

Mechanismen der reversiblen enzymatischen Adenylylierung von Rab-Proteinen

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

**angefertigt am
Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie**

vorgelegt von
Matthias Philipp Müller
geboren am 20.10.1982 in Beckum

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

1. Gutachter: Prof. Dr. Roger S. Goody

2. Gutachter: Prof. Dr. Roland Winter

Im Rahmen dieser Arbeit sind folgende Veröffentlichungen erschienen:

Müller, M. P., Peters, H., Blumer, J., Blankenfeldt, W., Goody, R. S., and Itzen, A. (2010) The Legionella effector protein DrrA AMPylates the membrane traffic regulator Rab1b. *Science* **329**, 946-949

Goody, R. S., Müller, M. P., Schoebel, S., Oesterlin, L. K., Blumer, J., Peters, H., Blankenfeldt, W., und Itzen, A. (2011) The versatile Legionella effector protein DrrA. *Commun Integr Biol* **4**, 72-74

Smit, C., Blumer, J., Eerland, M. F., Albers, M. F., Müller, M. P., Goody, R. S., Itzen, A., und Hedberg, C. (2011) Efficient synthesis and applications of peptides containing adenylylated tyrosine residues. *Angew Chem Int Ed Engl* **50**, 9200-9204

Goody, P. R., Heller, K., Oesterlin, L. K., Müller, M. P., Itzen, A., und Goody, R. S. (2012) Reversible phosphocholination of Rab proteins by *Legionella pneumophila* effector proteins. *EMBO J* **31**, 1774-1784

Müller, M. P., Shkumatov, A. V., Oesterlin, L. K., Schoebel, S., Goody, P. R., Goody, R. S., und Itzen, A. (2012) Characterization of enzymes from *Legionella pneumophila* involved in reversible adenylylation of Rab1. *J Biol Chem*, (im Druck). DOI: 10.1074/jbc.M112.396861

Stein, M. P., Müller, M. P., und Wandinger-Ness, A. (2012) Bacterial Pathogens commandeer Rab GTPases to establish intracellular niches. *Traffic*, (im Druck). DOI: 10.1111/tra.12000

INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS	I
ABKÜRZUNGEN UND FORMELZEICHEN	V
ZUSAMMENFASSUNG	1
ABSTRACT	3
1 EINLEITUNG	5
1.1 Ras-ähnliche kleine GTPasen	6
1.1.2 Rab-Proteine und vesikulärer Transport	7
1.1.2.1 Die strukturellen Grundlagen der Rab-Protein Funktion	11
1.2 Bakterien manipulieren gezielt den vesikulären Transport	14
1.2.1 <i>Legionella pneumophila</i>	15
1.2.1.1 Rab1 interagierende Proteine von <i>Legionella pneumophila</i>	16
1.2.1.1.1 Die Struktur der N-terminalen Domäne von DrrA	17
1.2.1.1.2 Die Nukleotidyllylierung ist ein weit verbreitetes Prinzip der Biochemie	19
2 ZIELSETZUNG	23
3 MATERIAL UND METHODEN	25
3.1 Material	25
3.1.1 Chemikalien	25
3.1.2 Enzyme, Reagenzien und Standards	27
3.1.3 Kits	27
3.1.4 Sonstige Materialien	28
3.1.5 Bakterien und Plasmide	29
3.1.6 Geräte und Zubehör	31
3.1.7 Software	33
3.1.8 Häufig verwendete Lösungen	34

3.2 Methoden	36
3.2.1 Molekularbiologische Methoden.....	36
3.2.1.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	36
3.2.1.2 Spaltung von DNA mittels Restriktionsenzymen.....	37
3.2.1.3 Reinigung von DNA	37
3.2.1.4 Ligation von DNA-Fragmenten.....	38
3.2.1.5 Einführung von Mutationen in Plasmid-DNA	38
3.2.1.6 Transformation elektrokompetenter Zellen	38
3.2.2 Proteinchemische Methoden	39
3.2.2.1 Proteinexpression und -reinigung.....	39
3.2.2.1.1 Expression von Selenomethionin- (SeMet-) modifiziertem Protein.....	42
3.2.2.1.2 Herstellung von <i>E. coli</i> Lysat.....	42
3.2.2.2 Konzentrierung von Proteinlösungen	43
3.2.2.3 Dialyse von Proteinlösungen.....	43
3.2.2.4 Präparativer Nukleotidaustausch.....	43
3.2.3 Analytische und biophysikalische Methoden.....	44
3.2.3.1 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	44
3.2.3.2 Bestimmung von Proteinkonzentrationen.....	44
3.2.3.3 Analytische Gelfiltration	45
3.2.3.4 Massenspektrometrie.....	46
3.2.3.5 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie	46
3.2.3.5.1 Bestimmung intrinsischer Hydrolyseraten.....	47
3.2.3.6 Circular dichroismus- (CD-) Spektroskopie	47
3.2.3.7 Kinetische Charakterisierungen der verwendeten Enzyme	48
3.2.3.7.1 Messung langsamer Kinetiken (Fluoromax).....	48
3.2.3.7.2 Messung schneller Kinetiken (stopped-flow).....	49

3.2.3.7.3 Messung von Kinetiken mittels radioaktivem [α - 32 P]-ATP	50
3.2.3.8 Isotherme Titrationskalorimetrie.....	51
3.2.3.9 Röntgenkristallstrukturanalyse.....	51
3.2.3.10 Röntgenkleinwinkelstreuung	52
4 ERGEBNISSE UND DISKUSSION	55
4.1 Die N-terminale Domäne von DrrA modifiziert Rab-Proteine kovalent.....	55
4.1.1 Massenspektrometrische Analyse	55
4.1.2 Die Struktur des kovalent modifizierten Rab1	56
4.1.3 Unterschiedliche Rab-Proteine können kovalent modifiziert werden	58
4.2 Kinetische Charakterisierung der Adenylylierung durch DrrA	64
4.2.1 Nukleotidspezifität von DrrA	68
4.3 Effekte der Modifizierung.....	71
4.3.1 Die intrinsischen Eigenschaften von Rab1 sind unverändert.....	72
4.3.2 Effekte gegenüber GTPase aktivierenden Proteinen und der GEF Domäne von DrrA	73
4.3.3 Effekte gegenüber Effektor-Proteinen.....	75
4.3.3.1 Analytische Gelfiltrationsexperimente	76
4.3.3.2 Die Bindung des humanen Effektorproteins Mical-3	78
4.3.3.3 Die Struktur der Rab1-bindenden Domäne von Mical-3.....	79
4.4 Strukturelle Charakterisierung von DrrA	85
4.4.1 Röntgenkleinwinkeluntersuchungen an DrrA.....	86
4.5 Die Modifizierung ist reversibel.....	90
4.5.1 Legionellenlysate enthält eine enzymatische Aktivität zur Deadenylylierung von Rab1-AMP ...	90
4.5.2 Kinetische Charakterisierung von SidD	91
4.5.3 Untersuchung der Nukleotidspezifität von SidD.....	94
5 ABSCHLIEßENDE DISKUSSION UND AUSBLICK	97
5. 1 Ein Modell der Funktion der Adenylylierung von Rab1 im Infektionszyklus	97

5.2 Vergleich der Adenylylierung durch DrrA und der Phosphocholinierung durch AnkX.....	100
5.3 Strukturelle Grundlagen der Effekte der Adenylylierung auf Proteininteraktionen	104
5.4 Ausblick.....	107
6 LITERATURVERZEICHNIS	109
7 ANHANG	123
7.1 Datenstatistik der Röntgenkristallstrukturanalyse	123
7.2 Massenspektren	125
7.2.1 Massenspektren zur Analyse der DrrA Spezifität gegenüber Rab-Proteinen.....	125
7.2.1.1 Vollständiger Sequenzvergleich aller für die Adenylylierung getesteter Rab-Proteine ...	127
7.2.3 Massenspektren zur Analyse der DrrA Spezifität unterschiedlicher Nukleotide	129
7.3 Progresskurven	130
7.4 Charakterisierung der Mical-3 Aminosäureaustauschmutanten	133
7.5 SAXS-Daten	136
DANKSAGUNG	137
EIDESSTÄTTLICHE ERKLÄRUNG	139

ABKÜRZUNGEN UND FORMELZEICHEN

Å	Angstrom
A (mA)	Ampere (Milliampere)
ADP	Adenosin-5'-diphosphat
AMP	Adenosin-5'-monophosphat
APS	Ammoniumperoxodisulfat
Atase	Adenylyltransferase
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
bp	Basenpaare (engl.: <i>base pairs</i>)
BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumine</i>)
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celcius
CD	Circulardichroismus
Ci	Curie
CTP	Cytidin -5'-triphosphat
Da (kDa)	Dalton (Kilodalton)
ddH ₂ O	entionisiertes Wasser
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	Desoxynukleosid-5'-triphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl.: <i>desoxyribonucleic acid</i>)
DTE	Dithioerythritol
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	N,N,N',N'-Ethyldiamintetraessigsäure
ER	Endoplasmatische Retikulum
<i>et al.</i>	und andere (lat.: <i>et alii</i>)
fl	vollständige Länge (engl.: <i>full length</i>)
FPLC	Schnelle-Protein-Flüssigkeits-Chromatographie (engl.: <i>fast protein liquid chromatography</i>)
g (mg, µg, ng)	Gramm (Milligramm, Mikrogramm, Nanogramm)

GAP	GTPase aktivierendes Protein (engl.: <i>GTPase activating protein</i>)
GDF	GDI- Dissoziationsfaktor (engl.: <i>GDI dissociation factor</i>)
GDI	Guaninnukleotid- Dissoziationsinhibitor (engl.: <i>Guanosine nucleotide dissociation inhibitor</i>)
GDP	Guanosin-5'-diphosphat
GEF	Guaninnukleotidaustauschfaktor (engl.: <i>guanine nucleotide exchange factor</i>)
GMP	Guanosin-5'-monophosphat
GppNHp	Guanosine-5'-(β - γ -imido)triphosphate
GSAtase	Glutamin Synthetase Adenylyltransferase
GST	Glutathion-S-Transferase
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
h	Stunden (engl.: <i>hour</i>)
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (engl.: <i>high performance liquid chromatography</i>)
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalaktopyranosid
ITC	Isotherme Titrationskalorimetrie (engl.: <i>isothermal titration calorimetry</i>)
kb	Kilobase
K _D	Dissoziationskonstante
KNT	Kanamycin Nukleotidyltransferase
l (ml, μ l)	Liter (Milliliter, Mikroliter)
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
LCV	Legionella enthaltende Vakuole (engl.: <i>Legionella- containing vacuole</i>)
<i>L. pneumophila</i>	<i>Legionella pneumophila</i>
LMW	<i>low molecular weight</i> Marker
M (mM, μ M, nM)	Molar (Millimolar, Mikromolar, Nanomolar)
m (cm, mm, μ m, nm)	Meter (Zentimeter, Millimeter, Mikrometer, Nanometer)
Mant	2'/3'-O-(N-methyl-anthraniloyl)
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
min	Minute
MWCO	<i>molecular weight cut off</i>
NMP	Nukleosid-5'-monophosphat

NTA	Nitrilotriessigsäure
OD ₆₀₀	optische Dichte bei 600 nm
PAP	Poly(A)-Polymerase
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (engl.: <i>Polymerase chain reaction</i>)
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
PDE	Phosphodiesterase
PEG	Polyethylenglycol
PMSF	Phenylmethylsulphonylfluorid
P4M	Phosphatidylinositol-4-phosphat bindende Domäne (engl.: <i>Phosphatidylinositol-4-phosphate binding domain</i>)
REP	Rab Eskortprotein (engl.: <i>Rab escort protein</i>)
rpm	Umdrehungen pro Minute (engl.: <i>revolutions per minute</i>)
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SDS-PAGE	Sodiumlaurylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (engl.: <i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>)
SeMet	Selenomethionin
TCEP	Tris(2-chlorethyl)phosphin
TEMED	N,N,N`N`-Tetramethyl-Ethylendiamin
TFA	Trifluoressigsäure (engl.: <i>Trifluoroacetic acid</i>)
u.a.	unter anderem
UTP	Uridin-5'-triphosphat
UV	Ultraviolett
V (kV)	Volt (Kilovolt)
(v/v)	Volumenprozent
(w/v)	Masseprozent
z.B.	zum Beispiel

Aminosäuren wurden gemäß den Empfehlungen der *International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC) und der *International Union of Biochemistry and Molecular Biology* (IUB) mit Ein- und Dreibuchstabencodes abgekürzt.

ZUSAMMENFASSUNG

Rab-Proteine bilden mit mehr als 60 Mitgliedern im Menschen die größte Unterfamilie der Superfamilie Ras-ähnlicher kleiner GTPasen, welche als molekulare Schalter in einer GDP-gebundenen (inaktiven) und einer GTP-gebundenen (aktiven) Konformation vorliegen können. Die Konversion der Aktivitätszustände erfolgt durch regulatorische Faktoren: GTPase aktivierende Proteine (GAPs) stimulieren die GTP-Hydrolyse und Guaninnukleotidaustauschfaktoren (GEFs) katalysieren den GDP-GTP-Austausch. In der aktiven Konformation interagieren Rab-Proteine mit Effektorproteinen und regulieren den vesikulären Transport in eukaryotischen Zellen. Um vesikuläre Transportwege zum eigenen Vorteil zu nutzen haben einige intrazellulär lebende Pathogene erstaunliche Methoden zur Manipulation von Rab-Proteinen entwickelt. Ein prominentes Beispiel eines solchen Pathogens ist *Legionella pneumophila* und insbesondere das Legionellenprotein DrrA (engl.: *defect in Rab recruitment A*), welches die intrazelluläre Lokalisation und den Aktivitätszustand von Rab1 manipuliert. Strukturelle Untersuchungen vor Beginn dieser Arbeit offenbarten eine weitere funktionelle Domäne von DrrA, welche Adenylyltransferase-Aktivität gegenüber Rab1 besitzt. Die Charakterisierung dieser Aktivität war zentrales Thema dieser Arbeit.

Die innerhalb dieser Arbeit bestimmte Röntgenkristallstruktur des adenylylierten Rab1 zeigte, das Rab1 spezifisch an einem Tyrosin im Bereich des funktionell wichtigen *switch II* modifiziert wird. Weiterführende Untersuchungen offenbarten starke inhibitorische Effekte der kovalenten Modifizierung auf die Interaktion von Rab1 mit GAPs und dem humanen Effektorprotein Mical-3, wohingegen die Interaktionen mit der GEF-Domäne von DrrA und dem Legionellen Effektorprotein LidA nicht signifikant gestört sind. Enzymkinetische Untersuchungen von DrrA und dem kürzlich identifizierten deadenylylierenden Enzym SidD zeigten, dass die aktive Konformation von Rab1 das bevorzugte Substrat der Adenylylierung durch DrrA ist, wohingegen SidD beide Aktivitätszustände von Rab1 gleichermaßen als Substrat akzeptiert. Diese Arbeit umfasst die erste Beschreibung und Charakterisierung der Adenylylierung als posttranslationale Modifikation eines Rab-Proteins. Im Kontext der aktuellen Literatur erlaubten die Ergebnisse dieser Arbeit die Erstellung eines Modells, in dem eine Deaktivierung von Rab1 durch GAPs und somit eine Extraktion von der Membran der Legionellen enthaltenden Vakuole (LCV) durch GDI temporär durch die kovalente Modifikation unterbunden wird und Rab1 an der LCV-Membran arretiert wird. Erst durch das deadenylylierende Enzym SidD wird zu einem späteren Zeitpunkt der Infektion eine Deaktivierung und Extraktion wieder ermöglicht.

ABSTRACT

Including more than 60 members in humans, Rab proteins constitute the largest subfamily of the Ras-like superfamily of small GTPases which act as molecular switches and can exist in a GDP-bound (inactive) and a GTP-bound (active) conformation. The conversion between these states is carried out by regulatory factors: GTPase activating proteins (GAPs) stimulate GTP hydrolysis and guanine nucleotide exchange factors (GEFs) catalyze the GDP-GTP exchange. Rab proteins interact with effector proteins only in the active state, thereby regulating vesicular trafficking in eukaryotic cells. For this purpose, the activity and the intracellular localization of Rab proteins need to be tightly regulated. In order to ensure their own survival, some intracellular pathogens have developed intriguing strategies for manipulation of intracellular vesicular transport processes and in particular of the Rab proteins involved. A prominent example of an intracellular pathogen that manipulates Rab proteins for its own benefit is *Legionella pneumophila*. In particular, the Legionella protein DrrA (defect in Rab recruitment A) was identified in the recent past as a protein that manipulates the intracellular localization and activity of Rab1. At the beginning of this work, structural studies on this protein showed the presence of an additional, previously uncharacterized domain possessing adenylyltransferase activity towards Rab1. The characterization of this enzymatic activity was the central subject of this work.

Within this work, the x-ray crystal structure of adenylylated Rab1 was solved. This structure showed that Rab1 was specifically modified on a tyrosine residue in the functionally important *switch II* region. Further studies of the effects of this modification showed that the interaction of Rab1-AMP with GAPs and the human effector Mical-3 are drastically inhibited, whereas the interaction with the GEF domain of the Legionella protein DrrA and the Legionella effector protein LidA are not significantly inhibited. Characterisation of the enzyme kinetics of DrrA and the recently identified deadenylylating enzyme SidD showed that Rab1:GTP is the preferred substrate of adenylylation by DrrA while SidD possesses a significantly lower substrate specificity towards the active or inactive conformation of Rab1. This work includes the first description and characterization of adenylylation as a posttranslational modification of Rab proteins. In the context of the current literature, the results of this work allowed the proposal of a model in which adenylylation temporarily inhibits deactivation of Rab1 by GAPs and thus the extraction of Rab1 from the Legionella containing vacuolar (LCV) membrane by GDI and Rab1 is entrapped at the LCV membrane. At a later stage of infection, deadenylylation by SidD allows for deactivation and extraction by GDI.

1 EINLEITUNG

Alle Lebewesen zeichnen sich trotz ihrer phänotypischen Mannigfaltigkeit durch eine sehr ähnliche Grundeinheit aus, die Zelle. Diesen Zellen lassen sich zwei Arten zuordnen, die prokaryotischen Zellen, denen ein abgegrenzter Zellkern fehlt, sowie die eukaryotischen Zellen, die diesen namensgebenden Zellkern besitzen⁽¹⁾. Die bis heute unvollständig verstandene Entwicklung von Eukaryoten aus Prokaryoten ermöglichte in der Evolution die Ausbildung hoch spezialisierter und differenzierter Zellen und somit die Entstehung multizellulärer Organismen wie Pflanzen und Tiere⁽²⁻⁴⁾. Insbesondere die unterschiedlichen Größen von Prokaryoten (1 – 10 µm) und Eukaryoten (10 – 100 µm) sowie die Kompartimentalisierung und das Vorhandensein des namensgebenden Zellkerns bei Eukaryoten stellen wesentliche Unterschiede zwischen Pro- und Eukaryoten dar^(1,4,5). Vermutlich war die Größenzunahme der eukaryotischen Zellen im Vergleich zu Prokaryoten gleichzeitig auch der Grund für die notwendige Ausbildung interner Membranen und Kompartimente, da die vorhandene Plasmamembran im Vergleich zum großen Volumen der Zellen keine ausreichende Fläche für lebensnotwendige Membranprozesse bot⁽¹⁾.

Neben der Notwendigkeit interner Membranen bietet die Kompartimentierung gleichzeitig auch den Vorteil, abgetrennte Reaktionsräume und somit verschiedene intrazelluläre Milieus zu ermöglichen. Das Zytosol bietet den wichtigsten Ort für viele Stoffwechselprozesse, der Zellkern bietet einen abgetrennten Raum für das Genom der Zelle, das endoplasmatische Retikulum und der Golgi Apparat dienen unter anderem der Synthese und posttranslationalen Modifikation von sekretorischen Proteinen sowie Membranproteinen, Mitochondrien sind ein wichtiger Ort der ATP-Synthese und Lysosomen bieten ein saures Milieu angereichert mit zahlreichen hydrolytischen Enzymen zum Abbau endozytotisch aufgenommener Stoffe^(1,5). Bei allen Vorteilen dieser Kompartimentierung muss jedoch auch gewährleistet sein, dass ein gerichteter und kontrollierter Transport zwischen den unterschiedlichen Organellen stattfindet. Bei diesem gerichteten Transport spielen die Rab-Proteine, eine Unterfamilie der Ras-ähnlichen kleinen GTPasen, eine wesentliche Funktion⁽⁶⁻⁹⁾. Da die Rab-Proteine ein wesentlicher Bestandteil der vorliegenden Arbeit sind werden sie im Folgenden detaillierter eingeführt.

1.1 Ras-ähnliche kleine GTPasen

Die Mitglieder der Superfamilie der Ras-ähnlichen GTPasen besitzen wesentliche Funktionen bei der Regulation wichtiger Prozesse wie Signaltransduktion und Genexpression, intrazellulären Transportprozessen sowie der Organisation des Zytoskeletts in der Zelle und werden nach ihren Funktionen in die 5 Proteinfamilien Ras, Rho/Rac/Cdc42, Ran, Sar/Arf und Rab (vergleiche Tabelle 1-1) unterteilt ⁽¹⁰⁾.

Tabelle 1-1: Zusammenfassung der Funktion der Familien der Ras-ähnlichen kleinen GTPasen.

Familie	Funktion	Quellen
Ras	Signaltransduktion / Genexpression	(11,12)
Rho/Rac/Cdc42	Zellform, -beweglichkeit und -polarität	(13,14)
Ran	Zellkernimport und -export	(15-17)
Sar/Arf	Vesikelknospung / vesikulärer Transport	(18,19)
Rab	vesikulärer Transport	(6-9)

Allen Mitgliedern dieser Familie ist eine Größe von 20 – 40 kDa und eine strukturell sehr ähnliche G-Domäne gemein, welche durch Bindung der Nukleotide GDP (Guanosin-5'-diphosphat) und GTP (Guanosin-5'-triphosphat) den Aktivitätszustand der Ras-ähnlichen GTPasen bestimmt und somit die Funktion dieser Proteine als molekulare Schalter ermöglicht. In der GDP-gebundenen Form sind die Proteine inaktiv, wohingegen sie im GTP-gebundenen Zustand aktiv sind und durch Interaktion mit Effektorproteinen, welche spezifisch die aktive Form der kleinen GTPasen erkennen, ihre physiologische Funktion in der Zelle erfüllen ^(10,20,21). Durch ihre intrinsische Hydrolyseaktivität können die Ras-ähnlichen GTPasen gebundenes GTP zu GDP hydrolysieren, um so eine Deaktivierung zu gewährleisten. Da diese intrinsische Aktivität jedoch im Allgemeinen sehr klein und somit für viele physiologische Prozesse nicht ausreichend ist (Halbwertszeiten zwischen etwa 30 min und vielen Stunden ⁽²²⁻²⁵⁾) kann die Geschwindigkeit der Hydrolyse durch GTPase aktivierende Proteine (engl.: *GTPase activating proteins*, GAPs) stark erhöht werden ^(26,27). Guaninnukleotidaustauschfaktoren (engl.: *guanine nucleotide exchange factors*, GEFs) wiederum katalysieren den reversiblen Austausch der gebundenen Nukleotide ^(26,27). Da GTP in der Zelle in höherer Konzentration als GDP vorliegt ⁽²⁸⁾ führt dies zu einer Aktivierung der Ras-ähnlichen GTPasen. Der Zyklus der Aktivierung und Inaktivierung ist in Abbildung 1-1 illustriert. Auf die zugrunde liegenden strukturellen Mechanismen und Unterschiede zwischen der

aktiven sowie der inaktiven Konformation von Ras-ähnlichen kleinen GTPasen wird in Kapitel 1.1.2.1 am Beispiel der Rab-Proteine detaillierter eingegangen.

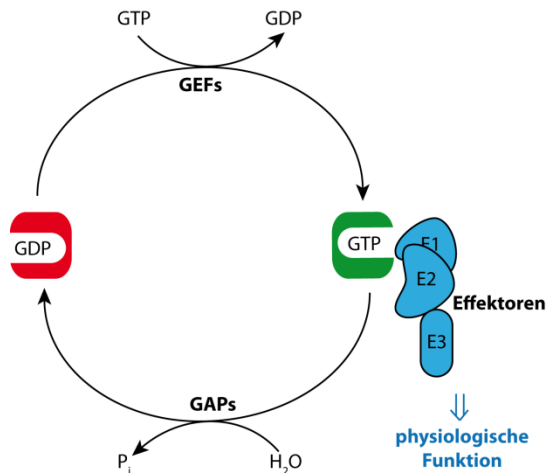


Abbildung 1-1: Zyklus der Aktivierung und Deaktivierung Ras-ähnlicher kleiner GTPasen. Die GDP-gebundene inaktive GTPase (rot) kann durch GEF-katalysierten Nukleotidaustausch in die aktive GTP-gebundene Form (grün) überführt werden. Durch Wechselwirkung mit diversen Effektorproteinen werden in der aktiven Konformation zahlreiche physiologische Prozesse gesteuert. Die Deaktivierung erfolgt durch GAP-katalysierte Hydrolyse des gebundenen GTP zu GDP und Phosphat (P_i).

1.1.2 Rab-Proteine und vesikulärer Transport

In ersten Studien in den 1980er Jahren konnte gezeigt werden, dass eine Gruppe von Proteinen mit hoher Ähnlichkeit zu Ras eine wichtige Rolle bei intrazellulären vesikulären Transportprozessen in der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* besitzen⁽²⁹⁻³²⁾. Homologe Proteine in höheren Eukaryoten wurden zuerst im Gehirn von Ratten entdeckt und führten so zu dem Namen Rab-Proteine (*Ras-like protein from rat brain*)⁽³³⁾.

Heute ist bekannt, dass die Rab-Proteine mit mehr als 60 Vertretern im Menschen und 11 Vertretern in der Hefe *S. cerevisiae* die größte Unterfamilie der Ras-ähnlichen kleinen GTPasen darstellen^(7,34-36). Einige dieser Rab-Proteine besitzen eine zell- oder gewebespezifische Expression und Lokalisation, wohingegen andere ubiquitär in unterschiedlichen Geweben exprimiert werden. Weiterhin konnte für unterschiedliche Rab-Proteine eine distinkte Lokalisation an den Organellen der Zelle gezeigt werden (Abbildung 1-2). An diesen Organellen sind sie an der Regulation aller notwendigen Schritte des vesikulären Transportes, angefangen mit der Sortierung des Vesikelinhaltes, der Formierung und Freisetzung der Vesikel sowie deren Transport entlang des Zytoskeletts bis zur Anheftung und schließlich der Fusion mit der Zielmembran beteiligt^(7,8).

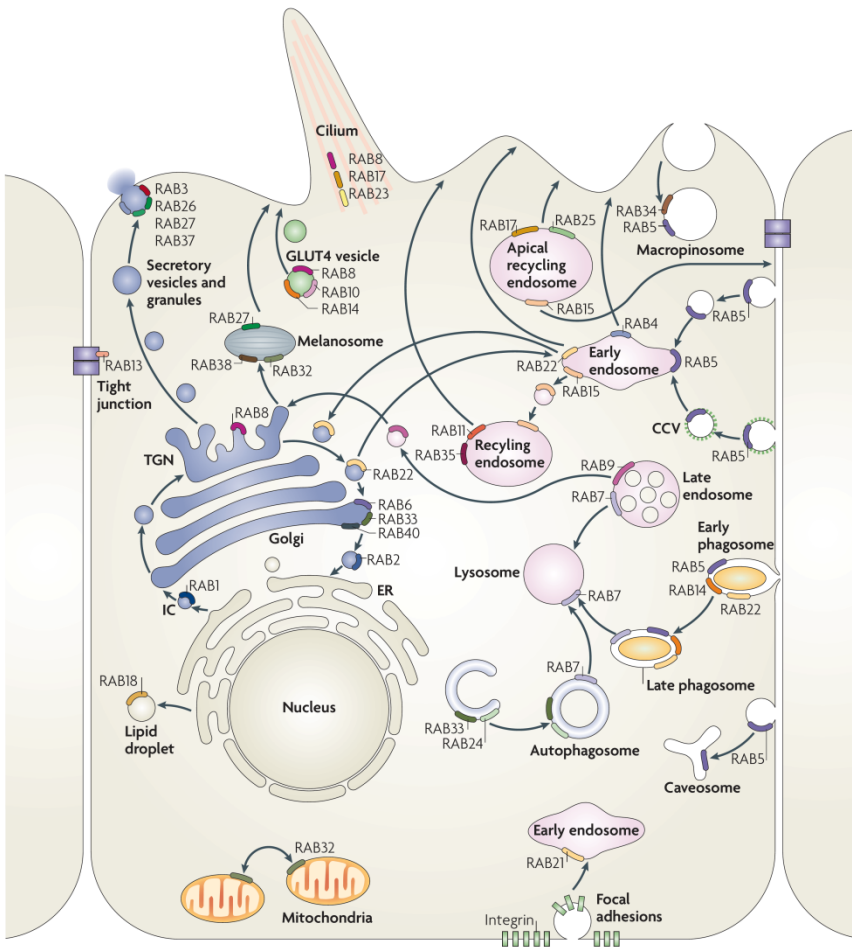


Abbildung 1-2: Funktion unterschiedlicher Rab-Proteine am Beispiel einer Epithelzelle. Unterschiedliche Rab-Proteine zeigen distinkte Lokalisationen an verschiedenen Organellen und sind für die Regulation vesikulärer Transportprozesse zwischen den Organellen der Zelle verantwortlich. Abbildung entnommen aus ⁽⁷⁾.

Während der Regulation des vesikulären Transportes alternieren Rab-Proteine zwischen dem für Ras-ähnliche GTPasen bereits beschriebenen GDP-gebundenen inaktiven und GTP-gebundenen aktiven Zustand sowie zwischen einer membrangebundenen und einer zytosolischen Lokalisation. Die Bindung an Membranen erfolgt dabei durch Isoprenoidmodifikationen (Geranylgeranylreste) an C-terminalen Cystein-Seitenketten der Rab-Proteine ^(37,38). Für die Katalyse der Modifikation binden neu-synthetisierte Rab-Proteine zunächst an das Rab Eskortprotein (REP) und werden von diesem anschließend der Rab Geranylgeranyltransferase (RabGGTase) zur Modifikation präsentiert. Nach erfolgter Modifikation können die Rab-Proteine durch REP zu einer Membran transportiert werden und dort als periphere Membranproteine mittels der Isoprenoidmodifikation binden ⁽³⁹⁻⁴¹⁾. Der genaue Mechanismus der spezifischen Rekrutierung von Rab-Proteinen an bestimmte Organellen ist bis heute nicht geklärt. Erste frühe Studien ergaben die Theorie eines zusätzlichen Faktors, dem GDP-Dissoziationsinhibitor (GDI) *displacement factor* (GDF), welcher für die spezifische Membranrekrutierung der Rab-Proteine

verantwortlich ist⁽⁴²⁻⁴⁴⁾. Weitere Studien konnten jedoch zeigen, dass GEFs die Aufgabe der Membranrekrutierung ebenso übernehmen könnten^(45,46). Aktivierte Rab-Proteine interagieren mit zahlreichen Effektorproteinen und steuern so die Knospung des Vesikels, den Transportprozess der Vesikel entlang des Zytoskeletts zu einer Zielmembran sowie schließlich die Anheftung (engl.: *tethering*) und die Fusion mit der Zielmembran⁽⁷⁾. An der Zielmembran angekommen deaktivieren GAPs das Rab-Protein⁽²⁶⁾ und GDI kann das inaktive Rab-Protein aus der Membran extrahieren und somit wieder dem Rab-Zyklus zuführen. Die essentielle Funktion des GDI besteht dabei in der Abschirmung und Solubilisierung der hydrophoben Geranylgeranyl-Reste gegenüber dem Zytoplasma^(46,47). Eine Extraktion des Rab-Proteins ist dabei erst nach Inaktivierung durch das GAP möglich, da GDI nur die GDP-gebundene Form der Rab-Proteine mit hoher Affinität bindet^(46,48).

Abbildung 1-3 zeigt ein stark vereinfachtes Schema der Regulation von Rab-Proteinen. Rab-Proteine sowie ihre GEFs, GAPs und Effektoren bilden tatsächlich aber aufwendige Reaktionskaskaden zur Aktivierung und Deaktivierung um die korrekte zeitliche und räumliche Funktion der Rab-Proteine an ihrem Wirkungsort sicherzustellen^(49,50). Für einige Rab-Proteine konnte beispielsweise gezeigt werden, dass sie die GEFs und GAPs für vor- oder nachgeschaltete Rab-Proteine im vesikulären Transport rekrutieren und somit gezielt die Aktivität unterschiedlicher Rab-Proteine auf distinkte Membranbereiche in der Zelle beschränkt wird⁽⁵¹⁻⁵³⁾.

Das zentrale Rab-Protein dieser Arbeit ist Rab1, welches eine wichtige Funktion in der Regulation des vesikulären Transports zwischen dem endoplasmatischen Retikulum und dem Golgi-Apparat sowie innerhalb der Golgi-Stapel (Abbildung 1-2) besitzt⁽⁵⁴⁻⁵⁷⁾. Bis zum heutigen Zeitpunkt konnten eine große Anzahl von Rab1-interagierenden Proteinen beschrieben werden, die an der Regulation dieser vesikulären Transportprozesse beteiligt sind. So konnten die TRAPPI und TRAPPII Komplexe in Hefe sowie der homologe mTRAPPII Komplex in Säugetieren als GEF für Ypt1 in Hefe (das homologe Protein von Rab1 in Hefe) bzw. für Rab1 in Säugetieren identifiziert werden⁽⁵⁸⁻⁶¹⁾. Weiterhin sind eine Reihe von Effektoren mit Funktionen als mögliche Verbindung zu Intermediärfilamenten des Zytoskeletts (Iporin und Mical-Proteine) und als *tethering*-Faktoren (p115, Giantin, GM130, golgin-84) beschrieben⁽⁶²⁻⁶⁶⁾. Als GTPase aktivierende Proteine konnten Gyp1 als GAP für das Rab1-homologe Ypt1 aus Hefe und TBC1D20 für Rab1 identifiziert werden^(67,68).

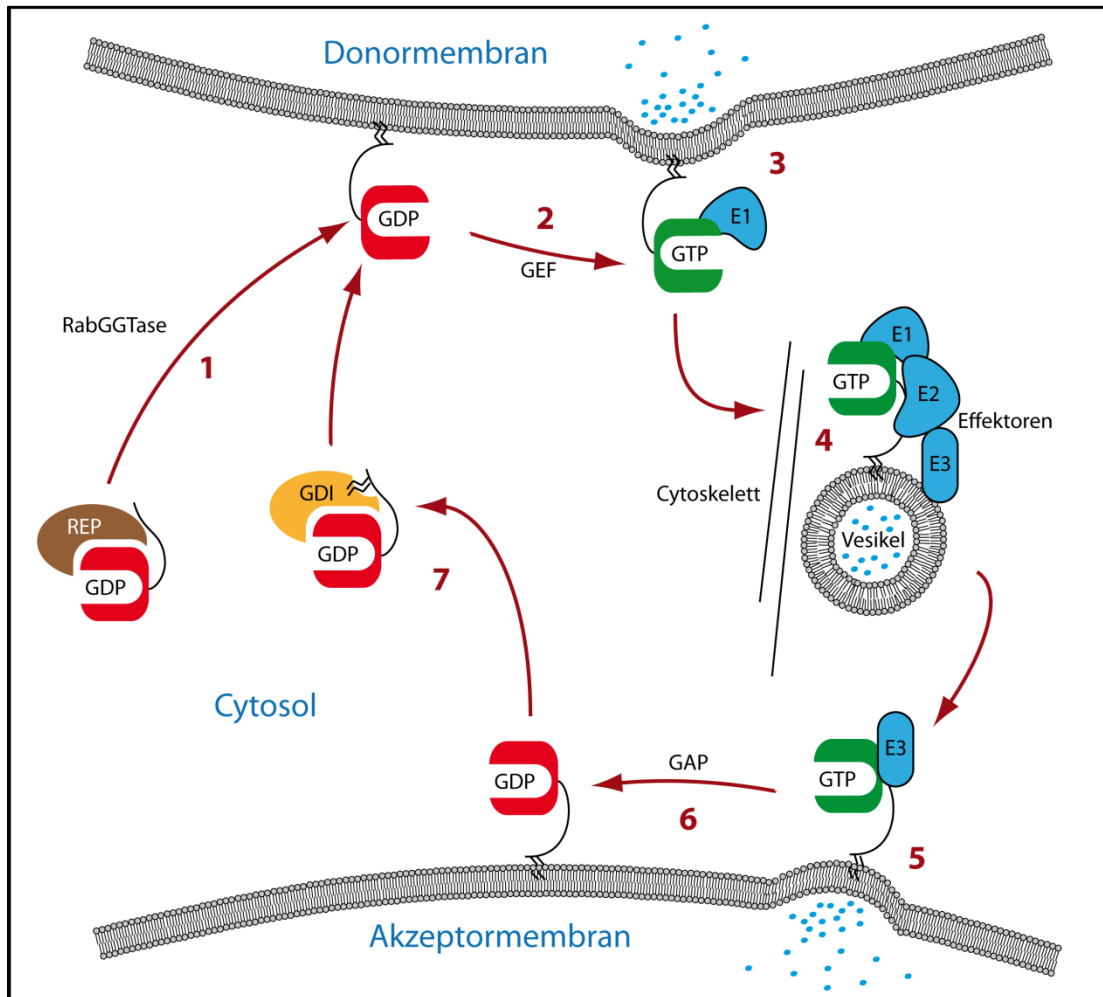


Abbildung 1-3: Modellvorstellung der Funktion von Rab-Proteinen zur Regulation des vesikulären Transportes. Nach der Synthese liegen die Rab-Proteine im Zytosol in der GDP-gebundenen Form (rot) gebunden an das Rab-Eskortprotein (braun) vor. Die Rab-Geranylgeranyltransferase (RabGGTase) katalysiert die Modifizierung C-terminaler Cysteine mit meist zwei Geranylgeranylresten (1). Über diese kovalenten Modifizierungen können die Rab-Proteine an Donormembranen binden und dort durch Guanininnukleotid Austauschfaktoren (GEFs) in die aktive GTP-gebundene Form (grün) überführt werden (2). In dieser aktiven Form können die Rab-Proteine mit zahlreichen Effektoren wechselwirken und somit alle Schritte von der Knospung des Vesikels von der Donormembran (3), dem Transport entlang des Zytoskeletts (4), der Anheftung und schließlich die Fusion mit der Akzeptormembran (5) und somit den Transport von unterschiedlichen Molekülen (angedeutet durch blaue Punkte) zwischen den Organellen regulieren. Die Deaktivierung der Rab-Proteine erfolgt schließlich durch GTPase-aktivierende Proteine (GAPs) (6). In dieser Form können die Rab-Proteine durch GDP-Dissoziationsinhibitoren (GDIs) aus der Membran extrahiert und zurück zur Donormembran transportiert werden (7). Für weitere Erläuterungen, siehe Text. Abbildung modifiziert nach ⁽⁶⁹⁾.

1.1.2.1 Die strukturellen Grundlagen der Rab-Protein Funktion

Die elementare funktionelle Grundlage der Mitglieder der Familie der Ras-ähnlichen kleinen GTPasen besteht in der alternierenden Bindung von GTP bzw. GDP und der daraus resultierenden Änderung des Aktivitätszustandes und somit der Funktion als molekulare Schalter (engl.: *molecular switch*)⁽⁷⁰⁾. In diesem Kapitel soll auf die strukturellen Grundlagen dieses *switch*-Mechanismus, der Bindung der Nukleotide bei Rab-Proteinen sowie die strukturellen Grundlagen der Katalyse von GAPs und GEFs eingegangen werden.

Die funktionelle Einheit der Ras-ähnlichen kleinen GTPasen für Nukleotidbindung und -hydrolyse ist die etwa 20 kDa große G-Domäne, welche ein zentrales 6-strängiges β -Faltblatt umgeben von 5 α -Helices besitzt^(70,71). Bereits Ende der 1980er bzw. Anfang der 1990er Jahre konnten Strukturen der G-Domäne mit atomarer Auflösung berichtet werden, welche die Grundlagen der Funktion als molekulare Schalter auf struktureller Ebene erklären konnten⁽⁷²⁻⁷⁵⁾. Insbesondere zwei Bereiche zeigten eine besonders ausgeprägte Änderung ihrer Konformation in Abhängigkeit des gebundenen Nukleotids und wurden aufgrund ihres Schaltercharakters als *switch I* und *switch II* bezeichnet⁽⁷²⁾. Diese Regionen besitzen eine höhere Flexibilität im Vergleich zu anderen Regionen des Proteins^(76,77). Die nukleotidvermittelten Konformationsänderungen begründen die erhöhte Affinität von Effektorproteinen für die aktive GTP-gebundene Konformation der kleinen GTPasen^(27,78,79). Als Beispiel für die Konformationsänderungen sind in Abbildung 1-4 die Konformationen der G-Domäne in Abhängigkeit des gebundenen Nukleotids für das Rab-Protein Ypt7 dargestellt⁽⁸⁰⁾.

