindungswinkel (°)	2,304
PDB Code	3JZ9

Tabelle 15: Datenstatistiken zur Aufnahme und Verfeinerung des nativen und des Selenomethionin-haltigen DrrA₃₄₀₋₆₄₇ Kristalls.

	DrrA ₃₄₀₋₆₄₇ (Se-SAD) ^a	DrrA ₃₄₀₋₆₄₇ (nativ)
Datenaufnahme		
Röntgenquelle	SLS X10SA	SLS X10SA
Raumgruppe	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
Zelldimensionen		
a, b, c (Å)	74,1, 75,3, 131,0	74,9, 75,4, 131,0
α, β, γ	90, 90, 90	90, 90, 90
Wellenlänge		
Auflösung (Å) *	20–2,7 (2,8–2,7)	20–2,5 (2,6–2,5)
R_{merge}		
I/σ(I)	10,6 (4,0)	15,8 (4,2)
Vollständigkeit		
Redundanz	7,3 (7,1)	8,1 (8,2)
Verfeinerung		
Auflösung (Å)		2,5
Anzahl der Reflexe		26,298
R _{work}		18,9
R _{free}		26,2
Anzahl der Atome		
Protein		4,752
Ligand/Ion		40
Wasser		174
B-Faktoren		
Protein		35
Ligand/Ion		42
Wasser		40
Rmsd		
Bindungslänge (Å)		0,019
Bindungswinkel (°)		1,658
PDB Code		
		3N6O

a: Die SAD-Datastatistiken beziehen sich auf die nicht-vereinten Friedel-Paare.

Tabelle 16: Datenstatistiken zur Aufnahme und Verfeinerung des nativen und des Selenomethionin-haltigen LidA₂₀₁₋₅₈₃:Rab8a₆₋₁₇₆ Kristalls.

	LidA ₂₀₁₋₅₈₃ :Rab8a ₆₋₁₇₆ (Se-SAD) ^a	LidA ₂₀₁₋₅₈₃ :Rab8a ₆₋₁₇₆ (nativ)
Datenaufnahme		
Röntgenquelle	SLS X10SA	SLS X10SA
Raumgruppe	P4 ₃ 2 ₁ 2	P4 ₃ 2 ₁ 2
Zelldimensionen		
a, b, c (Å)	103,33, 103,33, 150,33	103,33, 103,33, 150,33
α, β, γ	90, 90, 90	90, 90, 90
Wellenlänge	0,9786	0,9786
Auflösung (Å) *	30-3,2	30-2,5
R _{merge}	2,9 (10,7)	5,2 (39,7)
I/σ(I)	44,36 (14,63)	26,34 (4,59)
Vollständigkeit	100 (100)	99,8 (99,5)
Redundanz	72,1 (76)	10,7 (11,2)
Verfeinerung		
Auflösung (Å)		2,5
Anzahl der Reflexe		312773 (29145)
R _{work}		21,6
R _{free}		27,5
Anzahl der Atome		
Protein		4458
Ligand/Ion		81
Wasser		48
B-Faktoren		
Protein		72
Ligand/Ion		60
Wasser		53,7
Rmsd		
Bindungslänge (Å)		0,009
Bindungswinkel (°)		1,114
PDB Code		3TNF

a: Die SAD-Datenstatistiken beziehen sich auf die nicht-vereinigen Friedel-Paare.

Material und Methoden

$R_{\text{merge}} = \Sigma(|I - \langle I \rangle|) / \Sigma(I)$, mit I und $\langle I \rangle$ als die beobachteten und die mittleren Intensitäten aller Beobachtungen eines Reflexes, inklusive der Symmetrie-verwandten Äquivalente.

$R = \Sigma_{hkl} ||F_{\text{obs}}| - |F_{\text{calc}}|| / \Sigma |F_{\text{obs}}|$, mit F_{obs} und F_{calc} als die beobachteten und die berechneten Strukturfaktoren des hkl Reflexes.

R_{free} wurde von einer zufällig ausgewählten Teilmenge der Reflexe (5%), welche während der Verfeinerung ausgelassen wurden, berechnet.

7.6.2 Datenprozessierung, Modellbau und Verfeinerung

Die Datenprozessierung erfolgte mit dem Programmpaket XDS¹⁷⁹. Eine interne Skalierung der Daten wurde mit dem Programm XSCALE durchgeführt.

Die Analyse des Datensatzes des Selenomethion-haltigen Rab1b₃₋₁₇₄:DrrA₃₄₀₋₅₃₃ Kristalls erfolgte mit dem Programm autoSHARP (Global Phasing Limited)¹⁸⁰. Die Bestimmung der Positionen der Selen-Atome, die Phasierung und der initiale Modellbau in den Datensätzen der Selenomethion-haltigen DrrA₃₄₀₋₆₄₇ und LidA₂₀₁₋₅₈₃:Rab8a₆₋₁₇₆ Kristalle wurden mit dem Programm PHENIX¹⁸¹ durchgeführt. Die Struktur von DrrA₃₄₀₋₅₃₃ konnte durch die Methode des molekularen Ersatzes mit dem Programm Phaser¹⁸² bestimmt werden, indem DrrA₃₄₀₋₅₃₃ aus dem Komplex mit Rab1b₃₋₁₇₄ als Suchmodell verwendet wurde. Die berechneten Modellstrukturen wurden in einem iterativen Prozess unter Verwendung der Programme Refmac5¹⁸³ oder phenix.refine¹⁸¹ und durch die manuelle Anpassung des Modells in die Elektronendichte mit dem Programm COOT¹⁸⁴ verfeinert. Sämtliche grafischen Abbildungen wurden mit dem Programm PyMOL 1.4.1 (DeLano Scientific) erstellt. Die Darstellung des elektrostatischen Oberflächenpotentials wurde mit dem in Pymol integrierten Programm APBS¹⁸⁵ berechnet.

