
Membranlokalisation von Rab-Proteinen durch RabGEFs

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
Dortmund

vorgelegt von
Julia Blümer, M.Sc.

Oktober 2012

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Juli 2009 bis Oktober 2012 am Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie unter der Anleitung von Prof. Dr. Aymelt Itzen und Prof. Dr. Roger S. Goody durchgeführt.

Im Rahmen der Promotion konnten die folgenden Veröffentlichungen publiziert werden:

Müller, M.P., Peters, H., Blümer, J., Blankenfeldt, W., Goody, R.S. & Itzen, A. The Legionella Effector Protein DrrA AMPylates the Membrane Traffic Regulator Rab1b. *Science* **329**, 946-949 (2010).

Goody, R.S., Müller, M.P., Schoebel, S., Oesterlin, L.K., Blümer, J., Peters, H., Blankenfeldt, W. & Itzen, A. The versatile Legionella effector protein DrrA. *Communicative & integrative biology* **4**, 72-74 (2011).

Smit, C., Blümer, J., Eerland, M.F., Albers, M.F., Müller, M.P., Goody, R.S., Itzen, A. & Hedberg, C. Efficient Synthesis and Applications of Peptides containing Adenylylated Tyrosine Residues. *Angewandte Chemie International Edition* **50**, 9200-9204 (2011).

Blümer, J., Wu, Y.W., Goody, R.S. & Itzen, A. Specific localization of Rabs at intracellular membranes. *Biochemical Society Transactions* (2012), accepted.

Blümer, J., Rey, J., Dehmelt, L., Mazel, T., Bastiaens, P., Goody, R.S. & Itzen, A. RabGEFs are a major determinant for specific Rab membrane targeting. *The Journal of Cell Biology* (2012), under revision.

1. Gutachter: Prof. Dr. Roger S. Goody
2. Gutachter: Prof. Dr. Philippe Bastiaens

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung	1
2. Einleitung	3
2.1. Vesikulärer Transport	3
2.2. RabGTPasen	4
2.2.1. Struktur und konservierte Sequenzbereiche	4
2.2.2. Rab-Zyklus	7
2.3. Lokalisation von RabGTPasen	10
2.3.1. Modell zur C-Terminus-vermittelten Lokalisation von RabGTPasen	14
2.3.2. Modell zur GDF-vermittelten Dissoziation von Rab:GDP:GDI-Komplexen	15
2.4. Guaninnukleotidaustauschfaktoren (GEFs) und GEF-vermittelte Lokalisation von RabGTPasen	16
2.4.1. DENN-Domäne enthaltende GEFs	16
2.4.2. VPS9-Domäne enthaltende GEFs	17
2.4.3. Allgemeine Prinzipien des GEF-katalysierten Nukleotidaustauschs	19
2.4.4. Rabex-5-katalysierter Mechanismus des Nukleotidaustauschs	19
2.4.5. DrrA-vermittelte Rekrutierung und Aktivierung von Rab1	22
2.4.6. Domänenstruktur und Lokalisationssignale von Rabex-5	26
2.4.7. Rabin8 ist ein Rab8-spezifisches GEF	29
2.4.8. Rab3GEP-vermittelte Lokalisation von Rab27A	30
3. Zielsetzung	31
4. Material und Methoden	33
4.1. Materialien	33
4.1.1. Chemikalien	33
4.1.2. Sonstige Materialien.....	34
4.1.3. Molekularbiologische Kits.....	34
4.1.4. Proteine und Größenstandards	34
4.1.5. Geräte	35
4.1.6. Chromatographiesäulen und –materialen	36
4.1.7. Puffer und Lösungen.....	36
4.1.8. Plasmide	37
4.1.9. Oligonukleotide	38
4.1.10. Bakterienstämme und eukaryotische Zelllinien	39
4.1.11. Nährmedien für die Anzucht von <i>E. coli</i>	39

4.1.12. Zellkulturmedien, -zusätze und -reagenzien	40
4.2. Molekularbiologische Methoden	41
4.2.1. Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>Escherichia coli</i>	41
4.2.2. Bestimmung der DNA-Konzentration	41
4.2.3. Restriktionsverdau.....	41
4.2.4. Agarose-Gelelektrophorese	41
4.2.5. Gel-Extraktion von DNA	42
4.2.6. Ligation.....	42
4.2.7. Polymerase-Kettenreaktion	42
4.2.7.1. Präparative PCR.....	42
4.2.7.2. Analytische PCR.....	42
4.2.7.3. Zielgerichtete Mutagenese von Plasmid-DNA.....	43
4.2.7.4. DNA-Sequenzierung.....	43
4.3. Mikrobiologische Methoden	43
4.3.1. Kultur und Anzucht von <i>Escherichia coli</i>	43
4.3.2. Herstellung elektrokompetenter <i>Escherichia coli</i> Zellen.....	44
4.3.3. Transformation elektrokompetenter <i>Escherichia coli</i> Zellen.....	44
4.3.4. Transformation chemisch kompetenter <i>Escherichia coli</i> Zellen	44
4.3.5. Proteinexpression in <i>Escherichia coli</i>	45
4.3.6. Zellaufschluss.....	45
4.4. Proteinbiochemische Methoden	45
4.4.1. Affinitätschromatographie.....	45
4.4.1.1. Nickelaffinitätschromatographie.....	45
4.4.2. Größenausschlusschromatographie	46
4.4.3. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE).....	46
4.4.4. Bestimmung der Proteinkonzentration	47
4.4.4.1. Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford.....	47
4.4.4.2. Bestimmung der Proteinkonzentration durch Absorptionsmessung.....	48
4.4.5. Konzentrierung von Proteinen.....	48
4.4.6. <i>In vitro</i> Prenylierung von Rab-Proteinen	48
4.5. Biophysikalische Methoden	49
4.5.1. Messung von langsamen Kinetiken mittels Fluoreszenzspektroskopie.....	49
4.6. Zellbiologische Methoden	50
4.6.1. Kultivierung eukaryotischer Zellen	50
4.6.2. Transfektion eukaryotischer Zellen	50
4.6.3. Induktion der Heterodimerisierung von FKBP- und FRB-Domänen	50
4.6.4. Fixierung eukaryotischer Zellen	51

4.7. Fluoreszenzmikroskopie	51
4.7.1. Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie.....	51
4.7.1.1. Lebendzell-Mikroskopie.....	52
4.7.1.2. Mikroskopie fixierter Zellen.....	52
4.7.2. Bildprozessierung und Datenanalyse.....	52
5. Ergebnisse	55
5.1. Induzierte mitochondriale Lokalisation von Rab5A und Rabex-5	55
5.2. Rabex-5 bewirkt die spezifische Lokalisation von Rab5A	59
5.2.1. Rabex-5 induziert die Rekrutierung von Rab5A zu den Mitochondrien	59
5.2.2. Die Kontrollproteine FKBP-eGFP und ^{FKBP-eGFP} Rab1A werden nicht durch Rabex-5 rekrutiert	62
5.2.3. Die Fähigkeit von Rabex-5 Rab5A zu lokalisieren erfordert die Membraninsertion des Rabs	64
5.2.4. Fehllokalisiertes Rabex-5-VPS9 rekrutiert Rab5A	65
5.2.5. Die GDI-vermittelte Solubilisierung von Rab5A:GDP ist Voraussetzung zur Rabex-5-vermittelten Lokalisation der RabGTPase.....	66
5.3. Die Nukleotidaustauschaktivität von Rabex-5 beeinflusst die Lokalisation von Rab5A	71
5.3.1. Nukleotidaustauschaktivität verschiedener Rabex-5-Mutanten	71
5.3.2. Subzelluläre Lokalisation von Rabex-5-Mutanten.....	72
5.3.3. Eine verminderte Nukleotidaustauschaktivität von Rabex-5 beeinträchtigt die Lokalisation von Rab5A.....	73
5.3.4. Die Rabex-5 GEF-Aktivität korreliert mit der GDI-Freisetzungaktivität und Rekrutierung von Rab5A.....	78
5.4. Rabex-5-bindungsdefiziente Rab5A-Mutanten können nicht durch Rabex-5	81
rekrutiert werden.....	81
5.4.1. GEF-Aktivität verschiedener Rab5A-Mutanten	81
5.4.2. Subzelluläre Lokalisation verschiedener Rab5-Mutanten	82
5.4.3. Die Rabex-5-vermittelte Lokalisation erfordert die effiziente Bindung von Rab5A	83
5.5. Die Nukleotidaustauschaktivität von DrrA vermittelt die Lokalisation von Rab1A.....	89
5.6. Die GEF-Domäne von Rabin8 bewirkt die Lokalisation von Rab8A	94

6. Diskussion	97
6.1. Die Rabex-5-vermittelte Lokalisation von Rab5A.....	98
6.2. Der Einfluss der GEF-Aktivität auf die Lokalisation von Rab5A	101
6.3. Die Lokalisierung von Rab1A durch DrrA	105
6.4. Die Rabin8-vermittelte Rekrutierung von Rab8A.....	107
6.5. Einfluss von GEFs auf die Lokalisation von Rabs und Mechanismen zur Membranlokalisation von GEFs.....	108
7. Ausblick	113
8. Literaturverzeichnis	115
9. Anhang.....	133
9.1. Abbildungen.....	133
9.2. Abbildungsverzeichnis	149
9.3. Tabellenverzeichnis	153
9.4. Abkürzungsverzeichnis	155
9.5. Danksagung	159
9.6. Eidesstattliche Erklärung	161

1. Zusammenfassung

Insgesamt mehr als 60 humane Rab-Proteine lokalisieren an spezifischen Organellen und regulieren den intrazellulären vesikulären Transport. In der inaktiven GDP-gebundenen Form existieren Rabs im Zytosol im Komplex mit dem Solubilisierungsfaktor GDI, der die C-terminalen hydrophoben Geranylgeranylreste gegen das wässrige Milieu des Zytosols abschirmt, wobei der Prenylanker Voraussetzung für die reversible Membranassoziation von Rab:GTP nach Aktivierung durch ein GEF ist.

Rab-Proteine koordinieren als molekulare Schalter die Teilschritte vesikulärer Transportprozesse wie Abschnürung, Transport, Andocken und Fusion des Vesikels. Sowohl die Signalweiterleitung durch spezifische Interaktion mit Effektorproteinen als auch die Aktivierung und Deaktivierung durch GEFs bzw. GAPs ist im mechanistischen Detail bereits sehr gut verstanden. Gegenstand langjähriger Diskussion ist dagegen der zelluläre Mechanismus der spezifischen Lokalisation der 60 unterschiedlichen Rab-Proteine an ihre jeweilige Zielmembran. Neuere Untersuchungen haben mittels biochemischer Verfahren anhand des Legionellenproteins DrrA gezeigt, dass GEFs durch die Rab-Aktivierung GDI aus dem hochaffinen Rab:GDP:GDI-Komplex prinzipiell freisetzen können. Somit ist eine spezifische Membranrekrutierung von Rab-Proteinen durch membranständige GEFs denkbar.

Die vorliegende Arbeit untersucht mittels zellbiologischer Ansätze die Rolle von GEFs hinsichtlich der spezifischen Membranlokalisation von Rab-Proteinen und korreliert die erhaltenen Ergebnisse mit biochemischen Analysen. Das endosomale Rab5 und sein GEF Rabex-5 wurden dabei als initiales Modellsystem gewählt. Die artifizielle mitochondriale Fehllokalisation von Rabex-5 bewirkt die spezifische Rekrutierung von Rab5A. Diese Rekrutierung ist sowohl von der Fähigkeit das Substrat Rab5A zu erkennen als auch von der enzymatischen Aktivität des GEFs abhängig. Weiterhin konnte mittels gezielt gewählter Rab5-Mutanten gezeigt werden, dass die GDI-vermittelte Extraktion des Rabs für die anschließende spezifische Lokalisation des Rabs durch das GEF essentiell ist. Zusätzlich führt eine verminderte GEF-Aktivität durch Einführung von Punktmutationen gleichermaßen zu einer Reduktion der GDI-Freisetzungsaktivität und korreliert darüber hinaus mit der verminderten Fähigkeit das Rab-Protein effizient an Organellen zu rekrutieren. Dies verdeutlicht die signifikante Korrelation dieser drei vermeintlich unabhängigen Prozesse. Die Bedeutung von GEFs für die spezifische Rekrutierung von Rabs konnte durch die systematische Ausweitung des experimentellen Systems auf die GEFs DrrA und Rabin8 und ihre Substrate Rab1 bzw. Rab8 zusätzlich untermauert werden. Die zellbiologische und biochemische Analyse der erwähnten GEFs und ihrer Rab-Substrate lässt somit den Schluss zu, dass die GEF-vermittelte Rab-Lokalisation ein genereller Mechanismus zur spezifischen subzellulären Rekrutierung von Rab-Proteinen an eine distinkte Organellenmembran darstellt.

2. Einleitung

2.1. Vesikulärer Transport

Die Zelle stellt die kleinste funktionelle Einheit aller Organismen dar. Neben einer unterschiedlichen Komposition der Ribosomen, einem größeren Zelldurchmesser sowie einer differentiellen Organisation der chromosomalen DNA, ist das Vorhandensein von Organellen bei Eukaryoten ein wesentlicher Unterschied zu Prokaryoten^{1,2}. Organellen sind in sich abgeschlossene, von einer Lipiddoppelschicht umgebene Reaktionsräume, innerhalb einer eukaryotischen Zelle, welche durch die strukturelle Abgrenzung vom Zytosol eine räumlich begrenzte Regulierung spezifischer biochemischer Prozesse ermöglichen. Zu den Organellen gehören neben dem Endoplasmatischen Retikulum (ER), dem Golgi-Apparat und dem Zellkern auch die Mitochondrien sowie die Endosomen, Lysosomen und Peroxisomen^{3,4}. Die Organisation in Kompartimente erfordert Transportprozesse, um den intrazellulären Materialfluss sowie die Signalweiterleitung zwischen den Organellen und mit dem extrazellulären Raum zu gewährleisten, wobei zwischen nicht-vesikulärem und vesikulärem Transport unterschieden wird. Das Steroid Cholesterin wird beispielsweise von der Plasmamembran zum endozytotischen Recycling Kompartiment (*endocytic recycling compartment*, ERC) über einen ATP-unabhängigen nicht-vesikulären Prozess transportiert⁵. Dagegen erfolgt der Transport der Mehrheit von Proteinen und Lipiden zwischen den Organellen des Endomembransystems über kleine, von einer Lipiddoppelschicht umgebene, sogenannte Vesikel. Neben dem intrazellulären Transport stellen die Exozytose und die Endozytose zwei wichtige Transportwege dar, welche dem Materialaustausch sowie der Signalweiterleitung mit dem extrazellulären Raum dienen. Die Exozytose umfasst den Transport von an den Ribosomen synthetisierten Proteinen ausgehend vom ER über den Golgi-Apparat zur Plasmamembran, dem extrazellulären Raum oder zu ihrem Zielorganell⁶. Dagegen werden Makromoleküle nach Bindung an den extrazellulären Teil von Plasmamembranrezeptoren über die Rezeptor-vermittelte Endozytose (auch Clathrin-abhängige Endozytose) durch Abschnürung von Vesikeln internalisiert und zu ihrem Zielort transportiert⁷.

Der vesikuläre Transport wird in vier grundlegende Schritte unterteilt (Abbildung 3). Zunächst erfolgt die Knospung und Abschnürung (1) eines Vesikels von der Donormembran. Das Vesikel wird anschließend entlang Strukturen des Zytoskeletts zur Akzeptormembran transportiert (2). Dort erfolgt schließlich das Andocken (3), welche in der Fusion (4) der Lipiddoppelschicht des Vesikels und der Akzeptormembran mündet⁸.

Zur Gewährleistung der Spezifität des gerichteten Transports ist eine präzise zeitliche und räumliche Regulation aller Teilschritte erforderlich, bei der Proteine der Rab-Familie eine zentrale Rolle spielen⁹.

2.2. RabGTPasen

2.2.1. Struktur und konservierte Sequenzbereiche

Rab-Proteine stellen mit über 60 Mitgliedern in humanen Zellen die größte Familie der Ras Superfamilie, die aufgrund ihrer guaninnukleotidbindenden und GTP-hydrolysierenden Eigenschaft auch als GTPasen bezeichnet werden¹⁰. Basierend auf Aminosäuresequenzhomologien werden alle Proteine der Ras Superfamilie einer von fünf Familien zugeordnet, die an der Regulation spezifischer Signalwege und Prozesse in der Zelle beteiligt sind: Die namensgebenden (1) Ras-Proteine regulieren die Genexpression; Proteine der (2) Rho/Rac/Cdc42-Familie sind an der Reorganisation des Zytoskeletts sowie der Genexpression beteiligt; die bereits erwähnten (3) Rab-Proteine, die Gegenstand der vorliegenden Arbeit sind, regulieren den vesikulären Transport; Mitglieder der (4) Sar1/Arf-Familie sind wesentlich an der Abschnürung von Vesikeln als Teilschritt des vesikulären Transports sowie der Zytoskelettorganisation beteiligt; (5) Ran-Proteine regulieren neben dem Transport zwischen Zellkern und Zytoplasma zusätzlich die Mikrotubuli-Organisation^{11,12}.

Alle GTPasen der Ras Superfamilie besitzen eine konservierte Struktur aus einem zentralen, sechssträngigen β -Faltblatt, welches von fünf α -Helices umgeben ist, die über Schleifen (*loops*) miteinander verbunden sind. Innerhalb der Schleifen sind fünf konservierte Motive lokalisiert, die für die Bindung des Guaninnukleotids essentiell sind und daher als G1-G5 Motive bezeichnet werden (Abbildung 1A-C und Abbildung 2)^{13,14}. Das G1 Motiv mit der Konsensussequenz $Gx_4GK(S/T)$ koordiniert das Nukleotid durch Interaktion von Amid-Wasserstoffen des Proteinrückgrats mit dem α - und β -Phosphat des Nukleotids und wird deshalb auch als *P-loop* (*phosphate-binding loop*) bezeichnet¹⁵. Die Bezeichnung der Motive G2 und G3 als *switch I* bzw. *switch II*-Regionen wird abgeleitet durch den Vergleich der Strukturen von Ras:GDP bzw. Ras:GppNHp (GppNHp ist ein nicht-hydrolysierbares GTP-Analogon), da diese Bereiche nach Nukleotidaustausch (GDP zu GTP) bzw. GTP-Hydrolyse die größte konformationelle Veränderung erfahren¹⁶⁻¹⁸. Ein für die Nukleotidbindung und GTP-Hydrolyseaktivität essentielles Magnesium-Ion wird von einem hochkonservierten Threonin der G2-Domäne, einem invarianten Aspartat des Sequenzmotivs Dx_2G der G3-Domäne sowie dem β - und γ -Phosphat des GTPs koordiniert¹⁴. Über Wechselwirkungen der Motive G4 (NKxD) und G5 (TSA) mit der Nukleobase erfolgt die Diskriminierung zu anderen zellulären Nukleotiden, wie beispielsweise Adeninnukleotiden¹⁹ (Abbildung 1A-C).

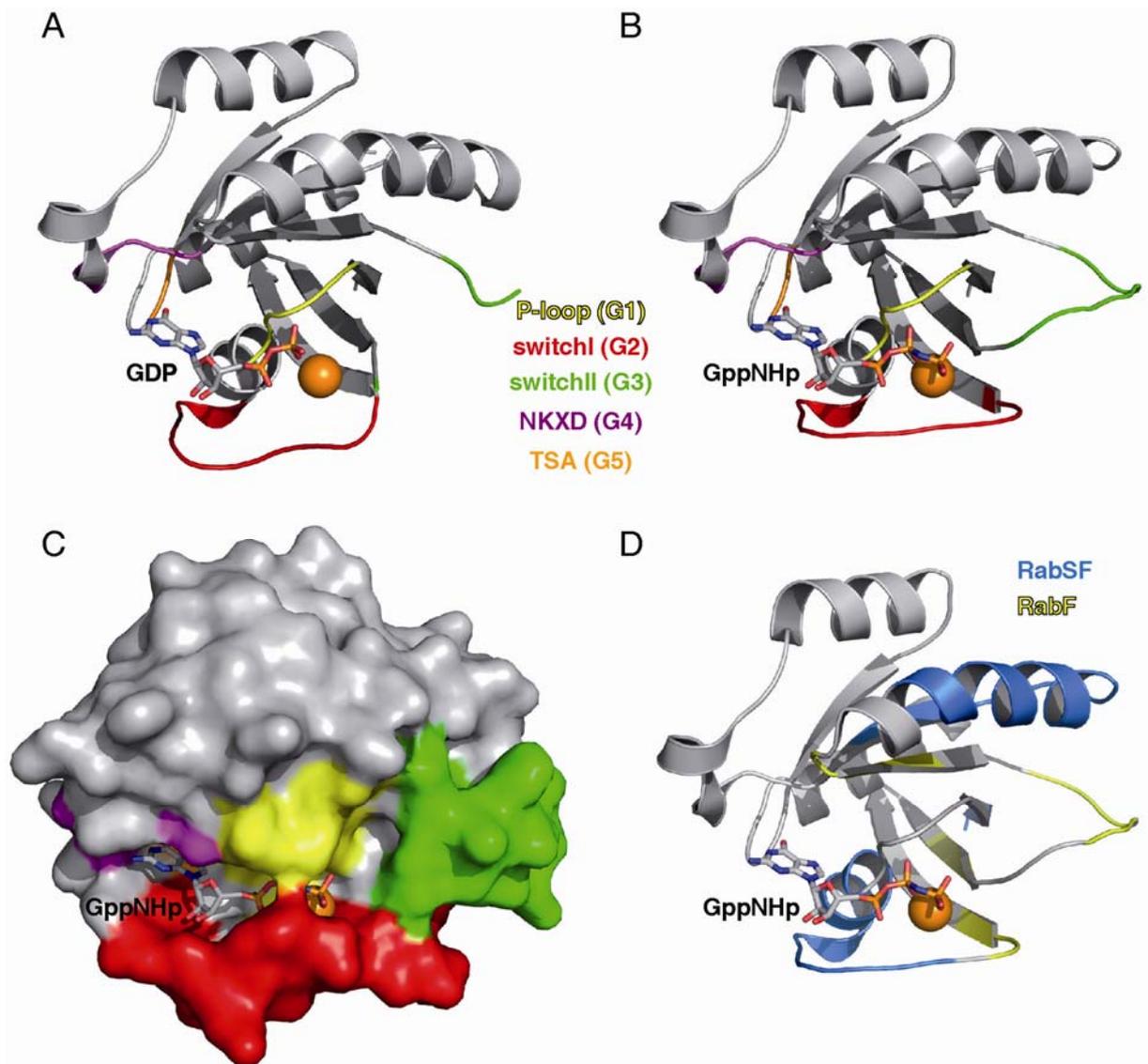


Abbildung 1: Strukturmerkmale von RabGTPasen und konservierte Sequenzbereiche am Beispiel von Rab21.

Kristallstrukturen von Rab21:GDP (PDB ID: 1ZOI) und Rab21:GppNHp (PDB ID: 1YZU; GppNHp ist ein nicht-hydrolysierbares GTP-Analogon). Die fünf konservierten Motive sind farblich hervorgehoben (**A-C**) gelb: *P-loop* (G1); rot: *switch I* (G2); grün: *switch II* (G3), lila: NKxD (G4); orange: TSA (G5). Das Proteinrückgrat ist in grau, das gebundene Nukleotid als Stabmodell und das essentielle Magnesium-Ion als orangefarbene Kugel dargestellt. (**A**) Im inaktiven, GDP-gebundenen Rab21 ist die *switch II*-Region flexibel und daher nicht in der Kristallstruktur zu sehen. (**B**) Im aktiven, GTP-gebundenen Rab21 nehmen der *P-loop*, das NKxD- und das TSA-Motiv die gleiche Konformation ein wie im GDP-gebundenen Zustand. Die *switch II*-Region ist durch die Bindung von GppNHp geordnet. Die vom *P-loop*, *switch I* und *switch II* flankierte Nukleotidbindetasche ist geschlossen. (**C**) Die Oberflächendarstellung des GppNHp-gebundenen Rab21 verdeutlicht die geschlossene Nukleotidbindetasche im aktiven Zustand des Proteins (**D**) Rab21:GppNHp mit farblich hervorgehobenen RabF- (gelb) und RabSF-Motiven (blau). Die RabF-Motive gruppieren sich um die Nukleotidbindetasche, während die RabSF-Motive an der Oberfläche des Proteins auf gegenüberliegenden Seiten lokalisiert sind. Das RabSF4-Motiv ist nicht dargestellt, da die Kristallstruktur eine verkürzte Form von Rab21 zeigt.

Eine detaillierte Sequenzanalyse führte zur Identifikation fünf weiterer, für die Rab-Familie spezifischer, Sequenzen (RabF1-RabF5), die eine Diskriminierung gegenüber anderen Mitgliedern der Ras Superfamilie ermöglicht (Abbildung 1D und Abbildung 2). Interessanterweise befinden sich die RabF-Motive innerhalb und angrenzend zu den *switch I* und *switch II* Bereichen, aufgrund dessen ihnen eine Rolle bei der Interaktion mit generellen Regulator-Proteinen wie dem *Rab Escort Protein* (REP) und dem GDP-Dissoziationsinhibitor (GDI) zugewiesen wird. Dagegen befinden sich vier weitere Motive (RabSF1-RabSF4) im N- und C-terminalen Bereich auf unterschiedlichen Seiten des Rab-Proteins, die eine Einteilung in zehn Rab-Subfamilien ermöglichen (Abbildung 1D und Abbildung 2). Es wird angenommen, dass aufgrund der Divergenz dieser Sequenzen zwischen Rab-Subfamilien die Interaktion mit spezifischen Effektoren sowie spezifischen Regulatoren wie Guaninnukleotidaustauschfaktoren (GEFs, *guanine nucleotide exchange factors*) und GTPase-aktivierenden Proteinen (GAPs, *GTPase activating proteins*) vermittelt wird^{20,21}. Ein weiteres wichtiges Sequenzmotiv ist die invariante hydrophobe Triade bestehend aus den aromatischen Aminosäuren Phenylalanin, Tryptophan und Tyrosin (F57, W74 und Y89 in Rab5A²²), welche eine wichtige Determinante in der Bindung von Effektoren der aktiven GTP-gebundenen Form darstellt (Abbildung 2)²³. Aufgrund der großen Varianz in der Sequenz wird der C-terminale Bereich von Rab-Proteinen, welcher die letzten 27 bis 47 Aminosäuren umfasst, als hypervariable Region bezeichnet und dieser Region wurde zunächst eine Rolle in der spezifischen Lokalisation sowie funktionalen Diversität verschiedener Rabs zugeschrieben²⁴⁻²⁶. Darüber hinaus beinhaltet der hypervariable C-Terminus mindestens einen, zumeist zwei Cysteinreste, welche posttranslational durch je eine Geranylgeranyl-Gruppe modifiziert werden (Abbildung 2). Das über eine Thioetherbindung kovalent gebundene, hydrophobe Isoprenoid ist Voraussetzung für die reversible Assoziation von RabGTPasen an intrazelluläre Membranen²⁷⁻²⁹.

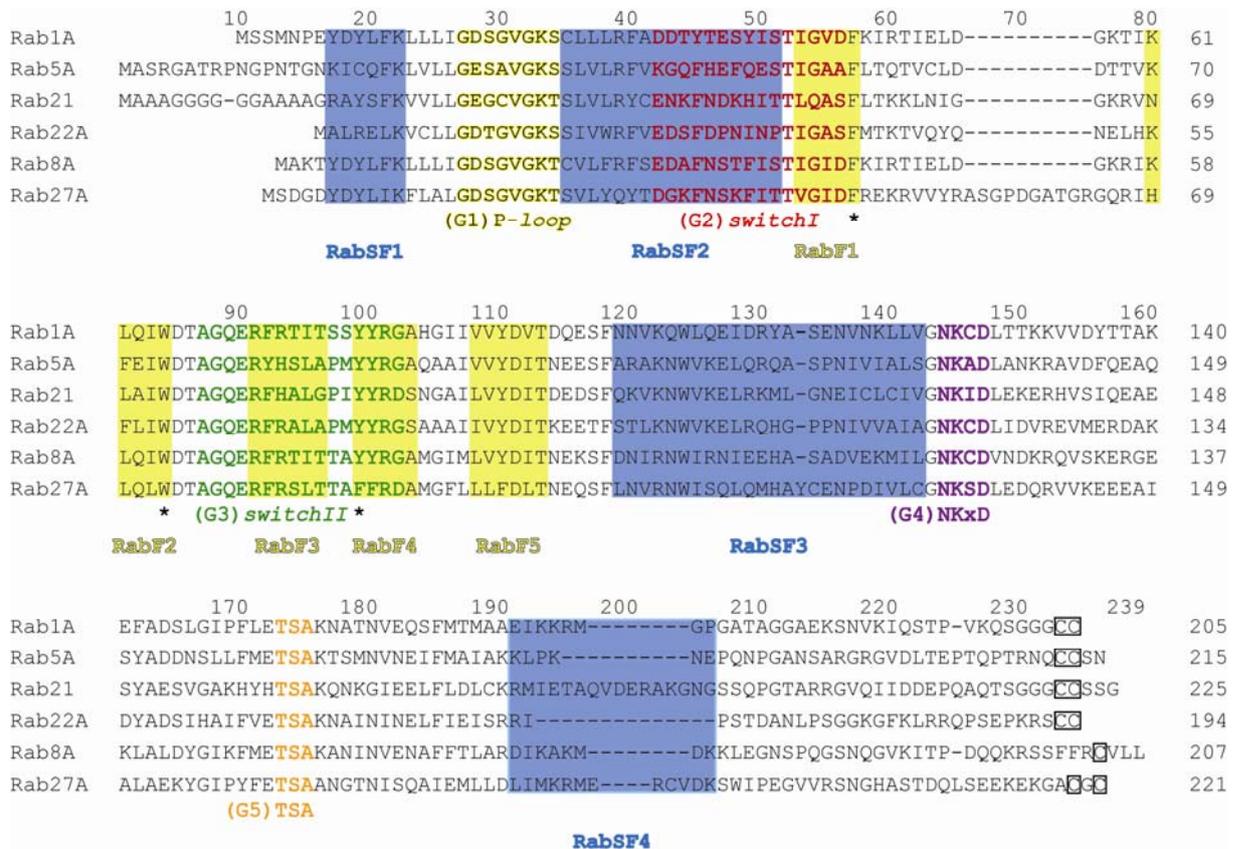


Abbildung 2: Aminosäuresequenzvergleich ausgewählter RabGTPasen.

Vergleich der Aminosäuresequenzen von Rab1A, Rab5A, Rab21, Rab22A, Rab8A und Rab27A und Darstellung konservierter Motive und Sequenzen. Der P-loop (G1) ist in gelb, die beiden switch-Regionen sind rot (switch I (G2)) bzw. grün (switch II (G3)) hervorgehoben. Das NKxD-Motiv (G4) ist in lila, das TSA-Motiv (G5) in orange dargestellt. Die vier RabSF-Sequenzen sind mit einem blauen Balken, die fünf RabF-Sequenzen mit einem gelben Balken unterlegt. Die Aminosäuren der hydrophoben Triade sind mit einem * markiert und die durch einen Geranylgeranyl-Anker modifizierte Cysteinreste mit einer Box umrahmt.

2.2.2. Rab-Zyklus

Wie alle Ras-ähnlichen GTPasen zeichnen sich auch Rab-Proteine durch das Vorhandensein zweier interkonvertierbarer Formen aus, aufgrund dessen sie als molekulare Schalter bezeichnet werden^{11,30,31}. Die dafür notwendige strukturelle Grundlage ist durch einen Konformationswechsel zwischen der inaktiven GDP-gebundenen und der aktiven GTP-gebundenen Form des Proteins gekennzeichnet, wobei Letztere durch Interaktion mit spezifischen Effektor-Proteinen für die vielfältigen regulatorischen Funktionen des vesikulären Transports verantwortlich ist^{10,32,33}. Des Weiteren ist der Wechsel zwischen der aktiven und inaktiven Form an die Assoziation bzw. Dissoziation an intrazelluläre Membranen gekoppelt^{34,35}. Dieser als Rab-Zyklus bezeichnete Prozess ist in Abbildung 3 dargestellt und wird im Folgenden näher erläutert:

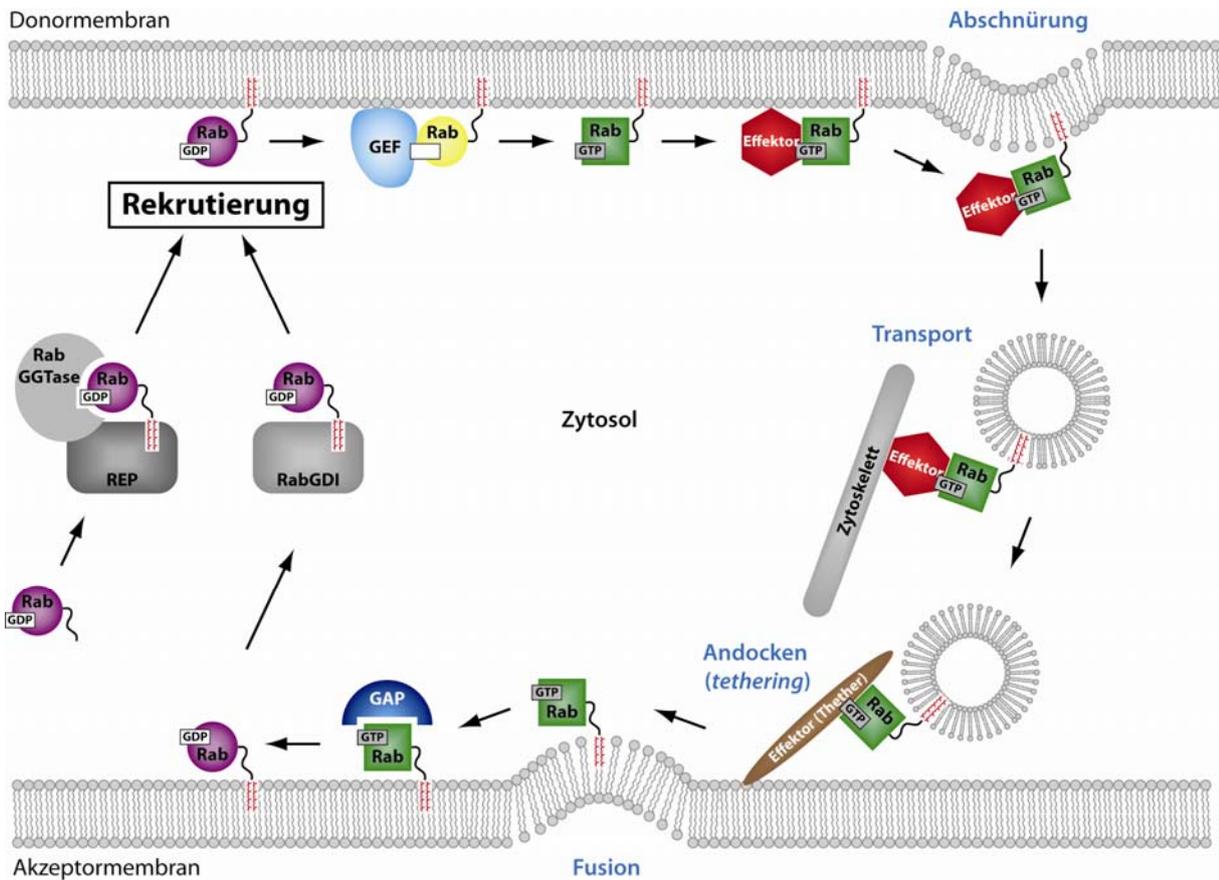


Abbildung 3: Schematische Darstellung des Rab-Zyklus und des vesikulären Transports.

Rab-Proteine werden nach der Synthese in einem ternären Komplex mit *Rab Escort Protein* (REP) und Rab-Geranylgeranyl-Transferase (RabGGTase) kovalent mit zumeist zwei Geranylgeranyl-Gruppen modifiziert. Nach Transport und Insertion des prenylierten Proteins in die Donormembran erfolgt der durch Guaninnukleotidaustauschfaktoren (GEF)-katalysierte Nukleotidaustausch von GDP zu GTP und damit die Aktivierung des Rabs. Durch die Interaktion von aktivem Rab:GTP mit zahlreichen Effektoren werden die Einzelschritte des vesikulären Transports wie Abschnürung, Transport, Andocken und Fusion des Vesikels reguliert und realisiert. Durch GTPase-aktivierende Proteine (GAPs) wird an der Akzeptormembran die Hydrolyse des gebundenen GTPs zu GDP beschleunigt und damit die Inaktivierung des Rabs vermittelt. Inaktives Rab:GDP wird durch den GDP-Dissoziationsinhibitor (GDI) aus der Akzeptormembran extrahiert und in einem zytosolischen Komplex gehalten. Der Mechanismus der initialen Lokalisation von Rab-Proteinen nach Neusynthese sowie des Rücktransports zur Donormembran ist unklar, wobei GDI-Freisetzungsfaktoren (GDFs, *GDI displacement factors*) und GEFs als Regulatoren dieses Prozesses in Frage kommen.

Nach der Synthese von Rab-Proteinen an zytosolischen Ribosomen erfolgt die Bindung der GDP-gebundenen Form durch das *Rab Escort Protein* (REP), das die RabGTPase dem Enzym Rab-Geranylgeranyl-Transferase (RabGGTase oder GGTase II) präsentiert³⁶. In diesem ternären Komplex bestehend aus Rab:GDP, REP und RabGGTase³⁷ erfolgt die kovalente Modifikation von zumeist zwei Cysteinresten am C-Terminus des Rab-Proteins mit zwei Geranylgeranyl-Gruppen^{38,39}. Nach Dissoziation der RabGGTase liefert REP das modifizierte Protein an die für das Rab-Protein spezifische Donormembran⁴⁰. Dort erfolgt die durch einen für das jeweilige Rab spezifischen Guaninnukleotidaustauschfaktor (GEF)-vermittelte Aktivie-

nung des membranassoziierten Proteins. Dies ist notwendig, da die intrinsische Nukleotidaustauschaktivität von Rabs sehr langsam ist und um eine zeitlich sowie räumlich kontrollierte Aktivierung zu gewährleisten⁴¹. GEFs katalysieren dabei die Freisetzung des GDPs und stabilisieren das nukleotidfreie Rab-Protein. Aufgrund des in der Zelle im Überschuss vorliegenden GTPs gegenüber GDP erfolgt daraufhin die Bindung des Nucleosidtriphosphats und dadurch die Aktivierung des Rab-Proteins⁴²⁻⁴⁶.

Da GEFs neben der Aktivierung eine weitere wichtige Rolle bei der spezifischen Lokalisation von Rabs an distinkte Organellen zugeschrieben wird, die Hauptbestandteil der vorliegenden Arbeit ist, erfolgt eine detaillierte Beschreibung der Wirkungsweise dieser Proteinfamilie in Kapitel 2.4.

Nach Freisetzung des GEFs interagiert aktives Rab:GTP mit einer Reihe von Effektoren, um alle für den vesikulären Transport notwendigen Schritte zu initiieren. Dabei sind Rab-Effektoren definitionsgemäß Proteine, die ausschließlich mit der aktiven GTP-gebundenen Form interagieren. Verschiedene Rab-Effektoren wirken bei der Auswahl des zu transportierenden Moleküls, der Vesikelabschnürung, dem Transport des Vesikels sowie beim Andocken und schließlich der Fusion des Vesikels mit der Akzeptormembran⁹.

Die Auswahl des Frachtmoleküls wird überwiegend von Komponenten von *Coat*-Komplexen (COPI, COPII oder Clathrin) übernommen, welche das Vesikel nach Abschnürung von der Donormembran umschließen⁴⁷. Eine weitere Gruppe von Rab-Effektoren sind Proteine, die direkt oder indirekt die Bewegung von Vesikeln entlang des Aktin- bzw. Mikrotubuli-basierten Zytoskeletts vermitteln⁴⁸. Des Weiteren gehören sogenannte *tethering*-Faktoren zu den Rab-Effektoren, die das Anheften eines Vesikels an die Akzeptormembran vermitteln⁴⁹. Darüber hinaus regulieren Rab-Proteine die SNARE-abhängige Fusion von bereits angehefteten Vesikeln mit der Akzeptormembran. SNAREs (*soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptors*) bilden eine Superfamilie von Proteinen mit einer einfachen Domänenstruktur und einem charakteristischen SNARE-Motiv, welches die Komplexbildung von vier SNARE-Proteinen vermittelt und für die Membranfusion essentiell ist⁵⁰.

Nach Beendigung eines Transportprozesses befindet sich das Rab in seiner aktiven GTP-gebundenen Form an der Akzeptormembran. Da die intrinsische GTP-Hydrolyserate von RabGTPasen sehr gering ist⁴¹, sind GTPase-aktivierende Proteine (GAP) erforderlich, welche die effiziente Inaktivierung durch eine Erhöhung der GTP-Hydrolysegeschwindigkeit vermitteln. Im Gegensatz zu der sehr heterogenen Gruppe der GEFs besitzen alle bislang identifizierten Rab-spezifischen GAPs mit Ausnahme von Rab3-GAP und LepB eine konservierte TBC-Domäne (Tre2/Bub2/Cdc16)⁵¹⁻⁵³. Basierend auf der Kristallstruktur des GAPs Gyp1p sowie von Gyp1p im Komplex mit Rab33 und des durch Mutationsanalyse identifizierten und für die Katalyse essentiellen Arginins konnte gezeigt werden, dass die GTP-Hydrolyse bei Rabs nach einem zu Ras- und Rho-GAPs analogen Mechanismus verläuft.

Darüber hinaus interagiert bei RabGAPs eine weitere basische Aminosäure, ein sogenannter Glutaminfinger der TBC-Domäne, mit dem γ -Phosphat des GTPs. Dieses Glutamin wird bei der GTP-Hydrolyse von Ras- und Rho-Proteinen durch die GTPase selbst zur Verfügung gestellt (DxxGQ-Motiv in *switch II*)^{54,55}.

Die Regulation eines weiteren Transportprozesses erfordert den Rücktransport zur entsprechenden Donormembran. Eine zentrale Rolle dieses Recycling-Prozesses übernimmt ein Protein, welches aufgrund seiner primär festgestellten Fähigkeit, die intrinsische GDP-Dissoziation von Rab3A zu inhibieren, als GDP-Dissoziationsinhibitor (GDI) bezeichnet wird⁵⁶. GDI extrahiert GDP-gebundene Rab-Proteine aus der Membran und bildet einen zytosolischen Komplex, um die hydrophoben Isoprenoidreste am C-Terminus zu maskieren. Aufgrund der um drei Größenordnungen geringeren Affinität von GDI gegenüber der GTP-gebundenen Form im Vergleich zur GDP-gebundenen Form wird gewährleistet, dass nur inaktive RabGTPasen extrahiert und in einem zytosolischen Pool gehalten werden, bis sie für einen weiteren Transportprozess an der Donormembran benötigt werden⁵⁷⁻⁶⁰.

2.3. Lokalisation von RabGTPasen

Ein charakteristisches Merkmal von RabGTPasen ist die spezifische subzelluläre Lokalisation an Membranen distinkter Organellen (Abbildung 4A)⁶¹. Aufgrund dessen werden sie häufig als Marker zur Identifikation von Organellen oder Subdomänen der entsprechenden Membran verwendet^{62,63}.

So lokalisieren Rab1-Isoformen an Membranen des ER und des Golgi-Apparates und sind wesentlich am vesikulären Transport zwischen diesen beiden Kompartimenten beteiligt⁶⁴⁻⁶⁶.

Rab8 ist sowohl an der Exozytose, am Membran-Recycling sowie der Ciliogenese beteiligt und lokalisiert am Golgi-Apparat und in vesikulären Strukturen an der Plasmamembran. Darüber hinaus weist Rab8 eine polarisierte Lokalisation an der Spitze von sogenannten *protrusions* sowie Lamellipodien, Filopodien und primären Cilien auf⁶⁷⁻⁷⁰.

Rab5 reguliert die Fusion von Clathrin-umhüllten Vesikeln mit frühen Endosomen sowie die Fusion zwischen frühen Endosomen und lokalisiert entsprechend an der Plasmamembran, an Clathrin-umhüllten Vesikeln und an frühen Endosomen (Abbildung 4B)⁷¹⁻⁷⁴. Die beiden Rab5 Aminosäurepunktmutanten Rab5_{S34N} und Rab5_{Q79L} induzieren bei Überexpression eine drastische Änderung der Zellmorphologie⁷⁴.

von Rab5_{Q79L} zu stark vergrößerten Endosomen, da die homotypische Fusion von Endosomen stimuliert wird. Die endosomale Lokalisation bleibt auch bei der Rab5_{Q79L}-Mutante erhalten (Abbildung 4B)^{74,75}.

Die wichtigste Voraussetzung für die Membranassoziation und korrekte Lokalisation von RabGTPasen ist die Prenylierung der meist zwei Cysteinreste am C-Terminus. Durch Mutation des Prenylierungsmotivs von Rab5A (Lokalisation an Endosomen) und Rab27A (Lokalisation an Melanosomen) wurde gezeigt, dass das Fehlen des zweiten Geranylgeranyl-Ankers eine Fehllokalisierung zum ER zur Folge hat^{76,77}.

Andere Ras-ähnliche GTPasen lokalisieren wie Rab-Proteine ebenfalls auf der zytoplasmatischen Seite distinkter intrazellulärer Membranen. Die Membranlokalisation wird mit Ausnahme von Sar1/Arf und Ran GTPasen gleichermaßen primär durch die Prenylierung von Cysteinresten am C-Terminus vermittelt. Dabei werden verschiedene Sequenzmotive unterschieden, die als Signal für die entsprechende Modifizierung dienen. Während die meisten Rab-Proteine zwei Cysteine innerhalb der Sequenzmotive CXC oder CC besitzen, enden die meisten Mitglieder der übrigen Ras-ähnlichen Proteine auf die Sequenz CAAX (C = Cystein, A = aliphatische Aminosäure, X = beliebige Aminosäure; im Folgenden CAAX-Proteine). Aufgrund dessen erfolgt die Klassifizierung der Prenyltransferasen. Die CAAX-Prenyltransferasen katalysieren die Verknüpfung eines Farnesylrests (Farnesyl-Transferase, FTase) oder einer Geranylgeranyl-Gruppe (Geranylgeranyl-Transferase I, GGTase-I) am Cystein innerhalb des CAAX-Sequenzmotifs, wohingegen RabGTPasen durch die Rab-Geranylgeranyl-Transferase (RabGGTase oder Geranylgeranyl-Transferase II, GGTase-II) an zwei Cysteinen prenyliert werden. Eine Ausnahme bildet dabei beispielsweise Rab8A, das auf die Sequenz CVLL endet, jedoch durch die RabGGTase mit nur einem Geranylgeranylrest modifiziert wird^{11,78,79}. Die Spezifität der Rab-Modifizierung durch die RabGGTase ergibt sich aus der Notwendigkeit für ein weiteres Protein, dem *Rab Escort Protein*, welches ausschließlich mit Rab-Proteinen interagiert und diese der RabGGTase präsentiert⁸⁰.

Endet die CAAX-Sequenz Ras-ähnlicher GTPasen auf die Aminosäure Leucin oder Phenylalanin, erfolgt die Modifizierung mit einem Geranylgeranyl-Isoprenoid, ansonsten ist das Protein Substrat für die FTase und wird entsprechend mit einem Farnesylrest versehen. Die durch das Vorhandensein von zumeist zwei Geranylgeranylresten verliehene Hydrophobizität ist bei RabGTPasen im Vergleich zu farnesylierten Ras-ähnlichen GTPasen deutlich höher. Dies erklärt auch die Notwendigkeit des Solubilisierungsfaktors RabGDI, der die hydrophoben Reste gegenüber dem wässrigen Milieu des Zytosols abschirmt^{78,79}.

CAAX-Proteine werden nach erfolgter Prenylierung durch zwei weitere Enzyme, die am ER lokalisieren, modifiziert. Die Endoprotease Rce1 (*Ras converting enzyme 1*) spaltet die letzten drei Aminosäuren AAX ab und die Methyltransferase Icmt (*Isoprenylcysteine carboxyl*

methyltransferase) methyliert die α -Carboxylgruppe des Prenylcysteins⁸¹. Rab-Proteine mit der C-terminalen Sequenz CXC werden ebenfalls methyliert, jedoch wird die Lokalisation durch eine fehlende Methylierung nicht beeinflusst⁷⁹.

Im Gegensatz zu Rab-Proteinen sind bei einigen Ras-ähnlichen GTPasen weitere Sequenzmotive für eine spezifische Membranassoziation notwendig. So werden die Ras-Isoformen N-Ras, H-Ras und K-Ras4A an ein oder zwei Cysteinen zusätzlich palmitoyliert, während K-Ras4B eine polybasische Region enthält, die für eine Lokalisation an der Plasmamembran notwendig ist⁷⁸. Nicht-palmitoyliertes N-Ras und H-Ras lokalisieren am Golgi-Apparat und der Transport der beiden Ras-Isoformen zwischen der Plasmamembran und dem Golgi-Apparat wird entsprechend durch die reversible Acylierung bzw. Deacylierung reguliert⁸².

Den meisten Mitgliedern der Rho/Rac/Cdc42-Familie, wie Cdc42 und Rac2, fehlt ein zweites Signal zur Membranassoziation und sie werden in der Regel mit einem Geranylgeranyl-Anker modifiziert. Daher existieren sie in Analogie zu RabGTPasen entweder im Zytosol als löslicher Komplex mit RhoGDI oder lokalisieren spezifisch an unterschiedlichen intrazellulären Membranen⁸³.

Strukturelle Untersuchungen zeigen, dass die Kontaktflächen zwischen RhoGTPasen und RhoGDI vom Nukleotidzustand nahezu nicht beeinflusst werden und RhoGDI bindet *in vitro* mit gleicher Affinität sowohl die GDP-gebundene Form als auch die GTP-gebundene Form von Cdc42⁸⁴⁻⁸⁶. In Gegenwart von Membranen haben RhoGDIs jedoch eine höhere Affinität zu Cdc42:GDP als zu Cdc42:GTP, wodurch ihre Rolle bei der selektiven Extraktion von inaktiven GDP-gebundenen RhoGTPasen aus Membranen erklärt werden kann⁸⁷. Weitere Untersuchungen sprechen dafür, dass die Freisetzung von RhoGTPasen aus dem Komplex mit RhoGDI an die Assoziation mit Zellmembranen gekoppelt sein muss, um eine Degradation der GTPase zu verhindern⁸⁸. Analog zu RabGTPasen wurde auch für RhoGTPasen die Existenz von GDFs (*GDI displacement factors*) postuliert, jedoch konnte ein solcher Faktor bislang nicht identifiziert werden. Stattdessen werden verschiedene Mechanismen diskutiert, wie die Freisetzung durch bestimmte Lipide, eine durch spezifische Protein-Protein-Interaktion vermittelte Dissoziation und eine durch Phosphorylierung induzierte Freisetzung. Es wurden bereits zahlreiche Phosphorylierungsstellen in RhoGDIs und RhoGTPasen identifiziert, die die Interaktion von RhoGTPase:RhoGDI-Komplexen modulieren⁸⁴.

Mitglieder der Sar1/Arf-Familie nehmen eine Sonderstellung ein, da ihre Membranassoziation nicht durch eine C-terminale Prenylierung, sondern durch eine N-terminale amphipathische Helix vermittelt wird. Darüber hinaus werden alle Arf-GTPasen kotranslational am N-Terminus myristoyliert und die Lipidmodifikation ist sowohl für die Membranrekrutierung als auch die Aktivität essentiell. Im inaktiven GDP-gebundenen Zustand bindet die amphipathische Helix in eine hydrophobe Tasche. Durch GTP-Bindung er-

folgt ein Konformationswechsel innerhalb der *switch*- und *interswitch*-Regionen, die daraufhin in die hydrophobe Tasche drängen, so dass die amphipathische Helix herausgeschoben wird und in die Membran inseriert wird. Durch diesen Mechanismus ist die Aktivierung der GTPase an die direkte Membranassoziation gekoppelt und erklärt das Fehlen eines GDIs^{62,89,90}.

Pde δ ist ein weiterer zytoplasmatischer Solubilisierungsfaktor, der eine hohe strukturelle Ähnlichkeit zu RhoGDI aufweist und verschiedene prenylierte GTPasen wie H-Ras, K-Ras und RheB bindet. Biochemische Studien zeigen, dass die Bindung spezifisch ist für farnesylierte GTPasen⁹¹⁻⁹⁴. Darüber hinaus bindet Pde δ Arl2 und Arl3, wobei diese Interaktion spezifisch ist für die GTP-gebundene Form. Demzufolge wird Pde δ als Effektor der beiden Ras-ähnlichen GTPasen klassifiziert^{91,95,96}. Erst kürzlich konnte gezeigt werden, dass Arl2:GTP und Arl3:GTP als allosterische Freisetzungsfaktoren von Pde δ aus dem Komplex mit der RasGTPase RheB fungieren. Der wesentliche Unterschied zu Rab:RabGDI-Komplexen ist, dass Pde δ sowohl GDP- als auch GTP gebundene Ras-ähnliche GTPasen bindet und zudem eine breites Spektrum an Bindungspartnern aufweist⁹⁷. Der Prozess der Rekrutierung eines spezifischen Rab-Proteins an seinen Bestimmungsort in der Zelle ist, trotz intensiver Untersuchungen sowie der Identifikation möglicher Kandidaten sowie Determinanten innerhalb der GTPase, nach wie vor Gegenstand aktueller Forschung. Da die Regulierung der Rekrutierung und spezifischen Lokalisation von Rab-Proteinen an eine distinkte Organellenmembran Gegenstand der vorliegenden Arbeit ist, werden im Folgenden die bisherigen Modelle näher erläutert.

2.3.1. Modell zur C-Terminus-vermittelten Lokalisation von RabGTPasen

Da der strukturell flexible C-Terminus von Rab-Proteinen die größte Sequenzdiversität aufweist, wurde zunächst postuliert, dass dieser eine Determinante für die spezifische Lokalisation von Rabs darstellt. So führt der Austausch der letzten 34 C-terminalen Aminosäuren von Rab5 mit den entsprechenden Aminosäuren des C-Terminus von Rab7 zu einer Relokalisation des chimären Proteins zur perinukleären Region, die der Lokalisation von wildtypischem Rab7 zugesprochen wird²⁴. Des Weiteren wurde in einer analogen Studie der C-Terminus von Rab6 (Lokalisation am Golgi-Apparat und *trans*-Golgi-Netzwerk, TGN) durch den C-Terminus von Rab5 ersetzt. Das chimäre Protein lokalisiert analog zu wildtypischem Rab5 an der Plasmamembran sowie an Endosomen²⁵.

Umfassende Untersuchungen zeigten jedoch, dass der Austausch des hypervariablen C-Terminus von Rab5A mit den entsprechenden Sequenzen von Rab1A, Rab2A, Rab7A und Rab27A keinen Einfluss auf die ursprüngliche Lokalisation besitzt, da alle chimären Proteine weiterhin an den Endosomen lokalisieren. Stattdessen führt der Austausch des RabF4- oder RabSF3-Motivs von Rab5A durch Rab27A sowie der Austausch des RabSF2- oder RabSF3-

Motivs von Rab27A durch Rab5A ausschließlich zu einer Relokalisation zum ER bzw. dem Golgi-Komplex. Dies führte zu der Schlussfolgerung, dass nicht die hypervariable Region alleine, sondern mehrere Regionen innerhalb der RabGTPase zur korrekten und effizienten Rekrutierung beitragen. Des Weiteren wurde daraus abgeleitet, dass Rab-Proteine, die ihre Lokalisationsinformation verloren haben, wie beispielsweise beim Austausch der RabF bzw. RabSF-Motive zwischen Rab5A und Rab27A, an Membranen des ER und des Golgi-Apparats lokalisieren, die als Ausgangsstandort für fehllokalisierte RabGTPasen dienen⁹⁸.

2.3.2. Modell zur GDF-vermittelten Dissoziation von Rab:GDP:GDI-Komplexen

Aufgrund der hohen Affinität von prenylierten, GDP-gebundenen RabGTPasen zu GDI (Dissoziationskonstante von Rab9:GDI: $K_D = 20$ nM) wurde die Existenz und Notwendigkeit von sogenannten GDI-Freisetzungsfaktoren (GDFs, *GDI displacement factors*) postuliert, die eine Dissoziation des Rab:GDP:GDI-Komplexes katalysieren, um dadurch die Insertion des Rabs in die Donormembran zu ermöglichen^{34,35,99}. Eine GDF-Aktivität wurde erstmals durch die Inkubation endosomaler Membranen mit Rab5, Rab7 bzw. Rab9 im Komplex mit GDI identifiziert, die einen anschließenden Nukleotidaustausch mit intrinsischer Geschwindigkeit ermöglicht¹⁰⁰. Das für die GDF-Aktivität verantwortliche PRA1 (*prenylated Rab acceptor*; Yip3-Homolog aus *S. cerevisiae*) wurde zunächst als Protein identifiziert, das an prenylierte Rab-Proteine sowie an VAMP2 (*vesicle-associated membrane protein 2*; Mitglied der SNARE-Proteinfamilie) bindet. Aufgrund dessen wurde dem integralen Membranprotein eine Rolle beim Andocken von Vesikeln sowie der anschließenden Fusion zugesprochen¹⁰¹. PRA1/Yip3 gehört zur Yip-Proteinfamilie mit 12 Mitgliedern in humanen Zellen und ist bislang das einzige Protein, das *in vitro* die Dissoziation von Rab9 aus dem Komplex mit GDI katalysiert¹⁰². Der Vergleich der Anzahl von Yip-Proteinen und RabGTPasen deutet jedoch darauf hin, dass Yip-Proteine allenfalls zu einem Teil für die spezifische Lokalisation von Rabs verantwortlich sind⁶². Es wurde für PRA1/Yip3 *in vitro* ebenfalls eine katalytische GDF-Aktivität gegenüber GDI im Komplex mit Rab5 und Rab7 (endosomale Lokalisation), nicht jedoch Rab1A und Rab2 (Lokalisation am ER und Golgi-Komplex) detektiert. Aufgrund dessen wurde eine Spezifität von PRA1/Yip3 gegenüber endosomalen Rab-Proteinen postuliert¹⁰². Weiterhin konnte jedoch gezeigt werden, dass PRA1/Yip3 mit einer Vielzahl von Rabs, die unterschiedlichen Subfamilien angehören, interagiert¹⁰³. Diese Promiskuität widerspricht der Rolle von GDFs als mögliche Determinanten zur spezifischen Lokalisation von RabGTPasen an distinkte Organellen⁶². Darüber hinaus lokalisieren Mitglieder der Yip-Proteinfamilie fast ausschließlich am ER und am Golgi-Komplex weshalb ihnen eine Funktion zur Aufrechterhaltung der Golgi-Struktur sowie des ER-Golgi-Transports zugesprochen wird¹⁰⁴.

Des Weiteren würde bei Abwesenheit eines spezifischen GEFs an der entsprechenden Organellenmembran die GDP-gebundene RabGTPase GDI-vermittelt wieder aus der Membran extrahiert werden. Aufgrund dieser Tatsache und fehlender struktureller sowie mechanistischer Untersuchungen zur GDF-vermittelten Dissoziation von Rab:GDP:GDI-Komplexen, bleibt die Rolle von Mitgliedern der Yip-Familie bezüglich der spezifischen Lokalisation von Rab-Proteinen weiterhin unklar.

2.4. Guaninnukleotidaustauschfaktoren (GEFs) und GEF-vermittelte Lokalisation von RabGTPasen

Die Membranassoziation von RabGTPasen an eine spezifische Donormembran wird von einer GEF-vermittelten Aktivierung begleitet^{34,35}. Die Tatsache, dass GEFs eine zu ihrem jeweiligen spezifischen Rab analoge Lokalisation an distinkten Organellen aufweisen, führte zur Hypothese, dass GEFs einen Einfluss auf die Lokalisation der zu aktivierenden Rabs besitzen¹⁰⁵. Generell sind GEFs Multidomänenproteine oder stellen Untereinheiten von multimeren Proteinkomplexen dar. So bilden beispielsweise die vier Untereinheiten Bet3, Bet5, Trs23 und Trs31 des aus 10 Untereinheiten bestehenden TRAPP-II-Komplexes in *S. cerevisiae* die für den Nukleotidaustausch von Ypt1 und Rab1 katalytisch aktive Einheit¹⁰⁶.

Tabelle 1: GEFs ohne charakteristisches Sequenzmotiv

GEF	Rab
Sec2p	Sec4p ¹⁰⁷
Rabin8/Rabin3	Rab8 ⁶⁷
GRAB	Rab3 ¹⁰⁸
TRAPP	Rab1/Ypt1 ¹⁰⁹
Ric1p-Rgp1p	Ypt6 ¹¹⁰
Mon1-Ccz1	Ypt7 ¹¹¹

Im Gegensatz zur TBC-Domäne von Rab-spezifischen GAP-Proteinen besitzen die meisten GEFs kein einheitliches Motiv, das eine Identifizierung anhand der Aminosäuresequenz ermöglicht (Tabelle 1). Dennoch konnten mit der VPS9- und der DENN-Domäne zwei Sequenzmotive identifiziert werden, die in einer Vielzahl Rab-spezifischer GEFs vorkommen^{112,113}.

2.4.1. DENN-Domäne enthaltende GEFs

Die DENN-Domäne, welche aus den Subdomänen uDENN (*upstream* DENN), DENN und dDENN (*downstream* DENN) besteht, konnte bislang in 18 humanen Proteinen identifiziert werden (Tabelle 2)^{112,114}. Bei 17 dieser DENN-Proteine wurde durch eine systematische Cha-

rakterisierung eine spezifische GEF-Aktivität gegenüber verschiedenen Rabs nachgewiesen¹¹⁵.

Um einen Einfluss auf die Rab-spezifische Lokalisation auszuüben, ist zumindest eine partielle Kolokalisation des GEFs mit dem entsprechenden Rab zu erwarten. So wurde beispielsweise für DENND1A als auch für das Substrat Rab35 in unabhängigen Studien eine Lokalisation an der Plasmamembran sowie an Clathrin-umhüllten Vesikeln detektiert^{115,116}. Weiterhin wurde gezeigt, dass DENND1A selektiv mit inaktivem Rab35 kolokalisiert und in Kombination mit Bindungsstudien postuliert, dass beide Proteine einen Komplex bilden, um Rab35 nach Eintreffen eines Signals zu aktivieren¹¹⁷.

Tabelle 2: DENN-Domäne enthaltende GEFs

GEF	Rab
DENND1A/connecdenn 1	Rab35 ^{109, 111, 112}
DENND1B/connecdenn 2	Rab35 ^{115,118}
DENND1C/connecdenn 3	Rab35, Rab13 ^{115,118}
DENND2A-D	Rab9A/B ¹¹⁵
	Rab34 (DENND2B)
DENND3	Rab12 ¹¹⁵
	Rab18
DENND4A-C	Rab10 ¹¹⁵
DENND5A/B	Rab39 ¹¹⁵
DENND6A/B	Nicht bestimmt
MTMR5/13	Rab28 ¹¹⁵
	Rab5A (MTMR5)
MADD/Rab3GEP	Rab3 ^{119,120}
	Rab27A/B ¹²⁰

2.4.2. VPS9-Domäne enthaltende GEFs

Als namensgebendes Protein für Nukleotidaustauschfaktoren mit einer VPS9-Domäne (Tabelle 3) wurde das Protein Vps9p (*vacuolar protein sorting 9*) aus *S. cerevisiae* identifiziert, das für die Lokalisation von vakuolären Proteinen notwendig ist und eine spezifische Nukleotidaustauschaktivität gegenüber Rab5 und Vps21p (Rab5-Homolog aus *S. cerevisiae*) besitzt^{121,122}. Die Identifizierung eines weiteren Proteins in humanen Zellen weist eine starke Sequenzhomologie zu Vps9p auf. Dieses Protein bildet einen festen Komplex mit dem Rab5-Effektor Rabaptin-5 und besitzt ebenfalls eine spezifische Nukleotidaustauschaktivität gegenüber Rab5 und wurde deshalb als Rabex-5 (*Rabaptin-5-associated exchange factor for Rab5*) bezeichnet¹²³.

Die VPS9-Domäne kommt darüber hinaus in dem Protein RIN1 vor, welches ursprünglich aufgrund seiner Fähigkeit aktiviertes Ras zu inhibieren, identifiziert wurde¹²⁴. RIN3 besitzt darüber hinaus GEF-Aktivität gegenüber Mitgliedern der Rab5-Subfamilie¹²⁵. Dies führte zur Charakterisierung der VPS9-Domäne als modulare Rab5 GEF-Domäne^{126,127}.

Anhand von Sequenzvergleichen konnte gezeigt werden, dass Proteine, die eine VPS9-Domäne enthalten (im Folgenden VPS9-Proteine) in Eukaryoten konserviert sind: Es konnten bislang zwei *S. cerevisiae*-Proteine (Vps9p und Muk1p), drei Proteine aus *C. elegans* (RME-6, RABX-5 und CE23604), vier *Drosophila melanogaster*-Proteine (Sprint, CG9139-PA, CG1657-PA und CG7158-PA) sowie neun humane VPS9-Proteine identifiziert werden (Tabelle 3). Dabei wurde bei sieben der humanen Proteine eine Rab5-spezifische GEF-Aktivität nachgewiesen^{113,125,128-131}.

Basierend auf einer umfangreichen biochemischen Analyse konnte die Spezifität der VPS9-Domäne von Rabex-5 demonstriert werden. Dazu wurden 31 humane Rabs analysiert, wobei eine Austauschaktivität ausschließlich gegenüber Mitgliedern der Rab5-Subfamilie wie Rab5, Rab21 und Rab22 detektiert wurde¹³². Rab22 zeigte dabei eine verminderte GEF-Aktivität, die aufgrund der phylogenetischen Analyse jedoch nicht zu erwarten war, da Rab22 eine höhere Sequenzhomologie gegenüber Rab5 aufweist als Rab21²¹.

Tabelle 3: humane VPS9-Domäne enthaltende GEFs

GEF	Rab
Rabex-5/VPS9	Rab5 ^{122,123}
	Rab21/Rab22 ¹³²
Rin1	Rab5 ¹²⁷
Rin2	Rab5 ¹³⁰
Rin3	Rab5 ¹²⁵
Als2	Rab5 ¹²⁹
Als2CL	Rab5 ¹²⁸
RME-6/Gapex-5/Rab6	Rab5 ^{133,134}
	Rab31 ¹³⁵
Varp	Rab21 ¹³⁶
	Rab5
Rin-like	Rab5 ¹³¹
	Rab22

2.4.3. Allgemeine Prinzipien des GEF-katalysierten Nukleotidaustauschs

Trotz der hohen strukturellen und sequenzspezifischen Divergenz von GEFs verwenden alle Austauschfaktoren bezüglich thermodynamischer und kinetischer Aspekte einen ähnlichen Mechanismus, um das gebundene Nukleotid der RabGTPase freizusetzen.

Die Prinzipien der Nukleotidfreisetzung wurden erstmals anhand der Ras-ähnlichen GTPase Ran und des GEFs RCC1 demonstriert. Dabei konnte neben zwei hochaffinen binären Komplexen (GTPase:GDP/GTP und GTPase:GEF) ein ternärer Komplex (GEF:GTPase:GDP/GTP) identifiziert werden, indem sowohl das GEF als auch das Nukleotid mit um mehrere Größenordnungen verringerter Affinität binden. Die verminderte Affinität wird überwiegend durch eine erhöhte Dissoziationsrate des GEFs und des Nukleotids aus dem ternären Komplex verursacht, wodurch die dramatische Beschleunigung der GDP-Freisetzung in Anwesenheit eines spezifischen GEFs erklärt werden kann^{80,137}.

Die Abschwächung der Affinität der Nukleotidbindung wird überwiegend durch Kontaktbildung des GEFs mit der *switch II*-Region sowie in den meisten Fällen auch der *switch I*-Region erreicht. Darüber hinaus wird das für die Nukleotidbindung essentielle Magnesiumion und der *P-loop* durch Aminosäuren des GEFs verdrängt und der *P-loop* im nukleotidfreien Komplex durch Interaktion des hochkonservierten *P-loop*-Lysins mit einer negativ geladenen Aminosäure des GEFs oder der *switch II*-Region stabilisiert. Die dadurch induzierten Konformationsänderungen, überwiegend in der *switch I*- und der *switch II*-Region, führen zur Öffnung der Nukleotidbindetasche und letztlich zur Freisetzung des Nukleotids^{18,43,138}.