Neben den *switch*-Bereichen konnten basierend auf den Strukturen 5 für die Nukleotidbindung wichtige Bereiche, bezeichnet als G-Motive (nummeriert von G1 bis G5), identifiziert werden⁽⁸¹⁾. Das aufgrund seiner Funktion auch als Phosphatbindungsschleife (P-Schleife) bezeichnete G1-Motiv (GxxxxGK[S/T], (x steht für eine beliebige Aminosäure)) bindet das β -Phosphat des gebundenen Nukleotids und ein Mg^{2+} -Ion in der Nukleotidbindungstasche. Ursprünglich wurde es in ATP- (Adenosintriphosphat-) bindenden Proteinen als Walker A Motiv beschrieben und vermittelt zusammen mit den G4 und G5 Motiven die hohe Affinität des Proteins zum Nukleotid^(71,82). Die G2- (T) und G3- (DxxGQ) Motive vermitteln über Amid-Gruppen der Hauptkette (Gly des G3-Motivs) Kontakte zu Sauerstoff-Atomen des γ -Phosphates von GTP sowie durch die Seitenkette des invarianten Thr des G2-Motivs zu einem Mg^{2+} -Ion in der Nukleotidbindungstasche und bedingen so den als *loaded spring* („gespannte Feder“) Mechanismus bezeichneten konformationellen Übergang zwischen der GDP- und der GTP- gebundenen

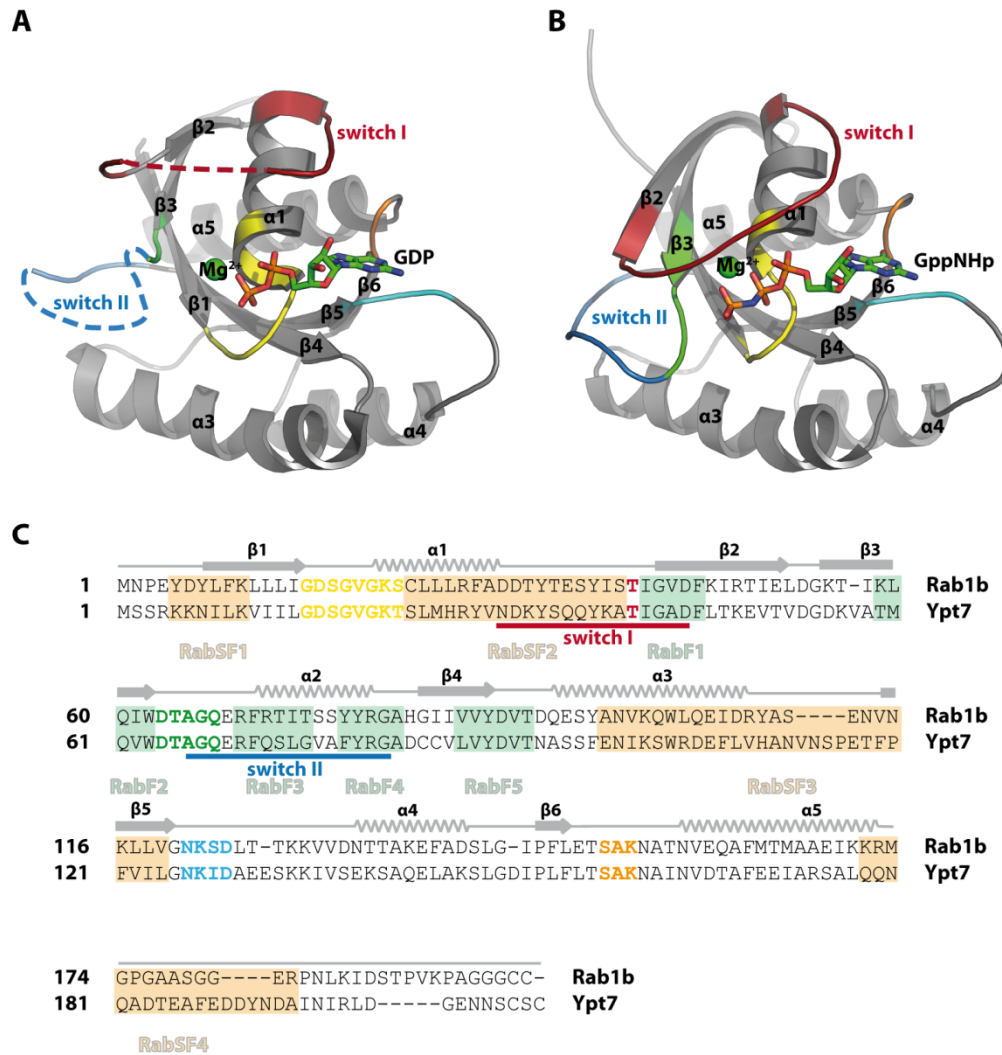


Abbildung 1-4: Vergleich der Struktur von Ypt7:GDP und Ypt7:GppNHp. (A) Struktur der G-Domäne von Ypt7:GDP (PDB Zugangsnummer 1KY3). *Switch I* und *switch II* sind in der GDP-gebundenen Struktur aufgrund der ungeordneten Struktur nur unvollständig zu sehen. (B) Struktur der G-Domäne von Ypt7:GppNHp (PDB Zugangsnummer 1KY2). Durch GTP (bzw. GppNHp) -Bindung liegen die *switch*-Bereiche in einer geordneten Struktur vor. In beiden Strukturen sind die *switch*-Bereiche (*switch I* – rot, *switch II* - blau) sowie die G-Motive (G1-Motiv [GxxxGK(S/T)] – gelb, G1-Motiv [T] – rot, G3-Motiv [DxxGQ] – grün, G4-Motiv [(N/T)KxD] – cyan und G5-Motiv [SAK] - orange) farblich hervorgehoben. (C) Sequenzvergleich des gezeigten Ypt7 mit humanem Rab1b, dem Rab-Protein welches in dieser Arbeit von zentraler Bedeutung ist. Die konservierten G-Motive sind mit denselben Farben wie in (A) und (B) hervorgehoben, weiterhin sind die RabF-Motive 1 - 5 (grün hinterlegt) sowie die RabSF-Motive 1 - 4 (orange hinterlegt) hervorgehoben. Siehe Text für weitere Erläuterungen.

Konformation der Ras-ähnlichen GTPasen^(71,83). Desweiteren ist das konservierte Gln des G3-Motivs essentiell für die intrinsische Hydrolyseaktivität, da es das γ -Phosphat in einem pentakovalenten Übergangszustand während der GTP-Hydrolyse stabilisiert⁽⁸⁴⁾. Das G4- ([N/T]KxD) und das weniger stark konservierte G5- (SAK) Motiv spielen eine wichtige Rolle bei der Bindung der Guanin-Base und der Diskriminierung gegenüber anderen Nukleotiden. Wichtige Kontakte zur Guanin-Base

werden durch die Seitenkette des Asp des G4-Motivs zur NH₂-Gruppe der Base sowie durch die Amidbindung des Ala des G5-Motivs zum Sauerstoff der Base gebildet^(70,71,85).

Da die G-Motive keine Abgrenzung der Rab-Proteine gegenüber anderen Mitgliedern der Familie der Ras-ähnlichen kleinen GTPasen erlauben wurden 5 weitere Sequenzmotive durch bioinformatische Studien identifiziert, welche diese Abgrenzung der Rab-Proteine von den anderen Mitgliedern der Superfamilie der Ras-ähnlichen kleinen GTPasen basierend auf der Aminosäuresequenz ermöglichen (Rab-Familien- (RabF-) Motive 1 - 5). Diese sind in und um die *switch*-Bereiche lokalisiert (Abbildung 1-4). Zusätzliche 4 Sequenzmotive ermöglichen weiterhin eine Unterteilung der Rab-Proteine in unterschiedliche Rab-Subfamilien (Rab-Subfamilien (RabSF-) Motive 1 - 4, Abbildung 1-4)^(34,35,86). Die RabSF-Motive bestimmen maßgeblich die Spezifität unterschiedlicher Rab-Proteine gegenüber Rab-spezifischen Effektorproteinen, GEFs und GAPs während die RabF-Motive vermutlich die Diskriminierung zwischen der aktiven und der inaktiven Konformation der Rab-Proteine erlauben und/oder die Bindung genereller Rab-bindender Proteine (wie REP und GDI) vermitteln⁽³⁵⁾. Vor kurzem wurde über den bisher umfassendsten Sequenzvergleich diverser Rab-Proteine aus eukaryotischen Organismen gezeigt, dass der letzte gemeinsame Vorfahre der Eukaryoten (engl.: *last eukaryotic common ancestor*, LECA) vermutlich bereits 20 verschiedene Rab-Proteine besessen hat. Diese Analyse erlaubte die Einordnung aller Rab-Proteine in 6 Supergruppen von Rab-Proteinen^(87,88).

Trotz der durch die RabF- und RabSF- Motive definierten Spezifitäten unterschiedlicher Effektorproteine, GEFs und GAPs können einige Mechanismen der Bindung dieser Faktoren an Rab-Proteine generalisiert werden⁽²⁷⁾. Die ersten strukturellen Einblicke in die Interaktion zwischen GAPs und Rho- bzw. Ras-GTPasen zeigten zusätzlich zum *cis*-Gln des G3-Motivs der kleinen GTPasen die Involvierung eines essentiellen Arg-Fingers, der das aktive Zentrum vervollständigt und so die Hydrolyse stimuliert^(89,90). Bei Rab-GAPs hingegen zeigte sich die Involvierung sowohl eines katalytisch essentiellen Arg sowie eines weiteren *trans*-Gln des GAPs, während das Gln des G3-Motivs des Rab-Proteins durch Interaktion mit dem GAP aus dem aktiven Zentrum entfernt wird^(26,27,91). Bei Rab-GEFs spielen vornehmlich Interaktionen mit den *switch*-Bereichen und mit der P-Schleife zur Öffnung der Nukleotidbindungstasche und somit einer Beeinträchtigung wichtiger Interaktionen zwischen dem Nukleotid und dem Rab-Protein eine wichtige Rolle. Die daraus resultierende Verringerung der Affinität der Rab-Proteine zum Nukleotid sowie die Stabilisierung des nukleotidfreien Zustands der Rab-Proteine führt zu der effektiven Katalyse des Nukleotidaustausches. Weiterhin konnten Mechanismen zur Verdrängung des Mg²⁺-Ions beobachtet werden, welche ebenfalls zu einer verringerten Affinität zwischen der kleinen GTPase und dem Nukleotid führen^(26,27). Interaktionen mit Effektorproteinen wiederum erfolgen über eine oder zwei

α -Helices der Effektorproteine, welche häufig in einer *coiled-coil* Struktur vorliegen, mit den *switch*- und *interswitch*-Bereichen der Rab-Proteine. In Rab-Effektor-Interaktionen konnte dabei die Interaktion des Effektors mit einer hydrophoben Triade aus einem Phe, Trp und Tyr (Phe₄₅, Trp₆₂ und Tyr₇₇ in Rab1b) sowie einer hydrophoben Tasche (Val₄₃, Phe₇₀ und Ile₇₃ in Rab1b) beobachtet werden, wobei die Spezifität der Effektoren gegenüber unterschiedlichen Rab-Proteinen durch weitere Interaktionen mit den zuvor beschriebenen variablen Bereichen der Rab-Proteine entsteht ^(27,92).

Neben der beschriebenen relativ konservierten G-Domäne weisen Rab-Proteine eine C-terminale hypervariable Region auf, welche die für die Prenylierung und damit die Membranbindung essentiellen Cysteine enthält ^(37,38,93). Aufgrund der Variabilität der Aminosäuresequenz im Gegensatz zur starken Konservierung der G-Domäne wurde diesen Bereichen anfänglich eine wichtige Funktion in der intrazellulären Lokalisation der Rab-Proteine an distinkte Organellen zugesprochen, diese Funktion des C-Terminus konnte jedoch nicht für alle Rab-Proteine bestätigt werden ^(94,95).

1.2 Bakterien manipulieren gezielt den vesikulären Transport

Zahlreiche pathogene Bakterien haben einen Lebenszyklus entwickelt, in dem sie intrazellulär in Wirtszellen überleben ⁽⁹⁶⁾. Um ihr Überleben zu gewährleisten nutzen diese Organismen Virulenzfaktoren zur Generierung intrazellulärer Nischen und zur Verhinderung ihrer Degradierung im Lysosom. Bis heute wurden sehr unterschiedliche Mechanismen entdeckt und beschrieben, die diesem Zweck dienen. Einige Pathogene haben Mechanismen entwickelt, um trotz der lebensfeindlichen Umgebung in Lysosomen zu überleben (z. B. *Coxiella burnetii*) oder um in das weniger lebensfeindliche Zytosol der Wirtszelle zu entkommen (z. B. *Listeria monocytogenes*). Andere Pathogene wiederum modifizieren aktiv den vesikulären Transport der Wirtszellen, um so nach der phagozytotischen Aufnahme durch die Wirtszelle dem lysosomalen Abbau zu entgehen (z. B. *Legionella pneumophila*). Hierbei stellen die Rab-Proteine als zentrale Regulatoren des vesikulären Transportes ein wichtiges Angriffsziel der Pathogene dar ^(6,69,97,98). Die faszinierenden Mechanismen der Einflussnahme der Bakterien auf intrazelluläre Transportprozesse bieten dabei eine relativ einfache Möglichkeit der Entdeckung und Erforschung bisher unbekannter regulatorischer Mechanismen, welche möglicherweise auch in Eukaryoten physiologisch relevant sind. Als zentraler Bestandteil dieser Arbeit wird im Folgenden auf *L. pneumophila* und die Mechanismen der intrazellulären Vermehrung mit einem Fokus auf die Einflussnahme auf vesikuläre Transportprozesse durch *L. pneumophila* eingegangen.

1.2.1 *Legionella pneumophila*

L. pneumophila ist ein opportunistisches gramnegatives Bakterium, welches mehr als 13 Arten unterschiedlicher Amöben sowie, aufgrund der zellbiologischen Verwandtschaft, auch humane alveolare Makrophagen infizieren kann^(99,100). Eine ausgiebige Charakterisierung dieser Bakterien erfolgte nach dem Ausbruch einer Lungenentzündung bei 182 Teilnehmern einer Kriegsveteranenkonferenz in Philadelphia im Jahr 1976 durch den bis dahin unbekannten Erreger, die für 29 Teilnehmer tödlich verlief^(101,102). Heute ist bekannt, dass die Bakterien in warmen Frischwassersystemen wie Duschen und Klimaanlage leben und sich in den oben genannten Wirtszellen vermehren können⁽¹⁰³⁾. Immundefiziente Menschen können durch Einatmen bakterienhaltiger Aerosole infiziert werden, eine Übertragung von Mensch zu Mensch ist hingegen nicht bekannt^(99,100). Neben der genannten Lungenentzündung (auch Legionärskrankheit oder Legionellose) können diese Bakterien beim Menschen auch das milder verlaufende Pontiac-Fieber verursachen⁽¹⁰⁴⁾.

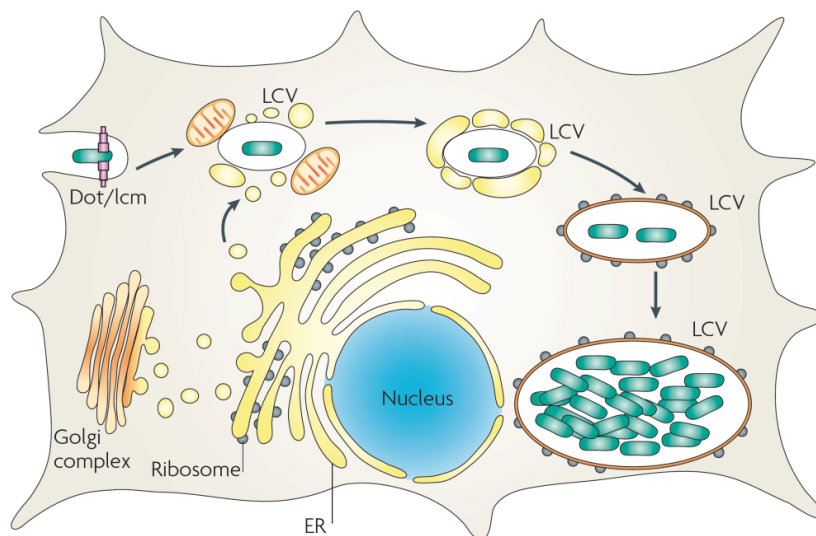


Abbildung 1-5: Der intrazelluläre Lebenszyklus von *Legionella pneumophila*. Nach der phagozytischen Aufnahme in Makrophagen injizieren Legionellen zahlreiche Proteine mittels eines T4 Sekretionssystems (T4SS), welches als Dot/Icm bezeichnet wird (engl.: *defect in organelle trafficking/intracellular multiplication*), in das Zytosol der Wirtszelle. Hierdurch wird unter anderem der Abbau durch den lysosomalen Weg verhindert. Stattdessen werden ER-stämmige Vesikel zur LCV rekrutiert und die Bakterien können sich intrazellulär in der gebildeten Replikationsvakuole vermehren. Abbildung entnommen aus⁽¹⁰⁵⁾.

Nach der Inhalation bakterienhaltiger Aerosole werden diese durch alveolare Makrophagen phagozytiert, die Bakterien werden jedoch nicht dem üblichen lysosomalen Abbau zugeführt und eine Azidifizierung der Legionellen enthaltenden Vakuole (engl.: *Legionella containing vacuole*, LCV) wird verhindert^(106,107). Es konnte gezeigt werden, dass Legionellen unter anderem zu diesem Zweck über ein Typ 4 Sekretionssystem (T4SS) mehr als 250 unterschiedliche Proteine in das Zytosol der Wirtszelle

injizieren (Abbildung 1-5)^(108,109). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Rab-Proteine Rab1, Rab7, Rab8 und Rab14 sowie die kleine GTPase Arf1 während der Infektion an die LCV rekrutiert werden^(110,111). Die Rekrutierung von ER-stämmigen Vesikeln führt schließlich zur Formierung einer Replikationsvakuole in den infizierten Zellen, in der sich die Legionellen vermehren und schließlich nach dem Absterben der Wirtszelle freigesetzt werden^(103,105). Insbesondere die Rekrutierung und Funktion von Rab1 im Infektionszyklus wurde in der Vergangenheit intensiv untersucht und ist auch zentrales Thema dieser Arbeit.

1.2.1.1 Rab1 interagierende Proteine von *Legionella pneumophila*

Bis heute sind zahlreiche Proteine beschrieben worden, die durch Legionellen in die Wirtszelle injiziert werden und Rab1 auf unterschiedliche Weise manipulieren (eine aktuelle Zusammenfassung bieten die Referenzen^(69,112)). Im Folgenden sollen diese Proteine kurz eingeführt werden.

Das erste identifizierte Rab1-interagierende Protein war DrrA (engl.: *defect in Rab recruitment A*), welches auch als SidM (engl.: *substrate of Icm/Dot M*) bezeichnet wird und zunächst als bifunktionelles Protein mit GEF- und GDF-Aktivität beschrieben wurde⁽¹¹³⁻¹¹⁶⁾. Später konnte jedoch gezeigt werden, dass keine echte GDF-Aktivität besteht und diese eine passive Konsequenz aus der GEF-Aktivität darstellt⁽⁴⁵⁾. Die C-terminale Domäne bindet mit hoher Affinität ($K_D = 18 \text{ nM}$) an Phosphatidylinositol-4-phosphat (PI4P)^(117,118) (die Domänenstruktur von DrrA ist in Abbildung 1-6 gezeigt). Nach Bindung an die LCV-Membran mittels der PI4P-bindenden Domäne (P4M) kann DrrA Rab1 durch die GEF-Aktivität an die LCV rekrutieren^(45,117-119). Neben DrrA ist LepB als GAP ein weiteres regulatorisches Legionellenprotein für Rab1⁽¹¹⁵⁾. Sowohl für Rab1 als auch für DrrA konnte eine Lokalisierung an der LCV-Membran etwa während der ersten 4 Stunden der Legionelleninfektion beobachtet werden, während LepB langsam während der ersten 8 Stunden an der LCV akkumuliert. Die Abnahme der Lokalisation von DrrA an der LCV ist dabei durch die Veränderung der Membranzusammensetzung und eine Abnahme der PI4P-Konzentration der Membran der LCV während der Infektion zu erklären⁽¹¹⁵⁾. Eine Aminosäuresequenzanalyse von LepB hingegen zeigt zwei putative Transmembranbereiche, über welche LepB vermutlich an die LCV-Membran bindet. Da GDI nur Rab1 in der GDP-gebundenen Konformation mit hoher Affinität bindet⁽⁴⁶⁾ ist die Extraktion durch GDI und die Entfernung von Rab1 von der LCV-Membran erst nach Deaktivierung durch LepB möglich (vergleiche Kapitel 1.1.2). Als weiteres Rab1-interagierendes Protein konnte LidA identifiziert werden. Dieses Protein bindet vermutlich über Phosphatidylinositol-3-phosphat (PI3P) und PI4P an die LCV Membran^(118,120,121). Da LidA

verschiedene Rab-Proteine (Rab1, Rab6 und Rab8) sowohl in der GDP- als auch der GTP-gebundenen Form mit ungewöhnlich hoher Affinität bindet wurde es als Rab-Supereffektor bezeichnet^(116,120,122). Hierbei konnte die ungewöhnlich hohe Affinität auf struktureller Ebene durch eine besonders große Interaktionsfläche zwischen LidA und dem gebundenen Rab-Protein zurückgeführt werden^(122,123). Während für Legionellen mit einer Deletion von DrrA keine signifikante Rekrutierung von Rab1 zur LCV, jedoch eine uneingeschränkte Vermehrung in infizierten Zellen beobachtet werden konnte, wurde für LidA defiziente Legionellen eine eingeschränkte Vermehrung in Wirtszellen beschrieben⁽¹¹⁶⁾.

Neben diesen gewöhnlichen Rab1-interagierenden Proteinen (GEF, GAP und Effektor) konnten kürzlich zwei Proteine beschrieben werden, welche Rab1 (und Rab35) mittels einer posttranslationalen Modifikation manipulieren. Zunächst wurde gezeigt, dass AnkX aus Legionellen Rab1 an einem Serin (Ser₇₉ in Rab1a, Ser₇₆ in Rab1b) bzw. dem homologen Thr in Rab35 im Bereich des *switch II* kovalent mit einem Phosphocholin-Rest modifizieren kann und CDP- (Cytidin-5'-diphosphat-) Cholin als Substrat nutzt (modifizierte Rabs werden im Folgenden als PC-Rabs bezeichnet)⁽¹²⁴⁾. Die Interaktion von Rab35 mit dem GEF connectenn-1 sowie die Bindung von Rab1 an GDI sind durch die Modifikation stark beeinträchtigt, wohingegen die GEF-Domäne von DrrA und die Bindung der Effektorproteine LidA aus Legionellen und das humane Mical-3 nicht signifikant beeinträchtigt sind. Für die Interaktion mit den GAPs LepB und TBC1D20 konnte eine leichte Beeinträchtigung durch die kovalente Modifikation beobachtet werden^(124,125). Aufgrund der Inhibierung der GDI-Bindung durch die Phosphocholinierung wurde eine Funktion dieser Modifizierung in der Fixierung modifizierter Rab-Proteine in Membranen postuliert, indem die Extraktion durch GDI verhindert wird^(48,125). Kurz nach der Entdeckung der Phosphocholintransferaseaktivität durch AnkX wurde ein weiteres Protein aus Legionellen identifiziert, welches die Modifizierung wieder entfernen kann und als Lem3 bzw. Ipg0696 bezeichnet wird^(125,126).

1.2.1.1.1 Die Struktur der N-terminalen Domäne von DrrA

Im vorhergehenden Kapitel wurden bereits die Funktionen der GEF- (Aminosäuren 340-533) und der P4M- (Aminosäuren 534-647) Domänen von DrrA beschrieben. Da DrrA einen weiteren großen Bereich (Aminosäuren 1-339) mit unbekannter Funktion enthielt und eine Funktion anhand der Aminosäuresequenz nicht vorhergesagt werden konnte wurde durch Heide Behrmann (geb. Peters) und Prof. Dr. Wulf Blankenfeldt die Struktur eines Fragmentes dieser Domäne mittels Röntgenkristallstrukturanalyse gelöst⁽¹²⁷⁾. Die Domänenstruktur von DrrA sowie die Röntgenkristallstruktur von DrrA₉₋₂₁₈ sind in Abbildung 1-6 (A und B) gezeigt.

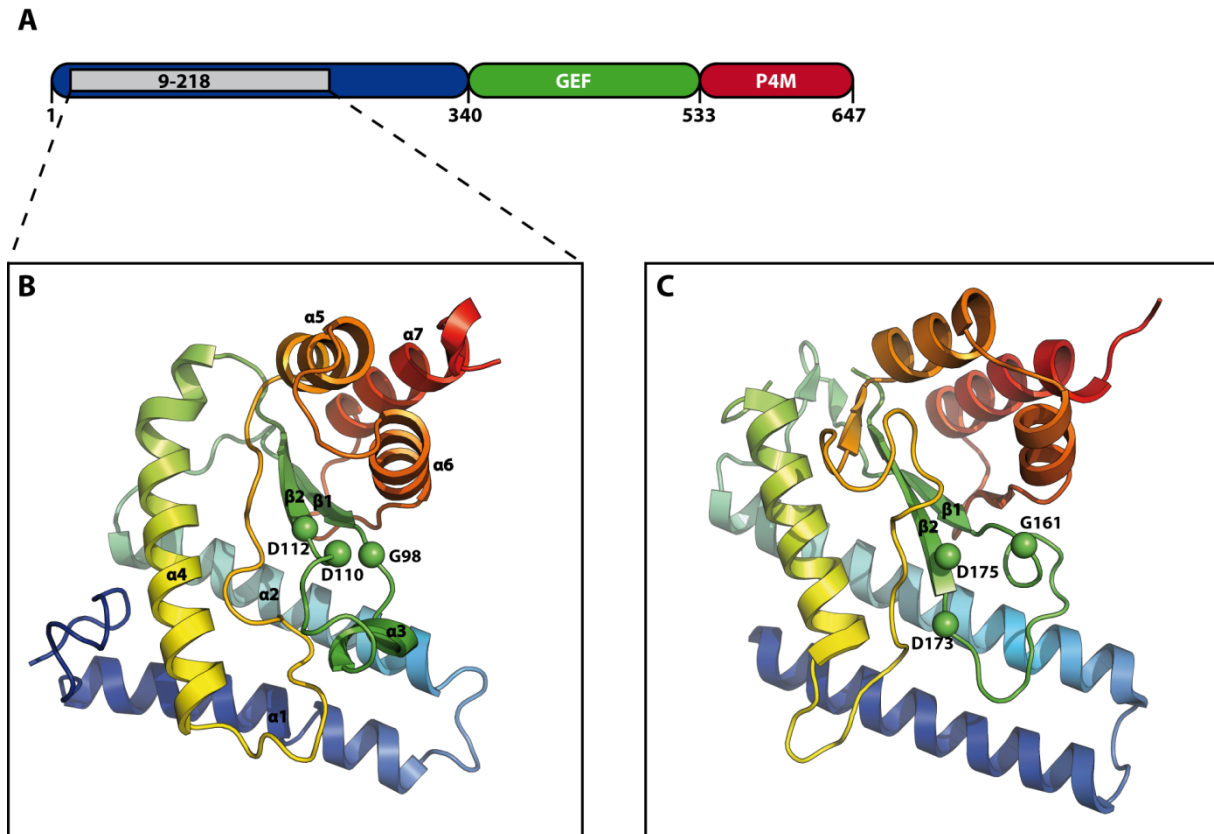


Abbildung 1-6: Die N-terminale Domäne von DrrA besitzt eine starke strukturelle Homologie zu Nukleotidyltransferasen. (A) Domänenstruktur von DrrA, die Reste 1-340 (blau) mit zu Beginn dieser Arbeit unbekannter Funktion, 340-533 (grün) entsprechen der GEF-Domäne und die Reste 533-647 (rot) der P4M-Domäne von DrrA. Das kristallisierte Fragment DrrA₉₋₂₁₈ ist grau hervorgehoben. **(B)** Struktur von DrrA₉₋₂₁₈ (PDB Zugangsnummer 3NKU). Die Cα-Atome des katalytischen Motivs Gx₁₁[D/E]x[D/E] sind als grüne Kugeln angedeutet, die restliche Struktur ist in der Bänderdarstellung gezeigt. **(C)** Gezeigt sind die Reste 81-288 der Struktur der N-terminalen Domäne der Glutamin Synthetase Adenylyltransferase (GSAAtase) aus *E. coli* (PDB Zugangsnummer 1V4A)⁽¹²⁸⁾. Die Cα-Atome des katalytischen Motivs Gx₁₁[D/E]x[D/E] sind als grüne Kugeln, die restliche Struktur ist in der Bänderdarstellung gezeigt. Die Darstellung von Molekülstrukturen erfolgte mittels PyMol 1.4⁽¹²⁹⁾. Abbildung modifiziert nach⁽¹²⁷⁾.

Mittels einer Suche nach strukturell homologen Proteinen konnte eine hohe strukturelle Homologie zu Mitgliedern der Familie der DNA-Polymerase β-ähnlichen Nukleotidyltransferasen gezeigt werden. Als Beispiel ist in Abbildung 1-6 (C) die Röntgenkristallstruktur eines Fragments der N-terminalen Domäne der Glutamin Synthetase Adenylyltransferase (GSAAtase) aus *E. coli* gezeigt^(127,128,130). Hier zeigt sich, dass beide Proteine eine sehr ähnliche Tertiärstruktur besitzen. Neben dieser generellen hohen strukturellen Homologie konnte weiterhin eine ähnliche Position des katalytischen Motivs Gx₁₁[D/E]x[D/E] (Gly89, Asp110 und Asp112 in DrrA; Gly161, Asp173 und Asp175 in der GSAAtase; x entspricht einer beliebigen Aminosäure) in beiden Proteinen beobachtet werden. Aufgrund dieser Tatsachen wurde vermutet, dass

DrrA ebenfalls Nukleotidyltransferaseaktivität besitzt. Die Untersuchungen dieser Aktivität sind zentrales Thema dieser Arbeit.

1.2.1.1.2 Die Nukleotidylierung ist ein weit verbreitetes Prinzip der Biochemie

Die Nukleotidylierung beschreibt den Prozess der Übertragung eines Nukleosidmonophosphats vom entsprechenden Nukleosidtriphosphat auf das zu modifizierende Molekül. Diese Nukleotidylierung und insbesondere die Adenylierung ist ein weit verbreitetes Prinzip zur Regulation biochemischer Prozesse, wobei diese zum einen der stabilen posttranslationalen Modifikation von Zielmolekülen und zum anderen der transienten Modifizierung zur thermodynamischen Aktivierung chemischer Reaktionen dienen kann. Aufgrund der diversen Funktionen der Adenylierung in der Biochemie kann eine vollständige Aufzählung an dieser Stelle nicht erfolgen und es werden ausschließlich einige repräsentative Beispiele im Text besprochen. Die Tabelle 1-2 gibt einen Überblick über die besprochenen Enzyme.

Als Beispiele der thermodynamischen Aktivierung durch Adenylierungen sollen hier kurz die Mechanismen der Aminoacyl-tRNA-Synthetase sowie der DNA-Ligase eingeführt werden. Im Reaktionsmechanismus der Aminoacyl-tRNA-Synthetase wird zunächst die Carboxylfunktion der Aminosäure unter Bildung eines gemischten Anhydrids adenyliert, um im nächsten Schritt die kovalente Bindung der Aminosäure an die tRNA zu ermöglichen. Die DNA-Ligase wiederum bindet zunächst das AMP über eine Lysinseitenkette unter Bildung eines Phosphoramids. Im Folgenden wird das AMP auf das 5'-Phosphat des DNA-Stranges unter Bildung eines Anhydrids übertragen und ermöglicht so den Angriff der 3'-OH-Gruppe und die Ligation der DNA. In beiden Reaktionsmechanismen wird so die thermodynamisch ungünstige Bildung einer kovalenten Bindung mit der Hydrolyse von ATP und dem während der Reaktion gebildeten Pyrophosphat (PP_i) gekoppelt, um die Gesamtreaktion thermodynamisch zu ermöglichen ^(5,131,132).

Im Unterschied zu diesen transienten Modifizierungen gibt es auch eine Reihe von Beispielen in der Biochemie, die eine stabile Nukleotidylierung beinhalten. Hierbei werden im Gegensatz zu den vorherigen Beispielen Hydroxylfunktionen der Moleküle unter Bildung von Phosphodiester-Bindungen modifiziert. Eine wichtige Funktion besitzt beispielsweise die Polyadenylierung durch Poly(A)-Polymerasen (PAP) zur Prozessierung von mRNAs in Eukaryoten und der damit einhergehenden Stabilisierung der prozessierten mRNA gegenüber Degradierung ^(133,134). In den 1960er Jahren wurde die Adenylierung zudem zum ersten Mal als posttranslationale Modifikation eines Proteins zur Regulation

dessen Aktivität identifiziert. Stadtman *et al.* ⁽¹³⁵⁾ konnten zeigen, dass die Glutamin Synthetase durch reversible Adenylierung eines Tyrosin-Restes durch die Glutamin Synthetase Adenylyltransferase (GSAtase) reguliert wird, wobei dieses Enzym wiederum durch ein weiteres Protein (P_{II}) reguliert wird, welches einer reversiblen Uridylierung durch die P_{II} -Uridylyltransferase (P_{II} -Utase) unterliegt ⁽¹³⁵⁻¹³⁷⁾. Die Kanamycin Nukleotidyltransferase (KNT), welche zuerst aus dem pathogenen Bakterium *Staphylococcus aureus* isoliert wurde, kann die Nukleotidyllylierung von Kanamycin und weiteren Aminoglykosidantibiotika unter Verwendung von ATP, GTP und UTP katalysieren. Hierdurch vermittelt die KNT die Resistenz gegenüber diesen Antibiotika durch eine Inhibierung der Bindung der Antibiotika an die 30S-Untereinheit der bakteriellen Ribosomen ⁽¹³⁸⁾. Sowohl die PAP und die KNT als auch die GSAtase besitzen eine konservierte DNA-Polymerase β -ähnliche Nukleotidyltransferasedomäne zur Katalyse, welche auch in vielen anderen Proteinen konserviert ist und das konservierte katalytische Motiv $Gx_{11}[D/E]x[D/E]$ besitzt ^(130,133).

Vor kurzem wurde die Nukleotidyllylierung als posttranslationale Modifizierung zur Regulation von Wirtszellproteinen durch pathogene Bakterien wiederentdeckt und auch als AMPylierung bezeichnet ^(139,140). Im Gegensatz zu den zuvor besprochenen Enzymen der Familie der DNA-Polymerase β -ähnlichen Nukleotidyltransferasen ist bei diesen Enzymen jedoch eine strukturell nicht verwandte Domäne, die Fic-Domäne (engl.: *filamentation induced by 3'-5'-cyclic AMP*) mit dem katalytischen Motiv $HPFx[D/E]GN[G/K]R$ und insbesondere dem konservierte His dieses Motivs, für die Katalyse essentiell ⁽¹⁴¹⁾. Drei Enzyme dieser Familie wurden bisher genauer charakterisiert. Das Enzym VopS aus *Vibrio parahaemolyticus* katalysiert die Adenylierung eines Thr-Restes und IbpA aus *Histophilus somni* die Adenylierung eines Tyrosin-Restes in der *switch I* Region von Rho-GTPasen, wodurch die Bindung der Rho-GTPasen an Effektor-Proteine inhibiert wird ^(139,140). Auch das bereits besprochene Enzym AnkX aus *L. pneumophila* enthält eine Fic-Domäne, welche jedoch die Phosphocholinierung eines Ser von Rab1 bzw. eines Thr von Rab35 im Bereich der *switch II* Region katalysiert (vergleiche Kapitel 1.2.1.1) ⁽¹²⁴⁾. Auch der Mensch besitzt mindestens ein Fic-Domänen enthaltendes Enzym mit dem Namen HYPE, das Rho-GTPasen *in vitro* adenylieren kann, dessen physiologische Funktion jedoch bisher unbekannt ist ⁽¹⁴⁰⁾.

Tabelle 1-2: Auflistung einiger Enzyme, welche die Nukleotidylierung bzw. Phosphocholinierung verschiedener Zielmoleküle katalysieren ^[1].

	Enzym	Organismen	katalysierte Reaktion	Zielmoleküle	Funktion	Quellen
Nukleotidylyl-transferasen (katalytisches Motiv G_x₁₁[D/E]x[D/E])	DNA-Polymerase β	Eukaryoten	Templat-abhängige DNA-Synthese	DNA	DNA-Reparatur	(142)
	GSAtase	viele	Adenylierung	Glutamin Synthetase	metabolische Kontrolle	(135)
	P _{II} -Utase	viele	Uridylierung	P _{II}	metabolische Kontrolle	(135)
	PAP	Eukaryoten	(poly-) Adenylierung	mRNA	mRNA Stabilität	(134)
	KNT	<i>S. aureus</i>	Nukleotidylierung (ATP, GTP, UTP)	Kanamycin	Resistenz gegen Antibiotika	(138)
Fic-Domänen Enzyme (katalytisches Motiv HPF_x[D/E]GN[G/K]R)	VopS	<i>V. parahaemolyticus</i>	Adenylierung	Rho-GTPasen	Pathogenität (Zytoskelett)	(139)
	IbpA	<i>H. somni</i>	Adenylierung	Rho-GTPasen	Pathogenität (Zytoskelett)	(140)
	AnkX	<i>L. pneumophila</i>	Phosphocholinierung	Rab1, Rab35	Pathogenität (vesikulärer Transport)	(124)
	HYPE	<i>H. sapiens</i>	Adenylierung	Rho-GTPasen (?)	?	(140)
weitere Enzyme mit unverwandter Struktur	DNA-Ligase	viele	DNA-Ligation	DNA	DNA-Ligation (-Reparatur)	(5,132)
	Aminoacyl-tRNA-Synthetase	viele	Aminosäure-tRNA Ligation	Aminosäuren	Aminosäureaktivierung	(5,131)

^[1] Erläuterungen im Text. ? bedeutet (*in vivo*) unbekannt.

2 ZIELSETZUNG

Posttranslationale Modifikationen (PTMs) von Proteinen sind ein weit verbreiteter Mechanismus zur Modulation und Diversifizierung von Proteinaktivitäten⁽¹⁴³⁾. Insbesondere wurden Enzyme, welche posttranslationale Modifikationen wichtiger regulatorischer eukaryotischer Proteine katalysieren, in der Vergangenheit auch als Pathogenitätsfaktoren beschrieben^(98,144,145). Zwei sehr interessante Entdeckungen stellen dabei die Fic-Domänen enthaltenden Enzyme VopS aus *Vibrio parahaemolyticus* und IbpA aus *Histophilus somni* dar, welche die Adenylylierung von Rho-GTPasen im Bereich des *switch I* katalysieren^(139,140).

Zu Beginn dieser Arbeit konnte durch Heide Behrmann (geb. Peters) und Prof. Dr. Wulf Blankenfeldt die Struktur eines Fragmentes der N-terminalen Domäne des Legionellenenzym DrrA mittels Röntgenkristallstrukturanalyse gelöst werden. Diese zeigte eine hohe strukturelle Homologie zu DNA-Polymerase β -ähnlichen Nukleotidyltransferasen, insbesondere zur Glutamin Synthetase Adenylyltransferase⁽¹²⁷⁾. Weiterhin hatten erste Experimente gezeigt, dass Rab1, das regulatorische Protein des vesikulären Transportes zwischen dem endoplasmatischem Retikulum und dem Golgi Apparat, durch DrrA adenylyliert werden kann. Neben den zuvor beschriebenen Enzymen VopS und IbpA stellte dies die erste Entdeckung der Adenylylierung als PTM kleiner GTPasen dar, insbesondere für Rab-Proteine konnte dies zuvor noch nicht beobachtet werden.

Um die potentielle Funktion dieser Domäne im Infektionszyklus von Legionellen zu verstehen sollte die Adenylyltransferase Domäne sowie modifizierte Substrate sowohl strukturell als auch biochemisch im Detail untersucht werden. Zum einen sollte hierzu die Röntgenkristallstruktur des kovalent modifizierten Rab1 bestimmt werden, um strukturelle Einblicke in die Modifizierung und deren mögliche Effekte zu erlangen. Weiterhin sollte DrrA biochemisch charakterisiert werden, um Einblicke in den Katalysemechanismus und die Substratspezifitäten von DrrA zu erhalten. Darüber hinaus sollten zum weiteren Verständnis der Funktion der Modifizierung die Auswirkungen der Adenylylierung auf die Interaktion von Rab1-AMP mit GEFs, GAPs und Effektorproteinen untersucht werden und mit der Interaktion von unmodifiziertem Rab1 verglichen werden. Einige der während dieser Dissertation durchgeführten Experimente deuteten an, dass Legionellen auch ein demodifizierendes Enzym besitzen könnten. Aus diesem Grund sollte versucht werden, dieses putative Enzym zunächst zu identifizieren und anschließend strukturell und biochemisch zu charakterisieren.

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Material

3.1.1 Chemikalien

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden von den Herstellern in Tabelle 3-1 in größtmöglicher Reinheit bezogen.

Tabelle 3-1: Liste der verwendeten Chemikalien.

Hersteller	Chemikalien
AppliChem (Darmstadt, Deutschland)	Acrylamid 4K-Lösung (30 %, Mix 37.5 : 1), Ammoniumsulfat, Dikaliumhydrogenphosphat, Isopropyl- β -D-thiogalaktopyranosid (IPTG), Methanol, Pepstatin A, Salzsäure (25 %)
Biomol GmbH (Hamburg, Deutschland)	Carbenicillin (Natriumsalz)
Calbiochem / Merck (Darmstadt, Deutschland)	Rinderserumalbumin
Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)	Adenosin-5'-triphosphat (ATP), Antipain, Chloramphenicol, Glycin, Leupeptin, N, N, N', N' - Tetramethylethylendiamin (TEMED), Tris - (hydroxymethyl) - aminomethan (Tris)
Difco Microbiology/ Voigt Global Distribution Inc. (Lawrence, USA)	Agar, Trypton, Hefeextrakt
Fermentas (St. Leon-Rot, Deutschland)	dNTPs
Fluka / Sigma-Aldrich (München, Deutschland)	Bariumchlorid, Isopropanol, Polyethylenglycol (PEG) 200, PEG 4000, PEG 8000, Tetracyclin, Trifluoressigsäure (TFA), Tris-(2-Carboxyethyl)-phosphin (TCEP)
Gerbu (Gaiberg, Deutschland)	Ampicillin (Natriumsalz), Dithioerythritol (DTE), Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) (Dinatriumsalz), Glycerin, 4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethansulfonsäure (Hepes), Kanamycinsulfat, Natriumlaurylsulfat (SDS)

Hersteller	Chemikalien
iNtRON Biotechnology (Sangdaewong-Dong, Südkorea)	RedSafe™ Nucleic Acid Staining Solution
Invitrogen (Darmstadt, Deutschland)	Agarose
Jena Bioscience (Jena, Deutschland)	2'/3'-O-(N-methyl-anthraniloyl) (mant) - Desoxyguanosin-5'-diphosphat (mdGDP), mant-Guanosin-5'-triphosphat (mantGTP)
J. T. Baker / Mallinckrodt Baker B.V. (Deventer, Niederlande)	2-Propanol, Essigsäure, Ethanol, Kaliumchlorid, Kaliumdihydrogenphosphat, Magnesiumchlorid, Natronlauge (2M), Salzsäure (1M)
LGC Promochem (Wesel, Deutschland)	Acetonitril
Merck (Darmstadt, Deutschland)	Dinatriumhydrogenphosphat, Imidazol
MP Biomedicals LLC (Illkirch, Frankreich)	Natriumdihydrogenphosphat
PerkinElmer (Waltham, USA)	[α - ³² P]-Adenosin-5'-triphosphat
Serva (Heidelberg, Deutschland)	Ammoniumperoxosulfat (APS), β -Mercaptoethanol, Bromphenolblau, Coomassie Brilliant Blue R250, Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)
Sigma-Aldrich (München, Deutschland)	Chymostatin, Ammoniumsalz, Guanosin-5'-monophosphat (GMP), Guanosin-5'-diphosphat (GDP), Guanosin-5'-triphosphat (GTP), Guanosin-5'-(β,γ -imido)-triphosphat (GppNHp), Imidazol, Natriumchlorid, Nickel(II)sulfathexahydrat, Tetrabutylammoniumbromid, Tris - (hydroxymethyl) - aminomethan (Tris)
Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, USA)	Coomassie Protein Assay Reagent, Rinderserumalbumin

3.1.2 Enzyme, Reagenzien und Standards

Die folgende Tabelle gibt eine Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Enzyme, Reagenzien und Standards.