8. Literaturverzeichnis

- 1 IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature. Tentative rules. A one-letter notation for amino acid sequences. *Biochimica et biophysica acta* **168**, 6-10 (1968).
- 2 Ingmundson, A., Delprato, A., Lambright, D. G. & Roy, C. R. Legionella pneumophila proteins that regulate Rab1 membrane cycling. *Nature* **450**, 365-U361 (2007).
- 3 Machner, M. P. & Isberg, R. R. A bifunctional bacterial protein links GDI displacement to Rab1 activation. *Science* **318**, 974-977 (2007).
- 4 Schoebel, S., Oesterlin, L. K., Blankenfeldt, W., Goody, R. S. & Itzen, A. RabGDI displacement by DrrA from Legionella is a consequence of its guanine nucleotide exchange activity. *Mol Cell* **36**, 1060-1072 (2009).
- 5 Wu, Y. W. *et al.* Membrane targeting mechanism of Rab GTPases elucidated by semisynthetic protein probes. *Nat Chem Biol* **6**, 534-540 (2010).
- 6 Machner, M. P. & Isberg, R. R. Targeting of host Rab GTPase function by the intravacuolar pathogen Legionella pneumophila. *Dev Cell* **11**, 47-56 (2006).
- 7 Isberg, R. R., O'Connor, T. J. & Heidtman, M. The Legionella pneumophila replication vacuole: making a cosy niche inside host cells. *Nature Reviews Microbiology* **7**, 12-24 (2009).
- 8 Stenmark, H. Rab GTPases as coordinators of vesicle traffic. *Nat Rev Mol Cell Bio* **10**, 513-525 (2009).
- 9 Stenmark, H. & Olkkonen, V. M. The Rab GTPase family. *Genome Biol* **2**, REVIEWS (2001).
- 10 Casey, P. J. & Seabra, M. C. Protein prenyltransferases. *Journal of Biological Chemistry* **271**, 5289-5292 (1996).
- 11 Alexandrov, K., Horiuchi, H., Steelemortimer, O., Seabra, M. C. & Zerial, M. Rab Escort Protein-1 Is a Multifunctional Protein That Accompanies Newly Prenylated Rab Proteins to Their Target Membranes. *Embo Journal* **13**, 5262-5273 (1994).
- 12 Shen, F. & Seabra, M. C. Mechanism of digeranylgeranylation of rab proteins - Formation of a complex between monogeranylgeranyl-rab and rab escort protein. *Journal of Biological Chemistry* **271**, 3692-3698 (1996).
- 13 Chavrier, P. *et al.* Hypervariable C-terminal domain of rab proteins acts as a targeting signal. *Nature* **353**, 769-772 (1991).

Literaturverzeichnis

- 14 Ali, B. R., Wasmeier, C., Lamoreux, L., Strom, M. & Seabra, M. C. Multiple regions contribute to membrane targeting of Rab GTPases. *J Cell Sci* **117**, 6401-6412 (2004).
- 15 Soldati, T., Shapiro, A. D., Svejstrup, A. B. & Pfeffer, S. R. Membrane targeting of the small GTPase Rab9 is accompanied by nucleotide exchange. *Nature* **369**, 76-78 (1994).
- 16 Ullrich, O., Horiuchi, H., Bucci, C. & Zerial, M. Membrane association of Rab5 mediated by *GDP-dissociation inhibitor* and accompanied by GDP/GTP exchange. *Nature* **368**, 157-160 (1994).
- 17 Sivars, U., Aivazian, D. & Pfeffer, S. R. Yip3 catalyses the dissociation of endosomal Rab-GDI complexes. *Nature* **425**, 856-859 (2003).
- 18 Barr, F. & Lambright, D. G. Rab GEFs and GAPs. *Curr Opin Cell Biol* **22**, 461-470 (2010).
- 19 Itzen, A. & Goody, R. S. GTPases involved in vesicular trafficking: Structures and mechanisms. *Semin Cell Dev Biol* **22**, 48-56 (2011).
- 20 Marat, A. L., Dokainish, H. & McPherson, P. S. DENN domain proteins: regulators of Rab GTPases. *The Journal of biological chemistry* **286**, 13791-13800 (2011).
- 21 Tarafder, A. K. *et al.* Rab27a targeting to melanosomes requires nucleotide exchange but not effector binding. *Traffic* **12**, 1056-1066 (2011).
- 22 Tong, L. A., de Vos, A. M., Milburn, M. V. & Kim, S. H. Crystal structures at 2.2 Å resolution of the catalytic domains of normal ras protein and an oncogenic mutant complexed with GDP. *J Mol Biol* **217**, 503-516 (1991).
- 23 Pai, E. F. *et al.* Refined crystal structure of the triphosphate conformation of H-ras p21 at 1.35 Å resolution: implications for the mechanism of GTP hydrolysis. *The EMBO journal* **9**, 2351-2359 (1990).
- 24 Rensland, H. *et al.* Substrate and product structural requirements for binding of nucleotides to H-ras p21: the mechanism of discrimination between guanosine and adenosine nucleotides. *Biochemistry* **34**, 593-599 (1995).
- 25 Pereira-Leal, J. B. & Seabra, M. C. The mammalian Rab family of small GTPases: definition of family and subfamily sequence motifs suggests a mechanism for functional specificity in the Ras superfamily. *J Mol Biol* **301**, 1077-1087 (2000).
- 26 Pereira-Leal, J. B. & Seabra, M. C. Evolution of the Rab family of small GTP-binding proteins. *J Mol Biol* **313**, 889-901 (2001).

- 27 Merithew, E. *et al.* Structural plasticity of an invariant hydrophobic triad in the switch regions of Rab GTPases is a determinant of effector recognition. *Journal of Biological Chemistry* **276**, 13982-13988 (2001).
- 28 Zhu, Z. Y., Delprato, A., Merithew, E. & Lambright, D. G. Determinants of the broad recognition of exocytic Rab GTPases by Mss4. *Biochemistry* **40**, 15699-15706 (2001).
- 29 Grosshans, B. L. *et al.* The yeast Igl family member Sro7p is an effector of the secretory Rab GTPase Sec4p. *Journal of Cell Biology* **172**, 55-66 (2006).
- 30 Hou, X. M. *et al.* A structural basis for Lowe syndrome caused by mutations in the Rab-binding domain of OCRL1. *Embo Journal* **30**, 1659-1670 (2011).
- 31 Pan, X. J., Eathiraj, S., Munson, M. & Lambright, D. G. TBC-domain GAPs for Rab GTPases accelerate GTP hydrolysis by a dual-finger mechanism. *Nature* **442**, 303-306 (2006).
- 32 Fukuda, M. TBC proteins: GAPs for mammalian small GTPase Rab? *Biosci Rep* **31**, 159-168 (2011).
- 33 Barr, F. A., Yoshimura, S., Gerondopoulos, A., Linford, A. & Rigden, D. J. Family-wide characterization of the DENN domain Rab GDP-GTP exchange factors. *Journal of Cell Biology* **191**, 367-381 (2010).
- 34 Mizuno-Yamasaki, E., Medkova, M., Coleman, J. & Novick, P. Phosphatidylinositol 4-phosphate controls both membrane recruitment and a regulatory switch of the Rab GEF Sec2p. *Dev Cell* **18**, 828-840 (2010).
- 35 Simon, I., Zerial, M. & Goody, R. S. Kinetics of interaction of Rab5 and Rab7 with nucleotides and magnesium ions. *The Journal of biological chemistry* **271**, 20470-20478 (1996).
- 36 Klebe, C., Prinz, H., Wittinghofer, A. & Goody, R. S. The kinetic mechanism of Ran-nucleotide exchange catalyzed by RCC1. *Biochemistry* **34**, 12543-12552 (1995).
- 37 Goody, R. S. & Hofmann-Goody, W. Exchange factors, effectors, GAPs and motor proteins: common thermodynamic and kinetic principles for different functions. *Eur Biophys J* **31**, 268-274 (2002).
- 38 Guo, Z., Ahmadian, M. R. & Goody, R. S. Guanine nucleotide exchange factors operate by a simple allosteric competitive mechanism. *Biochemistry* **44**, 15423-15429 (2005).
- 39 Vandyke, K. *et al.* Analysis of Nucleotides and Catecholamines in Bovine Medullary Granules by Anion-Exchange High-Pressure Liquid-Chromatography