2.4.4. Rabex-5-katalysierter Mechanismus des Nukleotidaustauschs

Da der Austauschfaktor Rabex-5 und sein Einfluss auf die Lokalisation von Rab5 Gegenstand der vorliegenden Arbeit ist, soll im Folgenden näher auf den Rabex-5-katalysierten Mechanismus der Nukleotidfreisetzung eingegangen werden. Die Struktur der katalytisch aktiven Domäne von Rabex-5 im Komplex mit nukleotidfreiem Rab21 verdeutlicht in welcher Art und Weise GEFs mit einer VPS9-Domäne ihr Substrat erkennen, wie die Freisetzung des GDPs beschleunigt sowie die Stabilisierung der nukleotidfreien Konformation des Rabs realisiert wird (Abbildung 5).

Die katalytisch aktive Domäne von Rabex-5 (im Folgenden Rabex-5-VPS9) besteht aus einer N-terminalen *Helical Bundle*-Domäne (α -Helices α HB1- α HB4) und der VPS9-Domäne (α -Helices α V1- α V6). Die VPS9-Domäne bildet großflächige Kontakte mit dem *P-loop* sowie den beiden *switch*-Regionen und der *interswitch*-Region von Rab21 aus, die sich in einer V-förmigen Anordnung der α -Helices α V4 und α V6 konzentrieren (Abbildung 5A). Die zwei invarianten aromatischen Aminosäuren Phe56 und Trp73 verankern die *interswitch*-Region

in eine angrenzende, unpolare Tasche der VPS9-Domäne (Abbildung 5B). Die Aminosäuren 51-Thr-Leu-Gln-Ala-Ser-55 von *switch I* kontaktieren die VPS9-Domäne über eine Einkerbung zwischen dem C-Terminus von $\alpha V4$ und dem $\alpha V3$ - $\alpha V4$ loop. Die *switch II*-Region bildet durch Einschieben des konservierten Phe81 in einen unpolaren Spalt von $\alpha V4$ und $\alpha V6$ und durch Interaktion von Leu84, Ile87 und Tyr88 zu Aminosäuren Tyr354, Thr357, Cys361 und Phe365 von $\alpha V6$ Kontakte zur VPS9-Domäne aus (Abbildung 5B). Die einzige invariante Aminosäure der VPS9-Domäne, Asp313, vermittelt einerseits die Interaktion mit dem invarianten Lys32 des P-loops sowie mit der NH-Gruppe des invarianten Gly77 der *switch II*-Region und imitiert dadurch Interaktionen mit dem γ -Phosphat des GTPs⁴⁵.

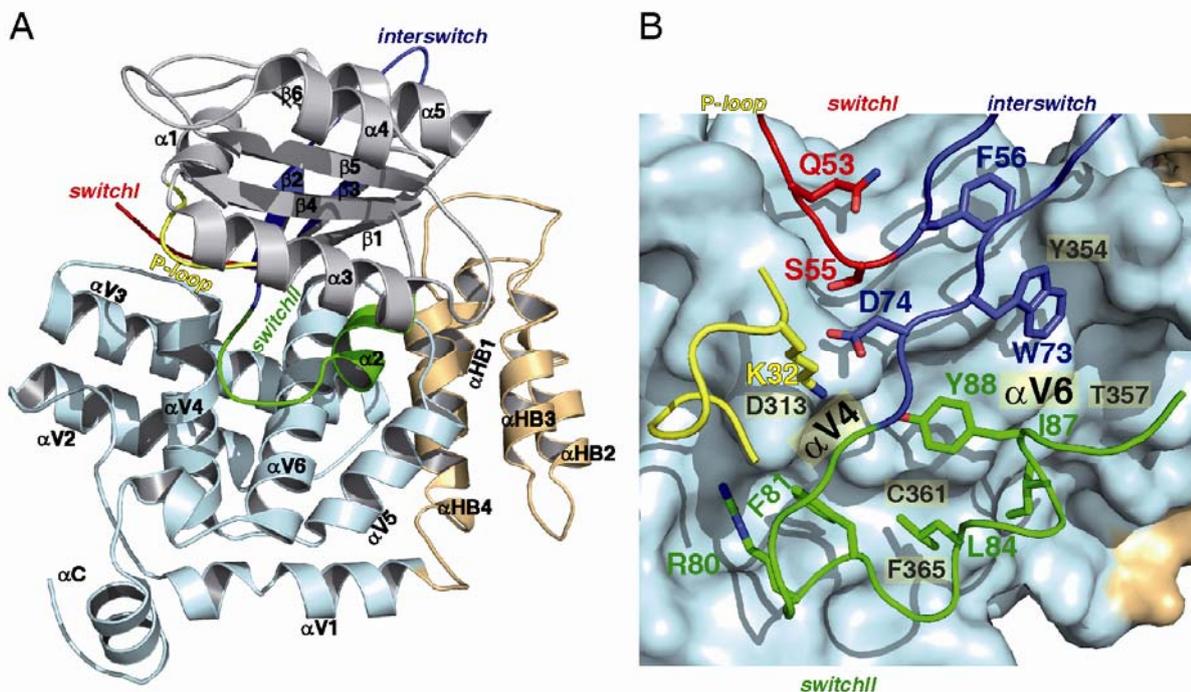


Abbildung 5: Struktur von Rabex-5 HB-VPS9 im Komplex mit nukleotidfreiem Rab21.

(A) Bändermodell der katalytisch aktiven Domäne von Rabex-5 bestehend aus der N-terminalen *Helical Bundle*-Domäne (α -Helices α HB1- α HB4; sand), der VPS9-Domäne (α -Helices α V1- α V6; hellblau) sowie einer C-terminalen kurzen α -Helix (α C). Rab21 (α 1- α 5 und β 1- β 6) ist in grau dargestellt mit den konservierten Strukturmotiven P-loop (gelb), *switch I* (rot), *switch II* (grün) sowie der *interswitch*-Region (blau). (B) Hydrophobe Wechselwirkungen von unpolaren Aminosäuren der *switch* und *interswitch*-Regionen von Rab21 in Stabdarstellung mit der hydrophoben Tasche zwischen den Helices α V4 und α V6 der VPS9-Domäne. Rabex-5 HB-VPS9 ist in Oberflächendarstellung gezeigt. Die konservierten Struktur motive von Rab21 sind wie in (A) farblich hervorgehoben. (Abbildungen adaptiert nach ⁴⁵).

Die Konformationsänderungen, welche durch den GDP-GTP-Austausch begleitet werden, wurden durch den Vergleich von nukleotidgebundenem Rab21 sowie der zuvor beschriebenen Komplexstruktur abgeleitet^{45,139}. Dabei sind vor allem drastische Änderungen in der Konformation der *switch*-Regionen sowie des P-loops zu beobachten. Im nukleotidfreien

Komplex nimmt der *P-loop* eine eingebrochene Konformation an, die durch ein Netzwerk intramolekularer, polarer Kontakte stabilisiert wird. Die *switch I*-Region nimmt dagegen eine offene Konformation an, die durch polare Interaktionen mit dem $\alpha V3$ - $\alpha V4$ loop stabilisiert wird. Die *switch II*-Region ist im Gegensatz zur GDP- bzw. GTP-gebundenen Form geordnet¹³⁹. Die beobachteten strukturellen Änderungen deuten auf eine durch die VPS9-Domäne-vermittelte Beschleunigung der GDP-Freisetzung durch eine Verdrängung des Magnesium-Ions durch Konformationsänderung in *switch I* und *switch II* in Kombination mit einer elektrostatischen Abstoßung zwischen dem β -Phosphat des GDP und dem invarianten Asp313 der VPS9-Domäne hin⁴⁵.

Durch eine umfangreiche Mutationsanalyse konservierter Aminosäurereste innerhalb von VPS9-Domänen enthaltenden Proteinen, die im Wesentlichen zum umgebenden Solvens exponiert sind, konnten vier Reste von Rabex-5 identifiziert werden (Asp313, Pro317, Tyr354 und Thr357), die sich nahe des N-Terminus von $\alpha V4$ und $\alpha V6$ konzentrieren (Abbildung 6). Die Mutation einer der vier Reste zu Alanin führt zu einer signifikanten Reduktion der Nukleotidaustauschaktivität von Rabex-5 gegenüber Rab5 und Rab21, wobei die Mutationen D313A (Aspartat zu Alanin) und Y354A (Tyrosin zu Alanin) die deutlichsten Effekte gegenüber Rab5 zeigen¹³². Es wird vermutet, dass die Unterschiede zwischen Rab5 und Rab21 auf eine ähnliche, jedoch keine identische Art der Interaktion mit Rabex-5 hinweisen¹³².

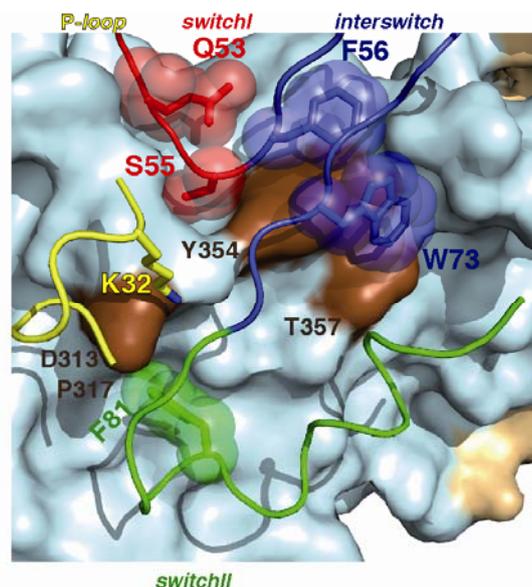


Abbildung 6: Nukleotidaustausch- und Spezifitäts-Determinanten von Rabex-5 und Rab21.

Korrelation der intermolekularen Kontakte zwischen Rabex-5-VPS9 und Rab21 mit kritischen Nukleotidaustausch- sowie Spezifitäts-Determinanten. Die VPS9-Domäne ist in Oberflächendarstellung gezeigt und die kritischen Nukleotidaustausch-Determinanten in braun hervorgehoben. Rab21 ist als Stab-Modell dargestellt und die konservierten Struktur motive wie in Abbildung 5A farblich hervorgehoben. Die kritischen Aminosäuren von Rab21 bezüglich der Nukleotidaustauschaktivität (F56, F81) sowie der Spezifität (Q53, S55) im Bezug auf Rabex-5 und W73 sind als halbtransparente Kugeln gezeigt. (Abbildung adaptiert nach⁴⁵).

Darüber hinaus wurden zwei Aminosäurereste von Rab5C (Ala57 und Tyr83, entsprechend Phe56 und Phe81 in Rab21) identifiziert, die für den Rabex-5-katalysierten Nukleotidaustausch von enormer Bedeutung sind (Abbildung 6). So führt die Substitution A57D (Alanin zu Aspartat) und die Substitution Y83A (Tyrosin zu Alanin) zu einer drastischen Verminderung des Rabex-5-katalysierten Nukleotidaustauschs ohne die intrinsische Austauschrate von Rab5C zu beeinflussen. Weiterhin wurde bezüglich der Spezifität der VPS9-Domäne für Mitglieder der Rab5-Subfamilie die strikte Notwendigkeit einer kleinen, nicht-aciden Aminosäure an Position 55 beschrieben, die dem invarianten Phe56 in *switch 1* vorausgeht (Abbildung 6). Während die Substitution von Ala55 in Rab5 mit Serin (analog zu Rab21 und Rab22) keinen Effekt hat, führt der Austausch zu Aspartat oder Glutamat (konserviert in nahezu allen anderen RabGTPasen) an dieser Stelle zu einer um den Faktor 200 verringerten Austauschaktivität¹³².

Aufgrund dieser umfangreichen strukturellen und biochemischen Daten bezüglich der Nukleotidaustauschaktivität diente Rabex-5 in der vorliegenden Arbeit in Kombination mit seinem Substrat Rab5A als Modellsystem zur Untersuchung der GEF-vermittelten Rekrutierung von Rab-Proteinen.

2.4.5. DrrA-vermittelte Rekrutierung und Aktivierung von Rab1

Aufgrund der hohen Spezifität für ein bestimmtes Rab-Protein oder eine Rab-Subfamilie und der organellenspezifischen Lokalisation stellen GEFs potentielle Kandidaten dar, um eine Lokalisation ihres Rabs an die Donormembran zu vermitteln.

Mit dem Protein DrrA/SidM (*defect in Rab recruitment/substrate of Icm/Dot M*; im Folgenden DrrA) aus *Legionella pneumophila* wurde das erste bakterielle GEF identifiziert, welches in der Lage ist Material vom ER der Wirtszelle zu rekrutieren, um dadurch eine sogenannte Legionellen-enhaltende Vakuole (LCV, *Legionella-containing vacuole*) zu generieren, in der das pathogene Bakterium sich repliziert. DrrA, welches über das Dot/Icm-Sekretionssystem des Bakteriums in die Wirtszelle injiziert wird, ist ein effizientes und hochspezifisches GEF für Rab1 und rekrutiert darüber hinaus Rab1 zur LCV¹⁴⁰.

Rab1, welches an Membranen des ER und des Golgi-Apparates lokalisiert, wird durch Koexpression mit dem die GEF-Domäne enthaltenden DrrA₆₁₋₆₄₇ zur Plasmamembran rekrutiert, wohingegen DrrA₄₅₁₋₆₄₇ (ohne GEF-Domäne) nicht in der Lage ist eine Relokalisation von Rab1 zur Plasmamembran zu induzieren (Abbildung 7). Aufgrund seiner Fähigkeit die Lokalisation von Rab1 zu beeinflussen, wurde zunächst angenommen, dass DrrA neben der das Rab-Protein aktivierenden GEF-Aktivität zusätzlich eine GDI-Freisetzungaktivität (GDF-Aktivität) besitzt, welche Rab1 aus dem zytosolischen Komplex mit GDI freisetzt und dadurch die Lokalisation und Membraninsertion des inaktiven GDP-gebundenen Rab1 vermittelt^{53,141}. Umfangreiche biochemische und strukturelle Untersuchungen des löslichen Proteins zeigten

jedoch, dass die GDF- und GEF-Aktivität von DrrA auf struktureller Ebene nicht voneinander getrennt werden kann und dass die GEF-Aktivität, welche den Aminosäuren 340-533 zugeordnet wird, ausreichend ist, um GDI effizient aus dem Komplex mit Rab1 freizusetzen^{59,142}.

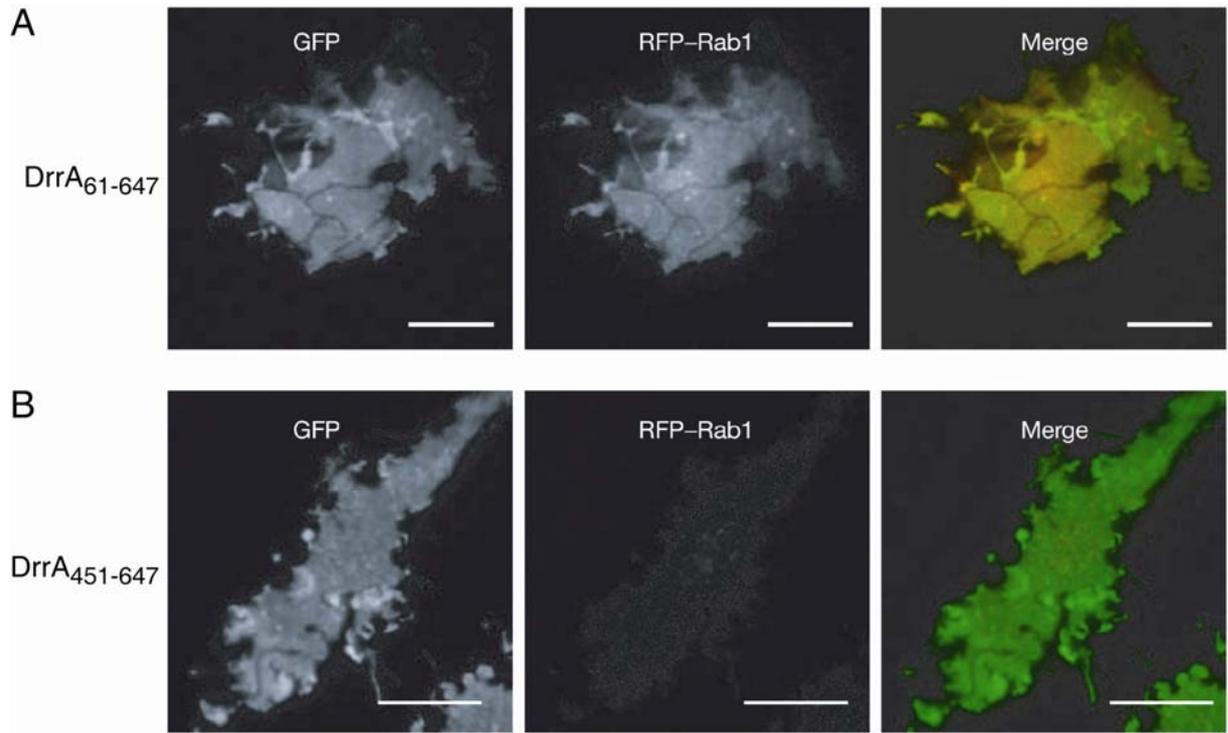


Abbildung 7: DrrA rekrutiert Rab1 zur Plasmamembran.

(A) TIRF-Mikroskopie Bilder (TIRF, *total internal reflection fluorescence*) zeigen eine Lokalisation von GFP-DrrA₆₁₋₆₄₇ und RFP-Rab1 an der Plasmamembran. (B) GFP-DrrA₄₅₁₋₆₄₇ lokalisiert an der Plasmamembran, aber es konnte keine Rekrutierung von Rab1 zur Plasmamembran detektiert werden. Maßstab 5 µm. (Abbildung adaptiert nach¹⁴³).

Die Kristallstruktur von nukleotidfreiem Rab1B₃₋₁₇₄ im Komplex mit DrrA₃₄₀₋₅₃₃ zeigt neben der typischen GTPase-Faltung von Rab1B eine neue 3-dimensionale Faltung der DrrA GEF-Domäne, die aus 8 α -Helices besteht, welche in zwei Schichten in einem Winkel von etwa 90° zueinander angeordnet sind. Dabei besteht die untere Schicht aus den parallelen Helices α_{1D} , α_{2D} , α_{6D} und α_{7D} , während die obere Schicht, überwiegend vermittelt durch die Helices α_{4D} und α_{5D} , die Hauptinteraktionsfläche mit Rab1B bilden (Abbildung 8A). Innerhalb der GEF-Domäne von DrrA existieren zwei Bindungsstellen, die im Wesentlichen Kontakte mit dem *P-loop* sowie den *switch*-Regionen von Rab1B bilden. Insbesondere interagieren dabei N451_D und R453_D der Bindungsstelle 1 mit den *P-loop* Aminosäuren S17_R und D16_R sowie die Reste D480_D und S483_D der Bindungsstelle 2 mit den Aminosäuren T34_R, E35_R und S36_R der *switch I*-Region¹⁴² (Abbildung 8B).

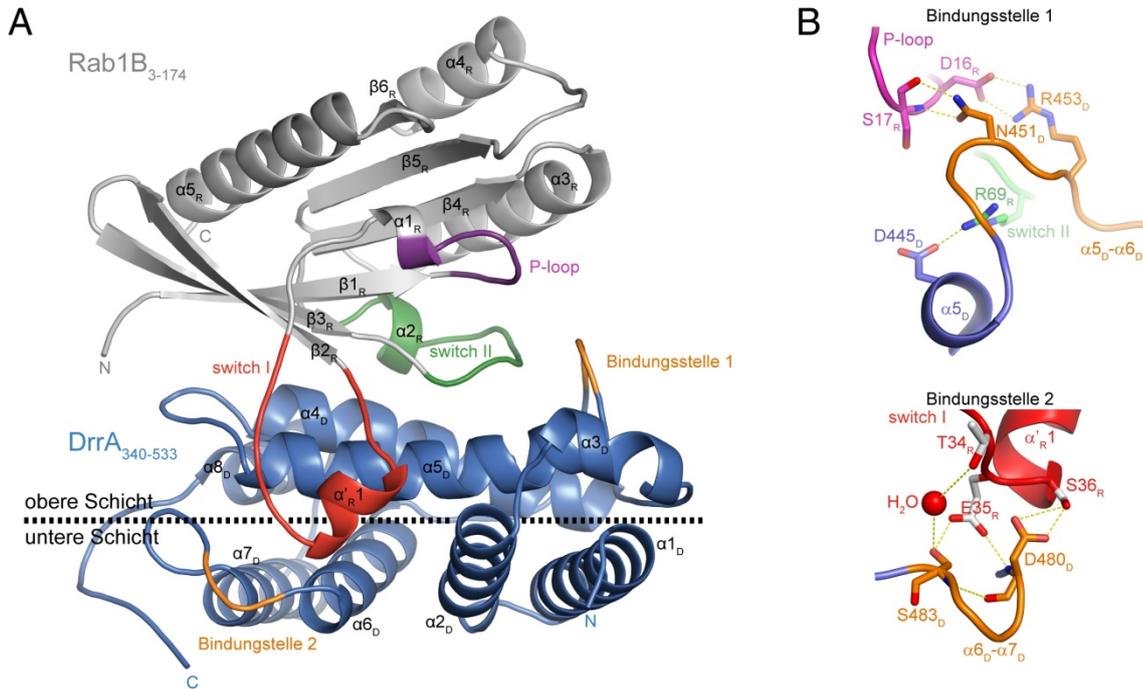


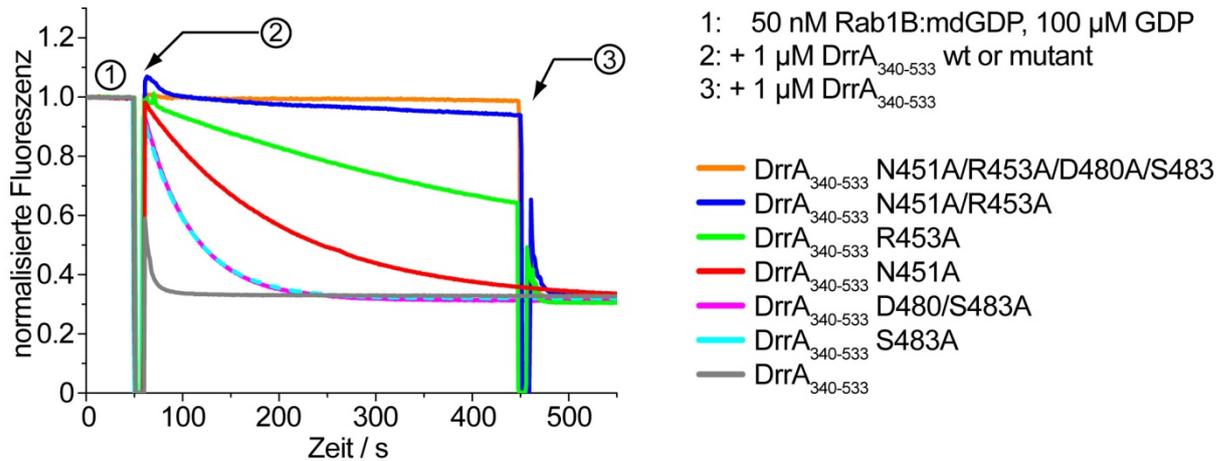
Abbildung 8: Kristallstruktur von DrrA₃₄₀₋₅₃₃ im Komplex mit Rab1B₃₋₁₇₄.

(A) Bändermodell der Kristallstruktur von DrrA₃₄₀₋₅₃₃ im Komplex mit Rab1B₃₋₁₇₄. Aufgrund der Bindung von DrrA₃₄₀₋₅₃₃ ist die Nukleotidbindetasche von Rab1B₃₋₁₇₄, welche von P-loop (magenta), switch I (rot) und switch II (grün) gebildet wird, zum Solvens exponiert. Rab1B₃₋₁₇₄ ist in grau, DrrA₃₄₀₋₅₃₃ in blau und die Bindungsstellen 1 und 2 sind in orange dargestellt. N: N-Terminus; C: C-Terminus. (B) Darstellung der Wechselwirkungen von DrrA₃₄₀₋₅₃₃ mit dem P-loop und switch II (oben, Bindungsstelle 1) bzw. der switch I-Region (unten, Bindungsstelle 2) von Rab1B₃₋₁₇₄. (Abbildung adaptiert nach ¹⁴²).

Basierend auf der Kristallstruktur und der Identifikation der an der Interaktion beteiligten Aminosäuren N451_D, R453_D, D480_D und S483_D erfolgte eine kombinatorische Mutationsanalyse und die Überprüfung der jeweiligen Mutanten bezüglich des GEF-katalysierten Nukleotidaustauschs gegenüber Rab1B. Dabei ist die Mutante N451A_D/R453A_D nahezu katalytisch inaktiv, während die Mutante D480A_D/S483A_D nur eine geringfügig verminderte Aktivität besitzt. Eine Kombination der genannten Mutationen zur Vierfachmutante N451A_D/R453A_D/D480A_D/S483A_D führt im Vergleich zur Mutante N451A_D/R453A_D lediglich zu einer minimalen Verringerung der GEF-Aktivität (Abbildung 9A). Dies demonstriert die hohe Bedeutung der Aminosäuren N451A_D und R453A_D der Bindungsstelle 1 für die GEF-Aktivität von DrrA. Die Überprüfung der genannten DrrA-Mutanten bezüglich ihrer Fähigkeit Rab1B, welches enzymatisch mit dem fluoreszenten Isoprenoid-Analogen Geranyl-NBD prenyliert wurde, aus dem Komplex mit GDI freizusetzen, zeigt, dass die vermeintliche GEF-Aktivität der DrrA-Mutanten in Analogie zur Verringerung der GEF-Aktivität abnimmt

(Abbildung 9B). Diese Untersuchungen demonstrierten, dass die GEF-Aktivität von DrrA notwendig und ausreichend ist, um GDI aus dem Komplex mit Rab1B freizusetzen¹⁴².

A Nukleotidaustauschaktivität von DrrA₃₄₀₋₅₃₃ Mutanten



B GDI-Freisetzungaktivität von DrrA₃₄₀₋₅₃₃ Mutanten

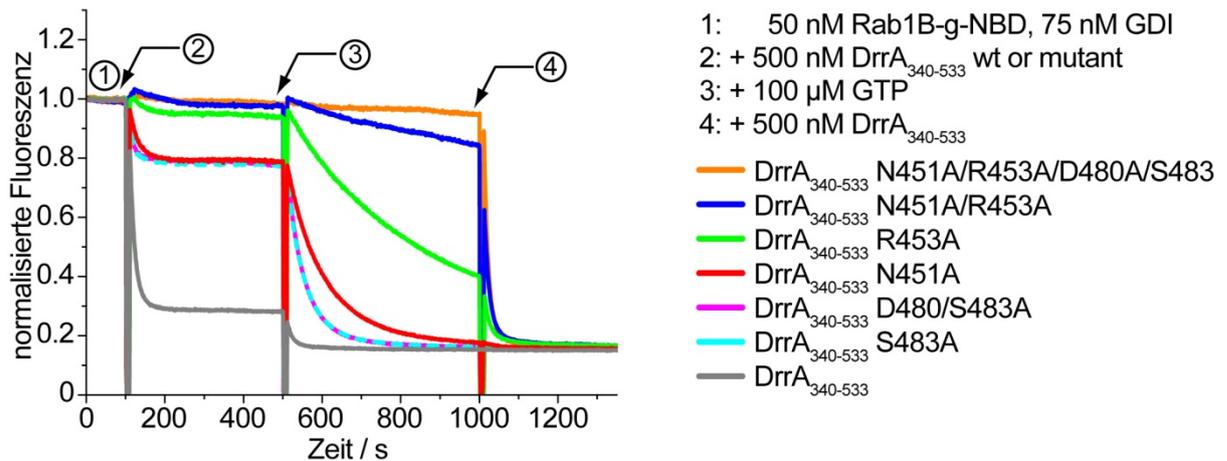


Abbildung 9: Nukleotidaustausch- und GDI-Freisetzungaktivität von DrrA₃₄₀₋₅₃₃-Mutanten.

(A) Der Einfluss der DrrA₃₄₀₋₅₃₃-Mutanten (1 μ M) bezüglich der Nukleotidaustauschaktivität wurde in Gegenwart von 100 μ M GDP gegenüber Rab1B:mantGDP durch Messung der Fluoreszenz der mant-Gruppe bestimmt. Nach 450 s wurde wildtypisches (wt) DrrA₃₄₀₋₅₃₃ zur Bestimmung des Endpunktes der Nukleotidaustausch-Reaktion zugefügt. (B) Die Freisetzung von GDI aus dem Komplex mit Rab1B-geranyl-NBD vermittelt durch die DrrA₃₄₀₋₅₃₃-Mutanten wurde durch Messung der NBD-Fluoreszenz bestimmt. Die unterschiedlichen Bindungsaffinitäten für Rab1B spiegeln sich in den unterschiedlichen Basislinien wieder, welche vor der Zugabe von GTP erreicht wurden. Das Ausmaß der Verringerung der Nukleotidaustauschaktivität (A) der DrrA₃₄₀₋₅₃₃-Mutanten korreliert mit einer verminderten GDI-Freisetzungaktivität (B). (Abbildung adaptiert nach ¹⁴²).

In Analogie zu anderen Ras-ähnlichen GTPasen katalysiert DrrA die Nukleotidfreisetzung nach einem ähnlichen Mechanismus¹⁸, indem es strukturelle Änderungen in Rab1B₃₋₁₇₄ induziert und dadurch die Nukleotidaffinität verringert, die schließlich die Freisetzung des Nukleo-

tids bewirkt. Jedoch beschleunigt DrrA, im Gegensatz zu bislang identifizierten RabGEFs, die intrinsische Nukleotidfreisetzung um mehr als fünf Größenordnungen und stellt damit ein hocheffizientes GEF dar^{46,142,144}. Diese hohe katalytische Effizienz bakterieller GEFs ist nicht unüblich, da diese mit den endogenen GEFs konkurrieren und diese daher in ihrer Effizienz übertreffen müssen, um die Pathogenität zu gewährleisten¹⁴².

Ein struktureller Vergleich von Rab1B₃₋₁₇₄:DrrA₃₄₀₋₅₃₃ mit dem Rab1-Homolog aus *S. cerevisiae* Ypt1 im Komplex mit GDI verdeutlicht, dass die Bindestelle von Rab1B durch GDI blockiert ist. Das bedeutet, dass DrrA mit GDI um die gleiche Bindestelle konkurriert und beide Proteine daher nicht gleichzeitig binden können. Aufgrund dessen kann DrrA erst nach Dissoziation von GDI aus dem Komplex mit Rab1B binden und den Nukleotidaustausch katalysieren. Obwohl der Komplex zwischen Rab1B und GDI sehr fest ist ($K_D = 1-12$ nM), liegt die intrinsische Halbwertszeit der Dissoziation im Bereich von 7-100 s. Daraufhin wurde postuliert, dass die intrinsische Dissoziationsrate ausreichend ist, um eine Assoziation von DrrA mit Rab1 zu ermöglichen. Aufgrund der hohen katalytischen Effizienz kann DrrA umgehend den Austausch von GDP zu GTP katalysieren¹⁴². Weitere Untersuchungen bestätigen, dass die Affinität von GDI zu GTP-gebundenem Rab um mindestens drei Größenordnungen niedriger ist als für die GDP-gebundene Form, wodurch eine Rückbindung von GDI nach Aktivierung verhindert wird. Da die Dissoziation von Rab:GDP:GDI-Komplexen im Vergleich zur anschließenden GEF-katalysierten Nukleotidfreisetzung langsam ist, stellt diese vermutlich den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt dar⁵⁹.

2.4.6. Domänenstruktur und Lokalisationssignale von Rabex-5

Die Ergebnisse des DrrA-vermittelten Nukleotidaustauschs und der Freisetzung von GDI aus dem Komplex mit Rab1B deuten darauf hin, dass die Frage nach der Lokalisation von Rab-Proteinen möglicherweise durch die Frage nach der Lokalisation des entsprechenden GEFs ersetzt werden kann⁵⁹. Für Rabex-5 ist das bereits weitestgehend gut verstanden. Rabex-5 ist ein Multidomänenprotein und enthält neben der bereits in Kapitel 2.4.4 beschriebenen katalytisch aktiven GEF-Domäne, bestehend aus der N-terminalen *Helical Bundle*-Domäne und der VPS9-Domäne, weitere für die Funktion und Lokalisation notwendige Domänen (Abbildung 10).

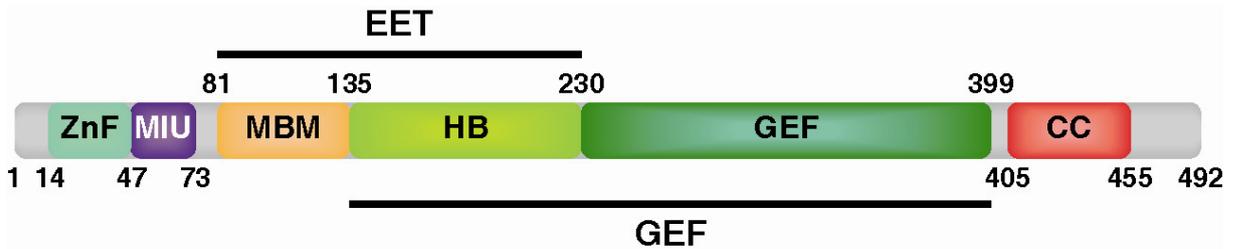


Abbildung 10: Schematische Domänenstruktur von Rabex-5.

ZnF (A20-Zinkfingerdomäne; AS 14-47), MIU (*motif interacting with Ubiquitin*; AS 47-73), MBM (*membrane-binding motif*, AS 81-135), HB (*helical bundle*-Domäne, AS 135-230), EET (*early endosomal targeting*-Domäne; AS 81-230), VPS9 (*vacuolar protein sorting 9*-Domäne, AS 230-399), CC (*coiled-coil*-Domäne, AS 405-455). (Abbildung adaptiert nach ¹⁴⁵).

Am N-Terminus befindet sich eine Ubiquitin-bindende A20-Zinkfingerdomäne (ZnF, AS 14-47) sowie eine angrenzende α -Helix (AS 47-73)^{146,147}, die eine hohe Ähnlichkeit zum bereits charakterisierten UIM (*Ubiquitin-interacting motif*) vieler Ubiquitin-bindenden Proteine aufweist¹⁴⁸⁻¹⁵⁰. Aufgrund der invertierten Orientierung bezüglich der Aminosäuresequenz wird sie jedoch als MIU (*motif interacting with Ubiquitin*) bezeichnet¹⁴⁷. Die genannten Ubiquitin-bindenden-Domänen (UBD) binden jedoch an unterschiedlichen Seiten. Während die MIU-Domäne mit dem klassischen Ile44-*patch* von Ubiquitin interagiert, bindet die ZnF-Domäne von Rabex-5 über eine polare Kontaktfläche, welche um Asp58 von Ubiquitin konzentriert ist^{146,147}. Rabex-5 bindet an den membranständigen EGFR (*epidermal growth factor receptor*), welcher ubiquitiniert wird, und diese Interaktion ist abhängig von der ZnF-Domäne oder der MIU-Domäne¹⁴⁷. Daher wurde postuliert, dass durch Bindung membranständiger, ubiquitinerter Proteine die Lokalisation von Rabex-5 reguliert wird¹⁵¹. Es konnte bestätigt werden, dass die Bindung an Ubiquitin für die Rekrutierung von Rabex-5 aus dem Zytosol zu den Endosomen essentiell ist, und dass dieser Prozess unabhängig ist von der GEF-Aktivität und von Rab5¹⁵². Dagegen lokalisiert monoubiquitiniertes Rabex-5 überwiegend im Zytosol, wobei die ZnF-Domäne selbst eine Ubiquitinligase (E3)-Aktivität besitzt¹⁵³. E3 Enzyme spezifizieren dabei neben der zeitlichen Regulation auch die Selektion des Substrats und sind demzufolge Schlüsselkomponenten der Ubiquitinierungsreaktion¹⁵⁴. Dies bietet die Möglichkeit, dass Rabex-5 seine eigene intramolekulare Ubiquitinierung katalysiert¹⁵³.

Diese Beobachtungen mündeten in einem Modell, in dem die Bindung an Ubiquitin und die Monoubiquitinierung die Assoziation von Rabex-5 mit Endosomen regulieren. Dabei wird Rabex-5 durch Interaktion mit ubiquitinierten, transmembranen Frachtmolekülen (oder ubiquitinierten Adapterproteinen, welche an diese Frachtmoleküle binden) zu den Endosomen rekrutiert. Der Transport des Frachtmoleküls, gefolgt von der UBD-abhängigen Monoubiquitinierung, resultiert in der Dissoziation von Rabex-5 von der Membran und der

Translokation ins Zytosol, wobei eine UBD wahrscheinlich mit dem kovalent verknüpften Monoubiquitin intramolekular interagiert. An den Endosomen lokalisierte deubiquitinierende Enzyme – wie beispielsweise AMSH und UBPY¹⁵⁵ – katalysieren vermutlich die Entfernung des Ubiquitins und ermöglichen dadurch einen neuen Zyklus¹⁵⁶.

Darüber hinaus konnte eine weitere sogenannte EET-Domäne (*early endosomal targeting*; AS 81-230) identifiziert werden, welche ebenfalls eine endosomale Lokalisation vermittelt. Diese besteht aus einer membranbindenden Domäne (MBM, *membrane-binding motif*; AS 81-135) sowie der bereits erwähnten *Helical Bundle*-Domäne (AS 135-230)¹⁴⁵. Am C-Terminus folgt auf die für die GEF-Aktivität essentielle VPS9-Domäne (AS 230-399) schließlich eine *coiled-coil*-Domäne (CC; AS 405-455), welche die Interaktion mit Rabaptin-5 vermittelt. Rabex-5 zeigt *in vitro* nur eine geringe GEF-Aktivität, wohingegen der Rabex-5:Rabaptin-5-Komplex eine höhere katalytische Effizienz aufweist^{46,157}. Darüber hinaus ist die katalytisch aktive Domäne *in vitro* ebenfalls hoch aktiv¹³². Diese Beobachtungen führten zur Hypothese eines Autoinhibitions-Mechanismus in dem bestimmte Domänen innerhalb von Rabex-5 die GEF-Aktivität inhibieren und Rabaptin-5 durch Bindung diese Inhibition aufhebt⁴⁵. Weiterhin wurde jedoch vermutet, dass zugegebenes Rabaptin-5 in den *in vitro*-Messungen zu einer Stabilisierung des möglicherweise sonst instabilen Rabex-5 führt, da *in vivo* die Notwendigkeit für Rabaptin-5 umgangen werden kann und die Membranrekrutierung sowie die Aktivierung von Rab5 unabhängig von Rabaptin-5 stattfinden können. Darüber hinaus ist die Membranassoziation von Rabex-5 essentiell für die *in vivo* GEF-Aktivität¹⁵⁸.

Neben einer direkten Lokalisation an den Endosomen vermittelt durch die EET-Domäne stellt die Interaktion mit Rabaptin-5 einen indirekten Rekrutierungs-Mechanismus dar. Die direkte Lokalisation ist vermutlich notwendig, um ein basales Level aktivierter Rab5-Moleküle zu generieren. Diese wiederum interagieren daraufhin mit Rabaptin-5:Rabex-5, wodurch weitere Rab5-Moleküle aktiviert werden. Dadurch wird sehr effektiv eine sogenannte positive *Feed-back*-Schleife zur Akkumulation von Rab5:GTP erzeugt, die schließlich zur Etablierung funktionaler Rab5-Domänen auf der Endosomen-Membran führt¹⁵⁸⁻¹⁶⁰.

Lokalisationssignale, die eine Rekrutierung zu bestimmten Organellen oder Subdomänen einer Organellenmembran vermitteln, konnten auch in anderen Nukleotidaustauschfaktoren identifiziert werden. So kodiert der C-terminale Bereich des Legionellenproteins DrrA (AS 544-647) für eine P4M-Domäne (*phosphatidylinositol-4-phosphate binding of SidM/DrrA*), die eine Interaktion mit Phosphatidylinositol-4-Phosphat (PI4P) vermittelt, welches in der Membran der LCV angereichert ist und dadurch die Rekrutierung und Verankerung von DrrA in der LCV-Membran bewirkt¹⁶¹. Darüber hinaus führt die Überexpression von DrrA in CHO-Zellen zu einer Lokalisation an der Plasmamembran (Abbildung 7)¹⁴³. Für die meisten der bislang identifizierten GEFs konnte eine Membranlokalisation gezeigt werden. In

vielen Fällen sind jedoch die Regulation und der Mechanismus der Membranassoziation unbekannt.

2.4.7. Rabin8 ist ein Rab8-spezifisches GEF

Für den Rab8-spezifischen Nukleotidaustauschfaktor Rabin8 konnte eine Kollokalisierung mit kortikalem Aktin gezeigt werden, jedoch sind die Regulationsmechanismen, die eine Aktin-Assoziation bzw. Membranlokalisierung vermitteln weitestgehend unklar. Die Kollokalisierung der beiden Proteine erfolgt sowohl an peripheren Filamenten und in sogenannten *protrusions* und *ruffles* an der Plasmamembran. Nach Behandlung Rabin8-transfizierter Zellen mit Nocodazol, einer Mikrotubuli-Polymerisation inhibierenden Substanz, wird Aktin in Fibrillenbündeln (*stress fibers*) inkorporiert, während Rabin8 weiterhin an der Plasmamembran lokalisiert⁶⁷. Das Rabin8 Substrat Rab8 weist ebenfalls eine polarisierte Lokalisation an der Spitze von *protrusions* auf und es wurde gezeigt, dass sowohl Rab8 als auch Rabin8 am polarisierten Transport von Membranproteinen zur Plasmamembran durch Reorganisation von Aktin und Mikrotubuli beteiligt sind^{67,162-164}.

Darüber hinaus sind Rabin8 und Rab8 neben der Exozytose essentiell für die primäre Ciliogenese und spielen eine entscheidende Rolle im Membran-Recycling¹⁶⁵⁻¹⁶⁸.

Für Rabin8 wurde eine spezifische GEF-Aktivität gegenüber Rab8, nicht jedoch Rab3A und Rab5 nachgewiesen⁶⁷.

Die Aufklärung der Struktur der GEF-Domäne des Rabin8-Homologs Sec2p aus *S. cerevisiae* im Komplex mit dem Rab8-Homolog Sec4p zeigt eine parallele *coiled-coil*-Struktur der Sec2p GEF-Domäne und deutet auf einen Mechanismus hin, in dem Sec2p drastische strukturelle Veränderungen in den *switch*-Regionen und dem *P-loop* induziert, die inkompatibel mit einer Nukleotidbindung sind und somit zur Freisetzung des Nukleotids führen¹⁶⁹.

Die Rab8-bindende Region von Rabin8 konnte zunächst eingegrenzt werden auf die AS 101-316⁶⁷ und die minimale GEF-Domäne wurde durch einen Sequenzvergleich mit Sec2p abgeleitet und den AS 84-255 zugewiesen¹⁶⁹⁻¹⁷¹.

2.4.8. Rab3GEP-vermittelte Lokalisation von Rab27A

In ersten zellbiologischen Experimenten bezüglich der GEF-vermittelten Rekrutierung von Rabs wurde die Rolle des GEFs Rab3GEP auf die Lokalisation von Rab27A in Melanozyten untersucht¹⁷². Rab27A reguliert den Transport von Melanosomen in Melanozyten sowie die Exozytose sekretorischer Vesikel in zytotoxischen T-Zellen, Mastzellen und pankreatischen β -Zellen^{81,173-177}. Die Funktion von Rab27A in dieser Vielzahl von Transportwegen wird durch die Interaktion mit diversen Effektoren erreicht. Bislang konnten 11 Effektoren identifiziert werden, die einer von 4 Untergruppen zugeordnet werden. Einige Effektoren, wie beispielsweise Mlph/Slac2a und MyRIP/Slac2c, fungieren als Adpatermoleküle, die der Verknüpfung von Rab27A mit Myosinmotormolekülen dienen und bis auf Munc13-4 enthalten alle Effektoren eine konservierte N-terminale Rab27-Bindedomäne (Rab27BD)¹⁷⁸.

Aktiviertes Rab27A bildet einen ternären Komplex mit Mlph und dem Myosinmotor MyoVa. Die Deletion einer der drei Komponenten führt zur Akkumulation von Melanosomen in der perinukleären Region, wie in isolierten Melanozyten der Maus-Mutanten *ashen* (Rab27A-defizient), *leaden* (Mlph-defizient) und *dilute* (MyoVa-defizient) beobachtet werden konnte¹⁷⁹. Nach Identifizierung von Rab3GEP, ursprünglich isoliert als Rab3A GEF¹⁸⁰, als nicht-redundantem GEF für Rab27A in Melanozyten, wurde gezeigt, dass eine Rab3GEP-Depletion ebenfalls zu einer Akkumulation von Melanosomen in der perinukleären Region sowie einer fehlenden Rab27A-Aktivierung führt¹⁸¹.

Weiterhin führt die siRNA-vermittelte Rab3GEP-Depletion zu einem Verlust der Lokalisation von Rab27A an Melanosomen, obwohl Rab27A weiterhin membrangebunden ist. Trotz einer durch Mlph-Depletion induzierten Akkumulation von Melanosomen in der perinukleären Region lokalisiert Rab27A in diesem Fall nach wie vor an Melanosomen. Der Nukleotidaustauschfaktor Rab3GEP ist demnach notwendig für die Lokalisation von Rab27A an Melanosomen und der Effektor Mlph besitzt keinen Einfluss bezüglich der Rekrutierung von Rab27A. Durch Erzeugung verschiedener Mutanten, die eine Bindung zu den bislang identifizierten Effektoren unterbinden, und Analyse der subzellulären Lokalisation konnte außerdem demonstriert werden, dass die Effektorbindung im Allgemeinen keinen Einfluss auf die Rekrutierung von Rab27A besitzt¹⁷².

Die Tatsache, dass eine Rab27A-Mutante, die in der die SF2-Region durch die entsprechende Sequenz von Rab5A ersetzt wurde, nicht an den Melanosomen lokalisiert, obwohl sie *in vitro* nach wie vor GEF-Aktivität besitzt, führte zur Hypothese, dass Rab3GEP zwar notwendig, jedoch nicht ausreichend ist für eine Rekrutierung von Rab27A zu Melanosomen¹⁷².

3. Zielsetzung

Eine charakteristische Eigenschaft von Rab-Proteinen ist die spezifische subzelluläre Lokalisation auf der zytoplasmatischen Seite distinkter Organellen. Die C-terminale posttranslationale Modifikation von Rabs mit zumeist zwei Geranylgeranylresten ermöglicht die reversible Assoziation mit Endomembranen. Im Zytosol liegen Rab-Proteine im Komplex mit dem Solubilisierungsfaktor GDI vor, der die hydrophoben Prenylgruppen gegen das wässrige Milieu des Zytosols abschirmt. Der Mechanismus der spezifischen Membranlokalisation von Rab-Proteinen und der Dissoziation von Rab:GDP:GDI-Komplexen sowie der Identifikation entsprechender Determinaten ist nach wie vor Gegenstand aktueller Forschung. Aufgrund der hohen Affinität von Rab:GDP:GDI-Komplexen wurde die Existenz von sogenannten GDI-Verdrängungsfaktoren postuliert, wobei bislang nur für Yip3/PRA1 eine entsprechende Aktivität gezeigt werden konnte.

Mit dem Legionellenprotein DrrA wurde ein Protein identifiziert, dem zunächst eine GEF- und eine GDF-Aktivität zugeschrieben wurde und dass in der Lage ist Rab1 von seiner nativen Lokalisation von Membranen des ER zur LCV zu rekrutieren.

Es konnte jedoch gezeigt werden, dass DrrA keine diskrete GDF-Aktivität besitzt, sondern dass die GEF-Aktivität von DrrA ausreicht, um GDI effizient aus dem Rab1:GDP:GDI-Komplex freizusetzen. Da GDI eine um mindestens drei Größenordnungen geringere Affinität zu Rab:GTP im Vergleich zu Rab:GDP besitzt, wird durch die Aktivierung eine Rückbindung an GDI verhindert. Dies führte zur Hypothese, dass GEFs prinzipiell in der Lage sind ihr spezifisches Rab-Protein zu einer distinkten Membran zu rekrutieren.

Daher sollte in der vorliegenden Arbeit unter Verwendung eines durch das Rapamycin-Analogon A/C Heterodimerizer induzierbares System verwendet werden, um in eukaryotischen Zellen das humane Rab5-GEF Rabex-5 von den Endosomen zur Mitochondrienmembran zu lokalisieren und die Auswirkung dieser Fehllokalisation auf die subzelluläre Lokalisation von Rab5 zu analysieren. Des Weiteren sollte unter Verwendung von Rabex-5- und Rab5A-Mutanten der Einfluss der GEF-Aktivität auf die Rab-Lokalisation näher charakterisiert werden.

Die biochemische Charakterisierung der GDI-Freisetzung aus dem Rab5:GDP:GDI-Komplex durch verschiedene Rabex-5-Mutanten mit modulierter GEF-Aktivität sollte weiterhin Aufschluss über eine Korrelation der GEF-Aktivität mit der GDI-Freisetzung sowie der Fähigkeit zur Membranrekrutierung des Rabs durch das GEF geben. Darüber hinaus sollte der Einfluss der GEFs DrrA und Rabin8 auf die spezifische Lokalisation ihrer Substrate Rab1 und Rab8 und der Einfluss der GEF-Aktivität charakterisiert werden, um eine Aussage über die mögliche Generalisierung der GEF-vermittelten Membranlokalisation von Rabs zu treffen.

4. Material und Methoden

4.1. Materialien

4.1.1. Chemikalien

Tabelle 4: Chemikalien

Chemikalien	Hersteller
Acrylamid 4K-Lösung (30 %; Mix 37,5:1), Dikaliumhydrogenphosphat, Isopropyl- β -D- thiogalaktopyranosid (IPTG), Methanol, Salzsäure (25 %)	Applichem (Darmstadt, Deutschland)
Bacto-Agar, Bacto-Trypton, Bacto Hefeextrakt	Difco Voigt Global Distribution Inc. (Lawrence, USA)
Carbenicillin	Biomol GmbH (Hamburg, Deutschland)
Glycin, Paraformaldehyd, N, N, N', N - Tetramethylethyldiamin (TEMED), Tri- (hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
6X DNA Loading Dye, dNTPs (10 mM each)	Fermentas (St. Leon-Rot, Deutschland)
Ampicillin, Dithioerythritol (DTE), Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA), Glycerin, 4-(2- Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethansulfonsäure (HEPES), Kanamycinsulfat, Natriumdodecylsulfat (SDS)	Gerbu (Gaiberg, Deutschland)
AEBSF Protease Inhibitor, TCEP	Gold BioTechnology (St. Louis, USA)
Essigsäure, Ethanol, Kaliumchlorid, Kaliumdihydrogen- phosphat, Magnesiumchlorid, Natronlauge (2 M), 2- Propanol, Salzsäure (1 M)	J. T. Baker/Maliinckrodt Baker B. V. (Deventer, Nieder- lande)
RedSafe	iNtRON Biotechnology (Sangdaewon-dong, Südkorea)
Agarose	Invitrogen (Darmstadt, Deutschland)
Dinatriumhydrogenphosphat, Imidazol	Merck (Darmstadt, Deutschland)
GS96-Medium, Natriumdihydrogenphosphat	MP Biomedicals (Solon, USA)
Ammoniumpersulfat (APS), Bromphenolblau, Coomas- sie Blue R 250, β -Mercaptoethanol	Serva (Heidelberg, Deutschland)
Farnesyl-Pyrophosphat-Ammoniumsalz, Laktose, Glu- kose, Guanosindiphosphat (GDP), Guanosintriphosphat (GTP), Guanosin-5'- β , γ -imidotriphosphat (GppNHp) Natriumchlorid	Sigma-Aldrich (München, Deutschland)

4.1.2. Sonstige Materialien

Tabelle 5: sonstige Materialien

Verbrauchsmaterial	Hersteller
Zellkulturflaschen (75 cm ²), 12-Well Multiwell-Zellkulturplatten, Petrischalen	Becton Dickinson (Franklin Lakes, USA)
Reaktionsgefäße (0,5 mL, 1,5 mL, 2,0 mL)	Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)
Quartz-Küvette 109.004F-Qs, 10 mm	Hellma GmbH (Mülheim, Deutschland)
Amicon Ultra Zentrifugen-Filtereinheiten (10 kDa)	Merck Millipore Ltd. (Tullagreen, Irland)
Pipettenspitzen (1-10 µL, 20-200 µL, 100-1000 µL)	Nerbe Plus GmbH (Winsen/Luhe, Deutschland)
Elektroporationsküvetten	peqlab Biotechnologie GmbH (Erlangen, Deutschland)
Dialysemembranen	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
Halb-Mikro-Küvetten, sterile Plastikpipetten, Reaktionsgefäße (15 mL, 50 mL)	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
LabTek 4-Well Chamber slides	Thermo Electron LED GmbH, Langenselbold, Deutschland)
Bottle Top Filter, SuperFrost microscope slides (Objektträger)	Thermo Fisher Scientific Inc. (Rochester, USA)

4.1.3. Molekularbiologische Kits

Tabelle 6: Molekularbiologische Kits

Kit	Hersteller
QuikChange II XL Site-directed Mutagenesis Kit	Agilent Technologies (Waldbronn, Deutschland)
BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit	Life Technologies (Darmstadt, Deutschland)
Coomassie Protein Assay Reagent Kit	Pierce (Rockford, USA)
DyeEx 2.0 Spin Kit, QIAfilter Plasmid Maxi Kit, QIAprep Spin Miniprep Kit, QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen (Hilden, Deutschland)

4.1.4. Proteine und Größenstandards

Tabelle 7: Proteine und Größenstandards

Größenstandard	Hersteller
Rinderserumalbumin (BSA)	Cell Signaling Technology, Inc. (Danvers, USA)
FastDigest Restriktionsenzyme, Gene Ruler 1 kb DNA Ladder, T4 DNA Ligase	Fermentas (St. Leon-Rot, Deutschland)
DNase I	Roche Applied Science (Mannheim, Deutschland)
RedTaq DNA-Polymerase	Sigma-Aldrich (München, Deutschland)
LMW Calibration Kit for SDS electrophoresis	GE Healthcare (München, Deutschland)

GGTaseI ($\alpha+\beta$) wurde von Nathalie Bleimling isoliert und zur Verfügung gestellt. GDI wurde von Lena Oesterlin isoliert und zur Verfügung gestellt^{37,142,182}.

4.1.5. Geräte

Tabelle 8: Geräte

Gerät	Hersteller
Avanti J-20 XP, Rotor JLA 8.100 & JA 25.50 , Vi-Cell XR Zellzähler	Beckman Coulter, Inc. (Brea, USA)
Brutschrank	Binder GmbH (Tuttlingen, Deutschland)
MicroPulser, Molecular Imager Gel Doc XR System, Mini-PROTEAN II System, PowerPac Basic Power Supply	Bio-Rad Laboratories GmbH (München, Deutschland)
Zelldisruptor <i>One-Shot</i> -Modell	Constant System Ltd. (Daventry, UK)
Thermoblock comfort, Tischzentrifuge 5415 D, Zentrifuge 5810 R, Eppendorf Research Pipetten (0,1-2,5 µL, 0,5-10 µL, 2-20 µL, 20-200 µL, 100-1000 µL)	Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)
Fluorescent Image Analyzer FLA-5000	Fujifilm Holdings Corporation (Tokyo, Japan)
FluoroMax-3	Horiba Jobin Yvon Inc. (Edison, USA)
RCT basic Heizplatte mit Magnetrührer	IKA Werke GmbH & Co. KG (Staufen, Deutschland)
Vakuum Membranpumpe	Ilmvac GmbH (Ilmenau, Deutschland)
Schüttelinkubatoren	Infors AG (Bottmingen, Schweiz)
Absaugsystem VACUSAFE comfort, Pipettierhilfe Pipetboy acu	Integra Biosciences GmbH (Fernwald, Deutschland)
pH Meter 761 Calimatic	Knick Elektronische Messgeräte GmbH & Co. KG (Berlin, Deutschland)
Leica DM-IRB-, Leica TCS SP5-Mikroskop	Leica Microsystems (Wetzlar, Deutschland)
ABI PRISM 3130x1 Genetic Analyzer	Life Technologies (Darmstadt, Deutschland)
Analysenwaage AM100	Mettler-Toledo GmbH (Giessen, Deutschland)
NuAire Autoflow-Inkubator	NuAire (Plymouth, USA)
NanoDrop ND-1000 Spektralphotometer, Primus96 advanced-Thermocycler	peqlab Biotechnologie GmbH (Erlangen, Deutschland)
QiaCube	Qiagen (Hilden, Deutschland)
Genesys 20 Spektralphotometer	Thermo Fisher Scientific Inc. (Rochester, USA)
Waage Kern 572	Waagen Strathausen (Holzwickede, Deutschland)
HPLC System (600 S Controller, 626 Pump, 717 plus Autosampler, 2487 Dual λ Absorbance Detector, Fraction Collector III)	Waters Corp. (Milford, USA)

4.1.6. Chromatographiesäulen und –materialien

Tabelle 9: Chromatographiesäulen und –materialien

Säulen/Säulenmaterial	Hersteller
HisTrap FF Crude-Säulen (1 mL), HiLoad Superdex 75 26/60, Superdex 200 10/30 GL	GE Healthcare (München, Deutschland)

4.1.7. Puffer und Lösungen

Tabelle 10: Puffer und Lösungen

Puffer und Lösungen	Zusammensetzung
Lyse-Puffer	50 mM HEPES, pH 8,0 300 mM NaCl 1 mM TCEP 20 mM Imidazol 0,5 mM AEBSF Protease Inhibitor 40 Units/mL DNase I
Wasch-Puffer	50 mM Na-Phosphat, pH 8,0 300 mM NaCl 1 mM TCEP 20 mM Imidazol
Cleavage-Puffer	50 mM HEPES, pH 8,0 150 mM NaCl 1 mM TCEP
Gelfiltrationspuffer (Rab5-Aufreinigung)	25 mM HEPES, pH 7,5 200 mM NaCl 1 mM TCEP 1 mM MgCl ₂ 1 µM GDP 5 % Glycerol
Gelfiltrationspuffer (Rabex-5-Aufreinigung)	25 mM HEPES, pH 7,5 40 mM NaCl 1 mM TCEP
Gelfiltrationspuffer (Prenylierung)	20 mM HEPES, pH 7,2 500 mM NaCl 2 mM MgCl ₂ 2 mM DTE 10 µM GDP
SDS-PAGE Trenngelpuffer	1,5 M Tris-HCl, pH 8,8 0,4 % (w/v) SDS

Puffer und Lösungen	Zusammensetzung
SDS-PAGE Sammelgelpuffer	0,5 M Tris-HCl, pH 6,8 0,4 % (w/v) SDS
2x SDS-PAGE Probenpuffer	100 mM Tris-HCl, pH 6,8 4 % (w/v) SDS 20 % (v/v) Glycerin 0,2 % (w/v) Bromphenolblau 5 % β -Mercaptoethanol
SDS-PAGE Laufpuffer	25 mM Tris 0,19 M Glycin 0,1 % (w/v) SDS
SDS-PAGE Färbelösung	44 % (v/v) Ethanol 12 % (v/v) Essigsäure 0,15 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue R250
Paraformaldehyd (PFA)-Fixierungslösung	4 % (w/v) Paraformaldehyd 10 mM NaOH 10 % (v/v) 10x DPBS pH 7,4 (mit HCl)
PBS	137 mM NaCl 2,68 mM KCl 10,1 mM Na_2HPO_4 1,76 mM KH_2PO_4 pH 7,4 (mit HCl)
TAE-Puffer	40 mM Tris 20 mM Essigsäure 1 mM EDTA, pH 8,0

4.1.8. Plasmide

Tabelle 11: Plasmide zur bakteriellen Proteinexpression

Plasmid	exprimiertes Protein
2474_pOPINF Rabex5_132-397	His ₆ -Rabex5-VPS9
3316_pOPIN-NHis-3C-Rabex-5_132-397_D313A	His ₆ -Rabex-5-VPS9 _{D313A}
3317_pOPIN-NHis-3C-Rabex-5_132-397_D313A_Y354A	His ₆ -Rabex-5-VPS9 _{D313A/Y354A}
3318_pOPIN-NHis-3C-Rabex-5_132-397_Y354A	His ₆ -Rabex-5-VPS9 _{Y354A}
3420_pOPIN-NHis-3C-Rab5A	His ₆ -Rab5A
3421_pOPIN-NHis-3C-Rab5A_A56D	His ₆ -Rab5A _{A56D}
3422_pOPIN-NHis-3C-Rab5A_A56D_Y82A	His ₆ -Rab5A _{A56D/Y82A}
3423_pOPIN-NHis-3C-Rab5A_CVIL	His ₆ -Rab5A _{CVIL}

Plasmid	exprimiertes Protein
3426_pOPIN-NHis-3C-Rab5A_Y82A	His ₆ -Rab5A _{Y82A}

Tabelle 12: Plasmide zur eukaryotischen Transfektion

Plasmid	exprimiertes Fusionsprotein
2506_mCherry-N1-FRB-FRB-ActA	mCherry-(FRB) ₂ -ActA
2860_pOPINE(n)mCitrine-Rab1A	mCitrine-Rab1A
2861_pOPINE(n)mCitrine-Rab5A	mCitrine-Rab5A
3262_pOPINE(n)mCitrine-Rab5A_A56D	mCitrine-Rab5A _{A56D}
3263_pOPINE(n)mCitrine-Rab5A_Y82A	mCitrine-Rab5A _{Y82A}
3273_pOPINE(n)mCitrine-Rab5A_A56D_Y82A	mCitrine-Rab5A _{A56D/Y82A}
3043_pOPINE(n)mCitrine-Rab5A_deltaC4	mCitrine-Rab5A _{ΔC4}
3236_pOPINE(n)mCitrine-Rab5A_Q79L	mCitrine-Rab5A _{Q79L}
2863_pOPINE(n)mCitrine-Rab8A	mCitrine-Rab8A
2765_FKBP-FKBP-eGFP	(FKBP) ₂ -eGFP
2670_FKBP_FKBP_eGFP-DrrA_340-533	(FKBP) ₂ -eGFP-DrrA-GEF
3510_FKBP_FKBP_eGFP-DrrA_340-533_N451A_R453A	(FKBP) ₂ -eGFP-DrrA ₃₄₀₋₅₃₃ N451A/R453A
3512_FKBP_eGFP-DrrA_340-533_N451A_R453A_D480A_S483A	(FKBP) ₂ -eGFP-DrrA ₃₄₀₋₅₃₃ N451A/R453A/D480A/S483A
2705_FKBP_FKBP_eGFP-Rabex-5	(FKBP) ₂ -eGFP-Rabex-5
2706_FKBP_FKBP_eGFP-Rabex-5_132-397	(FKBP) ₂ -eGFP-Rabex-5-VPS9
3229_FKBP_FKBP_eGFP-Rabex-5_D313A	(FKBP) ₂ -eGFP-Rabex-5 _{D313A}
3204_FKBP_FKBP_eGFP-Rabex-5_Y354A	(FKBP) ₂ -eGFP-Rabex-5 _{Y354A}
3217_FKBP_FKBP_eGFP-Rabex-5_D313A_Y354A	(FKBP) ₂ -eGFP-Rabex-5 _{D313A/Y354A}
2674_FKBP_FKBP_eGFP-Rabin8_157-232	(FKBP) ₂ -eGFP-Rabin8 ₁₅₇₋₂₃₂
2946_pOPINE(n)mCherry-EEA1_1257-1411	mCherry-EEA1 ₁₂₅₇₋₁₄₁₁

4.1.9. Oligonukleotide

Alle Oligonukleotide zur Klonierung und Sequenzierung der unter 4.1.8 aufgeführten Plasmide wurden von der Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Deutschland) synthetisiert und mittels HPSF-Methode gereinigt.

4.1.10. Bakterienstämme und eukaryotische Zelllinien

Tabelle 13: Bakterienstämme

<i>E. coli</i> Bakterienstamm	Genotyp	Hersteller
BL21(DE3)	F ⁻ <i>ompT hsdS</i> (r _B ⁻ m _B ⁻) <i>gal dcm</i> (DE3)	Merck (Darmstadt, Deutschland)
BL21-CodonPlus (DE3)-RIL	F ⁻ <i>ompT hsdS</i> (r _B ⁻ m _B ⁻) <i>dcm</i> ⁺ Tet ^r <i>gal</i> λ (DE3) <i>endA Hte</i> [<i>argU ileY leuW Cam</i> ']	Agilent Technologies (Waldbronn, Deutschland)
XL1-Blue	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac</i> [F' <i>proAB lac</i> ^f ZΔM15 Tn10 (Tet _r)]	Agilent Technologies (Waldbronn, Deutschland)
SCS110	<i>rpsL</i> (Str ^r) <i>thr leu endA thi-1 lacY galK galT ara</i> <i>tonA tsx dam dcm supE44 Δ(lac-proAB)</i> [F' <i>traD36 proAB lac</i> ^f ZΔM15]	Agilent Technologies (Waldbronn, Deutschland)

Tabelle 14: eukaryotische Zelllinien

Eukaryotische Zelllinie	Eigenschaften	Herkunft/Referenz
COS-7	Abgeleitet von der CV-1 Zelllinie (ATCC: CCL-70) durch Transformation einer Origin-defekten Mutante des SV40 Virus; dadurch Expression des Wildtyp T-Antigens	Nierengewebe der grünen Meerkatze <i>Cercopithecus aethiops</i> (ATCC: CRL-1651) ¹⁸³

4.1.11. Nährmedien für die Anzucht von *E. coli*

Tabelle 15: Nährmedien für die Anzucht von *E. coli*

Nährmedium	Zusammensetzung
LB-Flüssigmedium	10 g/L Bacto-Trypton 10 g/L NaCl 5 g/L Hefeextrakt pH 7,2
LB-Festagarplatten	10 g/L Bacto-Trypton 10 g/L NaCl 5 g/L Hefeextrakt 16 g/L Bacto-Agar pH 7,2
GYT	10 % (v/v) Glycerol 1,25 g/L Hefeextrakt 2,5 g/L Bacto-Trypton

Nährmedium	Zusammensetzung
GS96-Medium	49,2 g/L GS96-Medium 0,05 % (v/v) Glycerol 1 % (w/v) Glukose
TB-Medium	12 g/L Trypton 24 g/L Hefeextrakt 0,4 % (v/v) Glycerol 2,13 g/L KH_2PO_4 12,54 g/L K_2HPO_4
Expressions-Medium	TB-Medium + 1 % (w/v) Glukose
Autoinduktions-Medium (AI-Medium)	TB-Medium + 0,2 % (w/v) Laktose

Je nach unter 4.1.8 verwendetem Plasmid wurde das jeweilige Nährmedium mit dem entsprechenden Antibiotikum vergesetzt.

Tabelle 16: Antibiotika

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

4.1.12. Zellkulturmedien, -zusätze und -reagenzien

Tabelle 17: Zellkulturmedien, -zusätze und -reagenzien

Zellkulturmedium und Zusätze	Hersteller
A/C Heterodimerizer	Clontech Inc. (Mountain View, USA)
DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium); High Glucose	Life Technologies (Darmstadt, Deutschland)
Fötales Kälberserum (FCS), MEM NEAA (100x), L-Glutamin (200 mM), DMEM (ohne Phenolrot), DPBS, Trypsin/EDTA	Pan Biotech GmbH (Aidenbach, Deutschland)
Attractene Transfection Reagent	Qiagen (Hilden, Deutschland)
Fluoromount	Serva (Heidelberg, Deutschland)

4.2. Molekularbiologische Methoden

4.2.1. Isolierung von Plasmid-DNA aus *Escherichia coli*

Die Isolierung von Plasmid-DNA erfolgte aus transformierten XL1-Blue Zellen unter Verwendung des QIAprep Spin Miniprep Kits (Qiagen, Hilden, Deutschland) mit dem QiaCube Protokoll 728. Größere Mengen Plasmid-DNA wurden mit dem QIAfilter Plasmid Maxi Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) nach Herstellerangaben isoliert.

4.2.2. Bestimmung der DNA-Konzentration

Die Konzentration der unter 4.2.1 isolierten Plasmid-DNA wurde durch Messung der Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm mit einem NanoDrop ND-1000 Spektralphotometer (peqlab, Erlangen, Deutschland) ermittelt.

4.2.3. Restriktionsverdau

Restriktionsenzyme sind Endonukleasen, welche die hydrolytische Spaltung an spezifischen, meist palindromischen, Sequenzen doppelsträngiger DNA katalysieren. Die Restriktion von Plasmid-DNA sowie PCR-generierten DNA-Fragmenten (4.2.7) erfolgte mit FastDigest Restriktionsenzymen von Fermentas (St. Leon-Rot, Deutschland). Dazu wurden jeweils 0,2-1 µg Plasmid-DNA bzw. 200-400 ng PCR-Fragment mit 1-3 Units des jeweiligen Enzyms und dem vom Hersteller gelieferten Puffer in einem Gesamtvolumen von 30 µL versetzt und eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Anschließend erfolgte die Isolierung der geschnittenen DNA mittels Agarose-Gelelektrophorese (4.2.4) und Gel-Extraktion (4.2.5).