Tabelle 3-2: Liste der verwendeten Enzyme, Reagenzien und Standards.

Hersteller	Chemikalien
BioRad Laboratories GmbH (München, Deutschland)	Gelfiltrationsstandard
Fermentas (St. Leon-Rot, Deutschland)	GeneRuler™ 1kb DNA Ladder, FastDigest® Restriktionsenzyme, alkalische Phosphatase aus Krabben (SAP, <i>Shrimp Alkaline Phosphatase</i>), T4 DNA Ligase
Finnzymes (Vantaa, Finnland)	Phusion® High-Fidelity PCR Master Mix
GE Healthcare (München, Deutschland)	LMW (<i>low molecular weight</i>) Marker
Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie (Dortmund, Deutschland)	PreScission Protease, TEV-Protease
New England Biolabs GmbH (Frankfurt, Deutschland)	Anorganische Pyrophosphatase aus Hefe
Sigma-Aldrich (München, Deutschland)	REDTaq DNA-Polymerase

3.1.3 Kits

Die folgende Tabelle gibt eine Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Kits.

Tabelle 3-3: Liste der verwendeten Kits.

Hersteller	Chemikalien
Applied Biosystems (Darmstadt, Deutschland)	BigDye Terminator v 3.1. Cycle Sequencing Kit
Corning Inc. (New York, USA)	Corning® Next Generation CrystalEX Microplates 3550
Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen, Deutschland)	96 well microplate v-shape
Hampton Research (Aliso Viejo, CA, USA)	Additive Screen HT

Hersteller	Chemikalien
Qiagen (Hilden, Deutschland)	DyeEx 2.0 Spin Kit, JCSG Core I – IV Suites, JCSG+ Suite, Classics Suite, PACT Suite, PEG I + II Suite, Protein Complex Suite, QIAprep Spin Miniprep Kit, QIAquick Gel Extraction Kit, QIAquick PCR Purification Kit
Stratagene / Agilent Technologies (Waldbronn, Deutschland)	QuikChange II XL Site-Directed Mutagenesis Kit

3.1.4 Sonstige Materialien

Die folgende Tabelle gibt eine Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten sonstigen Materialien.

Tabelle 3-4: Liste der sonstigen verwendeten Materialien.

Hersteller	Material
Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)	Glaskugeln (2.85-3.45 mm)
Eppendorf (Hamburg, Deutschland)	Reaktionsgefäße (0.5 ml, 1 ml und 2 ml)
GE Healthcare (München, Deutschland)	NAP-5 Säulen, PD-10 Säulen, XK26/20 Säule
Hellma GmbH & Co. KG (Müllheim, Deutschland)	Quartz-Küvette 105.202-QS (10 mm), CD-Küvette 106-QS (0.5 mm)
Millipore (Schwalbach, Deutschland)	Zentrifugalkonzentratoren Amicon Ultra 10K/30K, Stirred Cells Modell 8050 und 8200, Ultrafiltrationsmembranen PLGC (10/30 kDa MWCO)
Nalgene Labware (Roskilde, Dänemark)	Bottle Top Filter
Nerbe (Winsen/Luhe, Deutschland)	Pipettenspitzen (1-10 µl, 20-200 µl 100-1000 µl)
PeqLab Biotechnology GmbH (Erlangen, Deutschland)	Elektroporationsküvetten (2 mm)
Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)	Plastikpipetten (steril, 5 ml, 10 ml und 25 ml), Plastik-Küvetten, Reaktionsgefäße (15 ml und 50 ml)
Spectrum Laboratories Inc. (Breda, Niederlande)	Spectra/Por® Dialysemembranen (MWCO zwischen 3.5 und 14 kDa)

Hersteller	Material
Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, USA)	Slide-A-Lyzer Dialysekassetten (MWCO 10 kDa)
Whatman International Ltd (Kent, UK)	P-81 Filterpapier

3.1.5 Bakterien und Plasmide

Die folgenden Tabellen geben eine Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Bakterien und Plasmide.

Tabelle 3-5: Liste der verwendeten Bakterienstämme.

Stamm	Genotyp	Hersteller
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	B F ⁻ <i>ompT hsdS</i> (rB ⁻ mB ⁻) <i>dcm+</i> Tetr <i>gal</i> λ (DE3)	Novagen / Merck (Darmstadt, Deutschland)
<i>E. coli</i> BL21-CodonPlus(DE3)-RIL	B F ⁻ <i>ompT hsdS</i> (rB ⁻ mB ⁻) <i>dcm+</i> Tetr <i>gal</i> λ (DE3) <i>endA</i> Hte [<i>argU ileY leuW</i> (Camr)]	Stratagene / Agilent Technologies (Waldbronn, Deutschland)
<i>E. coli</i> XL1-Blue	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1</i> <i>hsdR17 supE44 relA1 lac</i> [F' <i>proAB lacIq</i> Δ M15 Tn10 (Tetr)]	Stratagene / Agilent Technologies (Waldbronn, Deutschland)

Tabelle 3-6: Liste der verwendeten Plasmide.

kodiertes Protein	Konstrukt	Quelle
DrrA ₉₋₂₁₈	02295 pOPINF DrrA 9-218	Dortmund Protein Facility
DrrA ₁₋₃₁₉	03230 pOPINF DrrA 1-319	Dortmund Protein Facility
DrrA ₁₋₃₃₀	03231 pOPINF DrrA 1-330	Dortmund Protein Facility
DrrA ₁₋₃₃₉	02294 pET19mod DrrA 1-339	AG Goody, MPI Dortmund
DrrA ₁₋₃₆₀	03233 pOPINF DrrA 1-360	Dortmund Protein Facility
DrrA ₈₋₃₉₇	03234 pOPINF DrrA 8-397	Dortmund Protein Facility
DrrA ₃₀₋₃₆₀	03377 pOPINF DrrA 30-360	Dortmund Protein Facility
DrrA ₃₀₋₃₉₇	03378 pOPINF DrrA 30-397	Dortmund Protein Facility

kodiertes Protein	Konstrukt	Quelle
DrrA ₃₄₀₋₅₃₃	02144 pET19mod DrrA 340-533	AG Goody, MPI Dortmund
DrrA ₈₋₅₃₃	02592 pet19mod DrrA 8-533	AG Goody, MPI Dortmund
DrrA ₈₋₅₃₃ K311A K312A	02987 pET19mod DrrA 8-533 311-313A	AG Goody, MPI Dortmund
DrrA ₈₋₅₃₃ K232A E233A E236A	02988 pET19mod DrrA 8-533 232-236A	AG Goody, MPI Dortmund
DrrA _{fl}	02362 pET19mod DrrAfl	AG Goody, MPI Dortmund
DrrA _{fl} N451A R453A D480A S483A	02929 pET19mod DrrA fl N451A R453A D480A S483A	diese Arbeit
LepB ₃₂₅₋₆₁₈	03247 pOPINF LepB 325-618	Dortmund Protein Facility
Mical ₁₈₄₁₋₁₉₉₀	02570 pOPINF Mical3 1841-1990	Dortmund Protein Facility
Mical ₁₈₄₁₋₁₉₉₀ W1897A	03465 pOPINF Mical3 1841-1990 W1897A	AG Goody, MPI Dortmund
Mical ₁₈₄₁₋₁₉₉₀ F1898A	03461 pOPINF Mical3 1841-1990 F1898A	AG Goody, MPI Dortmund
Mical ₁₈₄₁₋₁₉₉₀ K1904A	03466 pOPINF Mical3 1841-1990 K1904A	AG Goody, MPI Dortmund
Mical ₁₈₄₁₋₁₉₉₀ N1905A	03462 pOPINF Mical3 1841-1990 N1905A	AG Goody, MPI Dortmund
Mical ₁₈₄₁₋₁₉₉₀ K1904A N1905A	03537 pOPINF Mical3 1841-1990 K1904A N1905A	AG Goody, MPI Dortmund
Mical ₁₈₄₁₋₁₉₉₀ R1919A	03539 pOPINF Mical3 1841-1990 R1919A	AG Goody, MPI Dortmund
Rab1b _{fl}	02140 pMAL Rab1b wt opti	AG Goody, MPI Dortmund
Rab1 _{fl} R71H	02924 pMAL Rab1 R71H	diese Arbeit
Rab1 _{fl} S76M	02925 pMAL Rab1 S76M	diese Arbeit
Rab1b _{fl} Y77F	02763 pMAL Rab1b Y77F	diese Arbeit
Rab1b _{fl} Y78F	02764 pMAL Rab1b Y78F	diese Arbeit
Rab1b ₃₋₁₇₄	02142 pMAL Rab1b delta N-C opti	AG Goody, MPI Dortmund

kodiertes Protein	Konstrukt	Quelle
His6-SidD ₃₆₋₅₀₇	03411 pET19mod SidD 36-507	diese Arbeit
TBC1D20 ₁₋₃₆₂	02817 pET19mod TBC1D20 1-362	AG Goody, MPI Dortmund

3.1.6 Geräte und Zubehör

Die folgende Tabelle gibt eine Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Geräte und deren Zubehör.

Tabelle 3-7: Liste der verwendeten Geräte und Zubehör.

Hersteller	Gerät / Zubehör
Agilent Technologies, Inc. (Santa Clara, USA)	Agilent 1100 Series HPLC System (Säule; Grace Vydac 214TP C4 5 μ)
Art Robbins Instruments (Sunnyvale, USA)	Crystal Phoenix Kristallisationsroboter
Applied Photophysics Ltd (Surrey, Großbritannien)	Stopped-flow SX20
Beckman Coulter, Inc. (Brea, USA)	Avanti J-20 XP Zentrifuge (Rotoren: JLA 8.1000, JA 25.50), DU 650 Spektrophotometer, Optima L-70K Ultrazentrifuge (Rotor 45 Ti)
Binder GmbH (Tuttlingen, Deutschland)	Brutschrank ED 115
BioRad Laboratories GmbH (München, Deutschland)	Power Pac 200 Spannungsquelle, MicroPulser, Mini-Protean 3 SDS-PAGE System, MJ Research PCR-cycler PTC-200, Agarosegelkammer Wide Mini-Sub [®] Cell GT
Bischoff Analysentechnik und -geräte GmbH (Leonberg, Deutschland)	HPLC Säule Prontosil 120-3-C18 AQ 3.0 μ m
Bruker AXS Inc. (Madison, USA)	MICROSTAR Röntgenquelle
Eppendorf (Hamburg, Deutschland)	Eppendorf 5804 Zentrifuge, Eppendorf 5810 R Zentrifuge, Eppendorf 5415 C & D Tischzentrifugen, Thermomixer comfort, 2.5 μ l, 10 μ l, 20 μ l, 200 μ l und 1 ml Pipetten
Formulatrix Inc. (Waltham, USA)	Rock Imager 1000

Hersteller	Gerät / Zubehör
GE Healthcare (München, Deutschland)	FPLC Äkta prime plus, Molecular Imager Gel Doc XR System, Hi-Load Superdex 75/200 16/60 und 26/60 prep grade, Superdex 200 10/30 GL, Hi-Trap Chelating HP 1 ml and 5 ml Säulen
Heidolph Instruments GmbH & Co. KG (Schwabach, Deutschland)	Magnetprüher MR 3000
Horiba Jobin Yvon Inc. (Edison, USA)	FluoroMax-3
Ilmvac GmbH (Ilmenau, Deutschland)	Vakuum Membranpumpe
Infors AG (Bottmingen, Schweiz)	Schüttelinkubatoren (HT Minitron und HT Multitron)
Jasco UK (Essex, UK)	J-815 Circular dichroismus Spektropolarimeter
Kern & Sohn GmbH (Balingen, Deutschland)	Kern 572 Präzisionswaage
Knick Elektronische Messgeräte GmbH & Co. KG (Berlin, Deutschland)	761 Calimatic pH Meter
Kontron Instruments (Rossdorf, Deutschland)	HPLC Pumpen System 52x
Latek (Eppelheim, Deutschland)	UV-visible Detektor SPD-6AV
Marresearch GmbH (Norderstedt, Deutschland)	Mar345 Image Plate Detektor
Mettler-Toledo GmbH (Giessen, Deutschland)	Analysewaage AM100
MicroCal / GE Healthcare (München, Deutschland)	ITC ₂₀₀
Microfluidics International Corporation (Newton, USA)	Microfluidizer
Millipore Corporation (Billerica, USA)	Milli-Q Wasseraufbereitungssystem
Olympus Corporation (Tokyo, Japan)	Labormikroskop CH30 RF200, Labormikroskop CX40 RF200 (mit Kamera Olympus DP21)
PeqLab Biotechnology GmbH (Erlangen, Deutschland)	NanoDrop ND-1000 Spektrophotometer
Qiagen (Hilden, Deutschland)	QIAcube

Hersteller	Gerät / Zubehör
Rigaku (Texas, USA)	MicroMax™-007 HF Röntgenquelle
Shimadzu Europa GmbH (Düsseldorf, Deutschland)	Chromatopac C-R3A Datenverarbeitungssystem
Steinbrenner Laborsysteme GmbH	Liquidator96 Pipettiergerät
Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, USA)	Finnigan LCQ Advantage Max Massenspektrometer
TTP LabTech Ltd (Melbourn, UK)	Mosquito® liquid handling Kristallisationsroboter
Waagen Strathausen (Holzwickede, Deutschland)	Waage Kern 572
Wallac (Freiburg, Deutschland)	Wallac 1409 Szintillationszähler
Waters Corporation (Milford, USA)	HPLC System (600 S Controller, 626 Pump, 717 plus Autosampler, 2487 Dual λ Absorbance Detector, Fraction Collector III)

3.1.7 Software

Die folgende Tabelle gibt eine Übersicht über die in dieser Arbeit verwendete Software.

Tabelle 3-8: Liste der verwendeten Software.

Hersteller	Software
Adobe Systems GmbH (München, Deutschland)	Adobe Illustrator CS4, Adobe Photoshop CS4
CambridgeSoft	ChemBioDraw Ultra 11.0
Max-Planck-Institut für medizinische Forschung (Heidelberg, Deutschland)	XDS Program Package
OriginLab Corporation (Northampton, USA)	Origin 7.0
PHENIX Industrial Consortium (Berkeley, USA)	Phenix 1.7.3-928
Schrödinger, LLC (Cambridge, UK)	PyMol 1.4

Hersteller	Software
STFC Rutherford Appleton Laboratory (Oxon, UK)	CCP4 - Collaborative Computational Project No. 4
Thermo Fischer Scientific Inc. (Waltham, USA)	Xcalibur 2.0.7

3.1.8 Häufig verwendete Lösungen

Die folgende Tabelle gibt eine Übersicht über die in dieser Arbeit häufig verwendeten Lösungen.

Tabelle 3-9: Liste häufig verwendeter Lösungen⁽¹⁾.

Lösung	Zusammensetzung
CLAP Protease Inhibitor Mix (400-fach)	1 mg/ml Antipain 1 mg/ml Chymostatin 1 mg/ml Leupeptin 1 mg/ml Pepstatin A in DMSO
DNA-Ladepuffer (5-fach)	30 % (w/v) Saccharose 20 % (v/v) Glycerol 0.2 % (w/v) Orange G
PBS (20-fach)	2.74 M NaCl 54 mM KCl 200 mM Na ₂ HPO ₄ 35 mM KH ₂ PO ₄ pH 7.4 mit HCl
Färbelösung für SDS-PAGE	44 % (v/v) Ethanol 12 % (v/v) Essigsäure 0.15 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue R 250
Laufpuffer für SDS-PAGE	25 mM Tris 190 mM Glycin 0.1 % (w/v) SDS

Lösung	Zusammensetzung
Probenpuffer für SDS-PAGE (2-fach)	100 mM Tris pH 6.8 4 % (w/v) SDS 20 % (v/v) Glycerol 0.2 % Bromphenolblau 5 % (v/v) β -Mercaptoethanol
Sammelgelpuffer für SDS-PAGE	0.5 M Tris pH 6.8 0.4 % (w/v) SDS
Trenngelpuffer für SDS-PAGE	1.5 M Tris pH 8.8 0.4 % (w/v) SDS
TAE-Puffer (50-fach)	1 M Tris pH 8.0 2 M Essigsäure 0.5 M EDTA

⁽¹⁾ Alle Lösungen wurden, sofern nicht anders angegeben, mit ddH₂O angesetzt.

3.2 Methoden

3.2.1 Molekularbiologische Methoden

3.2.1.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (engl.: *Polymerase chain reaction*) wurde zur Vervielfältigung von DNA verwendet. Dabei wurden je nach Bedarf analytische (Überprüfen erfolgreicher Ligationsreaktionen) bzw. präparative (Vervielfältigung von DNA-Fragmenten) PCR Ansätze genutzt (vgl. Tabelle 3-10).

Tabelle 3-10: Durchführung der analytischen bzw. präparativen PCR.

analytische PCR		präparative PCR	
1 µl Bakterienlysat ^[1]		20 ng DNA Templat	
je 1 µM komplementäre Oligonukleotide		je 1 µM komplementäre Oligonukleotide	
200 µM dNTPs		25 µl 2x Phusion [®] High-Fidelity PCR Master Mix	
1 µl RedTaq 10x Puffer		zu 50 µl ddH ₂ O	
0.5 µl RedTaq DNA-Polymerase			
zu 10 µl ddH ₂ O			
Reaktionsprogramm:		Reaktionsprogramm:	
5 min	95 °C	30 s	98 °C
30 s	95 °C	10 s	98 °C
30 s	50 °C	30 s	50 – 65 °C
1 min / 1000 bp	72 °C	30 s / 1000 bp	72 °C
∞	4 °C	10 min	72 °C
		∞	4 °C

} 30 Zyklen

^[1] bakterielle Einzelkolonien wurden von einer LB-Agarplatte in 50 µl ddH₂O überführt.

Zum Überprüfen korrekter Ligationen sowie eingeführter Mutationen in DNA-Plasmiden wurde die DNA sequenziert (modifizierte Methode nach ⁽¹⁴⁶⁾). In dieser Arbeit wurde das *BigDye Terminator v 3.1. Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystems) verwendet.

Tabelle 3-11: DNA Sequenzierung.
Sequenzierungs-PCR

0.5-1 µg DNA Templat		
100 pmol komplementäres Oligonukleotid	Reaktionsprogramm:	
4 µl <i>BigDyeDesoxy terminator</i> Mix	1 min	96 °C
zu 10 µl ddH ₂ O	15 s	96 °C
	15 s	44 °C
	4 min	72 °C
	∞	4 °C

} 25 Zyklen

Zur Entfernung überschüssiger Nukleotide wurde anschließend das DyeEx 2.0 Spin Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) genutzt und die Proben durch die Sequenziereinrichtung des Max-Planck-Instituts für molekulare Physiologie (Dortmund) sequenziert.

3.2.1.2 Spaltung von DNA mittels Restriktionsenzymen

Zur sequenzspezifischen Spaltung von DNA wurden FastDigest® Restriktionsenzyme (Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland) genutzt. Es wurden 0.1 – 3 µg DNA mit Puffer und Restriktionsenzymen nach Herstellerangaben versetzt. Die Reaktion erfolgte für 2 h bei 37 °C mit anschließender Hitzeinaktivierung der Restriktionsenzyme nach Herstellerangabe. Um eine Religation des Vektors bei einer anschließenden Ligationsreaktion (siehe Kapitel 3.2.1.4) zu verhindern wurden bei Verdau von Plasmid-DNA zusätzlich 1 Einheit alkalische Phosphatase aus Krabben (Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland) zugesetzt. Eine anschließende Reinigung erfolgte nach Bedarf mittels QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) oder Agarosegelelektrophorese (siehe Kapitel 3.2.1.3).

3.2.1.3 Reinigung von DNA

Die Agarosegelelektrophorese dient der Auftrennung von Nukleinsäuren nach ihrer Größe. In dieser Arbeit wurden je nach Größe der aufzutrennenden DNA-Fragmente 0.8 – 1.5 %ige (w/v Agarose in 1-fach TAE-Puffer) Agarosegele genutzt. Die DNA wurde zunächst mit DNA-Ladepuffer versetzt und in die Taschen des Agarosegels geladen. Eine Auftrennung der DNA erfolgte anschließend bei einer Spannung von etwa 100 V. Zur Abschätzung der Größe der aufgetrennten Fragmente wurde der

Größenstandard *GeneRuler™ 1kb DNA Ladder* (Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland) verwendet, eine Anfärbung der DNA erfolgte mit der *RedSafe™ Nucleic Acid Staining Solution* (iNtRON Biotechnology, Sangdaewong-Dong, Südkorea). Die Fragmente gewünschter Größe wurden aus dem Agarosegel ausgeschnitten und mit dem QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) isoliert.

Alternativ zur Agarosegelelektrophorese wurde zur Reinigung von PCR-Produkten das QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) verwendet.

Zur Vervielfältigung von Plasmiden wurden diese in *E. coli* XL1-Blue transformiert und in 5 ml LB-Medium über Nacht bei 37 °C inokuliert. Eine anschließende Isolierung der Plasmid-DNA erfolgte nach Herstellerangaben manuell mit dem QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) oder mit dem QIAcube (Qiagen, Hilden, Deutschland).

3.2.1.4 Ligation von DNA-Fragmenten

Zur Herstellung von Expressionsvektoren wurden 50 ng linearisierter und dephosphorylierter Vektor mit einem 5-fachen molaren Überschuss des gewünschten DNA-Fragments, 5 Einheiten T4 DNA Ligase (Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland) und 1x Puffer des Herstellers (Gesamtvolumen 10 µl) für 2 h bei RT oder für 16 h bei 4 °C inkubiert.

3.2.1.5 Einführung von Mutationen in Plasmid-DNA

Um einzelne Aminosäuren in den verwendeten Proteinen gezielt zu mutieren wurde das QuikChange II XL Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene / Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland) nach Angaben des Herstellers verwendet.

3.2.1.6 Transformation elektrokompenter Zellen

Nach Zugabe von 50 – 100 ng Plasmid-DNA bzw. 2 µl Ligationsansatz (Kapitel 3.2.1.4) zu den elektrokompenten *E. coli* Zellen (*E. coli* BL21(DE3) bzw. BL21-CodonPlus(DE3)-RIL für Expression verschiedener Proteine, *E. coli* XL1-Blue zur Vervielfältigung von Plasmid-DNA) wurden diese in vorgekühlte Elektroporationsküvetten überführt. Anschließend wurden Sie einem kurzen Puls hoher Spannung ausgesetzt (Spannung 1.8 kV, Widerstand 200 Ω, Kapazität 25 µF) und sofort mit 1 ml

LB-Medium versetzt. Nach 30 bis 45 min Inkubation bei 37 °C wurden die Zellen auf LB-Agarplatten mit entsprechendem Selektionsmarker ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

3.2.2 Proteinchemische Methoden

3.2.2.1 Proteinexpression und -reinigung

Die Expression der genutzten Proteine erfolgte durch Transformation der kodierenden Plasmide (siehe Kapitel 3.1.5) und Anzucht der *E. coli* Kulturen bei 37 °C in LB-Medium (siehe Tabelle 3-13) bis zu einer $OD_{600nm} = 0.6 - 0.8$. Nach Erreichen der OD wurden die Zellen für 30 – 45 min bei 4 °C abgekühlt und anschließend 0.2 mM IPTG zugegeben und die Zellen über Nacht bei 20 °C inkubiert (die Expression von TBC1D20₁₋₃₆₂ erfolgte bei 19 °C durch Zugabe von 0.5 mM IPTG). Die Ernte der Zellen erfolgte bei 4 °C und 5000 Umdrehungen pro Minute (engl.: *rounds per minute*, rpm) für 15 min (Rotor JLA 8.1000, Zentrifuge Avanti J-20 XP, Beckman Coulter Inc., Brea, USA). Anschließend wurden die Zellen in 1x PBS Puffer gewaschen und entweder bei -80 °C gelagert oder sofort weiter verwendet.

Der Zellaufschluss erfolgte in 50 mM Hepes, 500 mM LiCl, 2 mM β -Mercaptoethanol, 1-fach CLAP Protease Inhibitor Mix, 2 mM PMSF mit einem Microfluidizer (Microfluidics International Corporation, Newton, USA). Unlösliche Bestandteile wurden anschließend durch Zentrifugation (25000 rpm, 10 °C, Rotor JA 25.50, Zentrifuge Avanti J-20 XP, Beckman Coulter Inc., Brea, USA) und Filtration (Bottle Top Filter, Nalgene Labware, Roskilde, Dänemark) geklärt. Der eingestellte pH-Wert der Reinigungspuffer variierte je nach isoelektrischen Punkt des verwendeten Proteins und kann dem Gelfiltrationspuffer in Tabelle 3-12 entnommen werden. Weiterhin wurden zur Expression kleiner GTPasen allen Puffern 10 μ M GDP sowie 1-5 mM $MgCl_2$ zugesetzt. Die Reinigung erfolgte durch Beladung einer Hi-Trap Chelating HP 1 ml oder 5 ml Ni^{2+} -Affinitätssäule (GE Healthcare, München, Deutschland). Unspezifisch gebundene Proteine wurden durch Waschen mit 2 % Elutionspuffer (50 mM Hepes, 500 mM Imidazol, 2 mM β -Mercaptoethanol) entfernt. NaCl wurde allen Reinigungspuffern abhängig vom gereinigten Protein in der in Tabelle 3-12 angegebenen Konzentration für den Gelfiltrationspuffer zugesetzt. Die fraktionierte Elution erfolgte durch einen linearen Gradienten zu 100 % Elutionspuffer, wobei die Absorption bei 280 nm detektiert wurde und proteinhaltige Fraktionen mittels SDS-PAGE analysiert wurden. Möglichst reine Fraktionen des Zielproteins wurden vereinigt und über Nacht in Gegenwart von PreScission Protease (alle pOPIN-Vektor kodierten Proteine) bzw. TEV-Protease (alle anderen Proteine) gegen Elutionspuffer ohne Imidazol dialysiert, um den Affinitätsanker zu entfernen. Im Fall von SidD₃₆₋₅₀₇

konnte der Affinitätsanker nicht erfolgreich abgespalten werden, daher erfolgte die weitere Reinigung direkt mittels Gelfiltration. Bei allen anderen Proteinen konnte durch Wiederholung der Metallaffinitätschromatographie das geschnittene Zielprotein von ungeschnittenem Protein, der Protease sowie dem Affinitätsanker abgetrennt werden. Anschließend wurden die Proteinfractionen mit dem Zielprotein konzentriert (siehe Kapitel 3.2.2.2) und mittels Gelfiltration abschließend gereinigt (der Gelfiltrationspuffer kann Tabelle 3-12 entnommen werden). Die Gelfiltration von Proteinen mit einem Molekulargewicht größer 60 kDa erfolgte mit einer Hi-Load Superdex 200 16/60 oder 26/60 *prep grade* Gelfiltrationssäule (GE Healthcare, München, Deutschland), bei kleineren Proteinen wurde eine Hi-Load Superdex 75 16/60 oder 26/60 *prep grade* Gelfiltrationssäule (GE Healthcare, München, Deutschland) verwendet. Alle Reinigungsschritte erfolgten bei 4 °C mit einer FPLC Äkta prime plus (GE Healthcare, München, Deutschland).

Die Proteine DrrA₁₋₃₁₉, DrrA₁₋₃₃₀, DrrA₁₋₃₆₀, DrrA₈₋₃₉₇, DrrA₃₀₋₃₆₀ und DrrA₃₀₋₃₉₇ wurden durch die Dortmund Protein Facility exprimiert und gereinigt.

Tabelle 3-12: Expressionsstämme und Gelfiltrationspuffer der verwendeten Proteine.

Expressionskonstrukt	Expressionsstamm	Gelfiltrationspuffer
DrrA ₉₋₂₁₈	BL21-CodonPlus(DE3)-RIL	20 mM Hepes pH 8.0, 100 mM NaCl, 2 mM DTE
DrrA ₁₋₃₁₉	BL21-CodonPlus(DE3)-RIL	25 mM Hepes pH 7.5, 50 mM NaCl, 1 mM TCEP, 2 mM MgCl ₂
DrrA ₁₋₃₃₀	BL21-CodonPlus(DE3)-RIL	25 mM Hepes pH 7.5, 50 mM NaCl, 1 mM TCEP, 2 mM MgCl ₂
DrrA ₁₋₃₃₉	BL21-CodonPlus(DE3)-RIL	20 mM Hepes pH 8.0, 100 mM NaCl, 2 mM DTE
DrrA ₁₋₃₆₀	BL21-CodonPlus(DE3)-RIL	25 mM Hepes pH 7.5, 50 mM NaCl, 1 mM TCEP, 2 mM MgCl ₂
DrrA ₈₋₃₉₇	BL21-CodonPlus(DE3)-RIL	25 mM Hepes pH 7.5, 50 mM NaCl, 1 mM TCEP, 2 mM MgCl ₂
DrrA ₃₀₋₃₆₀	BL21-CodonPlus(DE3)-RIL	25 mM Hepes pH 7.5, 50 mM NaCl, 1 mM TCEP, 2 mM MgCl ₂
DrrA ₃₀₋₃₉₇	BL21-CodonPlus(DE3)-RIL	25 mM Hepes pH 7.5, 50 mM NaCl, 1 mM TCEP, 2 mM MgCl ₂

Expressionskonstrukt	Expressionsstamm	Gelfiltrationspuffer
DrrA ₃₄₀₋₅₃₃	BL21-CodonPlus(DE3)-RIL	20 mM Hepes pH 8.0, 50 mM NaCl, 2 mM DTE
DrrA _{fi}	BL21-CodonPlus(DE3)-RIL	20 mM Hepes pH 8.0, 100 mM NaCl, 1 mM MgCl ₂ , 2 mM DTE
LepB ₃₂₅₋₆₁₈	BL21-CodonPlus(DE3)-RIL	20 mM Hepes pH 7.5, 150 mM NaCl, 2 mM TCEP
Mical ₁₈₄₁₋₁₉₉₀	BL21-CodonPlus(DE3)-RIL	20 mM Hepes pH 7.5, 50 mM NaCl, 1 mM MgCl ₂ , 2 mM DTE
Rab1b _{fi}	BL21(DE3)	20 mM Hepes pH 8.0, 50 mM NaCl, 2 mM DTE, 1 mM MgCl ₂ , 10 μM GDP
Rab1b ₃₋₁₇₄	BL21(DE3)	20 mM Hepes pH 8.0, 50 mM NaCl, 2 mM DTE, 1 mM MgCl ₂ , 10 μM GDP
His6-SidD ₃₆₋₅₀₇	BL21-CodonPlus(DE3)-RIL	20 mM Hepes pH 7.5, 100 mM NaCl, 1 mM MgCl ₂ , 2 mM DTE
TBC1D20 ₁₋₃₆₂	BL21-CodonPlus(DE3)-RIL	20 mM Hepes pH 7.5, 100 mM NaCl, 2 mM DTE

Aminosäuremutanten der entsprechenden Proteine wurden analog zu den Wildtyp Proteinen gereinigt.

Tabelle 3-13: Medien zur Anzucht von *E. coli* Kulturen.

Lösung	Zusammensetzung
LB-Medium	10 g/l Trypton
	5 g/l NaCl
	5 g/l Hefeextrakt
	pH 7.2 mit Natronlauge
LB-Agarplatten	10 g/l Trypton
	5 g/l NaCl
	5 g/l Hefeextrakt
	16 g/l Agar
	pH 7.2 mit Natronlauge

Lösung	Zusammensetzung
M9-Minimalmedium	8.5 g/l $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 3 g/l KH_2PO_4 0.5 g/l NaCl 1.0 g/l NH_4Cl 1 mM MgSO_4 0.4 % (w/v) Glukose 0.1 mM CaCl_2

Zur Sterilisation wurden die Medien autoklaviert. Als Selektionsmarker wurden je nach vorhandenen Resistenzmarkern der verwendeten Plasmide und Bakterienstämme 125 mg/l Ampicillin (LB-Medium) bzw. Carbenicillin (LB-Agarplatten), 34 mg/l Chloramphenicol und/oder 50 mg/l Kanamycin zugesetzt.

3.2.2.1.1 Expression von Selenomethionin- (SeMet-) modifiziertem Protein

Die Expression von Selenomethionin- (SeMet-) modifiziertem Protein erfolgte mit einer modifizierten Variante nach⁽¹⁴⁷⁾. 50 ml einer $\text{Mical}_{1841-1990}$ Vorkultur (BL21-CodonPlus(DE3)-RIL) wurden abzentrifugiert, mit M9-Minimalmedium gewaschen und anschließend genutzt um 2 l M9-Minimalmedium zu inokulieren. Die Zellen wurden bei 37 °C bis zu einer $\text{OD}_{600\text{nm}} = 0.8$ vermehrt und anschließend bei 4 °C abgekühlt. Zu diesem Zeitpunkt wurden je 100 mg/l Lys, Phe und Thr sowie je 50 mg/l Ile, Leu und Val zugegeben. Nach 15 min wurden 60 mg/l SeMet hinzugegeben, weitere 15 min gewartet und durch Zugabe von 0.2 mM IPTG die Expression induziert. Die Expression erfolgte anschließend über Nacht bei 20 °C.

3.2.2.1.2 Herstellung von *E. coli* Lysat

E. coli Lysat wurde durch Anzucht der *E. Coli* Kultur (BL21-CodonPlus(DE3)-RIL) bei 37 °C in LB-Medium (siehe Tabelle 3-13) in Gegenwart von 34 mg/l Chloramphenicol bis zu einer $\text{OD}_{600\text{nm}} = 0.6$ erhalten. Die Ernte der Zellen erfolgte bei 4 °C und 5000 rpm für 15 min (Rotor JLA 8.1000, Zentrifuge Avanti J-20 XP, Beckman Coulter Inc., Brea, USA). Die Zellen wurden in 1x PBS Puffer gewaschen und anschließend in 20 mM HEPES pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM MgCl_2 , 1 mM PMSF und 1 mM DTE resuspendiert. Der Zellaufschluss erfolgte mit einem Microfluidizer (Microfluidics International Corporation, Newton, USA).

Unlösliche Bestandteile wurden durch Zentrifugation (25000 rpm, 10 °C, Rotor JA 25.50, Zentrifuge Avanti J-20 XP, Beckman Coulter Inc., Brea, USA) und Filtration (Bottle Top Filter, Nalgene Labware, Roskilde, Dänemark) geklärt und das Lysat anschließend bei -80 °C gelagert.

3.2.2.2 Konzentrierung von Proteinlösungen

Die Konzentrierung von Proteinlösungen erfolgte mit Zentrifugalkonzentratoren (Millipore, Schwalbach) bei 4 °C und 4000 rpm (Zentrifuge 5810 R, Eppendorf, Hamburg, Deutschland). Bei großen Volumina wurde die Konzentrierung alternativ in einer Amicon-Kammer (Modell 8050 oder 8200, Ultrafiltrationsmembranen PLGC, 10/30 kDa MWCO, Millipore, Schwalbach, Deutschland) bei 4 °C durchgeführt.

3.2.2.3 Dialyse von Proteinlösungen

Zur Umpufferung von Proteinlösungen wurden diese bei 4 °C über Nacht gegen wenigstens 50 Volumen des gewünschten Puffers dialysiert. Hierzu wurden Spectra/Por® Dialysemembranen (Molekulargewichts Ausschlussgrenze 3.5 – 14 kDa) verwendet, welche vor Verwendung mit ddH₂O gewaschen wurden und nach Befüllen mit der Proteinlösung an beiden Enden mit Dialyseschlauchklammern verschlossen wurden. Zur Dialyse kleiner Volumina wurden alternativ *Slide-A-Lyzer* Dialysekassetten (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA) genutzt.

3.2.2.4 Präparativer Nukleotidaustausch

Für einen präparativen Nukleotidaustausch der verwendeten Rab-Proteine wurden diese zunächst durch Zugabe von 5 – 10 % Glycerol stabilisiert. Durch Zugabe eines 5-fachen Überschusses EDTA gegenüber MgCl₂ wurde die Nukleotidaffinität des Rab-Proteins vermindert. Anschließend wurde das gewünschte Nukleotid in einem 20-fachen Überschuss (GTP, GppNHp) bzw. 5-fachen Überschuss (mant-Nukleotide) zugegeben und 2 h bei RT inkubiert. Eine Umpufferung erfolgte danach durch alternierendes Verdünnen mit dem gewünschten Puffer und Konzentrieren der Proteinlösung (siehe Kapitel 3.2.2.2). Eine Kontrolle der Nukleotidbeladung erfolgte mittels HPLC (siehe Kapitel 3.2.3.5).

3.2.3 Analytische und biophysikalische Methoden

3.2.3.1 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese⁽¹⁴⁸⁾ dient der analytischen Auftrennung von Proteinen nach ihrer Größe. Hierzu wurde die Proteinlösung zunächst mit 2-fach SDS-Probenpuffer (siehe Kapitel 3.1.8) versetzt und anschließend für 5 min bei 95 °C denaturiert und reduziert. Die anschließende Trennung erfolgte in SDS-PAGE-Laufpuffer bei einer Stromstärke von 60 mA für etwa 45 min, als Größenstandard diente der LMW (*low molecular weight*) Marker (GE Healthcare, München).

Tabelle 3-14: Zusammensetzung der verwendeten 15 %igen SDS-Polyacrylamidgele (9 Gele).

Lösung	Trenngel	Sammelgel
Gelpuffer (siehe Kapitel 3.1.8)	12.5 ml SDS-PAGE	7.5 ml SDS-PAGE
	Trenngelpuffer	Sammelgelpuffer
Acrylamid 4K-Lösung (30 %)	25 ml	5 ml
ddH ₂ O	12.5 ml	17.5 ml
10 % (w/v) Ammoniumperoxo- disulfat	250 µl	240 µl
TEMED	25 µl	30 µl

Die Färbung der Gele erfolgte in heißer SDS-PAGE Färbelösung für etwa 5 min, für eine anschließende Entfärbung des Hintergrundes wurde das Gel in 10 % (v/v) Essigsäure erhitzt.

3.2.3.2 Bestimmung von Proteinkonzentrationen

Eine häufig zur Bestimmung der Proteinkonzentration in Lösungen genutzte Methode ist die Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford⁽¹⁴⁹⁾. Bei dieser Methode wird die Bindung des Farbstoffes Coomassie Brilliant Blau G 250 an Seitenketten der Proteine und die daraus resultierende Verschiebung des Absorptionsmaximums des Farbstoffes von 465 nm zu 595 nm genutzt.

In dieser Arbeit wurden 100 µl einer Proteinlösung mit 900 µl Coomassie Protein Assay Reagenz (Thermo Fischer Scientific Inc., USA) versetzt und für 10 min bei RT inkubiert. Anschließend erfolgte eine

Bestimmung der Absorption bei 600 nm. Über den Vergleich mit einer Eichgrade für Rinderserumalbumin (BSA) wurde die Konzentration der Proteinlösungen abgeschätzt.

Alternativ zu dieser Methode wurde die Absorption der Proteine bei 280 nm bestimmt. Hierbei wird die Absorption der Aminosäuren Trp, Tyr sowie von Cystinen ausgenutzt. Eine Berechnung des Extinktionskoeffizienten erfolgte dabei nach der Methode von Gill und von Hippel⁽¹⁵⁰⁾, die Proteinkonzentration konnte dann nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz (Gleichung (1)) bestimmt werden:

$$E_{\lambda} = \lg \left(\frac{I_0}{I_A} \right) = \varepsilon_{\lambda} \cdot c \cdot d \quad (1)$$

E_{λ}	Absorption der Proteinlösung bei der Wellenlänge λ
I_0	Intensität des eingestrahnten Lichts
I_A	Intensität des ausfallenden Lichts
ε_{λ}	Extinktionskoeffizient des Proteins bei Wellenlänge λ ($M^{-1} \text{ cm}^{-1}$)
c	Konzentration der Proteinlösung (M)
d	Schichtdicke der genutzten Küvette (cm)

3.2.3.3 Analytische Gelfiltration

Die analytische Gelfiltration ist eine Methode zur Abschätzung des Molekulargewichtes und des Multimerisierungszustandes von Proteinen und Protein-Komplexen.

In dieser Arbeit wurde die Methode genutzt, um die Interaktion verschiedener Effektorproteine mit Rab1 zu bestimmen. Hierzu wurde eine Superdex 200 10/300 GL Gelfiltrationssäule (GE Healthcare, München, Deutschland) verwendet. Alle analytischen Gelfiltrationsläufe wurden mit dem Waters HPLC System (Waters Corporation, Milford, USA) bei 25 °C und einer Flussrate von 0.5 ml/min in 20 mM HEPES pH 7.5, 50 mM NaCl, 1 mM MgCl_2 , 2 mM DTE und 10 μM GppNHp durchgeführt. Eine Detektion der eluierenden Proteine erfolgte durch Absorptionsmessung bei 280 nm. Als Größenstandard diente der Gelfiltrationsstandard von BioRad (BioRad Laboratories GmbH, München, Deutschland).

3.2.3.4 Massenspektrometrie

Mithilfe der Massenspektrometrie kann die Masse von Molekülen bestimmt werden. In dieser Arbeit wurde die Elektrospray-Ionisations Massenspektrometrie (ESI-MS) zur Bestimmung von Proteinmassen verwendet.