- and Fluorescence - Evidence That Most of Catecholamines in Chromaffin Granules Are Stored without Associated Atp. *Pharmacology* **15**, 377-391 (1977).
- 40 Trahey, M. & McCormick, F. A Cytoplasmic Protein Stimulates Normal N-Ras P21 Gtpase, but Does Not Affect Oncogenic Mutants. *Science* **238**, 542-545 (1987).
- 41 Renault, L., Guibert, B. & Cherfils, J. Structural snapshots of the mechanism and inhibition of a *guanine nucleotide exchange factor*. *Nature* **426**, 525-530 (2003).
- 42 Murata, T. *et al.* The Legionella pneumophila effector protein DrrA is a Rab1 guanine nucleotide-exchange factor. *Nat Cell Biol* **8**, 971-977
- 43 Fukuda, M., Kanno, E., Ishibashi, K. & Itoh, T. Large scale screening for novel rab effectors reveals unexpected broad Rab binding specificity. *Mol Cell Proteomics* **7**, 1031-1042 (2008).
- 44 Kutateladze, T. G. *et al.* Phosphatidylinositol 3-phosphate recognition by the FYVE domain. *Molecular Cell* **3**, 805-811 (1999).
- 45 Stahelin, R. V. *et al.* Molecular Basis of Phosphatidylinositol 4-Phosphate and ARF1 GTPase Recognition by the FAPP1 Pleckstrin Homology (PH) Domain. *Journal of Biological Chemistry* **286**, 18650-18657 (2011).
- 46 Novick, P., Grosshans, B. L. & Ortiz, D. Rabs and their effectors: Achieving specificity in membrane traffic. *P Natl Acad Sci USA* **103**, 11821-11827 (2006).
- 47 Ostermeier, C. & Brunger, A. T. Structural basis of Rab effector specificity: Crystal structure of the small G protein Rab3A complexed with the effector domain of Rabphilin-3A. *Cell* **96**, 363-374 (1999).
- 48 Zhu, G. *et al.* Structural basis of Rab5-Rabaptin5 interaction in endocytosis. *Nat Struct Mol Biol* **11**, 975-983 (2004).
- 49 Eathiraj, S., Pan, X., Ritacco, C. & Lambright, D. G. Structural basis of family-wide Rab GTPase recognition by rabenosyn-5. *Nature* **436**, 415-419 (2005).
- 50 Wu, M., Wang, T., Loh, E., Hong, W. & Song, H. Structural basis for recruitment of RILP by small GTPase Rab7. *The EMBO journal* **24**, 1491-1501 (2005)
- 51 Jagoe, W. N. *et al.* Crystal structure of rab11 in complex with rab11 family interacting protein 2. *Structure* **14**, 1273-1283 (2006).
- 52 Kukimoto-Niino, M. *et al.* Structural basis for the exclusive specificity of Slac2-a/melanophilin for the Rab27 GTPases. *Structure* **16**, 1478-1490 (2008).
- 53 Chavas, L. M. *et al.* Elucidation of Rab27 recruitment by its effectors: structure of Rab27a bound to Exophilin4/Slp2-a. *Structure* **16**, 1468-1477 (2008).

- 54 Mishra, A., Eathiraj, S., Corvera, S. & Lambright, D. G. Structural basis for Rab GTPase recognition and endosome tethering by the C2H2 zinc finger of Early Endosomal Autoantigen 1 (EEA1). *P Natl Acad Sci USA* **107**, 10866-10871 (2010).
- 55 Burguete, A. S., Fenn, T. D., Brunger, A. T. & Pfeffer, S. R. Rab and arl GTPase family members cooperate in the localization of the golgin GCC185. *Cell* **132**, 286-298 (2008).
- 56 Eathiraj, S., Mishra, A., Prekeris, R. & Lambright, D. G. Structural basis for Rab11-mediated recruitment of FIP3 to recycling endosomes. *J Mol Biol* **364**, 121-135 (2006).
- 57 Eathiraj, S., Pan, X. J., Ritacco, C. & Lambright, D. G. Structural basis of family-wide Rab GTPase recognition by rabenosyn-5. *Nature* **436**, 415-419 (2005).
- 58 Vitale, G. *et al.* Distinct Rab-binding domains mediate the interaction of rabaptin-5 with GTP-bound rab4 and rab5. *Embo Journal* **17**, 1941-1951 (1998).
- 59 Merithew, E., Stone, C., Eathiraj, S. & Lambright, D. G. Determinants of Rab5 interaction with the n terminus of early endosome antigen 1. *Journal of Biological Chemistry* **278**, 8494-8500 (2003).
- 60 De Renzis, S., Sonnichsen, B. & Zerial, M. Divalent Rab effectors regulate the sub-compartmental organization and sorting of early endosomes. *Nature Cell Biology* **4**, 124-133 (2002).
- 61 Fielding, A. B. *et al.* Rab11-FIP3 and FIP4 interact with Arf6 and the Exocyst to control membrane traffic in cytokinesis. *Embo Journal* **24**, 3389-3399 (2005).
- 62 Miserey-Lenkei, S. *et al.* Rab6-interacting protein 1 links Rab6 and Rab11 function. *Traffic* **8**, 1385-1403 (2007).
- 63 Segev, N. Ypt and Rab GTPases: insight into functions through novel interactions. *Curr Opin Cell Biol* **13**, 500-511 (2001).
- 64 Haas, A. K. *et al.* Analysis of GTPase-activating proteins: Rab1 and Rab43 are key Rabs required to maintain a functional Golgi complex in human cells. *J Cell Sci* **120**, 2997-3010 (2007).
- 65 Tisdale, E. J., Bourne, J. R., Khosravi-Far, R., Der, C. J. & Balch, W. E. GTP-binding mutants of rab1 and rab2 are potent inhibitors of vesicular transport from the endoplasmic reticulum to the Golgi complex. *J Cell Biol* **119**, 749-761 (1992).
- 66 Plutner, H. *et al.* Rab1b regulates vesicular transport between the endoplasmic reticulum and successive Golgi compartments. *J Cell Biol* **115**, 31-43 (1991).