4.2.4. Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese dient der Größenbestimmung sowie der präparativen Isolierung von Plasmid-DNA. Aufgrund der negativ geladenen Phosphatgruppen des DNA-Rückgrats weist Plasmid-DNA ein konstantes Masse/Ladungs-Verhältnis auf und kann somit durch Anlegen eines elektrischen Feldes aufgrund des Molekularsiebeffekts nach ihrer Größe aufgetrennt werden.

Die Auftrennung der Plasmid-DNA erfolgte unter Verwendung von 1 %igen (w/v) Agarose-Gelen, welche mit dem DNA-interkalierenden Farbstoff RedSafe (iNtRON Biotechnology, Sangdaewon-dong, Südkorea) versetzt wurden, in TAE-Puffer bei einer angelegten Spannung von 100 V. Anschließend wurde die Plasmid-DNA durch Anregung mit UV-Licht ($\lambda = 254 \text{ nm}$) im Molecular Imager Gel Doc XR System (Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland) visualisiert. Der Größenstandard Gene Ruler 1 kb DNA Ladder der Firma Fermentas (St. Leon-Rot, Deutschland) diente der Bestimmung der Größe der aufgetrennten DNA-Fragmente.

4.2.5. Gel-Extraktion von DNA

Die Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen (4.2.4) erfolgte unter Verwendung des QIAquick Gel Extraction Kits (Qiagen, Hilden, Deutschland) nach Herstellerangaben.

4.2.6. Ligation

Die Ligation dient der kovalenten Verknüpfung von DNA-Fragmenten mit komplementären Enden. Das Enzym T4 DNA-Ligase katalysiert dabei unter ATP-Verbrauch die Bildung einer Phosphorsäureesterbindung zwischen dem 3'-Hydroxy- und dem 5'-Phosphatende zweier DNA-Stränge. Dazu wurden in einem Ansatz von 10 µL 20-50 ng geschnittener Vektor mit einem 3- bis 6-fachen molaren Überschuss des DNA-Fragments mit 1 U T4 DNA-Ligase (Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland) in dem vom Hersteller gelieferten Puffer für eine Stunde bei 20 °C oder über Nacht bei 16 °C inkubiert. Anschließend erfolgte die Inaktivierung der Ligase durch Inkubation des Reaktionsansatzes bei 65 °C für 10 min.

4.2.7. Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) dient der Vervielfältigung (Amplifikation) sowie der zielgerichteten Mutagenese von DNA. Die Reaktion umfasst drei Schritte, welche zyklisch wiederholt werden. Im ersten Schritt erfolgt die thermische Denaturierung, wodurch DNA-Einzelstränge erzeugt werden. Durch Verringerung der Temperatur erfolgt im zweiten Schritt die Anlagerung der Primer (Hybridisierung) an komplementäre Abschnitte der DNA-Einzelstränge. Im letzten Schritt katalysiert eine hitzestabile DNA-Polymerase nach Bindung an die Primer die kovalente Verknüpfung von Desoxynukleosidtriphosphaten an das jeweilige 3'-Hydroxyende des Primers, wodurch ein zum Matrizenstrang komplementärer DNA-Strang gebildet wird.

4.2.7.1. Präparative PCR

Zur Amplifikation von DNA-Fragmenten wurde das Enzym RedTaq DNA-Polymerase (Sigma-Aldrich, München, Deutschland) verwendet. Es wurden in einem 50 µL Reaktionsansatz 20-100 ng DNA-Vorlage mit je 50 pmol der beiden spezifischen Primer, je 10 nmol der Desoxynukleosidtriphosphate dATP, dCTP, dGTP, dTTP sowie 2,5 U RedTaq DNA-Polymerase in dem vom Hersteller gelieferten Puffer versetzt. Die Reaktion erfolgte in einem Thermocycler (Primus96 advanced, peqlab, Erlangen, Deutschland) mit dem folgenden Programm: (1) 95 °C: 1 min, (2) 95 °C: 30 s, (3) 48-62 °C: 30 s, (4) 72 °C: 1 min pro 1000 Basen, Schritte (2) bis (4): 30 Zyklen, (5) 72 °C: 5 min, (6) 4 °C: unendlich.

4.2.7.2. Analytische PCR

Die analytische PCR (Kolonie-PCR) dient der Überprüfung der Ligation. Dazu dienen Zellen aus gewachsenen Einzelkolonien nach Transformation des Ligationsansatzes als DNA-

Vorlage und wurden zunächst in 50 µL entionisiertem Wasser lysiert. Davon wurde 1 µL in einem Gesamtvolumen von 10 µL analog den Reaktionsbedingungen unter 4.2.7.1 gemischt und die DNA amplifiziert. Die Größe des amplifizierten DNA-Fragments wurde mittels Agarose-Gelelektrophorese (4.2.4) überprüft.

4.2.7.3. Zielgerichtete Mutagenese von Plasmid-DNA

Die zielgerichtete Mutagenese dient dem Einfügen spezifischer Mutationen in Plasmid-DNA und erfolgte unter Verwendung des QuikChange II XL Site-directed Mutagenesis Kits (Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland). Das Design der verwendeten Primer sowie die Durchführung erfolgten nach Herstellerangaben. Anschließend wurde der PCR-Ansatz vor Transformation (2 µL) in elektrokompente XL1-Blue Zellen (4.3.3) eine Stunde bei 37 °C mit dem Restriktionsenzym DpnI verdaut, um die Plasmid-Vorlage zu entfernen.

4.2.7.4. DNA-Sequenzierung

Die Analyse der Sequenz aller in dieser Arbeit klonierten DNA-Fragmente erfolgte über das Kettenabbruchverfahren nach Sanger¹⁸⁴ unter Verwendung des BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kits (Life Technologies, Darmstadt, Deutschland). Dazu wurden 500 ng DNA mit 4 µL Terminator Ready Reaction Mix und je 100 pmol vektorspezifischen Sequenzierungsprimern in einem Gesamtvolumen von 10 µL versetzt und die Sequenzierungs-PCR in einem Thermocycler mit folgendem Programm durchgeführt: (1) 96 °C: 2 min, (2) 96 °C: 15 s, (3) 46 °C: 15 s, (4) 60 °C: 4 min, Schritte (2) bis (4): 25 Zyklen, (5) 4 °C: unendlich.

Anschließend erfolgte zur Entfernung freier fluoreszenzmarkierter Didesoxynukleosidtriphosphate die Aufreinigung des Reaktionsansatzes unter Verwendung des DyeEx 2.0 Spin Kits (Qiagen, Hilden, Deutschland) nach Herstellerangaben. Nach Trocknen der DNA für 15 min bei 95 °C erfolgte die Sequenzbestimmung mit dem ABI PRISM 3130x1 Genetic Analyzer (Life Technologies, Darmstadt, Deutschland) in der zentralen Einrichtung Biotechnologie des Max-Planck-Instituts für molekulare Physiologie (Dortmund, Deutschland).

4.3. Mikrobiologische Methoden

4.3.1. Kultur und Anzucht von *Escherichia coli*

Die Kultivierung von *E. coli* Zellen (XL1-Blue, BL21(DE), BL21(DE3) Codon Plus RIL, SCS110) dient der Amplifikation von Plasmid-DNA sowie der Überexpression von rekombinanten Proteinen. Dazu erfolgt zunächst die unter 4.3.3 beschriebene Transformation elektrokompenter *E. coli* Zellen und die anschließende Kultivierung bei 37 °C auf LB-Festmedium oder in LB-Flüssigmedium unter Schütteln bei 180 rpm.

4.3.2. Herstellung elektrokompetenter *Escherichia coli* Zellen

Kompetente Bakterien besitzen die Fähigkeit freie DNA aufzunehmen. Diesen Vorgang bezeichnet man als Transformation. *E. coli* Zellen weisen keine natürliche Kompetenz auf und werden zur Durchführung einer Elektroschocktransformation entsprechend vorbereitet. Alle folgenden Schritte wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Es wurden 2 L LB-Flüssigmedium unter Zusatz des entsprechenden Antibiotikums mit 10 mL einer Übernachtskultur inokuliert. Anschließend wurde die Kultur bei 37 °C und 180 rpm bis zu einer optischen Dichte von $OD_{600nm} \approx 0,6$ inkubiert und für 15 min bei 5000 rpm und 4 °C zentrifugiert (Avanti J-20 XP, Rotor JLA 8.100, Beckman Coulter, Brea, USA). Es folgten drei Waschschriffe zur Entfernung von Salzen und Mediumrückständen. Für den ersten Schritt wurde 1 L eiskaltes, entionisiertes Wasser verwendet, für den zweiten und dritten Schritt 900 mL bzw. 800 mL 10 % Glycerol. Alle Zentrifugationsschritte erfolgten für 15 min bei 5000 rpm und 4 °C. Das gewaschene Bakterienpellet wurde in 50 mL 10 % Glycerol resuspendiert und erneut für 15 min bei 4000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen in 5 mL eiskaltem GYT-Medium aufgenommen und in 50 μ L Aliquots (3×10^{11} Zellen/mL GYT-Medium) in flüssigem Stickstoff gefroren und bei -80 °C gelagert.

4.3.3. Transformation elektrokompetenter *Escherichia coli* Zellen

Zur Transformation der unter 4.3.2 hergestellten elektrokompetenten *E. coli* Zellen wurde ein 50 μ L Aliquot auf Eis aufgetaut und mit 20-200 ng Plasmid-DNA bzw. 2 μ L Ligationsansatz versetzt. Die Zellen wurden in eine Elektroporationsküvette überführt und in einem MicroPulser (Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland) durch Anlegen eines Spannungspulses (Programm: Ec1: 1,8 kV) transformiert. Nach Aufnahme der Zellen in 800 μ L LB-Flüssigmedium erfolgte eine Inkubation für eine Stunde bei 37 °C und 200 rpm. Anschließend wurden 20-200 μ L der Bakteriensuspension auf einer LB-Festagarplatte mit dem entsprechenden Antibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

4.3.4. Transformation chemisch kompetenter *Escherichia coli* Zellen

Die Transformation chemisch kompetenter *E. coli* Zellen wurde von der Dortmund Protein Facility durchgeführt. Dazu wurde eine 50 μ L Aliquot chemisch kompetenter BL21(DE3) Codon Plus RIL *E. coli* Zellen auf Eis aufgetaut, mit 20-200 ng Plasmid-DNA versetzt und 30 min auf Eis inkubiert. Es folgte ein Hitzeschock für 20 s bei 42 °C und eine erneute Inkubation für 2 min auf Eis. Nach Aufnahme der Zellen in 275 μ L GS96-Medium erfolgte eine Inkubation für 1,5 h bei 37 °C. Anschließend wurden 40 μ L der Bakteriensuspension auf einer 24 Loch-LB-Festagarplatte mit dem entsprechenden Antibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

4.3.5. Proteinexpression in *Escherichia coli*

Die Expression von Proteinen in *E.coli* wurde unter Verwendung des Expressionsstamms BL21(DE3) Codon Plus RIL von der Dortmund Protein Facility durchgeführt. Zunächst erfolgte die Inokulation von 2 L Expressionsmedium oder Autoinduktions-Medium und dem entsprechenden Antibiotikum mit dem transformierten Expressionsstamm. Nach Inkubation bei 37 °C und 180 rpm bis zu einer OD_{600 nm} von 0,15-0,2 wurde die Proteinexpression mit 1 mM IPTG induziert und die Kultur für weitere 4 h bei 37 °C und 180 rpm inkubiert. Bei Verwendung von Autoinduktions-Medium wurde nach Inkubation von 4 h bei 37 °C und 180 rpm die Temperatur auf 25 °C reduziert und die Kultur für weitere 20-24 h inkubiert.

Anschließend wurde die Expressionskultur bei 6000 rpm und 4 °C für 20 min zentrifugiert (Avanti J-20 XP, Rotor JLA 8.100, Beckman Coulter, Brea, USA), das Zellpellet mit PBS-Puffer gewaschen und erneut bei 4500 rpm und 4 °C für 15 min zentrifugiert. Die Zellen wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

4.3.6. Zellaufschluss

Der Aufschluss der Zellen wurde unter Verwendung des Zelldisrupters *One-Shot*-Modell von der Dortmund Protein Facility durchgeführt. Dazu wurde das Zellpellet in Lyse-Puffer resuspendiert (4 mL pro 1 g Zellen) und die Zellsuspension bei einem Druck von 1350 bar durch eine Kapillare geleitet, wodurch die Zellmembran zerstört wird. Das Lysat wurde zur Abtrennung von Organellen, Membranbestandteilen sowie Zellresten bei 25000 rpm und 4 °C für 30 min zentrifugiert (Avanti J-20 XP, Rotor JA 25.50, Beckman Coulter, Brea, USA) und die zytosolische Fraktion weiterverarbeitet.

4.4. Proteinbiochemische Methoden

4.4.1. Affinitätschromatographie

Die Affinitätschromatographie diente der Isolierung des exprimierten Proteins des unter 4.3.6 erzeugten Zelllysats. Dabei erfolgt eine Trennung des mit einem Affinitätsanker exprimierten Proteins von weiteren löslichen Komponenten des Zelllysats durch eine spezifische, reversible Wechselwirkung des Affinitätsankers mit der Säulenmatrix. Die in dieser Arbeit verwendeten Proteine wurden als N-terminale Hexahistidin-Fusionsproteine exprimiert und mittels Nickelaffinitätschromatographie 4.4.1.1 isoliert.

4.4.1.1. Nickelaffinitätschromatographie

Die Nickelaffinitätschromatographie wurde unter Verwendung von HisTrap FF Crude-Säulen von der Dortmund Protein Facility durchgeführt und diente der Isolierung von Proteinen mit einem Hexahistidinanker. Dabei bindet die an einer Matrix immobilisierte Nitrilotriessigsäure (NTA) vier der sechs Bindungsstellen in der Koordinationssphäre des zweiwertigen Nickel-

Ions (Ni^{2+}) und über die zwei verbleibenden Bindungsstellen erfolgt die Wechselwirkung mit dem freien Elektronenpaar des Stickstoffs des Imidazolrings zweier benachbarter Histidin-Reste des Hexahistidinankers.

Das Lysat wurde auf die mit fünf Säulenvolumen Wasch-Puffer äquilibrierte Säule aufgetragen und mit 20 Säulenvolumen Wasch-Puffer unspezifisch gebundene Proteine entfernt. Nach erneutem Waschen der Säule erfolgte eine weitere Äquilibration mit 5 Säulenvolumen *Cleavage*-Puffer und der anschließenden Auftragung von 1 Säulenvolumen *Precission*-Protease (2 mg/mL), welche ebenfalls mit einem Hexahistidinanker fusioniert ist. Zur Abspaltung des Hexahistidinankers vom Fusionsprotein durch die *Precission*-Protease wurde das System für 5 h gestoppt. Anschließend erfolgte die Elution des abgespaltenen Zielproteins mit 5 Säulenvolumen Wasch-Puffer, wohingegen Hexahistidin-*Precission*-Protease, der vom Zielprotein abgespaltenene Hexahistidinanker sowie ungeschnittenes Hexahistidin-Fusionsprotein auf der Säule verbleiben.

Die Elution des Zielproteins wurde durch Messung der Absorption bei 280 nm verfolgt. Nach Analyse der Fraktionen mittels SDS-PAGE wurden die das Fusionsprotein enthaltenden Fraktionen vereinigt und für die weitere Aufreinigung mittels Größenausschlusschromatographie verwendet.

4.4.2. Größenausschlusschromatographie

Die Größenausschlusschromatographie dient der Aufreinigung von Proteinen nach ihrem hydrodynamischen Radius, wobei eine Säulenmatrix mit Poren definierter Größe verwendet wird. Da kleinere Proteine in die Poren diffundieren können, steht ihnen ein größeres Volumen zur Verfügung, wodurch sich ihre Retentionszeit verlängert. Demzufolge werden größere Proteine, die nicht oder nur teilweise in die Poren der Säulenmatrix diffundieren, früher von der Säule eluiert.

Nach Äquilibration einer Superdex 75 26/60-Gelfiltrationssäule mit 2 Säulenvolumen Gelfiltrations-Puffer wurde die vereinigte Elutionsfraktion der Nickelaffinitätschromatographie aufgetragen und mit 1,1 Säulenvolumen Gelfiltrationspuffer eluiert. Die gesammelten Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE (4.4.3) analysiert und die das Zielprotein in reiner Form enthaltenden Fraktionen vereinigt und konzentriert (4.4.5).

4.4.3. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese nach Laemmli¹⁸⁵ dient der Bestimmung der Reinheit und Zusammensetzung von Proteinlösungen.

Durch die Anlagerung des aliphatischen Teils der Dodecylsulfationen an das Proteinerückgrat der Polypeptidkette werden die Proteine denaturiert und ihnen ein konstantes Masse/Ladungs-Verhältnis verliehen. Auf diese Weise können diese durch Anlegen eines elektri-

schen Feldes in einem diskontinuierlichen Polyacrylamidgel nach ihrer Größe aufgetrennt werden. Die Größenbestimmung erfolgte durch Verwendung eines Molekulargewichtsstandards (LMW Calibration Kit for SDS electrophoresis, GE Healthcare, München, Deutschland).

Die SDS-PAGE erfolgte unter Verwendung des Mini-PROTEAN II Systems (Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland). Es wurden 15 %ige Trenngele, die von einem 5 %igen Sammelgel überschichtet wurden, gegossen (Tabelle 18). Nach Polymerisation des SDS-Polyacrylamidgels erfolgte die Beladung der mit 2x SDS-PAGE Probenpuffer versetzten und zuvor aufgekochten Proteinlösungen (5 min bei 95 °C) in SDS-PAGE-Laufpuffer. Durch Anlegung einer konstanten Spannung von 200 V für ca. 1 h wurden die Proteine nach ihrer Größe aufgetrennt (PowerPac Basic Power Supply, Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland)

Tabelle 18: Zusammensetzung der SDS-Polyacrylamidgele

Komponente	Trenngel (15 %)	Sammelgel (5 %)
Trenngelpuffer	1,25 mL	-
Sammelgelpuffer	-	380 µL
Acrylamid 4K-Lösung (30 %)	2,5 mL	250 µL
37,5:1 (Acrylamid/Bisacrylamid)		
ddH ₂ O	1,24 mL	880 µL
10 % APS	25 µL	12 µL
TEMED	2,5 µL	1,5 µL

Zur Visualisierung der aufgetrennten Proteine erfolgte die Färbung der SDS-Polyacrylamidgele in einer Färbelösung mit 0,1 % Coomassie Blue R 250 und die anschließende Entfärbung in 10 %iger Essigsäure, wodurch die Proteine als blaue Banden sichtbar werden.

Die Detektion der NBD-Fluoreszenz (4.4.6) in den Gelen wurde mit dem Fluorescent Image Analyzer FLA-5000 (Fujifilm Holdings Corporation, Tokyo, Japan) durchgeführt (Anregungswellenlänge $\lambda_{\text{ex}} = 473 \text{ nm}$; Emissionswellenlänge $\lambda_{\text{em}} = 510 \text{ nm}$)

4.4.4. Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte nach der Methode von Bradford¹⁸⁶ oder durch Messung der UV-Absorption nach Anregung mit einer Wellenlänge von $\lambda = 280 \text{ nm}$.

4.4.4.1. Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Bei der Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford wird die Eigenschaft von Coomassie Brilliant Blue G-250 ausgenutzt, in saurer Lösung die Seitenketten basischer und

aromatischer Aminosäuren zu binden. Dadurch verschiebt sich das Absorptionsmaximum des Farbstoffs von 465 nm nach 595 nm.

Alle Messungen wurden mit dem Coomassie Protein Assay Reagent Kit (Pierce, Rockford, USA) durchgeführt. Dazu wurden 900 μL Coomassie-Lösung mit 100-x μL ddH₂O und x μL Proteinlösung versetzt, 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und die Absorption bei 595 nm in einem Photometer (Genesys 20, Thermo Fisher Scientific Inc., Rochester, USA) gemessen. Durch Erstellen einer Kalibriergeraden mit definierten Proteinkonzentrationen des Proteins Rinderserumalbumin (BSA) erfolgte die Bestimmung der Proteinkonzentration.

4.4.4.2. Bestimmung der Proteinkonzentration durch Absorptionsmessung

Die Bestimmung der Proteinkonzentration von reinen Proteinlösungen erfolgte durch Messung der Absorption bei 280 nm mit einem NanoDrop ND-1000 Spektralphotometer (peqlab, Erlangen, Deutschland). Dazu wurde der Extinktionskoeffizient und die molare Masse des entsprechenden Proteins anhand der Aminosäuresequenz ermittelt (Programm: ProtParam des Internetservers Expasy (<http://web.expasy.org/protparam>)). Des Weiteren erfolgte die Bestimmung der Konzentration des Fluorophors NBD durch Messung der Absorption bei 481 nm.

4.4.5. Konzentrierung von Proteinen

Zur Erhöhung der Konzentration einer Proteinlösung wurden Amicon Ultra Zentrifugeneinheiten (Merck Millipore Ltd., Tullagreen, Irland) verwendet. Die Anreicherung erfolgt durch das Zurückhalten aller Proteine einer Proteinlösung, die ein größeres Molekulargewicht als die in der Zentrifugeneinheit vorhandenen Poren der Membran aufweisen, wohingegen kleinere Moleküle die Membran passieren können. Die Anreicherung erfolgte durch Zentrifugation bei 4000 rpm (Zentrifuge 5810 R, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) und 4 °C bis zur gewünschten Proteinkonzentration.

4.4.6. *In vitro* Prenylierung von Rab-Proteinen

Bei der *in vitro* Prenylierung wurde Rab5A kovalent mit einer fluoreszenten NBD-Farnesyl-Gruppe modifiziert. Dazu wurde der wildtypische C-Terminus von Rab5A (CCSN) zunächst zu CVIL mutiert, um als Substrat für die Geranylgeranyl-Transferase I zu dienen, die neben dem natürlichen Substrat Geranylgeranyl-Pyrophosphat zusätzlich NBD-Farnesyl-Pyrophosphat als Substrat verwendet. Für die Prenylierungsreaktion wurden 100 nmol Rab5A_{CVIL}, 75 nmol GST-GGTase I und 750 nmol NBD-Farnesyl-Pyrophosphat gemischt und für 1,5 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Erhöhung der NaCl-Konzentration auf 500 mM sowie nach Zugabe von 5 % (w/v) CHAPS zur Trennung des GGTase I:Rab5A_{CVIL}-Komplexes erfolgte eine Trennung von Rab5A-farnesyl-NBD (Rab5A-f-NBD) von den übrigen Komponenten des Reaktionsansatzes über Größenausschlusschromatographie.

4.5. Biophysikalische Methoden

4.5.1. Messung von langsamen Kinetiken mittels Fluoreszenzspektroskopie

Die Fluoreszenzspektroskopie unter Verwendung des FluoroMax-3 (Horiba Jobin Yvon Inc., Edison, USA) diente der Bestimmung der Nukleotidaustauschaktivität sowie der GDI-Freisetzungaktivität von Rabex-5-Mutanten gegenüber Rab5A-Varianten.

Zur Bestimmung der Nukleotidaustauschaktivität wurde die Reaktion durch Zugabe von 100 μM GppNHp (nicht-hydrolysierbares GTP-Analogon) zu einem Reaktionsgemisch aus 1 μM Rab5A und 50 nM Rabex-5-VPS9 gestartet. Die zeitabhängige Messung wurde bei 25 °C in einem Puffer aus 20 mM HEPES pH 7,5, 50 mM NaCl, 2 mM MgCl_2 und 5 mM DTE durchgeführt und die Änderung der intrinsischen Tryptophanfluoreszenz (Anregungswellenlänge $\lambda_{\text{ex}} = 297$ nm; Emissionswellenlänge $\lambda_{\text{em}} = 340$ nm) von Rab5A nach GDP-Freisetzung bestimmt.

Zur Bestimmung der GDI-Freisetzungaktivität wurde durch Zugabe von 100 μM GTP zu einem Reaktionsgemisch aus 100 nM Rab5A-f-NBD, 200 nM GDI und 2,5 μM Rabex-5 die Reaktion gestartet und die Änderung der NBD-Fluoreszenz von Rab5A-f-NBD nach Dissoziation aus dem Komplex mit GDI gemessen (Anregungswellenlänge $\lambda_{\text{ex}} = 479$ nm; Emissionswellenlänge $\lambda_{\text{em}} = 525$ nm). Die Messung wurde bei 25 °C in einem Puffer aus 25 mM HEPES pH 8,0, 50 mM NaCl, 5 mM MgCl_2 und 5 mM DTE durchgeführt.

4.6. Zellbiologische Methoden

4.6.1. Kultivierung eukaryotischer Zellen

Zur Überprüfung auf Kontaminationen und zur Beurteilung der Zellviabilität wurde das Leica DM-IRB Mikroskop (Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland) verwendet. Die Kultivierung von COS-7 Zellen erfolgte routinemäßig in 75 cm² Kulturflaschen in DMEM versetzt mit 10 % fetalem Kälberserum, 1 mM Glutamin und 1 % nicht-essentiellen Aminosäuren in einem Inkubator (NuAire Autoflow-Inkubator, NuAire, Plymouth, USA) bei 37 °C in 5 % CO₂ und wasserdampfgesättigter Atmosphäre bis zu einer Konfluenz von etwa 80 %. Die Zellen wurden mit 1 mL Trypsin/EDTA von der Substratoberfläche der Kulturflasche abgelöst und in 10 mL DMEM mit Zusätzen resuspendiert. Die Bestimmung der Lebendzellzahl erfolgte mit einem Zellzähler (Vi-Cell XR, Beckman Coulter, Inc., Brea, USA) nach Zugabe von Trypanblau und es wurden 3 x 10⁵ Zellen in eine neue 75 cm² Kulturflasche mit 15 mL DMEM mit Zusätzen ausgesät.

4.6.2. Transfektion eukaryotischer Zellen

Die Transfektion dient dem Einschleusen exogener Nukleinsäuren in eukaryotische Zellen zur Expression eines transgenen Proteins. Zur transienten Transfektion von COS-7 Zellen wurde das Transfektionsreagenz Attractene (Qiagen, Hilden, Deutschland) verwendet. Dazu wurden für die Lebendzell-Mikroskopie 2 x 10⁴ Zellen pro Vertiefung einer 4-Loch-Platte (LabTek, 4-Well Chamber slides) ausgesät und nach 24 h Inkubation bei 37 °C in 5 % CO₂ nach Angaben des Herstellers transfiziert. Für die Mikroskopie fixierter Zellpräparate wurden 5 x 10⁴ Zellen pro Vertiefung einer 12-Loch-Platte mit sterilen Deckgläsern ausgesät und 24 h inkubiert. Die Transfektion wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

4.6.3. Induktion der Heterodimerisierung von FKBP- und FRB-Domänen

Die Induktion der Heterodimerisierung der FRB- und FKBP-Domäne in lebenden Zellen diente der Fehllokalisierung von Guaninnukleotidaustauschfaktoren zu den Mitochondrien. A/C Heterodimerizer ist ein Rapamycin-Analogon, das simultan mit der FK506-bindenden Domäne (FKBP) des humanen FKBP12 Proteins als auch mit der FKBP-Rapamycin-bindenden Domäne (FRB) des Proteins mTOR (*mammalian target of rapamycin*) einen hochaffinen Komplex bildet¹⁸⁷⁻¹⁸⁹. Durch Fusion von jeweils einer der beiden Proteindomänen mit je einem Zielprotein kann durch Zugabe des membranpermeablen A/C Heterodimerizers die Dimerisierung der FKBP- und FRB-Domänen und somit der beiden entsprechenden Fusionsproteine in lebenden Zellen induziert werden.

Diese Methode findet Anwendung in der Analyse von Signaltransduktionswegen, der Regulation der Genexpression sowie der gezielten Rekrutierung von Proteinen zu spezifischen

subzellulären Kompartimenten, indem diese unterschiedlichen zellulären Ereignisse gezielt durch die Zugabe des A/C Heterodimerizers induziert und zeitabhängig beobachtet werden können¹⁹⁰⁻¹⁹².

In dieser Arbeit wurde ein System verwendet, bei dem das erste Fusionsprotein neben der FRB-Domäne das fluoreszente Protein mCherry sowie die Sequenz des Mitochondrienlokalisierungssignals aus dem ActA-Protein (im Folgenden ActA) von *Listeria monocytogenes* enthält und entsprechend an den Mitochondrien lokalisiert^{193,194}. Das zweite Fusionsprotein kodiert neben der FKBP-Domäne, für das fluoreszente Protein eGFP und einen Guaninnukleotidaustauschfaktor (GEF). Ein drittes Fusionsprotein kodiert für das fluoreszente Protein mCitrine und das Rab-Protein.

Nach erfolgter Kotransfektion mit drei Vektoren zur Expression der genannten Fusionsproteine wurden die Zellen mit 1 μ M A/C Heterodimerizer in DMEM mit Zusätzen (fixierte Zellen) bzw. DMEM (ohne Phenolrot; Lebendzell-Mikroskopie) versetzt.

Es erfolgte entweder die direkte fluoreszenzmikroskopische Detektion (4.7.1.1) des Rekrutierungsprozesses des FKBP-eGFP-GEF Fusionsproteins zu den Mitochondrien aufgrund der Heterodimerisierung der FRB- und FKBP-Domänen (Lebendzell-Mikroskopie) oder nach Inkubation von 1 h die unter 4.6.4 beschriebene Fixierung der Zellen. Gleichzeitig erfolgte die Detektion des entsprechenden Rab-Proteins, wodurch der Einfluss des entsprechenden GEFs auf die subzelluläre Lokalisation der Rabs analysiert werden konnte.

4.6.4. Fixierung eukaryotischer Zellen

Zur Fixierung wurden COS-7 Zellen 24 h nach Transfektion mit 1 mL Paraformaldehyd-Fixierungslösung pro Vertiefung der 12-Loch-Platte versetzt und für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Zellen wurden zweimal mit DPBS gewaschen und anschließend für 10 min in DPBS mit 0,1 M Glycin inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit DPBS erfolgte die Einbettung der Deckgläser in Fluoromount-Medium auf Objektträgern.

4.7. Fluoreszenzmikroskopie

4.7.1. Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie

Die konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie wurde an einem Leica TCS SP5-Mikroskop (Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland) durchgeführt, welches mit einem Ölimmersions-Objektiv (HCX PL APO lambda blue 63.0x/1.4 NA) ausgestattet ist. Ein vollautomatischer, motorisierter Mikroskoptisch dient der präzisen Positionierung der Probe und ist von einem Inkubator zur Kontrolle der Temperatur, des CO₂-Gehalts und der Luftfeuchtigkeit umgeben. Neben einem Argon-Laser ist das Mikroskop zusätzlich mit einem Weißlicht-Laser zur flexiblen Auswahl jeder Anregungswellenlänge zwischen 470 und 670 nm ausgestattet. Die Auswahl der Anregungswellenlänge des Weißlichtlasers erfolgt über einen akusto-optischen

Kristall (AOTF, *acousto-optical tunable filter*). Die Probe wird durch die entsprechende Laserlinie mit Geschwindigkeiten zwischen 400 und 800 Hz gescannt. Der AOBS (*acousto-optical beam splitter*) ersetzt den üblicherweise vorhandenen dichroitischen Spiegel zur Trennung des Anregungslichtes vom Fluoreszenzsignal der Probe und ermöglicht die simultane Detektion verschiedener Fluorophore. Das Emissionssignal wird zur Eliminierung von *out-of-focus*-Licht durch eine Lochblende mit definiertem Durchmesser geleitet und die gewünschte Detektionswellenlänge durch einen Spektraldetektor selektiert. Die Detektion des von der Probe emittierten und selektierten Signals erfolgt schließlich über *photomultiplier tubes* (PMTs), deren Sensitivität durch Regulierung der Spannung (*gain voltage*) angepasst werden kann.

4.7.1.1. Lebendzell-Mikroskopie

Zur Untersuchung der Rolle von GEFs bezüglich der subzelluläre Lokalisation von Rabs erfolgte die Analyse von lebenden COS-7 Zellen bei 37 °C und 5 % CO₂ 24 h nach erfolgter Transfektion im xyzt-Modus in definierten Zeitabständen. Die Heterodimerisierung der FRB- und FKBP-Domänen zur Fehllokalisierung des GEFs wurde durch Zugabe des A/C Heterodimerizers 2 min bzw. 2,5 min nach Beginn der Datenaufnahme induziert. Die Anregung von mCitrine erfolgte mit der 514 nm Laserlinie des Argon-Lasers, eGFP und mCherry wurden mit einer selektierten Wellenlänge von 476 nm bzw. 580 nm des Weißlicht-Lasers angeregt. Die Detektion der entsprechenden Fluoreszenzsignale erfolgte durch folgende Einstellungen der PMTs: mCitrine, 525-570 nm; eGFP, 486-520 nm; mCherry, 600-700 nm. Die Detektion von eGFP/mCherry und mCitrine erfolgte im sequentiellen Modus. Mit den genannten Einstellungen wurde in Kontrollmessungen mit einzeln markierten Proben verifiziert, dass der *bleed-through* zwischen den verschiedenen Fluoreszenzsignalen minimal ist. Alle Messungen wurden im *line-by-line*-Modus mit einem *4x line averaging* durchgeführt. Die Konfokalität wurde durch Einstellen der Lochblenden-Größe auf 2 Airy-Einheiten gewährleistet.

4.7.1.2. Mikroskopie fixierter Zellen

Die Datenaufnahme fixierter Zellpräparate erfolgte im xyz-Modus bei Raumtemperatur. Die übrigen Parameter entsprechen den unter 4.7.1.2 beschriebenen Einstellungen.

4.7.2. Bildprozessierung und Datenanalyse

Es wurden 16-bit TIFF-Bilder mit einer Voxelgröße von 140 nm (x) x 140 nm (y) x 713 nm (z) und einer Bildgröße von 512 x 512 Pixeln aufgenommen, wobei je nach Zelle 6-10 optische Ebenen einer Zelle pro Zeitpunkt gescannt wurden.

Die Visualisierung der Bilder erfolgte mit der Software Imaris 6.4.0 (Bitplane AG, Zürich, Schweiz). Der Hintergrund wurde durch Anwendung eines Gauß-Filters subtrahiert, indem

durch Angabe einer Filter-Weite von 17,8655 μm der Hintergrund in jedem Pixel bestimmt und anschließend eine Basislinien-Subtraktion des variablen Hintergrunds durchgeführt wird. Anschließend erfolgte eine Glättung durch Anwendung eines 3 x 3 x 1 Median-Filters, wobei der Intensitäts-Wert jedes Pixels durch den Median-Wert der 8 benachbarten Pixel einer z-Ebene und des betreffenden Pixels ersetzt wird. Abschließend wurden die Helligkeit sowie der Kontrast entsprechend angepasst.

Die quantitative Auswertung der Kolo-kalisation zwischen mCherry/eGFP bzw. mCherry/mCitrine erfolgte mit dem Coloc-Tool der Software Imaris 6.4.0. Dabei wurden die Rohdatensätze verwendet. Zunächst wurden Intensitäts-basiert mitochondriale Strukturen als *region-of-interest* (ROI) definiert. Anschließend erfolgte die automatische Berechnung des Pearson-Korrelations-Koeffizienten (PCC) im kolo-kalisierten Volumen zwischen je zwei Fluoreszenz-Kanälen nach Costes¹⁹⁵. Dabei erfolgt eine automatische Abschätzung des maximalen Schwellenwertes jedes Kanals, unterhalb dessen beide Signale keine statistische Korrelation zeigen. Der PCC berechnet die Kovarianz der Intensitätswerte zweier Bilder in jedem Pixel und ist definiert durch:

$$\text{PCC} = \frac{\sum_i (R_i - \bar{R}) \times (G_i - \bar{G})}{\sqrt{\sum_i (R_i - \bar{R})^2 \times \sum_i (G_i - \bar{G})^2}}$$

Dabei beziehen sich R_i und G_i auf die Intensitätswerte von Kanal 1 („roter“ Kanal) bzw. Kanal 2 („grüner“ Kanal) in jedem Pixel und \bar{R} und \bar{G} entsprechen dem jeweiligen Mittelwert der Intensitätswerte des gesamten Bildes. Aufgrund der Subtraktion des Intensitäts-Mittelwertes von jedem Pixel ist der PCC unabhängig von der Signal-Intensität und der Intensität des Hintergrunds.

Zur statistischen Auswertung der Rabex-5-vermittelten Rab5A-Rekrutierung zu den Mitochondrien wurden mindestens 50 Zellen in drei unabhängigen Experimenten analysiert. Dabei wurden ausschließlich Zellen bewertet, die alle drei Fusionsproteine (4.6.3) exprimieren, eine nicht-aberrante Morphologie der Mitochondrien zeigten und die mitochondriale Rekrutierung von Rabex-5 durch die A/C Heterodimerizer-vermittelte Dimerisierung der FRB- und FKBP-Domänen induziert wurde. Weiterhin wurden Zellen nur positiv bezüglich der Rab5A-Rekrutierung bewertet, die eine eindeutige Kolo-kalisation zwischen mCherry und mCitrine zeigten.

5. Ergebnisse

Eine charakteristische Eigenschaft von Rab-Proteinen ist die spezifische Lokalisation an Membranen distinkter Organellen. Trotz ihrer umfangreich dokumentierten Rolle bei der Regulation des vesikulären Transports, sind die molekularen Mechanismen, welche die spezifische Lokalisation von Rabs vermitteln noch wenig verstanden. In der vorliegenden Arbeit wurde durch eine Kombination zellbiologischer und biochemischer Experimente die Rolle von GEFs und ihrer Nukleotidaustauschaktivität für die spezifische subzelluläre Lokalisation von Rab-Proteinen untersucht.

Der für die Rab5-Subfamilie spezifische Austauschfaktor Rabex-5 ist sowohl auf struktureller als auch auf biochemischer Ebene bereits umfangreich charakterisiert und diente daher in Kombination mit seinem Substrat Rab5A als Modellsystem. Darüber hinaus wurde die Rolle des bakteriellen Austauschfaktors DrrA aus *Legionella pneumophila* bezüglich der Lokalisation von Rab1A sowie der Einfluss des humanen GEFs Rabin8 auf die subzelluläre Lokalisation von Rab8A untersucht.

5.1. Induzierte mitochondriale Lokalisation von Rab5A und Rabex-5

Um den Einfluss eines GEFs auf die Lokalisation seines spezifischen Rabs zu untersuchen, wurde ein durch das Rapamycin-Analogon A/C Heterodimerizer induzierbares System verwendet (iDimerize Inducible Heterodimer System, Clontech). Das System ermöglicht die zeitlich präzise Induktion der Dimerisierung zweier Proteindomänen, der FK506-bindenden Domäne (FKBP) des humanen FKBP12 Proteins und der FKBP-Rapamycin-bindenden Domäne (FRB) des Proteins mTOR (*mammalian target of rapamycin*)¹⁸⁷⁻¹⁸⁹, um im vorliegenden Fall das Zielprotein (POI, *protein of interest*) zu mitochondrialen Membranen zu rekrutieren. Dazu wurden zwei FRB-Domänen am N-Terminus mit dem fluoreszenten Protein mCherry sowie am C-Terminus mit der Mitochondrienlokalisationssequenz des *Listeria monocytogenes* Proteins ActA fusioniert^{193,194}. Zwei Kopien der FKBP-Domäne wurden am C-Terminus mit eGFP sowie dem Zielprotein fusioniert. Es wurde eine Mutante der FRB-Domäne (T2098L) verwendet, die in Gegenwart des A/C Heterodimerizers mit FKBP heterodimerisiert. Der A/C Heterodimerizer bindet jedoch nicht wie Rapamycin an das endogene Protein mTOR und besitzt daher keine unerwünschten Nebeneffekte auf die Zellphysiologie.

In Abbildung 11 ist der allgemeine Ablauf der Heterodimerisierung und die dadurch induzierte Fehllokalisierung des Zielproteins zu den Mitochondrien graphisch dargestellt. Zur vereinfachten Schreibweise wird im Folgenden nur jeweils eine der beiden FRB- bzw. FKBP-Domänen erwähnt, da alle Fusionsproteine einheitlich je zwei der Dimerisierungsdomänen besitzen.

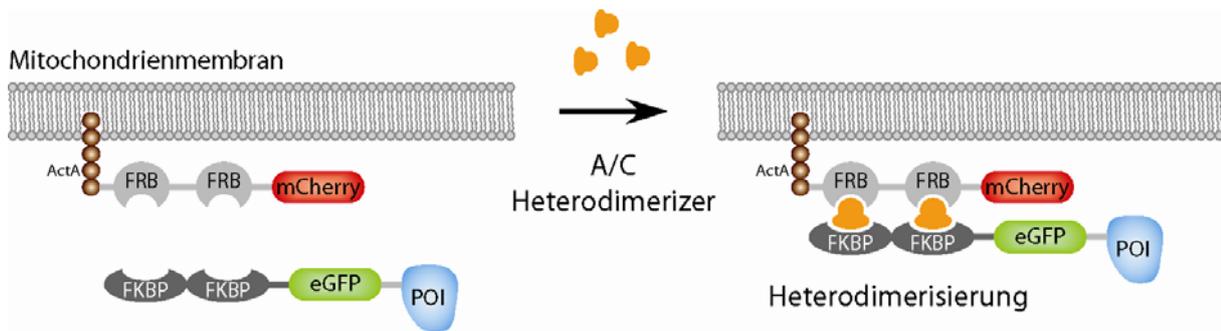


Abbildung 11: Induzierte Heterodimerisierung und Fehllokalisierung eines Zielproteins zur Mitochondrienmembran.

Das Fusionsprotein mCherry-FRB-ActA lokalisiert aufgrund der Mitochondrienlokalisationssequenz des *Listeria monocytogenes* Proteins ActA an der Mitochondrienmembran, wohingegen das zweite Fusionsprotein (FKBP-eGFP-POI) die für das Zielprotein (POI, *protein of interest*) charakteristische Lokalisation aufweist. Die Zugabe des membranpermeablen A/C Heterodimerizers zu lebenden Zellen induziert die Heterodimerisierung der FRB- und FKBP-Domänen und damit die Fehllokalisierung des Zielproteins zur Mitochondrienmembran.

Zur Überprüfung der Funktionalität des Systems wurde untersucht, ob Rabex-5 und Rab5A unabhängig voneinander durch die A/C Heterodimerizer-vermittelte Induktion zu den Mitochondrien fehllokalisiert werden können. Nach Kotransfektion (4.6.2) von COS-7 Zellen mit mCherry-FRB^{ActA} und FKBP-eGFP^{Rabex-5} (Abbildung 12) bzw. FKBP-eGFP^{Rab5A} (Abbildung 13) wurde nach Zugabe des A/C Heterodimerizers 2 min nach Datenaufnahme die subzelluläre Umverteilung der Proteine verfolgt. Dabei wurde mittels Berechnung des Pearson-Korrelationskoeffizienten (PCC) die Kolo-kalisation zwischen den FRB- und FKBP-Fusionsproteinen zu jedem Zeitpunkt quantifiziert.

Rabex-5 lokalisiert zunächst, wie bereits beschrieben, überwiegend an endosomalen punktförmigen Strukturen^{145,152}, d.h. die subzelluläre Lokalisation wird durch Kotransfektion mit mCherry-FRB^{ActA} nicht beeinflusst, das aufgrund von ActA an den Mitochondrien lokalisiert^{193,194} (Abbildung 12A, linke Spalte). Zu Beginn des Experiments befinden sich beide Fusionsproteine an Membranen unterschiedlicher Zellkompartimente. Dies ist anhand der diskreten roten mitochondrialen und grünen endosomalen Strukturen im überlagerten Bild zum Zeitpunkt t_0 sichtbar (Abbildung 12A, linke Spalte) und spiegelt sich in einem PCC-Wert nahe 0 wider (Abbildung 12B). Der Anstieg des PCC nach 16 min verdeutlicht eine zunehmende Kolo-kalisation von FKBP-eGFP^{Rabex-5} und mCherry-FRB^{ActA} und zeigt den Beginn der Rekrutierung von Rabex-5 zu den Mitochondrien an. Das Erreichen eines Plateaus nach 28 min markiert den Endpunkt der Rekrutierungs-Phase, entweder aufgrund der vollständigen Rekrutierung aller in der Zelle vorliegenden FKBP-eGFP^{Rabex-5} Fusionsproteine oder aufgrund der Sättigung aller FRB-Bindestellen an den Mitochondrien. Die Lokalisation von mCherry-FRB^{ActA} an den Mitochondrien ändert sich im Verlauf des Experiments nicht (Abbildung 12A).

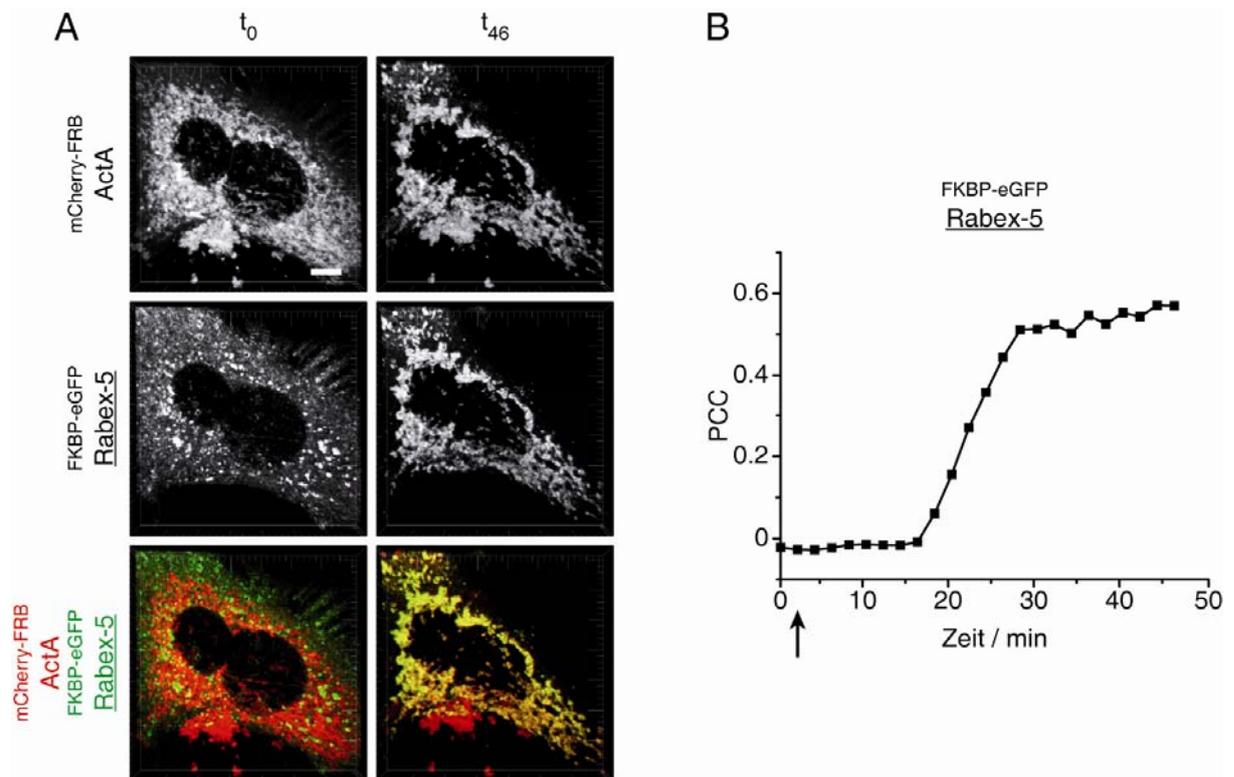


Abbildung 12: Induzierte Fehllokalisierung von Rabex-5 zu den Mitochondrien.

(A) Konfokale Aufnahmen lebender COS-7 Zellen zeigen die subzelluläre Lokalisation von mitochondrialem $mCherry-FRB$ ActA und endosomalem $FKBP-eGFP$ Rabex-5 (t_0). Die Zugabe des A/C Heterodimerizers (Endkonzentration: 1 μM) 24 h nach Transfektion der Zellen führt zur Translokation von $FKBP-eGFP$ Rabex-5 zu den Mitochondrien, erkennbar an den gelben Strukturen im überlagerten Bild zum Endzeitpunkt (t_{46}). Maßstab: 10 μm . (B) Die Quantifizierung der Kolo-kalisation von $mCherry-FRB$ ActA und $FKBP-eGFP$ Rabex-5 durch Berechnung des PCC zu jedem Zeitpunkt (Zeitabstand: 2 min). Die Zunahme des PCC nach 16 min zeigt die beginnende Rekrutierung von Rabex-5 zu den Mitochondrien an. Der Pfeil markiert den Zeitpunkt der Zugabe des A/C Heterodimerizers zu den Zellen.

Im analogen Experiment mit Rab5A anstelle von Rabex-5 wurden ähnliche Beobachtungen gemacht. Die Fehllokalisierung von $FKBP-eGFP$ Rab5A zu den Mitochondrien wurde durch Zugabe des A/C Heterodimerizers induziert und beginnt 4 min nach Datenaufnahme, erkennbar an der Zunahme des PCC. Das Plateau, welches nach 16 min erreicht ist, spiegelt den Endzeitpunkt der Rekrutierung wider. (Abbildung 13B). Die Bilder zeigen zum Zeitpunkt t_0 die beschriebene Lokalisation von $FKBP-eGFP$ Rab5A an den Endosomen und von $mCherry-FRB$ ActA an den Mitochondrien^{72,193,194,196}. Die Überlagerung der Bilder verdeutlicht zu Beginn die subzelluläre Lokalisation beider Fusionsproteine an Membranen unterschiedlicher Kompartimente in der Zelle (Abbildung 13A, linke Spalte). Zum Endzeitpunkt (t_{44}) kolo-kalisieren $mCherry-FRB$ ActA und $FKBP-eGFP$ Rab5A an den Mitochondrien, hervorgehoben durch die gelben Strukturen im überlagerten Bild (Abbildung 13A, rechte Spalte).

Der unterschiedliche Startzeitpunkt der Rekrutierung von Rabex-5 und Rab5A kann durch zwei unabhängige Prozesse erklärt werden. Zum einen variiert die Diffusionszeit des manuell

applizierten A/C Heterodimerizers in die beobachtete Zelle von Experiment zu Experiment. Darüber hinaus beeinflusst die Stabilität der Assoziation von Rabex-5 bzw. Rab5A mit endosomalen Membranen die Geschwindigkeit des Translokationsprozesses. Da jedoch der Einfluss des fehllokalisierten Austauschfaktors auf sein spezifisches Rab untersucht werden soll, spielen diese Parameter für die Analyse der GEF-vermittelten Rekrutierung eine zu vernachlässigende Rolle.

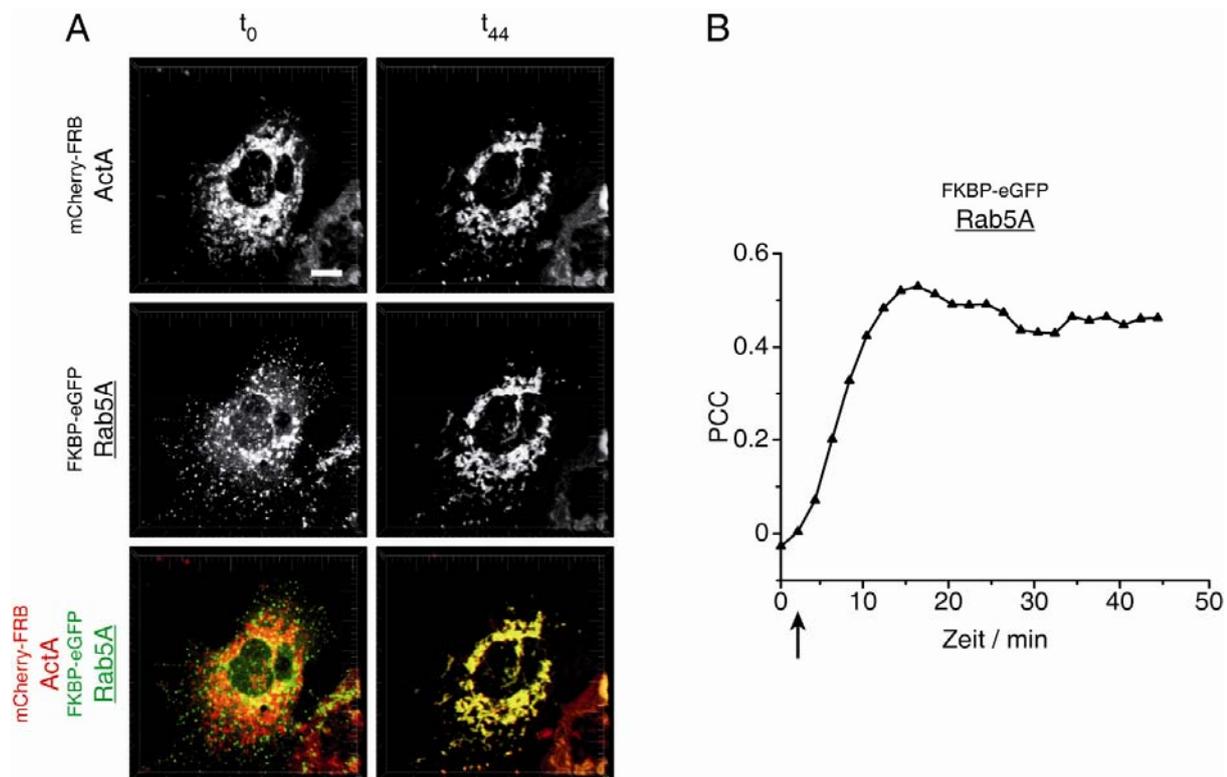


Abbildung 13: Induzierte Fehllokalisierung von Rab5A zu den Mitochondrien.

(A) Konfokale Bilder lebender Zellen zeigen die induzierte Fehllokalisierung von $FKBP-eGFP$ Rab5A zu in der Mitochondrienmembran verankertem $mCherry-FRB$ ActA. Nach Zugabe des A/C Heterodimerizers (Endkonzentration: $1 \mu M$) 24 h nach Transfektion der Zellen transloziert $FKBP-eGFP$ Rab5A von den Endosomen und aus dem Zytosol zu den Mitochondrien, sichtbar an den gelben Strukturen im überlagerten Bild nach 44 min. Maßstab: $10 \mu m$. (B) Die Quantifizierung der Kolo-kalisation von $mCherry-FRB$ ActA und $FKBP-eGFP$ Rab5A durch Berechnung des PCC zu jedem Zeitpunkt (Zeitabstand: 2 min). Der Anstieg des PCC verdeutlicht die beginnende Umverteilung von Rab5A zu den Mitochondrien. Der Pfeil markiert den Zeitpunkt der Zugabe des A/C Heterodimerizers.

Beide Experimente zeigen, dass das FRB-FKBP-A/C Heterodimerizer System geeignet ist, um eine induzierte Fehllokalisierung eines Zielproteins zu bewirken und demzufolge die Auswirkung der Fehllokalisierung auf mit dem Zielprotein in Wechselwirkung stehende Proteine zu analysieren.

5.2. Rabex-5 bewirkt die spezifische Lokalisation von Rab5A

5.2.1. Rabex-5 induziert die Rekrutierung von Rab5A zu den Mitochondrien

Um die Fähigkeit von Rabex-5 zu untersuchen, die Lokalisation von Rab5A zu beeinflussen, wurden COS7-Zellen mit $mCherry-FRB$ ActA, $FKBP-eGFP$ Rabex-5 und $mCitrine$ Rab5A kotransfiziert (4.6.2 und 4.6.3). Nach Zugabe des A/C Heterodimerizers wurde die subzelluläre Umverteilung sowohl von $mCherry-FRB$ ActA als auch von Rabex-5 und Rab5A in Abhängigkeit von der Zeit beobachtet. In unbehandelten Zellen lokalisiert Rab5A in der GTP-gebundenen, aktiven Form an Endosomen und in der GDP-gebundenen, inaktiven Form im Zytosol (Abbildung 14A, linke Spalte und Abbildung 15A, t_0), vermutlich im Komplex mit GDI^{72,196}. Rabex-5 weist ebenfalls die beschriebene endosomale Lokalisation auf (Abbildung 14A, linke Spalte und Abbildung 15A, t_0)^{145,152}.

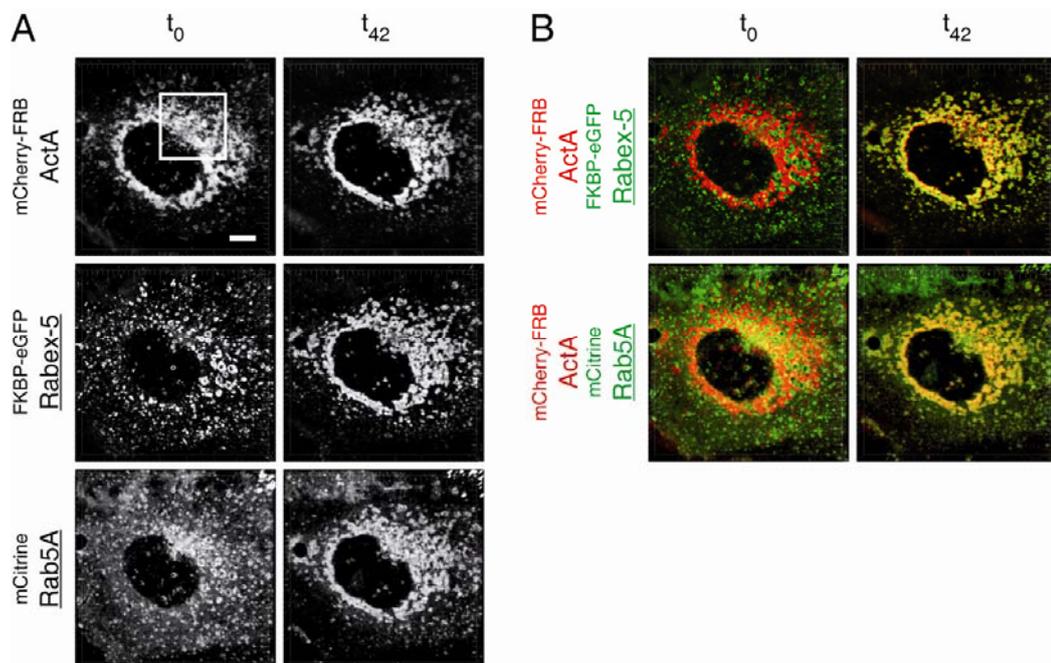


Abbildung 14: Rekrutierung von Rab5A zu den Mitochondrien durch Rabex-5.

(A) Konfokale Bilder zeigen die subzelluläre Lokalisation der angegebenen Fusionsproteine in lebenden COS-7 Zellen. $mCherry-FRB$ ActA lokalisiert in unbehandelten Zellen (t_0) an den Mitochondrien, $FKBP-eGFP$ Rabex-5 und $mCitrine$ Rab5A lokalisieren überwiegend an Endosomen, wobei Rab5A zusätzlich eine zytosolische Lokalisation zeigt. Durch Zugabe des A/C Heterodimerizers (Endkonzentration: 1 μ M) 24 h nach Transfektion wird $FKBP-eGFP$ Rabex-5 zu den Mitochondrien rekrutiert und dies wiederum induziert die mitochondriale Rekrutierung von $mCitrine$ Rab5A (t_{42}). In Abbildung 15A ist ein vergrößerter Ausschnitt des markierten Quadrats während des Übergangs der Rekrutierung gezeigt. Maßstab 10 μ m. (B) Die überlagerten Bilder der angegebenen Fusionsproteine verdeutlichen anhand der gelben Strukturen, die eine Kolo-kalisation repräsentieren, die Umverteilung von $eGFP$ Rabex-5 und $mCitrine$ Rab5A zu an den Mitochondrien lokalisiertem $mCherry-FRB$ ActA.

Die Endosomen sind aufgrund der Überexpression von Rabex-5 und Rab5A vergrößert, da die homotypische Fusion von Endosomen stimuliert wird. Das dritte Fusionsprotein $mCherry-FRB$ ActA lokalisiert wiederum an den Mitochondrien^{193,194}, d.h. die kotransfizierten Konstrukte beeinflussen sich nicht bezüglich ihrer nativen subzellulären Lokalisation (Abbildung 14 und Abbildung 15A). Die überlagerten Bilder zum Zeitpunkt t_0 zwischen $mCherry-FRB$ ActA/ $FKBP-eGFP$ Rabex-5 und $mCherry-FRB$ ActA/ $mCitrine$ Rab5A verdeutlichen, dass die entsprechenden Fusionsproteine vor Zugabe des A/C Heterodimerizers nicht kolokalisieren (Abbildung 14B, linke Spalte). Wie erwartet transloziert $FKBP-eGFP$ Rabex-5 nach Zugabe des A/C Heterodimerizers aufgrund der Heterodimerisierung der FRB- und FKBP-Domänen zu den Mitochondrien. Darüber hinaus transloziert Rab5A ebenfalls zu mitochondrialen Strukturen, so dass zum Ende eine Kolokalisation zwischen $mCherry-FRB$ ActA/ $FKBP-eGFP$ Rabex-5 und $mCherry-FRB$ ActA/ $mCitrine$ Rab5A an den Mitochondrien detektiert wurde (Abbildung 14A und B, rechte Spalte). Die Quantifizierung der Kolokalisation verdeutlicht, dass Rab5A simultan mit Rabex-5 zu den Mitochondrien rekrutiert wird (Abbildung 15B). Der Übergang der Translokation, welcher im Diagramm durch eine graue Fläche betont wird, wird zudem in der entsprechenden Lokalisation der drei Fusionsproteine zu den jeweiligen Zeitpunkten deutlich und wird darüber hinaus in den überlagerten Bildern anhand der sich herausbildenden gelben Strukturen hervorgehoben (Abbildung 15A und B).

Die Tatsache, dass es keine zeitliche Verzögerung zwischen der mitochondrialen Rekrutierung von Rabex-5 und Rab5A gibt, spricht möglicherweise dafür, dass beide Proteine bereits vor Induktion der Fehllokalisierung von Rabex-5 im Komplex vorliegen und daher gemeinsam rekrutiert werden. Eine weitere Möglichkeit besteht darin, dass der Rabex-5-vermittelte Rekrutierungsprozess von Rab5A schneller ist als die durch Heterodimerisierung induzierte Fehllokalisierung von Rabex-5 und daher mit dieser Methode zeitlich nicht aufgelöst werden kann. Ein Grund dafür, dass nach dem Translokationsprozess teilweise noch endosomale Strukturen existieren, ist möglicherweise eine feste Assoziation von Rabex-5 mit endosomalen Membranen. Man würde daher erwarten, dass die Kinetik der Fehllokalisierung verlangsamt wird bzw. dass sich ein Gleichgewicht einstellt zwischen endosomaler und mitochondrialer Lokalisation des Komplexes aus FRB- und FKBP-Fusionsproteinen.

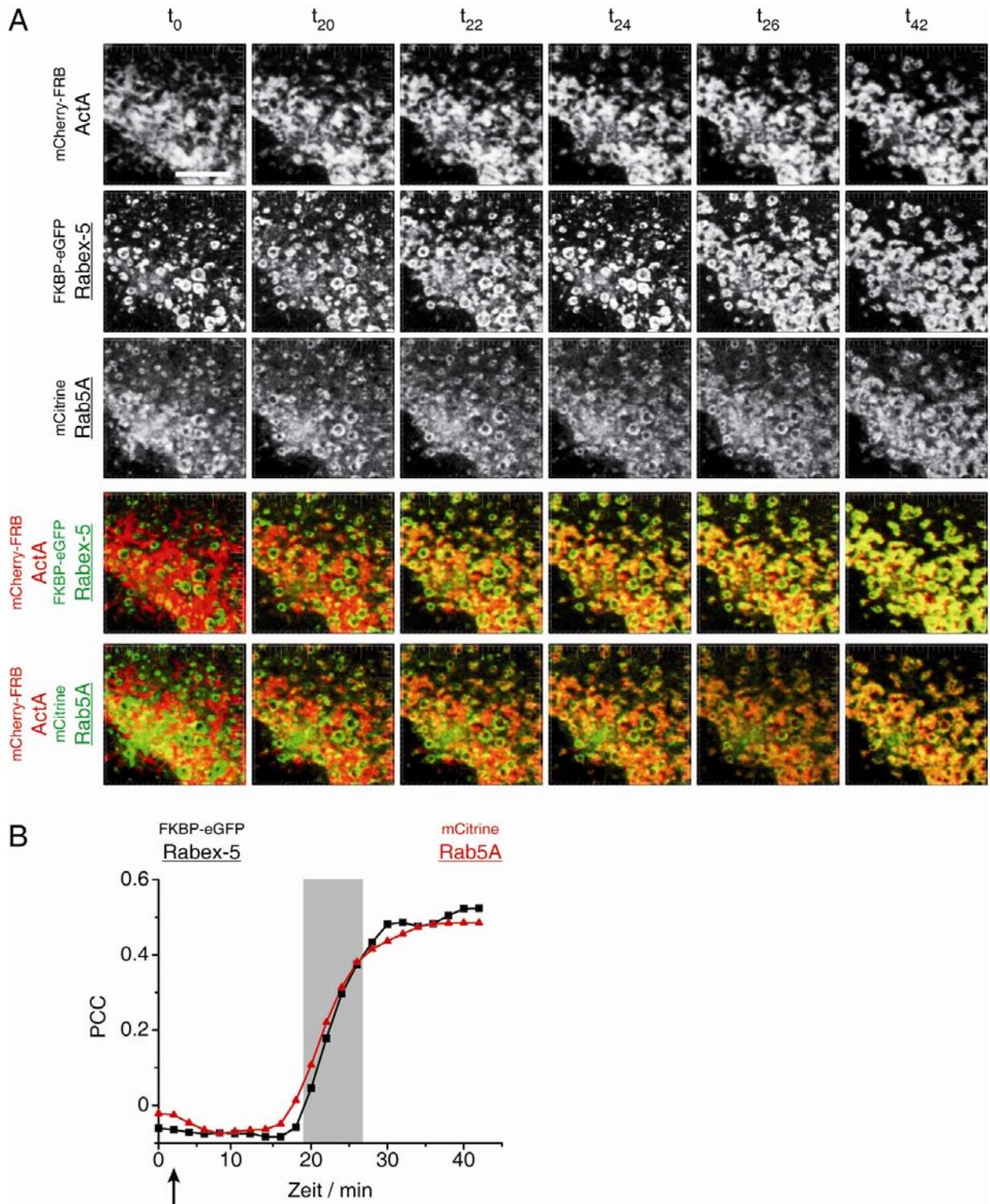


Abbildung 15: Übergang der zeitabhängigen Rekrutierung von Rab5A durch Rabex-5.

(A) Die konfokalen Aufnahmen zeigen einen vergrößerten Ausschnitt der in Abbildung 14 dargestellten Zelle während des Übergangs der Umverteilung der genannten Fusionsproteine nach Zugabe des A/C Heterodimerizers. In den überlagerten Bildern wird die simultane Rekrutierung von $^{FKBP-eGFP}$ Rabex-5 und mCitrine Rab5A zu den Mitochondrien anhand der sich bildenden gelben Strukturen hervorgehoben. Maßstab: 10 μ m. (B) Die Quantifizierung der Kolo­kalisierung zwischen $^{mCherry-FRB}ActA^{eGFP}$ Rabex-5 (schwarze Linie) und $^{mCherry-FRB}ActA/^{mCitrine}$ Rab5A (rote Linie) verdeutlicht, dass Rabex-5 und Rab5A gleichzeitig zu den Mitochondrien rekrutiert werden. Das graue Feld entspricht den in (A) gezeigten Bildern während des Übergangs der Relokalisation. Der Pfeil markiert die Zugabe des A/C Heterodimerizers.

5.2.2. Die Kontrollproteine FKBP-eGFP und $^{FKBP-eGFP}$ Rab1A werden nicht durch Rabex-5 rekrutiert

Weiterhin induziert das Kontroll-Fusionsprotein FKBP-eGFP (ohne Rabex-5) im analogen Experiment keine Translokation von Rab5A zu den Mitochondrien, wobei die Heterodimerisierung von $^{mCherry-FRB}$ ActA und FKBP-eGFP und damit die mitochondriale Fehllokalisation induziert wurde (Abbildung 16A). Dies verdeutlicht, dass die mitochondriale Rekrutierung von mCitrine Rab5A (Abbildung 14 und Abbildung 15) ausschließlich durch Rabex-5 vermittelt wird.