Bei dieser Methode werden Proteinlösungen durch eine Kapillare mit einer angelegten Spannung in Richtung einer Gegenelektrode geleitet. An der Spitze der Kapillare kommt es durch das angelegte elektrische Feld zu einer Anreicherung von gleichartig geladenen Ionen. Dies führt schließlich zu einem Zerfall der Tropfen an der Spitze der Kapillare und zu einem Freisetzen der Ionen nach vollständigem Verdampfen des Lösungsmittels. Die Ionen werden in einer Ionenfalle gesammelt und analysiert. Durch Änderung des elektrischen Feldes der Ionenfalle können hierbei Ionen unterschiedlicher Größe getrennt detektiert werden. In dieser Arbeit wurde ein Finnigan LCQ Advantage Max Massenspektrometer (Thermo Fischer Scientific Inc., Waltham, USA) verwendet. Zum Trennen unterschiedlicher Proteine in der zu analysierenden Lösung sowie zum Entsalzen der Probe wurden diese durch ein vorgeschaltetes Agilent 1100 Series HPLC System (Agilent Technologies Inc., Santa Clara, USA) mit einer C4-HPLC Säule (Grace Vydac 214TP C4 5 μ) geleitet. Als Laufmittel dienten dabei 0.1 % TFA in ddH₂O (Puffer A) bzw. 0.08 % TFA in Acetonitril (Puffer B) mit einem Gradienten von 20 % zu 90 % Puffer B. Eine Auswertung der erhaltenen Massenspektren erfolgte mit dem Programm Xcalibur (Thermo Fischer Scientific Inc., Waltham, USA) und durch Dekonvolution mit dem Programm MagTran⁽¹⁵¹⁾.

3.2.3.5 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie

Die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (engl.: *high performance liquid chromatography*, HPLC) ist eine analytische Methode zur Trennung verschiedener Substanzen in einer Analytlösung. Hierbei werden unterschiedliche Bindungsaffinitäten der Substanzen an das Säulenmaterial zur Trennung der Substanzen genutzt.

In dieser Arbeit wurde die HPLC genutzt, um unterschiedliche Nukleotide zu trennen und zu quantifizieren. Alle HPLC Untersuchungen wurden dabei mit einem Waters HPLC System (Waters Corporation, Milford, USA) bei 25 °C und einer Flussrate von 0.4 ml/min in 50 mM Kaliumphosphat pH 6.6, 8 % Acetonitril und 10 mM Tetrabutylammoniumbromid (TBABr) unter Verwendung einer C-18

HPLC Säule (Prontosil 120-3-C18 AQ 3.0 μm , Bischoff Analystechnik und -geräte GmbH, Leonberg) durchgeführt. Die Detektion der eluierenden Nukleotide erfolgte durch Messung der Absorption bei 254 nm. Als Standard für die Retentionszeiten diente ein Gemisch aus je 25 μM Guanosin, GMP, GDP, GTP und GppNHp.

Die Analyse im Fall von mant-Nukleotiden erfolgte mit derselben Methode, jedoch in 50 mM Kaliumphosphat pH 6.6, 25 % Acetonitril und 10 mM Tetrabutylammoniumbromid (TBABr).

3.2.3.5.1 Bestimmung intrinsischer Hydrolyseraten

Die Bestimmung intrinsischer Hydrolyseraten von Rab1 und Rab1-AMP erfolgte nach Nukleotidaustausch des Rab-Proteins mit GTP und nachfolgender Umpufferung in 20 mM Hepes pH 7.5, 50 mM NaCl, 2 mM DTE. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 2 mM MgCl_2 gestartet, die Proben bei 25 °C inkubiert und die Nukleotidzusammensetzung zu unterschiedlichen Zeitpunkten mittels HPLC bestimmt.

3.2.3.6 Circular dichroismus- (CD-) Spektroskopie

Die Messung von Fern-UV-CD-Spektren beruht auf der unterschiedlichen Absorption von links und rechts zirkular polarisiertem Licht durch chirale Moleküle wie beispielsweise Proteinen. In dieser Arbeit wurden Fern-UV-CD-Spektren zum Vergleich der Sekundärstrukturelemente unterschiedlicher Aminosäureaustauschmutanten verwendet.

Die CD-Spektren wurden bei 25 °C und einer Proteinkonzentration von 0.2 mg/ml in 10 mM Kaliumphosphat-Puffer pH 7.5 in einem Jasco J-815 CD Spektrometer aufgenommen und mit dem Puffer-Spektrum korrigiert. Es wurde eine Hellma 106-QS Küvette (0.5 mm Schichtdicke) verwendet und die Spektren im Bereich von 178 – 260 nm aufgenommen (Aufnahmegeschwindigkeit 50 nm/min, Schrittweite 1 nm, 7 Akkumulationen pro Spektrum). Die Auswertung erfolgte mittels DichroWeb⁽¹⁵²⁻¹⁵⁴⁾ und dem Algorithmus CDSSTR⁽¹⁵⁵⁾ unter Verwendung des Referenzdatensatzes 1. Die Umrechnung in molare Elliptizität pro Aminosäurerest erfolgte nach Gleichung (2).

$$\Theta_{MRW,\lambda} = \frac{\Theta_{\lambda} \cdot MRW}{10 \cdot c \cdot d} \quad (2)$$

$\Theta_{MRW,\lambda}$	molare Elliptizität pro Aminosäurerest (grad $\text{dmol}^{-1} \text{cm}^2$)
Θ_{λ}	gemessene Elliptizität bei der Wellenlänge λ (grad)
MRW	mittlere molare Masse einer Aminosäure des Proteins (g mol^{-1})
c	Konzentration des Proteins (g ml^{-1})
d	Schichtdicke der Küvette (cm)

3.2.3.7 Kinetische Charakterisierungen der verwendeten Enzyme

Die Bestimmung kinetischer Parameter der in dieser Arbeit untersuchten Proteine erfolgte entweder durch Messung der Änderung der intrinsischen Tryptophanfluoreszenz (Anregungswellenlänge 297 nm, Detektionswellenlänge 340 nm), durch Messung der Fluoreszenzänderung der Rab-Protein gebundenen mant-Nukleotidanaloga (Anregungswellenlänge 365 nm, Detektionswellenlänge 440 nm bzw. Verwendung von 395 nm oder 420 nm *cut-off* Filtern) oder unter Verwendung von radioaktivem [α - ^{32}P]-ATP. Alle Messungen erfolgten bei 25 °C. Die unterschiedlichen Methoden werden in den folgenden Kapiteln genauer eingeführt.

3.2.3.7.1 Messung langsamer Kinetiken (Fluoromax)

Langzeitfluoreszenzmessungen wurden am Fluoromax-3 (Horiba Jobin Yvon Inc., Edison, USA) in einer Quartz-Küvette (105.202-QS, 10 mm, Hellma GmbH & Co. KG, Mühlheim, Deutschland) durchgeführt.

Die Bestimmung der Enzymparameter für DrrA und SidD erfolgte durch Bestimmung der Initialgeschwindigkeiten aus Progresskurven mit unterschiedlichen Substratkonzentration. Aus der Auftragung dieser Initialgeschwindigkeiten geteilt durch die verwendeten Enzymkonzentrationen $\left(\frac{v}{[E_0]}\right)$ gegen die genutzten Substratkonzentrationen ($[S]$) wurden mithilfe der Gleichung (3) für Michaelis-Menten Kinetiken und Gleichung (4) im Fall von sigmoidalem Verhalten die entsprechenden Enzymparameter erhalten.

$$\frac{v}{[E_0]} = \frac{[S] \cdot k_{cat}}{[S] + K_M} \quad (3)$$

$$\frac{v}{[E_0]} = \frac{[S]^n \cdot k_{cat}}{[S]^n + S_{0,5}^n} \quad (4)$$

v	gemessene initiale Reaktionsgeschwindigkeit ($\mu\text{M s}^{-1}$)
$[E_0]$	verwendete Enzymkonzentration (μM)
$[S]$	Substratkonzentration (M)
k_{cat}	Wechselzahl (s^{-1})
K_M	Michaelis-Menten Konstante (M)
$S_{0,5}$	Substratkonzentration bei halbmaximaler Reaktionsgeschwindigkeit
n	Kooperativitätskoeffizient

Bei niedrigen K_M -Werten wurden die Enzymparameter zudem aus einzelnen Progresskurven mithilfe des Programms KinTek Explorer^(156,157) und der folgenden vereinfachten Modelle bestimmt (Rab-NMP: nukleotidyliertes Rab; NMP: Nukleosid-5'-monophosphat):



Um einen Einfluss der GEF Domäne von DrrA auszuschließen wurden alle Experimente zur kinetischen Charakterisierung von DrrA mit der Mutante DrrA_{fl} N451A R453A D480A S483A⁽⁴⁵⁾ durchgeführt.

3.2.3.7.2 Messung schneller Kinetiken (stopped-flow)

Die Messung schneller Kinetiken erfolgte in einem Stopped-flow SX20 Gerät (Applied Photophysics Ltd, Surrey, Großbritannien).

Zur Bestimmung der Enzymparameter von GAPs wurden *single turnover* Experimente mit hohem Überschuss des entsprechenden Enzyms durchgeführt. Als Substrat wurde 0.5 μM Rab1:mantGTP genutzt um die Änderung der mant-Fluoreszenz durch die Hydrolyse von mantGTP zu mantGDP

verfolgen zu können. Alle Experimente wurden bei 25 °C in 20 mM Hepes pH 7.5, 50 mM NaCl und 5 mM MgCl₂ durchgeführt. Erhaltene Progresskurven wurden mit der Software des Herstellers (Pro-Data SX, Applied Photophysics Ltd, Surrey, Großbritannien) und Verwendung einer einfach exponentiellen Funktion ausgewertet. Die erhaltenen Reaktionsraten (k_{obs}) wurden gegen die Enzymkonzentrationen aufgetragen und zur Bestimmung von k_{cat} und K_M mit Gleichung (5) ausgewertet.

$$k_{obs} = \frac{[E] \cdot k_{cat}}{[E] + K_M} \quad (5)$$

k_{obs}	Reaktionsrate (s ⁻¹)
[E]	Enzymkonzentration (M)
k_{cat}	Wechselzahl (s ⁻¹)
K_M	Michaelis-Menten Konstante (M)

Sofern keine ausreichende Sättigung der Reaktionsrate bei hohen Enzymkonzentrationen beobachtet werden konnte wurden die Daten mit einer linearen Funktion ausgewertet und somit die katalytische Effizienz $\left(\frac{k_{cat}}{K_M}\right)$ aus der Steigung erhalten.

Die GEF katalysierte Reaktion von DrrA wurde ebenfalls mittels mant-Fluoreszenz durch Verwendung von 50 nM Rab1:mantdGDP bzw. 50 nM Rab1-AMP:mantdGDP in Gegenwart von 1 μM DrrA₃₄₀₋₅₃₃ in 25 mM Hepes pH 7.5, 50 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 5 mM DTE und 100 μM GDP bei 25 °C verfolgt. Die Anregung erfolgte bei 366 nm, die Emission wurde mit einem 420 nm *cut-off* filter verfolgt. Die Auswertung der erhaltenen Kurven erfolgte durch Anpassung mit einer einfach exponentiellen Funktion.

3.2.3.7.3 Messung von Kinetiken mittels radioaktivem [α -³²P]-ATP

Kinetische Messungen zur Adenylylierung von 50 μM Rab1_{fi}:GDP in Gegenwart von 1 μM DrrA_{fi} bzw. 50 μM Rab1_{fi}:GppNHp in Gegenwart von 5 nM DrrA_{fi} wurden bei 25 °C in 20 mM Hepes pH 7.5, 50 mM NaCl, 2 mM DTE, 5 mM MgCl₂, 10 μM GDP oder 10 μM GppNHp und 400 μM ATP (15 μCi/ml [α -³²P]-ATP) durchgeführt. Nach unterschiedlichen Zeitpunkten wurden Proben der Reaktion entnommen und auf P-81 Filterpapier (Whatman International, Kent, UK) pipettiert, drei mal in 160 ml 0.75 %iger Phosphorsäure gewaschen und anschließend in einem Wallac 1409 Szintillationszähler (Wallac, Freiburg, Deutschland) die Radioaktivität quantifiziert.

Aus den Auftragungen des umgesetzten Rab1 gegen die Zeit und der Anpassung mit einer einfach exponentiellen Funktion wurde die observierte Ratenkonstante erhalten. Aus dieser konnte durch Division mit der Enzymkonzentration die apparente katalytische Effizienz berechnet werden.

3.2.3.8 Isotherme Titrationskalorimetrie

Die isotherme Titrationskalorimetrie (engl.: *isothermal titration calorimetry*, ITC) ist eine Methode zur direkten Bestimmung der Affinität (K_D) zweier Substanzen sowie der Bindungsenthalpie (ΔH) und der Stöchiometrie des gebildeten Komplexes. Hierbei wird ein Interaktionspartner in einer Zelle vorgelegt und mit dem zweiten Interaktionspartner titriert. Die Wärmetönung der Bindung beider Interaktionspartner wird direkt im Vergleich zu einer Referenzzelle gemessen.

In dieser Arbeit wurde ein ITC₂₀₀ Kalorimeter (MicroCal / GE Healthcare, München, Deutschland) verwendet um die Bindungsaffinitäten verschiedener Mutanten des humanen Effektorproteins Mical-3 für Rab1 zu bestimmen. Dabei wurden 400 – 500 μM Mical in 19 Injektionen (je 2 μl) zu 40 – 50 μM Rab1:GppNHp titriert. Um unerwünschte Effekte auszuschließen wurden alle Proteinlösungen zudem gegen Puffer ohne Protein titriert und, sofern vorhanden, die Interaktionsmessungen um den Puffereffekt korrigiert. Alle Messungen wurden bei 25 °C in 20 mM HEPES pH 7.5, 50 mM NaCl, 2 mM DTE und 2 mM MgCl_2 durchgeführt. Die Auswertung erfolgte mit der mitgelieferten Software des Herstellers (Origin 7.0).

3.2.3.9 Röntgenkristallstrukturanalyse

Die Kristallstrukturanalyse ist eine Methode, um die atomare Struktur von kleinen Molekülen sowie von Makromolekülen wie beispielsweise Proteinen oder DNA aufzuklären. Hierzu werden Kristalle des entsprechenden Moleküls Röntgenstrahlung ausgesetzt und das entstehende Beugungsmuster detektiert. Aus diesem Beugungsmuster kann mit unterschiedlichen Verfahren die Elektronendichte des Moleküls berechnet werden, eine anschließende Interpretation der Elektronendichte erlaubt die Modellierung des Moleküls.

In dieser Arbeit wurden die Strukturen der Proteine Rab1₃₋₁₇₄-AMP:GppNHp und SeMet-Mical₁₈₄₁₋₁₉₉₀ mit dieser Methode gelöst. Initiale Kristallisationsbedingungen wurden jeweils durch Verwendung der Protein Kristallisations Kits (*JCSG Core I – IV Suites*, *JCSG+ Suite*, *Classics Suite*, *PACT Suite*, *PEG I + II Suite*, *Protein Complex Suite*, Qiagen, Hilden, Deutschland) gefunden.

Für Rab₁₃₋₁₇₄-AMP:GppNHp ergab dabei die Bedingung 50 (*PEG II Suite*) initiale dünne nadelförmige Kristalle. Durch Variation der puffernden Substanz und des pH, Variation der initialen Konzentrationen der Additive und Tests verschiedener zusätzlicher Additive konnte das Protein schließlich in einer Konzentration von 10 – 12 mg/ml (Bedingungen: 500 µl Reservoir Lösung: 100 mM Imidazol pH 6.0, 15 % (v/v) Isopropanol, 15 % (w/v) PEG 4000, 10 mM BaCl₂; 1 µl Proteinlösung und 1 µl Reservoir Lösung; hängende Tropfen; 20 °C) kristallisiert werden.

Initiale Kristalle von SeMet-Mical₁₈₄₁₋₁₉₉₀ wuchsen in Bedingung 46 (*JCSG Core III Suite*). Durch Variation der Additivkonzentrationen der Reservoir Lösung sowie der Proteinkonzentration wurden schließlich optimierte Kristalle erhalten (Bedingungen: 5.5 – 11 mg/ml SeMet-Mical₁₈₄₁₋₁₉₉₀; 500 µl Reservoir Lösung: 0.1 M Tris pH 7.0, 45 – 50 % (v/v) PEG 200; 1 µl Proteinlösung und 1 µl Reservoir Lösung; hängende Tropfen; 20 °C).

Verschiedene Kristalle der Proteine wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren und im Max-Planck-Institut auf ihr Streuvermögen getestet (MICROSTAR Röntgenquelle, Bruker AXS Inc., Madison, USA; Mar345 Image Plate Detektor, Marresearch GmbH, Norderstedt, Deutschland). Für gut streuende Kristalle wurde an der Röntgenquelle X10SA des *Swiss Light Source* (Paul Scherrer Institut, Villigen, Schweiz) ein Datensatz aufgenommen.

Die Datenprozessierung erfolgte mit XDS⁽¹⁵⁸⁾. Die Struktur von Rab₁₃₋₁₇₄-AMP:GppNHp wurde durch molekularen Ersatz mittels Phaser⁽¹⁵⁹⁾ und Verwendung der Struktur von Ypt1 (PDB Zugangsnummer 1YZN), gefolgt von alternierenden Zyklen manuellen Modellbaus mit WinCoot⁽¹⁶⁰⁾ und Verfeinerung mit REFMAC5⁽¹⁶¹⁾ gelöst. Die Struktur von SeMet-Mical₁₈₄₁₋₁₉₉₀ wurde mittels Phenix⁽¹⁶²⁾ gelöst, die Verfeinerung erfolgte anschließend wie zuvor für Rab₁₃₋₁₇₄-AMP:GppNHp beschrieben. Die Datenstatistiken sind in Kapitel 7.1 zusammengefasst.

3.2.3.10 Röntgenkleinwinkelstreuung

Mittels der Röntgenkleinwinkelstreuung (engl.: *small angle x-ray scattering*, SAXS) können Moleküle strukturell in Lösung untersucht werden. Hierbei können Informationen über Konformation und Form des Moleküls im Gegensatz zur Röntgenkristallstrukturanalyse nur mit einer Auflösung von 10 – 50 Å erhalten werden, jedoch bietet die Methode den Vorteil, dass keine Kristalle mit einer hohen Ordnung des entsprechenden Makromoleküls benötigt werden^(163,164).

In dieser Arbeit wurde DrrA_{fl} im Komplex mit Rab₁₃₋₁₇₄ mittels SAXS analysiert. Alle Messungen und Auswertungen wurden unter Nutzung der Strahlenquelle X33 des DORIS Speicherringes am DESY

(Deutsches Elektronen Synchrotron, Hamburg) in Kooperation mit Dr. Alexander V. Shkumatov, Dr. Manfred Roessle und Dr. Dmitri Svergun (*European Molecular Biology Laboratory* (EMBL), Hamburg) durchgeführt. Die Messungen erfolgten bei 20 °C in 20 mM Hepes pH 8.0, 50 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 2 mM DTE (Detektor Pilatus 1-M, Detektor Distanz 2.7 m, Wellenlänge 1.5 Å).

4 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

4.1 Die N-terminale Domäne von DrrA modifiziert Rab-Proteine kovalent

In der Einleitung wurde bereits auf die hohe strukturelle Homologie der N-terminalen Domäne von DrrA zu DNA Polymerase β -ähnlichen Nukleotidyltransferasen und insbesondere der GSAtase sowie auf das vorhandene katalytische Motiv $Gx_{11}[D/E]x[D/E]$ eingegangen. Basierend auf diesen Beobachtungen wurde vermutet, dass DrrA ebenfalls Adenylyltransferase-Aktivität besitzt. Da zuvor bereits gezeigt wurde dass die zentrale GEF Domäne von DrrA Nukleotidaustausch an Rab1 katalysiert^(45,114), wurde weiterhin vermutet, dass eine Adenylylierung ebenfalls an Rab1 stattfinden könnte. Initiale Experimente konnten diese Vermutung bestätigen und wurden in dieser Arbeit fortgeführt.

4.1.1 Massenspektrometrische Analyse

Um die Adenylyltransferaseaktivität der N-terminalen Domäne von DrrA gegenüber Rab1 zu zeigen wurden zunächst massenspektrometrische Analysen durchgeführt (Abbildung 4-1). Die Inkubation von Rab1 in Gegenwart von DrrA und ATP führte zu einem Anstieg der molekularen Masse von Rab1 um 327 Da, entsprechend der Modifizierung von Rab1 mit einem AMP-Rest (erwarteter Anstieg 329 Da). Weiterführende Analysen durch Prof. Dr. Aymelt Itzen und Dr. Petra Janning (MPI für molekulare Physiologie, Dortmund) mittels ESI-MS/MS zeigten, dass die Modifizierung an einem der beiden Tyrosinreste des tryptischen Peptids $_{72}TITSSYYR_{79}$ von Rab1 erfolgte⁽¹²⁷⁾. Daher wurden die Aminosäureaustauschmutanten Rab1b_{fl} Y77F und Rab1b_{fl} Y78F ebenfalls als Substrate für die Adenylylierung durch DrrA getestet. Eine Modifizierung erfolgte dabei nur im Fall von Rab1b_{fl} Y78F, Rab1b_{fl} Y77F wurde unter gleichen Bedingungen nicht modifiziert (Abbildung 4-1). Anhand dieser Ergebnisse konnte bereits mit großer Sicherheit gesagt werden, dass eine Modifizierung an Y77 in der *switch II* Region von Rab1 erfolgte.

Anhand des strukturellen Vergleichs der N-terminalen Domäne von DrrA und der GSAtase wurde neben der generellen strukturellen Ähnlichkeit auch eine ähnliche relative Orientierung des katalytischen Motivs $Gx_{11}[D/E]x[D/E]$ beobachtet^(128,165). Um die Bedeutung dieses Motivs auch für die Katalyse durch DrrA zu zeigen wurden Mutationen der Aminosäuren D110 und D112 zu Alaninen eingeführt. Diese Mutationen führten zu einem katalytisch inaktiven Enzym (Abbildung 4-1) und bestätigten somit die essentielle Funktion dieser Aminosäuren auch bei der Katalyse der Adenylylierung durch DrrA.

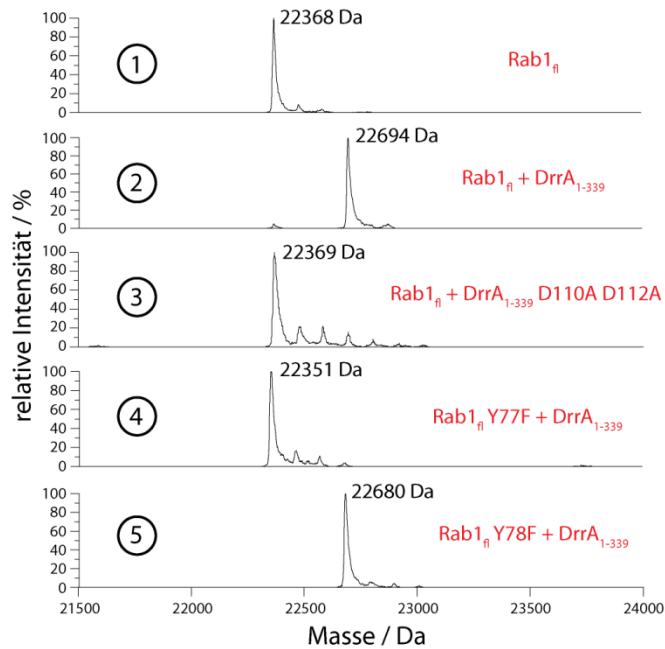


Abbildung 4-1: Massenspektrometrische Analyse der Adenylylierung von Rab1. Gezeigt sind von oben nach unten die Massenspektren von 50 μM Rab1_{ri} (1), 50 μM Rab1_{ri} nach Inkubation in Gegenwart von 20 μM DrrA₁₋₃₃₉ und 100 μM ATP (2), 50 μM Rab1_{ri} in Gegenwart von 20 μM DrrA₁₋₃₃₉ D110A D112A und 100 μM ATP (3), 50 μM Rab1_{ri} Y77F nach Inkubation in Gegenwart von 50 μM DrrA₁₋₃₃₉ und 100 μM ATP (4) und 50 μM Rab1_{ri} Y78F nach Inkubation in Gegenwart von 50 μM DrrA₁₋₃₃₉ und 100 μM ATP (5). Die Reaktionen wurden jeweils für 2 h bei RT durchgeführt. Die anhand der Sequenz berechneten erwarteten Massen sind 22365 Da für unmodifiziertes Rab1_{ri} und 22349 Da für unmodifiziertes Rab1_{ri} Y77F bzw. Rab1_{ri} Y78F⁽¹⁶⁶⁾, eine Adenylylierung führt zu einem Anstieg der molekularen Masse um 329 Da. Abbildung modifiziert nach⁽¹²⁷⁾.

4.1.2 Die Struktur des kovalent modifizierten Rab1

Um einen definitiven Nachweis der Modifizierungsstelle in Rab1 zu erbringen sowie zur weiteren Charakterisierung der Konsequenzen der Modifizierung sollte die Struktur des modifizierten Rab1b mittels Röntgenkristallstrukturanalyse bestimmt werden. Initiale Kristallisationsbedingungen wurden mithilfe der JCSG core I-IV und der EasyXtal PEG Hochdurchsatz Kristallisationsplatten (Qiagen, Hilden, Deutschland) ermittelt und anschließend durch Variation der Additive und Additivkonzentration sowie der puffernden Substanzen optimiert (Abbildung 4-2, A). Schließlich konnten Kristalle erhalten werden, die am Synchrotron (SLS, Villigen, Schweiz) gut diffraktierten und einen vollständigen Datensatz bis zu einer Auflösung von 1.7 Å ergaben.

Die gelöste Struktur des modifizierten Rab1b (Abbildung 4-2, B) zeigte die typische Faltung einer kleinen GTPase, bestehend aus einem zentralen 6-strängigen β -Faltblatt umgeben von 5 α -Helices. Die asymmetrische Einheit enthielt zwei Rab1 Monomere. Zusätzliche Elektronendichte konnte jeweils am Y77 in der *switch II* Region gut durch die AMP-Modifizierung erklärt werden (Abb. 4-2, D). Hierbei zeigten sich leicht unterschiedliche Konformationen der AMP-Reste zwischen Kette A und Kette B in der Kristallstruktur. Im Fall des Adenosinrings von Monomer A konnte eine Stapelwechselwirkung (engl.: *stacking interaction*) mit dem Phenylring von F45 (β -Faltblatt 2) beobachtet werden, welche in Monomer B nicht zu beobachten war. Die Konturierung der Elektronendichte bei unterschiedlichen σ -Werten (Abbildung 4-2, D) zeigte weiterhin eine sehr gut definierte Elektronendichte im Bereich des

Tyrosinringes und des α -Phosphates des AMP-Restes, welche graduell im Bereich der Ribose und des Adenosin-Ringes abnimmt. Zusammengenommen deuten die unterschiedlichen Konformationen des AMP-Restes in Kette A und Kette B, die Konturierungen der Elektronendichte bei unterschiedlichen σ -Werten sowie Temperatur-Faktoren der Atome der Adenosin-Ringe zwischen etwa 40 \AA^2 und 60 \AA^2 auf eine konformationelle Flexibilität des AMP-Restes hin, die nur teilweise durch die beobachtete Stapelwechselwirkung mit F45 (Abb. 4-2, B) eingeschränkt wird.

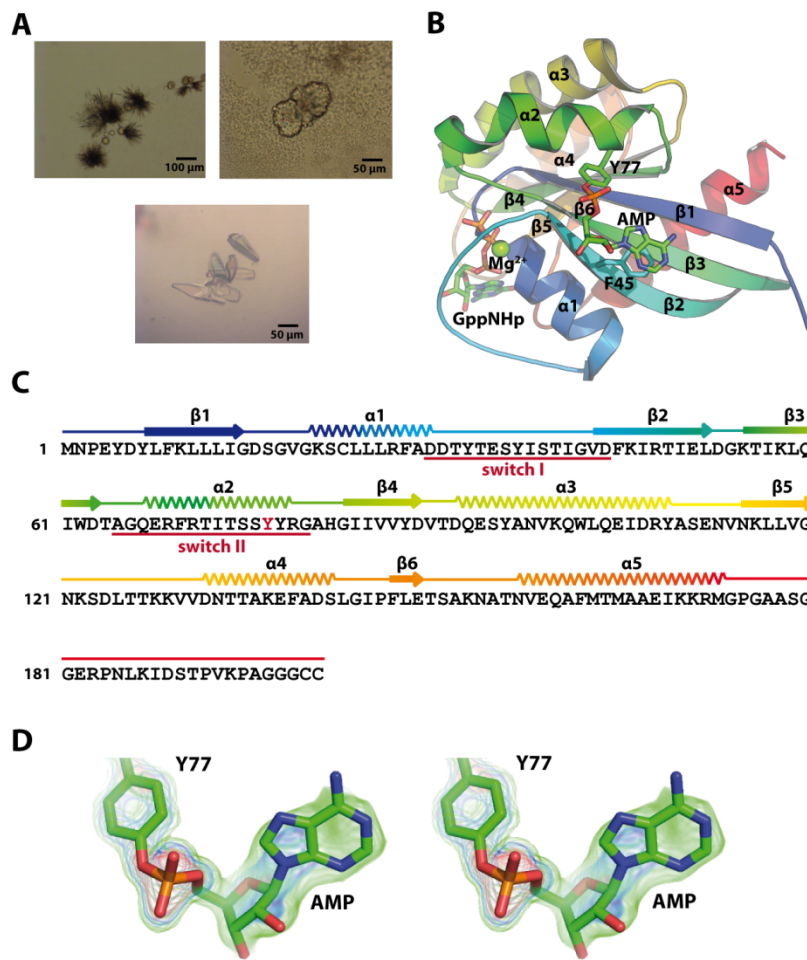


Abbildung 4-2: Kristallisation und Röntgenkristallstruktur von Rab1b₃₋₁₇₄:GppNHp-AMP. (A) Initiale Kristalle wurden mit einer Reserviörlösung bestehen aus 10 % PEG 4000, 20 % Isopropanol (links oben) erhalten, die Verfeinerung erfolgte durch Variation der Additivkonzentrationen und in Gegenwart puffernder Substanzen (100 mM Imidazol pH 6.0, 15 % PEG 4000, 15 % Isopropanol, rechts oben) und Hinzufügen weiterer Additive (100 mM Imidazol pH 6.0, 15 % PEG 4000, 15 % Isopropanol, 10 mM BaCl₂, unten). (B) Mithilfe der verfeinerten Kristalle konnte die Struktur von Rab1b₃₋₁₇₄: GppNHp-AMP mit einer Auflösung von 1.7 Å ($R_{\text{work}} = 15.6$, $R_{\text{free}} = 19.6$) gelöst werden. Die asymmetrische Einheit enthielt 2 Rab-Proteine, gezeigt ist eine Bänderdarstellung der Kette A sowie das AMP-modifizierte Y77 und das gebundene GppNHp in der Stabdarstellung (Kohlenstoff – grün, Sauerstoff – rot, Stickstoff – blau, Phosphor – orange) und Mg²⁺ als grüne Kugel. Die Struktur wurde unter der PDB Zugangsnummer 3NKV veröffentlicht. Die

Datenstatistik ist in Kapitel 7.1 zusammengefasst. (C) Sequenz von Rab1b. Das modifizierte Y77 im *switch II* ist in der Sequenz rot markiert. Die Sekundärstrukturelemente sind oberhalb der Sequenz mit dem selben Farbverlauf wie in (B) als Pfeile (β -Faltblätter) und Spiralen (α -Helices) dargestellt, *switch I* und *switch II* sind rot unterstrichen hervorgehoben. (D) Stereo Abbildung des AMP-modifizierten Tyrosin 77 aus Kette A. Die $2F_o - F_c$ -Elektronendichte ist bei 1.0 σ (grün), 2.0 σ (blau) und 3.0 σ (rot) dargestellt. Die Darstellung von Molekülstrukturen erfolgte mittels PyMol 1.4⁽¹²⁹⁾.

In der Einleitung wurde bereits die entscheidende Rolle der *switch* Regionen von kleinen GTPasen für die Funktion als molekulare Schalter sowie die Wechselwirkung mit diversen Interaktionspartnern erläutert. Die Modifizierung des Y77 in der *switch II* Region (α -Helix 2, Abbildung 4-2, C) deutete daher entscheidende Auswirkungen der Modifizierung auf die Funktion der kleinen GTPase an, die Untersuchung dieser Effekte ist in Kapitel 4.3 beschrieben.

4.1.3 Unterschiedliche Rab-Proteine können kovalent modifiziert werden

Nachdem gezeigt wurde, dass Rab1 durch DrrA modifiziert werden konnte, sollten weitere kleine GTPasen als DrrA-Substrate getestet werden, um Einblicke in die Substratspezifität des Enzyms zu erhalten. Die GDP-gebundenen Rab-Proteine wurden hierzu jeweils in Gegenwart von ATP und DrrA inkubiert und anschließend mittels Massenspektrometrie die Massen der Rab-Proteine vor und nach Inkubation bestimmt (alle Massenspektren sind im Anhang in Kapitel 7.2 gezeigt). Eine erfolgreiche Modifizierung konnte im Fall von Rab1b, Rab3a, Rab4b, Rab6a, Rab8a, Rab11a, Rab13, Rab14, Rab35 und Rab37 beobachtet werden. Rab5a, Rab7a, Rab9a, Rab22a, Rab23, Rab27a, Rab31, Rab32, Rab38 sowie die kleinen GTPasen RhoA, Rac, Cdc42 und Ras wurden nicht modifiziert.

Um die Substratspezifität der Adenylylierung durch DrrA zu erklären wurde zunächst ein phylogenetischer Stammbaum der getesteten Rab-Proteine erstellt (Abbildung 4-3). Der Stammbaum zeigt eine distinkte Gruppierung der Adenylylierungssubstrate sowie der Rab-Proteine, die nicht als Substrate der Adenylylierung dienen. Die Substrate der Adenylylierung sind im unteren Bereich des Stammbaums angesiedelt, während Rab-Proteine, welche nicht als Substrate dienen, im oberen Bereich des Stammbaums zu finden sind. Lediglich Rab6 und Rab27 bilden Ausnahmen. Da Rab27 anstelle des modifizierbaren Tyrosins ein Phenylalanin besitzt (Abbildung 4-4) ist eine Modifizierung nicht möglich. Innerhalb dieser Arbeit wurde daher die Austauschmutante Rab27 F88Y hergestellt und die Adenylylierung durch DrrA getestet (das Massenspektrum ist in Kapitel 7.2.1 gezeigt). Interessanterweise war eine Modifizierung von Rab27 F88Y dabei nur in der aktiven GppNHp-gebundenen Konformation möglich, nicht jedoch in der GDP-gebundenen Konformation. Diese Besonderheit ist vermutlich auf ein ungewöhnliches Dimerisierungsverhalten von Rab27 durch *domain swapping* der *switch*-Bereiche im GDP-gebundenen Zustand zurückzuführen, durch welches die Modifizierungsstelle in der GDP-gebundenen Form nicht zugänglich ist⁽¹⁶⁷⁾. Rab6 wiederum wurde nach der extensiven Sequenzanalyse durch Kloepper *et. al*⁽⁸⁷⁾ in eine eigene Supergruppe eingeteilt. Abbildung 4-3 zeigt, dass die Substrate der Adenylylierung alle den durch Klöpffer *et. al* definierten

Gruppen I, IV und V zugeordnet werden können. Diese Gruppen umfassen Rab-Proteine, die eine wichtige Funktion in den vesikulären Transportprozessen der Sekretion (Gruppe I, z. B. Rab1 und Rab8), dem endozytotischen Recycling (Gruppe IV, z. B. Rab4 und Rab11) sowie dem Transport von Endosomen zum Golgi Apparat (Gruppe V, Rab6) besitzen und somit in der Pathogenese von Legionellen eine Rolle spielen könnten⁽⁸⁸⁾. Weiterhin lokalisieren während der Infektion neben Rab1 auch weitere Rab-Proteine an der LCV (Rab7, Rab8 und Rab14)⁽¹¹¹⁾. Ob eine Adenylylierung dieser und weiterer Rab-Proteine (mit Ausnahme von Rab7, da dieses kein modifizierbares Tyrosin besitzt) eine Rolle in der Infektion spielt ist jedoch zu diesem Zeitpunkt unklar.

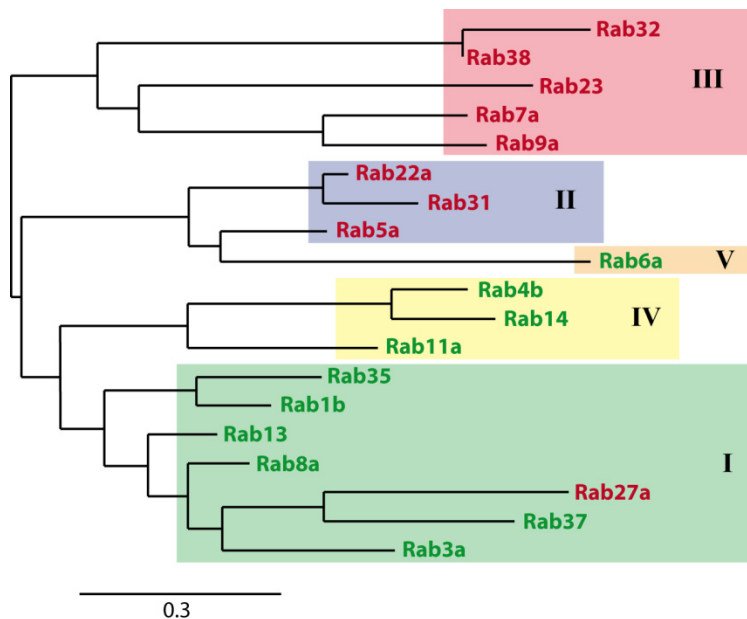


Abbildung 4-3: Phylogenetischer Baum der für die Adenylylierung durch DrrA getesteten Rab-Proteine. Der phylogenetische Baum wurde am 23.08.2012 erstellt (<http://www.phylogeny.fr/>)⁽¹⁶⁸⁾. Die Rab-Proteine, welche Substrate der Adenylylierung durch DrrA sind in grüner, alle anderen in roter Schrift gezeigt. Die getesteten Rab-Proteine sind weiterhin nach den von Kloepper *et. al.*⁽⁸⁷⁾ definierten 6 Supergruppen der Rab-Proteine unterteilt und farblich unterlegt (I – grün, II – blau, III – rot, IV – gelb, V – orange, aus Supergruppe VI wurde kein Rab-Protein innerhalb dieser Arbeit untersucht). Der Maßstabsbalken zeigt die Anzahl der Aminosäureaustausche pro Aminosäure des Proteins.

Um die Substratspezifität von DrrA auch auf Ebene der Primärstruktur der Rab-Proteine zu erklären und mögliche spezifitätsbestimmende Aminosäuren zu ermitteln wurde ein Sequenzvergleich der unmittelbar benachbarten Aminosäuren zu Y77 in Rab1b von allen getesteten Rab-Proteinen durchgeführt (Abbildung 4-4).

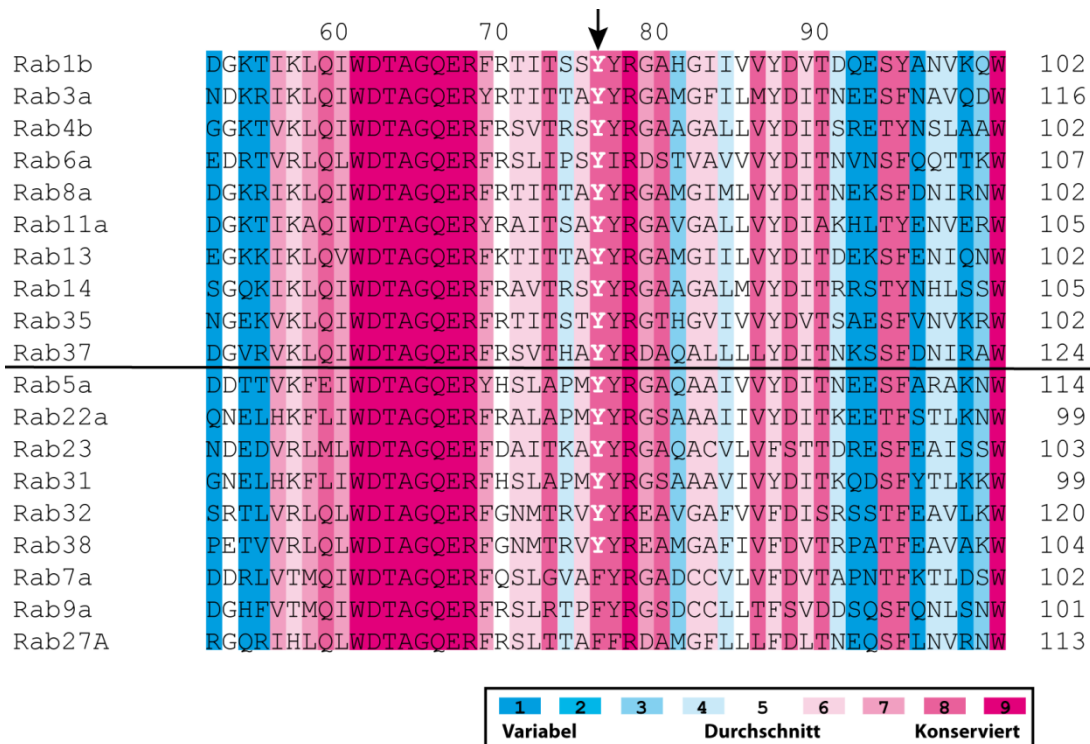


Abbildung 4-4: Sequenzvergleich der als Substrate für die DrrA-katalysierte Adenylierung getesteten Rab-Proteine. Der Sequenzvergleich wurde mit ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>, 01.06.2012) durchgeführt, die Farbkodierung der Konservierung unterschiedlicher Aminosäurereste erfolgte mittels ConSurf⁽¹⁶⁹⁾. Gezeigt ist die Sequenz benachbart zum modifizierten Tyrosin (Y77 in Rab1), das Tyrosin ist in weiß markiert und durch einen Pfeil oberhalb der Sequenzen gekennzeichnet. Die Nummerierung oberhalb der Sequenzen entspricht der Nummerierung für Rab1b, rechts neben den Sequenzen ist jeweils die Nummer der C-terminalen gezeigten Aminosäure des entsprechenden Rab-Proteins angegeben. Alle Rab-Proteine oberhalb der schwarzen Linie wurden durch DrrA adenyliert, alle Rab-Proteine unterhalb der Linie wurden durch DrrA nicht als Substrat genutzt. Abbildung modifiziert nach⁽¹²⁷⁾.