Literaturverzeichnis

- 67 Allan, B. B., Moyer, B. D. & Balch, W. E. Rab1 recruitment of p115 into a cis-SNARE complex: Programming budding COPII vesicles for fusion. *Science* **289**, 444-448 (2000).
- 68 Yu, I. M. & Hughson, F. M. Tethering Factors as Organizers of Intracellular Vesicular Traffic. *Annu Rev Cell Dev Bi* **26**, 137-156 (2010).
- 69 Sztul, E. & Lupashin, V. Role of vesicle tethering factors in the ER-Golgi membrane traffic. *Febs Letters* **583**, 3770-3783 (2009).
- 70 Moyer, B. D., Allan, B. B. & Balch, W. E. Rab1 interaction with a GM130 effector complex regulates COPII vesicle cis-Golgi tethering. *Traffic* **2**, 268-276 (2001).
- 71 Cao, X., Ballew, N. & Barlowe, C. Initial docking of ER-derived vesicles requires Uso1p and Ypt1p but is independent of SNARE proteins. *The EMBO journal* **17**, 2156-2165 (1998).
- 72 Moyer, B. D., Allan, B. B. & Balch, W. E. Rab1 interaction with a GM130 effector complex regulates COPII vesicle cis-Golgi tethering. *Traffic* **2**, 268-276 (2001).
- 73 Marra, P. *et al.* The GM130 and GRASP65 Golgi proteins cycle through and define a subdomain of the intermediate compartment. *Nature cell biology* **3**, 1101-1113 (2001).
- 74 Beard, M., Satoh, A., Shorter, J. & Warren, G. A cryptic Rab1-binding site in the p115 tethering protein. *The Journal of biological chemistry* **280**, 25840-25848 (2005).
- 75 Sonnichsen, B. *et al.* A role for giantin in docking COPI vesicles to Golgi membranes. *J Cell Biol* **140**, 1013-1021 (1998).
- 76 Sapperstein, S. K., Lupashin, V. V., Schmitt, H. D. & Waters, M. G. Assembly of the ER to Golgi SNARE complex requires Uso1p. *J Cell Biol* **132**, 755-767 (1996).
- 77 Shorter, J., Beard, M. B., Seemann, J., Dirac-Svejstrup, A. B. & Warren, G. Sequential tethering of Golgins and catalysis of SNAREpin assembly by the vesicle-tethering protein p115. *J Cell Biol* **157** (2002).
- 78 Derre, I. & Isberg, R. R. Legionella pneumophila replication vacuole formation involves rapid recruitment of proteins of the early secretory system. *Infection and Immunity* **72**, 3048-3053 (2004).
- 79 De Matteis, M. A. & Godi, A. PI-loting membrane traffic. *Nature Cell Biology* **6**, 487-492 (2004).
- 80 Behnia, R. & Munro, S. Organelle identity and the signposts for membrane traffic. *Nature* **438**, 597-604 (2005).

- 81 Godi, A. *et al.* ARF mediates recruitment of PtdIns-4-OH kinase-beta and stimulates synthesis of PtdIns(4,5)P-2 on the Golgi complex. *Nature Cell Biology* **1**, 280-287 (1999).
- 82 Christoforidis, S. *et al.* Phosphatidylinositol-3-OH kinases are Rab5 effectors. *Nature Cell Biology* **1**, 249-252 (1999).
- 83 Simonsen, A. *et al.* EEA1 links PI(3)K function to Rab5 regulation of endosome fusion. *Nature* **394**, 494-498 (1998).
- 84 Pizarro-Cerda, J. & Cossart, P. Subversion of phosphoinositide metabolism by intracellular bacterial pathogens. *Nature Cell Biology* **6**, 1026-1033 (2004).
- 85 Weber, S. S., Ragaz, C., Reus, K. & Hilbi, H. A role for phosphoinositide metabolism in phagocytosis and intracellular replication of *Legionella pneumophila*. *Legionella: State of the Art 30 Years after Its Recognition*, 292-296 (2006).
- 86 Weber, S. S., Ragaz, C. & Hilbi, H. Pathogen trafficking pathways and host phosphoinositide metabolism. *Mol Microbiol* **71**, 1341-1352 (2009).
- 87 Vergne, I. *et al.* Mechanism of phagolysosome biogenesis block by viable *Mycobacterium tuberculosis*. *P Natl Acad Sci USA* **102**, 4033-4038 (2005).
- 88 Hernandez, L. D., Hueffer, K., Wenk, M. R. & Galan, J. E. Salmonella modulates vesicular traffic by altering phosphoinositide metabolism. *Science* **304**, 1805-1807 (2004).
- 89 Brombacher, E. *et al.* Rab1 *guanine nucleotide exchange factor* SidM is a major phosphatidylinositol 4-phosphate-binding effector protein of *Legionella pneumophila*. *J Biol Chem* **284**, 4846-4856 (2009).
- 90 Hilbi, H., Weber, S. S., Ragaz, C., Reus, K. & Nyfeler, Y. *Legionella pneumophila* exploits PI(4)P to anchor secreted effector proteins to the replicative vacuole. *Plos Pathogens* **2**, 418-430 (2006).
- 91 Lemmon, M. A. Phosphoinositide recognition domains. *Traffic* **4**, 201-213 (2003).
- 92 Lemmon, M. A. Membrane recognition by phospholipid-binding domains. *Nat Rev Mol Cell Bio* **9**, 99-111 (2008).
- 93 Stahelin, R. V. Lipid binding domains: more than simple lipid effectors. *J Lipid Res* **50**, S299-S304 (2009).
- 94 Dumas, J. J. *et al.* Multivalent endosome targeting by homodimeric EEA1. *Molecular cell* **8**, 947-958 (2001).