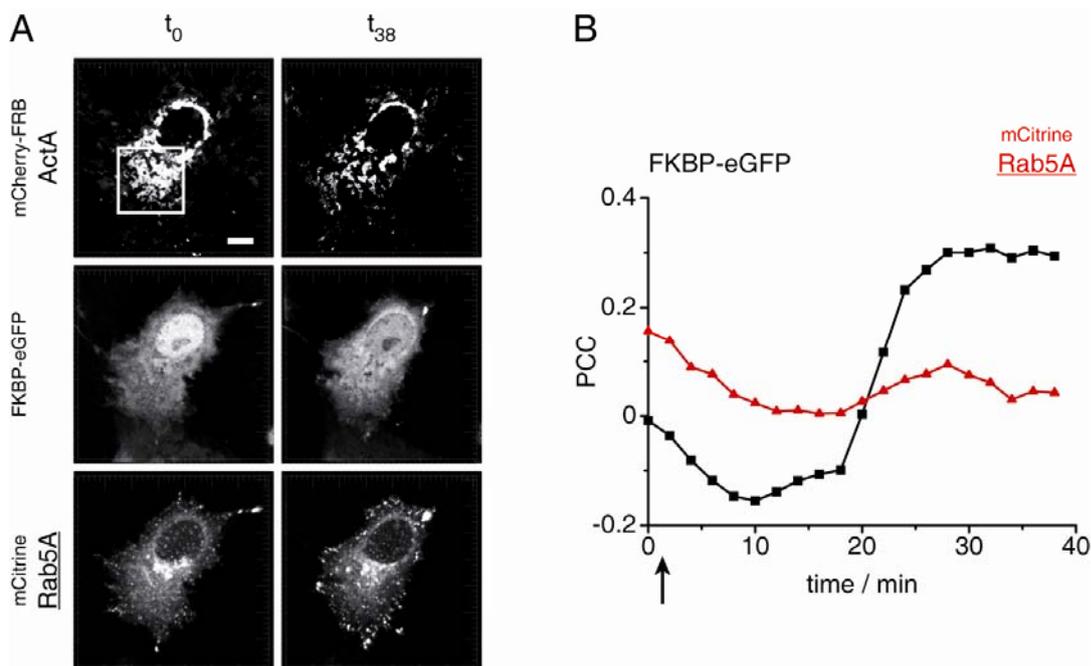


Abbildung 16: Das Kontrollprotein FKBP-eGFP induziert keine mitochondriale Lokalisation von Rab5A.

(A) Konfokale Bilder lebender COS-7 Zellen, die mitochondrial lokalisiertes $^{mCherry-FRB}$ ActA, FKBP-eGFP und mCitrine Rab5A exprimieren. Nach Zugabe des A/C Heterodimerizers (Endkonzentration: 1 μ M) 24 h nach Transfektion wird das Kontrollprotein FKBP-eGFP zu den Mitochondrien rekrutiert, wohingegen mCitrine Rab5A aufgrund des Fehlens von Rabex-5 im FKBP-eGFP Konstrukt weiterhin an endosomalen Strukturen und im Zytosol lokalisiert. In Abbildung 42 (siehe Anhang) ist ein vergrößerter Ausschnitt des markierten Quadrats während des Übergangs der Rekrutierung von FKBP-eGFP gezeigt. Maßstab 10 μ m. (B) Die Kolokalisation zwischen $^{mCherry-FRB}$ ActA/FKBP-eGFP (schwarze Linie) und $^{mCherry-FRB}$ ActA/ mCitrine Rab5A (rote Linie) an den Mitochondrien wurde durch Berechnung des PCC quantifiziert und veranschaulicht anhand des geringen, gleichbleibenden PCC zwischen $^{mCherry-FRB}$ ActA und mCitrine Rab5A, dass mCitrine Rab5A nicht zu den Mitochondrien rekrutiert wird. Der Pfeil markiert die Zugabe des A/C Heterodimerizers.

Im gesamten Zeitverlauf der Beobachtung der Zelle zeigt Rab5A eine überwiegend endosomale und zu einem geringeren Ausmaß zytosolische Lokalisation (siehe Anhang: Abbildung 42). Die Quantifizierung der Kolokalisation zwischen $^{mCherry-FRB}$ ActA/ mCitrine Rab5A verdeutlicht durch einen gleichbleibenden niedrigen PCC, dass keine Rekrutierung stattfindet.

det, wohingegen ein Anstieg des PCC zwischen $mCherry-FRB^{ActA}$ und FKBP-eGFP die durch Heterodimerisierung-induzierte Fehllokalisierung von FKBP-eGFP zu den Mitochondrien widerspiegelt (Abbildung 16B), die anhand der Zellenbilder durch eine Akkumulation von FKBP-eGFP an mitochondrialen Strukturen zum Endzeitpunkt des Experiments unterstützt wird (Abbildung 16A, rechte Spalte).

Zudem ist die Rabex-5-vermittelte Rekrutierung spezifisch für das Substrat Rab5A. Rabex-5 ist dagegen nicht in der Lage, die Lokalisation von Rab1A, das durch Rabex-5 nicht aktiviert werden kann¹³², zu beeinflussen, da nach induzierter Fehllokalisierung von Rabex-5 zu den Mitochondrien, Rab1A seine native subzelluläre Lokalisation am Golgi-Apparat aufrechterhält (Abbildung 17A).

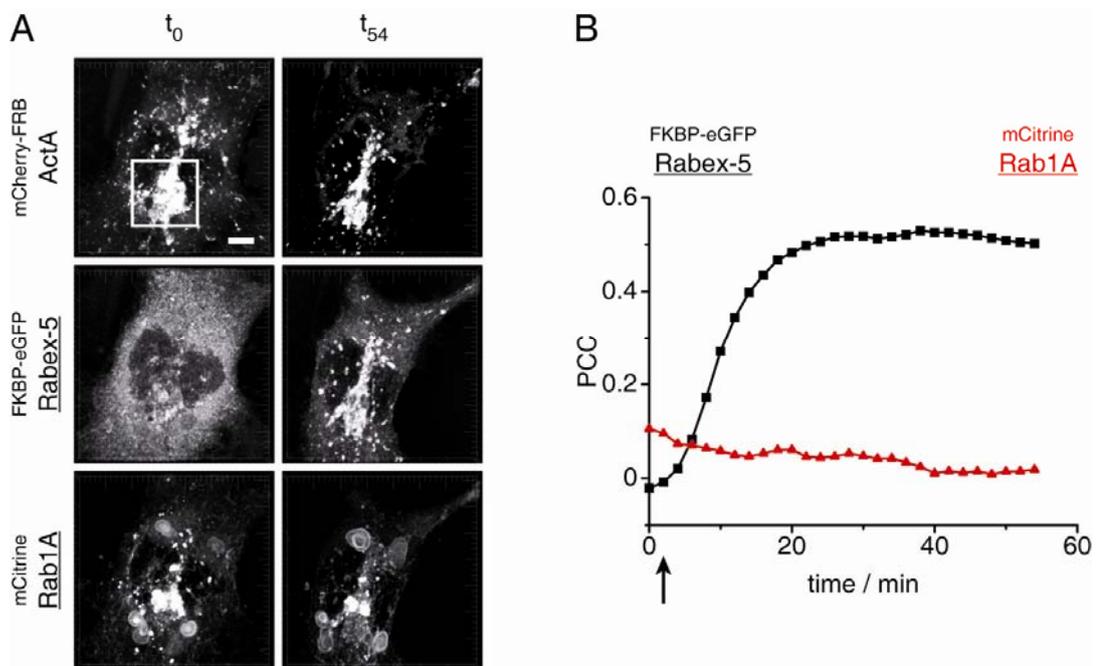


Abbildung 17: Die Lokalisation von Rab1A wird durch Rabex-5 nicht beeinflusst.

(A) Die konfokalen Bilder lebender COS-7 Zellen zeigen die subzelluläre Verteilung von $mCherry-FRB^{ActA}$, FKBP-eGFP/Rabex-5 und $mCitrine^{Rab1A}$, das am Golgi-Apparat lokalisiert. Rab1A ist kein Substrat von Rabex-5, daher bleibt dessen initiale Lokalisation nach Zugabe von 1 μ M A/C Heterodimerizer 24 h nach Transfektion erhalten, wohingegen die mitochondriale Fehllokalisierung von zuvor an Endosomen und im Zytosol lokalisiertem Rabex-5 induziert wurde. In Abbildung 43 (siehe Anhang) ist ein vergrößerter Ausschnitt des markierten Quadrats zu bestimmten Zeitpunkten dargestellt. Maßstab 10 μ m. (B) Quantitative Analyse der Kolo-kalisation durch Berechnung des PCC zwischen $mCherry-FRB^{ActA}$ /FKBP-eGFP/Rabex-5 (schwarze Linie) und $mCherry-FRB^{ActA}$ / $mCitrine^{Rab1A}$ (rote Linie). Der konstant niedrige PCC zwischen $mCherry-FRB^{ActA}$ und $mCitrine^{Rab1A}$ verdeutlicht, dass beide Fusionsproteine nicht kolo-kalisieren, d.h. dass Rabex-5 keine Rekrutierung von Rab1A zu den Mitochondrien vermittelt. Der Pfeil markiert die Zugabe des A/C Heterodimerizers.

Darüber hinaus unterstützt die Quantifizierung der Kolo-kalisation der angezeigten Fusionsproteine die visuelle Beurteilung der Zellenbilder (Abbildung 17B). Während der Anstieg des PCC zwischen $mCherry-FRB^{ActA}$ und FKBP-eGFP/Rabex-5 nach 4 min die Rekrutierung von Rabex-5

zu den Mitochondrien anzeigt, verdeutlicht der gleichbleibende Wert des PCC zwischen $mCherry-FRB$ ActA und $mCitrine$ Rab1A im Bereich von 0, dass beide Fusionsproteine nicht kolokalisieren und daher keine Rabex-5-vermittelte Umverteilung von Rab1A zu den Mitochondrien induziert wird. Da Rabex-5 kein Nukleotidaustauschfaktor für Rab1A ist¹³², spricht dies in Kombination mit den zuvor gezeigten Resultaten und Kontrollexperimenten für eine spezifische Rabex-5-vermittelte Lokalisation von Rab5A zu den Mitochondrien.

5.2.3. Die Fähigkeit von Rabex-5 Rab5A zu lokalisieren erfordert die Membraninsertion des Rabs

Um zu überprüfen, ob Rabex-5 die Rekrutierung von Rab5A zu den Mitochondrien durch Komplexbildung vermittelt, wurde in einem weiteren Experiment die Fähigkeit von Rabex-5 analysiert, die prenylierungsdefiziente Mutante Rab5A $_{\Delta C4}$ zu lokalisieren.

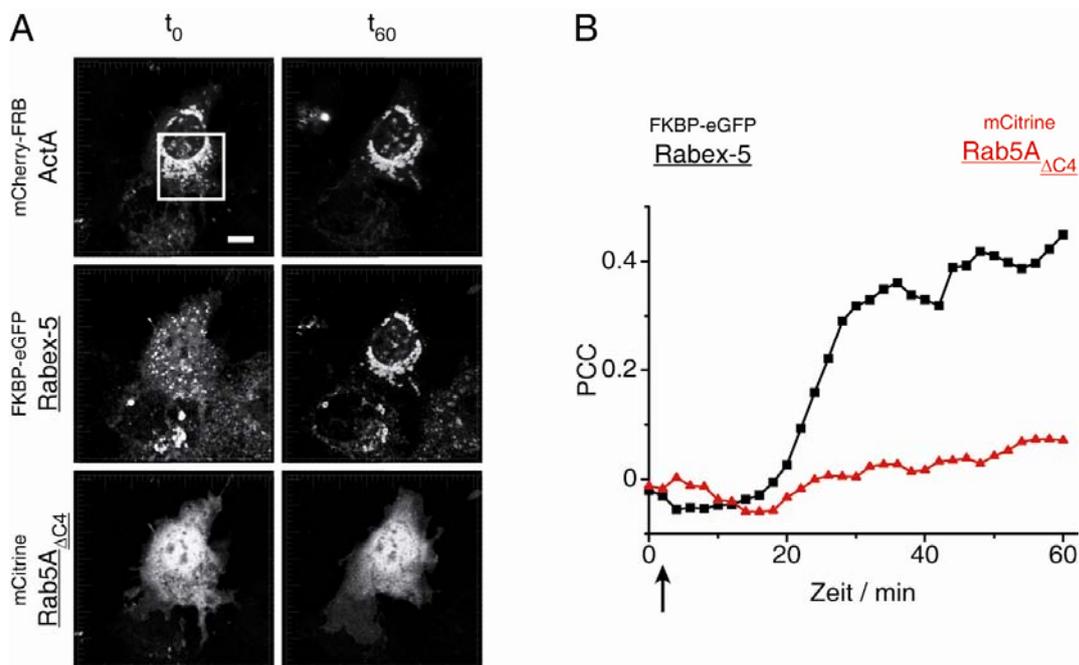


Abbildung 18: Die prenylierungsdefiziente Mutante Rab5A $_{\Delta C4}$ wird nicht von Rabex-5 rekrutiert.

(A) Konfokale Aufnahmen lebender COS-7 Zellen zeigen neben mitochondrial lokalisiertem $mCherry-FRB$ ActA sowie überwiegend endosomal lokalisiertem $FKBP-eGFP$ Rabex-5 die subzelluläre Lokalisation von $mCitrine$ Rab5A $_{\Delta C4}$ im Zytosol und im Zellkern zum Zeitpunkt t_0 . Durch Zugabe von 1 μM A/C Heterodimerizer 24 h nach Transfektion wird die Fehllokalisierung von $FKBP-eGFP$ Rabex-5 zu den Mitochondrien induziert, wohingegen $mCitrine$ Rab5A $_{\Delta C4}$ weiterhin im Zytosol und im Zellkern lokalisiert. In Abbildung 44 (siehe Anhang) ist ein vergrößerter Ausschnitt des markierten Quadrats während des Übergangs der induzierten Fehllokalisierung gezeigt. Maßstab 10 μm . (B) Der PCC zwischen $mCherry-FRB$ ActA/ $FKBP-eGFP$ Rabex-5 (schwarze Linie) und $mCherry-FRB$ ActA/ $mCitrine$ Rab5A $_{\Delta C4}$ (rote Linie) quantifiziert die Kolokalisation der entsprechenden Fusionsproteine und verdeutlicht, dass die prenylierungsdefiziente Mutante Rab5A $_{\Delta C4}$ nicht durch Rabex-5 lokalisiert werden kann. Der Pfeil markiert die Zugabe des A/C Heterodimerizers.

Aufgrund des Fehlens der zwei Cysteinreste am C-Terminus kann diese Mutante nicht durch die RabGGTase modifiziert werden und der fehlende Prenylanker bewirkt eine Lokalisation

von Rab5A $_{\Delta C4}$ im Zytosol und darüber hinaus im Zellkern¹⁹⁶. Die nukleäre Lokalisation des Fusionsproteins wird vermutlich durch das fluoreszente Protein mCitrine vermittelt (Abbildung 18A)¹⁹⁷. Nach erfolgter Fehllokalisierung von $^{FKBP-eGFP}$ Rabex-5 zu den Mitochondrien, wurde beobachtet, dass die Rab5A-Mutante die zytosolische und nukleäre Lokalisation beibehält (Abbildung 18A), die sich in einem konstant niedrigen PCC zwischen $^{mCherry-FRB}$ ActA und mCitrine Rab5A $_{\Delta C4}$ widerspiegelt (Abbildung 18B). Die wiederum durch den A/C Heterodimerizer-induzierte mitochondriale Rekrutierung von $^{FKBP-eGFP}$ Rabex-5 ist sowohl visuell anhand der Umverteilung von Rabex-5 von endosomalen zu mitochondrialen Strukturen als auch durch einen Anstieg des PCC, der eine zunehmende Kolo­kalisierung der beiden Fusionsproteine reflektiert, zu erkennen (Abbildung 18A und B). Dieses Experiment verdeutlicht, dass die Prenylierung der zwei Cysteinreste am C-Terminus von Rab5A für eine Assoziation und Akkumulation an mitochondrialen Membranen essentiell ist. Darüber hinaus deutet diese Beobachtung darauf hin, dass Rab5A nicht im Komplex mit Rabex-5 rekrutiert wird, da die vier fehlenden Aminosäuren am C-Terminus von Rab5A $_{\Delta C4}$ nicht an der Komplexbildung mit Rabex-5 beteiligt sind^{45,132}.

5.2.4. Fehllokalisiertes Rabex-5-VPS9 rekrutiert Rab5A

Da Rabex-5 neben der den Nukleotidaustausch von Rab5A katalysierenden GEF-Domäne (bestehend aus der VPS9- und HB-Domäne, Aminosäuren 132-397) weitere Domänen aufweist, wurde überprüft, ob die GEF-Domäne alleine ebenfalls eine Lokalisierung von Rab5A induziert. Rabex-5-VPS9 zeigt zum Zeitpunkt t_0 , im Gegensatz zu Rabex-5, eine zytosolische sowie nukleäre Lokalisation aufgrund der fehlenden N- und C-terminalen endosomalen Lokalisationssignale. Interessanterweise lokalisiert mCitrine Rab5A bei Koexpression mit $^{FKBP-eGFP}$ Rabex-5-VPS9 nicht an Endosomen, sondern zeigt eine zu Rabex-5-VPS9 analoge Verteilung im Zytosol und im Zellkern (Abbildung 19A, linke Spalte). Die veränderte Lokalisation im Vergleich zur Koexpression von Rab5A mit Rabex-5 deutet bereits auf einen Einfluss von Rabex-5 bezüglich der subzellulären Lokalisation von Rab5A hin. Die Lokalisation von $^{mCherry-FRB}$ ActA wird durch die Koexpression mit den beiden zuvor genannten Fusionsproteinen nicht beeinflusst und zeigt wie zuvor beschrieben eine mitochondriale Lokalisation (Abbildung 19A, linke Spalte). Nach A/C Heterodimerizer-induzierter Fehllokalisierung von $^{FKBP-eGFP}$ Rabex-5-VPS9 zu den Mitochondrien wird mCitrine Rab5A durch die GEF-Domäne von Rabex-5 korekrutiert, so dass sich zum Endzeitpunkt des Experiments alle Fusionsproteine an mitochondrialen Strukturen befinden (Abbildung 19A, rechte Spalte). Die zeitabhängige Analyse der Rekrutierung sowohl durch visuelle Bewertung der Zellenbilder als auch der Quantifizierung der Kolo­kalisierung von $^{mCherry-FRB}$ ActA/ $^{FKBP-eGFP}$ Rabex-5-VPS9 und $^{mCherry-FRB}$ ActA/ mCitrine Rab5A zeigt, dass die Translokation von Rabex-5-VPS9 und Rab5A ebenfalls simultan erfolgt (Abbildung 19B und Anhang: Abbildung 45).

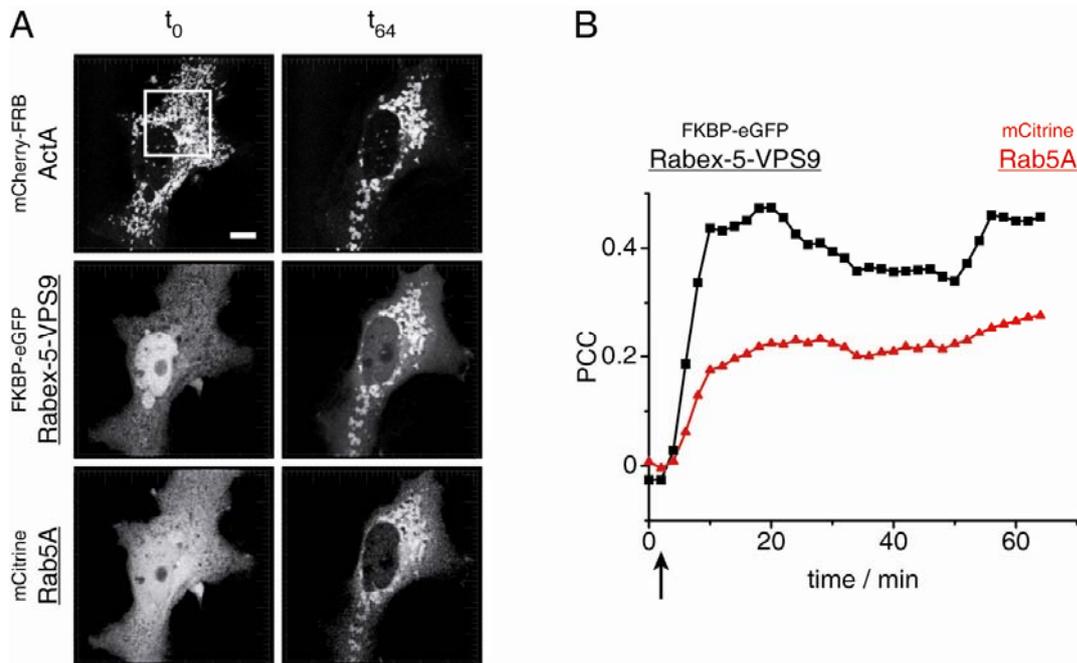


Abbildung 19: Die GEF-Domäne von Rabex-5 rekrutiert Rab5A zu den Mitochondrien.

(A) Konfokale Bilder lebender COS-7 Zellen, die $mCherry-FRB$ ActA, $FKBP-eGFP$ Rabex-5-VPS9 und $mCitrine$ Rab5A exprimieren. Die GEF-Domäne von Rabex-5 lokalisiert aufgrund fehlender endosomaler Lokalisationssignale im Zytosol und im Zellkern. In unbehandelten Zellen zeigt $mCitrine$ Rab5A ebenfalls eine gleichmäßige Verteilung in Analogie zu Rabex-5-VPS9. Nach induzierter Fehllokalisierung von $FKBP-eGFP$ Rabex-5-VPS9 zu den Mitochondrien durch Zugabe von $1 \mu M$ A/C Heterodimerizer 24 h nach Transfektion transloziert $mCitrine$ Rab5A ebenfalls zu den Mitochondrien. Ein vergrößerter Ausschnitt des markierten Quadrats zur visuellen Verdeutlichung der Rekrutierung ist in Abbildung 45 dargestellt. Maßstab $10 \mu m$. (B) Die Quantifizierung der Kolo-kalisation durch Berechnung des PCC der angezeigten Fusionsproteine mit $mCherry-FRB$ ActA an den Mitochondrien verdeutlicht die simultane Rekrutierung von $FKBP-eGFP$ Rabex-5-VPS9 (schwarze Linie) und $mCitrine$ Rab5A (rote Linie). Der Pfeil markiert die Zugabe des A/C Heterodimerizers.

5.2.5. Die GDI-vermittelte Solubilisierung von Rab5A:GDP ist Voraussetzung zur Rabex-5-vermittelten Lokalisation der RabGTPase

Zur Überprüfung, ob der Nukleotidzustand von Rab5A einen Einfluss auf die Rekrutierung durch Rabex-5 besitzt, wurde die Lokalisation der konstitutiv aktiven Mutante Rab5A_{Q79L} nach A/C Heterodimerizer-induzierter Fehllokalisierung von Rabex-5 analysiert. Das zu Leucin mutierte Glutamin an Position 79 innerhalb von *switch II* (G3-Motiv) spielt eine zentrale Rolle bei der intrinsischen und GAP-stimulierten GTP-Hydrolyseaktivität von Rab5A¹³. Die Mutante Rab5A_{Q79L} weist daher eine verminderte intrinsische GTP-Hydrolyseaktivität auf, so dass das physiologische Gleichgewicht verschoben ist und der überwiegende zelluläre Rab5A-Anteil in der GTP-gebundenen Form vorliegt. Da GDI aufgrund der um drei Größenordnungen verminderten Affinität gegenüber der GTP-gebundenen Form nicht mit der RabGTPase wechselwirken kann⁵⁹, bleibt diese überwiegend membranassoziiert.

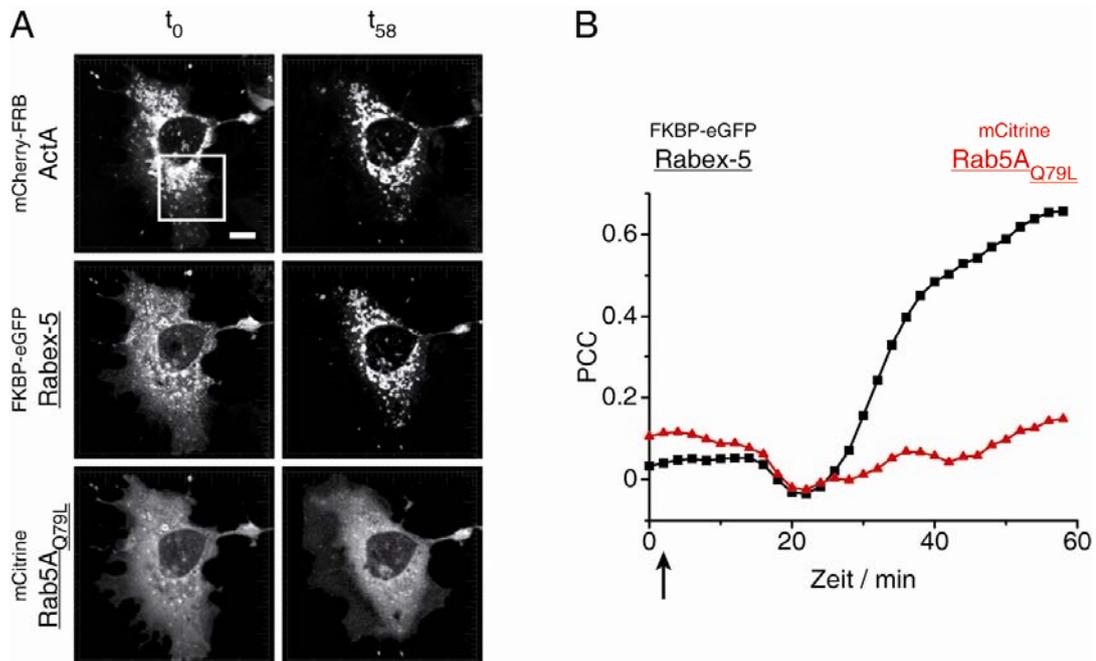


Abbildung 20: Die Rabex-5-vermittelte Rekrutierung der konstitutiv aktiven Mutante Rab5A_{Q79L} ist stark beeinträchtigt.

(A) Konfokale Aufnahmen zeigen die Expression von $mCherry-FRB$ ActA, $FKBP-eGFP$ Rabex-5 und $mCitrine$ Rab5A_{Q79L} in lebenden COS-7 Zellen. $FKBP-eGFP$ Rabex-5 und $mCitrine$ Rab5A_{Q79L} lokalisieren in unbehandelten Zellen (t_0) überwiegend an vergrößerten Endosomen und $mCherry-FRB$ ActA an den Mitochondrien. Nach Zugabe von A/C Heterodimerizer (Endkonzentration: 1 μM) 24 h nach Transfektion erfolgt die Rekrutierung von $FKBP-eGFP$ Rabex-5 zu den Mitochondrien, wohingegen die konstitutiv aktive Mutante $mCitrine$ Rab5A_{Q79L} weiterhin an Endosomen und im Zytosol lokalisiert. In Abbildung 21 ist ein vergrößerter Ausschnitt des markierten Quadrats zu definierten Zeitpunkten dargestellt. Maßstab 10 μm . (B) Die Berechnung des PCC diente der Quantifizierung der Kolo-kalisation zwischen $mCherry-FRB$ ActA/ $FKBP-eGFP$ Rabex-5 und $mCherry-FRB$ ActA/ $mCitrine$ Rab5A_{Q79L} und verdeutlicht durch einen konstant niedrigen PCC (rote Linie), dass Rab5A_{Q79L} nicht durch Rabex-5 lokalisiert werden kann. Der Pfeil markiert die Zugabe des A/C Heterodimerizers.

Die Koexpression von $mCherry-FRB$ ActA, $FKBP-eGFP$ Rabex-5 und $mCitrine$ Rab5A_{Q79L} führt aufgrund der durch die konstitutiv aktive Form von Rab5A stimulierten homotypischen Endosomenfusion zu vergrößerten Endosomen⁷⁴ (Abbildung 20A und Abbildung 21). $FKBP-eGFP$ Rabex-5 weist ebenfalls eine distinkte endosomale Lokalisation auf. Nach Induktion der mitochondrialen Fehllokalisation von $FKBP-eGFP$ Rabex-5 wurde in der gezeigten Zelle keine signifikante Korekrutierung von Rab5A_{Q79L} beobachtet, die sich in einem konstant geringen PCC-Wert zwischen $mCherry-FRB$ ActA und $mCitrine$ Rab5A_{Q79L} widerspiegelt (Abbildung 20B). Rab5A_{Q79L} lokalisiert trotz mitochondrialer Rekrutierung von Rabex-5 weiterhin an endosomalen Strukturen sowie im Zytosol, wobei die endosomale Lokalisation zum Ende des Experiments abnimmt (Abbildung 21).

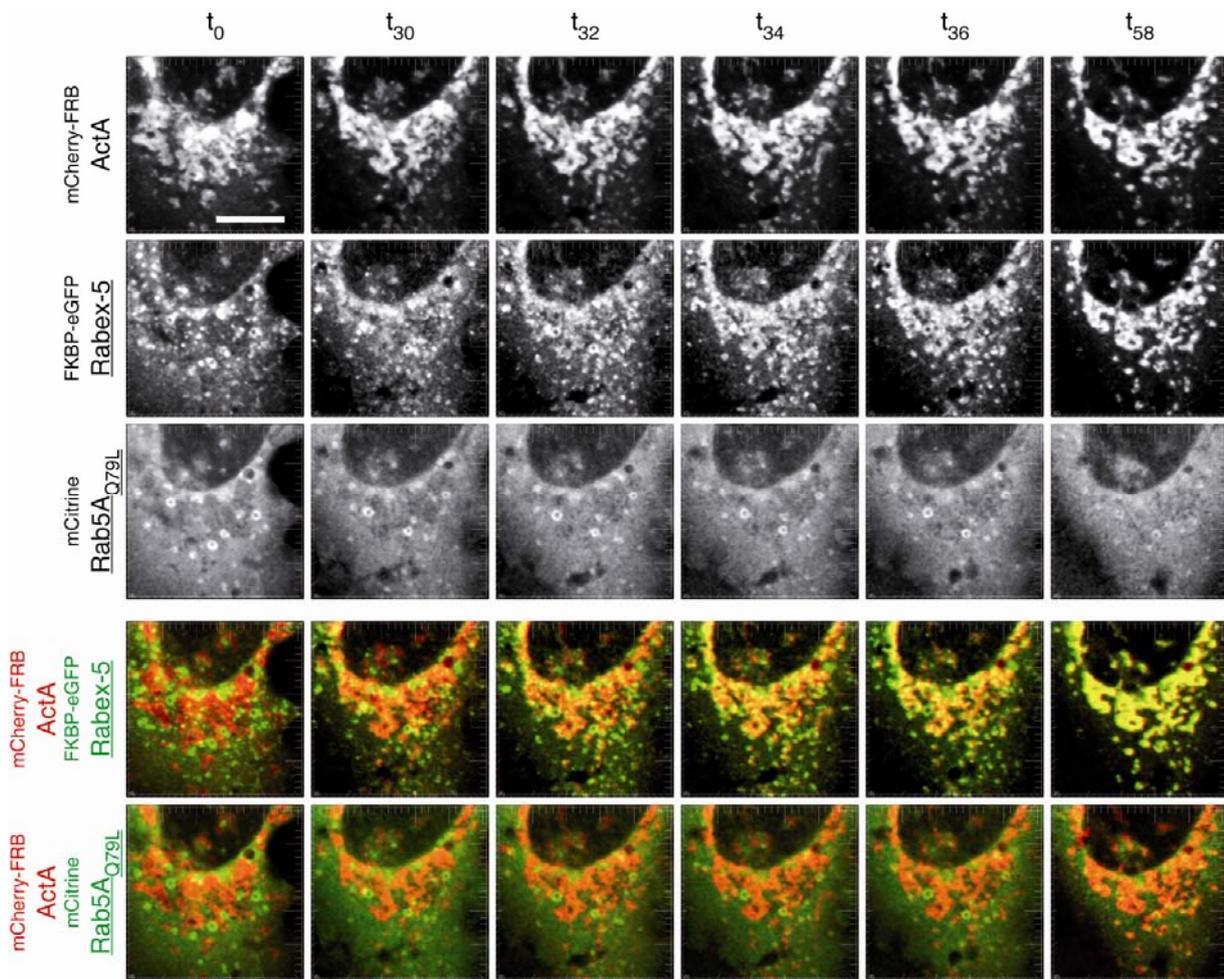


Abbildung 21: Detailansicht der Verteilung von Rab5A_{Q79L} nach induzierter Fehllokalisierung von Rabex-5 zu den Mitochondrien.

Die konfokalen Bilder zeigen einen vergrößerten Ausschnitt der in Abbildung 20 dargestellten Zelle nach Induktion der mitochondrialen Fehllokalisierung von ^{FKBP-eGFP}Rabex-5. Es ist deutlich zu erkennen, dass ^{mCitrine}Rab5A_{Q79L} nach Rekrutierung von Rabex-5 zu den Mitochondrien weiterhin an endosomalen Strukturen und im Zytosol lokalisiert. Maßstab 10 µm.

Weiterhin deutet der leichte Anstieg des PCC zwischen ^{mCherry-FRB}ActA und ^{mCitrine}Rab5A_{Q79L} nach 48 min möglicherweise darauf hin, dass der Prozess der Rekrutierung der konstitutiv aktiven Mutante sehr stark verlangsamt ist (Abbildung 20B). Da GDI nur GDP-gebundenes Rab aus der Membran extrahieren kann, ist der Rücktransport zur Donormembran für diese Mutante an dieser Stelle durch eine Verschiebung des Gleichgewichts zur GTP-gebundenen Form beeinträchtigt. Dies erklärt möglicherweise die stark verzögerte Rekrutierung, da sich nach Extraktion und Lokalisation der GDP-gebundenen Fraktion das Gleichgewicht zwischen GDP- und GTP-gebundener Form immer wieder neu einstellen muss.

Ergebnisse

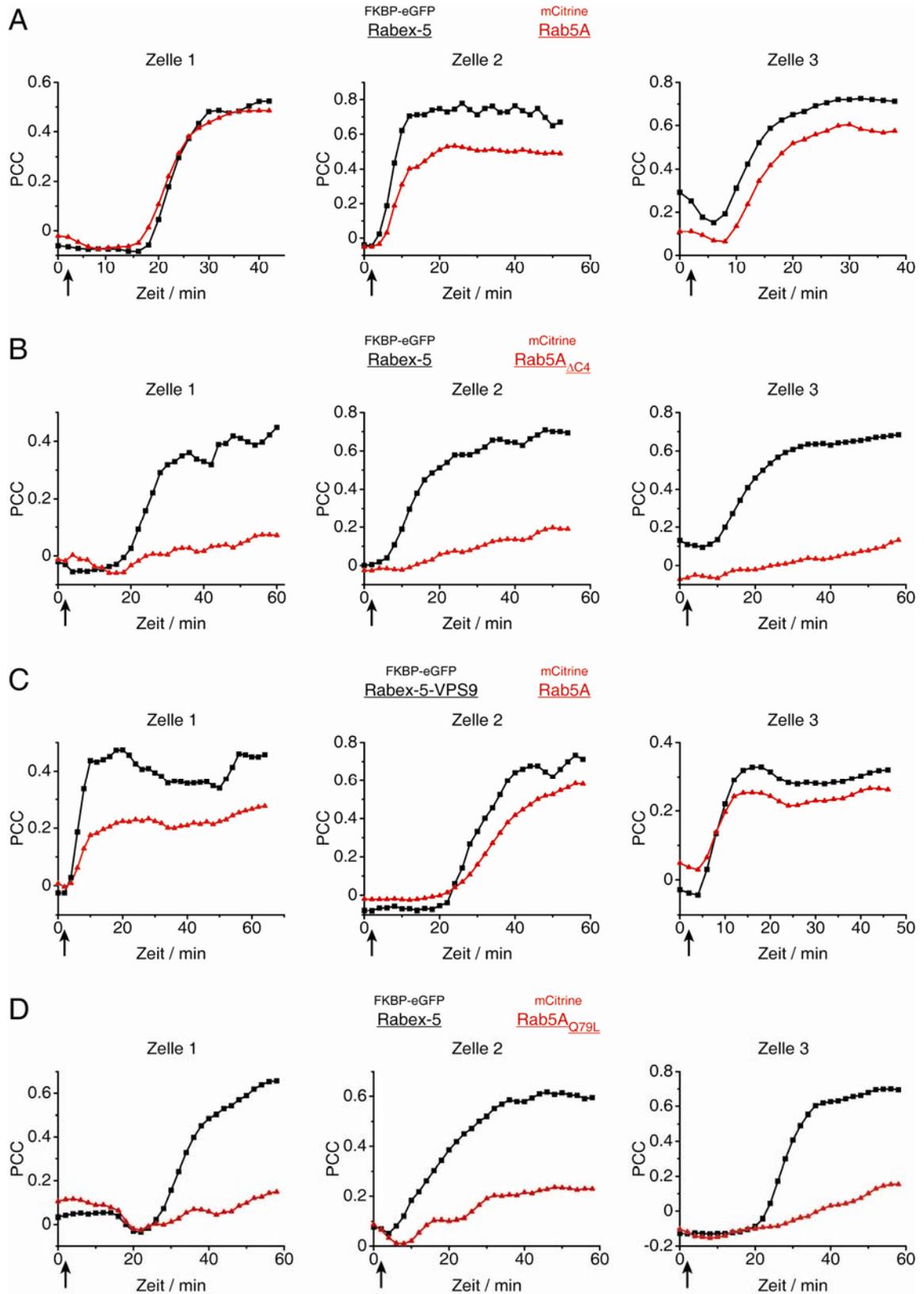


Abbildung 22: Quantitative Analyse der Kolokalisation der genannten Fusionsproteine mit mitochondrialem ^{mCherry-FRB}ActA in drei unabhängigen Zellen.

Die Diagramme zeigen die Quantifizierung der Kolokalisation von (A) ^{mCherry-FRB}ActA/^{FKBP-eGFP}Rabex-5 und ^{mCherry-FRB}ActA/^{mCitrine}Rab5A, (B) ^{mCherry-FRB}ActA/^{FKBP-eGFP}Rabex-5 und ^{mCherry-FRB}ActA/^{mCitrine}Rab5A_{ΔC4},

Ergebnisse

(C) $mCherry-FRB_{ActA}/FKBP-eGFP$ Rabex-5-VPS9 und $mCherry-FRB_{ActA}/mCitrine$ Rab5A und (D) $mCherry-FRB_{ActA}/FKBP-eGFP$ Rabex-5 und $mCherry-FRB_{ActA}/mCitrine$ Rab5A_{Q79L} anhand der Berechnung des PCC nach Induktion der Fehllokalisierung des FKBP-Fusionsproteins (Rabex-5 bzw. Rabex-5-VPS9) zu den Mitochondrien in drei unabhängigen Zellen. Die repetitive Analyse bestätigt, dass die GEF-Domäne von Rabex-5 ausreichend ist, um die Lokalisation von Rab5A zu vermitteln (A und C), wohingegen die Lokalisation der Mutanten Rab5A_{ΔC4} und Rab5A_{Q79L} (B und D) durch Rabex-5 nicht induziert werden kann. Der Pfeil markiert die Zugabe des A/C Heterodimerizers.

Zusätzlich untermauert die statistische Analyse (4.7.2), dass die durch Rabex-5- sowie Rabex-5-VPS9-vermittelte Lokalisation von Rab5A in nahezu 100 % der analysierten Zellen beobachtet wurde, wohingegen die Rekrutierung der prenylierungsdefizienten Mutante Rab5A_{ΔC4} durch Rabex-5 in nur 1 % der untersuchten Zellen erfolgte. Die zeitlich stark verzögerte Rabex-5-vermittelte Lokalisation der konstitutiv aktiven Mutante Rab5A_{Q79L} spiegelt sich in der statistischen Analyse wider, in dem eine signifikante mitochondriale Lokalisation nach 1 h in etwa 50 % der analysierten Zellen beobachtet werden konnte (Abbildung 23).

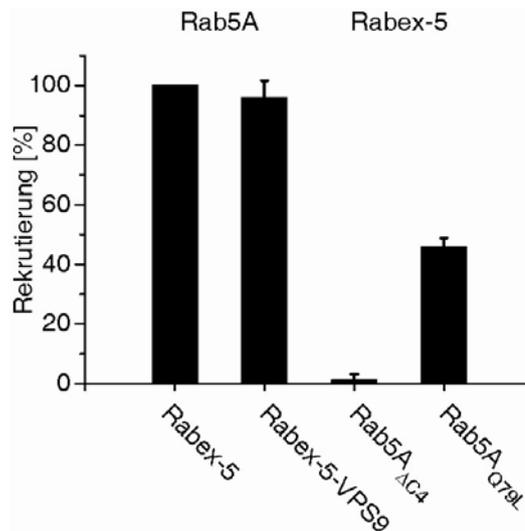


Abbildung 23: Statistische Analyse der Rabex-5-vermittelten Rekrutierung von verschiedenen Rab5A-Mutanten.

Statistischer Vergleich zwischen Rabex-5 und Rabex-5-VPS9, die Lokalisation von Rab5A zu vermitteln sowie der Lokalisations-Fähigkeit von Rabex-5 gegenüber den Rab5A-Mutanten Rab5A_{ΔC4} und Rab5A_{Q79L} nach A/C Heterodimerizer-induzierter Rekrutierung des jeweiligen $FKBP-eGFP$ Rabex-5 Fusionsproteins. Es wurden mindestens 50 Zellen in drei unabhängigen Experimenten bezüglich der mitochondrialen Lokalisation der Rab5A-Variante evaluiert. Die Daten zeigen jeweils den Mittelwert \pm Standardabweichung.

Zusammenfassend deuten die Ergebnisse darauf hin, dass die GEF-Domäne von Rabex-5 ausreichend ist, um die Lokalisation von Rab5A zu vermitteln. Darüber hinaus erfolgt die Rekrutierung von Rab5A durch Rabex-5 nicht durch Komplexbildung und erfordert die Insertion des Prenylankers in eine Membran. Die überwiegend in der GTP-gebundenen Form vorliegende Mutante Rab5A_{Q79L} ist bezüglich ihrer Rekrutierung durch Rabex-5 stark beeinträchtigt.

tigt, da GDI nur inaktives GDP-gebundenes Rab aus der Akzeptormembran extrahiert und somit der Rab-Zyklus an dieser Stelle stark beeinträchtigt ist.

5.3. Die Nukleotidaustauschaktivität von Rabex-5 beeinflusst die Lokalisation von Rab5A

5.3.1. Nukleotidaustauschaktivität verschiedener Rabex-5-Mutanten

Basierend auf einer Mutationsanalyse wurden die Aminosäuren Asp313_{Rabex-5} und Tyr354_{Rabex-5} identifiziert, die für die GEF-Aktivität gegenüber Rab5 und Rab21 von entscheidender Bedeutung sind. Die Mutation einer der beiden Reste zu Alanin führt zu einer signifikanten Reduktion der GEF-Aktivität¹³². Um die GEF-Aktivität weiter zu reduzieren, wurde die Doppelmutante Rabex-5_{D313A/Y354A} erzeugt und im Vergleich zum Wildtyp und den Einzelmутanten die Nukleotidaustauschaktivität gegenüber Rab5A durch Messung der Änderung der intrinsischen Tryptophanfluoreszenz von Rab5A nach GppNHp-Zugabe bestimmt (4.5.1) (Abbildung 24). Durch einen exponentiellen Fit wurde die Geschwindigkeitskonstante k ermittelt und daraus die in Tabelle 19 aufgelisteten katalytischen Effizienzen berechnet.

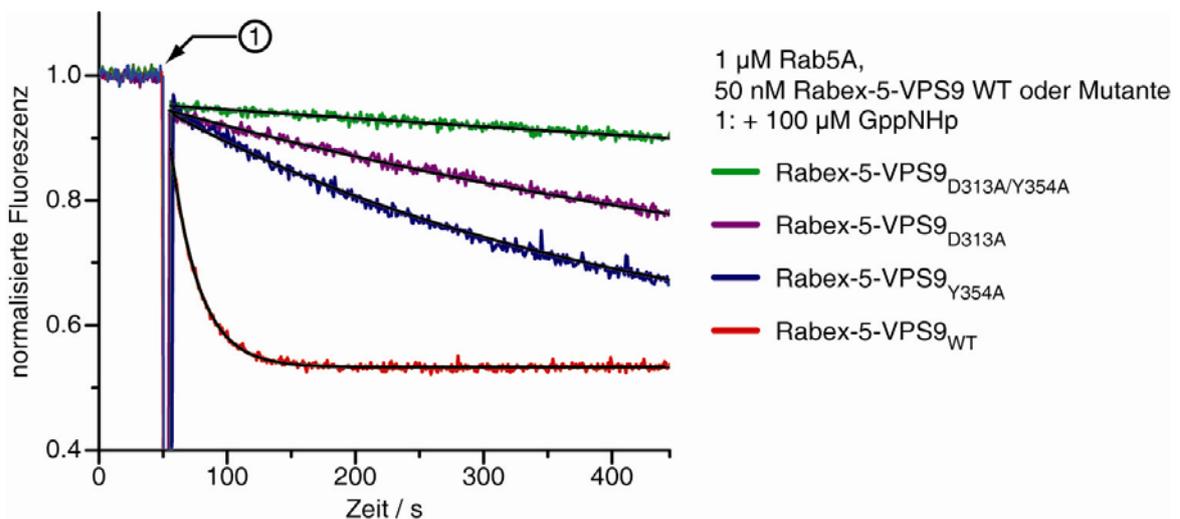


Abbildung 24: Nukleotidaustauschaktivität von Rabex-5-VPS9-Mutanten gegenüber Rab5A.

Bestimmung der Nukleotidaustauschaktivität von Rabex-5-VPS9-Mutanten (50 nM) gegenüber Rab5A (1 μM) durch Messung der Änderung der intrinsischen Tryptophanfluoreszenz von Rab5A nach Zugabe von 100 μM GppNHp.

Tabelle 19: Katalytische Effizienzen des durch Rabex-5-VPS9-Mutanten-katalysierten Nukleotidaustauschs gegenüber Rab5A

Rabex-5-VPS9-Mutante	k_{cat}/K_M
Rabex-5-VPS9	$9,0 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$
Rabex-5-VPS9 _{Y354A}	$5,4 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$
Rabex-5-VPS9 _{D313A}	$3,2 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$
Rabex-5-VPS9 _{D313AY354A}	$7,7 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$

Die Doppelmutante Rabex-5_{D313AY354A} zeigt eine um den Faktor 117 verminderte Austauschaktivität im Vergleich zum Wildtyp, wohingegen die Mutation D313A eine Verringerung um den Faktor 7 und die Mutation Y354A eine Verminderung um den Faktor 4,2 zur Folge hat. Das bedeutet, dass die Doppelmutante etwa 1 % der Nukleotidaustauschaktivität im Vergleich zum wildtypischen Protein aufweist.

5.3.2. Subzelluläre Lokalisation von Rabex-5-Mutanten

Um zu überprüfen, ob die genannten Mutationen, die eine Verminderung der GEF-Aktivität bewirken, einen Einfluss auf die subzelluläre Lokalisation von Rabex-5 besitzen, wurden die entsprechenden Varianten als GFP-Fusionsproteine in COS-7 Zellen exprimiert und 24 h nach Transfektion die subzelluläre Lokalisation der exprimierten Proteine fluoreszenzmikroskopisch detektiert. Dabei lokalisieren alle Rabex-5-Varianten in Analogie zum Wildtyp-Protein an punktförmigen, endosomalen Strukturen (Abbildung 25, I-IV), wohingegen alle Rabex-5-VPS9-Mutanten eine zytosolische sowie nukleäre Lokalisation zeigen (Abbildung 25, V-VIII), die durch das Fehlen der endosomalen Lokalisationssignale am N- und C-Terminus von Rabex-5 erklärt werden kann^{145,152}. Die signifikante nukleäre Lokalisation resultiert vermutlich aus der Fusion an das fluoreszente Protein eGFP¹⁹⁷.

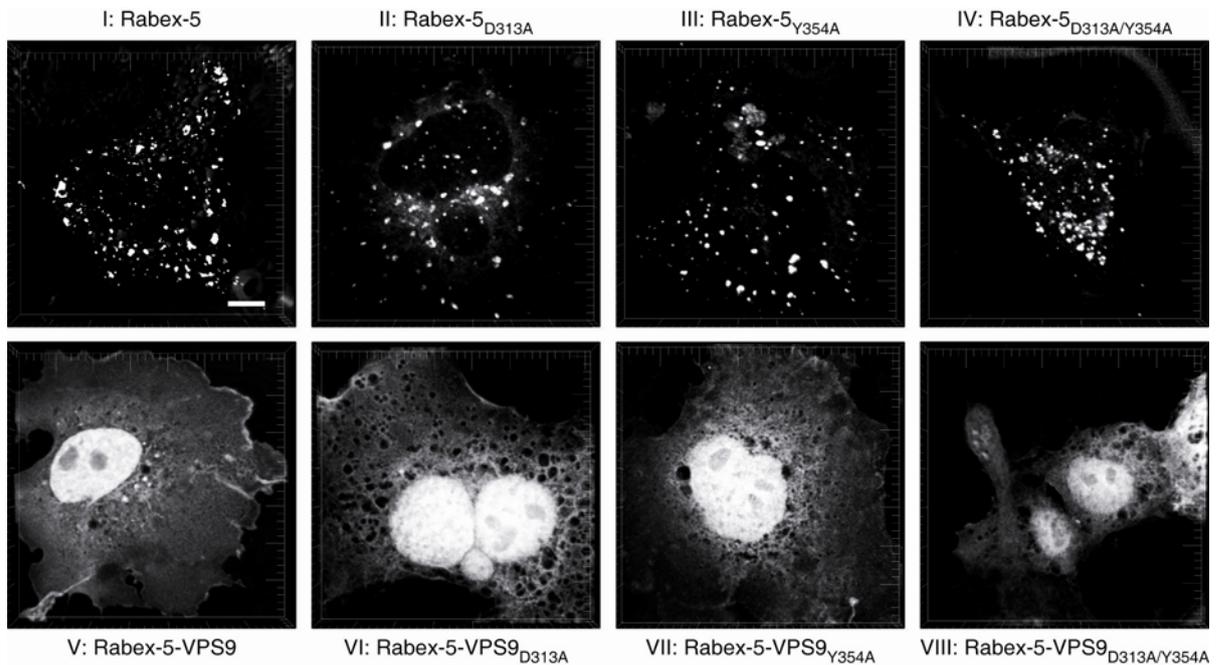


Abbildung 25: Subzelluläre Lokalisation von Rabex-5-Mutanten.

Konfokale Bilder fixierter COS-7 Zellen zeigen die subzelluläre Lokalisation von ^{eGFP}Rabex-5-Varianten (I-IV) und nur die GEF-Domäne enthaltenden ^{eGFP}Rabex-5-VPS9-Varianten (V-VIII). Die Zellen wurden 24 h nach Transfektion fixiert und analysiert. Die eingeführten Punktmutationen haben keinen Einfluss auf die subzelluläre Lokalisation von Rabex-5, da alle Mutanten an Endosomen lokalisieren. Alle Rabex-5-VPS9-Varianten lokalisieren hingegen aufgrund des Fehlens der N- und C-terminalen endosomalen Lokalisationssignale im Zytosol und im Zellkern. Maßstab 10 µm.

5.3.3. Eine verminderte Nukleotidaustauschaktivität von Rabex-5 beeinträchtigt die Lokalisation von Rab5A

Vorausgesetzt, dass GEFs die Freisetzung ihres spezifischen Rabs aus dem Komplex mit GDI sowie den anschließenden Transfer in die Donormembran durch Austausch des gebundenen GDP gegen GTP bewerkstelligen, ist zu erwarten, dass durch eine verminderte GEF-Aktivität die Lokalisation des Rab-Proteins beeinträchtigt ist. Daher wurden zunächst die Einzelmutanten von Rabex-5 (D313A und Y354A), die eine geringfügig verminderte GEF-Aktivität im Vergleich zum Wildtyp besitzen, bezüglich ihrer Fähigkeit Rab5A zur Mitochondrienmembran zu rekrutieren, analysiert (Abbildung 26).

Wie zuvor bereits in Einzeltransfektionsexperimenten überprüft wurde, zeigen beide Einzelmutanten von Rabex-5 in unbehandelten Zellen auch nach Kotransfektion eine endosomale Lokalisation, d.h. die subzelluläre Lokalisation wird durch mitochondrial lokalisiertes ^{mCherry-FRB}ActA sowie endosomal lokalisiertes ^{mCitrine}Rab5A nicht beeinflusst (Abbildung 26A und C, linke Spalte).

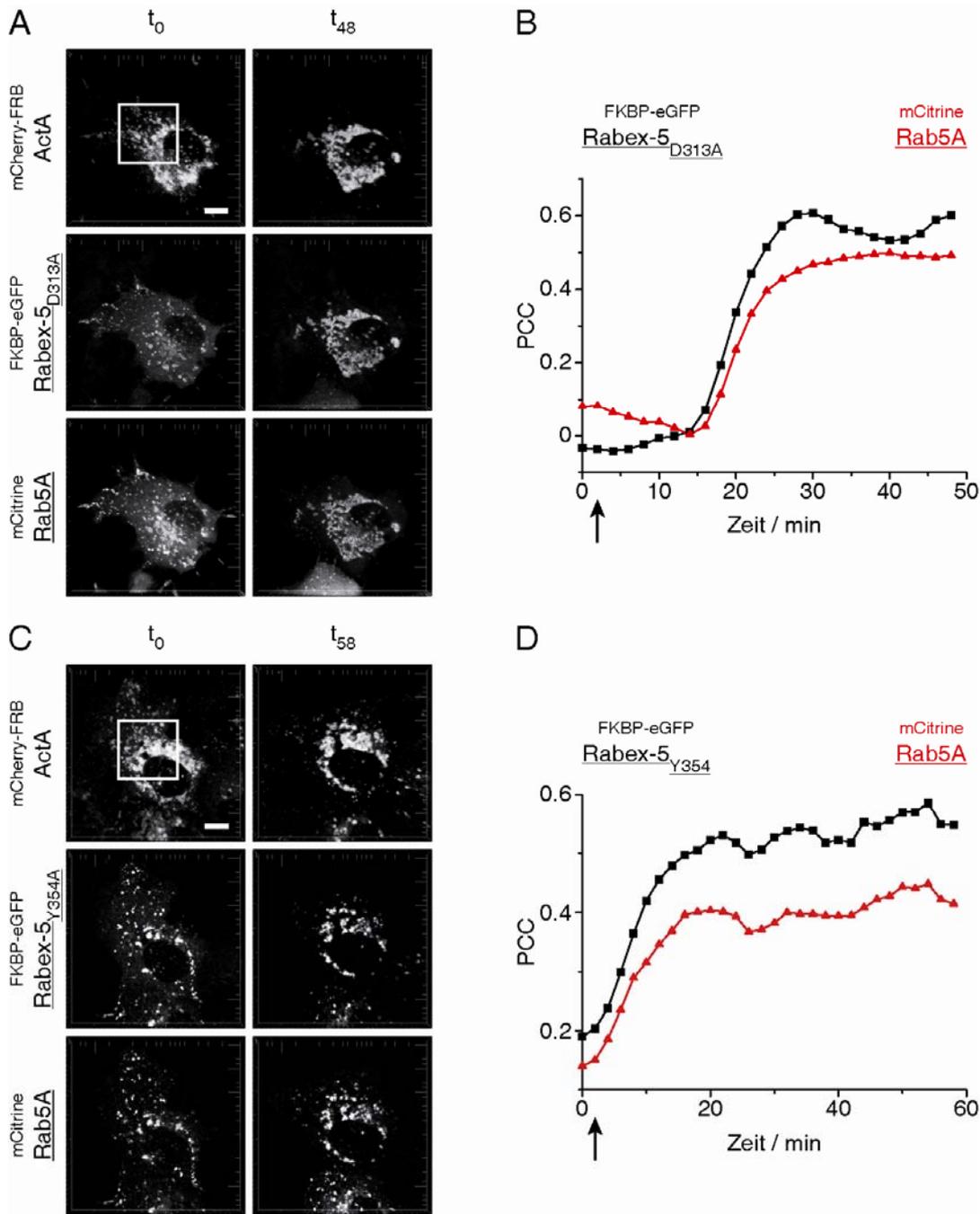


Abbildung 26: Die Mutanten Rabex-5_{D313A} und Rabex-5_{Y354A} lokalisieren Rab5A trotz verminderter Nukleotidaustauschaktivität.

(A und C) Konfokale Bilder lebender COS-7 Zellen, die mCherry-FRB ActA, FKBP-eGFP Rabex-5_{D313A} **(A)** bzw. FKBP-eGFP Rabex-5_{Y354A} **(C)** und mCitrine Rab5A exprimieren. Beide Rabex-5 Einzelmutanten lokalisieren in un-behandelten Zellen ebenso wie mCitrine Rab5A an Endosomen und mCherry-FRB ActA befindet sich an den Mitochondrien (t_0). Nach induzierter Fehllokalisierung von FKBP-eGFP Rabex-5_{D313A} **(A)** bzw. FKBP-eGFP Rabex-5_{Y354A} **(C)** zu den Mitochondrien durch Zugabe von 1 μ M A/C Heterodimerizer 24 h nach Transfektion transloziert mCitrine Rab5A ebenfalls zu den Mitochondrien. In Abbildung 46 bzw. Abbildung 47 ist jeweils ein vergrößerter Ausschnitt des markierten Quadrats während des Übergangs der induzierten Fehllokalisierung der Rabex-5-Variante gezeigt. Maßstab 10 μ m. **(B und D)** Die Quantifizierung der Kolo-kalisation durch Berechnung des PCC der angezeigten Fusionsproteine mit mCherry-FRB ActA an den Mitochondrien verdeutlicht die simultane Rekrutierung von FKBP-eGFP Rabex-5_{D313A} **(B)** bzw. FKBP-eGFP Rabex-5_{Y354A} **(D)** (schwarze Linie) und mCitrine Rab5A (rote Linie). Der Pfeil markiert die Zugabe des A/C Heterodimerizers.

Nach A/C Heterodimerizer-induzierter Fehllokalisierung von $^{FKBP-eGFP}$ Rabex-5_{D313A} (Abbildung 26A, rechte Spalte) bzw. $^{FKBP-eGFP}$ Rabex-5_{Y354A} (Abbildung 26C, rechte Spalte) zu den Mitochondrien wurde in beiden Fällen eine simultane Korekrutierung von Rab5A beobachtet (siehe Anhang: Abbildung 46 und Abbildung 47). Dies wird verdeutlicht anhand des PCC des FKBP-eGFP Fusionsproteins bzw. mCitrine Rab5A und $^{mCherry-FRB}$ ActA, da der Anstieg der Werte nahezu gleichzeitig erfolgt (Abbildung 26B und D). Zum Endzeitpunkt lokalisieren alle Fusionsproteine an den Mitochondrien (Abbildung 26A und C, rechte Spalte), d.h. beide Einzelmutanten besitzen trotz einer verminderten Nukleotidaustauschaktivität die Fähigkeit zur Lokalisation von Rab5A.

Die Doppelmutante $^{FKBP-eGFP}$ Rabex-5_{D313A/Y354A} zeigt nach Kotransfektion mit $^{mCherry-FRB}$ ActA und mCitrine Rab5A ebenfalls die erwartete endosomale Lokalisation. Gleichmaßen wird die Lokalisation von mCitrine Rab5A an den Endosomen in unbehandelten Zellen durch die Expression der beiden anderen Fusionsproteine nicht beeinträchtigt (Abbildung 27A, linke Spalte).

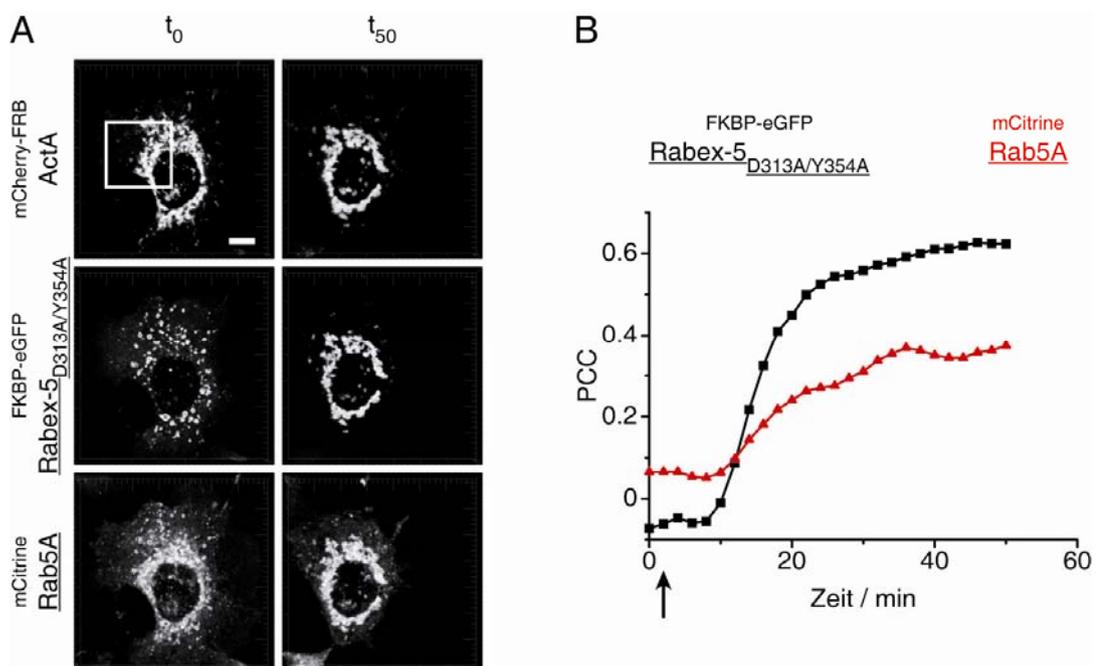


Abbildung 27: Die Lokalisationsfähigkeit von Rabex-5_{D313A/Y354A} gegenüber Rab5A ist beeinträchtigt.

(A) Konfokale Aufnahmen der zeitabhängigen Rab5A Rekrutierung durch Rabex-5_{D313A/Y354A}. COS-7 Zellen wurden mit Plasmiden transfiziert, die für mitochondrial lokalisiertes $^{mCherry-FRB}$ ActA sowie endosomal lokalisiertem $^{FKBP-eGFP}$ Rabex-5_{D313A/Y354A} und mCitrine Rab5A kodieren (t_0). Die Zugabe von 1 μ M A/C Heterodimerizer führt zur Fehllokalisierung von $^{FKBP-eGFP}$ Rabex-5_{D313A/Y354A} zu den Mitochondrien gefolgt von der Relokalisation von mCitrine Rab5A (t_{50}), die jedoch zu einem geringeren Ausmaß stattfindet, erkennbar an verbleibenden Rab5A-positiven Strukturen zum Zeitpunkt t_{50} im vergrößerten Ausschnitt (Abbildung 28) des markierten Quadrats. Maßstab 10 μ m. (B) Die Quantifizierung der Kolo-kalisation der angezeigten Fusionsproteine mit mitochondrialem $^{mCherry-FRB}$ ActA demonstriert trotz verminderter Lokalisationsfähigkeit von Rabex-5_{D313A/Y354A} die simultane Rekrutierung des Austauschfaktors und Rab5A zu den Mitochondrien. Der Pfeil markiert die Zugabe des A/C Heterodimerizers.

Nach Fehllokalisierung von $^{FKBP-eGFP}$ Rabex-5 $_{D313A/Y354A}$ zu den Mitochondrien durch induzierte Heterodimerisierung der FRB- und FKBP-Fusionsproteine wird wiederum Rab5A zu den Mitochondrien rekrutiert, jedoch zu einem geringeren Ausmaß im Vergleich zu wildtypischem Rabex-5, da zum Endzeitpunkt des Experiments noch Rab5A-positive endosomale Strukturen detektiert wurden, die nicht mit mitochondrialem $^{mCherry-FRB}$ ActA kolokalisieren. Dies ist besonders im überlagerten Bild des vergrößerten Ausschnitts zwischen mCitrine Rab5A und $^{mCherry-FRB}$ ActA zum Zeitpunkt t_{50} zu erkennen (Abbildung 28). Trotz der beeinträchtigten Fähigkeit von Rabex-5 $_{D313A/Y354A}$ Rab5A zu lokalisieren erfolgt die Rekrutierung simultan (Abbildung 27B).

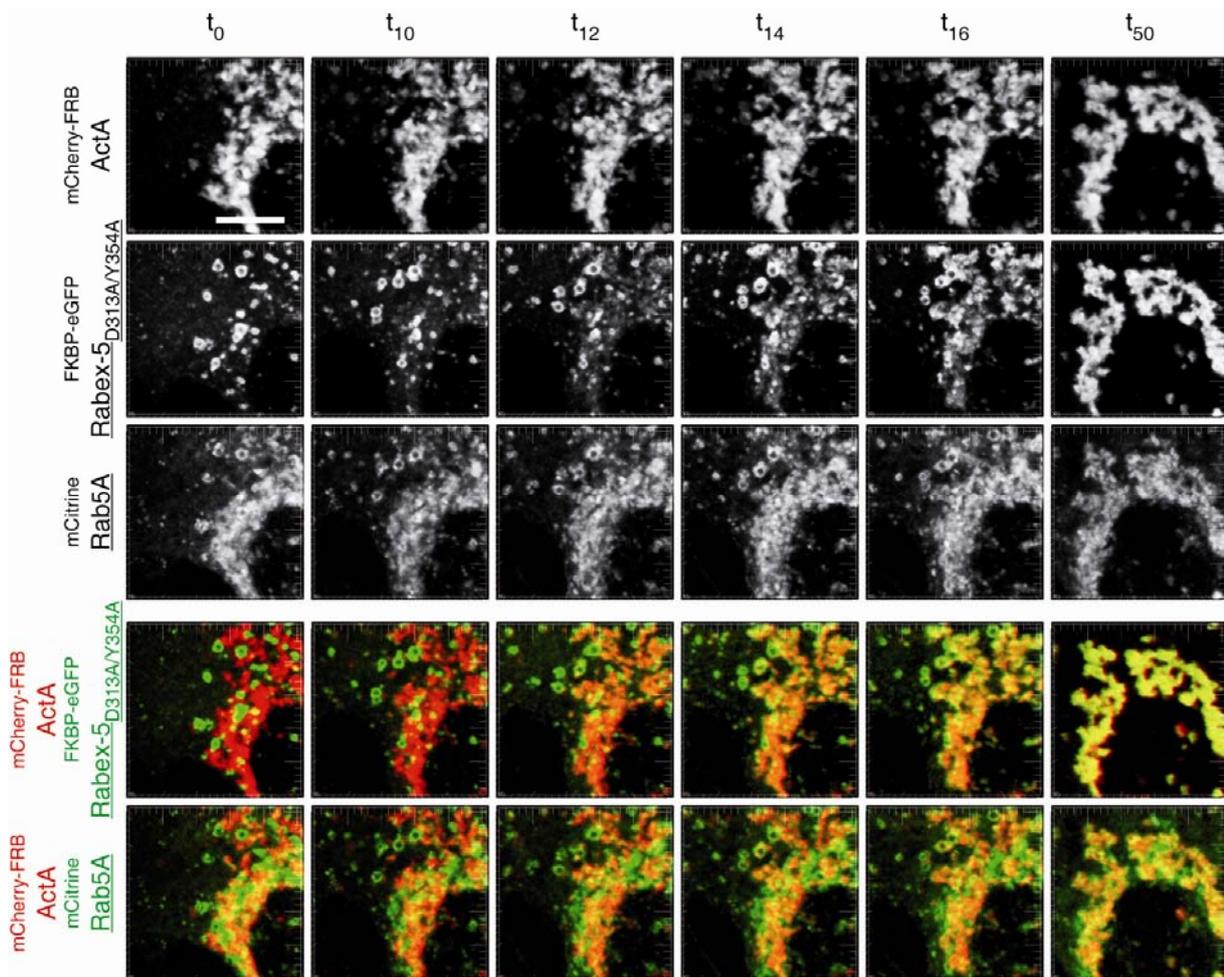


Abbildung 28: Detailansicht der Umverteilung von Rab5A nach induzierter Fehllokalisierung von Rabex-5 $_{D313A/Y354A}$ zu den Mitochondrien.

Die konfokalen Bilder zeigen einen vergrößerten Ausschnitt der in Abbildung 27 dargestellten Zelle nach Induktion der mitochondrialen Fehllokalisierung von $^{FKBP-eGFP}$ Rabex-5 $_{D313A/Y354A}$ zu definierten Zeitpunkten. Die verminderte Lokalisationsfähigkeit von Rabex-5 $_{D313A/Y354A}$ gegenüber Rab5A wird durch verbleibende Rab5A-positive Strukturen zum Endzeitpunkt t_{50} deutlich, die nicht mit mitochondrialen Membranen kolokalisieren. Maßstab 10 μ m.