In Abbildung 4-4 ist zu sehen, dass Rab7a, Rab9a und Rab27a ein Phenylalanin an der Y77-homologen Position in Rab1b besitzen und aus diesem Grund nicht modifiziert werden können. Bei den modifizierbaren Rab-Proteinen zeigte sich weiterhin im Vergleich zu den nicht-modifizierbaren Rab-Proteinen ein konservierter basischer Rest in Position 71 (Arginin oder Lysin) sowie benachbart zum modifizierten Y77 in Position 76 ein kleiner Rest (Alanin, Serin oder Threonin), wohingegen einige der Rab-Proteine, die nicht als Substrate dienen, ein Methionin an dieser Position besitzen. Weiterhin ist bekannt, dass eine Phosphocholinierung von S76 in Rab1b die katalytische Effizienz der Adenylierung stark vermindert⁽¹²⁵⁾. Dies deutet darauf hin, dass entweder die größere Seitenkette oder die positive Ladung des Phosphocholins an dieser Position die Effizienz der Adenylierung vermindert. Aufgrund dieser möglichen spezifitätsbestimmenden Aminosäuren wurden die entsprechenden Rab1 Aminosäureaustauschmutanten Rab1 R71H und Rab1 S76M als Substrate für DrrA getestet. Mittels

Massenspektrometrie (Abbildung 4-5) konnte jedoch gezeigt werden, dass beide Mutationen kein Ausschlusskriterium für die Modifizierung darstellen und beide Rab1 Mutanten durch DrrA modifiziert werden.

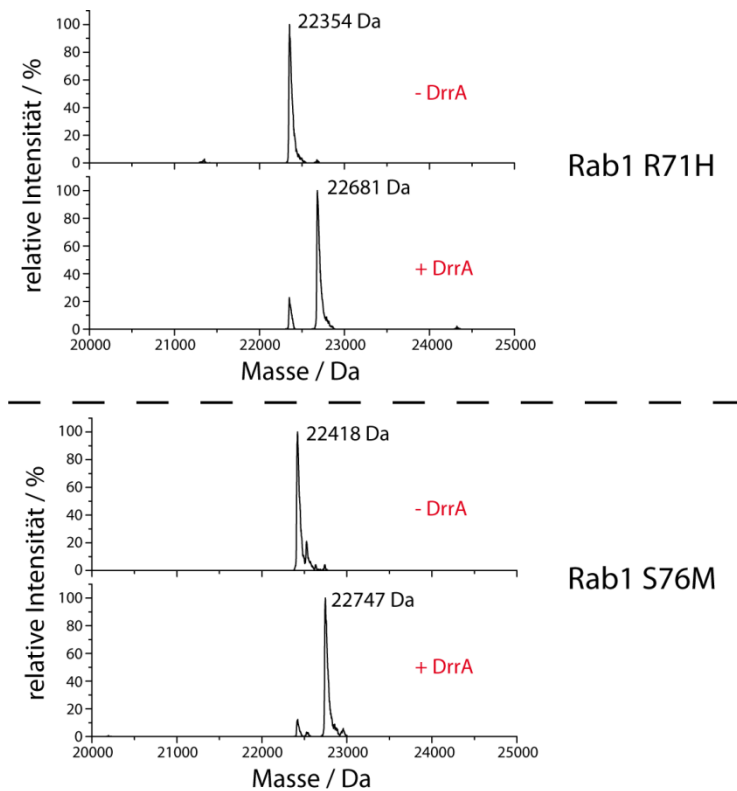


Abbildung 4-5: Die Aminosäurepunktmutanten Rab1 R71H und Rab1 S76M sind Adenylylierungs-substrate für DrrA. Gezeigt sind jeweils die Massenspektren von 50 μ M Rab1 R71H (oberhalb der gestrichelten Linie) und 50 μ M Rab1 S76M (unterhalb der gestrichelten Linie) vor (-DrrA) und nach (+DrrA) Inkubation für 2 h in Gegenwart von 20 μ M DrrA und 400 μ M ATP bei Raumtemperatur (erwartete Massen: Rab1 R71H, 22346 Da; Rab1 S76M, 22409 Da).

Um weitere Einblicke in mögliche spezifitätsvermittelnde Bereiche der Rab-Proteine zu erhalten wurden daher alle modifizierbaren Rab-Proteine mittels ClustalW verglichen (ein vollständiger Sequenzvergleich ist im Anhang in Kapitel 7.2.1.1 gezeigt) und die Sequenzkonservierung durch ConSurf dargestellt⁽¹⁶⁹⁻¹⁷²⁾. Zum Vergleich wurde dasselbe mit allen nicht modifizierbaren Rab-Proteinen gemacht, die ein Tyrosin an der Y77 homologen Position in Rab1 besitzen (Abbildung 4-6). Bei allen Rab-Proteinen zeigt sich in dieser Abbildung wie zu erwarten eine starke Konservierung im Bereich der G-Motive, wohingegen der hypervariable C-Terminus die geringste Konservierung aufweist.

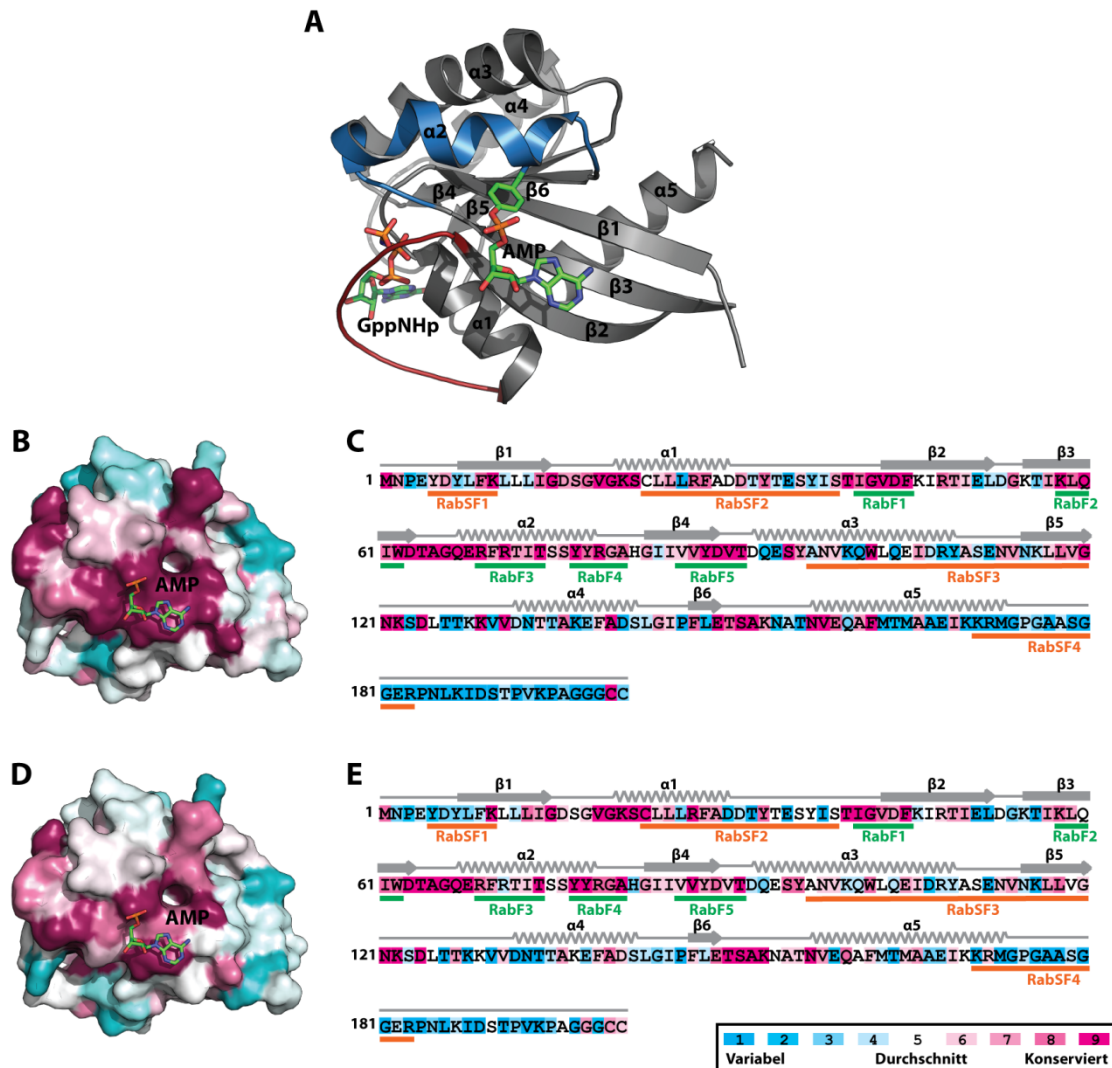


Abbildung 4-6: Vergleich der Konservierung der Aminosäuren in Rab-Proteinen. (A) Struktur des AMP-modifizierten Rab₁₋₃₋₁₇₄:GppNHp in Bänderdarstellung (*switch I* – rot, *switch II* – blau, Rest – grau) mit dem AMP-modifizierten Y77 und dem gebundenen GppNHp in der Stab Darstellung (Kohlenstoff – grün, Sauerstoff – rot, Stickstoff – blau, Phosphor – orange). (B) Oberflächenrepräsentation der Konservierung der Aminosäuren in Rab-Proteinen, die als Substrate der Adenylylierung durch DrrA dienen (vergleiche Tabelle 7-2, Rab1b als Referenzsequenz, Rab3a, Rab4b, Rab6a, Rab8a, Rab11a, Rab13, Rab14, Rab35). (C) Sequenz von Rab1 mit derselben Farbkodierung als Maß der Konservierung wie in (B). (D) Oberflächenrepräsentation der Konservierung der Aminosäuren in Rab-Proteinen, die ein Tyr an der Y77 homologen Position in Rab1 besitzen, jedoch nicht als Substrate der Adenylylierung durch DrrA dienen (vergleiche Tabelle 7-2, Rab1b als Referenzsequenz, Rab5a, Rab22a, Rab23, Rab31, Rab32, Rab38). (E) Sequenz von Rab1 mit derselben Farbkodierung als Maß der Konservierung wie in (C). Die Sekundärstrukturelemente sind jeweils oberhalb der Sequenzen in grau angedeutet, RabF-Motive und RabSF-Motive sind in grün bzw. orange gezeigt. Für die Darstellungen wurde jeweils ein Sequenzvergleich mit ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>, 21.06.2012) durchgeführt und die Ergebnisse mittels ConSurf (<http://consurf.tau.ac.il/>, 21.06.2012) veranschaulicht⁽¹⁶⁹⁻¹⁷²⁾. Konservierte Reste sind jeweils in magenta, nicht-konservierte Reste in cyan gezeigt. Die Darstellung von Molekülstrukturen erfolgte mittels PyMol 1.4⁽¹²⁹⁾.

Anhand der Modifizierungsstelle kann vermutet werden, dass eine Interaktion von DrrA während der Katalyse mit den *switch*-Bereichen sowie den α -Helices 1 und 2 und den β -Faltblättern 1-3 der Rab-Proteine stattfindet (entspricht etwa den Aminosäuren 1-80 in Rab1b). In Abbildung 4-6 zeigt sich, dass diese Bereiche in den Rab-Proteinen, die als Substrate der Adenylylierung dienen eine deutlich stärkere Konservierung aufweisen, als die Rab-Proteine, die nicht durch DrrA modifiziert wurden. Insbesondere die Aminosäuren V43 und D44 (beide RabF1), K58 und Q60 (beide RabF2) sowie das bereits zuvor untersuchte R71 (RabF3) zeigen eine starke Konservierung in den Adenylylierungssubstraten, die in den anderen getesteten Rab-Proteinen nicht zu beobachten ist (vergleiche Kapitel 7.2.1.1). Diese Aminosäuren könnten daher eine wichtige Funktion in der Bindung der Rab-Proteine an DrrA während der Adenylylierung spielen. Um diese Theorie zu bestätigen müssten weitere Aminosäureaustauschmutanten hergestellt werden und eine kinetische Analyse zur Charakterisierung der Mutanten durchgeführt werden. Weiterhin könnte getestet werden, ob die Adenylylierung weiterer Rab-Proteine anhand dieser Analyse vorhergesagt werden kann. Da Rab2 und Rab18 die aufgeführten Aminosäuren (mit Ausnahme des Q60-homologen Glutamins in Rab18) besitzen und weiterhin den nach Kloepper *et al.*⁽⁸⁷⁾ definierten Supergruppen I und IV zugeordnet werden müssten diese durch DrrA adenylyliert werden. Rab21 und Rab24 hingegen dürften nach dieser Analyse als Mitglieder der Supergruppe II nicht adenylyliert werden und zeigen wie zu erwarten keine Konservierung der aufgeführten Aminosäuren. Nach dieser initialen Charakterisierung der Substratspezifität von DrrA gegenüber unterschiedlichen Rab-Proteinen sollte weiterhin getestet werden, welche Substratspezifitäten DrrA gegenüber unterschiedlichen Nukleotiden und der GDP- bzw. der GTP-gebundenen Konformation von Rab1 besitzt. Die Experimente hierzu sind im nächsten Kapitel beschrieben.

4.2 Kinetische Charakterisierung der Adenylylierung durch DrrA

Im Folgenden soll auf die kinetische Charakterisierung der Adenylylierung durch DrrA eingegangen werden. Da während der Adenylylierung lediglich das α -Phosphat von ATP unter Freisetzung von Pyrophosphat (entspricht β - und γ -Phosphat von ATP) auf Rab1 übertragen wird wurden erste Experimente unter Verwendung von radioaktivem $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ durchgeführt. Das modifizierte Rab1 konnte somit nach der Reaktion immobilisiert und überschüssiges freies ATP entfernt werden, um die Reaktion durch Szintillationsmessungen des immobilisierten Rab-Proteins quantitativ verfolgen zu können. Abbildung 4-7 zeigt die mit dieser Methode gemessenen Kinetiken der Adenylylierung von $50\ \mu\text{M}$ Rab1:GDP in Gegenwart von $1\ \mu\text{M}$ DrrA und von $50\ \mu\text{M}$ Rab1:GppNHp in Gegenwart von $5\ \text{nM}$ DrrA.

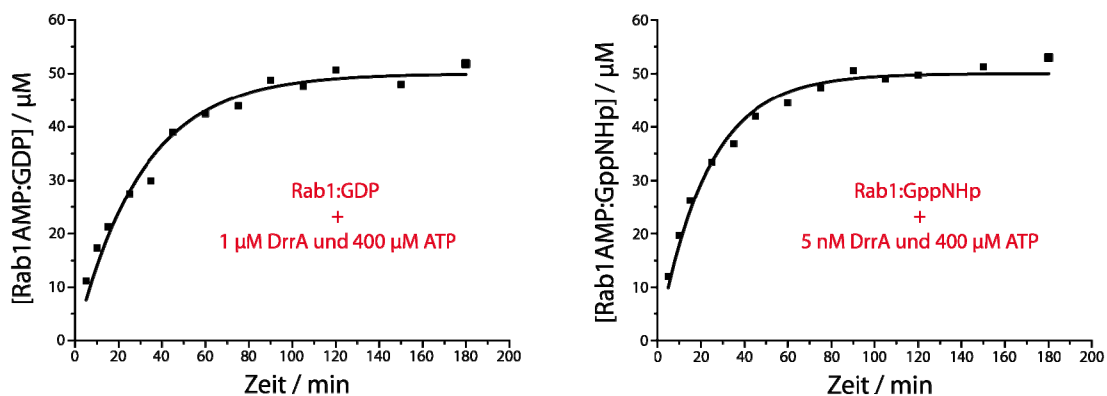


Abbildung 4-7: Kinetik der Adenylylierung von Rab1:GDP und Rab1:GppNHp. Die Adenylylierung von $50\ \mu\text{M}$ Rab1:GDP durch $1\ \mu\text{M}$ DrrA (links) bzw. $50\ \mu\text{M}$ Rab1:GppNHp durch $5\ \text{nM}$ DrrA (rechts) in Gegenwart von $400\ \mu\text{M}$ $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ wurde nach unterschiedlichen Zeitpunkten abgestoppt, überschüssiges radioaktives ATP entfernt und der Fortschritt der Reaktion mittels Szintillationszählung bestimmt (schwarze Punkte). Die schwarzen Kurven zeigen die Anpassung an eine einfach exponentielle Funktion und erlaubten die Berechnung der apparenten katalytischen Effizienzen (siehe Kapitel 3.2.4.1.3). Abbildung modifiziert nach ⁽¹²⁷⁾.

Die Progresskurven in Abbildung 4-7 wurden mit einer einfach exponentiellen Funktion angeglichen und die erhaltene Ratenkonstante durch die verwendeten Enzymkonzentrationen geteilt, um die apparenten katalytischen Effizienzen der Adenylylierung zu bestimmen. Diese betragen $((5.5 \pm 0.3) \cdot 10^2\ \text{M}^{-1}\ \text{s}^{-1})$ für Rab1:GDP und $((1.5 \pm 0.1) \cdot 10^5\ \text{M}^{-1}\ \text{s}^{-1})$ für Rab1:GppNHp und zeigten, dass die aktive GppNHp-gebundene Form von Rab1 das präferierte Substrat der Adenylylierung ist und etwa um einen Faktor 270 effizienter modifiziert wird als GDP-gebundenes Rab1. Die präferentielle Adenylylierung von Rab1 in der aktiven Konformation impliziert eine Erkennung der *switch*-Bereiche und insbesondere der

α 2-Helix in *switch II* des Rab-Proteins durch DrrA während der Katalyse, deren geordnete Konformation sich lediglich im GppNHp- (bzw. GTP-) gebundenen Zustand ausbildet. Dies könnte auch eine weitere Erklärung für das eingeschränkte Substratspektrum von DrrA (vergleiche Kapitel 4.1.3) darstellen. So konnte für Ypt7p, dem Hefe-Homolog von Rab7, gezeigt werden, dass es auch in der aktiven Konformation keine α -Helix im Bereich des *switch II* ausbildet⁽⁸⁰⁾. Möglicherweise trifft dies auch auf andere Rab-Proteine zu, wodurch diese nicht als Substrate der Adenylylierung dienen.

Als Alternative zur radioaktiven Quantifizierung der Adenylylierung durch DrrA wurde durch Philip Goody gezeigt, dass sich die intrinsische Tryptophanfluoreszenz von Rab1 durch die Modifizierung von Y77 mit AMP sowie von S76 mit Phosphocholin ändert und dies somit ebenfalls als Signal der Adenylylierung genutzt werden kann⁽¹²⁵⁾. In den folgenden Experimenten wurde daher die intrinsische Tryptophanfluoreszenz genutzt, um die Adenylylierung kinetisch weitergehend zu charakterisieren.

Interessanterweise zeigte sich bei ersten Experimenten mit hohen Rab1-Konzentrationen eine schnelle initiale Phase in der Kinetik, die von einer langsameren linearen Phase bis zum Substratverbrauch gefolgt wurde (Abbildung 4-8). Dieses kinetische Verhalten deutete auf eine Produktinhibition hin, war jedoch nicht durch eine einfache kompetitive Produkthemmung zu erklären, da bei einer kompetitiven Inhibition durch ein Produkt eine stetig abnehmende Reaktionsgeschwindigkeit, nicht jedoch eine lineare Phase, zu erwarten wäre. Vielmehr musste es sich um eine Form der allosterischen Inhibition durch ein Produkt der Adenylylierung handeln, welches durch Bindung an eine allosterische Bindungsstelle die Wechselzahl (k_{cat}), nicht jedoch die Michaeliskonstante (K_M) signifikant beeinflusst. Eine mögliche Ursache dieser Inhibition stellte das während der Reaktion gebildete Pyrophosphat (PP_i) dar (Abbildung 4-8, B). Zur Bestätigung dieser Hypothese wurde gezeigt, dass die Produkthemmung in Gegenwart von Pyrophosphatase zur Degradierung des während der Reaktion gebildeten Pyrophosphates aufgehoben wird (Abbildung 4-8). Aus diesem Grund wurden alle weiteren Experimente zur kinetischen Charakterisierung von DrrA in Gegenwart von Pyrophosphatase durchgeführt, um die Inhibition durch Pyrophosphat zu verhindern.

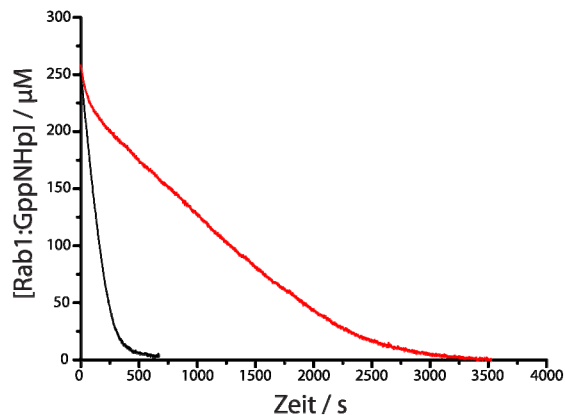
A

Abbildung 4-8: Inhibition der Adenylylierung durch Pyrophosphat. (A) Gezeigt sind die Progresskurven der Adenylylierung von 300 μM Rab1:GppNHp (15 nM DrrA und 2 mM ATP) in Abwesenheit von Pyrophosphatase (rot) und in Anwesenheit von 2.5 u Pyrophosphatase (schwarz). (B) Reaktionsschema der DrrA katalysierten Adenylylierung von Rab1 unter Freisetzung von Pyrophosphat (PP_i). Angedeutet ist weiterhin die Inhibition durch Pyrophosphat (rote Linie). Abbildung modifiziert nach ⁽¹⁷³⁾.

B

Zur genauen Bestimmung der kinetischen Parameter von DrrA wurden weitere Messungen mit variierenden Substratkonzentrationen und einem Unterschuss von DrrA durchgeführt. Für die Substrate Rab1:GppNHp und ATP zeigte sich dabei ein typisches Michaelis-Menten Verhalten mit ansteigender Reaktionsgeschwindigkeit bei steigender Substratkonzentration bis zur Sättigung des Enzym-Substrat-Komplexes, bei Rab1:GDP hingegen konnte ein sigmoidales Verhalten beobachtet werden. Die Anpassung dieser Daten mit einer sigmoidalen Gleichung ergab einen Kooperativitätskoeffizienten von $n = 1.7$ (vergleiche Kapitel 3.2.4.1.1). Dieses sigmoidale Verhalten ist daher möglicherweise durch eine Dimerisierung von Rab1:GDP bei hohen Konzentrationen und eine bevorzugte Adenylylierung des Dimers durch DrrA zu erklären. Solche Dimerisierungen wurden in der Vergangenheit bereits für die Rab-Proteine Rab9 und Rab27 beschrieben ^(167,174). In der Röntgenkristallstruktur der GDP-gebundenen Form von Rab9 konnte im Dimer zudem eine aktive Konformation der *switch II* Bereiche beobachtet werden. Da DrrA eine Präferenz der Adenylylierung der aktiven GppNHp-gebundenen Form von Rab1 zeigt könnte ein ähnliches Dimerisierungsverhalten der Rab-Proteine Rab1 und Rab9 in der GDP-gebundenen Form das beobachtete sigmoidale Verhalten erklären.

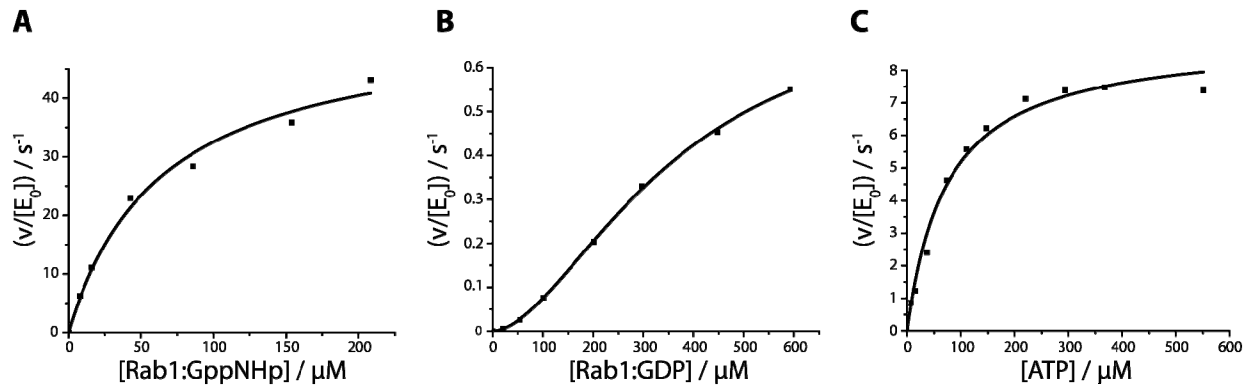


Abbildung 4-9: Kinetische Charakterisierung der DrrA-katalysierten Adenylylierung. Initiale Reaktionsgeschwindigkeiten wurden für variierende Substratkonzentrationen von Rab1:GppNHp (konstante Konzentrationen von 15 nM DrrA und 2 mM ATP), Rab1:GDP (konstante Konzentrationen von 5 µM DrrA und 2 mM ATP) und ATP (konstante Konzentrationen von 15 nM DrrA und 10 µM Rab1:GppNHp) gemessen und durch die verwendeten Enzymkonzentrationen geteilt. Die resultierenden Reaktionsraten wurden gegen die verwendeten Substratkonzentrationen von Rab1:GppNHp (**A**), Rab1:GDP (**B**) und ATP (**C**) aufgetragen (schwarze Punkte). Die Bestimmung der kinetischen Parameter k_{cat} , K_M , und $S_{0.5}$ erfolgte wie in Kapitel 3.2.4.1.1 beschrieben durch eine Anpassung der Daten mit einer Michaelis-Menten Gleichung (A und C) bzw. einer sigmoidalen Gleichung (B). Alle Progresskurven sind im Anhang in Kapitel 7-3 gezeigt. Abbildung modifiziert nach ⁽¹⁷³⁾.

Die Anpassung der Daten in Abbildung 4-9 mit einer Michaelis-Menten Gleichung (A und C) bzw. einer sigmoidalen Gleichung (B) ergab die in Tabelle 4-1 zusammengefassten k_{cat} , K_M und $S_{0.5}$ Werte. Auch hier konnte die bereits zuvor bestimmte präferentielle Adenylylierung des aktiven Rab1:GppNHp gegenüber Rab1:GDP durch DrrA bestätigt werden. Die katalytische Effizienz der Adenylylierung von Rab1:GppNHp ($k_{\text{cat}}/K_M = (8.3 \pm 2.2) \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) ist um einen Faktor 395 größer als von Rab1:GDP ($k_{\text{cat}}/K_M = (0.021 \pm 0.001) \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$).

Tabelle 4-1: Zusammenfassung der kinetischen Parameter der Adenylylierung durch DrrA.

	$k_{\text{cat}} \text{ (s}^{-1}\text{)}$	K_M bzw. $S_{0.5} \text{ (}\mu\text{M)}$	k_{cat}/K_M $(10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1})$
Rab1b:GppNHp	53.4 ± 3.9	64.2 ± 12.7	8.3 ± 2.2
Rab1b:GDP	0.78 ± 0.01	362.9 ± 21.7	0.021 ± 0.001
ATP	9.0 ± 0.4 ^[1]	73.9 ± 10.2	1.2 ± 0.2 ^[1]

^[1] Die Bestimmung der kinetischen Parameter für ATP erfolgte unter nicht-sättigenden Konzentrationen von Rab1:GppNHp, der k_{cat} -Wert ist daher nur ein apparenter Wert bei der verwendeten Rab1:GppNHp-Konzentration.

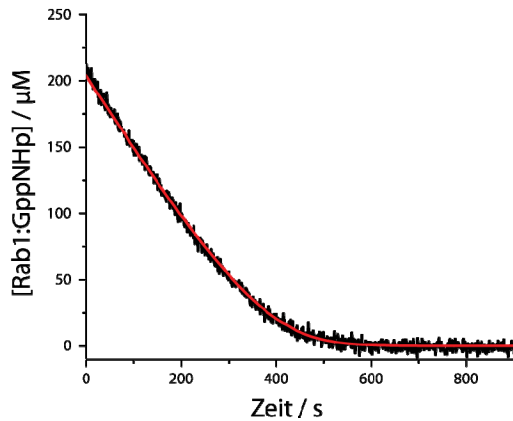


Abbildung 4-10: Bestimmung der kinetischen Parameter der Adenylylierung von Rab1:GppNHp aus einer Progresskurve. Gezeigt ist die Tryptophan Fluoreszenzänderung von 200 µM Rab1:GppNHp in Gegenwart von 15 nM DrrA und 2 mM ATP (schwarz) und die Anpassung mit einem Michaelis-Menten Modell mit dem Programm KinTek Explorer (rot, siehe Kapitel 3.2.4.1.1). Abbildung modifiziert nach ⁽¹⁷³⁾.

(Tabelle 4-1), auch die K_M -Werte können jedoch unter Betrachtung der Ungenauigkeit bei der Bestimmung aus einer einzelnen Progresskurve sowie der berechneten Fehler der K_M -Werte als konsistent angesehen werden.

4.2.1 Nukleotidspezifität von DrrA

Zur weiteren Charakterisierung von DrrA wurde überprüft, ob auch andere Nukleotide zur Modifizierung von Rab1 durch DrrA genutzt werden können.

Sowohl mittels der zuvor beschriebenen Fluoreszenzmessungen als auch massenspektrometrischer Analysen konnte gezeigt werden, dass alle getesteten Nukleotide als Substrate genutzt werden können, jedoch zeigten sich deutliche Unterschiede in den Reaktionsgeschwindigkeiten in Abhängigkeit des Nukleotids. Die Fluoreszenzmessungen für die unterschiedlichen getesteten Nukleotide sind in Abbildung 4-11, die zugehörigen Massenspektren für alle Modifizierungen im Anhang in Kapitel 7.2.1.1 gezeigt. Interessanterweise konnten neben den Purinnukleotiden ATP und GTP auch ADP und GDP zur Modifizierung von Rab1 genutzt werden, jedoch mit deutlich geringerer Effizienz. Bei den getesteten Pyrimidinnukleotiden CTP und UTP zeigte sich im Vergleich zu ATP eine nur unwesentlich geringere Reaktionsgeschwindigkeit im Fall von CTP, UTP wurde nur unter Verwendung höherer Enzymkonzentrationen effizient umgesetzt. Aus diesen Experimenten kann geschlossen werden, dass

Aufgrund des geringen K_M -Wertes für Rab1:GppNHp war eine zusätzliche unabhängige Bestimmung der k_{cat} - und K_M -Werte auch aus einer einzelnen Progresskurve möglich, die Auswertung erfolgte dabei wie in Kapitel 3.2.4.1.1 beschrieben mit dem Programm KinTek Explorer ^(156,157).

Aus den Daten in Abbildung 4-10 wurden k_{cat} ($43.4 \pm 0.8 \text{ s}^{-1}$) und K_M ($33.0 \pm 4.3 \text{ µM}$) bestimmt. Es zeigte sich somit eine gute Übereinstimmung des k_{cat} -Wertes mit dem zuvor bestimmten Wert (vergleiche Tabelle 4-1) mit einer Abweichung von etwa 20 %. Der aus der einzelnen Progresskurve bestimmte K_M -Wert unterscheiden sich etwa um einen Faktor 2 von dem zuvor bestimmten Wert

die Aminofunktion in Position C6 des Purinringes von ATP bzw. in Position C4 des Pyrimidinringes von CTP eine bedeutende Rolle in der Bindung durch DrrA während der Katalyse spielen muss.

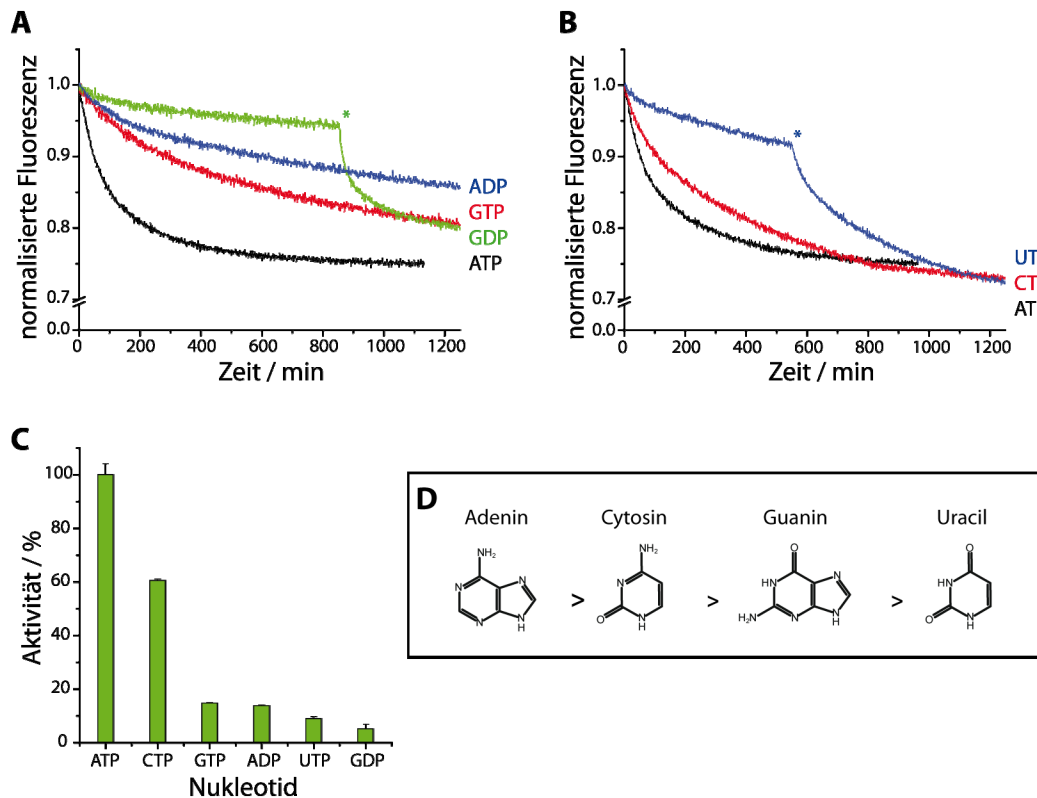


Abbildung 4-11: Nucleotidspezifität von DrrA. (A) Gezeigt sind die Progresskurven der Adenylylierung von $10 \mu\text{M}$ Rab $_{13-174}$:GppNHp in Gegenwart von je 15 nM DrrA und 2 mM ATP (schwarz), 2 mM GTP (rot), 2 mM ADP (blau) oder 2 mM GDP (grün). Der grüne Stern zeigt die Zugabe von $1.5 \mu\text{M}$ DrrA. (B) Gezeigt sind die Progresskurven der Adenylylierung von $10 \mu\text{M}$ Rab $_{13-174}$:GppNHp in Gegenwart von je 15 nM DrrA und 2 mM ATP (schwarz), 2 mM CTP (rot) oder 2 mM UTP (blau). Der blaue Stern zeigt die Zugabe von 75 nM DrrA. (C) Die relativen Aktivitäten von DrrA in Abhängigkeit des genutzten Nucleotids wurden aus den Initialgeschwindigkeiten der Progresskurven aus (A) und (B) berechnet. (D) Strukturformeln der Basen Adenin, Cytosin, Guanin und Uracil entsprechend der Reihenfolge der Substratspezifität von DrrA für ATP, CTP, GTP und UTP. Abbildung modifiziert nach ⁽¹⁷³⁾.

Die Kombination der relativen Aktivitäten von DrrA in Abhängigkeit des angebotenen Nucleotids (Abbildung 4-11, C) mit den publizierten intrazellulären Nucleotidkonzentrationen von ATP ($(3152 \pm 1698) \mu\text{M}$), GTP ($(468 \pm 224) \mu\text{M}$), CTP ($(278 \pm 242) \mu\text{M}$) und UTP ($(567 \pm 460) \mu\text{M}$) ⁽²⁸⁾ erlaubt eine Berechnung der relativen Verhältnisse von 91 % Rab1-AMP, etwa 6 % Rab1-CMP und etwa 3 % Rab1-GMP während der Infektion. In Übereinstimmung mit der Präferenz von DrrA zu ATP und den berechneten relativen Verhältnissen der unterschiedlich nucleotidylierten Rab1-Spezies konnte in

Zellen, die mit Legionellen infiziert waren, ausschließlich Rab1-AMP per Massenspektrometrie nachgewiesen werden⁽¹²⁴⁾. Vermutlich erlaubte das geringe Vorkommen von Rab1-CMP und Rab1-GMP in Legionellen-infizierten Zellen keine Detektion mittels Massenspektrometrie.

4.3 Effekte der Modifizierung

Um einen Einblick in die möglichen Effekte der AMP-Modifizierung von Rab1 und deren Rolle während des Infektionszyklus von *L. pneumophila* zu erhalten werden im Folgenden die untersuchten Effekte dargestellt. In der Einleitung wurden bereits die zahlreichen Interaktionen von Rab-Proteinen mit GAPs, GEFs und Effektorproteinen zur Regulation des vesikulären Transportes in eukaryotischen Zellen eingeführt. Insbesondere die Involvierung der *switch*-Bereiche der kleinen GTPasen in zahlreichen Proteininteraktionen deuteten hierbei mögliche Einflüsse der kovalenten Modifizierung im Bereich der *switch II*-Region auf diese Interaktionen an. Abbildung 4-12 illustriert die Interaktionsbereiche eines GEFs (A), eines GAPs (B) sowie eines Effektorproteins (C) anhand der Oberflächenstruktur von Rab1 und die zentrale Lokalisation der AMP-Modifizierung in den Interaktionsbereichen.

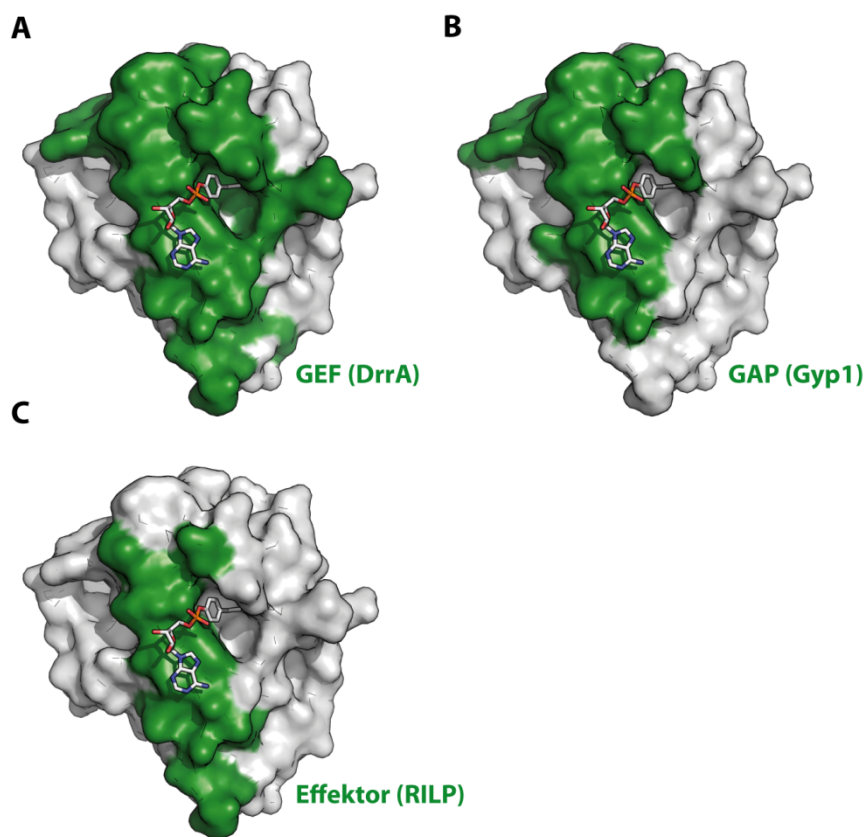


Abbildung 4-12: Interaktionsflächen von Rab-Proteinen mit GAPs, GEFs und Effektorproteinen. (A) Interaktionsflächen von Rab1 mit der GEF-Domäne von DrrA (PDB Zugangsnummer 3JZA)⁽⁴⁵⁾. (B) Hypothetische Interaktionsflächen von Rab1 mit dem GAP Gyp1 modelliert aus der Komplexstruktur zwischen Rab33 und Gyp1 (PDB Zugangsnummer 2G77)⁽⁹¹⁾. (C) Hypothetische Interaktionsflächen von Rab1 mit dem Effektorprotein RILP modelliert aus der Komplexstruktur zwischen Rab7 und RILP (PDB Zugangsnummer 1YHN)⁽¹⁷⁵⁾. Rab1 ist in der Oberflächenrepräsentation mit dem adenylierte Y77 in der Stab-Darstellung (Kohlenstoff – weiß, Sauerstoff – rot, Stickstoff – blau, Phosphor – orange) gezeigt. Die Interaktionsflächen sind in grün markiert. Als interagierende Reste in Rab1

wurden alle Reste mit einer maximalen Entfernung von 5 Å zu dem GEF, GAP oder Effektorprotein mittels Pymol selektiert. Die Darstellung von Molekülstrukturen erfolgte mittels PyMol 1.4⁽¹²⁹⁾. Abbildung modifiziert nach⁽¹²⁷⁾.

Bevor auf die Untersuchungen zum Einfluss der AMP-Modifizierung auf Proteininteraktionen eingegangen wird sollte jedoch auch untersucht werden, inwieweit intrinsische Eigenschaften von Rab1 durch die Modifizierung verändert sind.

4.3.1 Die intrinsischen Eigenschaften von Rab1 sind unverändert

Mithilfe der Röntgenkristallstruktur des AMP-modifizierten Rab1 konnte zunächst überprüft werden, ob die Modifizierung einen Einfluss auf die Konformation der kleinen GTPase hat.