Literaturverzeichnis

- 95 Misra, S. & Hurley, J. H. Crystal structure of a phosphatidylinositol 3-phosphate-specific membrane-targeting motif, the FYVE domain of Vps27p. *Cell* **97**, 657-666 (1999).
- 96 Kutateladze, T. & Overduin, M. Structural mechanism of endosome docking by the FYVE domain. *Science* **291**, 1793-1796 (2001).
- 97 Fraser, D. W. *et al.* Legionnaires Disease - Description of an Epidemic of Pneumonia. *New Engl J Med* **297**, 1189-1197 (1977).
- 98 Brenner, D. J., Steigerwalt, A. G. & McDade, J. E. Classification of the Legionnaires' disease bacterium: *Legionella pneumophila*, genus novum, species nova, of the family Legionellaceae, familia nova. *Ann Intern Med* **90**, 656-658 (1979).
- 99 Whiley, H. & Bentham, R. *Legionella longbeachae* and Legionellosis. *Emerg Infect Dis* **17**, 579-583 (2011).
- 100 Skaliy, P. & Mceachern, H. V. Survival of the Legionnaires Disease Bacterium in Water. *Ann Intern Med* **90**, 662-663 (1979).
- 101 Newton, H. J., Ang, D. K. Y., van Driel, I. R. & Hartland, E. L. Molecular Pathogenesis of Infections Caused by *Legionella pneumophila*. *Clin Microbiol Rev* **23**, 274-298, (2010).
- 102 Horwitz, M. A. The Legionnaires-Disease Bacterium (*Legionella-Pneumophila*) Inhibits Phagosome-Lysosome Fusion in Human-Monocytes. *Journal of Experimental Medicine* **158**, 2108-2126 (1983).
- 103 Horwitz, M. A. & Maxfield, F. R. *Legionella-Pneumophila* Inhibits Acidification of Its Phagosome in Human-Monocytes. *Journal of Cell Biology* **99**, 1936-1943 (1984).
- 104 Tilney, L. G., Harb, O. S., Connelly, P. S., Robinson, C. G. & Roy, C. R. How the parasitic bacterium *Legionella pneumophila* modifies its phagosome and transforms it into rough ER: implications for conversion of plasma membrane to the ER membrane. *J Cell Sci* **114**, 4637-4650 (2001).
- 105 Horwitz, M. A. Formation of a Novel Phagosome by the Legionnaires-Disease Bacterium (*Legionella-Pneumophila*) in Human-Monocytes. *Journal of Experimental Medicine* **158**, 1319-1331 (1983).
- 106 Abu Kwaik, Y. The phagosome containing *Legionella pneumophila* within the protozoan *Hartmannella vermiformis* is surrounded by the rough endoplasmic reticulum. *Appl Environ Microb* **62**, 2022-2028 (1996).

- 107 Swanson, M. S. & Isberg, R. R. Association of Legionella-Pneumophila with the Macrophage Endoplasmic-Reticulum. *Infection and Immunity* **63**, 3609-3620 (1995).
- 108 Tilney, L. G., Connelly, P. S. & Harb, O. S. How the parasitic bacterium Legionella modifies the phagosome and transforms it into rough ER. *Mol Biol Cell* **11**, 416a-417a (2000).
- 109 Hubber, A. & Roy, C. R. Modulation of Host Cell Function by Legionella pneumophila Type IV Effectors. *Annu Rev Cell Dev Bi* **26**, 261-283 (2010).
- 110 Ensminger, A. W. & Isberg, R. R. Legionella pneumophila Dot/Icm translocated substrates: a sum of parts. *Curr Opin Microbiol* **12**, 67-73 (2009).
- 111 Isberg, R. R., O'Connor, T. J. & Heidtman, M. The Legionella pneumophila replication vacuole: making a cosy niche inside host cells. *Nat Rev Microbiol* **7**, 13-24 (2009).
- 112 Urwyler, S., Brombacher, E. & Hilbi, H. Endosomal and secretory markers of the Legionella-containing vacuole. *Commun Integr Biol* **2**, 107-109 (2009).
- 113 Muller, M. P. *et al.* The Legionella effector protein DrrA AMPylates the membrane traffic regulator Rab1b. *Science* **329**, (2010).
- 114 Hilbi, H. *et al.* Rab1 *Guanine nucleotide exchange factor* SidM Is a Major Phosphatidylinositol 4-Phosphate-binding Effector Protein of Legionella pneumophila. *Journal of Biological Chemistry* **284**, 4846-4856 (2009).
- 115 Neunuebel, M. R. *et al.* De-AMPylation of the small GTPase Rab1 by the pathogen Legionella pneumophila. *Science* **333** (2011).
- 116 Conover, G. M., Derre, I., Vogel, J. P. & Isberg, R. R. The Legionella pneumophila LidA protein: a translocated substrate of the Dot/Icm system associated with maintenance of bacterial integrity. *Molecular microbiology* **48**, 305-321 (2003).
- 117 Heidtman, M., Chen, E. J., Moy, M. Y. & Isberg, R. R. Large-scale identification of Legionella pneumophila Dot/Icm substrates that modulate host cell vesicle trafficking pathways. *Cellular Microbiology* **11**, 230-248 (2009).
- 118 Derre, I. & Isberg, R. R. LidA, a translocated substrate of the Legionella pneumophila type IV secretion system, interferes with the early secretory pathway. *Infection and Immunity* **73**, 4370-4380 (2005).
- 119 Kagan, J. C. & Roy, C. R. Legionella phagosomes intercept vesicular traffic from endoplasmic reticulum exit sites. *Nature Cell Biology* **4**, 945-954 (2002).

Literaturverzeichnis

- 120 Merithew, E. *et al.* Structural plasticity of an invariant hydrophobic triad in the switch regions of Rab GTPases is a determinant of effector recognition. *The Journal of biological chemistry* **276**, 13982-13988 (2001).
- 121 Tan, Y. & Luo, Z. Q. Legionella pneumophila SidD is a deAMPylase that modifies Rab1. *Nature* **475**, 506-509 (2011).
- 122 Brombacher, E. *et al.* Rab1 guanine nucleotide exchange factor SidM is a major phosphatidylinositol 4-phosphate-binding effector protein of Legionella pneumophila. *The Journal of biological chemistry* **284**, 4846-4856 (2009).
- 123 Schoebel, S., Blankenfeldt, W., Goody, R. S. & Itzen, A. High-affinity binding of phosphatidylinositol 4-phosphate by Legionella pneumophila DrrA. *EMBO reports* **11**, 598-604 (2010).
- 124 Schoebel, S., Cichy, A. L., Goody, R. S. & Itzen, A. Protein LidA from Legionella is a Rab GTPase supereffector. *P Natl Acad Sci USA*, 108(44), 17945-50 (2011).
- 125 Holm, L. & Rosenstrom, P. Dali server: conservation mapping in 3D. *Nucleic Acids Res* **38**, W545-549 (2010).
- 126 Buchwald, G. *et al.* Structural basis for the reversible activation of a Rho protein by the bacterial toxin SopE. *Embo Journal* **21**, 3286-3295 (2002).
- 127 Dong, G., Medkova, M., Novick, P. & Reinisch, K. M. A catalytic coiled coil: Structural insights into the activation of the Rab GTPase Sec4p by Sec2p. *Molecular Cell* **25**, 455-462 (2007).
- 128 Cai, Y. *et al.* The structural basis for activation of the Rab Ypt1p by the TRAPP membrane-tethering complexes. *Cell* **133**, 1202-1213 (2008).
- 129 Delprato, A. & Lambright, D. G. Structural basis for Rab GTPase activation by VPS9 domain exchange factors. *Nat Struct Mol Biol* **14**, 406-412 (2007).
- 130 Itzen, A., Pylypenko, O., Goody, R. S., Alexandrov, K. & Rak, A. Nucleotide exchange via local protein unfolding--structure of Rab8 in complex with MSS4. *The EMBO journal* **25**, 1445-1455 (2006).
- 131 Chin, H. F. *et al.* Kinetic Analysis of the Guanine Nucleotide Exchange Activity of TRAPP, a Multimeric Ypt1p Exchange Factor. *J Mol Biol* **389**, 275-288 (2009).
- 132 Hall, A. & Self, A. J. The effect of Mg²⁺ on the guanine nucleotide exchange rate of p21N-ras. *The Journal of biological chemistry* **261**, 10963-10965 (1986).
- 133 Goody, R. S. *et al.* Studies on the structure and mechanism of H-ras p21. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **336**, 3-10; discussion 10-11 (1992).