Ergebnisse

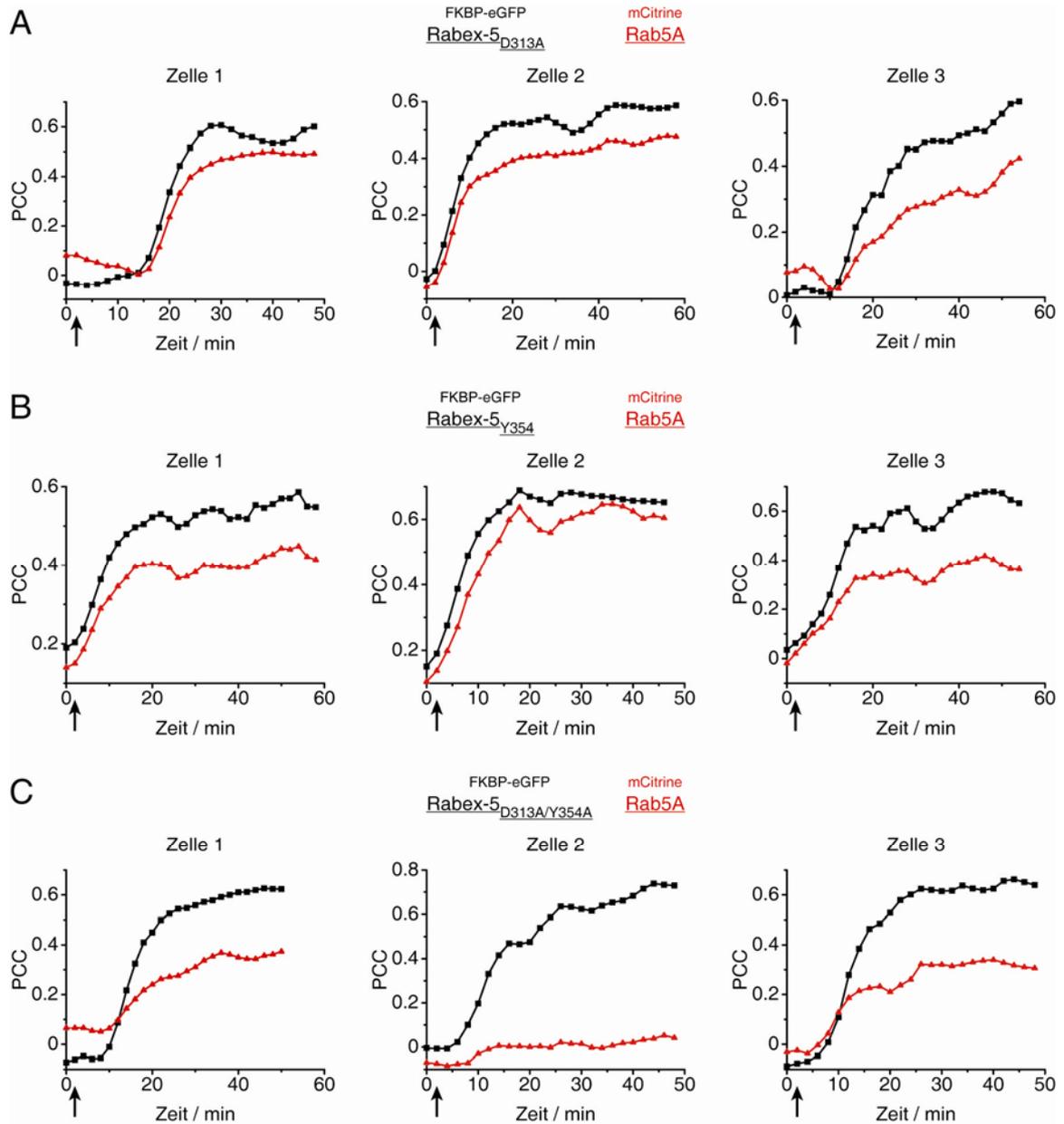


Abbildung 29: Quantitative Analyse der Kolokalisation der Rabex-5-Mutanten und Rab5A mit mitochondrialem $mCherry-FRB$ ActA in drei unabhängigen Zellen.

Quantifizierung der Kolokalisation von (A) $mCherry-FRB$ ActA/ $FKBP-eGFP$ Rabex-5_{D313A} und $mCherry-FRB$ ActA/ $mCitrine$ Rab5A, (B) $mCherry-FRB$ ActA/ $FKBP-eGFP$ Rabex-5_{Y354A} und $mCherry-FRB$ ActA/ $mCitrine$ Rab5A und (C) $mCherry-FRB$ ActA/ $FKBP-eGFP$ Rabex-5_{D313A/Y354A} und $mCherry-FRB$ ActA/ $mCitrine$ Rab5A durch Berechnung des PCC nach Induktion der Fehllokalisierung des FKBP-Fusionsproteins (Rabex-5-Mutante) zu den Mitochondrien in drei unabhängigen Zellen. Durch die repetitive Analyse wird bestätigt, dass die verbleibende katalytische Aktivität der beiden Rabex-5 Einzelmutanten (A und B) ausreichend ist, um Rab5A effektiv zu lokalisieren. Dagegen konnte fehllokalisiertes $FKBP-eGFP$ Rabex-5_{D313A/Y354A} in Zelle 2 Rab5A nicht rekrutieren, wohingegen in Zelle 1 und 3 eine Korekrutierung induziert wurde (C). Der Pfeil markiert die Zugabe des A/C Heterodimerizers.

In Übereinstimmung mit der beschriebenen Beobachtung bestätigt die Quantifizierung der Kolokalisation der angezeigten Fusionsproteine einer weiteren Zelle, dass dort keine Rab5A-Rekrutierung durch $FKBP-eGFP$ Rabex-5_{D313A/Y354A} induziert wurde (Abbildung 29C, Zelle 2), wo-

hingegen in einer weiteren Zelle Rab5A durch die Rabex-5-Doppelmutante wieder lokalisiert werden konnte (Abbildung 29C, Zelle 3).

Die verminderte GEF-Aktivität sowie die beeinträchtigte Fähigkeit von Rabex5_{D313A/Y354A} Rab5A zu lokalisieren wird zusätzlich von der Beobachtung unterstützt, dass in nur 54 % der Zellen der statistischen Analyse eine mitochondriale Rekrutierung von Rab5A durch die Rabex-5-Doppelmutante beobachtet wurde (Abbildung 31C). Das bedeutet, dass möglicherweise ein Schwellenwert der effektiven Nukleotidaustauschaktivität, d.h. das Produkt aus Expressionsniveau und katalytischer Effizienz von Rabex-5, an einer Membran erreicht werden muss, um den Lokalisationsprozess von Rab5A zu induzieren. Weiterhin wurde die Fähigkeit der beiden Rabex-5 Einzelmutanten Rab5A zu rekrutieren ebenfalls durch die zeitabhängige Analyse von je zwei weiteren Zellen bestätigt (Abbildung 29A und B). Die statistische Analyse unterstützt zudem die vorherigen Beobachtungen, dass die verbleibende Nukleotidaustauschaktivität von ^{eGFP}Rabex-5_{D313A} und ^{eGFP}Rabex-5_{Y354A} ausreichend ist, um Rab5A effizient zu lokalisieren, da in beiden Fällen in nahezu 100 % der Zellen eine signifikante mitochondriale Lokalisation von Rab5A beobachtet wurde (Abbildung 31C). Das bedeutet, dass die katalytische Effizienz der beiden Einzelmutanten Rabex5_{D313A} und Rabex5_{Y354A} im Vergleich zur Doppelmutante ausreichend ist, um eine effiziente Rekrutierung von Rab5A bei allen Expressionsniveaus von Rabex-5 zu bewirken.

5.3.4. Die Rabex-5 GEF-Aktivität korreliert mit der GDI-Freisetzungsaktivität und Rekrutierung von Rab5A

Die vermeintliche GDI-Freisetzungsaktivität des Legionellenproteins DrrA gegenüber des Rab1B:GDP:GDI-Komplexes ist eine Folge der Nukleotidaustauschaktivität gegenüber Rab1B¹⁴². Daher sollte überprüft werden, ob Rabex-5 ebenfalls in der Lage ist Rab5A aus dem Komplex mit GDI freizusetzen. Weiterhin sollte analysiert werden, ob eine beeinträchtigte Nukleotidaustauschaktivität mit einer verminderten GDI-Freisetzungsaktivität einhergeht. Dazu erfolgte zunächst die unter 4.4.6 beschriebene C-terminale Modifikation von Rab5A_{CVIL} mit fluoreszentschem Farnesyl-NBD. Anschließend wurden 100 nM Rab5A-f-NBD und 200 nM GDI in einer Küvette vorgelegt (4.5.1). Der beobachtete Anstieg der NBD-Fluoreszenz resultiert aus der Bildung des GDI:Rab5A-f-NBD-Komplexes (Abbildung 30). Durch Zugabe von 2,5 µM Rabex-5-VPS9 und einem Überschuss GTP (100 µM) wurde die Dissoziation des GDI:Rab5A-f-NBD-Komplexes durch Abnahme der NBD-Fluoreszenz zeitaufgelöst verfolgt. Dabei konnte zunächst beobachtet werden, dass Rabex-5-VPS9 Rab5A effektiv aus dem Komplex mit GDI freisetzen kann. Es konnte für DrrA und Rab1B gezeigt werden, dass die effektive Freisetzung von GDI aus dem Rab1B:GDP:GDI-Komplex nur in Anwesenheit eines Überschuss von GTP erfolgt und das durch Zugabe eines Überschuss von GDP die Reaktion umkehrbar ist, d.h. das sich der Komplex aus Rab und GDI wieder zurückbildet⁵⁹. Da GTP

in der Zelle im Überschuss vorliegt, spiegelt dies die physiologisch relevante Situation wider⁴².

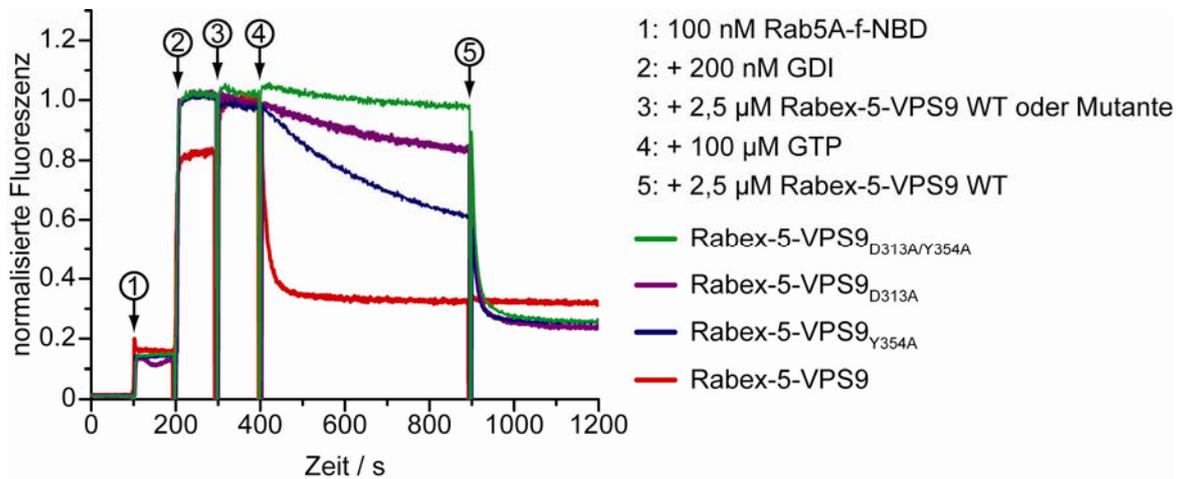


Abbildung 30: GDI-Freisetzungsfähigkeit verschiedener Rabex-5-VPS9-Mutanten.

Nach Bildung des GDI:Rab5A-f-NBD-Komplexes (100 nM Rab5A-f-NBD, 200 nM GDI) wurde durch Zugabe von wildtypischem oder mutiertem Rabex-5-VPS9 (2,5 µM) und GTP (100 µM) die Freisetzung von GDI zeitaufgelöst verfolgt. Die Zugabe von 2,5 µM wildtypischem Rabex-5-VPS9 nach 900 s diente der Bestimmung des Endpunktes der Reaktion.

Die Analyse der Mutanten Rabex-5-VPS9_{D313A/Y354A}, Rabex-5-VPS9_{D313A} und Rabex-5-VPS9_{Y354A} mit verminderter Nukleotidaustauschfähigkeit gegenüber Rab5A zeigt, dass die GDI-Freisetzungsfähigkeit in gleicher Weise abnimmt, d.h. eine geringere katalytische Effizienz bezüglich der Nukleotidaustauschfähigkeit geht einher mit einer geringeren GDI-Freisetzungsfähigkeit (Abbildung 24 und Abbildung 30).

Dies unterstützt die Hypothese, dass die GDI-Freisetzungsfähigkeit eine Folge der Nukleotidaustauschaktivität ist, da GDI nach Austausch von GDP zu GTP eine um drei Größenordnungen geringere Affinität gegenüber dem Rab-Protein besitzt und daher der GEF-vermittelte Nukleotidaustausch unweigerlich die Freisetzung des Rab-Proteins aus dem Komplex mit GDI zur Folge hat^{59,142}. Entsprechend führt der beeinträchtigte Prozess des Nukleotidaustauschs zu einer verlangsamten GDI-Freisetzung.

Die graphische Gegenüberstellung der katalytischen Effizienz der Nukleotidaustauschaktivität von wildtypischen Rabex-5-VPS9 und den genannten Mutanten mit der GDI-Freisetzungsfähigkeit sowie der Fähigkeit der entsprechenden Rabex-5-Variante Rab5A zu lokalisieren demonstriert eine signifikante Korrelation dieser drei vermeintlich unabhängigen Prozesse (Abbildung 31).

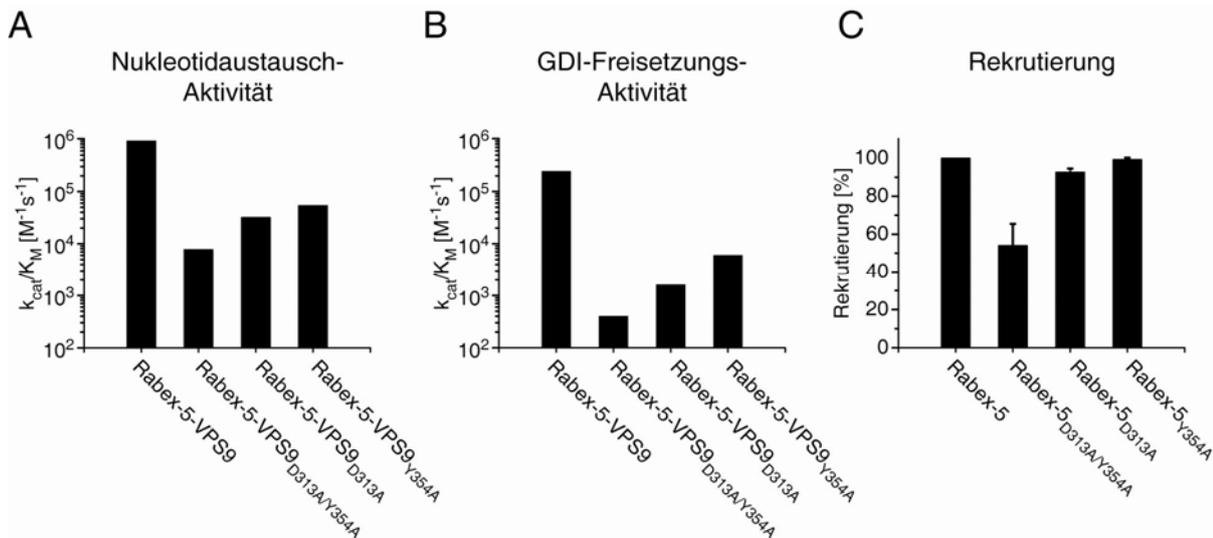


Abbildung 31: Nukleotidaustausch- und GDI-Freisetzungstätigkeit gegenüber Rab5A sowie die Fähigkeit zur Lokalisation von Rab5A verschiedener Rabex-5-Mutanten.

(A) Katalytische Effizienzen der Nukleotidaustauschaktivität der Rabex-5-VPS9-Mutanten gegenüber Rab5A. Durch einen einzelexponentiellen Fit wurde die Geschwindigkeitskonstante k aus den in Abbildung 24 dargestellten Kurven ermittelt und daraus jeweils die katalytische Effizienz berechnet. (B) Katalytische Effizienzen der GDI-Freisetzungstätigkeit der Rabex-5-VPS9-Mutanten gegenüber Rab5A. Die Geschwindigkeitskonstante k wurde durch einen einzelexponentiellen Fit aus den in Abbildung 30 dargestellten Kurven ermittelt und daraus die katalytische Effizienz für jede Mutante berechnet. (C) Statistischer Vergleich der Fähigkeit verschiedener Rabex-5-Mutanten nach mitochondrialer Fehllokalisierung die Rekrutierung von Rab5A zu vermitteln. Es wurden mindestens 50 Zellen in drei unabhängigen Experimenten analysiert. Die Daten zeigen jeweils den Mittelwert \pm Standardabweichung.

Insbesondere geht daraus hervor, dass die Rabex-5-Doppelmutante aufgrund ihrer um den Faktor 100 geringeren Nukleotidaustauschaktivität sogar eine um den Faktor 600 verminderte GDI-Freisetzungstätigkeit gegenüber GDI:Rab5A-f-NBD besitzt. Die Tatsache, dass immer noch in etwa 50 % der analysierten Zellen eine effektive Lokalisation durch Rabex-5_{D313A/Y354A} induziert wird, ist mit der Existenz endogener Proteine zu erklären. Das bedeutet, dass selbst eine geringe effektive Nukleotidaustauschaktivität von Rabex-5 an der Mitochondrienmembran zur Rekrutierung und Aktivierung von geringen Mengen ^{mCitrine}Rab5A und endogenem Rab5A führt. Aktives Rab5A:GTP interagiert daraufhin mit dem endogenen Rabex-5:Rabaptin-5-Komplex und dies resultiert in der mitochondrialen Rekrutierung von endogenem wildtypischem und entsprechend aktivem Rabex-5, wodurch sowohl endogenes Rab5A als auch ^{mCitrine}Rab5A rekrutiert werden.

Zusammenfassend demonstrieren die gezeigten Experimente, dass die Nukleotidaustauschaktivität von Rabex-5 einerseits die Freisetzung von GDI aus dem Komplex mit Rab5A bewirkt und dass dies einen direkten Einfluss auf die Fähigkeit von Rabex-5 besitzt Rab5A zu lokalisieren.

5.4. Rabex-5-bindungsdefiziente Rab5A-Mutanten können nicht durch Rabex-5 rekrutiert werden

Da die Nukleotidaustauschaktivität von Rabex-5 ein bestimmender Faktor bezüglich der Lokalisation von Rab5A ist, ist zu erwarten, dass Mutationen innerhalb von Rab5A, die für die Erkennung durch Rabex-5 notwendig sind, die subzelluläre Lokalisation von Rab5A beeinflussen. Im Rahmen der Mutationsanalyse, die zur Identifikation der Aminosäuren von Rabex-5 führten, die die GEF-Aktivität gegenüber Rab5 und Rab21 beeinträchtigen, wurden die Reste Ala57_{Rab5C} und Tyr83_{Rab5C} (entsprechend Ala56 und Tyr82 in Rab5A) identifiziert, die einen Einfluss auf die Erkennung durch Rabex-5 besitzen. So führen die Mutationen A56D und Y82A zu einer signifikanten Verminderung des durch Rabex-5-katalysierten Nukleotidaustauschs¹³².

5.4.1. GEF-Aktivität verschiedener Rab5A-Mutanten

Um in Analogie zu den Rabex-5-Mutanten eine Rab5A-Mutante zu generieren, die nicht mehr durch Rabex-5 aktiviert werden kann, wurde zunächst die Doppelmutante Rab5A_{A56D/Y82A} generiert und sowohl die Einzelmutanten als auch die Doppelmutante im Vergleich zum wildtypischen Protein bezüglich des Rabex-5-katalysierten Nukleotidaustauschs überprüft (Abbildung 32). Dazu wurde nach Zugabe von 100 μ M GppNHp in Anwesenheit von 50 nM Rabex-5-VPS9 die Änderung der intrinsischen Tryptophanfluoreszenz der jeweiligen Rab5A-Variante (1 μ M) bestimmt (4.5.1).

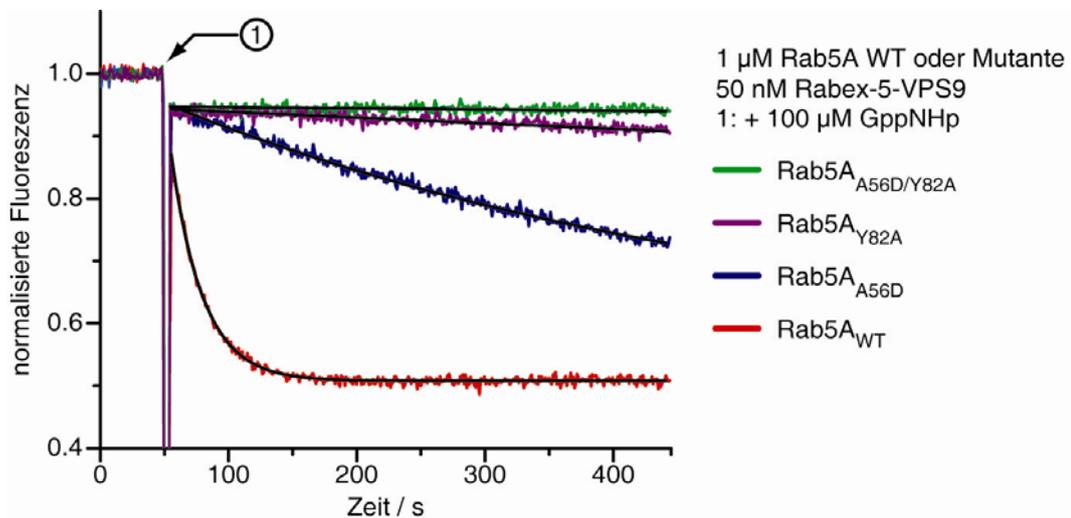


Abbildung 32: Nukleotidaustauschaktivität von Rab5A-Mutanten.

Bestimmung der Nukleotidaustauschaktivität von Rabex-5-VPS9 (50 nM) gegenüber verschiedener Rab5A-Mutanten (1 μ M) durch Messung der Änderung der intrinsischen Tryptophanfluoreszenz des Rab-Proteins nach Zugabe von 100 μ M GppNHp.

Dabei konnte zunächst die Reduktion des Nukleotidaustauschs von Rabex-5-VPS9 gegenüber Rab5A_{A56D} und Rab5_{Y82A} bestätigt werden. Die Doppelmutante Rab5A_{A56D/Y82A} zeigt im Vergleich zu Rab5_{Y82A} noch mal eine weitere signifikante Verminderung des Rabex-5-VPS9-katalysierten Nukleotidaustauschs. Es wurde durch einen exponentiellen Fit die Geschwindigkeitskonstante k ermittelt und daraus die in Tabelle 20 aufgelisteten katalytischen Effizienzen berechnet.

Tabelle 20: Katalytische Effizienzen des Rabex-5-VPS9-katalysierten Nukleotidaustauschs gegenüber Rab5A-Mutanten

Rab5A-Mutante	k_{cat}/K_M
Rab5A	$8,0 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$
Rab5A _{A56D}	$4,2 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$
Rab5A _{Y82A}	$4,0 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$
Rab5A _{A56D/Y82A}	$8,8 \cdot 10^2 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$

Während die Einzelmutanten Rab5A_{A56D} und Rab5_{Y82A} eine um den Faktor 20 bzw. 200 reduzierten Nukleotidaustauschaktivität aufweisen, ist die Effizienz des Nukleotidaustauschs gegenüber der Doppelmutante Rab5A_{A56D/Y82A} sogar um den Faktor 910 im Vergleich zu wildtypischem Rab5A vermindert.

5.4.2. Subzelluläre Lokalisation verschiedener Rab5-Mutanten

Die Analyse der subzellulären Lokalisation der genannten Rab5A-Mutanten im Vergleich zum wildtypischen Protein, welche für die Erkennung durch Rabex-5 eine entscheidende Rolle spielen, zeigt, im Gegensatz zu den Rabex-5-Mutationen, eine signifikante Änderung der Verteilung in der Zelle. Die Koexpression der Rab5A-Varianten mit der C-terminalen Domäne von EEA1 (Aminosäuren 1257-1411), die der Markierung früher Endosomen dient und eine Phosphatidylinositol-3-Phosphat-bindende FYVE-Fingerdomäne enthält, zeigt, dass bereits die Einzelmutante Rab5A_{A56D} zu einem deutlich geringeren Ausmaß an den Endosomen lokalisiert und eine partielle Lokalisation in der perinukleären Region aufweist (Abbildung 33A, II). Rab5A_{Y82A} weist nur noch eine geringfügige endosomale und dafür überwiegende Lokalisation am Golgi-Apparat und im Zytosol auf, wohingegen die Doppelmutante Rab5A_{A56D/Y82A} ausschließlich am Golgi-Apparat lokalisiert (Abbildung 33A, III und IV). Die Berechnung des PCC zur Quantifizierung der Kolo-kalisation der ^{eGFP}Rab5A-Varianten mit ^{mCherry}EEA1₁₂₅₇₋₁₄₁₁ bestätigt die erhebliche Reduktion der endosomalen Lokalisation (Abbildung 33B). Dies deutet bereits darauf hin, dass durch eine beeinträchtigte Bindung von Rab5A an Rabex-5 die subzelluläre Lokalisation signifikant beeinträchtigt wird.

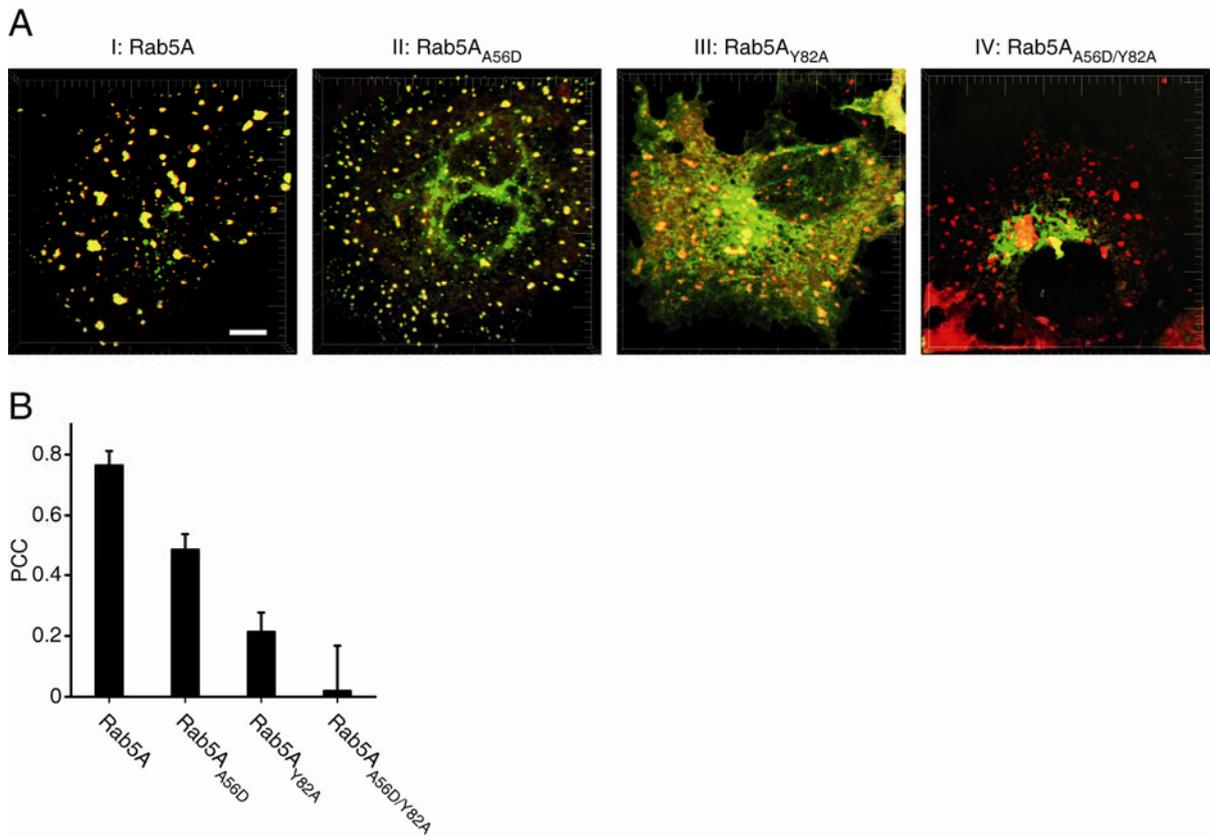


Abbildung 33: Subzelluläre Lokalisation von Rab5A-Mutanten.

(A) Konfokale Bilder fixierter COS-7 Zellen zeigen die subzelluläre Lokalisation von $eGFP^{Rab5A}$, $eGFP^{Rab5A_{A56D}}$, $eGFP^{Rab5A_{Y82A}}$ sowie $eGFP^{Rab5A_{A56D/Y82A}}$ nach Kotransfektion mit $mCherry^{EEA1_{1257-1411}}$, das als Marker für frühe Endosomen diente. Die Zellen wurden 24 h nach Transfektion fixiert und analysiert. Maßstab 10 μm . (B) Durch Berechnung des PCC zwischen den Rab5A-Varianten und $mCherry^{EEA1_{1257-1411}}$ wurde die Änderung der nativen Lokalisation an frühen Endosomen durch die eingeführten Punktmutationen quantifiziert. Der PCC wurde jeweils für drei unabhängige Zellen bestimmt. Die Daten zeigen jeweils den Mittelwert \pm Standardabweichung.

5.4.3. Die Rabex-5-vermittelte Lokalisation erfordert die effiziente Bindung von Rab5A

Die effektive Katalyse des Nukleotidaustauschs erfordert die spezifische Erkennung und Bindung des GEFs an sein Substrat. Die generierten Rab5A-Varianten, die einer signifikanten Beeinträchtigung der Bindung und als Folge dessen der Aktivierung durch den Rabex-5-vermittelten Nukleotidaustausch unterliegen, sollten daher bezüglich der Lokalisation durch Rabex-5 untersucht werden. Die Einzelmutante $m^{Citrine}Rab5A_{A56D}$ lokalisiert bei Koexpression mit $mCherry-FRB^{ActA}$ und $FKBP-eGFP^{Rabex-5}$ überwiegend an vergrößerten Endosomen, deren Bildung möglicherweise durch die Überexpression von Rabex-5 induziert wird. Die native Lokalisation von $FKBP-eGFP^{Rabex-5}$ an Endosomen sowie von $mCherry-FRB^{ActA}$ an den Mitochondrien wird durch die Kotransfektion mit $Rab5A_{A56D}$ nicht beeinflusst (Abbildung 34A, linke Spalte).

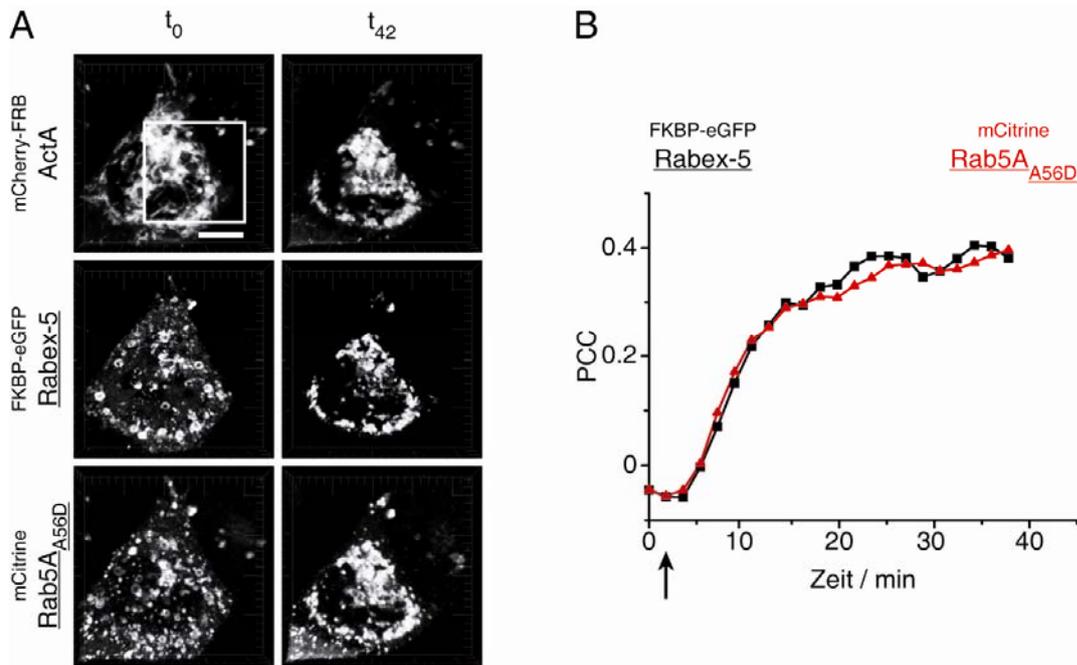


Abbildung 34: Rabex-5 lokalisiert Rab5A_{A56D} trotz reduzierter Nukleotidaustausch-Suszeptibilität.

(A) Konfokale Aufnahmen lebender COS-7 Zellen zeigen neben mitochondrial lokalisiertem $mCherry-FRB$ ActA die subzelluläre Lokalisation von $FKBP-eGFP$ Rabex-5 und $mCitrine$ Rab5A_{A56D} an überwiegend vergrößerten Endosomen zum Zeitpunkt t_0 . Nach induzierter Fehllokalisierung von $FKBP-eGFP$ Rabex-5 zu den Mitochondrien durch Zugabe von 1 μ M A/C Heterodimerizer 24 h nach Transfektion transloziert $mCitrine$ Rab5A_{A56D} gleichermaßen zu den Mitochondrien. Abbildung 48 (siehe Anhang) zeigt einen vergrößerten Ausschnitt des markierten Quadrats während des Übergangs der induzierten Fehllokalisierung. Maßstab 10 μ m. (B) Durch Berechnung des PCC zwischen $mCherry-FRB$ ActA/ $FKBP-eGFP$ Rabex-5 (schwarze Linie) und $mCherry-FRB$ ActA/ $mCitrine$ Rab5A_{A56D} (rote Linie) wurde die Kolokalisation der entsprechenden Fusionsproteine an den Mitochondrien quantifiziert. Dadurch geht hervor, dass $mCitrine$ Rab5A_{A56D} simultan mit $FKBP-eGFP$ Rabex-5 zu den Mitochondrien transloziert. Der Pfeil markiert die Zugabe des A/C Heterodimerizers.

Nach A/C Heterodimerizer-induzierter mitochondrialer Rekrutierung von $FKBP-eGFP$ Rabex-5 erfolgt gleichermaßen eine Relokalisation von $mCitrine$ Rab5A_{A56D} zu den Mitochondrien (Abbildung 34A, rechte Spalte). Das bedeutet, dass trotz einer signifikanten Reduktion der Aktivierung von Rab5A_{A56D} durch Rabex-5 die Fähigkeit zur Lokalisation vollständig erhalten bleibt. Weiterhin zeigt die Quantifizierung der Kolokalisation und damit des Rekrutierungsprozesses durch Berechnung des PCC zu jedem Zeitpunkt, dass die Relokalisation von $FKBP-eGFP$ Rabex-5 und $mCitrine$ Rab5A_{A56D} gleichzeitig erfolgt (Abbildung 34B). Entsprechend ist die verbleibende Fähigkeit zur Bindung von Rab5A_{A56D} durch Rabex-5 ausreichend, um die effiziente Rekrutierung zu induzieren. Dagegen können die Rab5A-Varianten, welche die Y82A-Mutation tragen (Rab5A_{Y82A} und Rab5A_{A56D/Y82A}), nicht mehr durch Rabex-5 lokalisiert werden. Auffallend ist, dass bereits vor Induktion der Fehllokalisierung von $FKBP-eGFP$ Rabex-5 beide Rab5A-Varianten eine überwiegende Lokalisation an perinukleären Membranen und am Golgi-Apparat aufweisen (Abbildung 35A und C, linke Spalte).

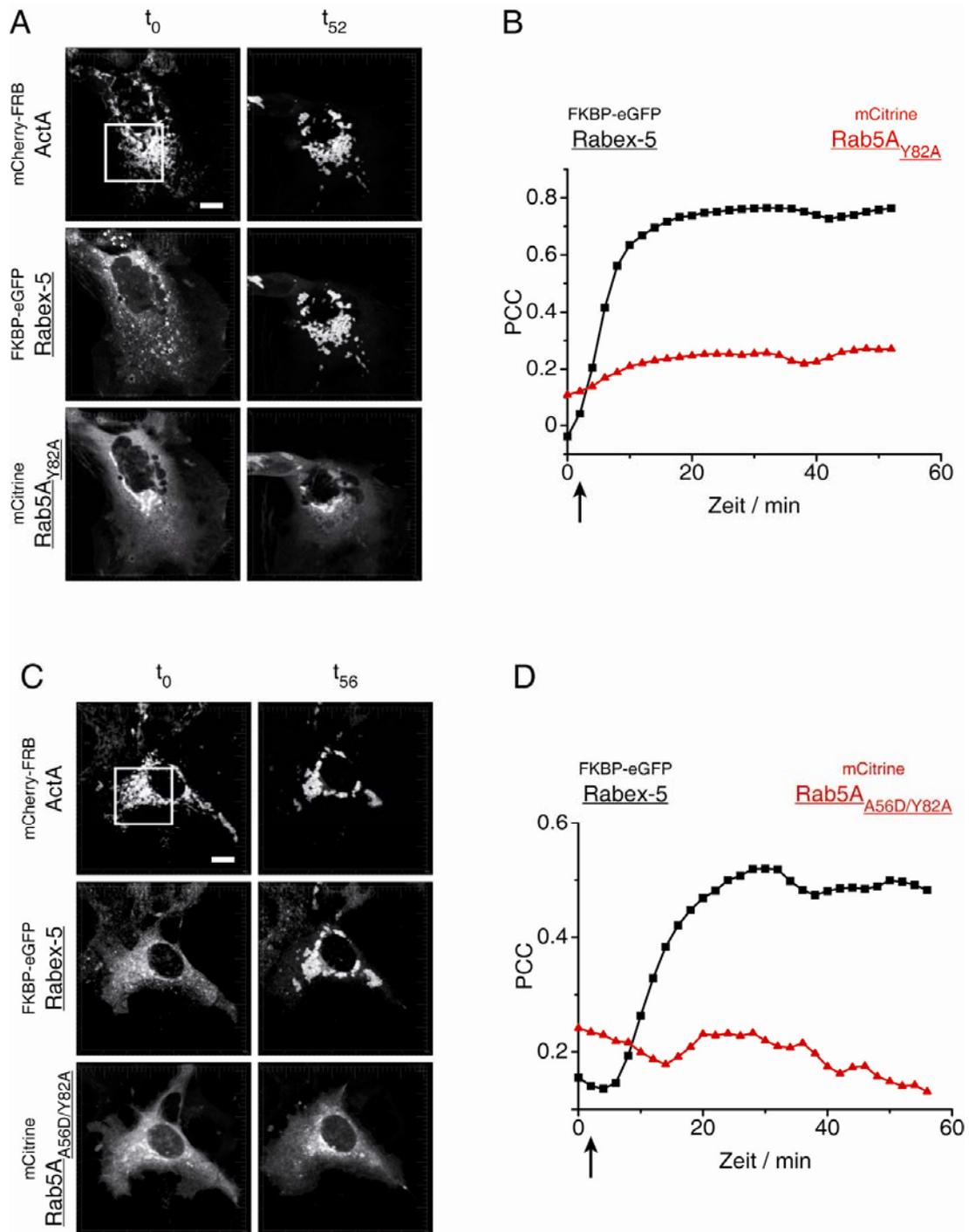


Abbildung 35: Die Lokalisation der Mutanten Rab5A_{Y82A} und Rab5A_{A56D/Y82A} kann nicht durch Rabex-5 vermittelt werden.

(A und C) Konfokale Bilder lebender COS-7 Zellen, die mCherry-FRB ActA, FKBP-eGFP Rabex-5 und mCitrine Rab5A_{Y82A} (A) bzw. mCitrine Rab5A_{A56D/Y82A} (C) exprimieren. Die initiale Lokalisation der Mutanten Rab5A_{Y82A} und Rab5A_{A56D/Y82A} am Golgi-Apparat bleibt nach Fehllokalisierung von FKBP-eGFP Rabex-5 zu den Mitochondrien induziert durch die Zugabe von 1 μ M A/C Heterodimerizer 24 h nach Transfektion unverändert. In Abbildung 49 bzw. Abbildung 50 ist jeweils ein vergrößerter Ausschnitt des markierten Quadrats während des Übergangs der induzierten Fehllokalisierung von Rabex-5 gezeigt. Maßstab 10 μ m. (B und D) Die Quantifizierung der Kolo-kalisation durch Berechnung des PCC der angezeigten Fusionsproteine mit mCherry-FRB ActA an den Mitochondrien verdeutlicht, dass keine Rekrutierung von mCitrine Rab5A_{Y82A} (B) und mCitrine Rab5A_{A56D/Y82A} (D) durch Rabex-5 vermittelt wird. Der Pfeil markiert die Zugabe des A/C Heterodimerizers.

Das bedeutet, dass durch Koexpression mit Rabex-5 keine Änderung der Lokalisation im Vergleich zur Koexpression mit dem Endosomenmarker EEA1₁₂₅₇₋₁₄₁₁ erfolgt (Abbildung 33A, III und IV). Bei Koexpression mit ^{mCitrine}Rab5A_{Y82A} lokalisiert Rabex-5 wie erwartet an Endosomen, die teilweise vergrößert sind (Abbildung 35A, linke Spalte), wohingegen die Koexpression mit ^{mCitrine}Rab5A_{A56D/Y82A} dazu führt, dass eine größere Fraktion von Rabex-5 zusätzlich im Zytosol lokalisiert (Abbildung 35C, linke Spalte). Die Lokalisation von ^{mCherry-FRB}ActA an den Mitochondrien wird in beiden Experimenten durch die Koexpression mit den angezeigten Fusionsproteinen nicht beeinflusst (Abbildung 35A und C, linke Spalte). Nach induzierter Fehllokalisierung von ^{FKBP-eGFP}Rabex-5 zu den Mitochondrien durch Zugabe des A/C Heterodimerizers wurde keine Umverteilung der beiden Rab5A-Mutanten beobachtet, d.h. beide zeigen zum Endzeitpunkt des Experiments weiterhin die ursprüngliche perinukleäre Lokalisation (Abbildung 35A und C, rechte Spalte). Die Quantifizierung der Kolokalisation zwischen ^{mCherry-FRB}ActA/^{mCitrine}Rab5A_{Y82A} und ^{mCherry-FRB}ActA/^{mCitrine}Rab5A_{A56D/Y82A} verdeutlicht die visuelle Beurteilung der Zellenbilder durch einen konstant niedrigen PCC, d.h. weder ^{mCitrine}Rab5A_{Y82A} noch ^{mCitrine}Rab5A_{A56D/Y82A} kolokalisieren mit mitochondrialem ^{mCherry-FRB}ActA, während der Anstieg des PCC zwischen ^{mCherry-FRB}ActA und ^{FKBP-eGFP}Rabex-5 in beiden Experimenten anzeigt, dass die mitochondriale Rekrutierung von Rabex-5 induziert wurde (Abbildung 35B und D). Zum einen scheint die Aminosäure Y82A eine spezifische Determinante bezüglich der Erkennung von Rab5A durch Rabex-5 zu sein. Weiterhin reicht die verbleibende katalytische Effizienz von Rabex-5 gegenüber Rab5A_{Y82A} und Rab5A_{A56D/Y82A} nicht aus, um eine Lokalisation zu bewirken.

Die beobachteten Ergebnisse konnten darüber hinaus in der repetitiven Analyse bestätigt werden. In allen drei Zellen, in denen die zeitabhängige Rekrutierung durch Quantifizierung der Kolokalisation zwischen ^{mCherry-FRB}ActA/^{FKBP-eGFP}Rabex-5 und ^{mCherry-FRB}ActA/^{mCitrine}Rab5A_{A56D} analysiert wurde, erfolgte eine durch Rabex-5-vermittelte Lokalisation von Rab5A_{A56D} (Abbildung 36A). Dagegen zeigt die Analyse der Rabex-5-vermittelten Lokalisation von ^{mCitrine}Rab5A_{Y82A} und ^{mCitrine}Rab5A_{A56D/Y82A} in allen weiteren zeitabhängig analysierten Zellen einen gleichbleibenden niedrigen PCC zwischen mitochondrialem ^{mCherry-FRB}ActA und der entsprechenden Rab5A-Variante nach erfolgter Fehllokalisierung von ^{FKBP-eGFP}Rabex-5, d.h. es konnte keine mitochondriale Umverteilung des Rab-Proteins induziert werden (Abbildung 36 B und C).

Ergebnisse

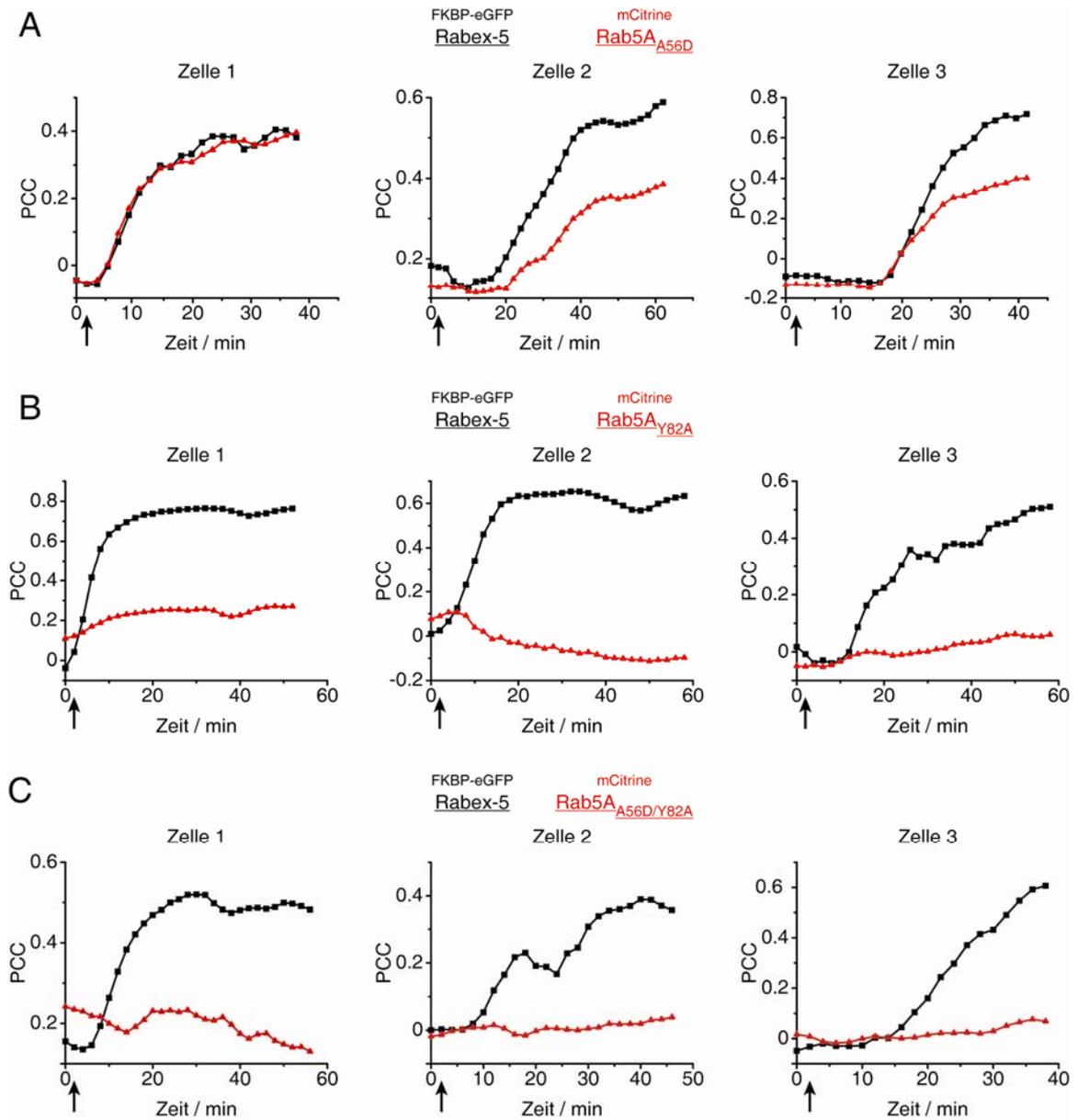


Abbildung 36: Quantitative Analyse der Kolokalisation von Rabex-5 und den genannten Rab5A-Mutanten mit mitochondrialem ^{mCherry-FRB}ActA in drei unabhängigen Zellen.

Quantifizierung der Kolokalisation von (A) ^{mCherry-FRB}ActA/^{FKBP-eGFP}Rabex-5 und ^{mCherry-FRB}ActA/^{mCitrine}Rab5A_{A56D}, (B) ^{mCherry-FRB}ActA/^{FKBP-eGFP}Rabex-5 und ^{mCherry-FRB}ActA/^{mCitrine}Rab5A_{Y82A} und (C) ^{mCherry-FRB}ActA/^{FKBP-eGFP}Rabex-5 und ^{mCherry-FRB}ActA/^{mCitrine}Rab5A_{A56D/Y82A} durch Berechnung des PCC nach Induktion der Fehllokalisation von Rabex-5 zu den Mitochondrien in drei unabhängigen Zellen. Die repetitive Analyse bestätigt, dass Rabex-5 die Lokalisation von Rab5A_{A56D} (A) nicht jedoch von Rab5A_{Y82A} (B) und Rab5A_{A56D/Y82A} (C) vermittelt. Der Pfeil markiert die Zugabe des A/C Heterodimerizers.

Die Gegenüberstellung der katalytischen Effizienzen des Rabex-5-katalysierten Nukleotidaustauschs gegenüber den Rab5A-Varianten und der statistischen Analyse der Fähigkeit von Rabex-5 deren Lokalisation zu beeinflussen verdeutlicht den Zusammenhang (Abbildung 37 A und B). Trotz einer um den Faktor 20 verminderten

Nukleotidaustauschaktivität im Vergleich zum wildtypischen Protein konnte in nahezu 100 % der bewerteten Zellen eine Lokalisation von Rab5A_{A56D} durch Rabex-5 induziert werden. Die um den Faktor 200 bzw. 910 verminderte Aktivität des Nukleotidaustauschs von Rabex-5 gegenüber Rab5A_{Y82A} bzw. Rab5A_{A56D/Y82A} reduziert die Lokalisationsfähigkeit dagegen bereits auf 17 % bzw. 8 % der analysierten Zellen.

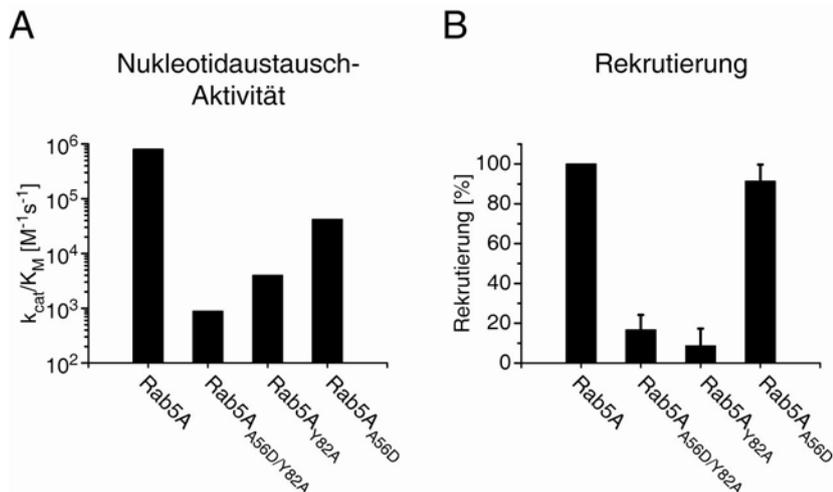


Abbildung 37: Nukleotidaustauschaktivität und Fähigkeit zur Lokalisation verschiedener Rab5A-Mutanten durch Rabex-5.

(A) Katalytische Effizienzen der Nukleotidaustauschaktivität von Rabex-5-VPS9 gegenüber verschiedener Rab5A-Mutanten. Die Geschwindigkeitskonstante k wurde durch einen einzelexponentiellen Fit aus den in Abbildung 32 dargestellten Kurven ermittelt und daraus die katalytische Effizienz von Rabex-5 für die verschiedenen Rab5A-Mutanten berechnet. **(B)** Statistischer Vergleich der Rekrutierungsfähigkeit von Rabex-5 nach mitochondrialer Fehllokalisierung gegenüber verschiedener Rab5A-Mutanten. Es wurden mindestens 50 Zellen in drei unabhängigen Experimenten analysiert. Die Daten zeigen jeweils den Mittelwert \pm Standardabweichung.

Zusammenfassend unterstützen die gezeigten Ergebnisse die Hypothese, dass die Interaktion eines Rab-Proteins mit ihrem spezifischen GEF eine entscheidende Bedeutung bezüglich der subzellulären Lokalisation des Rabs besitzt. Demzufolge ist bei Rab5A-Mutanten, die einem stark verminderten durch Rabex-5-vermittelten Nukleotidaustausch unterliegen, die GEF-vermittelte subzelluläre Lokalisation erheblich beeinträchtigt.

5.5. Die Nukleotidaustauschaktivität von DrrA vermittelt die Lokalisation von Rab1A

Es konnte bereits gezeigt werden, dass ein Fragment des GEFs DrrA (Aminosäuren 61-647) des Bakteriums *Legionella pneumophila* in der Lage ist, neben der spezifischen Aktivierung von Rab1, dessen Rekrutierung zur Plasmamembran zu vermitteln. Dagegen kann ein Fragment, welches die GEF-Domäne nicht enthält (Aminosäuren 451-647), diesen spezifischen Lokalisierungsprozess nicht mehr induzieren¹⁴³.

Zusätzlich wurden Aminosäurereste (Asn451_{DrrA}, Arg453_{DrrA}, Asp480_{DrrA}, Ser483_{DrrA}) innerhalb der GEF-Domäne identifiziert, die je nach Kombination zu einer drastischen Reduktion der Nukleotidaustauschaktivität führen und sich alle innerhalb einer der beiden Bindungsstellen befinden, die für die Interaktion mit Rab1B von entscheidender Bedeutung sind. Insbesondere sind dabei die Mutanten DrrA₃₄₀₋₅₃₃ N451A/R453A und DrrA₃₄₀₋₅₃₃ N451A/R453A/D480A/S483A nahezu katalytisch inaktiv, d.h. die Bindungsstelle 1, mit den Aminosäuren Asn451_{DrrA} und Arg453_{DrrA} scheint eine größere Bedeutung für die GEF-Aktivität zu besitzen als Bindungsstelle 2, welche die Reste Asp480_{DrrA} und Ser483_{DrrA} enthält¹⁴². Basierend auf diesen Ergebnissen sollte daher zunächst überprüft werden, ob die GEF-Domäne von DrrA (DrrA₃₄₀₋₅₃₃) in der Lage ist, nach induzierter Fehllokalisierung zu den Mitochondrien Rab1A dorthin zu lokalisieren. Dazu wurde nach Kotransfektion von mCherry-FRB^{ActA}, FKBP-eGFP^{DrrA₃₄₀₋₅₃₃} und mCitrine^{Rab1A} in COS-7 Zellen durch Zugabe von A/C Heterodimerizer DrrA₃₄₀₋₅₃₃ zu den Mitochondrien fehllokalisiert und im gesamten Verlauf des Experiments die subzelluläre Lokalisation aller Fusionsproteine analysiert. Auffallend ist zunächst die Lokalisation von Rab1A in unbehandelten Zellen im Zytosol (Abbildung 38A, linke Spalte), wohingegen Rab1A nach Kotransfektion mit dem Rab5A-Austauschfaktor Rabex-5 überwiegend am Golgi-Apparat lokalisiert (Abbildung 17A, linke Spalte). Da die Lokalisation von Rab1A am Golgi-Apparat der nativen Situation entspricht deutet die veränderte Lokalisation im Falle der Kotransfektion mit DrrA₃₄₀₋₅₃₃ bereits auf einen Einfluss des Austauschfaktors hin. Die zytosolische und nukleäre Lokalisation von DrrA₃₄₀₋₅₃₃ kann durch das Fehlen der C-terminalen Phosphatidylinositol-4-Phosphat-bindenden Domäne (P4M, Aminosäuren 533-647) erklärt werden (Abbildung 38A, linke Spalte), wodurch eine Lokalisation zu Phosphatidylinositol-4-Phosphat enthaltenden Membranen, wie der Plasmamembran oder der LCV, vermittelt wird¹⁶¹. Die Lokalisation von mCherry-FRB^{ActA} an den Mitochondrien wird durch die beiden anderen Fusionsproteine nicht beeinflusst (Abbildung 38A, linke Spalte).

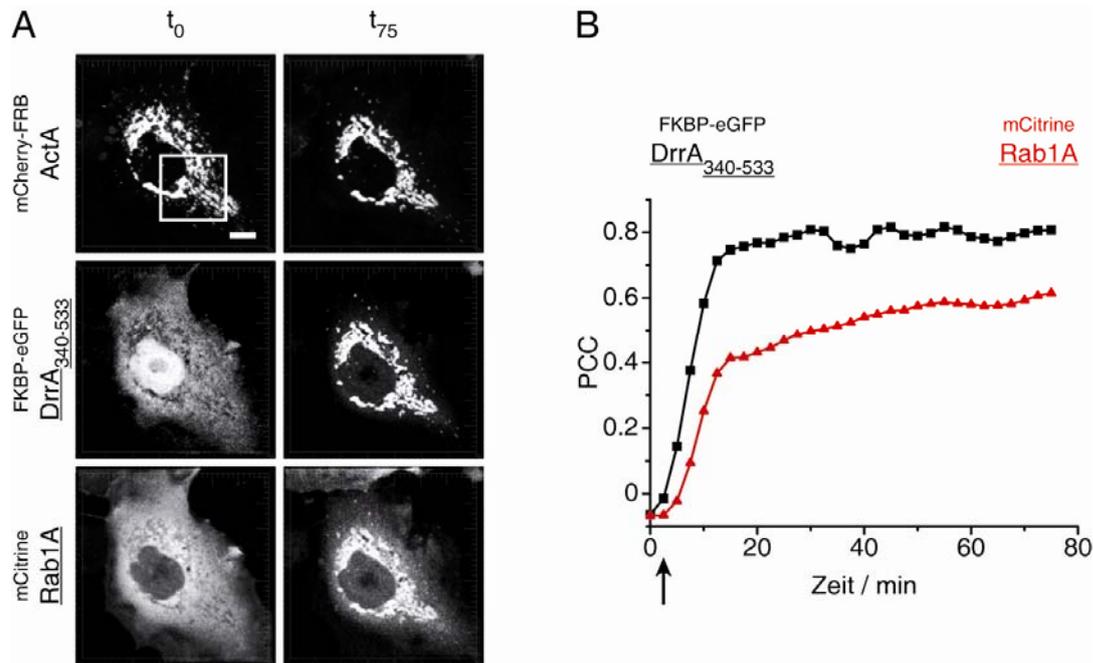


Abbildung 38: Die GEF-Domäne von DrrA (Aminosäuren 340-533) vermittelt die Lokalisation von Rab1A.

(A) Konfokale Aufnahmen der zeitabhängigen Rekrutierung von Rab1A durch DrrA₃₄₀₋₅₃₃. COS-7 Zellen wurden mit Plasmiden transfiziert, die für mitochondrial lokalisiertes mCherry-FRB ActA sowie FKBP-eGFP DrrA₃₄₀₋₅₃₃ und mCitrine Rab1A kodieren, die beide eine zytosolische sowie nukleäre Lokalisation zeigen (t_0). Die Zugabe von 1 μM A/C Heterodimerizer 24 h nach Transfektion führt zur Fehllokalisierung von FKBP-eGFP DrrA₃₄₀₋₅₃₃ zu den Mitochondrien gefolgt von der Korekrutierung von mCitrine Rab1A (t_{75}). Abbildung 51 zeigt einen vergrößerten Ausschnitt des markierten Quadrats während des Übergangs der Umverteilung von DrrA₃₄₀₋₅₃₃ und Rab1A. Maßstab 10 μm . (B) Die Quantifizierung der Kolo-kalisation der angezeigten Fusionsproteine mit mitochondrialen mCherry-FRB ActA demonstriert die simultane Rekrutierung der GEF-Domäne von DrrA und Rab1A zu den Mitochondrien. Der Pfeil markiert die Zugabe des A/C Heterodimerizers.

Nach Zugabe des A/C Heterodimerizers konnte eine Umverteilung von FKBP-eGFP DrrA₃₄₀₋₅₃₃ zu den Mitochondrien beobachtet werden, die eine Korekrutierung von Rab1A bewirkt (Abbildung 38A, rechte Spalte). Die Quantifizierung der Kolo-kalisation von FKBP-eGFP DrrA₃₄₀₋₅₃₃ bzw. mCitrine Rab1A mit dem mitochondrial lokalisierten mCherry-FRB ActA mittels Berechnung des PCC demonstriert darüber hinaus, dass beide Fusionsproteine simultan zu den Mitochondrien rekrutiert werden. Im Kontrollexperiment mit mCitrine Rab5A, welches kein Substrat von DrrA ist, wird keine mitochondriale Lokalisation des an den Endosomen lokalisierten Rab-Proteins durch das Legionellen-Protein vermittelt (Abbildung 54). Dies demonstriert, dass der Lokalisationsprozess spezifisch für das Substrat Rab1A ist. Die Ergebnisse zeigen eindeutig, dass die GEF-Domäne von DrrA ausreichend ist, um Rab1A zu lokalisieren.

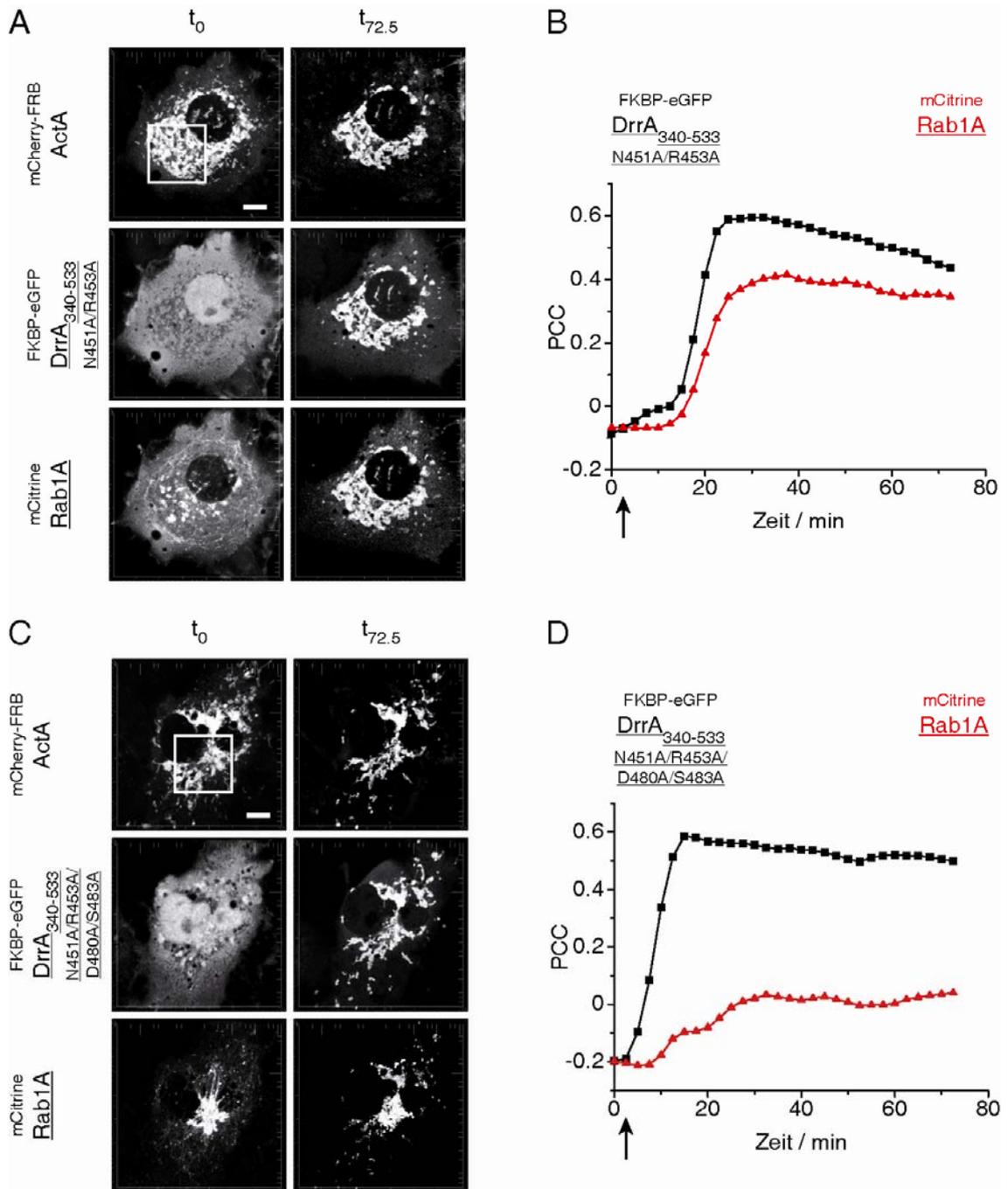


Abbildung 39: DrrA₃₄₀₋₅₃₃ N451A/R453A lokalisiert Rab1A, wohingegen DrrA₃₄₀₋₅₃₃ N451A/R453A/D480A/S483A den Translokationsprozess von Rab1A nicht induzieren kann.

(A und C) Konfokale Bilder lebender COS-7 Zellen, die ^{mCherry-FRB}ActA, ^{FKBP-eGFP}DrrA₃₄₀₋₅₃₃ N451A/R453A **(A)** bzw. ^{FKBP-eGFP}DrrA₃₄₀₋₅₃₃ N451A/R453A/D480A/S483A **(C)** und ^{mCitrine}Rab1A exprimieren. Beide DrrA₃₄₀₋₅₃₃-Mutanten lokalisieren im Zytosol und im Zellkern, während Rab1A nach Kotransfektion mit ^{FKBP-eGFP}DrrA₃₄₀₋₅₃₃ N451A/R453A ebenfalls überwiegend zytoplasmisch ist, nach Kotransfektion mit ^{FKBP-eGFP}DrrA₃₄₀₋₅₃₃ N451A/R453A/D480A/S483A jedoch am Golgi-Apparat lokalisiert (t_0). Nach induzierter Fehllokalisation von DrrA₃₄₀₋₅₃₃ N451A/R453A **(A)** transloziert Rab1A ebenfalls zu den Mitochondrien, wohingegen die mitochondriale Fehllokalisation von DrrA₃₄₀₋₅₃₃ N451A/R453A/D480A/S483A keinen Einfluss auf die Lokalisation von Rab1A am Golgi-Apparat besitzt **(C)**. In Abbildung 52 bzw. Abbildung 53 ist jeweils ein vergrößerter Ausschnitt des markierten Quadrats zu definierten Zeitpunkten gezeigt. Maßstab 10 μ m. **(B und D)** Die Quantifizierung der Kolo-kalisation durch Berechnung des PCC der angezeigten Fusionsproteine mit ^{mCherry-FRB}ActA an den Mitochondrien verdeutlicht die simultane Rekrutierung von ^{FKBP-eGFP}DrrA₃₄₀₋₅₃₃ N451A/R453A und ^{mCitrine}Rab1A

Ergebnisse

(B), wohingegen durch den konstant niedrigen PCC zwischen $mCherry-FRB$ ActA und $mCitrine$ Rab1A nach Kotransfektion mit DrrA₃₄₀₋₅₃₃N451A/R453A/D480A/S483A (D) verdeutlicht wird, dass keine Korekrutierung des Rab-Proteins stattfindet. Der Pfeil markiert die Zugabe des A/C Heterodimerizers.