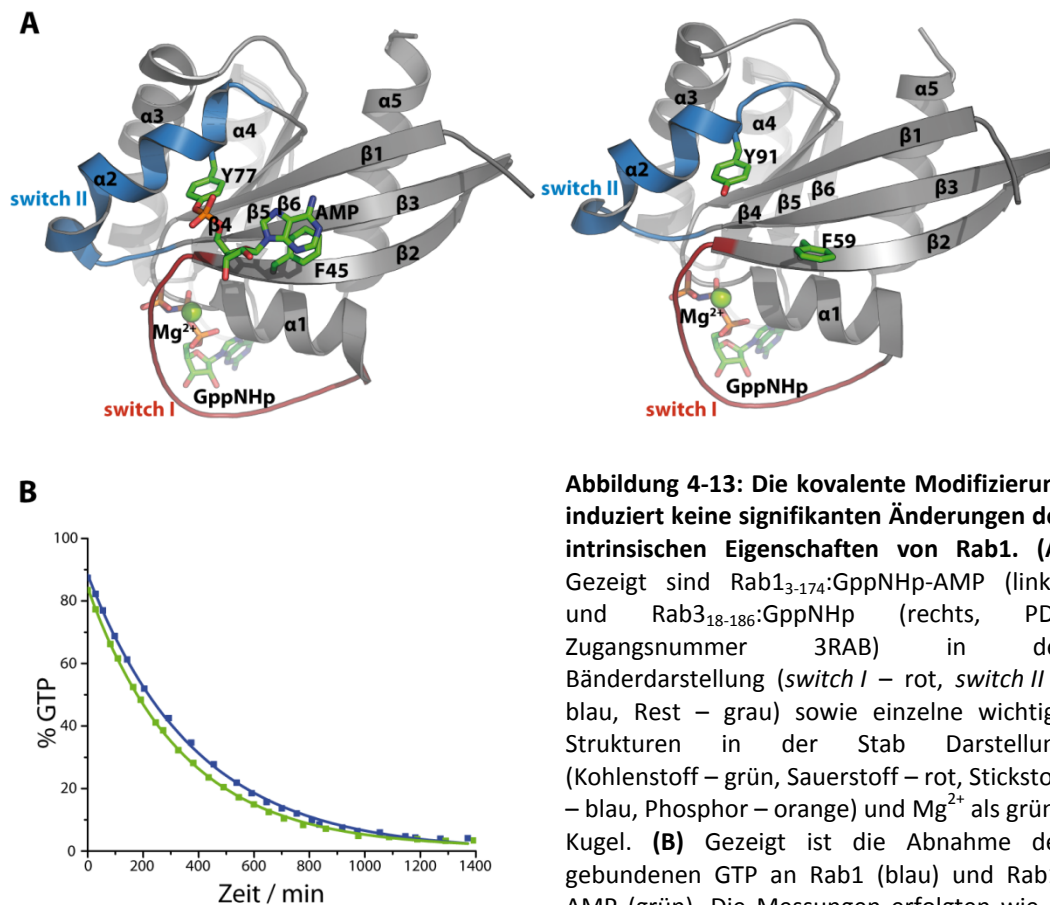


Abbildung 4-13: Die kovalente Modifizierung induziert keine signifikanten Änderungen der intrinsischen Eigenschaften von Rab1. (A) Gezeigt sind Rab₁₋₁₇₄:GppNHp-AMP (links) und Rab₁₈₋₁₈₆:GppNHp (rechts, PDB Zugangsnummer 3RAB) in der Bänderdarstellung (switch I – rot, switch II – blau, Rest – grau) sowie einzelne wichtige Strukturen in der Stab Darstellung (Kohlenstoff – grün, Sauerstoff – rot, Stickstoff – blau, Phosphor – orange) und Mg²⁺ als grüne Kugel. (B) Gezeigt ist die Abnahme des gebundenen GTP an Rab1 (blau) und Rab1-AMP (grün). Die Messungen erfolgten wie in

Kapitel 3.2.3.5.1 beschrieben. Durch Anpassung mit einer einfach exponentiellen Funktion konnten hierdurch die intrinsischen Hydrolyseraten bestimmt werden. Die Darstellung von Molekülstrukturen erfolgte mittels PyMol 1.4⁽¹²⁹⁾. Abbildung modifiziert nach^(127,173).

Da bisher keine Röntgenkristallstruktur von Rab1 in der aktiven Konformation existiert ist beispielhaft in Abbildung 4-13 (A) ein Vergleich der Struktur des modifizierten Rab1 mit der Struktur des nah

verwandten Rab3 gezeigt, beide Proteine wurden in der aktiven Konformation (gebunden an GppNHp) kristallisiert. Der Vergleich zeigt, dass die Modifizierung keine signifikanten strukturellen Änderungen in Rab1 induziert. Die relativen Orientierungen sowohl der *switch II* Region als auch des modifizierten Y77 in Rab1 und dem homologen Y91 in Rab3 sind in beiden Strukturen sehr ähnlich. Die Standardabweichung der Entfernung der α -Atome in den überlagerten Strukturen berechnet mittels DaliLite (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/dalilite/>, berechnet am 27.08.2012) betrug dabei lediglich 1.0 \AA ⁽¹⁷⁶⁾.

Aufgrund der unveränderten Konformation von Rab1 war zu erwarten, dass auch die intrinsischen Eigenschaften nicht signifikant durch die Modifizierung beeinflusst sind. Um dies zu überprüfen wurden die intrinsischen Hydrolyseaktivitäten von Rab1-AMP und vergleichend von Rab1 mittels HPLC bestimmt (Abbildung 4-13, B). Die Anpassung der Daten mit einer einfach exponentiellen Funktion ergab intrinsische Hydrolysekonstanten von $(5.0 \pm 0.1) \cdot 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ für Rab1-AMP und $(4.3 \pm 0.1) \cdot 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ für Rab1 und kann somit als unverändert angesehen werden. Auch die Analyse der intrinsischen Nukleotidaustauschrate durch Dr. Lena Oesterlin zeigte keinen Einfluss durch die Adenylylierung von Rab1 ⁽¹⁷³⁾.

Zusammenfassend kann somit gesagt werden, dass die AMP-Modifizierung weder die Struktur noch die Nukleotidbindungseigenschaften sowie die intrinsische Hydrolyseaktivität von Rab1 beeinflusst.

4.3.2 Effekte gegenüber GTPase aktivierenden Proteinen und der GEF Domäne von DrrA

Initiale Versuche zeigten, dass die GAP-katalysierte Hydrolyse durch die Enzyme TBC1D20, Gyp1 sowie LepB an Rab1 durch die AMP-Modifizierung stark beeinträchtigt ist ⁽¹²⁷⁾. Innerhalb dieser Arbeit wurden die Effekte weitergehend charakterisiert und die kinetischen Parameter der GAP-katalysierten Hydrolyse an Rab1 und Rab1-AMP vergleichend für das GAP LepB aus Legionellen und das humane GAP TBC1D20 bestimmt.

Sowohl im Fall von LepB als auch von TBC1D20 konnte eine starke Inhibition der Enzymkatalyse durch die AMP-Modifizierung von Rab1 bestätigt werden (Abbildung 4-14, A und B). Aufgrund dieser starken Inhibition und der erhöhten K_M -Werte der GAPs für Rab1-AMP konnte selbst bei sehr hohen Enzymkonzentrationen keine Sättigung der Reaktionsgeschwindigkeit beobachtet werden. Aus diesem Grund war eine unabhängige Berechnung von k_{cat} und K_M nur für unmodifiziertes Rab1 möglich, für Rab1-AMP konnten jeweils nur die katalytischen Effizienzen $\left(\frac{k_{\text{cat}}}{K_M}\right)$ bestimmt werden (die Analyse der Daten erfolgte wie in Kapitel 3.2.4.1.2 beschrieben). Der Vergleich der katalytischen Effizienzen von

Rab1 und Rab1-AMP (siehe Tabelle 4-2) zeigte eine 20-fach verringerte katalytische Effizienz von TBC1D20 und eine 1000-fach verringerte katalytische Effizienz von LepB infolge der AMP-Modifizierung.

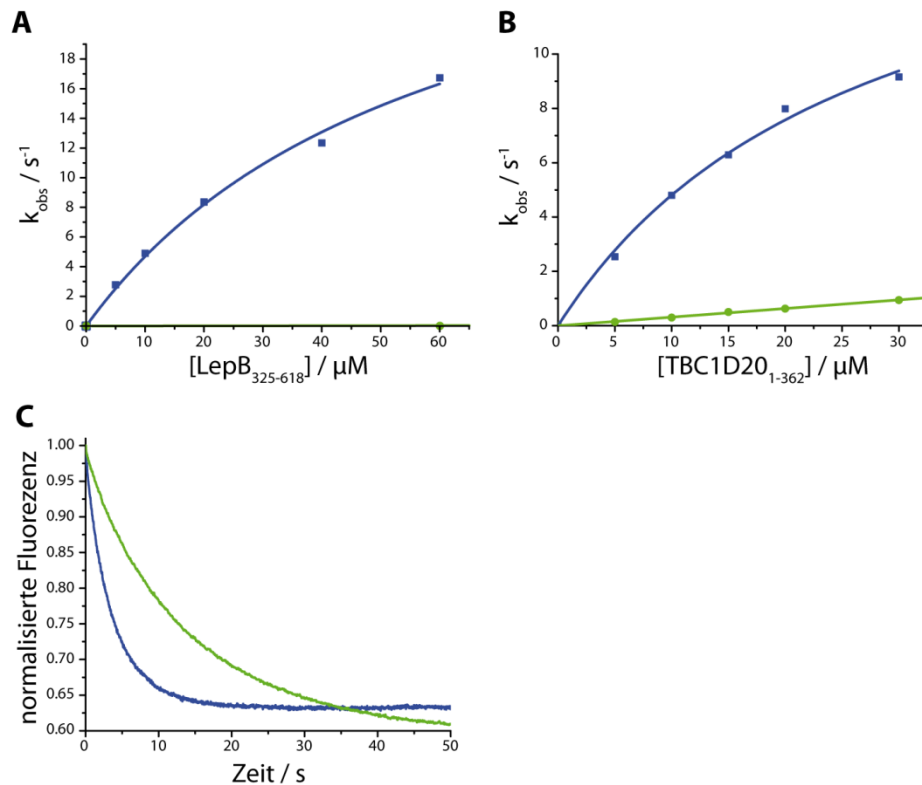


Abbildung 4-14: Vergleich der Effekte der AMP-Modifizierung auf die GAP Katalyse durch LepB und TBC1D20 sowie die GEF Katalyse durch DrrA. Mittels stopped flow wurde die Hydrolyse von mantGTP an Rab1 (blau) und Rab1-AMP (grün) in Gegenwart unterschiedlicher Konzentrationen der GAPs LepB₃₂₅₋₆₁₈ (A) und TBC1D20₁₋₃₆₂ (B) gemessen und die erhaltenen Reaktionsraten (k_{obs}) gegen die verwendeten Enzymkonzentrationen aufgetragen (grüne bzw. blaue Punkte, alle Progresskurven sind im Anhang in Kapitel 7.3 gezeigt). Die Bestimmung von k_{cat} , K_M und k_{cat}/K_M erfolgte durch Anpassung der Daten mit der in Kapitel 3.2.4.1.2 beschriebenen Funktion. (C) Progresskurven des DrrA₃₄₀₋₅₃₃ (1 μM) katalysierten Nucleotidaustausches an 50 nM Rab1:mantdGDP (blau) und 50 nM Rab1-AMP:mantdGDP (grün) in Gegenwart von 100 μM GDP. Abbildung modifiziert nach ^(127,173).

Weiterhin wurde auch der DrrA₃₄₀₋₅₃₃ katalysierte Nucleotidaustausch vergleichend für Rab1 und Rab1-AMP gemessen (Abbildung 4-14, C). Aus den einfach exponentiellen Anpassungen der gemessenen Progresskurven ergaben sich Reaktionsraten von $0,26 \text{ s}^{-1}$ für Rab1 und $0,07 \text{ s}^{-1}$ für Rab1-AMP. Es zeigte sich hier also nur eine Inhibierung der Katalyse um einen Faktor von etwa 4 durch die AMP-Modifizierung. Eine genauere Charakterisierung zur Bestimmung der k_{cat} - und der K_M -Werte sowie der daraus resultierenden katalytischen Effizienz des DrrA katalysierten Nucleotidaustausches erfolgte durch

Dr. Lena Oesterlin (MPI für molekulare Physiologie, Dortmund). Die entsprechenden Daten sind in Tabelle 4-2 zusammengefasst. Hier konnte beobachtet werden, dass die katalytische Effizienz der Reaktion durch die Modifizierung um einen Faktor 3 geringer war. Interessanterweise zeigte sich durch die unabhängige Bestimmung von k_{cat} und K_M , dass der K_M -Wert durch die Modifizierung etwa um eine Größenordnung zunimmt, dies jedoch partiell durch eine ebenfalls zunehmende Wechselzahl kompensiert wird.

Tabelle 4-2: Kinetische Parameter der GAPs LepB und TBC1D20 sowie des GEF DrrA für Rab1 bzw. Rab1-AMP.

	k_{cat} (s^{-1})		K_M (μM)		$\frac{k_{\text{cat}}}{K_M}$ ($10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$)	
	Rab1	Rab1-AMP	Rab1	Rab1-AMP	Rab1	Rab1-AMP
LepB ₃₂₅₋₆₁₈	32.4 ± 3.7	-	59.2 ± 11.8	-	5.5	0.005
TBC1D20 ₁₋₃₆₂	17.9 ± 1.9	-	27.2 ± 5.2	-	6.6	0.32
DrrA ₃₄₀₋₅₃₃ ^[1]	8.5 ± 0.04	17.9 ± 0.1	28.7 ± 0.4	214.0 ± 2.4	2.5	0.85

^[1] Die Bestimmung der katalytischen Parameter der GEF Katalyse erfolgte durch Dr. Lena Oesterlin ⁽¹⁷³⁾.

Bei der Analyse der Katalyse durch GAPs und GEFs konnte also gezeigt werden, dass die AMP-Modifizierung die Deaktivierung von Rab1-AMP durch GAPs stark inhibiert. Interessant ist hierbei, dass auch das Legionellen GAP LepB stark inhibiert wird. Da in der Literatur gezeigt wurde, dass Rab1 während der Infektion wieder von der LCV entfernt wird und dies ausschließlich in der inaktiven Konformation durch GDI erfolgen kann ^(46,115) ergab dies die Theorie eines zusätzlichen Faktors, welcher die kovalente Modifizierung wieder entfernen kann. Auf diese Theorie wird in Kapitel 4.5 weiter eingegangen. Im Gegensatz zur Katalyse durch GAPs wurde die GEF-Katalyse zumindest durch das Legionellenprotein DrrA nicht signifikant beeinflusst. Offen bleibt hierbei jedoch, ob dies auch auf die GEF-Katalyse durch humane GEFs zutrifft.

4.3.3 Effekte gegenüber Effektor-Proteinen

Neben den bereits beschriebenen Effekten auf GAPs und GEFs sollten auch die Effekte der AMP-Modifizierung auf die Interaktionen des humanen Effektorproteins Mical-3 sowie des Legionelleneffektorproteins LidA mit Rab1-AMP untersucht werden. Im Folgenden sind zunächst

analytische Gelfiltrationsexperimente zur Komplexbildung beider Proteine mit Rab1 bzw. Rab1-AMP gezeigt. Im Weiteren wird dann noch auf die Röntgenkristallstruktur von Mical-3 sowie die potentielle Interaktion mit Rab1 und mögliche Auswirkungen der Modifikation von Rab1 auf die Wechselwirkung mit Mical-3 eingegangen.

4.3.3.1 Analytische Gelfiltrationsexperimente

Um initial die Komplexbildung der Effektorproteine Mical-3 und LidA mit Rab1 bzw. Rab1-AMP zu testen wurden diese jeweils in einem Verhältnis von 1:1.2 (Effektor:Rab1(-AMP)) zusammengegeben und mittels analytischer Gelfiltration auf deren Koelution getestet.

Die analytischen Gelfiltrationsexperimente zeigten, dass eine Komplexbildung von LidA sowohl mit Rab1 als auch mit Rab1-AMP erfolgte. Die Elutionsprofile (Abbildung 4-15, A) zeigen freies LidA_{fi} (grün) sowie den Komplex aus LidA_{fi}:Rab1:GppNHp (rot) und LidA_{fi}:Rab1-AMP:GppNHp (blau) bei einem Elutionsvolumen von etwa 25 min. Bei beiden Komplexen kann zudem freies Rab1:GppNHp bzw. Rab1-AMP:GppNHp bei einem Elutionsvolumen von etwa 32 min beobachtet werden, da dieses für die Experimente in einem 1.2-fachen Überschuss gegenüber LidA eingesetzt wurde. In den SDS-Gelen unterhalb des Elutionsprofils kann jeweils der Komplex aus LidA und Rab1 (linkes SDS Gel) bzw. LidA und Rab1-AMP (rechtes SDS Gel) in den Fraktionen, welche dem Elutionsbereich von etwa 23 - 29 min entsprechen sowie freies Rab1 bzw. Rab1-AMP in den Fraktionen, die dem Elutionsbereich von etwa 31 - 34 min entsprechen, beobachtet werden.

In Abbildung 4-15 (B) sind dieselben analytischen Gelfiltrationsexperimente mit der Rab-bindenden Domäne des humanen Effektorproteins Mical-3 (Mical₁₈₄₁₋₁₉₉₀) gezeigt. Bei diesen Experimenten konnte beobachtet werden, dass eine Komplexbildung durch die AMP-Modifizierung vollständig verhindert wird. Im Elutionsprofil der Gelfiltration kann der Peak des freien Mical-3 bzw. des Komplexes aus Mical-3 und Rab1:GppNHp bei einer Retentionszeit von etwa 29 min beobachtet werden, freies Rab1 besitzt eine Retentionszeit von etwa 32 min. Eine Komplexbildung ist hier nur im roten Elutionsprofil (Mical-3:Rab1:GppNHp) zu beobachten, im blauen Elutionsprofil (Mical-3:Rab1-AMP:GppNHp) eluieren die Proteine Mical-3 und Rab1-AMP:GppNHp getrennt von der Gelfiltrationssäule. Entsprechend den Ergebnissen der Gelfiltration zeigen die proteinenthaltenden Fraktionen im linken SDS-Gel (entspricht dem Komplex Mical-3:Rab1:GppNHp) eine deutliche Koelution von Rab1 und Mical-3 in den Gelfiltrationsexperimenten, der Vergleich des rechten SDS-Gels (entspricht dem Komplex

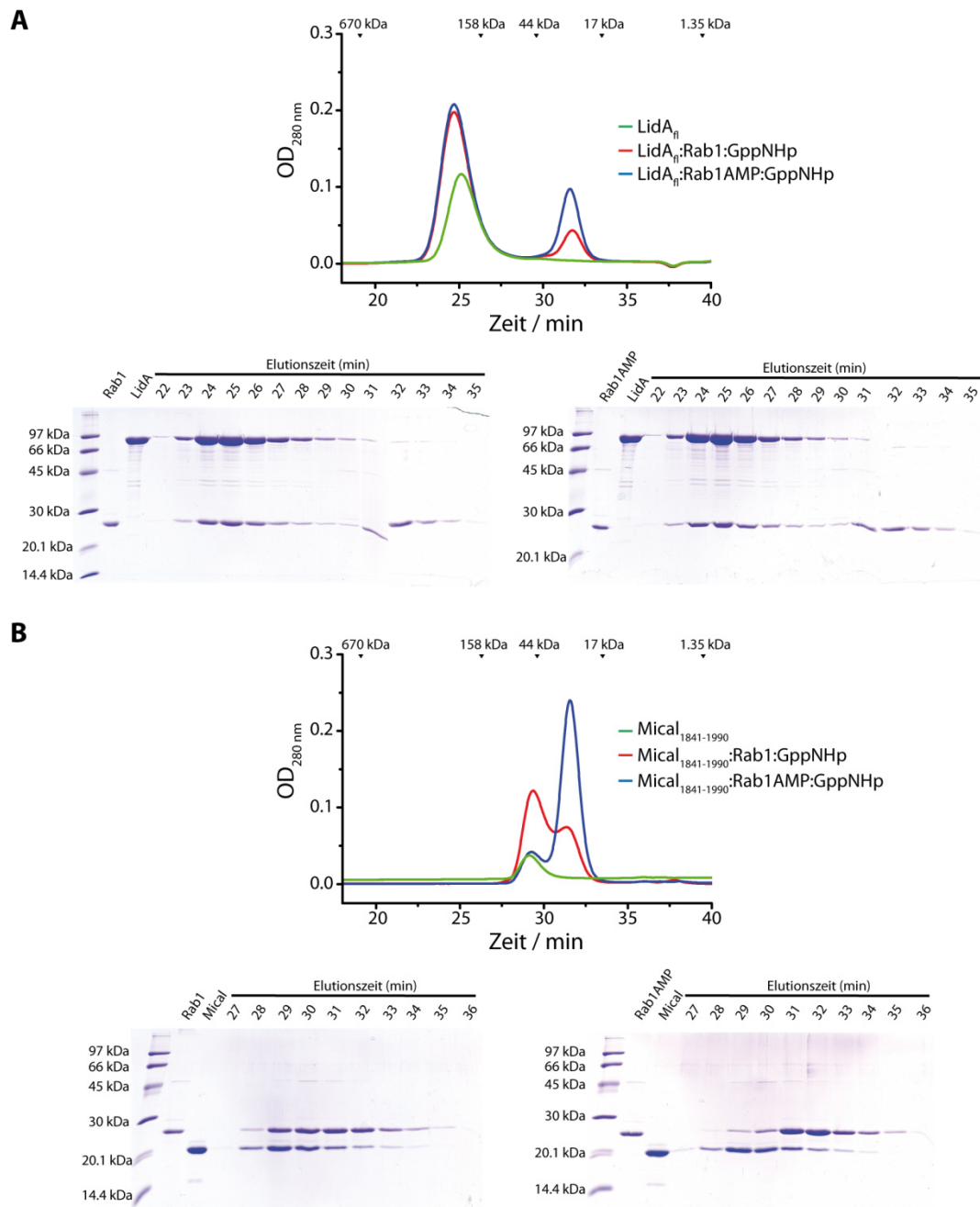


Abbildung 4-15: Analytische Gelfiltrationsexperimente zur Komplexbildung von Rab1 und Rab1-AMP mit den Effektorproteinen Mical-3 und LidA. (A) Elutionsprofile der Gelfiltration mit LidA_{fi} (grün), LidA_{fi}:Rab1:GppNHp (rot) und LidA_{fi}:Rab1-AMP:GppNHp (blau). Die proteinenthaltenden Fraktionen der Gelfiltrationsläufe von LidA_{fi}:Rab1:GppNHp sind im linken SDS-Gel gezeigt, die Protein enthaltenden Fraktionen der Gelfiltrationsläufe von LidA_{fi}:Rab1-AMP:GppNHp sind im rechten SDS-Gel gezeigt. **(B)** Elutionsprofile der Gelfiltration mit Mical₁₈₄₁₋₁₉₉₀ (grün), Mical₁₈₄₁₋₁₉₉₀:Rab1:GppNHp (rot) und Mical₁₈₄₁₋₁₉₉₀:Rab1-AMP:GppNHp (blau). Die proteinenthaltenden Fraktionen der Gelfiltrationsläufe von Mical₁₈₄₁₋₁₉₉₀:Rab1:GppNHp sind im linken SDS-Gel gezeigt, die Protein enthaltenden Fraktionen der Gelfiltrationsläufe von Mical₁₈₄₁₋₁₉₉₀:Rab1-AMP:GppNHp sind im rechten SDS-Gel gezeigt. Für alle Versuche wurden je 4.4 nmol Rab1:GppNHp bzw. Rab1-AMP:GppNHp und 3.8 nmol des Effektorproteins eingesetzt (Rab1: 22365 Da; LidA: 83425 Da; Mical 18224 Da). Als Größenstandard diente der BioRad Gelfiltrationsstandard (BioRad Laboratories GmbH, München, Deutschland). Abbildung modifiziert nach ⁽¹²⁷⁾.

Mical-3:Rab1-AMP:GppNHp) zeigt hingegen eine deutlich stärkere Trennung von Rab1-AMP und Mical in den Elutionsfraktionen. Die Elution von Rab1-AMP ist hier zu höheren Elutionsvolumina verschoben. Das Legionelleneffektorprotein LidA zeigt also im Vergleich zum humanen Effektorprotein Mical-3 keine verminderte Bindung an Rab1-AMP in den durchgeführten Gelfiltrationsexperimenten. Aus LidA-Bindungsstudien ist bekannt, dass es im Vergleich zu anderen Effektorproteinen eine ungewöhnlich hohe Affinität zu Rab-Proteinen sowohl in der GDP-gebundenen als auch der GTP-gebundenen Form besitzt^(122,123). Weiterhin wurden in diesen Studien Röntgenkristallstrukturen zwischen Rab8 und LidA sowie zwischen Rab1 und LidA mit einer ungewöhnlich großen Interaktionsfläche zwischen LidA und den Rab-Proteinen berichtet. Trotz der Position des AMP-Restes innerhalb der Bindungsoberfläche kann hierdurch vermutlich der AMP-Rest die Interaktion nur partiell stören und bewirkt lediglich eine verminderte Affinität, die sich jedoch nicht auf die Komplexbildung in den gezeigten Gelfiltrationsexperimenten auswirkt. Auf mögliche strukturelle Grundlagen der verminderten Bindung des humanen Effektorproteins Mical-3 soll in den folgenden Kapiteln detaillierter eingegangen werden.

4.3.3.2 Die Bindung des humanen Effektorproteins Mical-3

Nachdem gezeigt wurde, dass die Rab-bindende Domäne von Mical-3 in der Gelfiltration keinen Komplex mit Rab1-AMP bildete, sollte die Interaktion weitergehend charakterisiert werden. Zunächst sollte versucht werden, Bindungsaffinitäten der Domäne zu Rab1 und Rab1-AMP mittels isothermer Titrationskalorimetrie zu bestimmen.

Abbildung 4-16 zeigt die ITC-Messungen von Mical-3 mit Rab1 (A) und Rab1-AMP (B). Für Rab1 konnte eine Affinität von $(2.6 \pm 0.3) \mu\text{M}$ bestimmt werden, bei der ITC-Messung für Rab1-AMP hingegen zeigte sich nur eine leichte Wärmetönung bei der ersten Injektion, die vermutlich auf eine kleine Verunreinigung mit unmodifiziertem Rab1 zurückzuführen ist. Durch Simulation der Interaktion mit dem Programm des Herstellers des verwendeten ITC₂₀₀ Mikrokalorimeter (MicroCal / GE Healthcare, München, Deutschland) wurde ermittelt, dass die Affinität von Mical-3 für Rab1-AMP mindestens zwei Größenordnungen schlechter ist als für Rab1 und somit der K_D -Wert der Interaktion von Mical-3 und Rab1-AMP größer als $260 \mu\text{M}$ sein muss. Aufgrund dieser drastisch verringerten Affinität war eine genaue Bestimmung der Affinität nicht möglich.

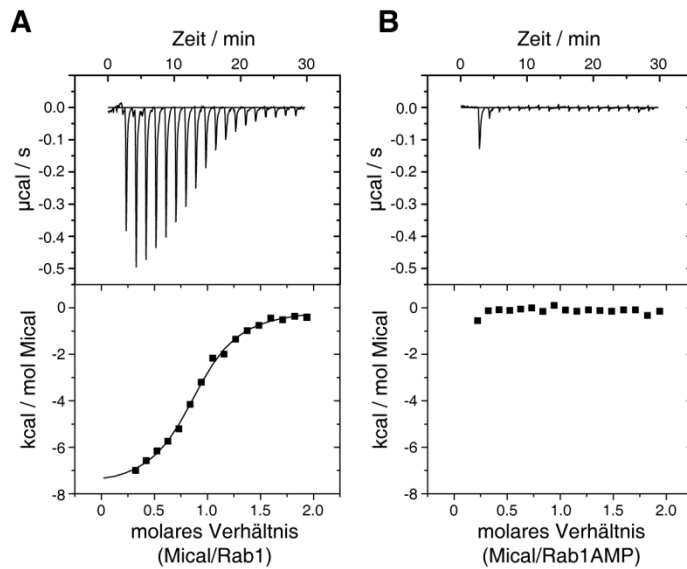


Abbildung 4-16: ITC-Messungen zur Bestimmung der Bindungsaffinitäten der Rab1-bindenden Domäne von Mical-3 und Rab1 bzw. Rab1-AMP. (A) 500 μM Mical₁₈₄₁₋₁₉₉₀ wurden zu 50 μM Rab1:GppNHp titriert ($K_D = (2.6 \pm 0.3) \mu\text{M}$, $N = (0.880 \pm 0.011)$, $\Delta H = (-7772 \pm 162) \text{ cal/mol}$, $\Delta S = -0.536 \text{ cal/mol/K}$). **(B)** 500 μM Mical₁₈₄₁₋₁₉₉₀ wurden zu 50 μM Rab1-AMP:GppNHp titriert. Abbildung modifiziert nach ⁽¹⁷³⁾.

Inwieweit die Adenylylierung von Rab1 generell eine Bindung humaner Effektorproteine inhibiert ist zu diesem Zeitpunkt unbekannt. Jedoch konnte gezeigt werden, dass weder das Effektorprotein p115 noch GM130 während der Legionelleninfektion an der LCV lokalisiert sind ⁽¹⁷⁷⁾ und somit vermutlich auch deren Bindung an Rab1-AMP inhibiert ist.

4.3.3.3 Die Struktur der Rab1-bindenden Domäne von Mical-3

Um weitere Einblicke in die Interaktion zwischen Mical-3 und Rab1 zu bekommen und dadurch die Effekte der Modifizierung auf die Interaktion zu verstehen sollte die Komplexstruktur der Rab1-bindenden Domäne von Mical-3 und Rab1 mittels Röntgenkristallstrukturanalyse aufgeklärt werden. Trotz ausgiebiger Versuche der Kristallisation von Mical-3 im Komplex mit Rab1 konnten jedoch keine Kristalle des Komplexes erhalten werden, ausschließlich die Rab1-bindende Domäne von Mical-3 alleine konnte erfolgreich kristallisiert werden.

Die Röntgenkristallstruktur von Mical enthält zwei Monomere pro asymmetrischer Einheit, die jeweils *coiled-coils* bilden. Hierbei falten die N- und C-terminalen α -helikalen Bereiche auf eine zentrale α -Helix zurück. Die Interaktionsfläche zwischen beiden Monomeren in der asymmetrischen Einheit beträgt etwa 2500 \AA^2 bei einer Lösungsmittel zugänglichen Gesamtoberfläche des Dimers von etwa 17000 \AA^2 (berechnet mittels *naccess* ⁽¹⁷⁸⁾ und *MSMS* ⁽¹⁷⁹⁾, Probenradius je 1.4 \AA). Weiterhin konnten zahlreiche polare Interaktionen zwischen beiden Monomeren in der Kristallstruktur beobachtet werden (Abbildung 4-17, D). Sowohl die große Interaktionsfläche der Monomere als auch die polaren Kontakte

deuten hierbei auf eine Dimer-Formierung auch in Lösung hin. In der analytischen Gelfiltration zeigte Mical₁₈₄₁₋₁₉₉₀ ein apparentes Molekulargewicht von 47 kDa (Abbildung 4-15, B). Aufgrund der *coiled-coil* Struktur ist jedoch eine Abschätzung des Molekulargewichtes anhand der analytischen Gelfiltration sehr ungenau.

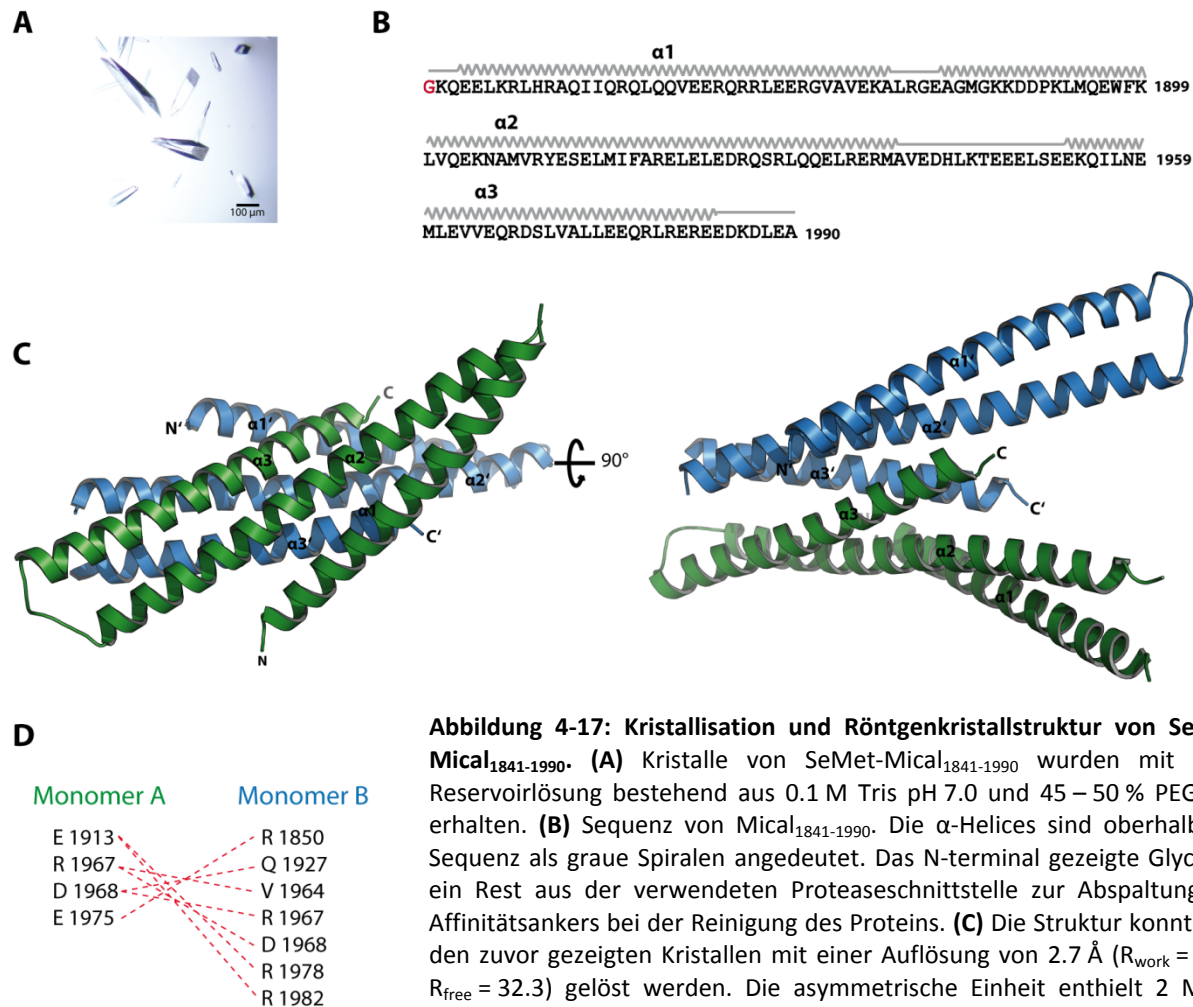


Abbildung 4-17: Kristallisation und Röntgenkristallstruktur von SeMet-Mical₁₈₄₁₋₁₉₉₀. (A) Kristalle von SeMet-Mical₁₈₄₁₋₁₉₉₀ wurden mit einer Reservoiirlösung bestehend aus 0.1 M Tris pH 7.0 und 45 – 50 % PEG 200 erhalten. (B) Sequenz von Mical₁₈₄₁₋₁₉₉₀. Die α -Helices sind oberhalb der Sequenz als graue Spiralen angedeutet. Das N-terminal gezeigte Glycin ist ein Rest aus der verwendeten Proteaseschnittstelle zur Abspaltung der Affinitätsankers bei der Reinigung des Proteins. (C) Die Struktur konnte mit den zuvor gezeigten Kristallen mit einer Auflösung von 2.7 Å ($R_{\text{work}} = 26.9$, $R_{\text{free}} = 32.3$) gelöst werden. Die asymmetrische Einheit enthielt 2 Mical-Monomere, beide sind in der Bänderdarstellung gezeigt (Monomer A – grün, Monomer B – blau, N- und C-Terminus sind jeweils als N bzw. C

markiert (N' und C' für Monomer B)). Die Datenstatistik ist in Kapitel 7.1 zusammengefasst. (D) Gezeigt sind die polaren Kontakte zwischen den Aminosäuren von Monomer A (links) und von Monomer B (rechts). Die Berechnung der polaren Kontakte erfolgte mittels PyMol (*cut-off* von 3.6 Å bei idealer Geometrie, 3.2 Å bei minimal akzeptierter Geometrie). Die Darstellung von Molekülstrukturen erfolgte mittels PyMol 1.4⁽¹²⁹⁾.

Über Sequenzvergleiche mit anderen Effektorproteinen, deren Struktur im Komplex mit einem Rab-Protein bekannt ist wurde versucht, die Interaktionsfläche von Mical-3 mit Rab1 vorherzusagen. Hierbei zeigte sich eine hohe Sequenzhomologie zwischen der α -Helix des Effektorproteins RILP (*Rab-interacting lysosomal protein*), die an der Bindung mit Rab7 beteiligt ist⁽¹⁷⁵⁾, und der zentralen α -Helix der

Rab-bindenden Domäne von Mical-3 (Abbildung 4-18, A). Aufgrund dieser hohen Ähnlichkeit wurde anhand der Komplexstruktur von RILP und Rab7 (PDB Zugangsnummer 1YHN) auch eine mögliche Komplexstruktur zwischen Mical-3 und Rab1 modelliert (Abbildung 4-18, B und C).

In der Kristallstruktur des Komplexes RILP:Rab7:GTP wurden unter anderem hydrophobe Kontakte zwischen F248 (RILP) und I41 (Rab7), L252 (RILP) und L73 (Rab7) sowie zwischen der Methylengruppe von N256 (RILP) und F45 (Rab7) beschrieben. Weiterhin konnte eine ionische Wechselwirkung zwischen R255 (RILP) und D44 (Rab7) gezeigt werden. Eine entsprechende Darstellung der beschriebenen Reste ist in Abbildung 4-18 (B) gezeigt. Homologe Reste konnten ebenfalls in Mical-3 beobachtet werden. Hier könnten K1904 und N1906 homolog zu R255 und N256 aus RILP mit D44 und F45 in Rab1 interagieren. Eine weitere Interaktion wäre auch zwischen N1906 (Mical-3) und Y77 (Rab1b) möglich. W1897, F1898 und V1902 (Mical-3) könnten homolog zu RILP einen hydrophoben Bereich zur Interaktion mit den hydrophoben Aminosäuren V43, F70, I73 sowie I41 aus Rab1 bilden. Die Bedeutung dieser hydrophoben Tasche in kleinen GTPasen für Wechselwirkungen mit Effektorproteinen ist aus anderen Effektor:GTPase-Interaktionen bekannt und wurde bereits in der Einleitung eingeführt ^(27,92).

Im Vergleich zwischen dem Komplex aus RILP:Rab7:GTP und dem putativen Komplex aus Mical-3:Rab1:GppNHp ist zu sehen, dass die genannten homologen Reste in beiden Strukturen vorhanden sind. Teilweise unterscheiden sich jedoch die Seitenkettenkonformationen und die Ausrichtung der Seitenketten (Rotamere) deutlich (insbesondere D44 und F45 in Rab1, K1904 und N1905 in Mical-3). Im Komplex zwischen Mical-3 und Rab1 müssten diese Reste eine andere Konformation annehmen.

Um die potentiellen interagierenden Reste in Mical-3 zu untersuchen wurden die Aminosäureaustauschmutanten W1897A, F1898A, K1904A, N1905A und R1919A hergestellt. Die Mutanten W1897A, F1898A (sowie N1905A) sollten dazu dienen, die Rolle der potentiellen hydrophoben Interaktionen zu testen, die Mutanten K1904A und N1905A um mögliche ionische Wechselwirkungen zu testen und R1919A als weiterer Rest, der in Mical-3 und RILP (entspricht R274 in RILP, Abbildung 4-18) konserviert ist, jedoch nicht offensichtlich an der Bindung beteiligt ist. Für alle Mutanten wurden mittels ITC die Bindung an Rab1 getestet (alle mutierten Aminosäuren sind in Abbildung 4-18 (C) in rot markiert). Die Ergebnisse sind in Tabelle 4-3 zusammengefasst, alle ITC Messungen sind im Anhang in Kapitel 7.4 gezeigt. Weiterhin wurden alle Aminosäureaustauschmutanten von Mical-3 mittels Circular dichroismus mit dem Wildtyp Protein verglichen, um mögliche Einflüsse der Mutationen auf die Struktur von Mical-3 weitestgehend auszuschließen. Hierbei zeigten sich keine messbaren Änderungen der Konformation und

die Berechnung der Sekundärstrukturanteile mittels DichroWeb ergab für alle Aminosäureaustauschmutanten von Mical-3 sehr ähnliche Ergebnisse (siehe Kapitel 7.4).