- 134 Bravo, J. *et al.* The crystal structure of the PX domain from p40(phox) bound to phosphatidylinositol 3-phosphate. *Molecular cell* **8**, 829-839 (2001).
- 135 Schoebel, S., Blankenfeldt, W., Goody, R. S. & Itzen, A. High-affinity binding of phosphatidylinositol 4-phosphate by Legionella pneumophila DrrA. *EMBO Rep* **11**, 598-604 (2009).
- 136 Nagai, H., Kagan, J. C., Zhu, X., Kahn, R. A. & Roy, C. R. A bacterial *guanine nucleotide exchange factor* activates ARF on Legionella phagosomes. *Science* **295**, 679-682 (2002).
- 137 Schoebel, S., Oesterlin, L. K., Blankenfeldt, W., Goody, R. S. & Itzen, A. RabGDI Displacement by DrrA from Legionella Is a Consequence of Its Guanine Nucleotide Exchange Activity. *Molecular Cell* **36**, 1060-1072 (2009).
- 138 Itzen, A., Rak, A. & Goody, R. S. Sec2 is a highly efficient exchange factor for the Rab protein Sec4. *J Mol Biol* **365**, 1359-1367 (2007).
- 139 Gasper, R., Thomas, C., Ahmadian, M. R. & Wittinghofer, A. The role of the conserved switch II glutamate in *guanine nucleotide exchange factor*-mediated nucleotide exchange of GTP-binding proteins. *J Mol Biol* **379**, 51-63 (2008).
- 140 Takai, Y., Sasaki, T. & Matozaki, T. Small GTP-binding proteins. *Physiol Rev* **81**, 153-208 (2001).
- 141 Vetter, I. R. & Wittinghofer, A. The guanine nucleotide-binding switch in three dimensions. *Science* **294**, 1299-1304 (2001).
- 142 Kagan, J. C., Stein, M. P., Pypaert, M. & Roy, C. R. Legionella subvert the functions of Rab1 and Sec22b to create a replicative organelle. *Journal of Experimental Medicine* **199**, 1201-1211 (2004).
- 143 Schoebel, S., Oesterlin, L. K., Blankenfeldt, W., Goody, R. S. & Itzen, A. RabGDI displacement by DrrA from Legionella is a consequence of its guanine nucleotide exchange activity. *Molecular cell* **36**, 1060-1072 (2009).
- 144 Rink, J., Ghigo, E., Kalaidzidis, Y. & Zerial, M. Rab conversion as a mechanism of progression from early to late endosomes. *Cell* **122**, 735-749 (2005).
- 145 Stahelin, R. V. *et al.* Structural and membrane binding analysis of the Phox homology domain of phosphoinositide 3-kinase-C2alpha. *The Journal of biological chemistry* **281**, 39396-39406 (2006).
- 146 Godi, A. *et al.* FAPPs control Golgi-to-cell-surface membrane traffic by binding to ARF and PtdIns(4)P. *Nature cell biology* **6**, 393-404 (2004).

Literaturverzeichnis

- 147 Lomma, M. *et al.* The Legionella pneumophila F-box protein Lpp2082 (AnkB) modulates ubiquitination of the host protein parvin B and promotes intracellular replication. *Cellular microbiology* **12**, 1272-1291 (2010).
- 148 Perrett, C. A., Lin, D. Y. & Zhou, D. Interactions of bacterial proteins with host eukaryotic ubiquitin pathways. *Front Microbiol* **2**, 143 (2011).
- 149 Kubori, T., Shinzawa, N., Kanuka, H. & Nagai, H. Legionella metaeffector exploits host proteasome to temporally regulate cognate effector. *PLoS pathogens* **6**, e1001216 (2010).
- 150 Di Paolo, G. & De Camilli, P. Phosphoinositides in cell regulation and membrane dynamics. *Nature* **443**, 651-657 (2006).
- 151 Zhang, G., Kazanietz, M. G., Blumberg, P. M. & Hurley, J. H. Crystal structure of the cys2 activator-binding domain of protein kinase C delta in complex with phorbol ester. *Cell* **81**, 917-924 (1995).
- 152 Ferguson, K. M., Lemmon, M. A., Schlessinger, J. & Sigler, P. B. Structure of the high affinity complex of inositol trisphosphate with a phospholipase C pleckstrin homology domain. *Cell* **83**, 1037-1046 (1995).
- 153 Stahelin, R. V. *et al.* Phosphatidylinositol 3-phosphate induces the membrane penetration of the FYVE domains of Vps27p and Hrs. *The Journal of biological chemistry* **277**, 26379-26388 (2002).
- 154 Ford, M. G. *et al.* Curvature of clathrin-coated pits driven by epsin. *Nature* **419**, 361-366 (2002).
- 155 Ford, M. G. *et al.* Simultaneous binding of PtdIns(4,5)P₂ and clathrin by AP180 in the nucleation of clathrin lattices on membranes. *Science* **291**, 1051-1055 (2001).
- 156 Stahelin, R. V. *et al.* Contrasting membrane interaction mechanisms of AP180 N-terminal homology (ANTH) and epsin N-terminal homology (ENTH) domains. *The Journal of biological chemistry* **278**, 28993-28999 (2003).
- 157 Michell, R. H., Heath, V. L., Lemmon, M. A. & Dove, S. K. Phosphatidylinositol 3,5-bisphosphate: metabolism and cellular functions. *Trends Biochem Sci* **31**, 52-63 (2006).
- 158 Ragaz, C. *et al.* The Legionella pneumophila phosphatidylinositol-4 phosphate-binding type IV substrate SidC recruits endoplasmic reticulum vesicles to a replication-permissive vacuole. *Cellular microbiology* **10**, 2416-2433 (2008).
- 159 Morita, Y. S. *et al.* Stress-induced synthesis of phosphatidylinositol 3-phosphate in mycobacteria. *The Journal of biological chemistry* **285**, 16643-16650 (2010).