Um den Einfluss der die Nukleotidaustauschaktivität vermindernenden Mutationen auf den Lokalisationsprozess von Rab1A zu untersuchen, wurden in weiteren Experimenten die DrrA₃₄₀₋₅₃₃ Doppelmutante sowie die Mutante DrrA₃₄₀₋₅₃₃N451A/R453A/D480A/S483A untersucht. Bemerkenswert ist zunächst erneut die unterschiedliche initiale Lokalisation von $mCitrine$ Rab1A nach Kotransfektion mit $FKBP-eGFP$ DrrA₃₄₀₋₅₃₃N451A/R453A bzw. $FKBP-eGFP$ DrrA₃₄₀₋₅₃₃N451A/R453A/D480A/S483A und mitochondrialem $mCherry-FRB$ ActA. Während Rab1A nach Kotransfektion mit DrrA₃₄₀₋₅₃₃N451A/R453A eine überwiegende zytosolische Verteilung ebenso wie die DrrA-Doppelmutante aufweist, lokalisiert das Rab-Protein nach Kotransfektion mit DrrA₃₄₀₋₅₃₃N451A/R453A/D480A/S483A am Golgi-Apparat (Abbildung 39A und C, linke Spalte). Entsprechend führt nur die Fehllokalisierung von DrrA₃₄₀₋₅₃₃N451A/R453A zu einer Rekrutierung von Rab1A zu den Mitochondrien, wohingegen die A/C Heterodimerizer-induzierte Rekrutierung von DrrA₃₄₀₋₅₃₃N451A/R453A/D480A/S483A keinen Einfluss auf die Lokalisation von Rab1A besitzt, da es zum Endzeitpunkt nach wie vor am Golgi-Apparat lokalisiert (Abbildung 39A und C, rechte Spalte).

Darüber hinaus bestätigt die Quantifizierung des Rekrutierungsprozesses, dass $mCitrine$ Rab1A nur nach Kotransfektion mit $FKBP-eGFP$ DrrA₃₄₀₋₅₃₃N451A/R453A nicht jedoch mit $FKBP-eGFP$ DrrA₃₄₀₋₅₃₃N451A/R453A/D480A/S483A nach dessen Fehllokalisierung zu den Mitochondrien mit $mCherry-FRB$ ActA kolokalisiert (Abbildung 39B und D).

Weiterhin untermauert die statistische Analyse die Beobachtungen der zeitabhängigen Experimente zur Fehllokalisierung der verschiedenen DrrA-Mutanten, da nach mitochondrialer Fehllokalisierung von wildtypischem DrrA₃₄₀₋₅₃₃ und der Doppelmutante DrrA₃₄₀₋₅₃₃N451A/R453A in 95 % bzw 82 % der Zellen ebenfalls eine mitochondriale Lokalisation von Rab1A detektiert wurde, wohingegen in nur 13 % der analysierten Zellen nach induzierter Rekrutierung von DrrA₃₄₀₋₅₃₃N451A/R453A/D480A/S483A zu den Mitochondrien eine Korekrutierung von Rab1A zu Membranen desselben Kompartiments beobachtet wurde (Abbildung 40).

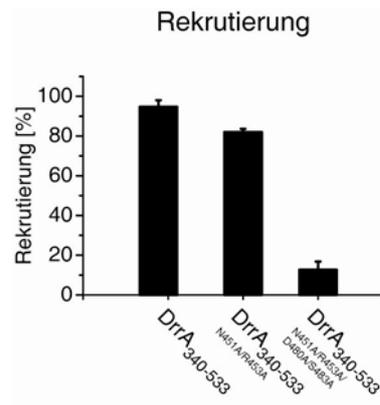


Abbildung 40: Rekrutierungsfähigkeit verschiedener DrrA₃₄₀₋₅₃₃-Mutanten gegenüber Rab1A.

Statistischer Vergleich der Fähigkeit verschiedener DrrA₃₄₀₋₅₃₃-Mutanten nach mitochondrialer Fehllokalisierung Rab1A zu rekrutieren. Es wurden mindestens 50 Zellen in drei unabhängigen Experimenten analysiert. Die Daten zeigen jeweils den Mittelwert \pm Standardabweichung.

Obwohl die Reduktion der Nukleotidaustauschaktivität der DrrA₃₄₀₋₅₃₃-Doppelmutante und DrrA₃₄₀₋₅₃₃ N451A/R453A/D480A/S483A in der gleichen Größenordnung liegen, kann der Unterschied in der Lokalisationsfähigkeit dadurch erklärt werden, dass für eGFP^{DrrA₃₄₀₋₅₃₃ N451A/R453A} noch eine Interaktion mit Rab1B nachgewiesen werden konnte, wohingegen DrrA₃₄₀₋₅₃₃ N451A/R453A/D480A/S483A nicht mehr in der Lage ist mit Rab1B zu interagieren¹⁴². Da DrrA ein hocheffizientes GEF ist^{142,143}, reicht vermutlich die minimale verbleibende Aktivität der Doppelmutante aus, um Rab1A effektiv zu lokalisieren, während durch die nicht mehr vorhandene Fähigkeit von DrrA₃₄₀₋₅₃₃ N451A/R453A/D480A/S483A mit Rab1A zu interagieren die Lokalisationsfähigkeit komplett aufgehoben ist.

5.6. Die GEF-Domäne von Rabin8 bewirkt die Lokalisation von Rab8A

Rab8A vermittelt den konstitutiven vesikulären Transport vom *trans*-Golgi Netzwerk (TGN) zur Plasmamembran und spielt darüber hinaus eine entscheidende Rolle in der Translokation des Glukosetransporters Typ 4 (GLUT4) sowie der Ciliogenese (mit Rab17 und Rab23)⁶¹. Rab8A wird durch das GEF Rabin8 aktiviert, das vor allem in der für den Nukleotidaustausch essentiellen *coiled-coil*-Domäne, eine hohe Sequenzhomologie zu Sec2p besitzt, dem GEF für das Rab8A-Homolog Se4p aus *S. cerevisiae*^{67,108}.

Um zu überprüfen, ob die GEF-vermittelte Rab-Rekrutierung ein genereller Mechanismus zur spezifischen subzellulären Lokalisation ist, sollte die Fähigkeit der GEF-Domäne von Rabin8 analysiert werden Rab8A zu den Mitochondrien zu lokalisieren. Es wurde wiederum ausschließlich die katalytisch aktive Domäne bezüglich ihrer Lokalisationsfähigkeit analysiert.

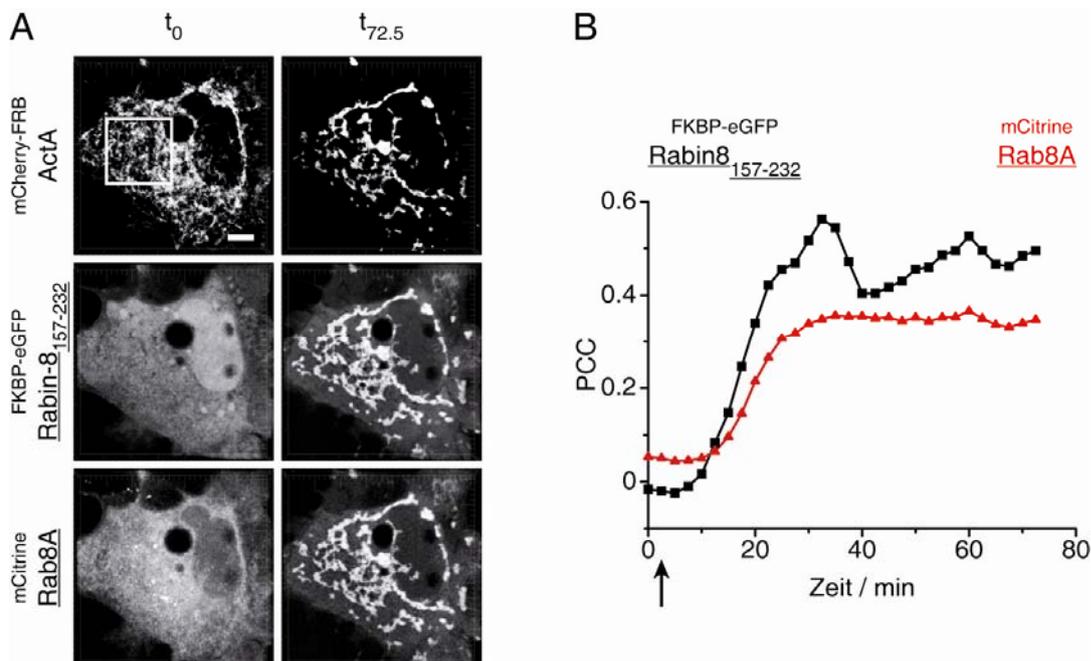


Abbildung 41: Die GEF-Domäne von Rabin8 (Aminosäuren 157-232) vermittelt die Lokalisation von Rab8A.

(A) Konfokale Bilder lebender COS-7 Zellen, die $mCherry-FRB^{ActA}$, $FKBP-eGFP^{Rabin8_{157-232}}$ und $mCitrine^{Rab8A}$ exprimieren. Die GEF-Domäne von Rabin8 lokalisiert überwiegend im Zytosol und im Zellkern. In unbehandelten Zellen zeigt $mCitrine^{Rab8A}$ ebenfalls eine gleichmäßige Verteilung in Analogie zu $Rabin8_{157-232}$. Nach induzierter Fehllokalisierung von $FKBP-eGFP^{Rabin8_{157-232}}$ zu den Mitochondrien durch Zugabe von 1 μM A/C Heterodimerizer 24 h nach Transfektion transloziert $mCitrine^{Rab8A}$ ebenfalls zu den Mitochondrien. Ein vergrößerter Ausschnitt des markierten Quadrats zur visuellen Verdeutlichung der Rekrutierung ist in Abbildung 55 dargestellt. Maßstab 10 μm . **(B)** Die Quantifizierung der Kolokalisation durch Berechnung des PCC der angezeigten Fusionsproteine mit $mCherry-FRB^{ActA}$ an den Mitochondrien verdeutlicht die simultane Rekrutierung von $FKBP-eGFP^{Rabin8_{157-232}}$ (schwarze Linie) und $mCitrine^{Rab8A}$ (rote Linie). Der Pfeil markiert die Zugabe des A/C Heterodimerizers

Nach Kotransfektion von ^{mCherry-FRB}ActA, ^{FKBP-eGFP}Rabin8₁₅₇₋₂₃₂ und ^{mCitrine}Rab8A in COS-7 Zellen wurde zunächst die subzelluläre Lokalisation der drei Fusionsproteine analysiert. Auffallend ist, dass Rab8A, das normalerweise überwiegend am Golgi-Apparat und der Plasmamembran lokalisiert nach Kotransfektion mit der GEF-Domäne von Rabin8 eine überwiegend zytosolische sowie partiell nukleäre Lokalisation genauso wie Rabin8₁₅₇₋₂₃₂ zeigt (Abbildung 41A, linke Spalte). Bislang konnten für Rabin8 keine Domänen identifiziert werden, die eine spezifische Lokalisation zu intrazellulären Membranen vermitteln. Vermutlich existieren diese jedoch in Analogie zu Rabex-5 und DrrA C- oder N-terminal zur beschriebenen GEF-Domäne, da Rabin8 überwiegend an der Plasmamembran lokalisiert⁶⁷. Das dritte Protein ^{mCherry-FRB}ActA zeigt wie in den vorherigen Experimenten eine distinkte Lokalisation an den Mitochondrien (Abbildung 41A, linke Spalte).

Die veränderte Lokalisation von Rab8A nach Kotransfektion mit Rabin8₁₅₇₋₂₃₂ deutet bereits auf eine Beeinflussung der subzellulären Lokalisation des Rab-Proteins durch seinen spezifischen Nukleotidaustauschfaktor hin. Weiterhin führt die induzierte Fehllokalisierung von ^{FKBP-eGFP}Rabin8₁₅₇₋₂₃₂ zu den Mitochondrien durch Zugabe des A/C Heterodimerizers gleichermaßen zu einer Korekrutierung von Rab8A (Abbildung 41A, rechte Spalte). Die quantitative Analyse der Kolo-kalisation von ^{FKBP-eGFP}Rabin8₁₅₇₋₂₃₂ bzw. ^{mCitrine}Rab8A mit mitochondrialem ^{mCherry-FRB}ActA zeigt darüber hinaus durch den gleichzeitigen Anstieg des jeweiligen PCC nach 10 min, dass die Rekrutierung beider Proteine simultan erfolgt (Abbildung 41B). Rabin8₁₅₇₋₂₃₂ bewirkt nach induzierter Fehllokalisierung dagegen keine Änderung der subzellulären Lokalisation von endosomalem Rab5A, welches kein Substrat des Austauschfaktors ist (Abbildung 56). Dies deutet auf eine spezifische Fähigkeit von Rabin8₁₅₇₋₂₃₂ hin sein Substrat Rab8A zur gleichen intrazellulären Membran zu lokalisieren.

Die spezifische Lokalisation von Rab8A durch die GEF-Domäne von Rabin8 deutet zusätzlich zu den gezeigten Rekrutierungsstudien mit den Austauschfaktoren Rabex-5 und DrrA darauf hin, dass die GEF-vermittelte Rekrutierung möglicherweise einen generellen Mechanismus zur Vermittlung der spezifischen Lokalisation von RabGTPasen an distinkte Membranen in der Zelle darstellt.

6. Diskussion

Die spezifische intrazelluläre Lokalisation von RabGTPasen an Membranen distinkter Organellen spielt eine entscheidende Rolle für die Regulation des vesikulären Transports. Da Rab-Proteine einer zyklischen Aktivierung unterliegen, die einen Wechsel zwischen zytosolischer Lokalisation und Membranassoziation einschließt, sind selektivitätsbestimmende Faktoren zur Rekrutierung einer spezifischen Rab-Subfamilie an eine distinkte Membran notwendig ohne Mitglieder anderer Rab-Subfamilien in ihrer Lokalisation zu beeinflussen. Rabs können im Zytosol nur im Komplex mit dem Solubilisierungsfaktor GDI vorliegen, der die hydrophoben Geranylgeranylreste am C-Terminus von der wässrigen Umgebung des Zytosols abschirmt. Da die Affinität zwischen Rab:GDP und GDI sehr hoch ist (Dissoziationskonstanten $K_D = 1\text{-}20\text{ nM}^{99,198}$), wurde zunächst angenommen, dass Proteine mit einer diskreten GDI-Freisetzungsaktivität (*GDI displacement factors*, GDFs) die Dissoziation dieses stabilen Komplexes katalysieren, um anschließend die Membraninsertion von Rab:GDP zu ermöglichen, wo dann anschließend die GEF-vermittelte Aktivierung des Rab-Proteins erfolgt. Vorausgesetzt, dass GDFs durch Interaktion mit Rabs die Freisetzung von GDI aus dem Rab:GDP:GDI-Komplex bewirken, erfordert dies eine höhere Affinität des GDFs für das Rab-Protein im Vergleich zu GDI. Dies würde zur Frage nach der mechanistischen Realisierung der Dissoziation des stabileren Rab:GDP:GDF-Komplexes führen. Es wäre prinzipiell denkbar, dass GDFs durch Bindung an GDI die Dissoziation des Rab:GDP:GDI-Komplexes katalysieren. Jedoch kann durch diesen Mechanismus die Diversität der spezifischen Rab-Lokalisation nicht erklärt werden, da nur zwei GDI-Isoformen für insgesamt etwa 60 Rabs in der Zelle vorliegen¹⁹⁹. Es wurde für das bislang einzige mutmaßliche GDF, Yip3/PRA1, eine Spezifität bezüglich der GDF-Aktivität für Rab9, Rab7 und Rab5 gezeigt¹⁰², so dass diese Beobachtungen gegen einen Mechanismus sprechen, wodurch ein GDF an GDI bindet, um die Dissoziation des Rab:GDP:GDI-Komplexes zu katalysieren.

Eine umfangreiche biochemische und strukturelle Charakterisierung des bakteriellen GEFs DrrA, welches eine hohe Spezifität für Rab1 besitzt, zeigte, dass eine effektive Freisetzung von GDI aus dem Rab1:GDP:GDI-Komplex durch Aktivierung von Rab1 induziert wird, da der Austausch von GDP gegen GTP zu einer Verminderung der Affinität von GDI für das Rab-Protein um drei Größenordnungen führt^{59,142}.

Dies führte zu der Hypothese, dass GEFs als generelle Faktoren zur subzellulären Lokalisation von Rab-Proteinen fungieren. Dieser Mechanismus ist weiterhin besonders attraktiv, da alle bislang beschriebenen GEFs hochspezifisch für ein bestimmtes Rab bzw. eine Rab-Subfamilie sind, wie beispielsweise der TRAPP-Komplex für Ypt1/Rab1¹⁰⁹, DrrA für Rab1¹⁴³, Rabin8 für Rab8⁶⁷, Sec2 für Sec4¹⁰⁷, Mon1-Ccz1 für Ypt7¹¹¹, Connecdenn für Rab35¹¹⁷,

Rab3GEP für Rab3 und Rab27^{119,120}, Varp für Rab21¹³⁶ und Rabex-5 für Rab5 und Rab21^{122,123,132}.

6.1. Die Rabex-5-vermittelte Lokalisation von Rab5A

In der vorliegenden Arbeit wurde die Rolle von RabGEFs auf die Membranlokalisation von Rab-Proteinen unter Verwendung der folgenden RabGEF/Rab-Systeme untersucht: Rabex-5 und Rab5A, DrrA und Rab1A, Rabin8 und Rab8A.

Dabei vermittelt die induzierte Fehllokalisation des GEFs Rabex-5 von der nativen Lokalisation an den Endosomen zur Mitochondrienmembran die simultane Korekrutierung seines Substrats Rab5A (Abbildung 14 und Abbildung 15). Da die Rekrutierung von Rab5A ohne zeitliche Verzögerung relativ zu Rabex-5 verläuft, ist zu vermuten, dass der Mechanismus der Lokalisation sehr schnell ist. Die Lokalisation des Rabs wird dabei ausschließlich von der katalytisch aktiven Domäne (Aminosäuren 132-397) induziert (Abbildung 19). Die GEF-Domänen-vermittelte Lokalisation von Rab5A läuft ebenfalls ohne zeitliche Verzögerung ab. Weiterhin ist der Lokalisationsprozess spezifisch für Rab-Proteine, die als GEF-Substrat dienen, da die Lokalisation von Rab1A nicht durch Rabex-5 beeinflusst wird (Abbildung 17). Nach mitochondrialer Fehllokalisation von Rabex-5 bewahrt Rab1A seine initiale Lokalisation am Golgi-Apparat. Da Rabex-5 nicht in der Lage ist Rab1A zu aktivieren¹³², spricht dies für eine durch den Nukleotidaustausch vermittelte Lokalisation. Aufgrund der simultanen Rekrutierung von Rab5A sowohl durch Rabex-5 als auch durch dessen GEF-Domäne, ist auch eine Rabex-5-vermittelte Rekrutierung durch Komplexbildung denkbar. Jedoch kann die prenylierungsdefiziente Mutante Rab5A_{ΔC4}, der die prenylierbaren Cysteinreste fehlen, durch Rabex-5 nicht lokalisiert werden. Da der C-Terminus von Rab5A nicht an der Komplexbildung mit Rabex-5 beteiligt ist⁴⁵, spricht dies nicht für eine Beeinflussung der Rab5A-Lokalisation durch Bildung eines stabilen Komplexes. Weiterhin deutet die Tatsache, dass Rabex-5 die Lokalisation von Rab5A_{ΔC4} nicht beeinflusst, auf die absolute Notwendigkeit der Insertion der RabGTPase in eine Membran hin, die spätestens nach deren Aktivierung durch den Nukleotidaustauschfaktor erfolgt. Darüber hinaus werden Rab-Proteine, die normalerweise zweifach prenyliert werden, nach Monoprenylierung zwar in eine Membran inseriert, jedoch erfolgt in diesem Fall eine Fehllokalisation zu Membranen des ER und des Golgi-Apparats, die als Ausgangsstandort für Rabs dienen, die ihre Lokalisationsinformation verloren haben^{76,77,98}.

Diese Fehllokalisation zum Golgi-Apparat und zum ER wird gleichermaßen durch den Austausch von Sequenzbereichen innerhalb der RabSF-Regionen zwischen Mitgliedern verschiedener Rab-Subfamilien induziert. Die RabSF-Regionen erlauben auf der Basis von Aminosäuresequenzvergleichen eine Einteilung in zehn Rab-Subfamilien und es wurde postuliert, dass aufgrund der Divergenz dieser Regionen zwischen Rab-Subfamilien die Interak-

tion mit spezifischen Effektoren wie GAPs und GEFs vermittelt wird^{20,21}. Da die RabSF-Sequenzen jedoch mit dem Bereich überlappen, an dem GEFs binden, führt der Austausch dieser Domänen möglicherweise dazu, dass das Rab-Protein durch seinen natürlichen Austauschfaktor nicht mehr gebunden werden kann. So überlappt etwa die RabSF2-Region mit der *switch I*-Region, die häufig an der Interaktion mit dem GEF beteiligt ist, wie dies in den Komplexstrukturen zwischen Sec2p und Sec4p, Rabex-5-VPS9 und Rab21 sowie DrrA und Rab1B gezeigt werden konnte^{45,142,169}. Somit kann der Nukleotidaustausch, der letztlich zur effizienten Dissoziation des Rab:GDP:GDI-Komplexes führt, nicht mehr katalysiert werden und aufgrund dessen kann die spezifische Lokalisation des Rab-Proteins nicht mehr vermittelt werden. Dies deutet darauf hin, dass sowohl die vollständige Prenylierung des Rab-Proteins als auch die Erkennung eines Rabs durch seinen Austauschfaktor Voraussetzungen für die effiziente Lokalisation an eine distinkte Membran sind.

Weiterhin zeigen verschiedene Kristallstrukturen, dass GDI und GEFs aufgrund überlappender Bindungsbereiche innerhalb des Rab-Proteins nicht simultan binden können^{142,171,200}. Zusammen mit biochemischen Untersuchungen deutet dies darauf hin, dass GEFs den Nukleotidaustausch von Rabs nicht direkt am Rab:GDP:GDI-Komplex katalysieren, sondern zunächst die Dissoziation von GDI mit intrinsischer Geschwindigkeit erfolgen muss. Die kinetischen Daten des durch das Legionellenprotein DrrA-vermittelten Nukleotidaustauschs von Rab1 sprechen dafür, dass die GEF-Aktivität dennoch für die effektive Dissoziation des Rab1:GDP:GDI-Komplexes verantwortlich ist^{53,59,141,142}. Dabei ist jedoch die intrinsische Dissoziation des Rab1:GDP:GDI-Komplexes der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Freisetzung. Obwohl der Komplex zwischen prenyliertem Rab1:GDP und GDI mit einer Dissoziationskonstanten im Bereich von $K_D = 1-12$ nM sehr stabil ist, beträgt die Halbwertszeit der Dissoziation 7-100 s bei 25 °C¹⁴². Die Dissoziationsrate ist daher vermutlich ausreichend, um die Assoziation von DrrA mit Rab1:GDP in einem für die physiologischen Erfordernisse in der Zelle angemessenen Zeitfenster zu ermöglichen. Nachdem DrrA an freies Rab1:GDP gebunden hat, tauscht es aufgrund seiner hohen katalytischen Effizienz umgehend das gebundene GDP gegen GTP aus. Aufgrund der um drei Größenordnungen geringeren Affinität von GDI gegenüber Rab:GTP im Vergleich zur GDP-gebundenen Form wird dadurch die Rückbindung an GDI verhindert und somit die GDI-Freisetzung irreversibel^{59,142}.

Da Rabex-5 ebenfalls mit GDI um die gleiche Bindungsstelle innerhalb von Rab5A konkurriert⁴⁵, kann die für DrrA beschriebene Freisetzung von GDI aus dem Rab1:GDP:GDI-Komplex prinzipiell auf eine Rabex-5-vermittelte GDI-Freisetzung aus dem Rab5A:GDP:GDI-Komplex übertragen werden. Es konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass Rabex-5 in Gegenwart eines GTP-Überschusses (100 μ M) die Freisetzung von GDI aus dem Rab5A-farnesyl-NBD:GDI-Komplex (Abbildung 30) mit einer katalytischen Effizienz von

$2,4 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ katalysiert. Da auch innerhalb der Zelle GTP im Überschuss im Vergleich zu GDP vorliegt spiegelt dies die physiologisch relevante Situation *in vivo* wider⁴².

Des Weiteren ist der Nukleotidzustand des Rab-Proteins von entscheidender Bedeutung, um durch das GEF lokalisiert zu werden. Das bei der Rab5A_{Q79L}-Mutante zu Leucin mutierte Glutamin innerhalb der *switch II*-Region (G3-Motiv) ist essentiell für die intrinsische und GAP-stimulierte Hydrolyse des gebundenen GTPs aktiver Rab-Proteine, so dass diese Mutante überwiegend in der GTP-gebundenen Form vorliegt⁷⁴. Da GDI aufgrund der höheren Affinität zu Rab:GDP im Vergleich zu Rab:GTP nur GDP-gebundenes Rab aus der Membran extrahiert, ist der Rab-Zyklus an dieser Stelle vermutlich inhibiert⁵⁹. Dies erklärt die starke Beeinträchtigung von Rabex-5, die konstitutiv aktive Mutante Rab5A_{Q79L} zu rekrutieren (Abbildung 20 und Abbildung 21). Wie die statistische Analyse fixierter Zellen nach induzierter Fehllokalisierung des GEFs zeigt, kann die Rabex-5-vermittelte Lokalisation der Mutante jedoch in etwa 50 % der bewerteten Zellen induziert werden (Abbildung 23). Die fixierten Zell-Präparate wurden für 1 h mit dem die Heterodimerisierung der FRB- und FKBP-Domänen induzierenden Molekül behandelt. Daher ist es möglich, dass in den Zellen, in denen die mitochondriale Lokalisation der konstitutiv aktiven Rab5A_{Q79L}-Mutante beobachtet wurde, die Fehllokalisierung von Rabex-5 bereits sehr früh induziert wurde. Nach der Rekrutierung des relativ geringen aber dennoch vorhandenen GDP-gebundenen Anteils von Rab5A_{Q79L} dauert es möglicherweise bis sich der Gleichgewichtszustand zwischen den zwei Nukleotidzuständen wieder eingestellt hat. Prinzipiell kann der Austausch des Nukleotids in beiden Richtungen erfolgen, d.h. der Austauschfaktor besitzt keine Präferenz das Nukleotid des GDP-gebundenen oder des GTP-gebundenen Rabs freizusetzen. Es induziert lediglich Konformationsänderungen, die prinzipiell mit einer Nukleotidbindung nicht kompatibel sind. Die Verschiebung des Gleichgewichts hinsichtlich des Nukleotidzustands des Rabs wird daher ausschließlich durch den Überschuss des Nukleotiddiphosphats oder des Nukleotidtriphosphats induziert²⁰¹. Aufgrund dessen ist nicht der Nukleotidzustand im Bezug auf die Aktivierung durch das GEF, sondern die Affinität von GDI für die GDP- bzw. GTP-gebundene Form für die beeinträchtigte Lokalisationsfähigkeit von Rabex-5 gegenüber Rab5A_{Q79L} verantwortlich. Daher wäre es denkbar, dass die Rekrutierung von Rab5A_{Q79L} zwar vermittelt werden kann, jedoch stark zeitverzögert stattfindet.

Diese Vermutung wird unterstützt durch die Beobachtung der zeitabhängigen Rekrutierung, bei der sich die subzelluläre Lokalisation von Rab5A_{Q79L} dahingehend verändert, dass die initiale Lokalisation an vergrößerten Endosomen teilweise verloren geht und das Fusionsproteins zum Endzeitpunkt des Experiments im Zytosol, vermutlich in der GDP-gebundenen Form im Komplex mit GDI, nicht jedoch mit mitochondrialem Rabex-5 kolokalisiert. Der geringfügige Anstieg des PCC zur Quantifizierung der Kolokalisation zwischen ^{mCherry-FRB}ActA

und ^{mCitrine}Rab5A_{Q79L} zum Ende des Experiments deutet weiterhin auf die zu diesem Zeitpunkt möglicherweise beginnende mitochondriale Rekrutierung des Rab-Proteins hin (Abbildung 20B).

6.2. Der Einfluss der GEF-Aktivität auf die Lokalisation von Rab5A

Die Tatsache, dass Rabex-5 sowie dessen GEF-Domäne die Lokalisation von Rab5A vermitteln, wohingegen Rab1A durch Rabex-5 nicht rekrutiert wird, unterstützt die Hypothese, dass die Nukleotidaustauschaktivität der entscheidende Faktor bezüglich einer effizienten Membranrekrutierung des Rab-Proteins darstellt.

Daher stellt die Identifikation der Aminosäurereste Asp313_{Rabex-5} und Tyr354_{Rabex-5}, deren Mutation zu Alanin eine signifikante Reduktion des Nukleotidaustauschs gegenüber Rab5A zur Folge hat¹³², ein nützliches Werkzeug zur Überprüfung dieser Hypothese dar. Um eine vollständig katalytisch inaktive Mutante bezüglich der Rab5A-GEF-Aktivität zu generieren, wurden beide Mutationen kombiniert. Die erzeugte Doppelmutante Rabex-5_{D313A/Y354A} zeigt entsprechend eine nochmals reduzierte Austauschaktivität mit einer katalytischen Effizienz von $7,7 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, die um zwei Größenordnungen gegenüber dem wildtypischen Protein vermindert ist (Abbildung 24 und Tabelle 19), jedoch nicht vollständig inaktiv ist. Interessanterweise, bewirkt die Verminderung der GEF-Aktivität der beiden Einzelmutanten Rabex-5_{D313A} und Rabex-5_{Y354A} keine Beeinträchtigung der Fähigkeit zur Lokalisation von Rab5A, da in beiden Fällen eine Umverteilung von Rab5A zu den Mitochondrien nach induzierter Fehllokalisierung der entsprechenden Rabex-5 Einzelmutante beobachtet wurde (Abbildung 26). Dagegen ist die Fähigkeit von Rabex-5_{D313A/Y354A} Rab5A zu rekrutieren beeinträchtigt, da trotz einer partiell detektierten mitochondrialen Lokalisation des Rab-Proteins zum Endzeitpunkt des Experiments noch Rab5A-positive Strukturen detektiert wurden, die nicht mit mitochondrialem ^{mCherry-FRB}ActA kolokalisieren (Abbildung 27 und Abbildung 28).

Die beeinträchtigte Lokalisationsfähigkeit der Doppelmutante Rabex-5_{D313A/Y354A} wird durch die zeitabhängige Analyse einer weiteren Zelle deutlich, in der keine Rab5A-Rekrutierung detektiert wurde (Abbildung 29C, Zelle 2). Weiterhin bestätigt die statistische Auswertung der fixierten Zellpräparate die eingeschränkte Rekrutierungsfähigkeit von Rabex-5_{D313A/Y354A} gegenüber Rab5A, da in nur etwa 50 % der analysierten Zellen eine signifikante mitochondriale Lokalisation des Rab-Proteins nach induzierter Fehllokalisierung des Austauschfaktors beobachtet wurde (Abbildung 31C). Es ist zu vermuten, dass die Fähigkeit des GEFs die Lokalisation des Rab-Proteins zu induzieren, einen Schwellenwert der effektiven Nukleotidaustauschaktivität, d.h. dem Produkt aus Expressionsniveau und katalytischer Effizienz, erfordert.

Die Annahme, dass die Fähigkeit von Rabex-5 zur Freisetzung von GDI aus dem Komplex mit Rab5A:GDP auf der Nukleotidaustauschaktivität des GEFs basiert, wird unterstützt durch

die Analyse der beiden Einzelmутanten Rabex-5_{D313A} und Rabex-5_{Y354A} sowie der Doppelmütante bezüglich ihrer GDI-Freisetzungsaktivität (Abbildung 30). Der Effekt der Verminderung in den beiden genannten Aktivitäten liegt jeweils in einer ähnlichen Größenordnung. So nimmt die Aktivität bezüglich der GDI-Freisetzung sowie des Nukleotidaustauschs folgendermaßen ab:

$$\text{Rabex-5}_{\text{WT}} > \text{Rabex-5}_{\text{Y354A}} > \text{Rabex-5}_{\text{D313A}} > \text{Rabex-5}_{\text{D313A/Y354A}}$$

Die Gegenüberstellung der katalytischen Effizienz der Rabex-5-Mutanten bezüglich ihrer Nukleotidaustausch- und GDI-Freisetzungsaktivität sowie der statistischen Auswertung der Fähigkeit Rab5A zu rekrutieren, deutet auf eine signifikante Abhängigkeit der drei vermeintlich unabhängigen Prozesse hin (Abbildung 31), so dass angenommen werden kann, dass durch die Nukleotidaustauschaktivität von Rabex-5 die effektive Freisetzung von GDI aus dem Komplex mit Rab5A:GDP vermittelt wird. Nach Dissoziation des Komplexes mit intrinsischer Geschwindigkeit, erfolgt entsprechend die umgehende Katalyse des GEF-vermittelten Nukleotidaustauschs. Die Freisetzung von Rab5A aus dem Rab5A:GDP:GDI-Komplex, der die Prenylgruppen gegen das wässrige Milieu des Zytosols abschirmt, bewirkt die simultane Insertion des Rab-Proteins in die Membran. Durch die verminderte Affinität von GDI gegenüber der GTP-gebundenen Form von Rab5A wird dadurch die Rückbindung sowie Re-Extraktion von Rab5A aus der Membran verhindert, so dass letztlich die Aktivierung des Rab-Proteins zu einer effizienten und zeitlich präzisen Rekrutierung von Rab5A zur Donormembran führt.

Die Geschwindigkeitskonstanten des Nukleotidaustauschs variieren zum Teil erheblich zwischen verschiedenen Austauschfaktoren. So zählt Rabex-5 mit einer maximalen Nukleotidaustauschrate von $0,012 \text{ s}^{-1}$ zu den langsam austauschenden GEFs⁴⁶. Der TRAPP-Komplex ist mit einer maximalen Geschwindigkeitskonstanten von $0,17 \text{ s}^{-1}$ bereits um eine Größenordnung schneller und das bakterielle GEF DrrA zählt mit einer maximalen Rate von $7,6 \text{ s}^{-1}$ zu den GEFs mit der höchsten Austauschrate^{142,143,202}. Daher ist es möglich, dass beim Rabex-5-vermittelten Nukleotidaustausch der geschwindigkeitsbestimmende Schritt nicht mehr die intrinsische Dissoziationsrate des Rab5A:GDP:GDI-Komplexes ist, sondern die durch das GEF-katalysierte Freisetzung des Nukleotids. Diese Eigenschaft eines GEFs mit geringer Nukleotidaustauschrate würde jedoch letztlich nicht die Effizienz der thermodynamischen GDI-Freisetzung beeinflussen. Der Endpunkt der GDI-Freisetzung aus dem Rab:GDP:GDI-Komplex wird ausschließlich durch die relativen Affinitäten von Rab:GDP bzw. Rab:GTP zu GDI und durch das Verhältnis der Konzentrationen von GDP zu GTP bestimmt¹⁴².

Möglicherweise besteht eine direkte Korrelation zwischen der intrinsischen Dissoziationsrate jedes Rab:GDP:GDI-Komplexes und der Geschwindigkeitskonstanten des Nukleotidaustauschs für ein bestimmtes GEF, so dass in einem für physiologisch notwendige Bedingungen relevanten Zeitrahmen die effiziente Lokalisation an die Donormembran und simultane Aktivierung der RabGTPase vermittelt werden kann. Für eine solche Korrelation sprechen die Werte der intrinsischen Dissoziationsrate des Rabs aus dem Rab:GDP:GDI-Komplex und der maximalen Nukleotidaustauschrates für die GEFs DrrA und Rabex-5 und ihre jeweiligen Substrate Rab1B und Rab5A. So beträgt die intrinsische Dissoziationsrate des Rab1B-f-NBD:GDI-Komplexes $0,0277 \text{ s}^{-1}$ und ist damit um den Faktor fünf geringer im Vergleich zum Rab5A-f-NBD:GDI-Komplex ($0,1449 \text{ s}^{-1}$, Lena Oesterlin, unveröffentlichte Daten). Dagegen liegt die DrrA-vermittelte maximale Nukleotidaustauschrates um drei Größenordnungen über dem Wert des durch Rabex-5-vermittelten Nukleotidaustauschs, wohingegen das physiologisch relevante GEF für Rab1B, der TRAPP-Komplex, lediglich eine zehnfach höhere Austauschrates besitzt und damit das Verhältnis dieser beiden Geschwindigkeitskonstanten der physiologisch relevanten GEFs in der gleichen Größenordnung liegt^{46,142,202}. Dadurch wird möglicherweise gewährleistet, dass die Rekrutierung und Aktivierung eines Rabs in einem analogen Zeitfenster erfolgt. Diesbezüglich stehen die vorliegenden Ergebnisse hinsichtlich der Fähigkeit von Rabex-5 sein Substrat Rab5A zu lokalisieren im Einklang. Die deutlich höhere GEF-Aktivität von DrrA kann dadurch erklärt werden, dass es mit endogenen GEFs der Wirtszelle konkurriert, um eine effiziente Pathogenität zu erzielen¹⁴².

Weiterhin wurden mit Ala57 und Tyr83 zwei Aminosäurereste innerhalb von Rab5C identifiziert (entsprechend Ala56 und Tyr82 in Rab5A), die eine essentielle Rolle bei der Erkennung durch Rabex-5 spielen. So führen die Mutationen A56D und Y82A bereits zu einer signifikanten Reduktion des Rabex-5-vermittelten Nukleotidaustauschs¹³². Zur Erzeugung einer Mutante, die nicht mehr in der Lage ist an Rabex-5 zu binden bzw. bei der Rabex-5 den Nukleotidaustausch nicht mehr katalysieren kann, wurden beide Mutationen kombiniert und die Doppelmutante Rab5A_{A56D/Y82A} generiert. Die Messung der Rabex-5-vermittelten GEF-Aktivität gegenüber den Einzelmutanten Rab5A_{A56D} und Rab5A_{Y82A} sowie der Doppelmutante zeigt, dass Rabex-5 den Nukleotidaustausch von Rab5A_{A56D} mit einer katalytischen Effizienz von $4,2 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ katalysiert und damit bereits um eine Größenordnung gegenüber wildtypischem Rab5A vermindert ist (Abbildung 32 und Tabelle 20). Die beiden Mutanten, welche die Y82A-Mutation enthalten, zeigen noch mal eine weitere Verminderung der Nukleotidaustausch-Suszeptibilität gegenüber Rabex-5 (Abbildung 32). So katalysiert Rabex-5 den Nukleotidaustausch von Rab5A_{Y82A} mit einer katalytischen Effizienz von

$4,0 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ sowie gegenüber $\text{Rab5A}_{\text{A56D/Y82A}}$ mit einer katalytischen Effizienz von $8,8 \cdot 10^2 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (Tabelle 20).

Dies deutet darauf hin, dass $\text{Tyr82}_{\text{Rab5A}}$ eine größere Bedeutung bezüglich der Bindung durch Rabex-5 besitzt. Die Struktur zwischen der Rabex-5 GEF-Domäne und Rab21 verdeutlicht, dass Phe81 (entspricht $\text{Tyr82}_{\text{Rab5A}}$) in einen unpolaren Spalt zwischen $\text{Leu316}_{\text{Rabex-5}}$ und $\text{Pro317}_{\text{Rabex-5}}$ bindet⁴⁵ (Abbildung 6). Durch den Austausch der aromatischen Aminosäure gegen Alanin wird dadurch vermutlich die Bindung zwischen der Rabex-5 GEF-Domäne und Rab5A komplett aufgehoben, so dass der darauffolgende Nukleotidaustausch nicht mehr katalysiert werden kann. Diese Annahme wird unterstützt durch die Analyse der Fähigkeit von Rabex-5 nach induzierter Fehllokalisierung zu den Mitochondrien die genannten Rab5A -Mutanten zu rekrutieren. So zeigt die Mutante $\text{Rab5A}_{\text{A56D}}$ nach mitochondrialer Fehllokalisierung von Rabex-5 gleichermaßen in allen zeitabhängigen Experimenten eine Kolokalisation mit $^{\text{mCherry-FRB}}\text{ActA}$, d.h. sie wird durch Rabex-5 rekrutiert (Abbildung 34 und Abbildung 36A). Die statistische Analyse stützt darüber hinaus diese Beobachtungen, da in 91 % der analysierten Zellen eine signifikante mitochondriale Lokalisation von $\text{Rab5A}_{\text{A56D}}$ beobachtet wurde (Abbildung 37B). Dagegen ist Rabex-5 nicht in der Lage die Rab5A -Mutanten, welche die Y82A -Mutation enthalten, zu lokalisieren. So bewahren $\text{Rab5A}_{\text{Y82A}}$ als auch $\text{Rab5A}_{\text{A56D/Y82A}}$ nach induzierter Fehllokalisierung von Rabex-5 ihre initiale Lokalisation am Golgi-Apparat (Abbildung 35A und C). Dies wurde in drei verschiedenen Zellen in einer zeitabhängigen Analyse bestätigt (Abbildung 36B und C). Weiterhin zeigt die statistische Analyse eine signifikante Reduktion der Lokalisationsfähigkeit von Rabex-5 nur gegenüber den beiden die Y82A -Mutation enthaltenden Rab5A -Mutanten (Abbildung 37B). Die Gegenüberstellung der katalytischen Effizienz des Rabex-5-vermittelten Nukleotidaustauschs gegenüber den Rab5A -Mutanten sowie der Fähigkeit des Austauschfaktors die entsprechende Mutante zu rekrutieren, verdeutlicht den signifikanten Zusammenhang zwischen der Bindung des GEFs an das Rab-Protein und der Beeinflussung der subzellulären Lokalisation (Abbildung 37). In Kombination mit den zuvor gezeigten Ergebnissen der Rekrutierung von Rab5A durch die drei verschiedenen Rabex-5-Mutanten, deutet dies darauf hin, dass zunächst eine effiziente Bindung des Austauschfaktors an das Rab-Protein erfolgen muss und dass anschließend die Katalyse des Nukleotidaustauschs vermutlich einen Schwellenwert der effektiven katalytischen Effizienz erreichen muss, um die Lokalisation des Rabs zu induzieren.

Es scheint zunächst überraschend, dass eine vergleichbare Verminderung der katalytischen Effizienz von Rab5A und Rabex-5 durch Einführung der genannten Punktmutationen einen unterschiedlichen Effekt bezüglich der mitochondrialen Rekrutierung des Rab-Proteins besitzt. Sowohl $\text{Rab5A}_{\text{Y82A}}$ als auch $\text{Rabex-5}_{\text{D313A/Y354A}}$ besitzen eine vergleichbare katalytische

Effizienz des Nukleotidaustauschs (Tabelle 19 und Tabelle 20). Während die Rabex-5-vermittelte Rekrutierung von Rab5A_{Y82A} vollständig unterbunden ist, ist die Lokalisation von Rab5A durch die Mutante Rabex-5_{D313A/Y354A} zwar beeinträchtigt, jedoch nicht vollständig inhibiert. Dieser scheinbare Widerspruch kann durch die positive *Feedback*-Schleife von endogenem Rab5A, Rabex-5 und Rabaptin-5 erklärt werden²⁰³. Die Doppelmutante Rabex-5_{D313A/Y354A}, die etwa 1 % der katalytischen Aktivität im Vergleich zum wildtypischen Protein besitzt, kann vermutlich geringe Mengen ^{mCitrine}Rab5A und endogenes Rab5A zur Mitochondrienmembran rekrutieren. Aktives endogenes Rab5A sowie aktives ^{mCitrine}Rab5A rekrutieren daraufhin endogenes Rabaptin-5 zu den Mitochondrien, welches zum Teil im Komplex mit endogenem Rabex-5 vorliegt, das entsprechend die volle katalytische Aktivität besitzt. Der endogene Rabaptin-5:Rabex-5-Komplex an den Mitochondrien rekrutiert daraufhin sowohl endogenes Rab5A als auch ^{mCitrine}Rab5A.

Dagegen kann diese Erklärung nicht auf die Rekrutierung der Rab5A-Mutanten angewendet werden. Zu bemerken sei hier, dass nur die transfizierten Fusionsproteine detektiert wurden. Zu den Mitochondrien fehllokalisiertes Rabex-5 rekrutiert ausschließlich endogenes Rab5A. Aktiviertes, endogenes Rab5A an den Mitochondrien rekrutiert daraufhin den endogenen Rabaptin-5:Rabex-5-Komplex, der wiederum nur das endogene Rab5A, jedoch nicht die detektierbare Mutante Rab5A_{Y82A} rekrutiert.

6.3. Die Lokalisierung von Rab1A durch DrrA

Aufgrund der umfangreichen Analyse der Rabex-5-vermittelten Lokalisation von Rab5A stellte sich die Frage, ob die GEF-vermittelte Rekrutierung möglicherweise einen generellen Mechanismus zur spezifischen Lokalisation von Rab-Proteinen darstellt und ob die GEF-Aktivität auch in diesen Fällen die treibende Kraft der Lokalisation ist.

Das Fragment des Legionellen-GEFs DrrA (Aminosäuren 61-647) enthält die vollständige und katalytisch aktive GEF-Domäne und lokalisiert in eukaryotischen Zellen aufgrund der C-terminalen P4M-Domäne an der PI4P-angereicherten Plasmamembran¹⁴³. Die Koexpression dieses Fragments mit Rab1, das normalerweise an Membranen des ERs und am Golgi-Apparat lokalisiert⁶⁵, führt zur Rekrutierung des Rabs zu demselben Kompartiment. Dagegen vermittelt ein DrrA-Fragment, welches nur einen Teil der GEF-Domäne enthält (Aminosäuren 451-647), keine Lokalisation von Rab1 zur Plasmamembran¹⁴³ (Abbildung 7).

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die induzierte Fehllokalisierung der GEF-Domäne von DrrA (Aminosäuren 340-533) zu den Mitochondrien die simultane Rekrutierung von Rab1A bewirkt (Abbildung 38). Im Vergleich zu den Experimenten von Murata et al., deutet dies darauf hin, dass neben der GEF-Domäne keine weiteren Domänen des Austauschfaktors für die Beeinflussung der Lokalisation der RabGTPase notwendig sind¹⁴³. Die DrrA-vermittelte Lokalisation ist spezifisch für Rab1A, da die Rekrutierung von Rab5A, wel-

ches kein Substrat des bakteriellen GEFs ist, nicht induziert wird. Rab5A lokalisiert nach mitochondrialer Fehllokalisierung der DrrA GEF-Domäne weiterhin überwiegend an Endosomen (Abbildung 54).

Die Mutationen spezifischer Aminosäurereste von DrrA innerhalb der zwei Bindungsstellen für Rab1B bewirken eine drastische Verminderung der Nukleotidaustauschaktivität. Dabei zeigen vor allem die Mutanten DrrA₃₄₀₋₅₃₃ N451A/R453A und DrrA₃₄₀₋₅₃₃ N451A/R453A/D480A/S483A eine deutliche Beeinträchtigung bezüglich der GEF-Aktivität, die in der gleichen Größenordnung liegt¹⁴². Überraschenderweise zeigen die Doppelmutante sowie die Vierfachmutante einen unterschiedlichen Effekt bezüglich der Rekrutierung von Rab1A. Die Analyse der DrrA-vermittelten Lokalisationsfähigkeit von Rab1A nach induzierter mitochondrialer Fehllokalisierung des GEFs, zeigt, dass die Doppelmutante ohne zeitliche Verzögerung die mitochondriale Korekrutierung des Rab-Proteins vermittelt (Abbildung 39A und B). Dagegen ist die Vierfachmutante nicht in der Lage Rab1A, das initial am Golgi-Apparat lokalisiert, zu den Mitochondrien zu rekrutieren (Abbildung 39C und D). Bereits die unterschiedliche initiale Lokalisation von Rab1A nach Kotransfektion mit den beiden DrrA-Mutanten deutet auf den Einfluss des GEFs auf die subzelluläre Lokalisation des Rab-Proteins hin. Während Rab1A nach Kotransfektion mit der Doppelmutante ebenfalls eine in Analogie zur DrrA-Mutante zytoplasmische sowie partiell nukleäre Lokalisation aufweist, befindet sich Rab1A nach Kotransfektion mit der Vierfachmutante überwiegend am Golgi-Apparat. Diese Ergebnisse können dadurch erklärt werden, dass die Doppelmutante noch in der Lage ist mit Rab1 zu interagieren, wohingegen für die Vierfachmutante keine Bindung an das Rab-Protein nachweisbar ist¹⁴². Weiterhin basiert der Unterschied der Lokalisationsfähigkeit von Rab1A der beiden DrrA-Mutanten möglicherweise auf einem Unterschied der jeweiligen GDI-Freisetzungsaktivität. Während die Doppelmutante aufgrund der minimalen aber dennoch verbleibenden GEF-Aktivität GDI aus dem Rab1:GDP:GDI-Komplex freisetzen kann, trifft dies für die Vierfachmutante nicht mehr zu, da das GEF nach spontaner Dissoziation von GDI aus dem Komplex mit Rab1A:GDP mit intrinsischer Geschwindigkeit nicht mehr an das Rab-Protein binden kann. Die Experimente der zeitabhängigen Einzelzellanalyse werden darüber hinaus durch die statistische Analyse fixierter Zellpräparate unterstützt. Während für DrrA₃₄₀₋₅₃₃ sowie die Doppelmutante DrrA₃₄₀₋₅₃₃ N451A/R453A in 95 % bzw. 82 % der analysierten Zellen eine signifikante mitochondriale Lokalisation von Rab1A nach Fehllokalisierung des GEFs detektiert wurde, findet die Rekrutierung durch DrrA₃₄₀₋₅₃₃ N451A/R453A/D480A/S483A in nur 13 % der Zellen statt und zeigt damit eine deutliche Beeinträchtigung der Lokalisationsfähigkeit.

In Kombination mit den Experimenten der Rabex-5-vermittelten Lokalisation von Rab5A sprechen die Experimente der DrrA-vermittelten Rekrutierung von Rab1A dafür, dass die Bindung des GEFs an das Rab-Protein und der darauffolgende Nukleotidaustausch die trei-

bende Kraft der spezifischen Lokalisation ist, wodurch möglicherweise die präzise zeitliche und räumliche Kontrolle des vesikulären Transports gewährleistet wird.

6.4. Die Rabin8-vermittelte Rekrutierung von Rab8A

Um ein weiteres physiologisch relevantes GEF bezüglich der Lokalisationsfähigkeit seines spezifischen Rabs zu überprüfen und um die Hypothese zu stützen, dass die GEF-vermittelte Rekrutierung einen generellen Mechanismus zur subzellulären Lokalisation von Rab-Proteinen darstellt, wurde der Austauschfaktor Rabin8 bezüglich der Lokalisationsfähigkeit des Substrats Rab8A untersucht. Es wurde ausschließlich die GEF-Domäne von Rabin8, welche die Aminosäuren 157-232 umfasst, hinsichtlich der Fähigkeit Rab8A zu rekrutieren, untersucht. Nach induzierter mitochondrialer Fehllokalisierung von Rabin8₁₅₇₋₂₃₂ wurde die simultane Rekrutierung von Rab8A zu den Mitochondrien beobachtet (Abbildung 41). Dadurch konnte gezeigt werden, dass die GEF-Domäne von Rabin8 ausreichend ist, um die Lokalisation von Rab8A zu induzieren. Die Spezifität der Rabin8-induzierten Lokalisation gegenüber Rab8A wurde weiterhin demonstriert durch das Kontrollexperiment zur Überprüfung der Fähigkeit von Rabin8₁₅₇₋₂₃₂ die Lokalisation von Rab5A zu vermitteln, welches kein Substrat des Austauschfaktors ist. Nach mitochondrialer Fehllokalisierung von Rabin8₁₅₇₋₂₃₂ wurde im gesamten Verlauf des Experiments eine endosomale Lokalisation von Rab5A detektiert. Dies verdeutlicht, dass Rab5A nicht durch Rabin8 rekrutiert werden kann (Abbildung 56). Für Rabin8 wurde eine relativ geringe GEF-Aktivität gegenüber dem Rab8-Homolog Sec4 aus *S. cerevisiae* bestimmt (Aymelt Itzen, unveröffentlichte Daten) und in Analogie dazu eine geringe Aktivität bezüglich der Freisetzung von GDI aus dem Sec4:GDP:GDI-Komplex ermittelt (Lena Oesterlin, unveröffentlichte Daten). Die Tatsache, dass die GEF-Domäne von Rabin8 dennoch eine sehr schnelle und effiziente Rekrutierung von Rab8A induziert, deutet darauf hin, dass bei einer ausreichenden Geschwindigkeit der intrinsischen Dissoziation des Rab:GDP:GDI-Komplexes, eine geringe GEF-Aktivität ausreicht, um die spezifische Lokalisation des Rab-Proteins zu vermitteln.

6.5. Einfluss von GEFs auf die Lokalisation von Rabs und Mechanismen zur Membranlokalisation von GEFs

Die Bedeutung von GEFs für die korrekte Membranrekrutierung von Rabs wurde bereits für Rab3GEP, dem GEF für Rab27A in Melanozyten, demonstriert¹⁷². So führt die siRNA-vermittelte Verminderung der Rab3GEP-Expression in Melanozyten zu einem Verlust der Lokalisation von Rab27A an Melanosomen, wobei das Rab-Protein weiterhin membrangebunden ist. Eine Rab27A-Mutante, bei der ein Teil der RabSF2-Region gegen die entsprechende Sequenz aus Rab5A ausgetauscht wurde (NSKFIT zu HEFQES, Rab27A^{SF2}-Mutante), lokalisiert nicht mehr an Melanozyten, sondern zeigt eine Fehllokalisation an Membranen des ER und des Golgi-Apparats¹⁷². Wie dies bereits zuvor für verschiedene chimäre Rab-Proteine gezeigt werden konnte, dienen das ER und der Golgi-Apparat als Ausgangsstandort für fehllokalisierte Rab-Proteine⁹⁸. Da Rab3GEP den Nukleotidaustausch an der Rab27A^{SF2}-Mutante jedoch nach wie vor katalysiert, wie in biochemischen Experimenten gezeigt werden konnte, wurde spekuliert, dass die GEF Aktivität zwar notwendig jedoch nicht ausreichend ist für eine effiziente und korrekte Membranlokalisation. Ein Vergleich mit der Komplexstruktur zwischen der TBC-Domäne des GAPs Gyp1p und Rab33b deutet jedoch darauf hin, dass der Aminosäureaustausch der Rab27A^{SF2}-Mutante möglicherweise mit der Bindungsstelle für GAPs überlappt⁵⁵. Infolgedessen ist es denkbar, dass die Rab27A^{SF2}-Mutante hinsichtlich der GAP-stimulierten GTP-Hydrolyse beeinträchtigt ist und dies demzufolge Auswirkungen auf den Übergang zwischen der GTP- und GDP-gebundenen Form besitzt. In diesem Fall ist der Rab-Zyklus in Analogie zur konstitutiv aktiven Mutante Rab5A_{Q79L} an der Akzeptormembran unterbrochen (Abbildung 20), wodurch die darauffolgende GDI-vermittelte Extraktion nicht mehr stattfinden kann. Als Folge ist die anschließende GEF-vermittelte Rekrutierung des Rab-Proteins zur Akzeptormembran ebenfalls beeinträchtigt und erklärt möglicherweise die Diskrepanz zwischen der beeinträchtigten Lokalisation der Rab27A^{SF2}-Mutante bei vollständig ablaufendem Nukleotidaustausch. Weiterhin deutet dies darauf hin, dass eine Beeinträchtigung an verschiedenen Punkten des Rab-Zyklus, wie beispielsweise der verminderten GTP-Hydrolyse, letztlich zu einer Fehllokalisation des Rabs und damit zur Störung der zeitlich und räumlich präzise regulierten Aktivierung der GTPase führt.

Darüber hinaus konnte für weitere GEFs gezeigt werden, dass deren Funktion und Lokalisation für die Lokalisation ihres spezifischen Rabs essentiell sind. So wurde für den Mon1-Ccz1-Komplex, der ein Effektor von Rab5 und ein GEF für das Rab7-Homolog aus *S. cerevisiae* Ypt7 darstellt, eine Verknüpfung von aktivem Rab5:GTP zur Rekrutierung und GDI-Freisetzung von Rab7 postuliert, um die Reifung von frühen zu späten Endosomen zu

initiieren^{111,204}. Die siRNA-vermittelte Expressionsverminderung des VPS9-Proteins Varp, dass eine höhere GEF-Aktivität gegenüber Rab21 im Vergleich zu Rab5 aufweist, führt zu einer diffusen, zytoplasmatischen Verteilung von Rab21 sowie einer partiellen Fehllokalisation zur perinukleären Region¹³⁶. Dies erinnert an die ebenfalls diffuse zytoplasmatische Verteilung von Rab5A nach Koexpression mit der VPS9-Domäne von Rabex-5 (Abbildung 19A, linke Spalte). Gleichermäßen führt die Deletion von Ric1p, einer Komponente des Ric1p-Rgp1p-Komplexes, der eine spezifische Nukleotidaustauschaktivität gegenüber Ypt6 besitzt, zu einer diffusen Verteilung des normalerweise an Membranen des Golgi-Apparats lokalisierten Ypt6, wohingegen die Lokalisation des Ric1p-Rgp1p-Komplexes am Golgi-Apparat durch die Deletion von Ypt6 nicht beeinflusst wird¹¹⁰. Zusammenfassend deuten diese Daten in Kombination mit den in dieser Arbeit gezeigten Ergebnissen auf die Notwendigkeit von GEFs hinsichtlich der Membranrekrutierung von Rab-Proteinen hin.

Wenn Rab-Proteine durch ihre GEFs lokalisiert werden, stellt sich die Frage nach der Lokalisation und Membranrekrutierung des jeweiligen Austauschfaktors. GEFs sind Multidomänen-Proteine (Rabex-5, DrrA, Sec2, Connecdenn)^{45,117,144,169} und/oder Multiprotein-Komplexe (TRAPP, Mon1-Ccz1, Ric1p-Rgp1p)^{110,111,205}. DrrA (GEF für Rab1) und Sec2p (GEF für Sec4p; Sec4p ist das Rab8-Homolog aus *S. cerevisiae*) interagieren beispielsweise mit Membranlipiden vom Typ der Phosphoinositide (PIs), so dass die Rekrutierung bzw. Lokalisation des GEFs von der PI-Identität der jeweiligen Membran abhängt^{161,206}. DrrA interagiert mit der C-terminalen P4M-Domäne mit Phosphatidylinositol-4-Phosphat (PI4P) und wird dadurch in infizierten Zellen zur Legionellen-enthaltenden Vakuole (LCV) rekrutiert, in der PI4P angereichert ist. Die Expression von DrrA-Fragmenten in eukaryotischen Zellen, die die C-terminale P4M-Domäne enthalten, führt zur Lokalisation des Fusionsproteins an der Plasmamembran, die ebenfalls mit PI4P angereichert ist¹⁴³.

Die Lokalisation von Sec2p am Golgi-Apparat wird ebenfalls zum Teil durch die Interaktion mit PI4P vermittelt. Darüber hinaus ist jedoch auch die Interaktion mit der GTP-gebundenen Form der RabGTPase Ypt32p (Rab11-Homolog aus *S. cerevisiae*) für eine effiziente Rekrutierung erforderlich, d.h. die Interaktion mit bestimmten Membranlipiden als auch mit Ypt32p:GTP führt letztlich zur Lokalisation des GEFs Sec2p am Golgi-Apparat²⁰⁶. In Analogie zur positiven *Feedback*-Schleife der Aktivierung von Rab5A durch Rekrutierung des Rabaptin-5/Rabex-5-Komplexes zu den Endosomen, existiert ein vergleichbarer Mechanismus bei der Aktivierung von Sec4p¹²³. So interagiert Sec15p, eine Komponente des Exozyst-Komplexes, sowohl mit aktivem Sec4p als auch mit dem GEF Sec2p. Dies erinnert an die Rolle von Rabaptin-5 zur Rekrutierung von weiteren GEF-Molekülen zur schnellen und effizienten Etablierung einer Rab-Subdomäne auf der Organellenmembran^{123,206,207}. Darüber hinaus zählen PI-metabolisierende Enzyme wie Kinasen und Phosphatasen zu Effektoren spe-

zifischer Rab-Proteine, so dass Rabs maßgeblich an der Regulation der PI-Identität von Membranen beteiligt sind. Entsprechend bietet die Rekrutierung von GEFs durch *upstream* Rab-Proteine in Kombination mit der GEF-Rekrutierung durch spezifische Phosphoinositide an eine distinkte Membran die Möglichkeit zur präzisen Regulierung der Aktivierung von *downstream* Rab-Proteinen.

So ist an der Reifung von frühen zu späten Endosomen, die mit einem Übergang von Rab5-positiven zu Rab7-positiven Membrandomänen einhergeht, die Erzeugung von Phosphatidylinositol-3-Phosphat (PI3P) von entscheidender Bedeutung²⁰⁸. Dafür verantwortlich ist das Rab5-Effektorprotein Vps34, eine Phosphatidylinositol-3-Kinase, die durch aktives Rab5:GTP zu frühen Endosomen rekrutiert wird²⁰⁹⁻²¹¹. Mit steigendem PI3P-Gehalt der Endosomen wird das Protein Mon1 (SAND-1-Homolog aus *S. cerevisiae*) rekrutiert²⁰⁸. Mon1 ist Bestandteil des Mon1-Ccz1-Komplexes, der GEF-Aktivität gegenüber Ypt7 (Rab7-Homolog aus *S. cerevisiae*) besitzt und für die Rekrutierung und Aktivierung des Rab-Proteins verantwortlich ist¹¹¹. Gleichzeitig induziert Mon1 die Freisetzung von Rabex-5 von der Endosomenmembran, wodurch möglicherweise die Aktivierung weiterer Rab5-Moleküle inhibiert wird und dadurch der Übergang von Rab5-positiven zu Rab7-positiven Endosomen vollzogen wird²⁰⁸. Die Untereinheit Vps41 des HOPS-Komplexes stellt ebenfalls einen Effektor von aktivem Rab5 dar. Eine weitere Komponente des HOPS-Komplexes, Vps39, ist ebenfalls ein GEF für Rab7. Auf diese Weise rekrutiert Rab5 einen Komplex, der ein GEF für die *downstream* RabGTPase Rab7 enthält. Zusätzlich ist der HOPS-Komplex auch ein Effektor von Rab7, so dass auch hier wiederum eine positive *Feedback*-Schleife zur Etablierung einer spezifischen Rab-Subdomäne existiert^{9,212-214}. Ob die beiden GEFs für Rab7 – Mon1-Ccz1 und Vps39 – synergistisch wirken oder einen jeweils alternativen Signalweg darstellen ist noch unklar²¹⁵.

Dagegen wird die Inositol-Polyphosphat-5-Phosphatase OCRL1 von einer Vielzahl von aktiven Rab-Proteinen gebunden, wobei die Golgi-assoziierten Rab-Proteine Rab1, Rab6 und Rab8 sowie an Endosomen lokalisiertes Rab5 die stärksten Interaktionen zeigen^{216,217}. Das bevorzugte Substrat von OCRL1 ist PI(4,5)P₂, jedoch wird auch PI(3,4,5)P₃ an der 5'-Position dephosphoryliert²¹⁸. PI(3,4,5)P₃ wird überwiegend an der Plasmamembran als Reaktion auf extrazelluläre Signale synthetisiert und PI4P ist an Membranen des Golgi-Apparates angereichert²¹⁹. Daher beeinflusst OCRL1 möglicherweise indirekt den vesikulären Transport zwischen der Plasmamembran, den Endosomen und dem Golgi-Apparat durch Regulation des PI(4,5)P₂-Gehalts am Golgi-Apparat und an Endosomen sowie des PI(3,4,5)P₃-Gehalts an der Plasmamembran²¹⁸. Wie bereits erwähnt wird das Sec4p-GEF Sec2p neben der Interaktion mit dem Rab Ypt32p:GTP durch Interaktion mit PI4P zum Golgi-

Apparat rekrutiert²⁰⁶. Eine solche Form der kombinatorischen Rekrutierung von GEFs ist prinzipiell auch für andere Austauschfaktoren vorstellbar.

Neben der Rekrutierung von GEFs durch eine *upstream* RabGTPase existieren weitere Mechanismen zur spezifischen Lokalisation von Nukleotidaustauschfaktoren an eine bestimmte Membran. So wird Connecdenn, das GEF für Rab35, durch Interaktion mit dem Adapterprotein AP-2 an die Membran von Clathrin-umhüllten Vesikeln (*clathrin coated vesicles*, CCVs) rekrutiert. Darüber hinaus enthält Connecdenn mehrere *Src homology 3* (SH3)-Domänen, die für die Interaktion mit den synaptischen SH3-Proteinen Intersectin und Endophilin A1 verantwortlich sind. Die Tatsache, dass die Inhibierung der Interaktion von Connecdenn mit seinen Bindungspartnern zu drastischen Defekten während der Endozytose synaptischer Vesikel führt, verdeutlicht die Notwendigkeit der korrekten Membranlokalisation und der zentralen Rolle des GEFs in diesem Transportprozess^{117,220}. Weiterhin interagiert Connecdenn mit inaktivem Rab35 und die siRNA-vermittelte Expressionsverminderung von Connecdenn führt zu vergrößerten Endosomen, die auch nach Verlust der Rab35-Aktivität beobachtet wurden^{117,118}. Daher ist die effiziente und korrekte Rekrutierung von Connecdenn zu CCVs vermutlich entscheidend für die Rekrutierung und Aktivierung von Rab35.

Es konnte erst kürzlich gezeigt werden, dass die kovalente Modifikation von Rab-Proteinen mit einem AMP-Rest bzw. mit einer Phosphocholin-Gruppe ebenfalls die Affinität von GDI gegenüber der GDP-gebundenen Form von Rabs beeinflusst²²¹⁻²²³. So vermindert die Adenylierung von Rab1B die Affinität gegenüber GDI um mindestens fünf Größenordnungen. In Analogie dazu führt die Phosphocholinierung von Rab1B ebenfalls zu einer drastisch reduzierten GDI-Affinität²²³. Jedoch ist die durch das GEF DrrA-vermittelte Aktivierung von Rab1B notwendig, um die durch den gleichen Austauschfaktor katalysierte Adenylierung zu erleichtern. Im Gegensatz zur DrrA-vermittelten Adenylierung findet die durch das Legionellenprotein AnkX-vermittelte Phosphocholinierung in einem physiologisch relevanten Zeitfenster statt²²³. Dies deutet darauf hin, dass die kovalente Modifikation von Rab-Proteinen prinzipiell die effektive Dissoziation von Rab:GDP:GDI-Komplexen bewirken kann. Die in dieser Arbeit gezeigten Experimente sprechen dennoch dafür, dass die Spezifität zur korrekten Lokalisation eines Rabs an eine distinkte intrazelluläre Membran durch das jeweilige GEF bestimmt wird. Es ist jedoch unklar, ob möglicherweise durch posttranslationale Modifikationen von Rabs zunächst die GDI-Freisetzung aus dem Rab:GDP:GDI-Komplex und die Membranassoziation des inaktiven, modifizierten Rabs erfolgt und anschließend die Aktivierung durch das GEF katalysiert wird. Daher ist es möglich, dass GEFs mit Hilfe von weiteren bislang nicht identifizierten Faktoren für die effiziente Dissoziation des Rab-Proteins aus dem Rab:GDP:GDI-Komplex und die spezifische Rekrutierung verantwortlich sind und beide

Komponenten auf diese Weise einen synergistischen Effekt ausüben. Weiterhin wäre es vorstellbar, dass die posttranslationale Modifikation von Rab-Proteinen einen alternativen Signalweg zur Membranrekrutierung von RabGTPasen durch Proteine pathogener Bakterien darstellt, um die physiologischen Signalwege der Wirtszelle zu inhibieren.

In Analogie zu Rab-Proteinen existieren auch die Mitglieder der Rho/Rac/Cdc42-Familie, die überwiegend mit einem Geranylgeranyl-Anker modifiziert sind, im Zytosol in Form eines löslichen Komplexes mit RhoGDIs, denen ebenso wie RabGDIs eine Rolle bei der selektiven Membranextraktion der GDP-gebundenen Form der Ras-ähnlichen GTPase zugeschrieben wird⁸³. Erst kürzlich konnte gezeigt werden, dass prenyliertes RhoA:GDP mit sehr hoher Affinität ($K_D = 5 \text{ pM}$) an RhoGDI bindet, wohingegen die Affinität zur GTP-gebundenen Form um fast drei Größenordnungen reduziert ist ($K_D = 3 \text{ nM}$)²²⁴. Dennoch wurde für RhoA:GDP:RhoGDI-Komplexe bislang kein GDF identifiziert. Weiterhin konnte *in vitro* durch die Rekonstitution von Liposomen mit monovalenten, anionischen Phospholipiden sowie PI(3,4,5)P₃ gezeigt werden, dass die Dissoziation des Rac1:GDP:RhoGDI abhängig ist von dem GEF Tiam1 und GppNHp (nicht-hydrolysierbares GTP-Analogon)²²⁵. Dies unterstützt die in dieser Arbeit gezeigten Ergebnisse hinsichtlich der GEF-vermittelten Membranlokalisation von Rab-Proteinen, da trotz einer deutlich höheren Affinität des RhoA:GDP:RhoGDI-Komplexes im Vergleich zu Rab:GDP:RabGDI-Komplexen prinzipiell eine effiziente Dissoziation induziert werden kann. Jedoch wurde aufgrund der höheren Affinität des RhoA:GDP:RhoGDI-Komplexes und einer relativ langsamen intrinsischen Dissoziationsrate ($2 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$) neben GEFs die Existenz weiterer Faktoren postuliert, die die Dissoziation des hochaffinen RhoA:GDP:RhoGDI-Komplexes zusätzlich beschleunigen, um eine effiziente und spezifische Membranlokalisation in einem biologisch relevanten Zeitfenster zu gewährleisten²²⁴.