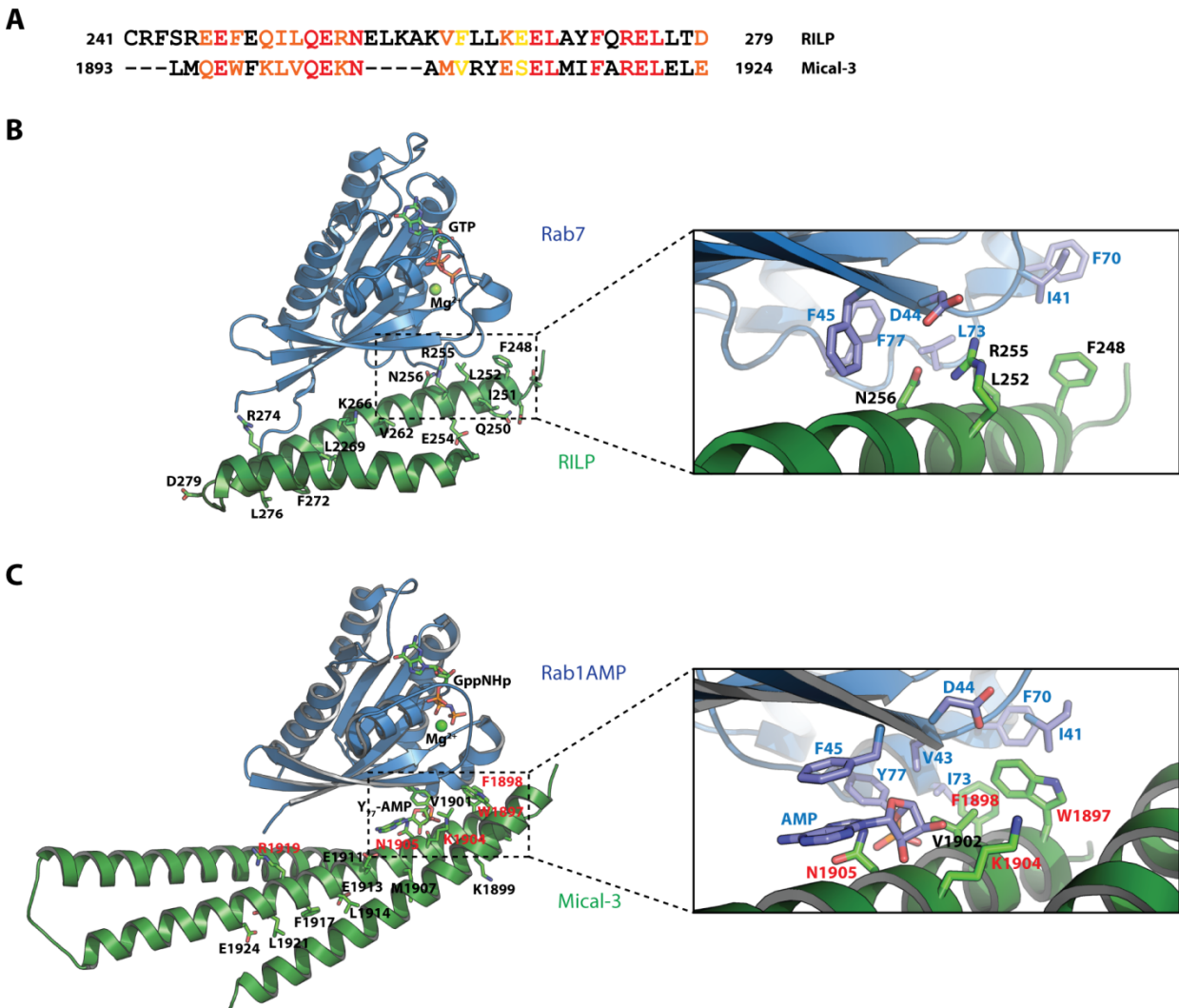


Abbildung 4-18: Kristallstruktur von RILP:Rab7:GTP und der Vergleich mit der potentiellen Interaktion von Mical-3 mit Rab1. (A) Sequenzvergleich der Rab7-interagierenden α -Helix von RILP (*Rab-interacting lysosomal protein*) und der zentralen Helix von Mical-3 (rot – konservierte Reste, orange – starke Homologie, gelb – schwache Homologie, schwarz – keine Homologie). Der Sequenzvergleich wurde mit ClustalW durchgeführt. (B) Struktur von Rab7 im Komplex mit RILP (PDB Zugangsnummer 1YHN) in der Bänderdarstellung (blau – Rab7, grün – RILP). GTP sowie homologe Reste zu Mical-3 sind in der Stab Darstellung gezeigt (RILP: Kohlenstoff – grün, Sauerstoff – rot, Stickstoff – blau, Phosphor – orange; Rab7: Kohlenstoff – violett, Sauerstoff – rot) sowie Mg^{2+} als grüne Kugel. Im schwarzen Kasten sind wichtige interagierende Reste hervorgehoben. (C) Darstellung der potentiellen Interaktion zwischen Rab1b und Mical-3 in der Bänderdarstellung blau – Rab1-AMP, grün – Mical-3). GppNHp sowie homologe Reste zu RILP sind in der Stab Darstellung gezeigt (RILP: Kohlenstoff – grün, Sauerstoff – rot, Stickstoff – blau, Phosphor – orange; Rab7: Kohlenstoff – violett, Sauerstoff – rot) sowie Mg^{2+} als grüne Kugel. Im schwarzen Kasten sind potentiell interagierende Reste zwischen Rab1 und Mical-3 hervorgehoben. Die Darstellung von Molekülstrukturen erfolgte mittels PyMol 1.4⁽¹²⁹⁾. Für weitere Erläuterungen, siehe Text.

Tabelle 4-3: Aminosäureaustauschmutanten von Mical-3 und deren Bindungseigenschaften zu Rab1.

	N	K_D (μM)	ΔH (cal mol⁻¹)	ΔS (cal mol⁻¹ K⁻¹)
Mical₁₈₄₁₋₁₉₉₀	0.75 ± 0.01	1.9 ± 0.1	-7611 ± 98	0.7
Mical₁₈₄₁₋₁₉₉₀ W1897A	0.83 ± 0.01	1.5 ± 0.2	-5288 ± 128	8.9
Mical₁₈₄₁₋₁₉₉₀ F1898A	0.73 ± 0.01	2.0 ± 0.2	-8282 ± 139	-1.7
Mical₁₈₄₁₋₁₉₉₀ K1904A	0.74 ± 0.01	2.8 ± 0.3	-6833 ± 178	2.5
Mical₁₈₄₁₋₁₉₉₀ N1905A	0.79 ± 0.01	4.4 ± 0.4	-7402 ± 184	-0.3
Mical₁₈₄₁₋₁₉₉₀ K1904A N1905A^[1]	1.18 ± 0.13	22.0 ± 5.3	-7699 ± 108	-4.5
Mical₁₈₄₁₋₁₉₉₀ R1919A^[2]	0.90 ± 0.02	3.6 ± 0.6	-6621 ± 252	2.7

^[1] Die Berechnung der Daten erfolgte aus dem Puffer-korrigierten ITC Spektrum in Abbildung 7-4 (C), alle anderen Daten wurden aus den ITC Spektren in Abbildung 7-3 berechnet.

^[2] Die ITC-Messungen der Aminosäureaustauschmutante Mical₁₈₄₁₋₁₉₉₀ R1919A wurde freundlicherweise durch Timon Friese durchgeführt.

Die ITC-Messungen zeigten, dass die Mutationen der hydrophoben Aminosäuren W1897 und F1898 keinen Einfluss auf die Bindung von Mical-3 an Rab1 haben. Möglicherweise wirken sich die Mutationen zu wenig auf die Gesamtinteraktion aus, da insbesondere die Mutationen zu Alanin vermutlich keinen großen Einfluss auf die Interaktion mit der hydrophoben Tasche in Rab1 besitzen. Kleine Abschwächungen um etwa einen Faktor 1.5 - 2 im Vergleich zum Wildtyp Protein konnten hingegen bei den Aminosäureaustauschmutanten K1904A, N1905A und R1919A beobachtet werden. Um diese Einflüsse weiter zu bestätigen und zu zeigen, dass es sich bei den Effekten nicht um Messartefakte handelte, wurde auch die Doppelmutante Mical₁₈₄₁₋₁₉₉₀ K1904A N1905A hergestellt und die Bindung an Rab1 getestet. Bei dieser Mutante zeigte sich eine um etwa eine Größenordnung abgeschwächte Bindung. Um aus den ITC-Messungen trotzdem die Dissoziationskonstante berechnen zu können wurden für die ITC Messungen höhere Konzentrationen von Mical₁₈₄₁₋₁₉₉₀ K1904A N1905A benötigt. Da bei dieser Messung im Gegensatz zu den anderen Mical-Mutanten ein starker Puffereffekt beobachtet wurde musste das ITC Spektrum entsprechend korrigiert werden (Abbildung 7-4).

Insgesamt deuten die Ergebnisse an, dass die Bindung zwischen Mical-3 und Rab1 der Darstellung aus Abbildung 4-18 (C) ähnelt. Dies würde zudem den starken Einfluss der AMP-Modifizierung auf die Interaktion zwischen Mical-3 und Rab1 erklären, da der AMP-Rest im Bereich der Aminosäuren K1904 und N1905 von Mical-3 eine starke sterische Hinderung hervorrufen würde (Abbildung 4-18, C). Ein geringer Einfluss der beiden Mutationen auf die Konformation von Mical₁₈₄₁₋₁₉₉₀ K1904A N1905A kann jedoch trotz der CD-spektroskopischen Untersuchungen nicht vollständig ausgeschlossen werden. Um weitere Belege für die gezeigte potentielle Interaktion zu erhalten sollten zusätzliche Aminosäureaustauschmutanten erzeugt werden. Insbesondere geladene Aminosäuren im Bereich der hydrophoben Tasche sollten einen starken Effekt auf die gezeigte Interaktion besitzen. Weiterhin könnten weitere verkürzte Konstrukte von Mical-3 hergestellt werden, welche ausschließlich den vermeintlichen interagierenden Bereich enthalten, um die Bedeutung dieses Bereiches für die Bindung an Rab1 zu bestätigen.

4.4 Strukturelle Charakterisierung von DrrA

Mittels Röntgenkristallstrukturanalyse wurden bisher sowohl die GEF Domäne als auch die P4M Domäne von DrrA sehr ausgiebig charakterisiert^(45,117,180,181). Im Gegensatz hierzu konnte von der N-terminalen Domäne bisher nur ein Fragment bestehend aus den Aminosäuren 9-218 erfolgreich kristallisiert werden⁽¹²⁷⁾. Im Rahmen dieser Arbeit wurden daher weitere Fragmente der N-terminalen Domäne hergestellt und für Aktivitätsuntersuchungen sowie Kristallisationsexperimente verwendet (Abbildung 4-19).

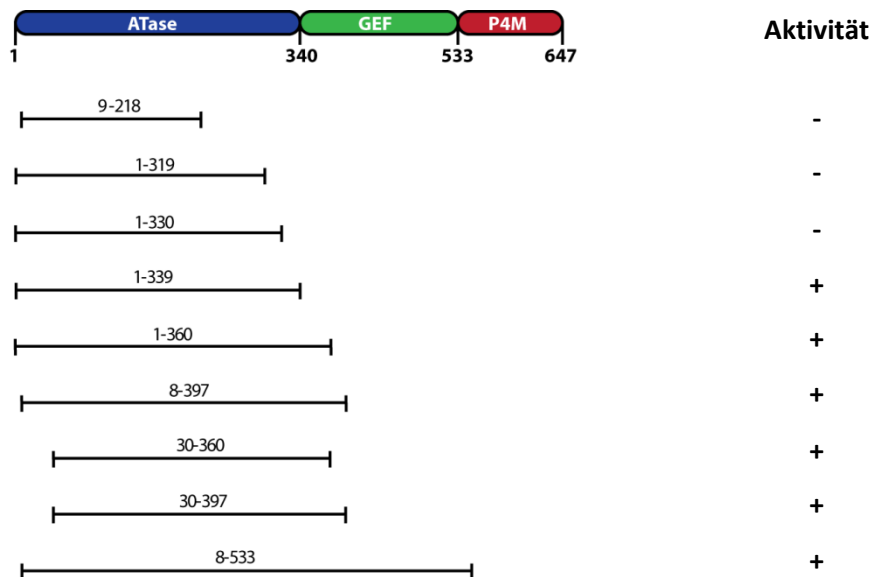


Abbildung 4-19: N-terminale Fragmente von DrrA für Kristallisations- und Aktivitätsuntersuchungen. Die qualitative Bestimmung der katalytischen Aktivität erfolgte durch Inkubation von 50 μM Rab1 in Gegenwart von 400 μM ATP und 20 μM des jeweiligen DrrA-Fragments und anschließender massenspektrometrischer Analyse.

Das kleinste getestete aktive Fragment war DrrA₁₋₃₃₉, wobei auch die N-terminalen 30 Aminosäuren nicht für die Katalyse notwendig zu sein scheinen, da auch DrrA₃₀₋₃₆₀ und DrrA₃₀₋₃₉₇ katalytisch aktiv sind. Neben den Aktivitätstests wurden mit allen Fragmenten initiale Kristallisationsexperimente (JCSG Core I–IV Suites) durchgeführt, es konnten jedoch keine erfolgreichen Kristallisationsbedingungen gefunden werden. Da zuvor für die C-terminale P4M-Domäne beschrieben wurde, dass die zentrale GEF Domäne die Aktivität und die Kristallisationseigenschaften positiv beeinflussen^(117,118) wurde ebenfalls das Fragment DrrA₈₋₅₃₃ für Kristallisationsexperimente hergestellt. Trotz extensiver

Kristallisationsexperimente durch Heide Behrmann (geb. Peters) konnten auch für dieses Fragment keine Kristallisationsbedingungen gefunden werden. Weitere Kristallisationsexperimente im Rahmen dieser Arbeit mit DrrA₈₋₅₃₃ sowie mit den Aminosäureaustauschmutanten DrrA₈₋₅₃₃ K311A K312A und DrrA₈₋₅₃₃ K232A E233A E236A zur Reduzierung der Oberflächenentropie des Proteins⁽¹⁸²⁾ sowie Kristallisationsexperimente in Gegenwart des adenylylierten Peptides Ac-TITSSY[-AMP]YRGAHGC-NH₂, welches freundlicherweise von Dr. Christian Hedberg (Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie, Dortmund) zur Verfügung gestellt wurde⁽¹⁸³⁾, ergaben ebenfalls keine erfolgreichen Kristallisationsbedingungen. Um trotzdem weitere strukturelle Informationen der N-terminalen Domäne zu erhalten wurden Modellierungen mit den vorhandenen Kristallstrukturen durchgeführt und das resultierende Modell mittels Röntgenkleinwinkelstreuung experimentell validiert.

4.4.1 Röntgenkleinwinkeluntersuchungen an DrrA

Anhand der in Abbildung 4-20 dargestellten vorhandenen Röntgenkristallstrukturen verschiedener Fragmente von DrrA wurde ein Modell von DrrA_{fi} im Komplex mit Rab1 erstellt. Abbildung 4-20 (A) zeigt alle vorhandenen Röntgenkristallstrukturen von DrrA, für die Generierung dieses Modells wurden jedoch ausschließlich die Kristallstrukturen von DrrA₉₋₂₁₈ (PDB Zugangsnummer 3NKU), DrrA₁₉₃₋₅₅₀ (PDB Zugangsnummer 3L0I), DrrA₃₁₇₋₆₄₇ (PDB Zugangsnummer 3L0M) und DrrA₃₄₀₋₅₃₃ im Komplex mit Rab1₁₃₋₁₇₄ (PDB Zugangsnummer 3JZA) genutzt. Aufgrund der geringen Überlappung der Fragmente DrrA₉₋₂₁₈ und DrrA₁₉₃₋₅₅₀ wurde für die Modellierung der relativen Orientierung dieser beiden Domänen die hohe strukturelle Homologie zur N-terminalen Domäne der Glutamin Synthetase Adenylyltransferase (PDB Zugangsnummer 1V4A) genutzt.

Das erhaltene Modell ist in Abbildung 4-20 (B) gezeigt. Deutlich können hier die 3 funktionellen Domänen von DrrA unterschieden werden. Die Aminosäuren 1-339 entsprechen der Atase-Domäne (blau), Aminosäuren 340-533 der GEF-Domäne (grün) mit gebundenem Rab1 (gelb) und Aminosäuren 534-647 der P4M-Domäne (rot). Zur Validierung des Modells wurden gemeinsam mit Dr. Stefan Schöbel Röntgenkleinwinkelstreuungsexperimente (engl.: *small-angle x-ray scattering*, SAXS) mit DrrA_{fi} im Komplex mit Rab1₁₃₋₁₇₄ durchgeführt. Das *ab initio* Modell (graue Kugeln in Abbildung 4-20, B) zeigte dabei eine sehr gute Übereinstimmung mit dem theoretischen Modell (χ^2 -Wert ≈ 1 ; Abbildung 7-5, B).

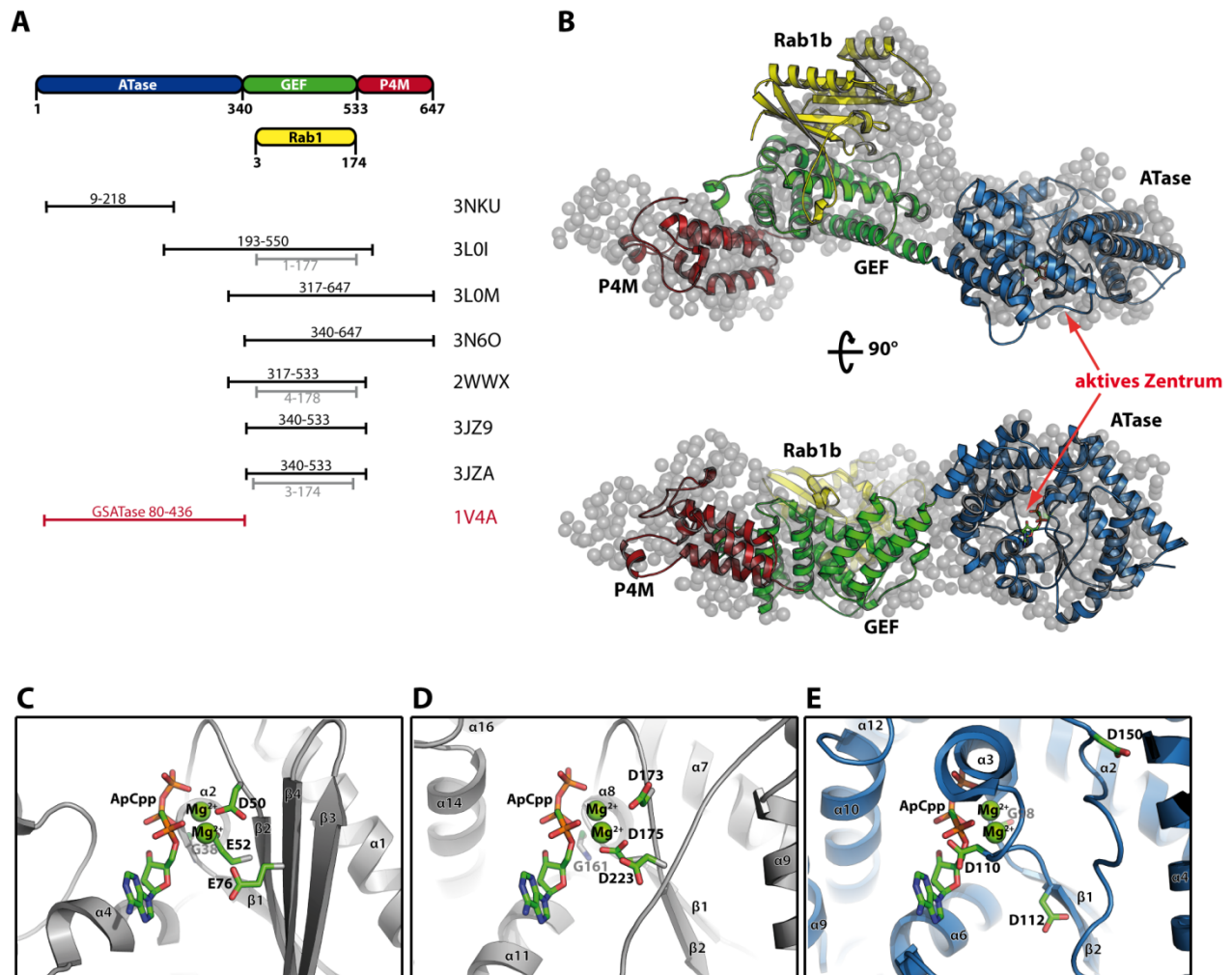


Abbildung 4-20: Röntgenkleinwinkeluntersuchungen mit DrrA_{fi}:Rab1. (A) Domänenstruktur von DrrA mit der Atase-Domäne (blau), der GEF-Domäne (grün), der P4M-Domäne (rot) und Rab1 (gelb). Die darunter gezeigten Balken entsprechen den aktuell vorhandenen Röntgenkristallstrukturen von DrrA (schwarz) im Komplex mit Rab1 (grau) sowie der Struktur der N-terminalen Domäne der Glutamin Synthetase Adenylyltransferase (rot) ^(45,117,127,128,180,181), die PDB Zugangsnummern sind jeweils rechts neben den Balken angegeben. (B) Modell von DrrA_{fi} im Komplex mit Rab1 in der Bänderdarstellung mit derselben Farbgebung wie in (A). Das aktive Zentrum mit gebundenem Adenosin-5'-(α,β-methylen)-triphosphat (ApCpp, Stab-Darstellung) ist mit einem roten Pfeil angedeutet. Das überlagerte *ab initio* Modell aus den Röntgenkleinwinkelstreuungsexperimenten (transparente graue Kugeln) wurde mittels GASBOR ⁽¹⁸⁴⁾ erstellt. (C) Aktives Zentrum der Kanamycin Nukleotidyltransferase (KNT, PDB Zugangsnummer 1KNY). Sekundärstrukturelemente sind in der Bänderdarstellung (grau), die katalytischen Reste und das Substratanalogon ApCpp in der Stab-Darstellung und Mg²⁺ als grüne Kugel gezeigt. (D) Aktives Zentrum der N-terminalen Domäne der Glutamin Synthetase Adenylyltransferase (GSATase, PDB Zugangsnummer 1V4A). Sekundärstrukturelemente sind in der Bänderdarstellung (grau), die katalytischen Reste und das Substratanalogon ApCpp in der Stab-Darstellung und Mg²⁺ als grüne Kugel gezeigt. (E) Aktives Zentrum der Adenylyltransferase von DrrA. Sekundärstrukturelemente sind in der Bänderdarstellung (blau), die katalytischen Reste und das Substratanalogon ApCpp in der Stab-Darstellung und Mg²⁺ als grüne Kugel gezeigt. Die Position des ApCpp und der Mg²⁺-Ionen in (B), (C), (D) und (E) wurden aus der Struktur der KNT und der DNA-Polymerase β (PDB Zugangsnummer 2BPF) abgeleitet. Alle Atome in der Stab-Darstellung sind in derselben Farbkodierung (Kohlenstoff – grün, Sauerstoff – rot, Stickstoff – blau, Phosphor – orange) gezeigt. Die Darstellung von Molekülstrukturen erfolgte mittels PyMol 1.4 ⁽¹²⁹⁾. Abbildung modifiziert nach ⁽¹⁷³⁾.

Die Position des aktiven Zentrums der Atase-Domäne von DrrA mit dem Aminosäuremotiv G98x₁₁D110xD112 ist durch einen roten Pfeil in Abbildung 4-20 gekennzeichnet. Aufgrund der großen Entfernung zur Bindungsstelle der GEF-Domäne von DrrA für Rab1 kann davon ausgegangen werden, dass die Katalyse des Nukleotidaustausches und der Adenylylierung von Rab1 getrennte Bindungen erfordern und keine simultane Katalyse bzw. Substrat-Weitergabe (engl.: *substrate channeling*) möglich ist.

Abbildung 4-20 (C-E) zeigt das aktive Zentrum der Atase-Domäne von DrrA sowie zum Vergleich die aktiven Zentren der KNT (PDB Zugangsnummer 1KNY) und der N-terminalen Domäne der GSAtase (PDB Zugangsnummer 1V4A)^(128,138). In allen aktiven Zentren zeigt sich dabei ein konserviertes Strukturmotiv aus einem β -Faltblatt gefolgt von einer α -Helix und einem weiteren β -Faltblatt (KNT: β 1- α 2- β 2, GSAtase: β 1- α 8- β 2, DrrA: β 1- α 3- β 2), welche alle das katalytische Motiv Gx₁₁[D/E]x[D/E] enthalten. Hervorgehoben sind dabei die katalytischen Reste dieses Motivs (G38, D50 und E52 der KNT; G161, D173 und D175 der GSAtase; G98, D110 und D112 von DrrA) sowie ein dritter saurer Rest, der außerhalb des Strukturmotivs liegt (E76 der KNT, D223 der GSAtase, möglicherweise D150 in DrrA). Die sauren Reste des aktiven Zentrums sind für die Koordinierung divalenter Kationen wie Mg²⁺ während der Katalyse verantwortlich, das Glycin besitzt eine entscheidende Rolle in der Bindung des Substrates im aktiven Zentrum^(130,133). Der Vergleich der KNT und der GSAtase zeigt eine sehr starke Übereinstimmung in der Position der katalytischen Reste, bei DrrA hingegen kann eine deutliche Abweichung beobachtet werden. Insbesondere der dritte saure Rest ist anhand der Struktur nicht eindeutig zu bestimmen, möglicherweise handelt es sich hierbei um das Aspartat D150. Vermutlich bildet sich die Konformation des aktiven Zentrums von DrrA erst während der Katalyse durch ATP-Bindung aus und die gezeigte Konformation ist ein Artefakt der Kristallisation in Abwesenheit des Substrates. Weitere konformationelle Unterschiede könnten auch durch das Kristallisationsfragment DrrA₉₋₂₁₈ verursacht sein, da möglicherweise entscheidende Bereiche der N-terminalen Domäne fehlen um das aktive Zentrum in der nativen Form zu stabilisieren.

Anhand der Kristallstruktur von DrrA₉₋₂₁₈ und der hohen Homologie zu DNA-Polymerase β -ähnlichen Nukleotidyltransferasen soll im Folgenden ein Reaktionsmechanismus abgeleitet werden (Abbildung 4-21). Hierzu wurde die Struktur und der putative Reaktionsmechanismus der DNA-Polymerase β im Komplex mit einem DNA-Templat und Didesoxycytidin-5'-triphosphat (ddCTP) als Referenz verwendet^(142,185). Die Aspartate D110 und D112 sowie das dritte putative D150 koordinieren die beiden Mg²⁺-Ionen im aktiven Zentrum. Das Mg²⁺-Ion Nr. 1 (Abbildung 4-21) erfüllt dabei die Aufgabe, den pentakovalenten Übergangszustand des α -Phosphates zu stabilisieren. Gleichzeitig

stabilisiert es als Lewisäure das Hydroxylatanion von Y77 (Rab1b) und bedingt so einen erniedrigten pK_A -Wert und eine erhöhte Nukleophilie für den nukleophilen Angriff auf das α -Phosphat des ATP. Hierbei könnte D110 zudem als Protonenakzeptor dienen und die Deprotonierung der Hydroxylgruppe von Y77 (Rab1b) weiter vereinfachen. Das Mg^{2+} -Ion Nr. 2 ist an der Koordinierung aller Phosphate beteiligt. Hierdurch stabilisiert es ebenfalls den pentakovalenten Übergangszustand. Des Weiteren dient es der korrekten Ausrichtung der Phosphate im aktiven Zentrum.

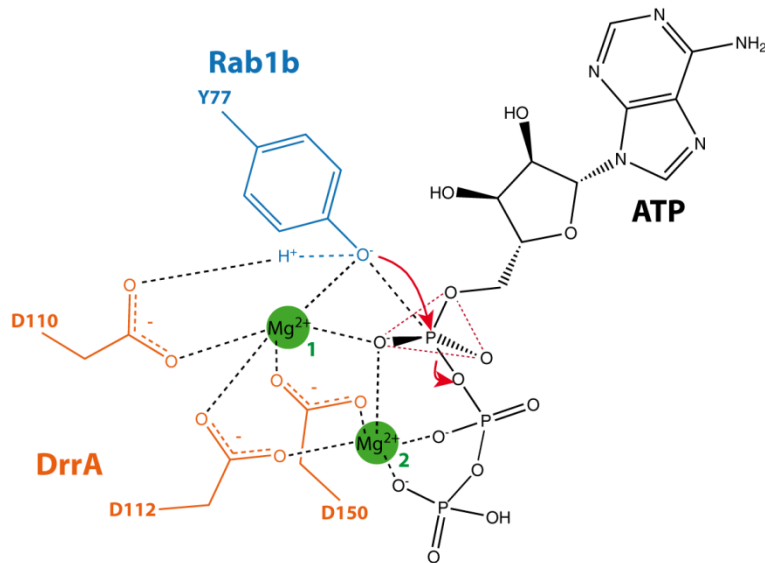


Abbildung 4-21: Wahrscheinlicher Reaktionsmechanismus der DrrA-katalysierten Adenylylierung von Rab1b. ATP ist in schwarz, Y77 von Rab1b in blau, die katalytischen Reste D110 und D112 sowie das putative dritte Aspartat D150 in orange sowie die beiden Mg^{2+} -Ionen in grün gezeigt. Schwarze gestrichelte Linien deuten die diversen Interaktionen an, rote gestrichelte Linien die Geometrie des pentakovalenten Übergangszustandes. Die roten Pfeile zeigen die Formierung der kovalenten Bindung zwischen Y77 und AMP sowie die Abspaltung des Pyrophosphates. Abbildung modifiziert nach ⁽¹⁴²⁾.

4.5 Die Modifizierung ist reversibel

In Kapitel 4.3.2 wurde gezeigt, dass die GAP-Katalyse durch das humane GAP TBC1D20 und das Legionellen GAP LepB durch die AMP-Modifizierung stark inhibiert werden. Aus der Literatur ist jedoch bekannt, dass Rab1 nach etwa 4 Stunden in infizierten Zellen von der Membran der LCV verschwindet⁽¹¹⁵⁾. Da eine Extraktion von Rab-Proteinen aus Membranen durch GDI jedoch nur im GDP-gebundenen Zustand möglich ist⁽⁴⁶⁾ wurde vermutet, dass Legionellen auch ein deadenylylierendes Enzym besitzen könnten um die Modifizierung wieder von Rab1 zu entfernen um somit eine Deaktivierung des Rab-Proteins durch LepB und eine anschließende Extraktion durch GDI zu ermöglichen. Die Bestätigung dieser Hypothese soll im folgenden Abschnitt dargelegt werden.

4.5.1 Legionellenlysat enthält eine enzymatische Aktivität zur Deadenylylierung von Rab1-AMP

Um zu testen ob Legionellen Enzyme besitzen, welche Rab1-AMP deadenylylieren können, wurde präparativ hergestelltes Rab1-AMP in Gegenwart von Legionellenlysat inkubiert und anschließend mittels Massenspektrometrie untersucht. Als Negativkontrolle erfolgte zudem auch eine Inkubation in Gegenwart von *E. coli* Lysat. Die Ergebnisse dieser Experimente sind in Abbildung 4-22 gezeigt.

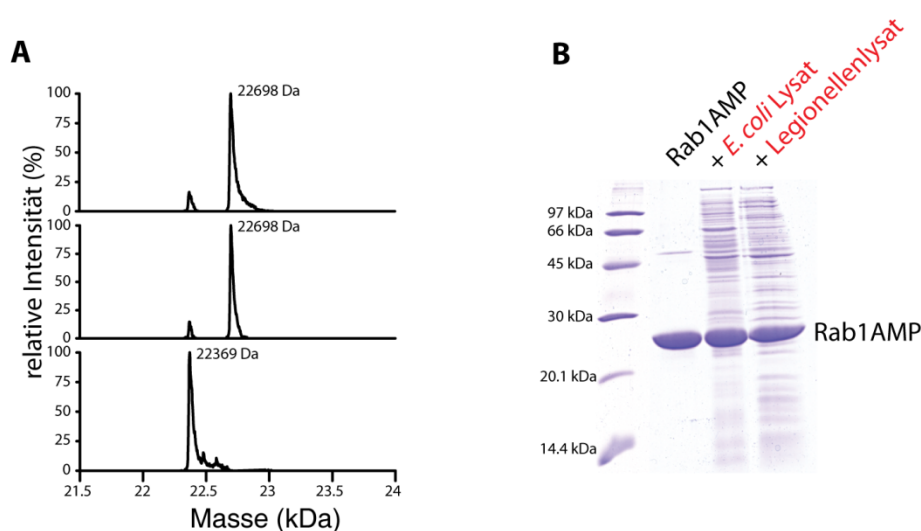


Abbildung 4-22: Legionellen-Lysat enthält eine enzymatische Aktivität zur Deadenylylierung von Rab1-AMP. (A) Massenspektren von 0.5 nmol Rab1 vor (oberes Massenspektrum) sowie nach Inkubation für 1 h bei RT in Gegenwart von *E. coli*-Lysat (mittleres Massenspektrum) und Legionellenlysat (unteres Massenspektrum). (B) Zur Abschätzung der eingesetzten Verhältnisse von Lysat zu Rab1-AMP sind

die Proben im SDS-Gel gezeigt. Das Legionellen-Lysat wurde freundlicherweise von Prof. Dr. Hubert Hilbi und Stephanie Dolinsky (Max-Pettenkofer Institut, München) zur Verfügung gestellt. Abbildung modifiziert nach⁽¹⁷³⁾.

Es konnte gezeigt werden, dass die AMP-Modifizierung an Rab1 innerhalb von einer Stunde durch Inkubation mit Legionellenlysate vollständig entfernt wurde, *E. coli*-Lysat hingegen bewirkte dies nicht. Da alle Proteine des Lysates im Vergleich zu Rab1-AMP lediglich in katalytischen Mengen vorhanden waren (vergleiche Verhältnis des eingesetzten Lysates zu Rab1-AMP in Abbildung 4-22, B) konnte weiterhin vermutet werden, dass das gesuchte Enzym eine hohe katalytische Effizienz besitzen muss. Somit konnte davon ausgegangen werden, dass es sich um eine spezifische enzymatische Aktivität zur Entfernung des AMP-Restes handelte. Bevor jedoch eine Identifizierung des deadenylierenden Enzyms im Rahmen dieser Arbeit gelang erschienen zwei Publikationen, die das Protein SidD aus Legionellen als das gesuchte Enzym identifizierten ^(186,187).

4.5.2 Kinetische Charakterisierung von SidD

Nach Klonierung und Reinigung des Proteins SidD₃₆₋₅₀₇ wurden Experimente zur kinetischen Charakterisierung durchgeführt. Abbildung 4-23 zeigt die Michaelis-Menten Auftragungen von SidD für variierte Konzentrationen der Substrate Rab1-AMP:GDP (A) und Rab1-AMP:GppNHp (B) in Gegenwart katalytischer Konzentrationen von SidD. Aus den Auftragungen der initialen Reaktionsgeschwindigkeiten geteilt durch die verwendeten Enzymkonzentration gegen die verwendeten Substratkonzentrationen wurden durch Anpassung mit einer Michaelis-Menten Gleichung k_{cat} und K_M berechnet. Interessanterweise zeigte SidD keine signifikante Präferenz gegenüber Rab1-AMP:GDP oder Rab1-AMP:GppNHp (vergleiche Tabelle 4-4).

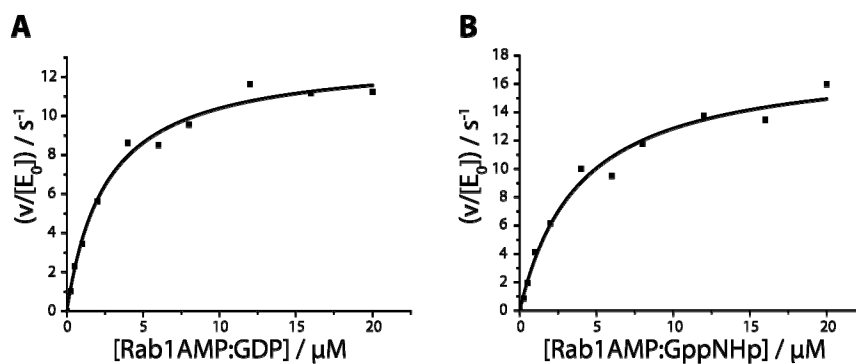


Abbildung 4-23: Kinetische Charakterisierung der SidD-katalysierten Deadenylierung. Die initialen Reaktionsgeschwindigkeiten der SidD katalysierten Deadenylierung geteilt durch die verwendete Enzymkonzentration wurde gegen die verwendeten Konzentrationen von Rab1-AMP:GDP (A) und Rab1-

AMP:GppNHp (B) aufgetragen (schwarze Punkte, konstante SidD Konzentration je 4 nM). Alle Progresskurven sind in Kapitel 7.3 gezeigt. Die Bestimmung der kinetischen Parameter k_{cat} und K_M erfolgte wie in Kapitel 3.2.4.1.1 beschrieben durch Anpassung mit einer Michaelis-Menten Gleichung (schwarze Linie). Abbildung modifiziert nach ⁽¹⁷³⁾.

Eine mögliche Erklärung für diese geringe Substratspezifität könnte eine Konformation der *switch II*-Region in Rab1-AMP:GDP ähnlich der aktiven Konformation der *switch II* Region von Rab1 darstellen. In der Kristallstruktur von Rab1₃₋₁₇₄AMP:GppNHp konnte eine Stapelwechselwirkung (engl.: *stacking interaction*) zwischen dem Adenin des AMP-Restes und dem Phenylrest von F45 in Rab1 beobachtet werden (vergleiche Kapitel 4.1.2). Diese Wechselwirkung könnte auch in der GDP-gebundenen Form von Rab1-AMP auftreten und somit zur einer Stabilisierung der aktiven Konformation der *switch II* Region in Rab1 führen. Alternativ könnte ausschließlich die Aminosäuresequenz bzw. der AMP-Rest von Rab1 während der Katalyse von SidD erkannt und gebunden werden. Während der Infektion könnte die unspezifische Erkennung von Rab1-AMP:GDP und Rab1-AMP:GppNHp durch SidD eine vollständige Demodifizierung von Rab1 unabhängig vom gebundenen Nukleotid sicherstellen (vergleiche auch Kapitel 4.6.1).

Tabelle 4-4: Zusammenfassung der kinetischen Parameter der Deadenylierung durch SidD.

	k_{cat} (s^{-1})	K_{M} (μM)	$k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$ ($10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$)
Rab1bAMP:GDP	13.1 ± 0.5	2.6 ± 0.3	5.0 ± 0.8
Rab1bAMP:GppNHp	17.8 ± 1.0	3.9 ± 0.7	4.6 ± 1.1

Aufgrund der kleinen K_{M} -Werte konnten unabhängige Parameter für die K_{M} - und k_{cat} -Werte wie zuvor bereits für DrrA gezeigt mittels KinTek Explorer auch für SidD berechnet werden (Abbildung 4-24). Die aus diesen Progresskurven bestimmten k_{cat} -Werte sind $(17.6 \pm 0.2) \text{ s}^{-1}$ für Rab1-AMP:GDP und $(19.6 \pm 1.4) \text{ s}^{-1}$ für Rab1-AMP:GppNHp, die K_{M} -Werte betragen laut dieser Auswertung $(5.4 \pm 0.8) \mu\text{M}$ für Rab1-AMP:GDP und $(2.9 \pm 4.7) \mu\text{M}$ für Rab1-AMP:GppNHp. Es zeigte sich also im Rahmen der Messungenauigkeit bei der Bestimmung aus einer einzelnen Progresskurve eine gute Übereinstimmung mit den zuvor bestimmten Parametern (vergleiche Tabelle 4-4).

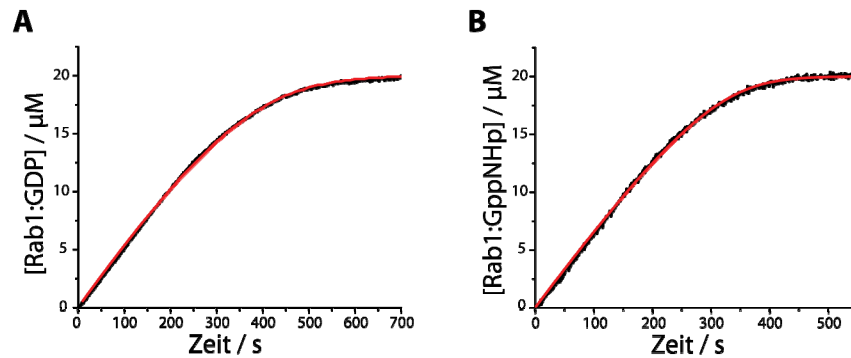


Abbildung 4-24: Bestimmung der kinetischen Parameter der Deadenylierung von Rab1-AMP:GDP und Rab1-AMP:GppNHp aus einer Progresskurve. Gezeigt ist jeweils die Tryptophan Fluoreszenzänderung von 20 μM Rab1-AMP:GDP (A) und Rab1-AMP:GppNHp (B) in Gegenwart von 4 nM SidD (schwarz) und die Anpassung mit einem Michalis-Menten Modell mittels KinTek Explorer (rot, siehe Kapitel 3.2.4.1.1). Abbildung modifiziert nach ⁽¹⁷³⁾.

In der Literatur wurde die Lokalisierung der Deadenylierungsdomäne sowie der katalytisch essentiellen Reste D92 und D110 im Bereich des N-Terminus von SidD beschrieben ^(187,188). Aus diesem Grund wurden im Rahmen der Bachelorarbeit von Frank Gerhard verkürzte Konstrukte von SidD hergestellt und auf deren Deadenylierungsaktivität getestet. Das minimal getestete aktive Fragment innerhalb dieser Arbeit war SidD₅₁₋₃₆₀ unter Verwendung von Rab1bAMP:GDP als Substrat, wobei ein K_M -Wert von $(40 \pm 4.2) \mu\text{M}$, ein k_{cat} -Wert von 3 s^{-1} und somit eine katalytische Effizienz der Deadenylierung von $(0.75 \cdot 10^{-6}) \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ bestimmt wurde. Abbildung 4-25 zeigt die Domänenstruktur mit der bisher ermittelten minimalen Deadenylierungsdomäne. Der Vergleich der katalytischen Effizienz von SidD₅₁₋₃₆₀ mit der katalytischen Effizienz von SidD₃₆₋₅₀₇ ($(5.0 \cdot 10^{-6}) \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, vergleiche Tabelle 4-4) deutet dabei an, dass weitere Bereiche von SidD für eine effiziente Katalyse notwendig sind. Weiterhin deuten die Ergebnisse an, dass SidD eine weitere funktionelle Domäne im Bereich des C-Terminus (Aminosäuren 360-507) besitzen könnte.



Abbildung 4-25: Domänenstruktur von SidD. Die bisher bestimmte minimale Deadenylierungsdomäne ist in grün dargestellt, der Rest von SidD ist in grau gezeigt. Die Position der katalytisch essentiellen Aspartate D92 und D110 ist in rot gezeigt.

4.5.3 Untersuchung der Nukleotidspezifität von SidD

Da zuvor gezeigt wurde, dass DrrA unterschiedliche Nukleotide zur Modifizierung von Rab1 nutzen kann, sollte in weiteren Experimenten die Substratspezifität von SidD gegenüber unterschiedlich nukleotidyliertem Rab1 getestet werden. Zu diesem Zweck wurden einzelne Progresskurven aufgenommen und mittels KinTek Explorer die katalytischen Effizienzen bestimmt (Abbildung 4-26 und Tabelle 4-5). Bei diesen Experimenten zeigte sich eine Präferenz von SidD gegenüber Rab1-AMP, es wurden jedoch auch alle anderen getesteten Nukleotide durch SidD hydrolytisch entfernt.