- 160 Balla, A., Tuymetova, G., Tsiomenko, A., Varnai, P. & Balla, T. A plasma membrane pool of phosphatidylinositol 4-phosphate is generated by phosphatidylinositol 4-kinase type-III alpha: studies with the PH domains of the oxysterol binding protein and FAPP1. *Mol Biol Cell* **16**, 1282-1295 (2005).
- 161 Lee, M. T., Mishra, A. & Lambright, D. G. Structural mechanisms for regulation of membrane traffic by rab GTPases. *Traffic* **10**, 1377-1389 (2009).
- 162 Hou, X. *et al.* A structural basis for Lowe syndrome caused by mutations in the Rab-binding domain of OCRL1. *The EMBO journal* **30**, 1659-1670 (2011).
- 163 Conover, G. M., Derre, I., Vogel, J. P. & Isberg, R. R. The Legionella pneumophila LidA protein: a translocated substrate of the Dot/Icm system associated with maintenance of bacterial integrity. *Molecular Microbiology* **48**, 305-321 (2003).
- 164 Wilson, B. S. *et al.* A Rab1 mutant affecting guanine nucleotide exchange promotes disassembly of the Golgi apparatus. *J Cell Biol* **125**, 557-571 (1994).
- 165 Nuoffer, C., Davidson, H. W., Matteson, J., Meinkoth, J. & Balch, W. E. A GDP-bound of rab1 inhibits protein export from the endoplasmic reticulum and transport between Golgi compartments. *J Cell Biol* **125**, 225-237 (1994).
- 166 Trahey, M. *et al.* Biochemical and Biological Properties of the Human N-Ras P21 Protein. *Mol Cell Biol* **7**, 541-544 (1987).
- 167 Craig, S. & Staehelin, L. A. High pressure freezing of intact plant tissues. Evaluation and characterization of novel features of the endoplasmic reticulum and associated membrane systems. *Eur J Cell Biol* **46**, 81-93 (1988).
- 168 Staehelin, L. A. The plant ER: a dynamic organelle composed of a large number of discrete functional domains. *Plant J* **11**, 1151-1165 (1997).
- 169 Henkart, M., Landis, D. M. & Reese, T. S. Similarity of junctions between plasma membranes and endoplasmic reticulum in muscle and neurons. *J Cell Biol* **70**, 338-347 (1976).
- 170 Brownell, W. E., Spector, A. A., Raphael, R. M. & Popel, A. S. Micro- and nanomechanics of the cochlear outer hair cell. *Annu Rev Biomed Eng* **3**, 169-194 (2001).
- 171 Forge, A. Structural features of the lateral walls in mammalian cochlear outer hair cells. *Cell Tissue Res* **265**, 473-483 (1991).
- 172 Pollice, P. A. & Brownell, W. E. Characterization of the outer hair cell's lateral wall membranes. *Hear Res* **70**, 187-196 (1993).

Literaturverzeichnis

- 173 Pan, X., Eathiraj, S., Munson, M. & Lambright, D. G. TBC-domain GAPs for Rab GTPases accelerate GTP hydrolysis by a dual-finger mechanism. *Nature* **442**, 303-306 (2006).
- 174 Albert, S., Will, E. & Gallwitz, D. Identification of the catalytic domains and their functionally critical arginine residues of two yeast GTPase-activating proteins specific for Ypt/Rab transport GTPases. *Embo Journal* **18**, 5216-5225 (1999).
- 175 Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *P Natl Acad Sci USA* **74**, 5463-5467 (1977).
- 176 Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685 (1970).
- 177 Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248-254 (1976).
- 178 Lobley, A., Whitmore, L. & Wallace, B. A. DICHROWEB: an interactive website for the analysis of protein secondary structure from circular dichroism spectra. *Bioinformatics* **18**, 211-212 (2002).
- 179 Kabsch, W. Xds. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **66**, 125-132 (2010).
- 180 Vonrhein, C., Blanc, E., Roversi, P. & Bricogne, G. Automated structure solution with autoSHARP. *Methods in molecular biology* **364**, 215-230 (2007).
- 181 Adams, P. D. *et al.* PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **66**, 213-221 (2010).
- 182 McCoy, A. J. Solving structures of protein complexes by molecular replacement with Phaser. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **63**, 32-41 (2007).
- 183 Murshudov, G. N., Vagin, A. A. & Dodson, E. J. Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **53**, 240-255 (1997).
- 184 Emsley, P., Lohkamp, B., Scott, W. G. & Cowtan, K. Features and development of Coot. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **66**, 486-501 (2010).
- 185 Baker, N. A., Sept, D., Joseph, S., Holst, M. J. & McCammon, J. A. Electrostatics of nanosystems: application to microtubules and the ribosome. *P Natl Acad Sci USA* **98**, 10037-10041 (2001).
- 186 Bergbrede, T. *et al.* Biophysical analysis of the interaction of Rab6a GTPase with its effector domains. *The Journal of biological chemistry* **284**, 2628-2635 (2009).

- 187 Wang, X., Hu, B., Zimmermann, B. & Kilimann, M. W. Rim1 and rabphilin-3 bind Rab3-GTP by composite determinants partially related through N-terminal alpha-helix motifs. *The Journal of biological chemistry* **276**, 32480-32488 (2001).
- 188 Westlake, C. J. *et al.* Identification of Rab11 as a small GTPase binding protein for the Evi5 oncogene. *P Natl Acad Sci USA* **104**, 1236-1241 (2007).
- 189 Junutula, J. R. *et al.* Molecular characterization of Rab11 interactions with members of the family of Rab11-interacting proteins. *The Journal of biological chemistry* **279**, 33430-33437 (2004).
- 190 Wang, Y., Okamoto, M., Schmitz, F., Hofmann, K. & Sudhof, T. C. Rim is a putative Rab3 effector in regulating synaptic-vesicle fusion. *Nature* **388**, 593-598 (1997).
- 191 Itzen, A. Strukturelle und biochemische Einblicke in Mechanismen des Nukleotid-austauschs von Rab-Proteinen (Dortmund, TU Dortmund, 2010).

9. Anhang

Tabelle 17: Vergleich der Affinitäten verschiedener Rab-Effektoren und den entsprechenden Rab-Proteinen. SF: Stopped-flow, ITC: isothermale titrationscalometrie, SPR: Surface plasmon resonance.