Die in dieser Arbeit gezeigten Experimente, die auf die essentielle Rolle von GEFs hinsichtlich der spezifischen Membranlokalisation ihrer Rabs hindeuten, stehen im Einklang mit der Kombination aus PIP-vermittelter-Rekrutierung von GEFs und der Existenz sogenannter Rab-Kaskaden, bei der die Rekrutierung eines GEFs durch eine aktive *upstream* RabGTPase erfolgt. Weiterhin wird die aufgestellte Hypothese durch die Analyse endogener Proteine unterstützt, da in vielen Fällen gezeigt werden konnte, dass die distinkte Lokalisation eines Rab-Proteins von der korrekten Lokalisation des jeweiligen GEFs abhängt.

7. Ausblick

Die Analyse der Auswirkung auf die subzelluläre Lokalisation von Rab5, Rab1 und Rab8 nach induzierter, mitochondrialer Fehllokalisierung ihrer spezifischen GEFs Rabex-5, DrrA und Rabin8 sowie der Analyse der GDI-Freisetzungs-Aktivität von Rabex-5 gegenüber Rab5A-f-NBD:GDP:GDI deutet auf einen GEF-vermittelten Mechanismus der GDI-Freisetzung in Kombination mit der spezifischen Membranrekrutierung von Rab-Proteinen hin.

Da in eukaryotischen Zellen mehr als 60 verschiedene Rab-Proteine existieren, die jeweils eine spezifische subzelluläre Lokalisation aufweisen, ist eine analoge Anzahl spezifischer Austauschfaktoren zu erwarten. Der Einfluss weiterer bislang identifizierter GEFs hinsichtlich der Lokalisation ihrer spezifischen Rabs, sollte daher mit dem in dieser Arbeit angewendeten zellbiologischen Versuchsansatz analysiert werden. Zur weiteren Unterstützung der Hypothese, dass die GEF-Aktivität des jeweiligen Austauschfaktors die treibende Kraft der Rekrutierungsfähigkeit darstellt, ist die Identifikation spezifischer Aminosäurereste innerhalb des GEFs zur Modulation bzw. Reduktion der GEF-Aktivität sinnvoll.

Weiterhin sollte nach induzierter Fehllokalisierung des GEFs an die Mitochondrienmembran die Identifikation potenzieller GEF-Bindungspartner Hinweise liefern, ob GEFs entsprechende Hilfs-Proteine benötigen, die durch posttranslationale Modifikationen die Affinität von GDI zu Rab:GDP beeinflussen.

Hinsichtlich der Rolle der DrrA-vermittelten Modifikation von Rab1 mit einem AMP-Rest auf die Membranlokalisierung des Rab-Proteins, bietet die Analyse der mitochondrialen Rekrutierung von mikroinjiziertem ^{mCherry}Rab1:AMP nach induzierter Fehllokalisierung von DrrA₃₄₀₋₅₃₃ bzw. der katalytisch inaktiven DrrA DrrA₃₄₀₋₅₃₃-Vierfachmutante, die Möglichkeit den Einfluss dieser PTM zu analysieren. Weiterhin sollte nach mitochondrialer Fehllokalisierung des Legionellenproteins AnkX, das durch Phosphocholinierung von Rab1B dessen Affinität zu GDI drastisch verringert, die subzelluläre Lokalisation des kotransfizierten Rab-Proteins analysiert werden, um zu überprüfen, ob diese Art der posttranslationalen Modifikation möglicherweise einen alternativen Mechanismus pathogener Bakterien darstellt, die Lokalisation von Rab-Proteinen zu beeinflussen.

8. Literaturverzeichnis

1. Collinge, W.E. Human chromosomes. *Nature* **156**, 755 (1945).
2. Wool, I.G. The structure and function of eukaryotic ribosomes. *Annual review of biochemistry* **48**, 719-754 (1979).
3. Dempsey, E.W. Variations in the structure of mitochondria. *The Journal of biophysical and biochemical cytology* **2**, 305-312 (1956).
4. Bainton, D.F. The discovery of lysosomes. *The Journal of cell biology* **91**, 66s-76s (1981).
5. Hao, M., Lin, S.X., Karylowski, O.J., Wustner, D., McGraw, T.E. & Maxfield, F.R. Vesicular and non-vesicular sterol transport in living cells. The endocytic recycling compartment is a major sterol storage organelle. *The Journal of biological chemistry* **277**, 609-617 (2002).
6. Palade, G. Intracellular aspects of the process of protein synthesis. *Science* **189**, 867 (1975).
7. Goldstein, J.L., Anderson, R.G. & Brown, M.S. Coated pits, coated vesicles, and receptor-mediated endocytosis. *Nature* **279**, 679-685 (1979).
8. Zerial, M. & McBride, H. Rab proteins as membrane organizers. *Nature reviews. Molecular cell biology* **2**, 107-117 (2001).
9. Hutagalung, A.H. & Novick, P.J. Role of Rab GTPases in membrane traffic and cell physiology. *Physiological reviews* **91**, 119-149 (2011).
10. Barnekow, A., Thyrock, A. & Kessler, D. Chapter 5: rab proteins and their interaction partners. *International review of cell and molecular biology* **274**, 235-274 (2009).
11. Takai, Y., Sasaki, T. & Matozaki, T. Small GTP-binding proteins. *Physiological reviews* **81**, 153-208 (2001).
12. Wennerberg, K., Rossman, K.L. & Der, C.J. The Ras superfamily at a glance. *Journal of cell science* **118**, 843-846 (2005).
13. Paduch, M., Jelen, F. & Otlewski, J. Structure of small G proteins and their regulators. *Acta biochimica Polonica* **48**, 829-850 (2001).
14. Bourne, H.R., Sanders, D.A. & McCormick, F. The GTPase superfamily: conserved structure and molecular mechanism. *Nature* **349**, 117-127 (1991).
15. Saraste, M., Sibbald, P.R. & Wittinghofer, A. The P-loop--a common motif in ATP- and GTP-binding proteins. *Trends in biochemical sciences* **15**, 430-434 (1990).
16. Schlichting, I., Almo, S.C., Rapp, G., Wilson, K., Petratos, K., Lentfer, A., Wittinghofer, A., Kabsch, W., Pai, E.F., Petsko, G.A. & et al. Time-resolved X-ray crystallographic study of the conformational change in Ha-Ras p21 protein on GTP hydrolysis. *Nature* **345**, 309-315 (1990).

17. Milburn, M.V., Tong, L., deVos, A.M., Brunger, A., Yamaizumi, Z., Nishimura, S. & Kim, S.H. Molecular switch for signal transduction: structural differences between active and inactive forms of protooncogenic ras proteins. *Science* **247**, 939-945 (1990).
18. Vetter, I.R. & Wittinghofer, A. The guanine nucleotide-binding switch in three dimensions. *Science* **294**, 1299-1304 (2001).
19. Rensland, H., John, J., Linke, R., Simon, I., Schlichting, I., Wittinghofer, A. & Goody, R.S. 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).
20. 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. *Journal of molecular biology* **301**, 1077-1087 (2000).
21. Pereira-Leal, J.B. & Seabra, M.C. Evolution of the Rab family of small GTP-binding proteins. *Journal of molecular biology* **313**, 889-901 (2001).
22. IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature. Tentative rules. A one-letter notation for amino acid sequences. *Biochimica et biophysica acta* **168**, 6-10 (1968).
23. Merithew, E., Hatherly, S., Dumas, J.J., Lawe, D.C., Heller-Harrison, R. & Lambright, D.G. 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).
24. Chavrier, P., Gorvel, J.P., Stelzer, E., Simons, K., Gruenberg, J. & Zerial, M. Hypervariable C-terminal domain of rab proteins acts as a targeting signal. *Nature* **353**, 769-772 (1991).
25. Stenmark, H., Valencia, A., Martinez, O., Ullrich, O., Goud, B. & Zerial, M. Distinct structural elements of rab5 define its functional specificity. *The EMBO journal* **13**, 575-583 (1994).
26. Valencia, A., Chardin, P., Wittinghofer, A. & Sander, C. The ras protein family: evolutionary tree and role of conserved amino acids. *Biochemistry* **30**, 4637-4648 (1991).
27. Kinsella, B.T. & Maltese, W.A. rab GTP-binding proteins implicated in vesicular transport are isoprenylated in vitro at cysteines within a novel carboxyl-terminal motif. *The Journal of biological chemistry* **266**, 8540-8544 (1991).
28. Khosravi-Far, R., Lutz, R.J., Cox, A.D., Conroy, L., Bourne, J.R., Sinensky, M., Balch, W.E., Buss, J.E. & Der, C.J. Isoprenoid modification of rab proteins terminating in CC or CXC motifs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **88**, 6264-6268 (1991).
29. Farnsworth, C.C., Kawata, M., Yoshida, Y., Takai, Y., Gelb, M.H. & Glomset, J.A. C terminus of the small GTP-binding protein smg p25A contains two geranylgeranylated cysteine residues and a methyl ester. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **88**, 6196-6200 (1991).

30. Bourne, H.R., Sanders, D.A. & McCormick, F. The GTPase superfamily: a conserved switch for diverse cell functions. *Nature* **348**, 125-132 (1990).
31. Macara, I.G. & Wolfman, A. Signal transduction and the ras gene family: molecular switches of unknown function. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* **1**, 26-30 (1989).
32. 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).
33. Stroupe, C. & Brunger, A.T. Crystal structures of a Rab protein in its inactive and active conformations. *Journal of molecular biology* **304**, 585-598 (2000).
34. 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).
35. 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).
36. Andres, D.A., Seabra, M.C., Brown, M.S., Armstrong, S.A., Smeland, T.E., Cremers, F.P. & Goldstein, J.L. cDNA cloning of component A of Rab geranylgeranyl transferase and demonstration of its role as a Rab escort protein. *Cell* **73**, 1091-1099 (1993).
37. Alexandrov, K., Simon, I., Yurchenko, V., Iakovenko, A., Rostkova, E., Scheidig, A.J. & Goody, R.S. Characterization of the ternary complex between Rab7, REP-1 and Rab geranylgeranyl transferase. *European journal of biochemistry / FEBS* **265**, 160-170 (1999).
38. Casey, P.J. & Seabra, M.C. Protein prenyltransferases. *The Journal of biological chemistry* **271**, 5289-5292 (1996).
39. Farnsworth, C.C., Seabra, M.C., Ericsson, L.H., Gelb, M.H. & Glomset, J.A. Rab geranylgeranyl transferase catalyzes the geranylgeranylation of adjacent cysteines in the small GTPases Rab1A, Rab3A, and Rab5A. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **91**, 11963-11967 (1994).
40. Alexandrov, K., Horiuchi, H., Steele-Mortimer, O., Seabra, M.C. & Zerial, M. Rab escort protein-1 is a multifunctional protein that accompanies newly prenylated rab proteins to their target membranes. *The EMBO journal* **13**, 5262-5273 (1994).
41. 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).
42. Van Dyke, K., Robinson, R., Urquilla, P., Smith, D., Taylor, M., Trush, M. & Wilson, M. An analysis of nucleotides and catecholamines in bovine medullary granules by anion exchange high pressure liquid chromatography and fluorescence. Evidence that most of the catecholamines in chromaffin granules are stored without associated ATP. *Pharmacology* **15**, 377-391 (1977).
43. Barr, F. & Lambright, D.G. Rab GEFs and GAPs. *Current opinion in cell biology* **22**, 461-470.

44. Cai, Y., Chin, H.F., Lazarova, D., Menon, S., Fu, C., Cai, H., Sclafani, A., Rodgers, D.W., De La Cruz, E.M., Ferro-Novick, S. & Reinisch, K.M. The structural basis for activation of the Rab Ypt1p by the TRAPP membrane-tethering complexes. *Cell* **133**, 1202-1213 (2008).
45. Delprato, A. & Lambright, D.G. Structural basis for Rab GTPase activation by VPS9 domain exchange factors. *Nature structural & molecular biology* **14**, 406-412 (2007).
46. Esters, H., Alexandrov, K., Iakovenko, A., Ivanova, T., Thoma, N., Rybin, V., Zerial, M., Scheidig, A.J. & Goody, R.S. Vps9, Rabex-5 and DSS4: proteins with weak but distinct nucleotide-exchange activities for Rab proteins. *Journal of molecular biology* **310**, 141-156 (2001).
47. Traub, L.M. Tickets to ride: selecting cargo for clathrin-regulated internalization. *Nature reviews. Molecular cell biology* **10**, 583-596 (2009).
48. Horgan, C.P. & McCaffrey, M.W. Rab GTPases and microtubule motors. *Biochemical Society transactions* **39**, 1202-1206 (2011).
49. Brocker, C., Engelbrecht-Vandre, S. & Ungermann, C. Multisubunit tethering complexes and their role in membrane fusion. *Current biology* **20**, R943-952 (2010).
50. Jahn, R. & Scheller, R.H. Snares - Engines for Membrane Fusion. *Nature reviews. Molecular cell biology* **7**, 631-643 (2006).
51. Richardson, P.M. & Zon, L.I. Molecular cloning of a cDNA with a novel domain present in the tre-2 oncogene and the yeast cell cycle regulators BUB2 and cdc16. *Oncogene* **11**, 1139-1148 (1995).
52. Fukui, K., Sasaki, T., Imazumi, K., Matsuura, Y., Nakanishi, H. & Takai, Y. Isolation and characterization of a GTPase activating protein specific for the Rab3 subfamily of small G proteins. *The Journal of biological chemistry* **272**, 4655-4658 (1997).
53. Ingmundson, A., Delprato, A., Lambright, D.G. & Roy, C.R. Legionella pneumophila proteins that regulate Rab1 membrane cycling. *Nature* **450**, 365-369 (2007).
54. Rak, A., Fedorov, R., Alexandrov, K., Albert, S., Goody, R.S., Gallwitz, D. & Scheidig, A.J. Crystal structure of the GAP domain of Gyp1p: first insights into interaction with Ypt/Rab proteins. *The EMBO journal* **19**, 5105-5113 (2000).
55. 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).
56. Sasaki, T., Kikuchi, A., Araki, S., Hata, Y., Isomura, M., Kuroda, S. & Takai, Y. Purification and Characterization from Bovine Brain Cytosol of a Protein That Inhibits the Dissociation of Gdp from and the Subsequent Binding of Gtp to Smg-P25a, a Ras P21-Like Gtp-Binding Protein. *The Journal of biological chemistry* **265**, 2333-2337 (1990).
57. Araki, S., Kikuchi, A., Hata, Y., Isomura, M. & Takai, Y. Regulation of Reversible Binding of Smg P25a, a Ras P21-Like Gtp-Binding Protein, to Synaptic Plasma-Membranes and Vesicles by Its Specific Regulatory Protein, Gdp Dissociation Inhibitor. *The Journal of biological chemistry* **265**, 13007-13015 (1990).

58. Regazzi, R., Kikuchi, A., Takai, Y. & Wollheim, C.B. The Small Gtp-Binding Proteins in the Cytosol of Insulin-Secreting Cells Are Complexed to Gdp Dissociation Inhibitor Proteins. *The Journal of biological chemistry* **267**, 17512-17519 (1992).
59. Wu, Y.W., Oesterlin, L.K., Tan, K.T., Waldmann, H., Alexandrov, K. & Goody, R.S. Membrane targeting mechanism of Rab GTPases elucidated by semisynthetic protein probes. *Nature chemical biology* **6**, 534-540.
60. Ullrich, O., Stenmark, H., Alexandrov, K., Huber, L.A., Kaibuchi, K., Sasaki, T., Takai, Y. & Zerial, M. Rab Gdp Dissociation Inhibitor as a General Regulator for the Membrane Association of Rab Proteins. *The Journal of biological chemistry* **268**, 18143-18150 (1993).
61. Stenmark, H. Rab GTPases as coordinators of vesicle traffic. *Nature reviews. Molecular cell biology* **10**, 513-525 (2009).
62. Behnia, R. & Munro, S. Organelle identity and the signposts for membrane traffic. *Nature* **438**, 597-604 (2005).
63. Munro, S. Organelle identity and the targeting of peripheral membrane proteins. *Current opinion in cell biology* **14**, 506-514 (2002).
64. 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. *The Journal of cell biology* **119**, 749-761 (1992).
65. Saraste, J., Lahtinen, U. & Goud, B. Localization of the small GTP-binding protein rab1p to early compartments of the secretory pathway. *Journal of cell science* **108 (Pt 4)**, 1541-1552 (1995).
66. 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. *The Journal of cell biology* **125**, 225-237 (1994).
67. Hattula, K., Furuholm, J., Arffman, A. & Peranen, J. A Rab8-specific GDP/GTP exchange factor is involved in actin remodeling and polarized membrane transport. *Molecular biology of the cell* **13**, 3268-3280 (2002).
68. Sahlender, D.A., Roberts, R.C., Arden, S.D., Spudich, G., Taylor, M.J., Luzio, J.P., Kendrick-Jones, J. & Buss, F. Optineurin links myosin VI to the Golgi complex and is involved in Golgi organization and exocytosis. *The Journal of cell biology* **169**, 285-295 (2005).
69. Bryant, D.M., Datta, A., Rodriguez-Fraticelli, A.E., Peranen, J., Martin-Belmonte, F. & Mostov, K.E. A molecular network for de novo generation of the apical surface and lumen. *Nature cell biology* **12**, 1035-1045 (2010).
70. Peranen, J. Rab8 GTPase as a Regulator of Cell Shape. *Cytoskeleton* **68**, 527-539 (2011).
71. Gorvel, J.P., Chavrier, P., Zerial, M. & Gruenberg, J. rab5 controls early endosome fusion in vitro. *Cell* **64**, 915-925 (1991).

72. Bucci, C., Parton, R.G., Mather, I.H., Stunnenberg, H., Simons, K., Hoflack, B. & Zerial, M. The Small Gtpase Rab5 Functions as a Regulatory Factor in the Early Endocytic Pathway. *Cell* **70**, 715-728 (1992).
73. Li, G.P. & Stahl, P.D. Structure-Function Relationship of the Small Gtpase Rab5. *The Journal of biological chemistry* **268**, 24475-24480 (1993).
74. Stenmark, H., Parton, R.G., Steelemortimer, O., Lutcke, A., Gruenberg, J. & Zerial, M. Inhibition of Rab5 Gtpase Activity Stimulates Membrane-Fusion in Endocytosis. *The EMBO journal* **13**, 1287-1296 (1994).
75. Galperin, E. & Sorkin, A. Visualization of Rab5 activity in living cells by FRET microscopy and influence of plasma-membrane-targeted Rab5 on clathrin-dependent endocytosis. *Journal of cell science* **116**, 4799-4810 (2003).
76. Gomes, A.Q., Ali, B.R., Ramalho, J.S., Godfrey, R.F., Barral, D.C., Hume, A.N. & Seabra, M.C. Membrane targeting of Rab GTPases is influenced by the prenylation motif. *Molecular biology of the cell* **14**, 1882-1899 (2003).
77. Calero, M., Chen, C.Z., Zhu, W., Winand, N., Havas, K.A., Gilbert, P.M., Burd, C.G. & Collins, R.N. Dual prenylation is required for Rab protein localization and function. *Molecular biology of the cell* **14**, 1852-1867 (2003).
78. Wright, L.P. & Philips, M.R. Thematic review series: lipid posttranslational modifications. CAAX modification and membrane targeting of Ras. *Journal of lipid research* **47**, 883-891 (2006).
79. Leung, K.F., Baron, R. & Seabra, M.C. Thematic review series: lipid posttranslational modifications. geranylgeranylation of Rab GTPases. *Journal of lipid research* **47**, 467-475 (2006).
80. Itzen, A. & Goody, R.S. GTPases involved in vesicular trafficking: Structures and mechanisms. *Seminars in cell & developmental biology* **22**, 48-56 (2011).
81. Wu, X.F., Rao, K., Bowers, M.B., Copeland, N.G., Jenkins, N.A. & Hammer, J.A. Rab27a enables myosin Va-dependent melanosome capture by recruiting the myosin to the organelle. *The Journal of General Physiology* **118**, 23a-24a (2001).
82. Rocks, O., Peyker, A. & Bastiaens, P.I. Spatio-temporal segregation of Ras signals: one ship, three anchors, many harbors. *Current opinion in cell biology* **18**, 351-357 (2006).
83. Michaelson, D., Silletti, J., Murphy, G., D'Eustachio, P., Rush, M. & Philips, M.R. Differential localization of Rho GTPases in live cells: Regulation by hypervariable regions and RhoGDI binding. *The Journal of cell biology* **152**, 111-126 (2001).
84. Garcia-Mata, R., Boulter, E. & Burridge, K. The 'invisible hand': regulation of RHO GTPases by RHOGDIs. *Nature reviews. Molecular cell biology* **12**, 493-504 (2011).
85. Phillips, M.J., Calero, G., Chan, B., Ramachandran, S. & Cerione, R.A. Effector proteins exert an important influence on the signaling-active state of the small GTPase Cdc42. *The Journal of biological chemistry* **283**, 14153-14164 (2008).
86. Nomanbhoy, T.K. & Cerione, R.A. Characterization of the interaction between RhoGDI and Cdc42Hs using fluorescence spectroscopy. *The Journal of biological chemistry* **271**, 10004-10009 (1996).

87. Johnson, J.L., Erickson, J.W. & Cerione, R.A. New Insights into How the Rho Guanine Nucleotide Dissociation Inhibitor Regulates the Interaction of Cdc42 with Membranes. *The Journal of biological chemistry* **284**, 23860-23871 (2009).
88. Boulter, E., Garcia-Mata, R., Guilluy, C., Dubash, A., Rossi, G., Brennwald, P.J. & Burridge, K. Regulation of Rho GTPase crosstalk, degradation and activity by RhoGDI1. *Nature cell biology* **12**, 477-483 (2010).
89. Donaldson, J.G. & Jackson, C.L. ARF family G proteins and their regulators: roles in membrane transport, development and disease. *Nature reviews. Molecular cell biology* **12**, 362-375 (2011).
90. Antony, B., Beraud-Dufour, S., Chardin, P. & Chabre, M. N-terminal hydrophobic residues of the G-protein ADP-ribosylation factor-1 insert into membrane phospholipids upon GDP to GTP exchange. *Biochemistry* **36**, 4675-4684 (1997).
91. Hanzal-Bayer, M., Renault, L., Roversi, P., Wittinghofer, A. & Hillig, R.C. The complex of Arl2-GTP and PDE delta: from structure to function. *The EMBO journal* **21**, 2095-2106 (2002).
92. Nancy, V., Callebaut, I., El Marjou, A. & de Gunzburg, J. The delta subunit of retinal rod cGMP phosphodiesterase regulates the membrane association of Ras and Rap GTPases. *The Journal of biological chemistry* **277**, 15076-15084 (2002).
93. Zhang, H.B., Liu, X.H., Zhang, K., Chen, C.K., Frederick, J.M., Prestwich, G.D. & Baehr, W. Photoreceptor cGMP phosphodiesterase delta subunit (PDE delta) functions as a prenyl-binding protein. *The Journal of biological chemistry* **279**, 407-413 (2004).
94. Chen, Y.X., Koch, S., Uhlenbrock, K., Weise, K., Das, D., Gremer, L., Brunsveld, L., Wittinghofer, A., Winter, R., Triola, G. & Waldmann, H. Synthesis of the Rheb and K-Ras4B GTPases. *Angewandte Chemie International Edition* **49**, 6090-6095 (2010).
95. Linari, M., Hanzal-Bayer, M. & Becker, J. The delta subunit of rod specific cyclic GMP phosphodiesterase, PDE delta, interacts with the Arf-like protein Arl3 in a GTP specific manner. *Febs Letters* **458**, 55-59 (1999).
96. Veltel, S., Kravchenko, A., Ismail, S. & Wittinghofer, A. Specificity of Arl2/Arl3 signaling is mediated by a ternary Arl3-effector-GAP complex. *Febs Letters* **582**, 2501-2507 (2008).
97. Ismail, S.A., Chen, Y.X., Rusinova, A., Chandra, A., Bierbaum, M., Gremer, L., Triola, G., Waldmann, H., Bastiaens, P.I. & Wittinghofer, A. Arl2-GTP and Arl3-GTP regulate a GDI-like transport system for farnesylated cargo. *Nature chemical biology* **7**, 942-949 (2011).
98. Ali, B.R., Wasmeier, C., Lamoreux, L., Strom, M. & Seabra, M.C. Multiple regions contribute to membrane targeting of Rab GTPases. *Journal of cell science* **117**, 6401-6412 (2004).
99. Shapiro, A.D. & Pfeffer, S.R. Quantitative-Analysis of the Interactions between Prenyl Rab9, Gdp Dissociation Inhibitor-Alpha, and Guanine-Nucleotides. *The Journal of biological chemistry* **270**, 11085-11090 (1995).

100. DiracSvejstrup, A.B., Sumizawa, T. & Pfeffer, S.R. Identification of a GDI displacement factor that releases endosomal Rab GTPases from Rab-GDI. *The EMBO journal* **16**, 465-472 (1997).
101. Martincic, I., Peralta, M.E. & Ngsee, J.K. Isolation and characterization of a dual prenylated Rab and VAMP2 receptor. *The Journal of biological chemistry* **272**, 26991-26998 (1997).
102. Sivars, U., Aivazian, D. & Pfeffer, S.R. Yip3 catalyses the dissociation of endosomal Rab-GDI complexes. *Nature* **425**, 856-859 (2003).
103. Calero, M. & Collins, R.N. *Saccharomyces cerevisiae* Pra1p/Yip3p interacts with Yip1p and Rab proteins. *Biochemical and biophysical research communications* **290**, 676-681 (2002).
104. Shakoori, A., Fujii, G., Yoshimura, S., Kitamura, M., Nakayama, K., Ito, T., Ohno, H. & Nakamura, N. Identification of a five-pass transmembrane protein family localizing in the Golgi apparatus and the ER. *Biochemical and biophysical research communications* **312**, 850-857 (2003).
105. Ali, B.R. & Seabra, M.C. Targeting of Rab GTPases to cellular membranes. *Biochemical Society transactions* **33**, 652-656 (2005).
106. Barrowman, J., Bhandari, D., Reinisch, K. & Ferro-Novick, S. TRAPP complexes in membrane traffic: convergence through a common Rab. *Nature reviews. Molecular cell biology* **11**, 759-763 (2010).
107. WalchSolimena, C., Collins, R.N. & Novick, P.J. Sec2p mediates nucleotide exchange on Sec4p and is involved in polarized delivery of post-Golgi vesicles. *The Journal of cell biology* **137**, 1495-1509 (1997).
108. Luo, H.R., Saiardi, A., Nagata, E., Ye, K.Q., Yu, H.B., Jung, T.S., Luo, X.J., Jain, S., Sawa, A. & Snyder, S.H. GRAB: A physiologic guanine nucleotide exchange factor for Rab3A, which interacts with inositol hexakisphosphate kinase. *Neuron* **31**, 439-451 (2001).
109. Wang, W., Sacher, M. & Ferro-Novick, S. TRAPP stimulates guanine nucleotide exchange on Ypt1p. *The Journal of cell biology* **151**, 289-295 (2000).
110. Siniosoglou, S., Peak-Chew, S.Y. & Pelham, H.R.B. Ric1p and Rgp1p form a complex that catalyses nucleotide exchange on Ypt6p. *The EMBO journal* **19**, 4885-4894 (2000).
111. Nordmann, M., Cabrera, M., Perz, A., Brocker, C., Ostrowicz, C., Engelbrecht-Vandre, S. & Ungermann, C. The Mon1-Ccz1 Complex Is the GEF of the Late Endosomal Rab7 Homolog Ypt7. *Current Biology* **20**, 1654-1659 (2010).
112. Marat, A.L., Dokainish, H. & McPherson, P.S. DENN domain proteins: regulators of Rab GTPases. *The Journal of biological chemistry* **286**, 13791-13800 (2011).
113. Carney, D.S., Davies, B.A. & Horazdovsky, B.F. Vps9 domain-containing proteins: activators of Rab5 GTPases from yeast to neurons. *Trends in cell biology* **16**, 27-35 (2006).

114. Levivier, E., Goud, B., Souchet, M., Calmels, T.P., Mornon, J.P. & Callebaut, I. uDENN, DENN, and dDENN: indissociable domains in Rab and MAP kinases signaling pathways. *Biochemical and biophysical research communications* **287**, 688-695 (2001).
115. Yoshimura, S., Gerondopoulos, A., Linford, A., Rigden, D.J. & Barr, F.A. Family-wide characterization of the DENN domain Rab GDP-GTP exchange factors. *The Journal of cell biology* **191**, 367-381 (2010).
116. Kouranti, I., Sachse, M., Arouche, N., Goud, B. & Echard, A. Rab35 regulates an endocytic recycling pathway essential for the terminal steps of cytokinesis. *Current biology* **16**, 1719-1725 (2006).
117. Allaire, P.D., Marat, A.L., Dall'Armi, C., Di Paolo, G., McPherson, P.S. & Ritter, B. The Connecdenn DENN domain: a GEF for Rab35 mediating cargo-specific exit from early endosomes. *Molecular cell* **37**, 370-382 (2010).
118. Marat, A.L. & McPherson, P.S. The connecdenn family, Rab35 guanine nucleotide exchange factors interfacing with the clathrin machinery. *The Journal of biological chemistry* **285**, 10627-10637 (2010).
119. Wada, M., Nakanishi, H., Satoh, A., Hirano, H., Obaishi, H., Matsuura, Y. & Takai, Y. Isolation and characterization of a GDP/GTP exchange protein specific for the Rab3 subfamily small G proteins. *The Journal of biological chemistry* **272**, 3875-3878 (1997).
120. Figueiredo, A.C., Wasmeier, C., Tarafder, A.K., Ramalho, J.S., Baron, R.A. & Seabra, M.C. Rab3GEP is the non-redundant guanine nucleotide exchange factor for Rab27a in melanocytes. *The Journal of biological chemistry* **283**, 23209-23216 (2008).
121. Burd, C.G., Mustol, P.A., Schu, P.V. & Emr, S.D. A yeast protein related to a mammalian Ras-binding protein, Vps9p, is required for localization of vacuolar proteins. *Molecular and cellular biology* **16**, 2369-2377 (1996).
122. Hama, H., Tall, G.G. & Horazdovsky, B.F. Vps9p is a guanine nucleotide exchange factor involved in vesicle-mediated vacuolar protein transport. *The Journal of biological chemistry* **274**, 15284-15291 (1999).
123. Horiuchi, H., Lippe, R., McBride, H.M., Rubino, M., Woodman, P., Stenmark, H., Rybin, V., Wilm, M., Ashman, K., Mann, M. & Zerial, M. A novel Rab5 GDP/GTP exchange factor complexed to Rabaptin-5 links nucleotide exchange to effector recruitment and function. *Cell* **90**, 1149-1159 (1997).
124. Han, L.M. & Colicelli, J. A Human Protein Selected for Interference with Ras Function Interacts Directly with Ras and Competes with Raf. *Molecular and cellular biology* **15**, 1318-1323 (1995).
125. Kajihio, H., Saito, K., Tsujita, K., Kontani, K., Araki, Y., Kurosu, H. & Katada, T. RIN3: a novel Rab5 GEF interacting with amphiphysin II involved in the early endocytic pathway. *Journal of cell science* **116**, 4159-4168 (2003).
126. Han, L., Wong, D., Dhaka, A., Afar, D., White, M., Xie, W., Herschman, H., Witte, O. & Colicelli, J. Protein binding and signaling properties of RIN1 suggest a unique effector function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**, 4954-4959 (1997).

127. Tall, G.G., Barbieri, M.A., Stahl, P.D. & Horazdovsky, B.F. Ras-activated endocytosis is mediated by the Rab5 guanine nucleotide exchange activity of RIN1. *Developmental cell* **1**, 73-82 (2001).
128. Hadano, S., Otomo, A., Suzuki-Utsunomiya, K., Kunita, R., Yanagisawa, Y., Showguchi-Miyata, J., Mizumura, H. & Ikeda, J.E. ALS2CL, the novel protein highly homologous to the carboxy-terminal half of ALS2, binds to Rab5 and modulates endosome dynamics. *Febs Letters* **575**, 64-70 (2004).
129. Otomo, A., Hadano, S., Okada, T., Mizumura, H., Kunita, R., Nishijima, H., Showguchi-Miyata, J., Yanagisawa, Y., Kohiki, E., Suga, E., Yasuda, M., Osuga, H., Nishimoto, T., Narumiya, S. & Ikeda, J.E. ALS2, a novel guanine nucleotide exchange factor for the small GTPase Rab5, is implicated in endosomal dynamics. *Human molecular genetics* **12**, 1671-1687 (2003).
130. Saito, K., Murai, J., Kajihō, H., Kontani, K., Kurosu, H. & Katada, T. A novel binding protein composed of homophilic tetramer exhibits unique properties for the small GTPase Rab5. *The Journal of biological chemistry* **277**, 3412-3418 (2002).
131. Woller, B., Luiskandl, S., Popovic, M., Prieler, B.E., Ikonge, G., Mutzl, M., Rehmann, H. & Herbst, R. Rin-like, a novel regulator of endocytosis, acts as guanine nucleotide exchange factor for Rab5a and Rab22. *Biochimica et biophysica acta* **1813**, 1198-1210 (2011).
132. Delprato, A., Merithew, E. & Lambright, D.G. Structure, exchange determinants, and family-wide rab specificity of the tandem helical bundle and Vps9 domains of Rabex-5. *Cell* **118**, 607-617 (2004).
133. Hunker, C.M., Galvis, A., Kruk, I., Giambini, H., Veisaga, M.L. & Barbieri, M.A. Rab5-activating protein 6, a novel endosomal protein with a role in endocytosis. *Biochemical and biophysical research communications* **340**, 967-975 (2006).
134. Sato, M., Sato, K., Fonarev, P., Huang, C.J., Liou, W. & Grant, B.D. Caenorhabditis elegans RME-6 is a novel regulator of RAB-5 at the clathrin-coated pit. *Nature cell biology* **7**, 559-U557 (2005).
135. Lodhi, I.J., Chiang, S.H., Chang, L., Vollenweider, D., Watson, R.T., Inoue, M., Pessin, J.E. & Saltiel, A.R. Gapex-5, a Rab31 guanine nucleotide exchange factor that regulates Glut4 trafficking in adipocytes. *Cell Metabolism* **5**, 59-72 (2007).
136. Zhang, X.J., He, X., Fu, X.Y. & Chang, Z.J. Varp is a Rab21 guanine nucleotide exchange factor and regulates endosome dynamics. *Journal of cell science* **119**, 1053-1062 (2006).
137. Klebe, C., Prinz, H., Wittinghofer, A. & Goody, R.S. The kinetic mechanism of Ran-nucleotide exchange catalyzed by RCC1. *Biochemistry* **34**, 12543-12552 (1995).
138. Renault, L., Guibert, B. & Cherfils, J. Structural snapshots of the mechanism and inhibition of a guanine nucleotide exchange factor. *Nature* **426**, 525-530 (2003).
139. 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).
140. Machner, M.P. & Isberg, R.R. Targeting of host Rab GTPase function by the intravacuolar pathogen Legionella pneumophila. *Developmental Cell* **11**, 47-56 (2006).

141. Machner, M.P. & Isberg, R.R. A bifunctional bacterial protein links GDI displacement to Rab1 activation. *Science* **318**, 974-977 (2007).
142. 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).
143. Murata, T., Delprato, A., Ingmundson, A., Toomre, D.K., Lambright, D.G. & Roy, C.R. The Legionella pneumophila effector protein DrrA is a Rab1 guanine nucleotide-exchange factor. *Nature cell biology* **8**, 971-977 (2006).
144. Itzen, A., Rak, A. & Goody, R.S. Sec2 is a highly efficient exchange factor for the Rab protein Sec4. *Journal of molecular biology* **365**, 1359-1367 (2007).
145. Zhu, H.P., Zhu, G.Y., Liu, J., Liang, Z.M., Zhang, X.J.C. & Li, G. Rabaptin-5-independent membrane targeting and Rab5 activation by Rabex-5 in the cell. *Molecular biology of the cell* **18**, 4119-4128 (2007).
146. Lee, S., Tsai, Y.C., Mattera, R., Smith, W.J., Kostelansky, M.S., Weissman, A.M., Bonifacino, J.S. & Hurley, J.H. Structural basis for ubiquitin recognition and autoubiquitination by Rabex-5. *Nature structural and molecular biology* **13**, 264-271 (2006).
147. Penengo, L., Mapelli, M., Murachelli, A.G., Confalonieri, S., Magri, L., Musacchio, A., Di Fiore, P.P., Polo, S. & Schneider, T.R. Crystal structure of the ubiquitin binding domains of rabex-5 reveals two modes of interaction with ubiquitin. *Cell* **124**, 1183-1195 (2006).
148. Hofmann, K. & Falquet, L. A ubiquitin-interacting motif conserved in components of the proteasomal and lysosomal protein degradation systems. *Trends in biochemical sciences* **26**, 347-350 (2001).
149. Polo, S., Confalonieri, S., Salcini, A.E. & Di Fiore, P.P. EH and UIM: endocytosis and more. *Science signaling* **2003**, re17 (2003).
150. Hicke, L., Schubert, H.L. & Hill, C.P. Ubiquitin-binding domains. *Nature reviews. Molecular cell biology* **6**, 610-621 (2005).
151. Raiborg, C., Slagsvold, T. & Stenmark, H. A new side to ubiquitin. *Trends in biochemical sciences* **31**, 541-544 (2006).
152. Mattera, R. & Bonifacino, J.S. Ubiquitin binding and conjugation regulate the recruitment of Rabex-5 to early endosomes. *The EMBO journal* **27**, 2484-2494 (2008).
153. Mattera, R., Tsai, Y.C., Weissman, A.M. & Bonifacino, J.S. The Rab5 guanine nucleotide exchange factor Rabex-5 binds ubiquitin (Ub) and functions as a Ub ligase through an atypical Ub-interacting motif and a zinc finger domain. *The Journal of biological chemistry* **281**, 6874-6883 (2006).
154. Hicke, L. & Dunn, R. Regulation of membrane protein transport by ubiquitin and ubiquitin-binding proteins. *Annual review of cell and developmental biology* **19**, 141-172 (2003).
155. Clague, M.J. & Urbe, S. Endocytosis: the DUB version. *Trends in cell biology* **16**, 551-559 (2006).

156. Mattera, R. & Bonifacino, J.S. Ubiquitin binding and conjugation regulate the recruitment of Rabex-5 to early endosomes. *The EMBO journal* **27**, 2484-2494 (2008).
157. Lippe, R., Miaczynska, M., Rybin, V., Runge, A. & Zerial, M. Functional synergy between Rab5 effector Rabaptin-5 and exchange factor Rabex-5 when physically associated in a complex. *Molecular biology of the cell* **12**, 2219-2228 (2001).
158. Zhu, H., Zhu, G., Liu, J., Liang, Z., Zhang, X.C. & Li, G. Rabaptin-5-independent membrane targeting and Rab5 activation by Rabex-5 in the cell. *Molecular biology of the cell* **18**, 4119-4128 (2007).
159. Grosshans, B.L., Ortiz, D. & Novick, P. Rabs and their effectors: achieving specificity in membrane traffic. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**, 11821-11827 (2006).
160. Zhu, H.P., Qian, H. & Li, G.P. Delayed Onset of Positive Feedback Activation of Rab5 by Rabex-5 and Rabaptin-5 in Endocytosis. *Plos One* **5** (2010).
161. Brombacher, E., Urwyler, S., Ragaz, C., Weber, S.S., Kami, K., Overduin, M. & Hilbi, H. 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).
162. Peranen, J., Auvinen, P., Virta, H., Wepf, R. & Simons, K. Rab8 promotes polarized membrane transport through reorganization of actin and microtubules in fibroblasts. *The Journal of cell biology* **135**, 153-167 (1996).
163. Peranen, J. & Furuholm, J. Expression, purification, and properties of Rab8 function in actin cortical skeleton organization and polarized transport. *Methods in Enzymology* **329**, 188-196 (2001).
164. Chen, S., Liang, M.C., Chia, J.N., Ngsee, J.K. & Ting, A.E. Rab8b and its interacting partner TRIP8b are involved in regulated secretion in AtT20 cells. *The Journal of biological chemistry* **276**, 13209-13216 (2001).
165. Nachury, M.V., Loktev, A.V., Zhang, Q., Westlake, C.J., Peranen, J., Merdes, A., Slusarski, D.C., Scheller, R.H., Bazan, J.F., Sheffield, V.C. & Jackson, P.K. A core complex of BBS proteins cooperates with the GTPase Rab8 to promote ciliary membrane biogenesis. *Cell* **129**, 1201-1213 (2007).
166. Westlake, C.J., Baye, L.M., Nachury, M.V., Wright, K.J., Ervin, K.E., Phu, L., Chalouni, C., Beck, J.S., Kirkpatrick, D.S., Slusarski, D.C., Sheffield, V.C., Scheller, R.H. & Jackson, P.K. Primary cilia membrane assembly is initiated by Rab11 and transport protein particle II (TRAPP II) complex-dependent trafficking of Rabin8 to the centrosome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108**, 2759-2764 (2011).
167. Yoshimura, S., Egerer, J., Fuchs, E., Haas, A.K. & Barr, F.A. Functional dissection of Rab GTPases involved in primary cilium formation. *The Journal of cell biology* **178**, 363-369 (2007).
168. Peranen, J. Rab8 GTPase as a regulator of cell shape. *Cytoskeleton (Hoboken)* **68**, 527-539 (2011).

169. 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).
170. Feng, S., Knodler, A., Ren, J., Zhang, J., Zhang, X., Hong, Y., Huang, S., Peranen, J. & Guo, W. A rab8 Guanine nucleotide exchange factor-effector interaction network regulates primary ciliogenesis. *The Journal of biological chemistry* **287**, 15602-15609 (2012).
171. Sato, Y., Fukai, S., Ishitani, R. & Nureki, O. Crystal structure of the Sec4p.Sec2p complex in the nucleotide exchanging intermediate state. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**, 8305-8310 (2007).
172. Tarafder, A.K., Wasmeier, C., Figueiredo, A.C., Booth, A.E., Orihara, A., Ramalho, J.S., Hume, A.N. & Seabra, M.C. Rab27a targeting to melanosomes requires nucleotide exchange but not effector binding. *Traffic* **12**, 1056-1066 (2011).
173. Bahadoran, P., Aberdam, E., Mantoux, F., Busca, R., Bille, K., Yalman, N., de Saint-Basile, G., Casaroli-Marano, R., Ortonne, J.P. & Ballotti, R. Rab27a: A key to melanosome transport in human melanocytes. *The Journal of cell biology* **152**, 843-849 (2001).
174. Hume, A.N., Collinson, L.M., Rapak, A., Gomes, A.Q., Hopkins, C.R. & Seabra, M.C. Rab27a regulates the peripheral distribution of melanosomes in melanocytes. *The Journal of cell biology* **152**, 795-808 (2001).
175. Wilson, S.M., Yip, R., Swing, D.A., O'Sullivan, T.N., Zhang, Y., Novak, E.K., Swank, R.T., Russell, L.B., Copeland, N.G. & Jenkins, N.A. A mutation in Rab27a causes the vesicle transport defects observed in ashen mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**, 7933-7938 (2000).
176. Stinchcombe, J.C., Barral, D.C., Mules, E.H., Booth, S., Hume, A.N., Machesky, L.M., Seabra, M.C. & Griffiths, G.M. Rab27a is required for regulated secretion in cytotoxic T lymphocytes. *The Journal of cell biology* **152**, 825-834 (2001).
177. Yi, Z., Yokota, H., Torii, S., Aoki, T., Hosaka, M., Zhao, S., Takata, K., Takeuchi, T. & Izumi, T. The Rab27a/granuphilin complex regulates the exocytosis of insulin-containing dense-core granules. *Molecular and cellular biology* **22**, 1858-1867 (2002).
178. Fukuda, M. Versatile role of Rab27 in membrane trafficking: Focus on the Rab27 effector families. *Journal of Biochemistry* **137**, 9-16 (2005).
179. Seabra, M.C. & Coudrier, E. Rab GTPases and myosin motors in organelle motility. *Traffic* **5**, 393-399 (2004).
180. Wada, M., Nakanishi, H., Satoh, A., Hirano, H., Obaishi, H., Matsuura, Y. & Takai, Y. Isolation and characterization of a GDP/GTP exchange protein specific for the Rab3 subfamily Small G proteins. *The Journal of biological chemistry* **272**, 3875-3878 (1997).
181. Figueiredo, A.C., Wasmeier, C., Tarafder, A.K., Ramalho, J.S., Baron, R.A. & Seabra, M.C. Rab3GEP is the non-redundant guanine nucleotide exchange factor for Rab27a in melanocytes. *The Journal of biological chemistry* **283**, 23209-23216 (2008).

182. Kalinin, A., Thoma, N.H., Iakovenko, A., Heinemann, I., Rostkova, E., Constantinescu, A.T. & Alexandrov, K. Expression of mammalian geranylgeranyltransferase type-II in *Escherichia coli* and its application for in vitro prenylation of Rab proteins. *Protein Expression and Purification* **22**, 84-91 (2001).
183. Gluzman, Y. SV40-transformed simian cells support the replication of early SV40 mutants. *Cell* **23**, 175-182 (1981).
184. Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A.R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **74**, 5463-5467 (1977).
185. Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685 (1970).
186. Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry* **72**, 248-254 (1976).
187. Banaszynski, L.A., Liu, C.W. & Wandless, T.J. Characterization of the FKBP.rapamycin.FRB ternary complex. *Journal of the American Chemical Society* **127**, 4715-4721 (2005).
188. Choi, J., Chen, J., Schreiber, S.L. & Clardy, J. Structure of the FKBP12-rapamycin complex interacting with the binding domain of human FRAP. *Science* **273**, 239-242 (1996).
189. Liang, J., Choi, J. & Clardy, J. Refined structure of the FKBP12-rapamycin-FRB ternary complex at 2.2 angstrom resolution. *Acta Crystallographica Section D* **55**, 736-744 (1999).
190. Spencer, D.M., Wandless, T.J., Schreiber, S.L. & Crabtree, G.R. Controlling Signal-Transduction with Synthetic Ligands. *Science* **262**, 1019-1024 (1993).
191. Crabtree, G.R. & Schreiber, S.L. Three-part inventions: Intracellular signaling and induced proximity. *Trends in biochemical sciences* **21**, 418-422 (1996).
192. Castellano, F., Montcourrier, P., Guillemot, J.C., Gouin, E., Machesky, L., Cossart, P. & Chavrier, P. Inducible recruitment of Cdc42 or WASP to a cell-surface receptor triggers actin polymerization and filopodium formation. *Current Biology* **9**, 351-360 (1999).
193. Pistor, S., Chakraborty, T., Niebuhr, K., Domann, E. & Wehland, J. The Acta Protein of *Listeria-Monocytogenes* Acts as a Nucleator Inducing Reorganization of the Actin Cytoskeleton. *The EMBO journal* **13**, 758-763 (1994).
194. Pistor, S., Chakraborty, T., Walter, U. & Wehland, J. The bacterial actin nucleator protein ActA of *Listeria monocytogenes* contains multiple binding sites for host microfilament proteins. *Current biology : CB* **5**, 517-525 (1995).
195. Costes, S.V., Daelemans, D., Cho, E.H., Dobbin, Z., Pavlakis, G. & Lockett, S. Automatic and quantitative measurement of protein-protein colocalization in live cells. *Biophysical Journal* **86**, 3993-4003 (2004).

196. Chavrier, P., Parton, R.G., Hauri, H.P., Simons, K. & Zerial, M. Localization of Low-Molecular-Weight Gtp Binding-Proteins to Exocytic and Endocytic Compartments. *Cell* **62**, 317-329 (1990).
197. Seibel, N.M., Eljouni, J., Nalaskowski, M.M. & Hampe, W. Nuclear localization of enhanced green fluorescent protein homomultimers. *Analytical biochemistry* **368**, 95-99 (2007).
198. Wu, Y.W., Tan, K.T., Waldmann, H., Goody, R.S. & Alexandrov, K. Interaction analysis of prenylated Rab GTPase with Rab escort protein and GDP dissociation inhibitor explains the need for both regulators. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**, 12294-12299 (2007).
199. Wu, S.K., Zeng, K., Wilson, I.A. & Balch, W.E. Structural insights into the function of the Rab GDI superfamily. *Trends in biochemical sciences* **21**, 472-476 (1996).
200. Pylypenko, O., Rak, A., Durek, T., Kushnir, S., Dursina, B.E., Thomae, N.H., Constantinescu, A.T., Brunsveld, L., Watzke, A., Waldmann, H., Goody, R.S. & Alexandrov, K. Structure of doubly prenylated Ypt1:GDI complex and the mechanism of GDI-mediated Rab recycling. *The EMBO journal* **25**, 13-23 (2006).
201. Goody, R.S. & Hofmann-Goody, W. Exchange factors, effectors, GAPs and motor proteins: common thermodynamic and kinetic principles for different functions. *European biophysics journal* **31**, 268-274 (2002).
202. Chin, H.F., Cai, Y.Y., Menon, S., Ferro-Novick, S., Reinisch, K.M. & De La Cruz, E.M. Kinetic Analysis of the Guanine Nucleotide Exchange Activity of TRAPP, a Multimeric Ypt1p Exchange Factor. *Journal of molecular biology* **389**, 275-288 (2009).
203. Zhu, H., Qian, H. & Li, G. Delayed onset of positive feedback activation of Rab5 by Rabex-5 and Rabaptin-5 in endocytosis. *PLoS one* **5**, e9226 (2010).
204. Kinchen, J.M. & Ravichandran, K.S. Identification of two evolutionarily conserved genes regulating processing of engulfed apoptotic cells. *Nature* **464**, 778-U157 (2010).
205. Sacher, M., Barrowman, J., Schieltz, D., Yates, J.R., 3rd & Ferro-Novick, S. Identification and characterization of five new subunits of TRAPP. *European Journal of Cell Biology* **79**, 71-80 (2000).
206. 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. *Developmental cell* **18**, 828-840 (2010).
207. Guo, W., Roth, D., Walch-Solimena, C. & Novick, P. The exocyst is an effector for Sec4p, targeting secretory vesicles to sites of exocytosis. *The EMBO journal* **18**, 1071-1080 (1999).
208. Poteryaev, D., Datta, S., Ackema, K., Zerial, M. & Spang, A. Identification of the switch in early-to-late endosome transition. *Cell* **141**, 497-508 (2010).
209. Christoforidis, S., Miaczynska, M., Ashman, K., Wilm, M., Zhao, L., Yip, S.C., Waterfield, M.D., Backer, J.M. & Zerial, M. Phosphatidylinositol-3-OH kinases are Rab5 effectors. *Nature cell biology* **1**, 249-252 (1999).

210. Gillooly, D.J., Morrow, I.C., Lindsay, M., Gould, R., Bryant, N.J., Gaullier, J.M., Parton, R.G. & Stenmark, H. Localization of phosphatidylinositol 3-phosphate in yeast and mammalian cells. *The EMBO journal* **19**, 4577-4588 (2000).
211. Siddhanta, U., McIlroy, J., Shah, A., Zhang, Y. & Backer, J.M. Distinct roles for the p110alpha and hVPS34 phosphatidylinositol 3'-kinases in vesicular trafficking, regulation of the actin cytoskeleton, and mitogenesis. *The Journal of cell biology* **143**, 1647-1659 (1998).
212. Seals, D.F., Eitzen, G., Margolis, N., Wickner, W.T. & Price, A. A Ypt/Rab effector complex containing the Sec1 homolog Vps33p is required for homotypic vacuole fusion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**, 9402-9407 (2000).
213. Cabrera, M., Ostrowicz, C.W., Mari, M., LaGrassa, T.J., Reggiori, F. & Ungermann, C. Vps41 Phosphorylation and the Rab Ypt7 Control the Targeting of the HOPS Complex to Endosome-Vacuole Fusion Sites. *Molecular biology of the cell* **20**, 1937-1948 (2009).
214. 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).
215. Cabrera, M. & Ungermann, C. Guiding Endosomal Maturation. *Cell* **141**, 404-406 (2010).
216. Fukuda, M., Kanno, E., Ishibashi, K. & Itoh, T. Large scale screening for novel rab effectors reveals unexpected broad Rab binding specificity. *Molecular & cellular proteomics* **7**, 1031-1042 (2008).
217. Hyvola, N., Diao, A., McKenzie, E., Skippen, A., Cockcroft, S. & Lowe, M. Membrane targeting and activation of the Lowe syndrome protein OCRL1 by rab GTPases. *The EMBO journal* **25**, 3750-3761 (2006).
218. Lowe, M. Structure and function of the Lowe syndrome protein OCRL1. *Traffic* **6**, 711-719 (2005).
219. Di Paolo, G. & De Camilli, P. Phosphoinositides in cell regulation and membrane dynamics. *Nature* **443**, 651-657 (2006).
220. Allaire, P.D., Ritter, B., Thomas, S., Burman, J.L., Denisov, A.Y., Legendre-Guillemain, V., Harper, S.Q., Davidson, B.L., Gehring, K. & McPherson, P.S. Connecdenn, a novel DENN domain-containing protein of neuronal clathrin-coated vesicles functioning in synaptic vesicle endocytosis. *Journal of Neuroscience* **26**, 13202-13212 (2006).
221. Goody, P.R., Heller, K., Oesterlin, L.K., Muller, M.P., Itzen, A. & Goody, R.S. Reversible phosphocholination of Rab proteins by Legionella pneumophila effector proteins. *The EMBO journal* **31**, 1774-1784 (2012).
222. Muller, M.P., Peters, H., Blumer, J., Blankenfeldt, W., Goody, R.S. & Itzen, A. The Legionella Effector Protein DrrA AMPylates the Membrane Traffic Regulator Rab1b. *Science* **329**, 946-949 (2010).

223. Oesterlin, L.K., Goody, R.S. & Itzen, A. Posttranslational modifications of Rab proteins cause effective displacement of GDP dissociation inhibitor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **109**, 5621-5626 (2012).
224. Tnimov, Z., Guo, Z., Gambin, Y., Nguyen, U.T., Wu, Y.W., Abankwa, D., Stigter, A., Collins, B.M., Waldmann, H., Goody, R.S. & Alexandrov, K. Quantitative Analysis of Prenylated RhoA Interaction with Its Chaperone, RhoGDI. *The Journal of biological chemistry* **287**, 26549-26562 (2012).
225. Ugolev, Y., Berdichevsky, Y., Weinbaum, C. & Pick, E. Dissociation of Rac1(GDP)center dot RhoGDI complexes by the cooperative action of anionic liposomes containing phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate, rac guanine nucleotide exchange factor, and GTP. *Journal of Biological Chemistry* **283**, 22257-22271 (2008).

9. Anhang

9.1. Abbildungen

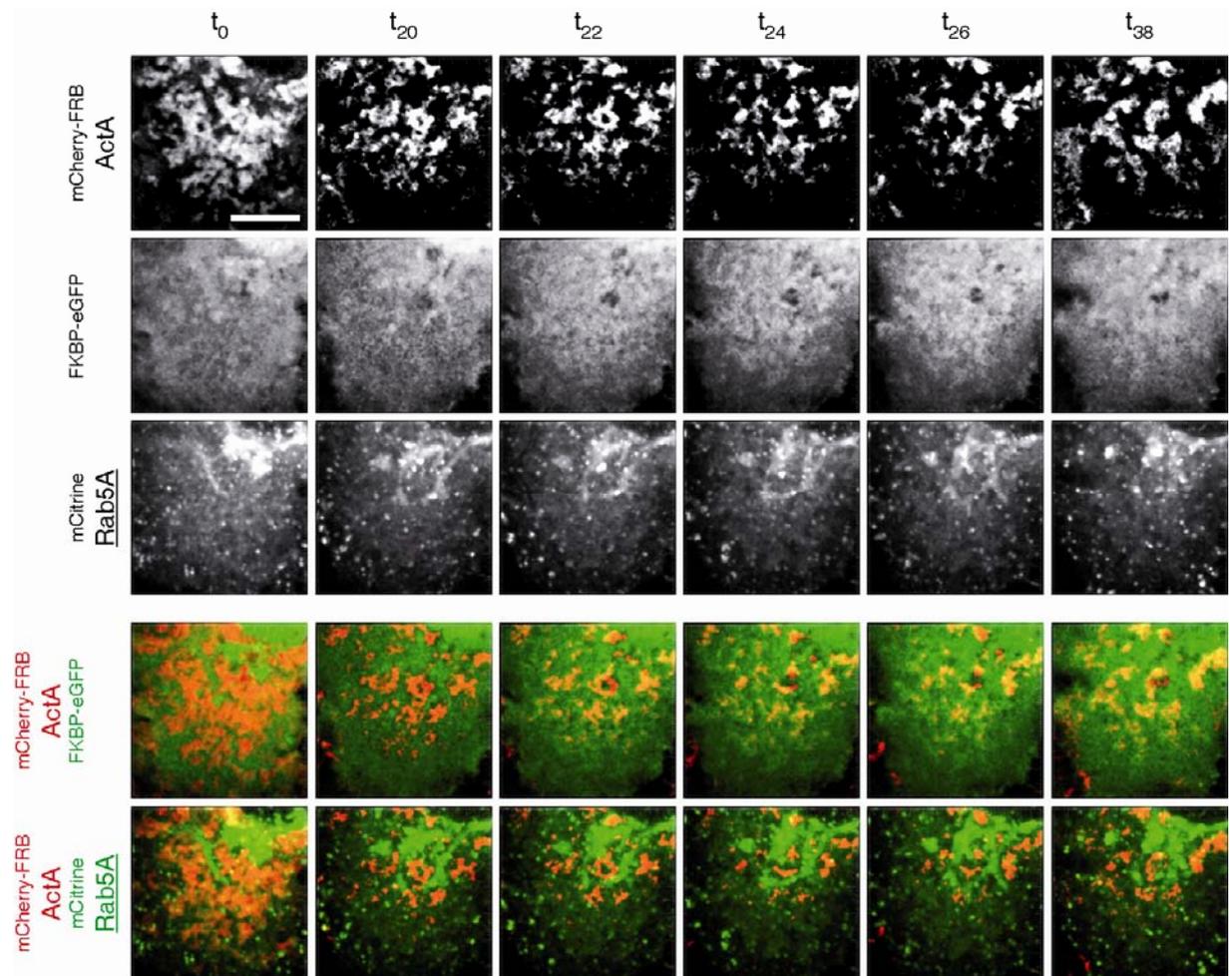


Abbildung 42: Detailansicht der Lokalisation von $mCitrine$ Rab5A nach induzierter Fehllokalisierung des Kontrollproteins FKBP-eGFP zu den Mitochondrien.

Die konfokalen Bilder zeigen einen vergrößerten Ausschnitt der in Abbildung 16A dargestellten Zelle zu definierten Zeitpunkten. In den überlagerten Bildern wird deutlich, dass nach mitochondrialer Fehllokalisierung von FKBP-eGFP $mCitrine$ Rab5A die überwiegend endosomale Lokalisation beibehält. Maßstab: 10 μ m.

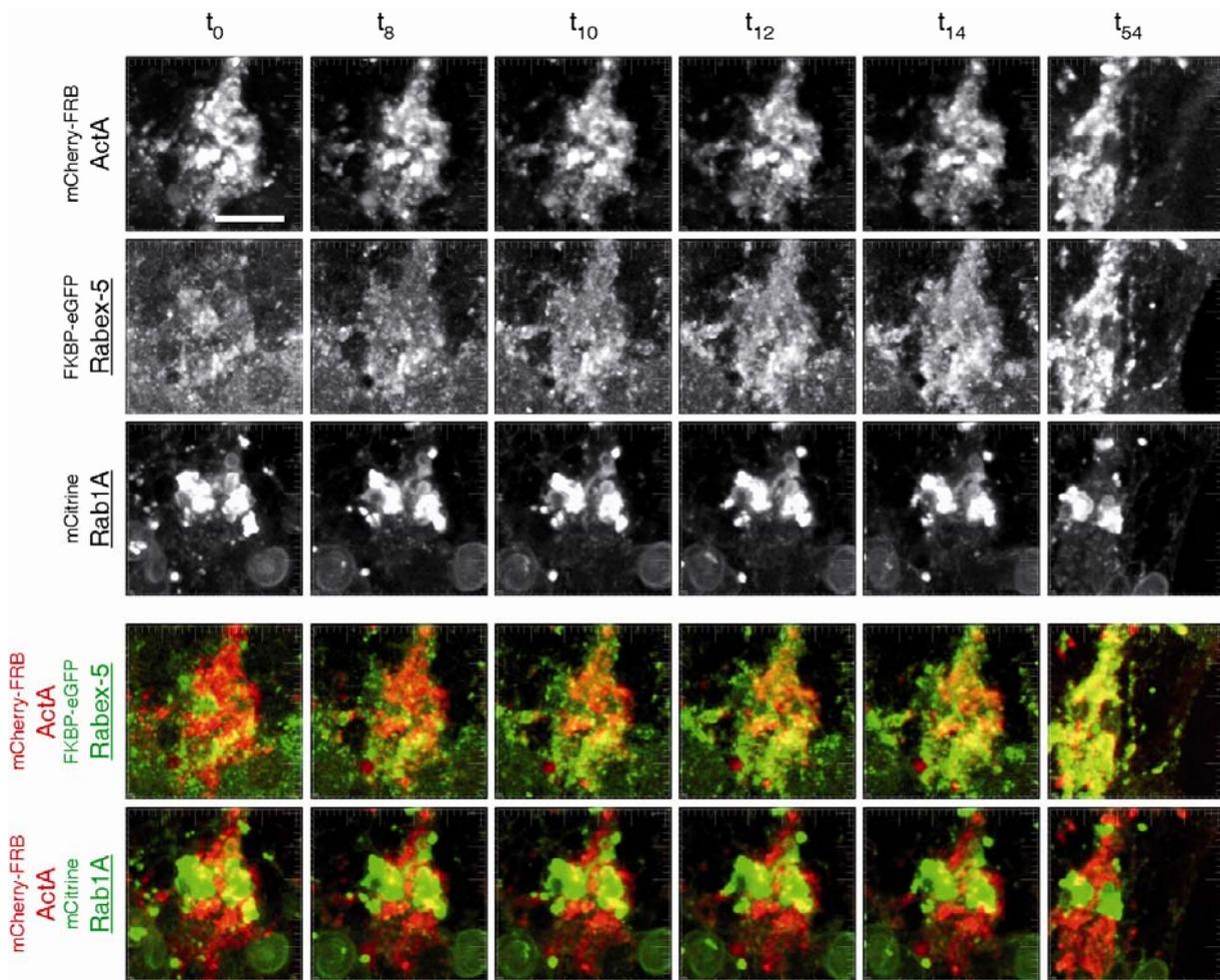


Abbildung 43: Detailansicht der Lokalisation von $mCitrine$ Rab1A nach induzierter Fehllokalisierung von $FKBP-eGFP$ Rabex-5.

Die konfokalen Aufnahmen zeigen einen vergrößerten Ausschnitt der in Abbildung 17A dargestellten Zelle während des Übergangs der Umverteilung der genannten Fusionsproteine nach Zugabe des A/C Heterodimerizers. $mCitrine$ Rab1A ist kein Substrat von fehllokalisiertem $FKBP-eGFP$ Rabex-5 und lokalisiert daher während der gesamten Zeit der Detektion am Golgi-Apparat. Maßstab: 10 μ m.

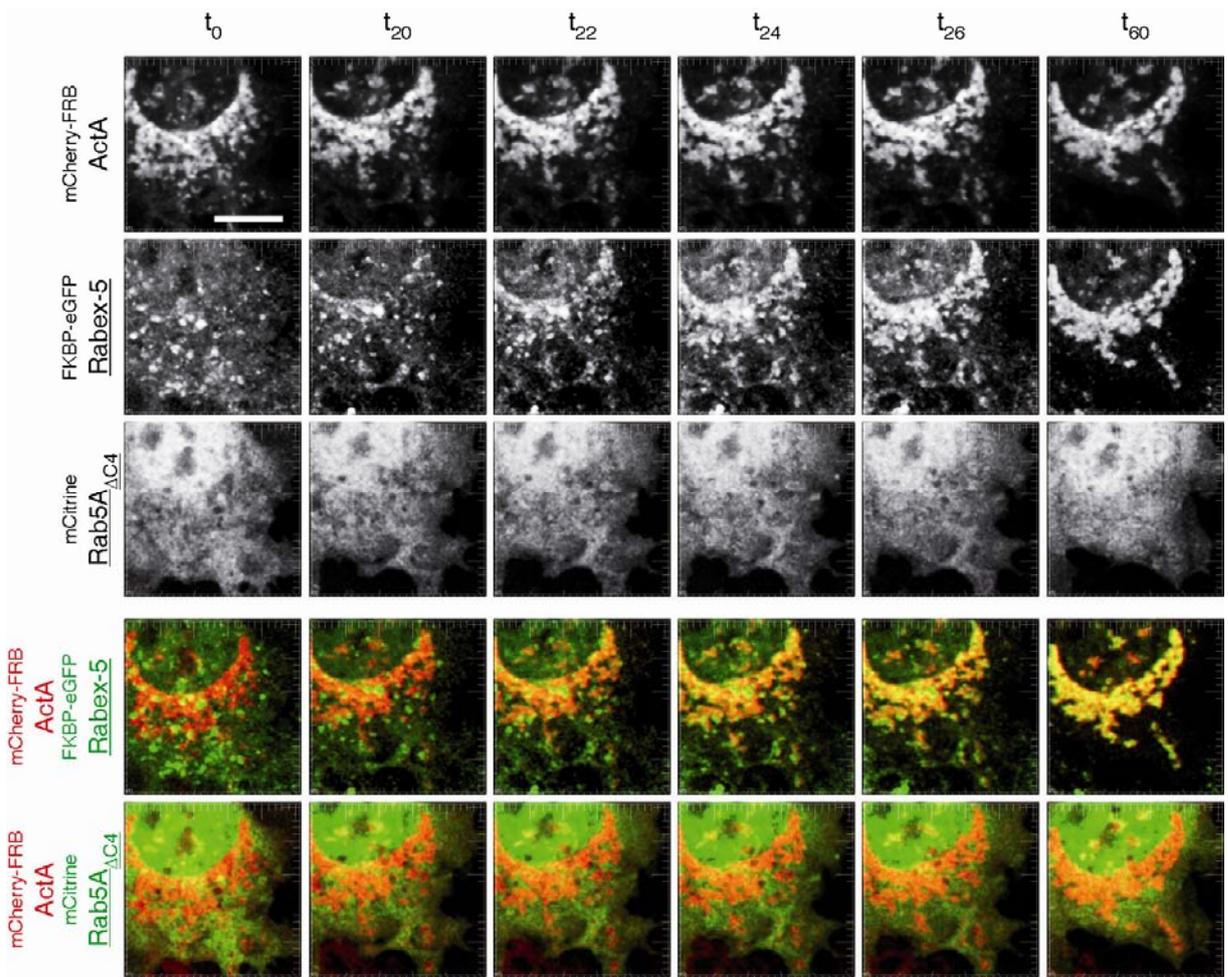


Abbildung 44: Detailansicht der Lokalisation von $m^{Citrine}Rab5\Delta_{C4}$ nach A/C Heterodimerisierung induzierter Fehllokalisierung von $^{FKBP-eGFP}Rabex-5$ zu den Mitochondrien.

Konfokale Aufnahmen eines vergrößerten Ausschnitts der in Abbildung 18A dargestellten Zelle verdeutlichen die zytoplasmatische Verteilung von $m^{Citrine}Rab5\Delta_{C4}$ während der mitochondrialen Fehllokalisierung von $^{FKBP-eGFP}Rabex-5$, da die prenylierungsdefiziente Rab5A-Mutante nicht mit Endomembranen interagieren kann. Maßstab: 10 μm .

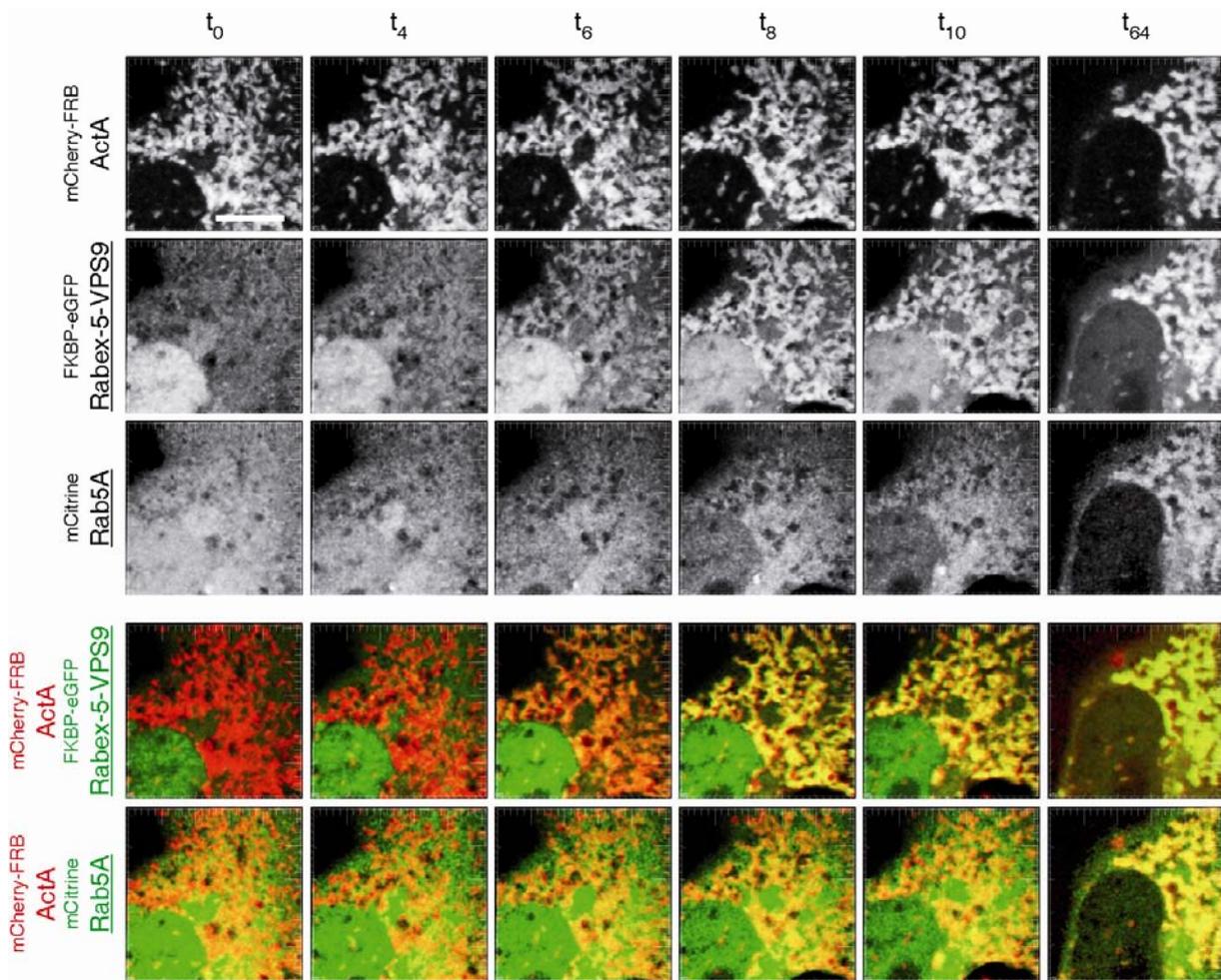


Abbildung 45: Übergang der zeitabhängigen Rekrutierung von $mCitrine$ Rab5A durch $FKBP-eGFP$ Rabex-5-VPS9.

Die konfokalen Bilder zeigen einen vergrößerten Ausschnitt der in Abbildung 19A dargestellten Zelle während des Übergangs der Umverteilung der genannten Fusionsproteine nach Zugabe des A/C Heterodimerizers. Die überlagerten Bilder verdeutlichen die simultane Rekrutierung der GEF-Domäne von Rabex-5 ($FKBP-eGFP$ Rabex-5-VPS9) und $mCitrine$ Rab5A zu den Mitochondrien anhand der sich bildenden gelben Strukturen. Maßstab: 10 μm .

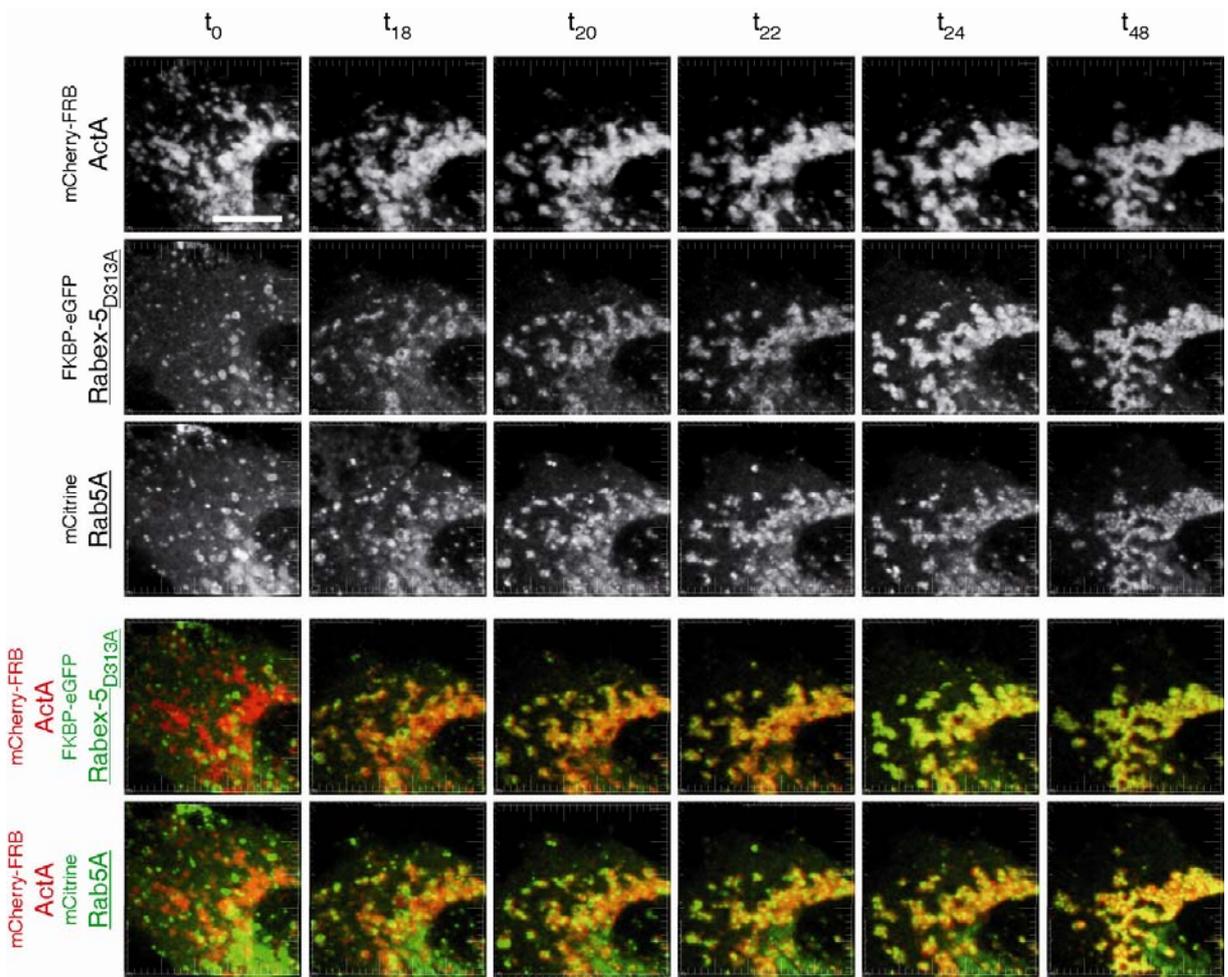


Abbildung 46: Übergang der zeitabhängigen $^{FKBP-eGFP}$ Rabex-5 $_{D313A}$ -vermittelten Rekrutierung von mCitrine Rab5A zu den Mitochondrien.

Konfokale Aufnahmen eines vergrößerten Ausschnitts der in Abbildung 26A dargestellten Zelle zu definierten Zeitpunkten zeigen die Rekrutierung von mCitrine Rab5A durch die fehllokalierte Einzelmutante $^{FKBP-eGFP}$ Rabex-5 $_{D313A}$. In den überlagerten Bildern wird die simultane Rekrutierung von $^{FKBP-eGFP}$ Rabex-5 $_{D313A}$ und mCitrine Rab5A zu den Mitochondrien anhand der sich bildenden gelben Strukturen hervorgehoben. Maßstab: 10 μ m.

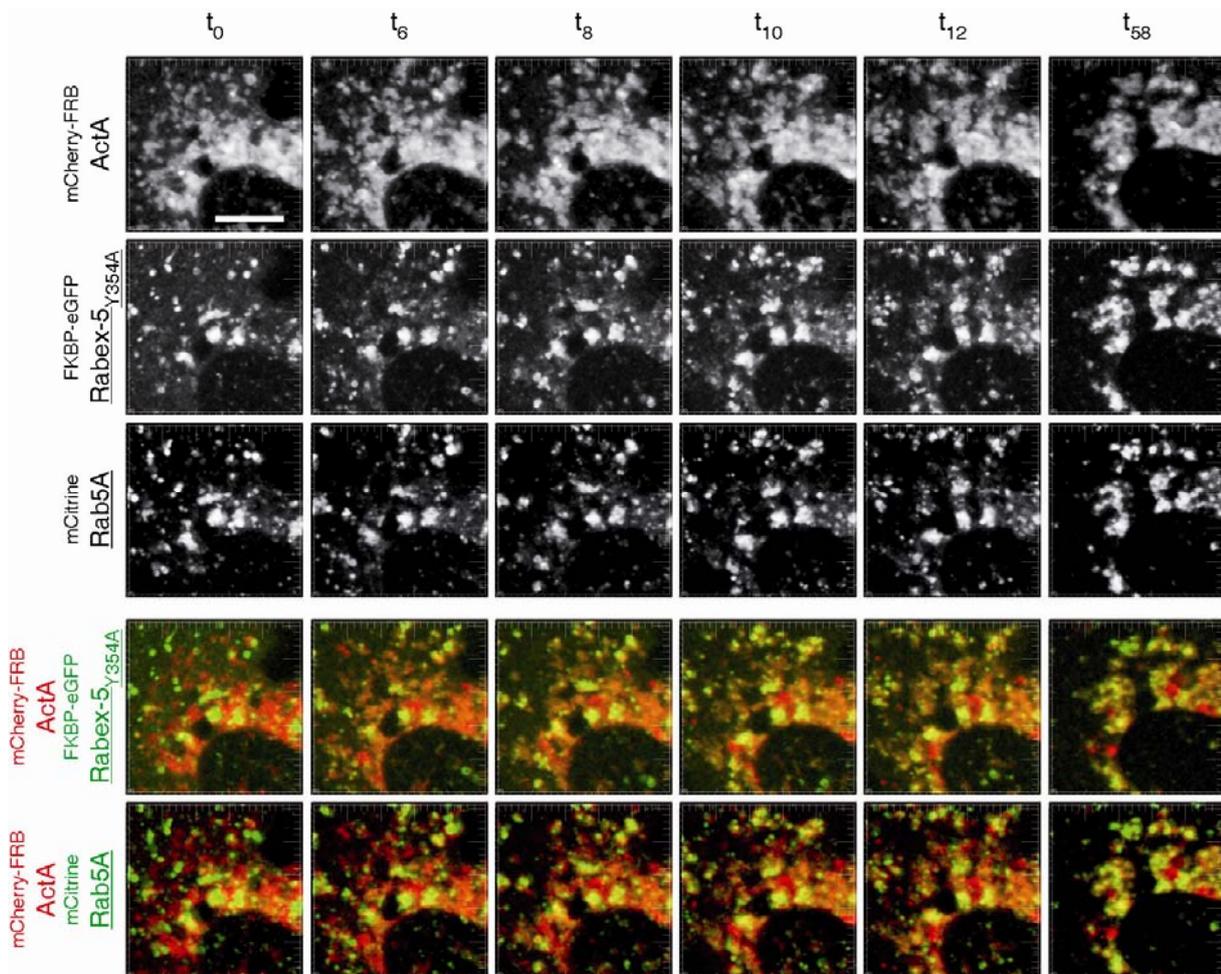


Abbildung 47: Detailansicht der zeitabhängigen Rekrutierung von $mCitrine$ Rab5A zu den Mitochondrien vermittelt durch fehllokalisiertes $FKBP-eGFP$ Rabex-5 $_{Y354A}$.

Die konfokalen Aufnahmen zeigen einen vergrößerten Ausschnitt der in Abbildung 26C dargestellten Zelle während des Übergangs der Umverteilung der genannten Fusionsproteine nach Zugabe des A/C Heterodimerizers. $mCitrine$ Rab5A wird durch fehllokalisiertes $FKBP-eGFP$ Rabex-5 $_{Y354A}$ zu den Mitochondrien rekrutiert. Dies wird durch die sich bildenden gelben Strukturen in den überlagerten Bildern deutlich. Maßstab: 10 μm .

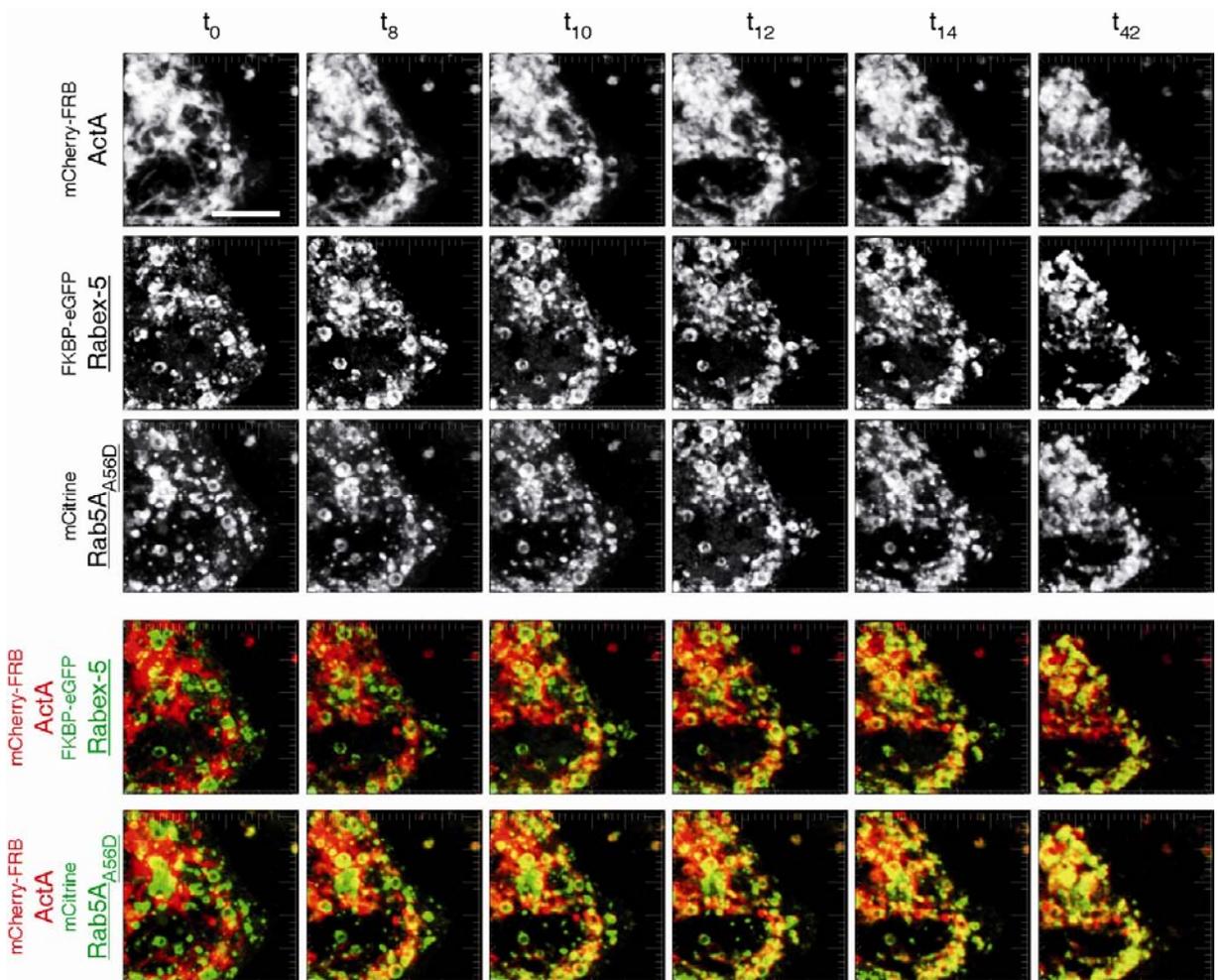


Abbildung 48: Übergang der ^{FKBP-eGFP}Rabex-5 vermittelten Rekrutierung von ^{mCitrine}Rab5A_{A56D} zu den Mitochondrien.

Konfokale Bilder eines vergrößerten Ausschnitts der in Abbildung 34A dargestellten Zelle zeigen die Umverteilung der genannten Fusionsproteine nach Zugabe des A/C Heterodimerizers. Die überlagerten Bilder verdeutlichen die durch ^{FKBP-eGFP}Rabex-5-vermittelte Rekrutierung der Mutante ^{mCitrine}Rab5A_{A56D} zu den Mitochondrien anhand der sich bildenden gelben Strukturen. Maßstab: 10 µm.

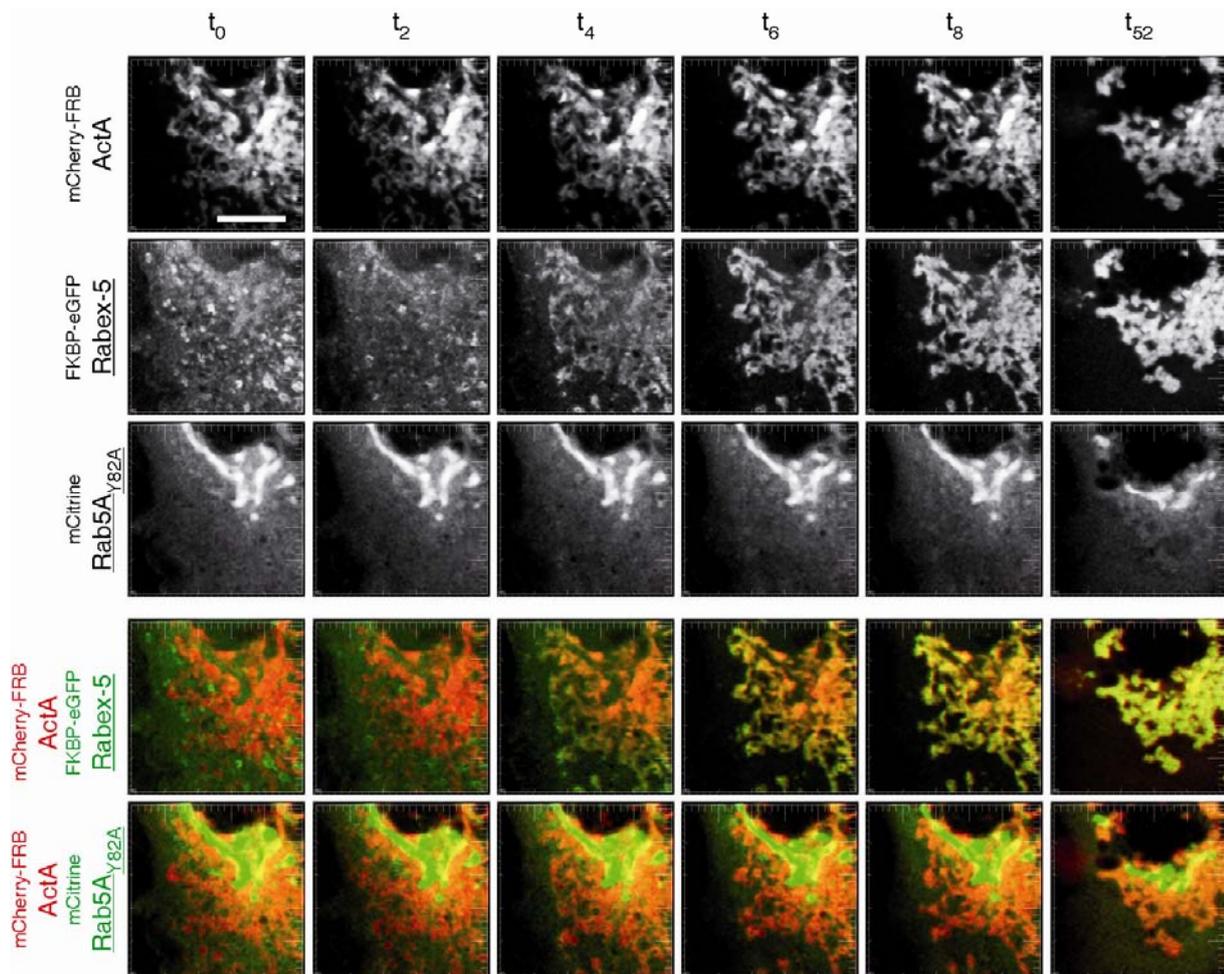


Abbildung 49: Detailansicht der Lokalisation der Mutante $mCitrine$ Rab5A_{Y82A} nach induzierter Fehllokalisation von $FKBP-eGFP$ Rabex-5 zu den Mitochondrien.

Die konfokalen Aufnahmen eines vergrößerten Ausschnitts der in Abbildung 35A dargestellten Zelle zeigen den Übergang der induzierten, mitochondrialen Rekrutierung von $FKBP-eGFP$ Rabex-5 und verdeutlichen in den überlagerten Bildern anhand der diskreten roten und grünen Strukturen, dass die Mutante $mCitrine$ Rab5A_{Y82A} die initiale Lokalisation am Golgi-Apparat beibehält und nicht zu den Mitochondrien rekrutiert wird. Maßstab: 10 μ m.

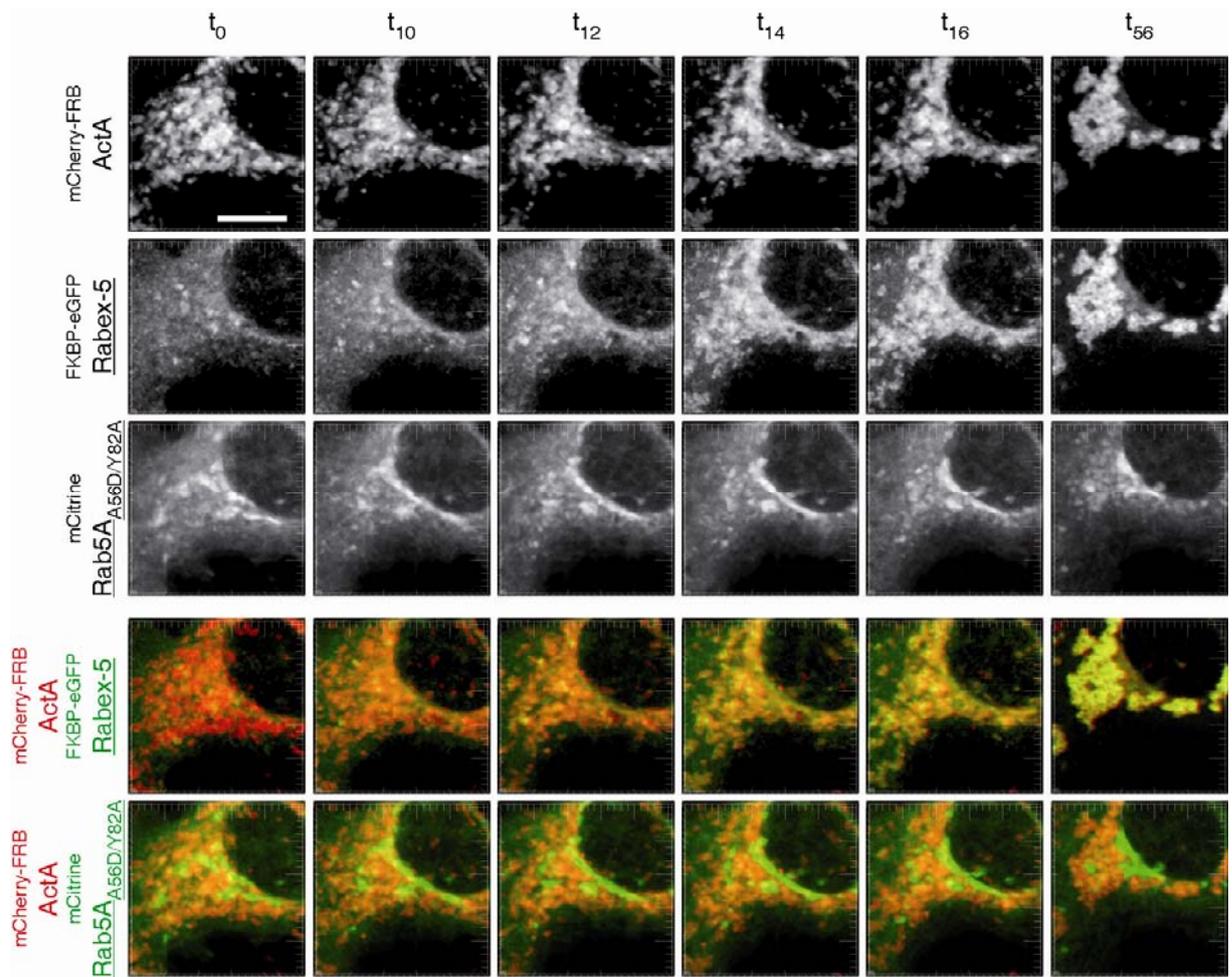


Abbildung 50: Detailansicht der Lokalisation von ^{mCitrine}Rab5A_{A56D/Y82A} während des Übergangs der Fehllokalisierung von ^{FKBP-eGFP}Rabex-5.

Die konfokalen Bilder zeigen einen vergrößerten Ausschnitt der in Abbildung 35C dargestellten Zelle während des Übergangs der Umverteilung der genannten Fusionsproteine nach Zugabe des A/C Heterodimerizers. Die Mutante ^{mCitrine}Rab5A_{A56D/Y82A} bewahrt die initiale Lokalisation an Membranen des Golgi-Apparats nach induzierter Fehllokalisierung von ^{FKBP-eGFP}Rabex-5 zu den Mitochondrien. Dies wird durch die diskreten roten mitochondrialen und grünen Strukturen des Golgi-Apparats in den überlagerten Bildern zwischen ^{mCherry-FRB}ActA und ^{mCitrine}Rab5A_{A56D/Y82A} hervorgehoben. Maßstab: 10 µm.

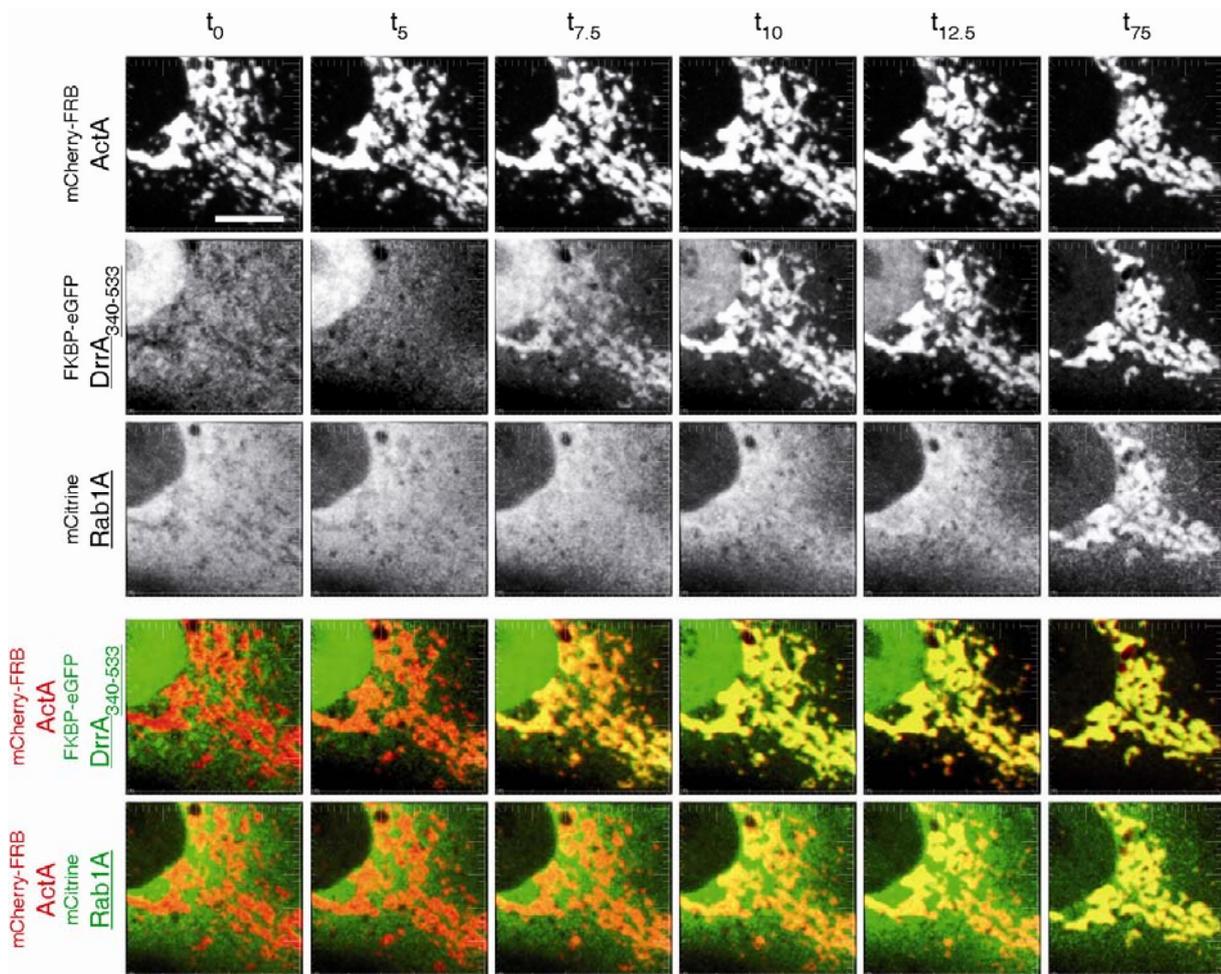


Abbildung 51: Übergang der $^{FKBP-eGFP}$ DrrA₃₄₀₋₅₃₃-vermittelten Rekrutierung von mCitrine Rab1A zu den Mitochondrien.

Die konfokalen Aufnahmen zeigen einen vergrößerten Ausschnitt der in Abbildung 38A dargestellten Zelle während des Übergangs der Rekrutierung von $^{FKBP-eGFP}$ DrrA₃₄₀₋₅₃₃ und mCitrine Rab1A zu den Mitochondrien. Die induzierte Fehllokalisierung der GEF-Domänen von DrrA (DrrA₃₄₀₋₅₃₃) vermittelt die simultane Rekrutierung von mCitrine Rab1A, verdeutlicht durch die sich nahezu gleichzeitig bildenden gelben Strukturen in den überlagerten Bildern. Maßstab: 10 μ m.

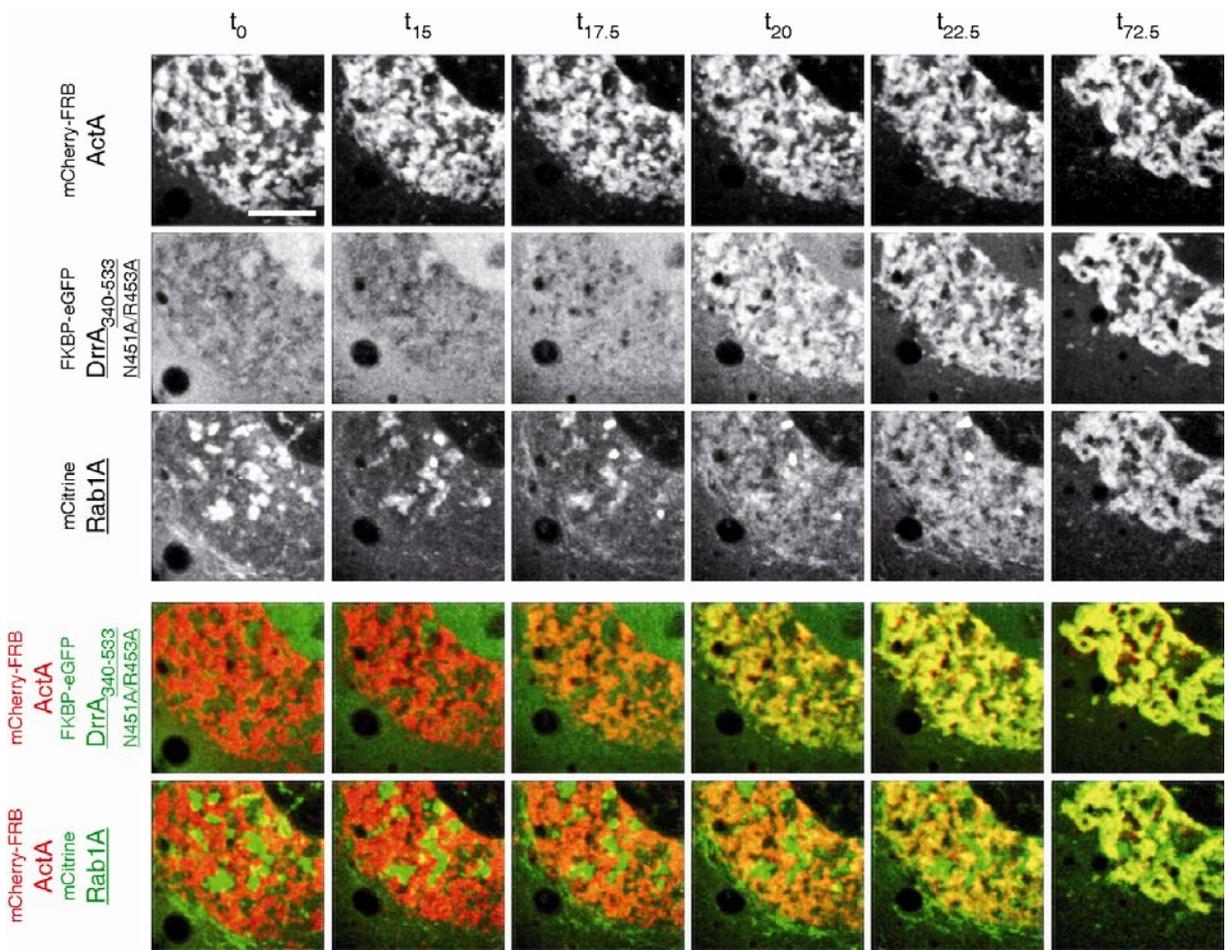


Abbildung 52: Übergang der Rekrutierung von $mCitrine$ Rab1A zu den Mitochondrien durch die DrrA-Doppelmutante ($^{FKBP-eGFP}DrrA_{340-533}$ N451A/R453A).

Die konfokalen Bilder zeigen einen vergrößerten Ausschnitt der in Abbildung 39A dargestellten Zelle nach Induktion der mitochondrialen Fehllokalisierung von $^{FKBP-eGFP}DrrA_{340-533}$ N451A/R453A zu definierten Zeitpunkten. Trotz stark verminderter GEF-Aktivität induziert die Doppelmutante die mitochondriale Rekrutierung von $mCitrine$ Rab1A erkennbar an den sich bildenden gelben Strukturen in den überlagerten Bildern. Maßstab: 10 μ m.

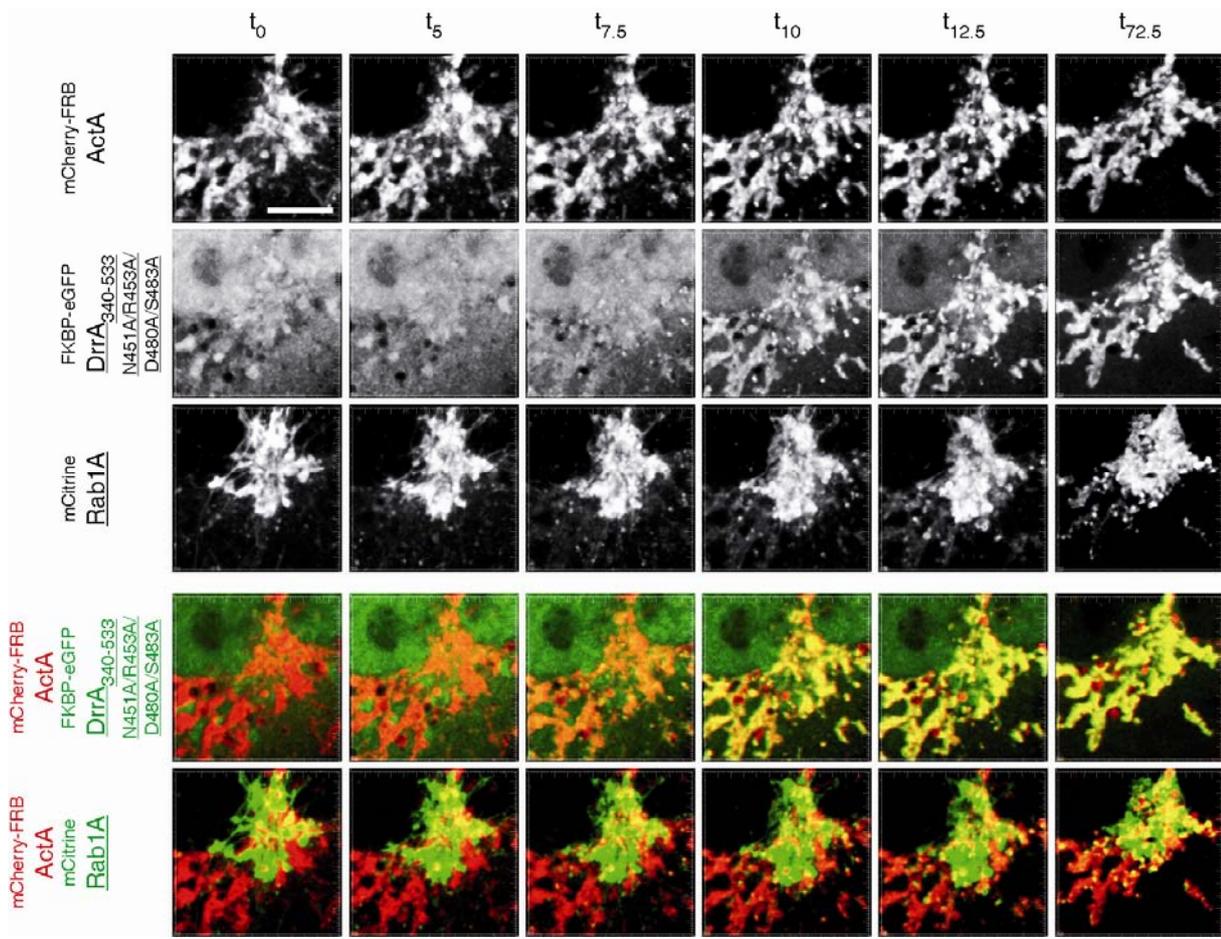


Abbildung 53: Detailansicht der Lokalisation von ^{mCitrine}Rab1A nach induzierter Fehllokalisierung von ^{FKBP-eGFP}DrrA₃₄₀₋₅₃₃ N451A/R453A/D480A/S483A zu den Mitochondrien.

Die konfokalen Aufnahmen eines vergrößerten Ausschnitts der in Abbildung 39C dargestellten Zelle zeigen den Übergang der induzierten, mitochondrialen Rekrutierung der DrrA₃₄₀₋₅₃₃-Vierfachmutante und verdeutlichen in den überlagerten Bildern anhand der diskreten roten und grünen Strukturen, dass ^{mCitrine}Rab1A die initiale Lokalisation am Golgi-Apparat beibehält und demnach nicht durch die DrrA₃₄₀₋₅₃₃-Vierfachmutante rekrutiert werden kann. Maßstab: 10 µm.

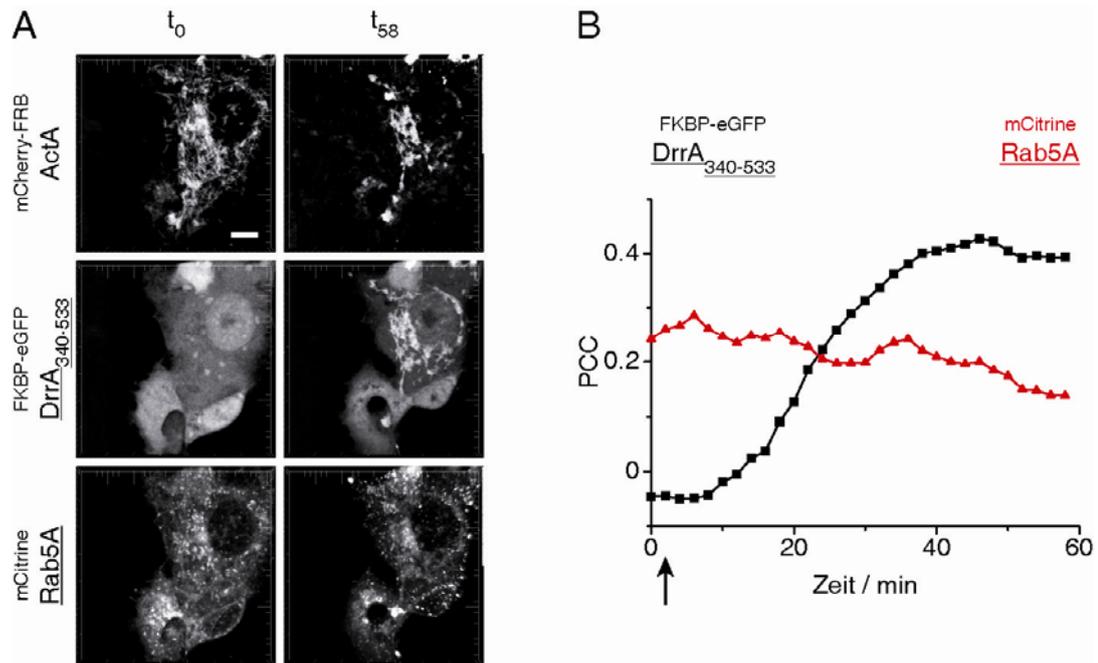


Abbildung 54: $\text{FKBP-eGFP DrrA}_{340-533}$ kann die Rekrutierung von mCitrine Rab5A nicht induzieren.

(A) Die konfokalen Bilder lebender COS-7 Zellen zeigen die subzelluläre Verteilung von mCherry-FRB ActA , $\text{FKBP-eGFP DrrA}_{340-533}$ und mCitrine Rab5A . Rab5A ist kein Substrat von $\text{DrrA}_{340-533}$. Daher bleibt die initiale Lokalisation des Rabs nach Zugabe von $1 \mu\text{M}$ A/C Heterodimerizer 24 h nach Transfektion weitestgehend erhalten, wohingegen $\text{FKBP-eGFP DrrA}_{340-533}$ zu den Mitochondrien fehllokalisiert wird. Maßstab $10 \mu\text{m}$. (B) Quantitative Analyse der Kolokalisation durch Berechnung des PCC zwischen mCherry-FRB ActA / $\text{FKBP-eGFP DrrA}_{340-533}$ (schwarze Linie) und mCherry-FRB ActA / mCitrine Rab5A (rote Linie). Der konstante, geringe PCC zwischen mCherry-FRB ActA und mCitrine Rab5A verdeutlicht, dass beide Fusionsproteine nicht kolokalisieren, d.h. dass $\text{DrrA}_{340-533}$ keine Rekrutierung von Rab5A zu den Mitochondrien vermittelt. Der Pfeil markiert die Zugabe des A/C Heterodimerizers.

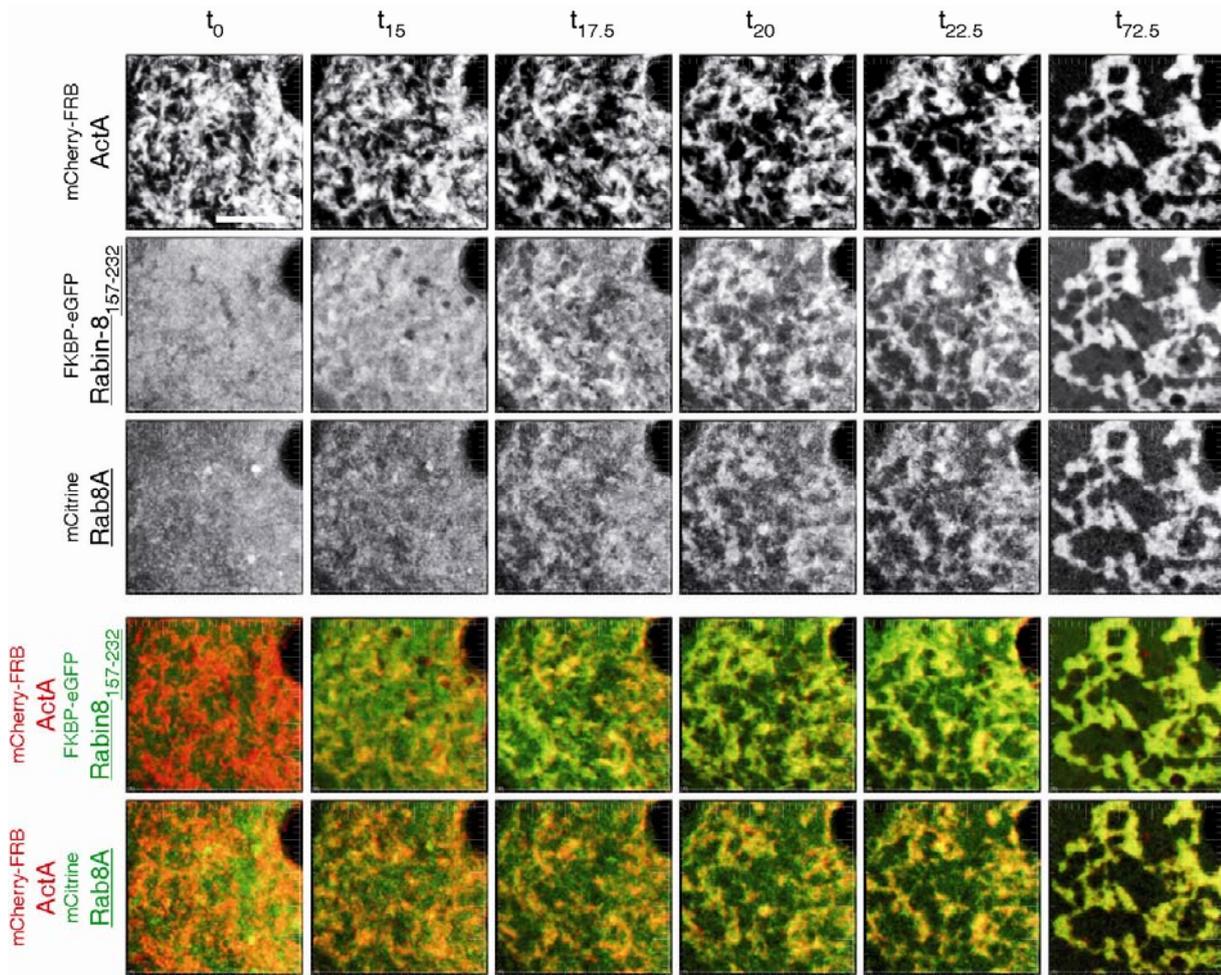


Abbildung 55: Übergang der zeitabhängigen Rekrutierung von $mCitrineRab8A$ durch $FKBP-eGFP Rabin8_{157-232}$.

Die konfokalen Aufnahmen zeigen einen vergrößerten Ausschnitt der in Abbildung 41A dargestellten Zelle während des Übergangs der Umverteilung der genannten Fusionsproteine nach Zugabe des A/C Heterodimerizers. In den überlagerten Bildern wird die simultane Rekrutierung der GEF-Domäne von Rabin8 ($FKBP-eGFP Rabin8_{157-232}$) und $mCitrineRab8A$ zu den Mitochondrien anhand der sich bildenden gelben Strukturen hervorgehoben. Maßstab: 10 μm .

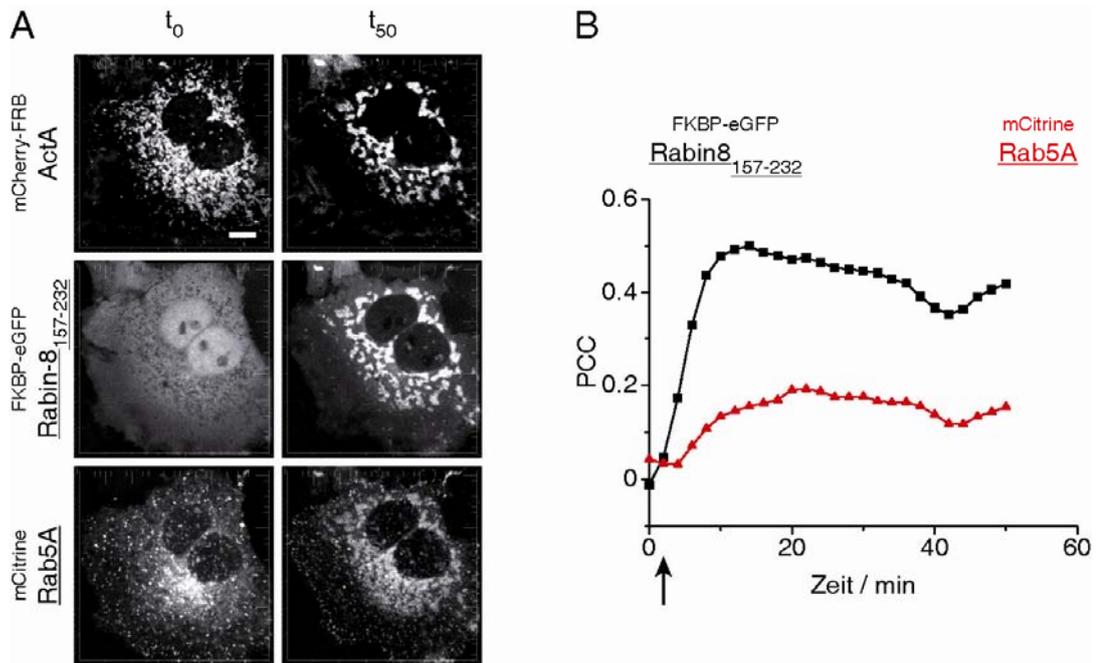


Abbildung 56: Die Lokalisation von ^{mCitrine}Rab5A wird durch ^{FKBP-eGFP}Rabin8₁₅₇₋₂₃₂ nicht beeinflusst.

Die konfokalen Aufnahmen zeigen neben mitochondrial lokalisiertem ^{mCherry-FRB}ActA sowie zytosolisch und nukleär lokalisiertem ^{FKBP-eGFP}Rabin8₁₅₇₋₂₃₂ die subzelluläre Lokalisation von ^{mCitrine}Rab5A überwiegend an Endosomen (t_0). Rab5A ist kein Substrat des GEFs Rabin8₁₅₇₋₂₃₂ und daher bleibt dessen initiale Lokalisation nach Zugabe von 1 μ M A/C Heterodimerizer 24 h nach Transfektion an den Endosomen erhalten, wohingegen die mitochondriale Fehllokalisierung von ^{FKBP-eGFP}Rabin8₁₅₇₋₂₃₂ induziert wurde. Maßstab 10 μ m. **(B)** Die Quantifizierung der Kolo-kalisation durch Berechnung des PCC zwischen ^{mCherry-FRB}ActA/^{FKBP-eGFP}Rabin8₁₅₇₋₂₃₂ (schwarze Linie) und ^{mCherry-FRB}ActA/^{mCitrine}Rab5A (rote Linie) verdeutlicht, dass die Rekrutierung von ^{mCitrine}Rab5A durch ^{FKBP-eGFP}Rabin8₁₅₇₋₂₃₂ nicht vermittelt wird. Der Pfeil markiert die Zugabe des A/C Heterodimerizers.

9.2. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Strukturmerkmale von RabGTPasen und konservierte Sequenzbereiche am Beispiel von Rab21.....	5
Abbildung 2:	Aminosäuresequenzvergleich ausgewählter RabGTPasen.....	7
Abbildung 3:	Schematische Darstellung des Rab-Zyklus und des vesikulären Transports.....	8
Abbildung 4:	Lokalisation und Funktion von RabGTPasen.....	11
Abbildung 5:	Struktur von Rabex-5 HB-VPS9 im Komplex mit nukleotidfreiem Rab21.....	20
Abbildung 6:	Nukleotidaustausch- und Spezifitäts-Determinanten von Rabex-5 und Rab21.....	21
Abbildung 7:	DrrA rekrutiert Rab1 zur Plasmamembran.....	23
Abbildung 8:	Kristallstruktur von DrrA ₃₄₀₋₅₃₃ im Komplex mit Rab1B ₃₋₁₇₄	24
Abbildung 9:	Nukleotidaustausch- und GDI-Freisetzungsaktivität von DrrA ₃₄₀₋₅₃₃ -Mutanten.....	25
Abbildung 10:	Schematische Domänenstruktur von Rabex-5.....	27
Abbildung 11:	Induzierte Heterodimerisierung und Fehllokalisierung eines Zielproteins zur Mitochondrienmembran.....	56
Abbildung 12:	Induzierte Fehllokalisierung von Rabex-5 zu den Mitochondrien.....	57
Abbildung 13:	Induzierte Fehllokalisierung von Rab5A zu den Mitochondrien.....	58
Abbildung 14:	Rekrutierung von Rab5A zu den Mitochondrien durch Rabex-5.....	59
Abbildung 15:	Übergang der zeitabhängigen Rekrutierung von Rab5A durch Rabex-5.....	61
Abbildung 16:	Das Kontrollprotein FKBP-eGFP induziert keine mitochondriale Lokalisation von Rab5A.....	62
Abbildung 17:	Die Lokalisation von Rab1A wird durch Rabex-5 nicht beeinflusst.....	63
Abbildung 18:	Die prenylierungsdefiziente Mutante Rab5A _{ΔC4} wird nicht von Rabex-5 rekrutiert.....	64
Abbildung 19:	Die GEF-Domäne von Rabex-5 rekrutiert Rab5A zu den Mitochondrien.....	66
Abbildung 20:	Die Rabex-5-vermittelte Rekrutierung der konstitutiv aktiven Mutante Rab5A _{Q79L} ist stark beeinträchtigt.....	67
Abbildung 21:	Detailansicht der Verteilung von Rab5A _{Q79L} nach induzierter Fehllokalisierung von Rabex-5 zu den Mitochondrien.....	68
Abbildung 22:	Quantitative Analyse der Kolo-kalisation der genannten Fusionsproteine mit mitochondrialem ^{mCherry-FRB} ActA in drei unabhängigen Zellen.....	69
Abbildung 23:	Statistische Analyse der Rabex-5-vermittelten Rekrutierung von verschiedenen Rab5A-Mutanten.....	70
Abbildung 24:	Nukleotidaustauschaktivität von Rabex-5-VPS9-Mutanten gegenüber Rab5A.....	71
Abbildung 25:	Subzelluläre Lokalisation von Rabex-5-Mutanten.....	73
Abbildung 26:	Die Mutanten Rabex-5 _{D313A} und Rabex-5 _{Y354A} lokalisieren Rab5A trotz verminderter Nukleotidaustauschaktivität.....	74
Abbildung 27:	Die Lokalisationsfähigkeit von Rabex-5 _{D313A/Y354A} gegenüber Rab5A ist beeinträchtigt.....	75
Abbildung 28:	Detailansicht der Umverteilung von Rab5A nach induzierter Fehllokalisierung von Rabex-5 _{D313A/Y354A} zu den Mitochondrien.....	76

Abbildung 29: Quantitative Analyse der Kolo­kalisierung der Rabex-5-Mutanten und Rab5A mit mitochondrialem ^{mCherry-FRB} ActA in drei unabhängigen Zellen.....	77
Abbildung 30: GDI-Freisetzungsaktivität verschiedener Rabex-5-VPS9-Mutanten.	79
Abbildung 31: Nukleotid­aus­tausch- und GDI-Freisetzungsaktivität gegenüber Rab5A sowie die Fähigkeit zur Lokalisation von Rab5A verschiedener Rabex-5-Mutanten.....	80
Abbildung 32: Nukleotid­aus­tauschaktivität von Rab5A-Mutanten.	81
Abbildung 33: Subzelluläre Lokalisation von Rab5A-Mutanten.	83
Abbildung 34: Rabex-5 lokalisiert Rab5A _{A56D} trotz reduzierter Nukleotid­aus­tausch-Suszeptibilität.	84
Abbildung 35: Die Lokalisation der Mutanten Rab5A _{Y82A} und Rab5A _{A56D/Y82A} kann nicht durch Rabex-5 vermittelt werden.	85
Abbildung 36: Quantitative Analyse der Kolo­kalisierung von Rabex-5 und den genannten Rab5A-Mutanten mit mitochondrialem ^{mCherry-FRB} ActA in drei unabhängigen Zellen.	87
Abbildung 37: Nukleotid­aus­tauschaktivität und Fähigkeit zur Lokalisation verschiedener Rab5A-Mutanten durch Rabex-5.	88
Abbildung 38: Die GEF-Domäne von DrrA (Aminosäuren 340-533) vermittelt die Lokalisation von Rab1A.	90
Abbildung 39: DrrA ₃₄₀₋₅₃₃ N451A/R453A lokalisiert Rab1A, wohingegen DrrA ₃₄₀₋₅₃₃ N451A/R453A/D480A/S483A den Translokationsprozess von Rab1A nicht induzieren kann.	91
Abbildung 40: Rekrutierungsfähigkeit verschiedener DrrA ₃₄₀₋₅₃₃ -Mutanten gegenüber Rab1A.....	93
Abbildung 41: Die GEF-Domäne von Rabin8 (Aminosäuren 157-232) vermittelt die Lokalisation von Rab8A.	94
Abbildung 42: Detailansicht der Lokalisation von ^{mCitrine} Rab5A nach induzierter Fehllokalisierung des Kontrollproteins FKBP-eGFP zu den Mitochondrien.	133
Abbildung 43: Detailansicht der Lokalisation von ^{mCitrine} Rab1A nach induzierter Fehllokalisierung von ^{FKBP-eGFP} Rabex-5.....	134
Abbildung 44: Detailansicht der Lokalisation von ^{mCitrine} Rab5A _{ΔC4} nach A/C Heterodimerisierung induzierter Fehllokalisierung von ^{FKBP-eGFP} Rabex-5 zu den Mitochondrien.	135
Abbildung 45: Übergang der zeitabhängigen Rekrutierung von ^{mCitrine} Rab5A durch ^{FKBP-eGFP} Rabex-5-VPS9.	136
Abbildung 46: Übergang der zeitabhängigen ^{FKBP-eGFP} Rabex-5 _{D313A} -vermittelten Rekrutierung von ^{mCitrine} Rab5A zu den Mitochondrien.....	137
Abbildung 47: Detailansicht der zeitabhängigen Rekrutierung von ^{mCitrine} Rab5A zu den Mitochondrien vermittelt durch fehllokalisiertes ^{FKBP-eGFP} Rabex-5 _{Y354A}	138
Abbildung 48: Übergang der ^{FKBP-eGFP} Rabex-5 vermittelten Rekrutierung von ^{mCitrine} Rab5A _{A56D} zu den Mitochondrien.	139
Abbildung 49: Detailansicht der Lokalisation der Mutante ^{mCitrine} Rab5A _{Y82A} nach induzierter Fehllokalisierung von ^{FKBP-eGFP} Rabex-5 zu den Mitochondrien.	140
Abbildung 50: Detailansicht der Lokalisation von ^{mCitrine} Rab5A _{A56D/Y82A} während des Übergangs der Fehllokalisierung von ^{FKBP-eGFP} Rabex-5.	141

Abbildung 51: Übergang der ^{FKBP-eGFP} DrrA ₃₄₀₋₅₃₃ -vermittelten Rekrutierung von ^{mCitrine} Rab1A zu den Mitochondrien.	142
Abbildung 52: Übergang der Rekrutierung von ^{mCitrine} Rab1A zu den Mitochondrien durch die DrrA-Doppelmutante (^{FKBP-eGFP} DrrA ₃₄₀₋₅₃₃ N451A/R453A).....	143
Abbildung 53: Detailansicht der Lokalisation von ^{mCitrine} Rab1A nach induzierter Fehllokalisierung von ^{FKBP-eGFP} DrrA ₃₄₀₋₅₃₃ N451A/R453A/D480A/S483A zu den Mitochondrien.	144
Abbildung 54: ^{FKBP-eGFP} DrrA ₃₄₀₋₅₃₃ kann die Rekrutierung von ^{mCitrine} Rab5A nicht induzieren.	145
Abbildung 55: Übergang der zeitabhängigen Rekrutierung von ^{mCitrine} Rab8A durch ^{FKBP-eGFP} Rabin8 ₁₅₇₋₂₃₂	146
Abbildung 56: Die Lokalisation von ^{mCitrine} Rab5A wird durch ^{FKBP-eGFP} Rabin8 ₁₅₇₋₂₃₂ nicht beeinflusst.	147

9.3. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	GEFs ohne charakteristisches Sequenzmotiv	16
Tabelle 2:	DENN-Domäne enthaltende GEFs.....	17
Tabelle 3:	humane VPS9-Domäne enthaltende GEFs.....	18
Tabelle 4:	Chemikalien	33
Tabelle 5:	sonstige Materialien	34
Tabelle 6:	Molekularbiologische Kits	34
Tabelle 7:	Proteine und Größenstandards	34
Tabelle 8:	Geräte	35
Tabelle 9:	Chromatographiesäulen und –materialen	36
Tabelle 10:	Puffer und Lösungen	36
Tabelle 11:	Plasmide zur bakteriellen Proteinexpression.....	37
Tabelle 12:	Plasmide zur eukaryotischen Transfektion.....	38
Tabelle 13:	Bakterienstämme	39
Tabelle 14:	eukaryotische Zelllinien	39
Tabelle 15:	Nährmedien für die Anzucht von <i>E. coli</i>	39
Tabelle 16:	Antibiotika	40
Tabelle 17:	Zellkulturmedien, -zusätze und -reagenzien.....	40
Tabelle 18:	Zusammensetzung der SDS-Polyacrylamidgele	47
Tabelle 19:	Katalytische Effizienzen des durch Rabex-5-VPS9-Mutanten-katalysierten Nukleotidaustauschs gegenüber Rab5A	72
Tabelle 20:	Katalytische Effizienzen des Rabex-5-VPS9-katalysierten Nukleotidaustauschs gegenüber Rab5A-Mutanten	82

9.4. Abkürzungsverzeichnis

% (v/v)	Volumenprozent
% (w/v)	Gewichtsprozent
AMSH	<i>associated molecule with the SH3 domain of STAM</i>
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
AOBS	<i>acousto-optical beam splitter</i>
AOTF	<i>acousto-optical tunable filter</i>
ATCC	<i>American type culture collection</i>
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
C	Celsius
CC	<i>coiled-coil</i>
CFP	<i>cyan fluorescent protein</i>
CHO	<i>chinese hamster ovary</i>
COPI und II	<i>coat protein complex I and II</i>
C-terminal	Carboxy-terminal
dATP	desoxy-Adenosintriphosphat
dCTP	desoxy-Cytidintriphosphat
dGTP	desoxy-Guanosintriphosphat
dTTP	desoxy-Thymidintriphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DMEM	<i>Dulbecco's modified eagle medium</i>
DPBS	<i>Dulbecco's phosphate buffered saline</i>
DrrA/SidM	<i>defect in Rab recruitment/substrate of Icm/Dot M</i>
DTE	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EET	<i>early endosomal targeting</i>
EGFR	<i>epidermal growth factor receptor</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERC	<i>endocytic recycling compartment</i>
FCS	<i>fetal calf serum</i>
FKBP	FK506-bindende Domäne
FRB	FKBP-Rapamycin-bindende Domäne
FTase	Farnesyl-Transferase
g	Gramm
GAP	GTPase aktivierendes Protein

GDF	<i>GDI displacement factor</i>
GDI	GDP-Dissoziationsinhibitor
GDP	Guanosindiphosphat
GEF	Guaninnukleotidaustauschfaktor
eGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i>
GGTase I	Geranylgeranyl-Transferase I
GppNHp	Guanosin-5'-(β -imino)triphosphat
GTP	Guanosintriphosphat
GYT	<i>glycerol, yeast extract, tryptone</i>
HB	<i>helical bundle</i>
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethansulfonsäure
Icmt	<i>Isoprenylcysteine carboxyl methyltransferase</i>
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
kb	Kilobasen
K_D	Dissoziationskonstante
L	Liter
LB	<i>lysogeny broth</i>
LCV	<i>Legionella-containing vacuole</i>
m	Meter
M	mol/L
Mant	Methylantraniloyl
MBM	<i>membrane-binding motif</i>
min	Minute
MIU	<i>motif interacting with Ubiquitin</i>
NEAA	<i>non-essential amino acids</i>
NaCl	Natriumchlorid
NBD	7-Nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl
N-terminal	Amino-terminal
NTA	Nitrilotriessigsäure
OD	optische Dichte
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
P4M	<i>phosphatidylinositol-4-phosphate binding of SidM/DrrA</i>
PCC	Pearson-Korrelations-Koeffizient
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PMT	<i>photo multiplier tube</i>
PRA1/Yip3	<i>Prenylated Rab Acceptor/Ypt interacting protein 3</i>
POI	<i>protein of interest</i>

Rabex-5	<i>Rabaptin-5-associated exchange factor for Rab5</i>
RabF	Rab-Familie
RabGGTase	Rab-Geranylgeranyl-Transferase
RabSF	Rab-Subfamilie
Rce1	<i>Ras converting enzyme 1</i>
REP	Rab Escort Protein
ROI	<i>region of interest</i>
rpm	<i>revolutions per minute</i>
s	Sekunde
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i>
SNARE	<i>soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment protein receptor</i>
STAM	<i>signal transducing adapter molecule</i>
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TB	<i>terrific broth</i>
TCEP	Tris(2-carboxyethyl)phosphin
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamin
TGN	<i>trans-Golgi-Netzwerk</i>
TIFF	<i>tagged image file format</i>
TIRF	<i>total internal reflection fluorescence</i>
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit
UBD	Ubiquitin-bindende Domäne
UBPY	<i>Ubiquitin-specific processing protease Y</i>
V	Volt
VAMP2	<i>vesicle-associated membrane protein 2</i>
Vps9p	<i>vacuolar protein sorting 9</i>
ZnF	Zinkfinger

9.5. Danksagung

Mein Dank gilt:

Professor Dr. Roger Goody für die große Unterstützung meiner Arbeit und das für seine Arbeitsgruppe ungewöhnliche und sehr spannende Projekt.

Professor Dr. Philippe Bastiaens für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Professor Dr. Aymelt Itzen für die hervorragende Betreuung, die vielfältigen Ideen, die Unterstützung und gleichzeitig die Freiheit vor allem hinsichtlich der Organisation des Projektes.

Nathalie Bleimling und Janine Beine für die exzellente Unterstützung im Laboralltag.

der Arbeitsgruppe Goody für eine äußerst angenehme und motivierende Arbeitsatmosphäre.

Juliana Rey für den unglaublichen Fleiß bei der Klonierung der unzähligen Konstrukte und der tatkräftigen Unterstützung am Mikroskop unter mehrstündigem Ausschluß von Tageslicht.

der Dortmund Protein Facility (Tina Rogowsky, Astrid Sander, Melina Terbeck, Deike Sievert, Nadine Wösthoff und Tim Bergbrede) für den großartigen Service der Klonierung und der Proteinexpression.

Anette Langerak und Petra Glitz für die hervorragende und unersetzbare Unterstützung im Zellkulturlabor.

Dr. Sven Müller für die sehr kompetente und immer freundliche, technische Unterstützung des manchmal eigenwilligen Mikroskops.

Dr. Leif Dehmelt und Dr. Tomáš Mazel für die anregenden Diskussionen und die Unterstützung bei der Auswertung der Datensätze.

der IMPRS (Christa Hornemann, Dr. Waltraud Hofmann-Goody, Prof. Dr. Martin Engelhard) für die Unterstützung und die Organisation der vielfältigen und interessanten Vorträge und Retreats.

meiner Familie, insbesondere meiner Mutter, meinen Freunden und Laura für das geduldige Zuhören, die stetige Aufmunterung und die bedingungslose Unterstützung.

9.6. Eidesstattliche Erklärung

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

Dortmund, 09.10.2012

Julia Blümer