Rab-Effektor	Rab	Affinität	Methode	Quelle
EEA1	Rab5 / Rab9	2,4 uM / 14 uM	SPR	⁵⁴
OCRL	Rab8 / Rab1a, 5a, 6a	0,9 mM / 4 mM	SF	³⁰
Rabenosyn-5	Rab2, 4, 5, 14, 22, 24	10-20 uM	SPR	⁴⁹
Rabenosyn-5 C2H2 Zink-Finger	Rab5a / Rab22	4,8 uM / 63 uM	SPR	⁵⁹
GCC185	Rab6	2,3 uM	ITC	⁵⁵
pist150glued	Rab6a	2,38 uM	SF	¹⁸⁶
Bicaudal	Rab6a	1,5 uM	SF	¹⁸⁶
PIST	Rab6a	2,75 uM	SF	¹⁸⁶
Rabphilin-3	Rab3	10-20 nM	SPR	¹⁸⁷
Evi5	Rab11a / Rab11b	55nM / 50nM	SPR	¹⁸⁸
FIP2, Rip11/Fip5, RCP/FIP1	Rab11a	40-107 nM	ITC	¹⁸⁹
Slp2	Rab27	13,4 nM	SPR	⁴³
Slp4-a	Rab27	19,2 nM	SPR	⁴³
Slac2	Rab27	112 nM	SPR	⁴³
Rim3	Rab3 / Rab6a	1-2uM / 16uM	SPR	¹⁹⁰

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Schöbel
Vorname: Stefan
Adresse: Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie
Otto-Hahn-Str. 11, 44227 Dortmund
Telefonnr.: 0231-1332357
E-mail-Adresse: stefan.schoebel@mpi-dortmund.mpg.de
Nationalität: deutsch
Geburtsdatum/Geburtsort: 10.09.1981, Dortmund
Geschlecht: männlich
Familienstand: ledig

Promotion

Seit Januar 2008 Promotion am Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie, Dortmund, Abteilung für physikalische Biochemie (Prof. Dr. R. Goody)
Thema:
Molekulare Grundlagen der Rab-Manipulation der Proteine DrrA und LidA aus *Legionella pneumophila*

Ausbildung

Okt. 2002 – Sept. 2005 Bachelorstudium „Molecular Life Sciences“ an der Universität zu Lübeck
Abschluss: Bachelor of Science (2,3)

Mär. 2005 – Jun. 2005 Bachelorarbeit: “Expression, Purification and Crystallization Attempts of the C-terminal domain of RelA from *Salmonella typhimurium*”, an der Universität zu Lübeck, Institut für Biochemie bei Prof. Dr. R. Hilgenfeld

Sept. 2004 – Jan. 2005 Sokrates/Erasmus Austausch, Universität Oulu, Finnland

Mai 2005 – Juni 2005 Forschungspraktikum: „Molecular dynamics simulation of the Rel/Spo homolog RelSeq“
Prof. Dr. Hualiang Jiang, Shanghai Institute of Materia Medica (SIMM), Shanghai, China

- Okt. 2005 – Sept. 2007 Masterstudium „Molecular Life Sciences“ an der Universität zu Lübeck, Abschluss Master of Science (1,6)
- Sep. 2006 – Nov. 2006 Forschungspraktikum: „Co-Kristallisation der IPNV VP4 Protease mit Peptidsubstraten“
Prof. Dr. Mark Paetzel, Simon Frasier University, Department of Molecular Biology and Biochemistry, Burnaby/Canada
- Dez. 2006 – Feb. 2007 Forschungspraktikum: „Quantenmechanische Berechnungen eines [Fe₄S₄] Ferredoxin“
Dr. Hauke Paulsen, Universität Lübeck, Institut für Physik
- Mär. 2007 – Okt. 2007 Masterarbeit: „Strukturelle and thermodynamische Analyse von Komponenten des COG-Komplexes“, am Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie, Dortmund, Abteilung für physikalische Biochemie bei Dr. Kirill Alexandrov)
- Nov. 2008 – Dez. 2008 Forschungspraktikum: „Potential of mean force for glycerol, ammonia and water of the aquaporin GlpF (Gromacs)“
Dr. Bert de Groot, Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie, Computational Biomolecular Dynamics Group, Göttingen

Veröffentlichungen

Schoebel S, Cichy A, Goody RS, Itzen A (2011)
LidA from Legionella is a Rab GTPase Supereffector.
P Natl Acad Sci USA, 108(44), 17945-50

Goody RS, Müller M, Schoebel S, Oesterlin LK, Blümer J, Peters H, Blankenfeldt W, Itzen A (2011)
The versatile Legionella effector DrrA. Commun Integr Biol. 4(1), 72–74

Hou X, Hagemann N, Schoebel S, Blankenfeldt W, Goody RS, Erdmann KS, Itzen A (2011)
A structural basis for Lowe syndrome caused by mutations in the Rab binding domain of OCRL1.
EMBO J, 30, 1659–1670

Anhang

Schoebel S, Blankenfeldt W, Goody RS, Itzen A (2010)
High-affinity binding of phosphatidylinositol 4-phosphate by Legionella pneumophila DrrA.
EMBO Rep, 11 (8), 598-604

Schoebel S, Oesterlin LK, Blankenfeldt W, Goody RS, Itzen A (2009)
RabGDI displacement by DrrA from Legionella pneumophila is a consequence of its guanine nucleotide exchange activity.
Mol Cell, 36 (6), 1060-72
*Reviewed by Faculty of 1000

Bergbrede T, Chuky N, Schoebel S, Blankenfeldt W, Geyer M, Fuchs E, Goody RS, Barr F, Alexandrov K (2009)
Biophysical analysis of the interaction of Rab6a GTPase with its effector domains.
J Biol Chem, 284 (5), 2628-35

Danksagung

Mein Dank gilt:

Professor Dr. Roger Goody für die konstante Unterstützung meiner Arbeit und die Möglichkeit an „anständigen“ Projekten, sogar im Exil zu arbeiten.

Professor Dr. Roland Winter für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Dr. Aymelt Itzen für die exzellente Betreuung, die stets offene Tür und die vielen Freiheiten. Alles Gute in München!

Nathalie Bleimling für allerlei Scheiben Baguette, die Sie mir großzügig abgeschnitten hat und die ich behalten durfte.

Professor Dr. Wulf Blankenfeldt für die Hilfe bei kristallographischen Problemen.

Dr. Kirill Alexandrov für den Einstieg ins MPI-Dortmund.

Lena Oesterlin für die erfolgreiche Zusammenarbeit am DrrA-Projekt.

Der gesamten Arbeitsgruppe Goody für die Erduldung meines Musikterrors und den vielen Spaß während der Arbeit.

Yashar Sadian, Shyamal Narayan, Matthias Müller und Gregor Bahrenberg für die vielen wissenschaftlichen und soziokulturellen Diskussionsrunden im kleinen Paris.

Mihai Gazdag und Li Qiang für die Campingtrips mit Buffet und Feuerwerk, incl. Weiterbildung: Lesson Nr. 1: Continue.

Dr. Ingrid Vetter und Georg Holterman, ohne die das wahrscheinlich beste Kristallisationslabor der Welt nicht existieren würde.

Anhang

Adam Cichy für die erfolgreiche Zusammenarbeit am LidA-Projekt.

Den Plasmid- und Protein-Machern aus der DPF-Dortmund: Astrid Sander, Tina Rogowski, Melina Terbeck und Dr. Tim Bergbrede.

Meinen Eltern, meiner Schwester und Oma für die vielen Verpflegungspakete und ihre kontinuierliche Unterstützung.

Janna für das Mich-Ertragen, insbesondere während der letzten gefühlten 1000 Monate.

und natürlich Alexandra und Muffy.

Eidesstattliche Erklärung

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

Dortmund, den

Stefan Schöbel