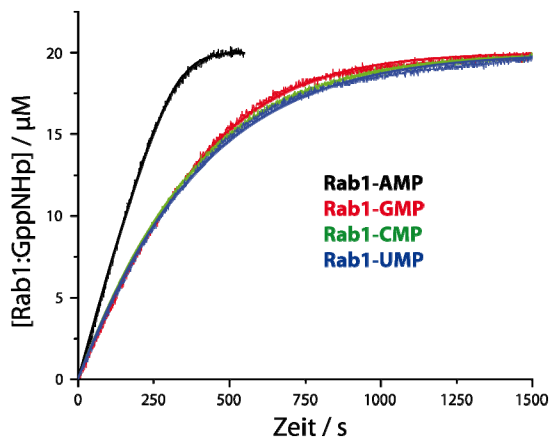


Abbildung 4-26: SidD katalysiert die Denukleotidylierung von Rab1 mit unterschiedlichen Nukleotiden. Progresskurven der Umsetzung von 20 µM Rab1-AMP:GppNHp (schwarz), Rab1-GMP:GppNHp (rot), Rab1-CMP:GppNHp (grün) und Rab1-UMP:GppNHp (blau) in Gegenwart von 4 nM SidD bei 25 °C (Puffer: 20 mM HEPES pH 7.5, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂). Die Auswertung zur Bestimmung der katalytischen Effizienzen erfolgte wie zuvor beschrieben mittels KinTek Explorer. Abbildung modifiziert nach ⁽¹⁷³⁾.

Die katalytischen Effizienzen der hydrolytischen Denukleotidylierung der getesteten Substrate Rab1GMP, Rab1CMP und Rab1UMP sind je etwa um einen Faktor 7 geringer als für Rab1-AMP, zeigen

Tabelle 4-5: Katalytische Effizienzen der Deadenylierung durch SidD.

	k_{cat}/K_M ($10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$)
Rab1bAMP	6.8
Rab1bGMP	1.1
Rab1bCMP	0.8
Rab1bUMP	0.7

für alle getesteten Nukleotide jedoch mit einer katalytischen Effizienz größer als $0.7 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ eine sehr effiziente Katalyse. Möglicherweise ist diese geringe Substratspezifität von SidD notwendig, um Rab1 im

Infektionszyklus vollständig zu denukleotidylieren. Da für die N-terminale Domäne von DrrA eine zytotoxische Wirkung durch ektopische Expression gezeigt werden konnte ist die hohe katalytische Effizienz von SidD gegenüber unterschiedlich nukleotidyliertem Rab1 möglicherweise notwendig um

eine vollständige Demodifizierung und ein Überleben der Wirtszellen während der Replikation der Legionellen zu gewährleisten^(114,127). Darüber hinaus könnte dies auch in Gegenwart von geringen verbleibenden Mengen von DrrA während der Infektion eine vollständige Demodifizierung von Rab1 gewährleisten (vergleiche auch Kapitel 5.1).

5 ABSCHLIEßENDE DISKUSSION UND AUSBLICK

In der abschließenden Diskussion sollen zunächst die dargestellten Ergebnisse dieser Arbeit im Kontext der Literatur zur Erstellung eines Modells der Rab1-Rekrutierung durch Legionellen genutzt werden, um mögliche Rückschlüsse auf die Bedeutung der Adenylylierung und Deadenylylierung im Infektionszyklus zu erhalten. Da bereits in der Einleitung (vergleiche Kapitel 1.2.1.1) auf die Funktionen zahlreicher Rab1-interagierender und -modifizierender Legionellenproteine (mit Ausnahme der Adenylylierung durch DrrA und der Deadenylylierung durch SidD) eingegangen wurde soll Tabelle 5-1 eine kurze Auflistung der Enzyme, deren bekannter Funktionen und der zugehörigen Literatur zeigen, um dem Leser eine Einordnung in die aktuelle Literatur zu vereinfachen.

Tabelle 5-1: Rab1-interagierende Proteine aus Legionella pneumophila.

Familie	beschriebene Funktion	Quellen
DrrA/SidM	GEF / Adenylylierung	(45,113-118,127,173)
SidD	Deadenylylierung	(173,186-188)
LidA	Effektorprotein	(120-122)
LepB	GAP	(115)
AnkX	Phosphocholinierung	(124-126,189)
Lem3/lpg0696	Dephosphocholinierung	(125,126)

5. 1 Ein Modell der Funktion der Adenylylierung von Rab1 im Infektionszyklus

Während der Legionelleninfektion sind unterschiedliche Proteine zu unterschiedlichen Zeiten an der LCV lokalisiert bzw. detektierbar (siehe Schema in Abbildung 5-1). Die Rekrutierung von Rab1 kann dabei vermutlich in 2 Phasen eingeteilt werden, zunächst eine membrangebundene Phase (bezeichnet als Membraneinschlussphase in Abbildung 5-1) etwa während der ersten 4 Stunden der Legionelleninfektion und eine anschließende Freisetzungsphase. Neben Rab1 ist auch DrrA während der ersten 4 Stunden an der LCV Membran lokalisiert⁽¹¹⁵⁾. Vermutlich bindet DrrA nach der Sekretion in das Zytoplasma aufgrund der hohen Affinität der P4M-Domäne zu Phosphatidylinositol-4-phosphat direkt an die LCV-Membran und rekrutiert anschließend mittels der GEF-Domäne Rab1^(45,117,118). Da die katalytische Effizienz der Adenylylierung durch DrrA von Rab1:GppNHp mit $(8.3 \pm 2.2) \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$

gegenüber Rab1:GDP mit $(0.021 \pm 0.001) \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ etwa um einen Faktor 395 größer ist (vergleiche Kapitel 4.2) findet die Adenylylierung vermutlich erst nach der Aktivierung durch die GEF Domäne von DrrA statt. Innerhalb dieser Arbeit sowie anderweitig wurden diverse Effekte der Adenylylierung auf die Interaktion von Rab1 mit unterschiedlichen Proteinen beschrieben: Zum einen konnte gezeigt werden, dass die Inaktivierung durch die GAPs LepB und TBC1D20 durch die Adenylylierung drastisch inhibiert wird (Reduzierung der katalytischen Effizienzen um einen Faktor von etwa 1000 für LepB und etwa 20 für TBC1D20, vergleiche Kapitel 4.3.2). Der GEF-katalysierte Nukleotidaustausch durch DrrA hingegen ist nur unwesentlich beeinträchtigt^(127,173). Trotz der intrinsischen Hydrolyseaktivität ist Rab1 in der adenylylierten Form daher vermutlich ständig an GTP gebunden und kann nicht deaktiviert werden. Trotz dieser ständigen aktiven Konformation kann es jedoch nicht mit dem humanen Effektorprotein Mical-3 und vermutlich auch anderen humanen Effektorproteinen interagieren (vergleiche Kapitel 4.3.3.2). Das Legionelleneffektorprotein LidA hingegen bindet mit hoher Affinität sowohl Rab1 als auch adenylyliertes Rab1⁽¹²²⁾ und ist bereits nach etwa 20 Minuten an der LCV-Membran nachweisbar⁽¹²¹⁾. Möglicherweise dient LidA als Anheftungsfaktor (engl.: *tethering factor*) für ER-stämmige Vesikel und unterstützt somit die Umwandlung der LCV in eine Replikationsvakuole. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass adenylyliertes Rab1 nicht durch GDI gebunden werden kann und dadurch vermutlich durch die Adenylylierung an der LCV arretiert ist⁽⁴⁸⁾.

Nach etwa 3-6 Stunden gehen Legionellen innerhalb der LCV in die Replikationsphase über^(190,191). Während DrrA vermutlich aufgrund der veränderten Membranzusammensetzung und einer Abnahme der PI4P-Konzentration die LCV-Lokalisierung nach ungefähr 4 Stunden verliert konnten etwa zu diesem Zeitpunkt das GAP LepB und das deadenylylierende Enzym SidD an der LCV nachgewiesen werden^(115,186). Da adenylyliertes Rab1 kein Substrat für LepB darstellt muss Rab1 zunächst durch SidD deadenylyliert werden, um anschließend eine Deaktivierung durch LepB und schließlich die Extraktion durch GDI zu ermöglichen. Möglicherweise stellt dabei die hohe katalytische Effizienz von SidD gegenüber adenylyliertem Rab1:GDP und Rab1:GppNHp (bzw. Rab1:GTP) sicher, dass Rab1 auch in Gegenwart kleiner verbleibender DrrA-Konzentrationen vollständig demodifiziert wird und von der LCV entfernt werden kann. Weiterhin konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass Rab1-AMP eine intrinsische Hydrolyseaktivität vergleichbar mit unmodifiziertem Rab1 besitzt. Durch die Abnahme der DrrA-Konzentration (und somit der GEF-Aktivität) an der LCV könnte daher Rab1-AMP:GDP an der LCV gebildet werden. Möglicherweise stellt die unspezifische Erkennung durch SidD somit eine vollständige Demodifizierung von Rab1 auch unabhängig vom gebundenen Nukleotid sicher. Auch die relativ

unspezifische Erkennung unterschiedlich nukleotidylierter Rab1-Spezies (vergleiche Kapitel 4.5.3) unterstützt diese Vermutung.

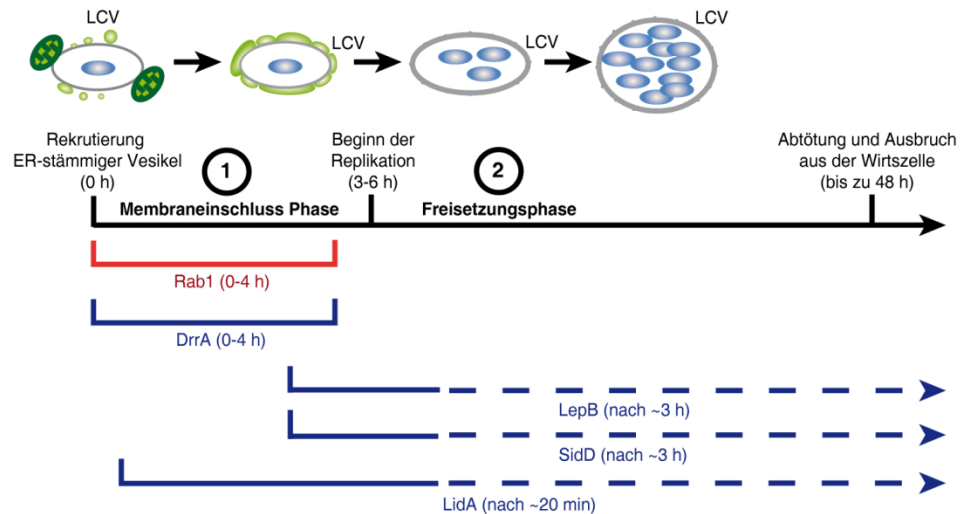


Abbildung 5-1: Zeitlicher Ablauf der Legionelleninfektion im Kontext der Rab1-Rekrutierung. Gezeigt sind der zeitliche Ablauf der Legionellen-Infektion (schwarzer Balken) sowie die in der Literatur beschriebene zeitliche Lokalisierung bzw. Detektion des humanen Rab1 (rot) und der Legionellen-Proteine DrrA, LepB, SidD und LidA (blau) an der LCV. Für detailliertere Erläuterungen, siehe Text. Abbildung modifiziert nach ^(105,173).

Legionellen mit einer Deletion des Gens für DrrA zeigen eine drastisch reduzierte Rekrutierung von Rab1 an die LCV, wohingegen Legionellen mit Deletion des Gens für SidD eine verlangsamt Entfernung von Rab1 von der LCV während der Infektion zeigen. Obwohl Legionellen diese Enzyme zur Modifizierung von Rab1 zur Verfügung stellen konnte jedoch für beide Enzyme gezeigt werden, dass sie für eine erfolgreiche Infektion von Wirtszellen nicht notwendig sind ^(116,186,187). Die augenscheinliche Entbehrlichkeit von DrrA und SidD kann unterschiedliche Gründe haben. Zum einen ist bekannt, dass Legionellen eine Vielzahl von Effektoren mit teilweise redundanter Funktion in die Wirtszellen sekretieren ^(113,115,192). Desweiteren konnte gezeigt werden, dass neben Rab1 weitere Rab-Proteine an die LCV rekrutiert werden und somit möglicherweise weitere vesikuläre Transportprozesse zur Generierung der Replikationsvakuole genutzt werden ⁽¹¹¹⁾. Weiterhin infizieren Legionellen viele unterschiedliche Wirtszellen: neben Makrophagen sind mehr als 13 Arten von Amöben und 2 Arten von Protozoen als Wirte von Legionellen bekannt ^(99,100). Hierbei könnte die reversible Adenylylierung in unterschiedlichen Wirtszellen und insbesondere in Anwesenheit bestimmter feindseliger Umweltfaktoren und (bakterieller) Konkurrenten einen Vorteil bieten, der in Zellkulturexperimenten nicht zum Tragen kommt.

5.2 Vergleich der Adenylylierung durch DrrA und der Phosphocholinierung durch AnkX

Neben der reversiblen Adenylylierung durch DrrA und SidD konnte vor kurzem auch die reversible Phosphocholinierung von Rab1 und Rab35 durch AnkX und Lem3 (lpg0696) aus Legionellen beschrieben werden⁽¹²⁴⁻¹²⁶⁾. Die Modifizierung durch AnkX findet hierbei am S76 in Rab1b (bzw. dem homologen Threonin in Rab35) in direkter Nachbarschaft zu dem durch DrrA adenylylierten Y77 statt. Auch für diese Modifizierung von Rab1 und Rab35 wurden diverse Effekte auf die Interaktion mit GAPs, GEFs, Effektoren und GDI untersucht. Tabelle 5-2 gibt eine Zusammenfassung der bekannten Daten.

Tabelle 5-2: Vergleich der Auswirkungen der Phosphocholinierung und der Adenylylierung^[1]

	Einschränkung der Bindung / Katalyse an	
	Rab1-AMP	PC-Rab1 / PC-Rab35
GAPs		
TBC1D20	20-fach ⁽¹⁷³⁾	etwa 4-fach ⁽¹²⁵⁾
LepB	1000-fach ⁽¹⁷³⁾	etwa 17-fach ⁽¹²⁵⁾
GEFs		
DrrA	3-fach ⁽¹⁷³⁾	5-fach ⁽¹²⁵⁾
connecdenn-1	–	sehr stark ⁽¹²⁵⁾
Effektorproteine		
Mical-3	> 200-fach ⁽¹⁷³⁾	keine ⁽¹²⁵⁾
LidA	– ⁽¹²²⁾	– ⁽¹²⁵⁾
GDI	sehr stark ⁽⁴⁸⁾	sehr stark ⁽⁴⁸⁾

^[1] – bedeutet keine Daten vorhanden bzw. nicht exakt bestimmbar. Erläuterungen im Text.

Für die GAPs LepB und TBC1D20 zeigt die Phosphocholinierung einen geringeren inhibitorischen Effekt als die Adenylylierung, es konnte jedoch in beiden Fällen eine stärkere Inhibition des Legionellen-GAPs LepB beobachtet werden. Für die GEF-Domäne von DrrA konnte in beiden Fällen nur eine leichte Inhibition beobachtet werden, wohingegen die GEF-Katalyse durch connecdenn-1 an Rab35 sehr stark durch die Phosphocholinierung beeinträchtigt wird. Interessant wäre es in diesem Zusammenhang für

weitere insbesondere humane GEF-Proteine die Auswirkungen der Adenylylierung zu untersuchen. Bei dem Effektorproteinen Mical-3 zeigt sich im Gegensatz zur Adenylylierung bei der Phosphocholinierung von Rab1 keine signifikante Einschränkung der Bindung. In der putativen Komplexstruktur zwischen Mical-3 und Rab1 (vergleiche Kapitel 4.3.3.3) liegt das phosphocholinierte Ser76 nicht direkt im Bindungsbereich von Mical-3 und könnte daher die weiterhin mögliche Bindung von PC-Rab1 an Mical erklären. Für LidA konnten aufgrund der ungewöhnlich hohen beschriebenen Affinitäten für verschiedene Rab-Proteine keine exakten Affinitäten für unmodifizierte oder modifizierte Rab-Proteine bestimmt werden⁽¹²²⁾. Lediglich für Rab6 konnte gezeigt werden, dass die Adenylylierung zu einer etwa um 2 Größenordnungen abgeschwächten Bindung von LidA führt, die Bindungsaffinität jedoch auch in diesem Fall noch im niedrigen nanomolaren Bereich liegt⁽¹²²⁾. Schließlich konnte für GDI gezeigt werden, dass beide Modifizierungen die Affinitäten der Rab:GDI Komplexe drastisch reduzieren und *in vivo* vermutlich keine Komplexformierung und somit Extraktion aus Membranen erlauben^(48,125).

Abbildung 5-2 zeigt ein vergleichendes Modell der Auswirkungen der Modifizierungen auf Rab-Proteine in Ergänzung zu Tabelle 5-2. Insbesondere die eingeschränkte Bindung von GDI sowohl durch die Adenylylierung als auch die Phosphocholinierung könnte bei der Legionelleninfektion dazu dienen, eine Extraktion der Rab-Proteine aus Membranen zu unterbinden^(48,69,125). Da DrrA ausschließlich während der ersten Phase der Infektion an der LCV lokalisiert ist wird Rab1 vermutlich ausschließlich dort modifiziert⁽¹¹⁵⁾. Ob Adenylylierungen durch DrrA (vor allem zu späteren Zeitpunkten) der Infektion auch in anderen Bereichen der Zelle auftreten ist nicht bekannt und stellt eine interessante Fragestellung für zukünftige Forschung dar. Die Lokalisierung von AnkX während der Infektion ist bisher unbekannt. Bei ektopischer Expression bzw. Mikroinjektion konnte jedoch gezeigt werden, dass AnkX eine Fragmentierung des Golgi-Apparates und eine Blockierung endosomaler Transportprozesse bewirkt und somit möglicherweise eine Rolle in der Manipulation des vesikulären Transportes zum oder vom Golgi-Apparat sowie der Inhibition der lysosomalen Degradation von Legionellen spielen könnte^(124,189). Möglicherweise haben die Phosphocholinierung durch AnkX und die Adenylylierung durch DrrA dabei zumindest partiell redundante Funktionen während der Infektion. Eine simultane Modifizierung wurde in infizierten Zellen nicht beobachtet und ist aufgrund der starken kinetischen Inhibition der Phosphocholinierung an Rab1-AMP bzw. der Adenylylierung an PC-Rab1 unwahrscheinlich^(124,125). Weiterhin scheint die Konformation der Rab-Proteine für die Phosphocholinierung im Gegensatz zur Adenylylierung keine signifikante Rolle zu besitzen, da sowohl Rab1:GDP als auch Rab1:GppNHp mit in etwa vergleichbarer katalytischer Effizienz modifiziert werden⁽¹²⁵⁾. Erst nach der Entfernung der Modifizierungen durch die Enzyme SidD und Lem3 kann schließlich die Extraktion durch GDI erfolgen

(Abbildung 5-2)^(48,125). Eine weitere mögliche Funktion von AnkX könnte auch die Phosphocholinierung neu synthetisierter Rab-Proteine und einer damit einhergehende Inhibierung der Bindung an das Rab Eskortprotein (REP) analog zur Inhibierung der GDI-Bindung sein, was zu einer effektiven Verminderung der Prenylierung der phosphocholinieren Rab-Proteine führen würde. Diese Vermutung wird durch die starke strukturelle Homologie von REP und GDI^(193,194) sowie die hohe katalytische Effizienz der Phosphocholinierung von GDP-gebundenem Rab⁽¹²⁵⁾ gestützt. Durch diesen Mechanismus könnten gezielt bestimmte vesikuläre Transportprozesse in der Zelle blockiert werden.

Insbesondere für die Proteine AnkX, Lem3 und SidD ist bisher die intrazelluläre Lokalisierung während der Infektion nur ungenügend bekannt. Im Kontext der Funktion wäre eine genauere Charakterisierung in der Zukunft von großem Interesse, um weitere Schlussfolgerungen über die Funktion der Proteine während des Infektionszyklus ziehen zu können. Weiterhin sind diese Proteine strukturell bisher nicht untersucht worden. Da diese Proteine ein Molekulargewicht von mehr als 50 kDa besitzen (SidD: 57 kDa, AnkX: 107 kDa, Lem3: 65 kDa), enthalten sie vermutlich neben den bisher beschriebenen Aktivitäten weitere Domänen mit bisher unbekannter Funktion. So konnte für SidD die Deadenylierungsdomäne sowie die katalytisch essentiellen Reste D92 und D110 im Bereich des N-Terminus lokalisiert werden^(187,188), AnkX wiederum besitzt neben der Fic-Domäne weitere *Ankyrin Repeat* Domänen mit bisher unbekannter Funktion⁽¹⁸⁹⁾.

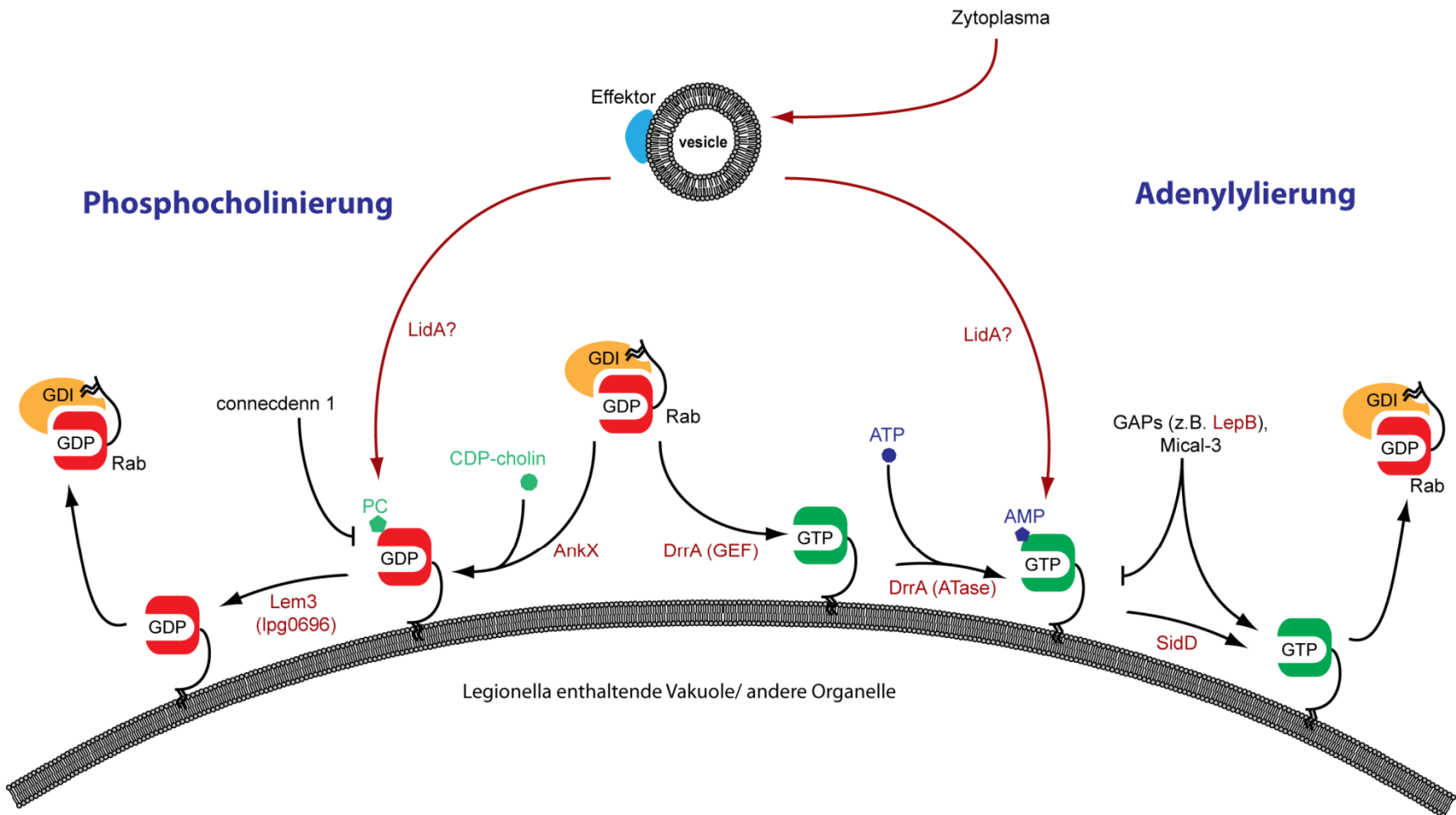


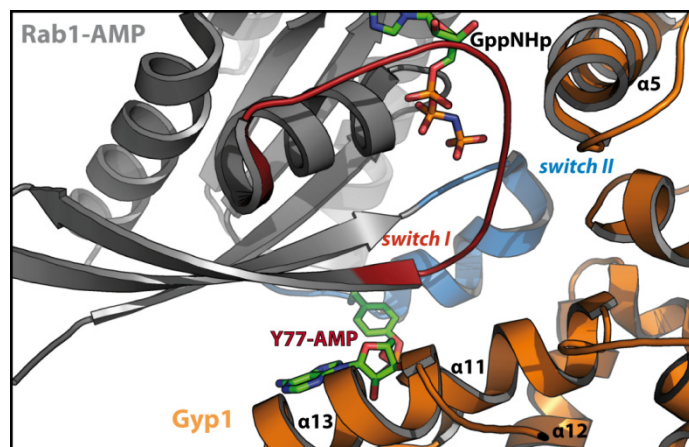
Abbildung 5-2: Vergleich der Phosphocholinierung und der Adenylylierung. Gezeigt ist ein Modell der Auswirkungen der Phosphocholinierung (links) und der Adenylylierung (rechts) von Rab-Proteinen auf die Wechselwirkungen mit diversen interagierenden Proteinen. Da beide Modifizierungen keine Bindung und Extraktion durch GDI erlauben führen sie vermutlich zu einer stabilen Assoziation der Rab-Proteine mit intrazellulären Membranen, die erst nach der Demodifizierung wieder aufgelöst werden kann. Abbildung modifiziert nach ⁽⁶⁹⁾.

5.3 Strukturelle Grundlagen der Effekte der Adenylylierung auf Proteininteraktionen

In dieser Arbeit wurden die Effekte der Adenylylierung von Rab1 auf diverse Proteininteraktionen untersucht. Im Folgenden sollen einige der Effekte anhand bekannter Röntgenkristallstrukturen auf struktureller Ebene betrachtet und soweit möglich erklärt werden. Hierzu wurden die Komplexstrukturen von Rab1-AMP mit dem GAP TBC1D20 (Abbildung 5-3), mit der GEF-Domäne von DrrA (Abbildung 5-4), mit dem Effektorprotein LidA (Abbildung 5-5) und mit GDI (Abbildung 5-6) modelliert^(45,91,122,194). In allen Strukturen konnte dabei beobachtet werden, dass die AMP-Modifizierung im Bereich der Interaktionsfläche liegt.

Die putative Komplexstruktur von Gyp1 mit Rab1-AMP wurde als Beispiel für TBC-Domänen ähnliche GAPs (wie z. B. TBC1D20) anhand der publizierten Komplexstruktur von Rab33 und Gyp1 (PDB Zugangsnummer 2G77) modelliert⁽⁹¹⁾. Hierbei zeigt sich, dass die AMP-Modifizierung eine sterische Behinderung im Bereich der α -Helices 11 und 13 von Gyp1 bedingt. Die moderat beeinträchtigte Katalyse von TBC1D20 (vergleiche Tabelle 5-2) kann somit durch eine schlechtere Bindung des Substrates (und somit einem erhöhten K_M -Wert für Rab1-AMP) erklärt werden. Für das weitere untersuchte GAP LepB wurde bisher keine Komplexstruktur publiziert. Die Aminosäuresequenz dieses GAPs zeigt keine Ähnlichkeit zu bisher bekannten Rab GAPs und lässt daher keine Spekulationen zu möglichen strukturellen Grundlagen der verminderten Katalyse an Rab1-AMP zu. Vermutlich liegt die AMP-Modifizierung auch hier im Bindungsbereich und verursacht starke sterische Behinderungen der Rab1-AMP-Bindung an LepB während der Katalyse.

Abbildung 5-3: Modellerte Bindung von Rab1-AMP und dem GAP Gyp1. Theoretischer Komplex aus Rab1-AMP (PDB Zugangsnummer 3NKV) und Gyp1 modelliert aus der Komplexstruktur von Gyp1 mit Rab33 (PDB Zugangsnummer 2G77). Rab1-AMP und Gyp1 sind jeweils in der Bänderdarstellung (Rab1-AMP: grau, *switch I* – rot, *switch II* – blau; Gyp1: orange) mit dem modifizierten Y77 und AMP sowie dem gebundenen Nucleotid GppNHp in der Stab-Darstellung gezeigt (Kohlenstoff – grün, Sauerstoff – rot, Stickstoff – blau, Phosphor – orange). Die Darstellung von Molekülstrukturen erfolgte mittels PyMol 1.4⁽¹²⁹⁾.



Für die GEF-Katalyse durch DrrA wurde gezeigt, dass die Bindung der GEF-Domäne große strukturelle Konformationsänderungen der *switch*-Bereiche in Rab1 induziert um eine Öffnung der Nukleotidbindungsstasche und eine damit einhergehende Verringerung der Nukleotidaffinität zu vermitteln⁽⁴⁵⁾. Abbildung 5-4 zeigt die modellierte Komplexstruktur von Rab1-AMP und der GEF-Domäne von DrrA, zusätzlich sind auch die Konformationen der *switch*-Bereiche von Rab1 in der DrrA-gebundenen Konformation aus der publizierten Komplexstruktur (PDB Zugangsnummer 3JZA) gezeigt. Hierbei kann beobachtet werden, dass auch Y77 durch die Bindung an DrrA aus dem Bereich der Bindungsfläche herausklappt. Durch kinetische Messungen konnte gezeigt werden, dass sowohl der K_M -Wert als auch die Wechselzahl (k_{cat}) der GEF-Katalyse durch die AMP-Modifizierung ansteigen und somit die katalytische Effizienz beinahe konstant bleibt (siehe Tabelle 4-2). Vermutlich ist durch die AMP-Modifizierung die initiale Bindung somit erschwert, die anschließende geschwindigkeitsbestimmende Konformationsänderung von Rab1 jedoch vereinfacht^(45,173).

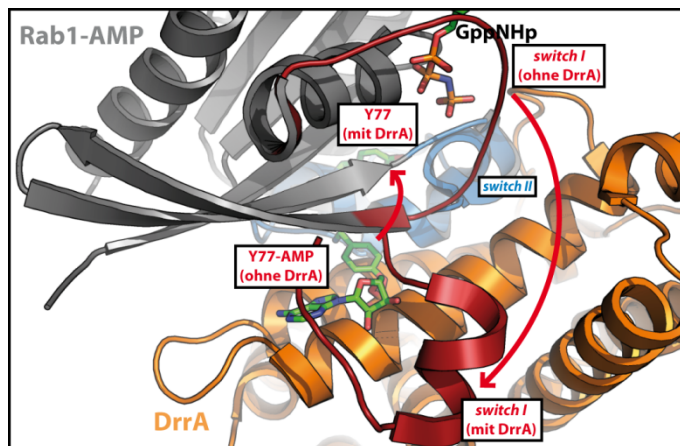


Abbildung 5-4: Modellierte Bindung von Rab1-AMP und der GEF-Domäne von DrrA.

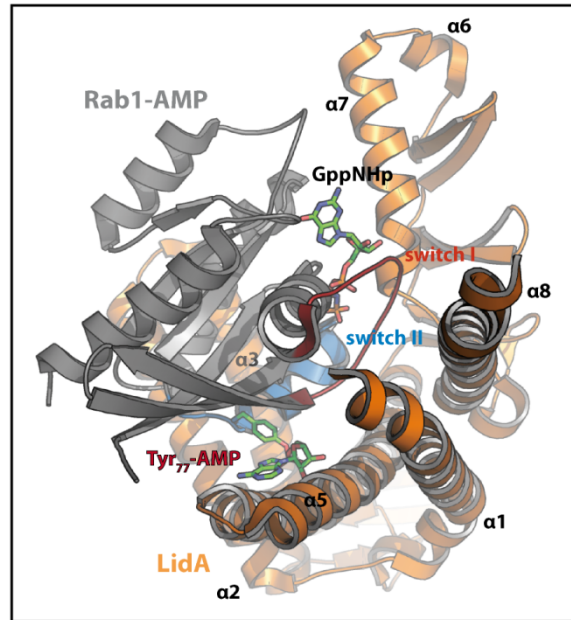
Theoretischer Komplex aus Rab1-AMP (PDB Zugangsnummer 3NKV) und der GEF Domäne von DrrA modelliert aus der Komplexstruktur von DrrA mit Rab1 (PDB Zugangsnummer 3JZA). Die Konformationsänderungen der *switch*-Bereiche und des Y77 während der Katalyse des Nukleotidaustausches durch DrrA sind durch rote Pfeile angedeutet (die Konformationen von *switch I* und Y77 im DrrA-gebundenen („mit DrrA“) und ungebundenen („ohne DrrA“) Zustand sind entsprechend bezeichnet. Rab1-AMP und DrrA sind jeweils in der Bänderdarstellung

(Rab1-AMP: grau, *switch I* – rot, *switch II* – blau; DrrA: orange) mit dem modifizierten Y77 und AMP sowie dem gebundenen Nukleotid GppNHp in der Stab-Darstellung gezeigt (Kohlenstoff – grün, Sauerstoff – rot, Stickstoff – blau, Phosphor – orange). Die Darstellung von Molekülstrukturen erfolgte mittels PyMol 1.4⁽¹²⁹⁾.

In der putativen Komplexstruktur zwischen Rab1-AMP und LidA kann die bereits in Kapitel 4.3.3.1 besprochene ungewöhnlich große Interaktionsfläche zwischen LidA und den Rab-Proteinen beobachtet werden⁽¹²²⁾. Trotz der Position des AMP-Restes innerhalb der Bindungsfläche im Bereich der α -Helices 4 und 5 kann der AMP-Rest die Interaktion nur partiell stören und bewirkt lediglich eine verminderte Affinität. Aufgrund dieser hohen Affinitäten war eine Bestimmung der Affinität von LidA durch Stefan Schoebel und Adam Cichy lediglich für adenyliertes und unmodifiziertes Rab6 möglich, wobei eine etwa um den Faktor 100 verschlechterte Bindung an LidA durch die Adenylierung

gemessen wurde. Selbst für adenyliertes Rab6 wurde dabei jedoch eine Bindungsaffinität von 4.8 nM bestimmt ⁽¹²²⁾.

Abbildung 5-5: Modellierter Bindung von Rab1-AMP und dem Effektor LidA. Theoretischer Komplex aus Rab1-AMP (PDB Zugangsnummer 3NKV) und LidA modelliert aus der Komplexstruktur von LidA mit Rab8 (PDB Zugangsnummer 3SFV). Rab1-AMP und LidA sind jeweils in der Bänderdarstellung (Rab1-AMP: grau, *switch I* – rot, *switch II* – blau; LidA: orange) mit dem modifizierten Y77 und AMP sowie dem gebundenen Nukleotid GppNHp in der Stab-Darstellung gezeigt (Kohlenstoff – grün, Sauerstoff – rot, Stickstoff – blau, Phosphor – orange). Die Darstellung von Molekülstrukturen erfolgte mittels PyMol 1.4 ⁽¹²⁹⁾.



Die modellierte Komplexstruktur zwischen GDI und Rab1-AMP schließlich zeigt wiederum eine sterische Hinderung im Bereich der α -Helix 11 von GDI und bedingt somit die verminderte Bindung an Rab1-AMP. Da die Untersuchungen zur Bindung von Rab1 und Rab1-AMP an GDI lediglich mit farnesylierten Rab-Proteinen durchgeführt wurden ⁽⁴⁸⁾ wäre es sehr interessant zu testen, ob die Modifizierung ähnlich starke Auswirkungen auch auf geranylgeranylierte Rab-Proteine und deren Bindung an GDI besitzt.

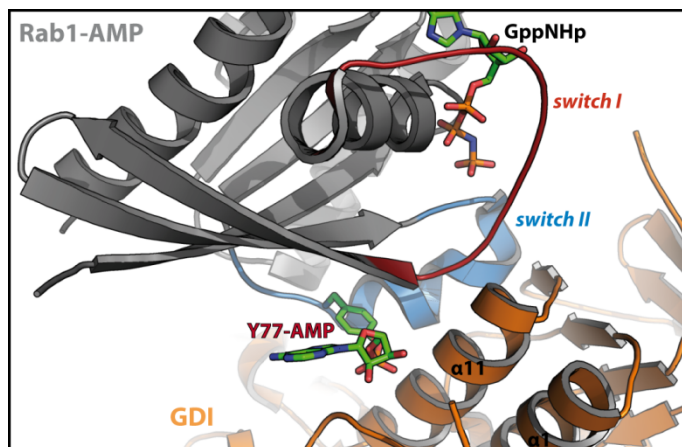


Abbildung 5-6: Modellierter Bindung von Rab1-AMP und GDI. Theoretischer Komplex aus Rab1-AMP (PDB Zugangsnummer 3NKV) und GDI modelliert aus der Komplexstruktur von GDI mit Ypt1 (PDB Zugangsnummer 2BCG). Rab1-AMP und GDI sind jeweils in der Bänderdarstellung (Rab1-AMP: grau, *switch I* – rot, *switch II* – blau; GDI: orange) mit dem modifizierten Y77 und AMP sowie dem gebundenen Nukleotid GppNHp in der Stab-Darstellung gezeigt (Kohlenstoff – grün, Sauerstoff – rot, Stickstoff – blau, Phosphor – orange). Die Darstellung von Molekülstrukturen erfolgte mittels PyMol 1.4 ⁽¹²⁹⁾.

5.4 Ausblick

Innerhalb dieser Arbeit wurde die Adenylylierung von Rab1 als posttranslationale Modifikation katalysiert durch das Legionellenprotein DrrA untersucht. Weiterhin wurden die Auswirkungen der Modifizierung auf unterschiedliche Interaktionen von Rab1 mit diversen regulatorischen Proteinen analysiert. Da diese Untersuchungen bisher ausschließlich *in vitro* durchgeführt wurden, sollten weitere Experimente insbesondere die Funktion der Adenylylierung durch DrrA *in vivo* während der Legionelleninfektion betrachten. Ob und inwieweit die in dieser Arbeit untersuchten Effekte während der Infektion tatsächlich von Bedeutung sind ist bisher nicht erwiesen. Weiterhin ist bekannt, dass Legionellen neben den bisher untersuchten Proteinen eine Vielzahl weiterer Faktoren in Wirtszellen injizieren⁽¹⁰⁹⁾, welche auch im Kontext der Adenylylierung weitere faszinierende Funktionen besitzen könnten. Insgesamt könnten *in vivo* Untersuchungen der Adenylylierung weitere Einblicke in die Funktion und bisher nicht untersuchte Effekte der Modifizierung offenbaren.

Weiterhin sind bisher weder der genaue Katalysemechanismus von DrrA noch von SidD aufgeklärt worden. Strukturelle Untersuchungen beider Proteine im Komplex mit ihren Substraten oder Substratanaloga wie beispielsweise den durch Dr. Christian Hedberg (MPI für molekulare Physiologie, Dortmund) hergestellten adenylylierten Peptiden⁽¹⁸³⁾ sollten unternommen werden, um auch hier weitere Einblicke zu erlangen.

Neben der Adenylylierung wurde während der Zeit dieser Dissertation auch die Phosphocholinierung als posttranslationale Modifikationen von Rab1 (und anderen Rab-Proteinen) katalysiert durch das Legionellenprotein AnkX beschrieben^(124,127). In der Vergangenheit konnte zudem gezeigt werden, dass die Adenylylierung kleiner GTPasen auch von anderen bakteriellen Pathogenen genutzt wird. Insbesondere die Proteine VopS aus *Vibrio parahaemolyticus* und IbpA aus *Histophilus somni* wurden dabei genauer charakterisiert^(139,140). Diese Fic-Domänen enthaltenden Enzyme katalysieren die Adenylylierung eines Threonin-Restes (VopS) bzw. eines Tyrosin-Restes (IbpA) im *switch I* von Rho-GTPasen und dies führt analog zu Rab1 zu einer eingeschränkten Bindung von Effektorproteinen (vergleiche Kapitel 1.2.1.1.2). Auch menschliche Zellen besitzen ein Fic-Domänen enthaltendes Enzym mit dem Namen HYPE, welches *in vitro* Adenylylierungsaktivität gegenüber Rho-GTPasen zeigt⁽¹⁴⁰⁾. Insgesamt deuten diese Ergebnisse an, dass die Adenylylierung (sowie weitere bisher unbekannt posttranslationale Modifizierungen) von Rab-Proteinen auch in menschlichen Zellen eine physiologische Funktion besitzen bzw. von vielen weiteren Pathogenen als Virulenzfaktoren genutzt werden könnten. Da die Sequenz von Proteinen keine zuverlässige Vorhersage der Anwesenheit von DNA-Polymerase β

ähnlichen Nukleotidyltransferasedomänen erlaubt⁽¹²⁷⁾ könnten auch weitere Proteine mit solchen Domänen und bislang unbekanntem physiologischen Funktionen existieren. Die Generierung von Antikörpern gegen adenylierte Proteine in Kooperation mit Dr. Christian Hedberg (Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie, Dortmund) könnte daher ein wichtiges Werkzeug zur möglichen Detektion physiologischer sowie pathologischer Adenylierungsprozesse darstellen⁽¹⁸³⁾. Auch die Identifizierung weiterer Rab-Proteine als Substrate posttranslationaler Modifikationen könnte durch eine Kombination der Verwendung dieser Antikörper und weiterer Untersuchungen des Rab-Proteoms (in An- und Abwesenheit von Virulenzfaktoren) Aufschlüsse über bisher unentdeckte Modifizierungen liefern. Neben den bekannten posttranslationalen Modifizierungen von Rab-Proteinen (Geranylgeranylierung, Carboxymethylierung, Phosphorylierung und Seronylierung⁽¹⁹⁵⁻²⁰¹⁾) sind weitere potentielle posttranslationale Modifizierungen ein interessantes zukünftiges Forschungsfeld, welche das Verständnis der Funktion und Regulation von Rab-Proteinen (und anderen Mitgliedern der Superfamilie Ras-ähnlicher kleiner GTPasen) weiter vertiefen können. Aufgrund der in dieser Arbeit gezeigten Auswirkungen der Adenylierung auf Funktion und Wechselwirkung von Rab1 mit unterschiedlichen Interaktionspartnern könnten posttranslationale Modifikationen eine weitere Ebene der Regulation kleiner GTPasen darstellen, die bisher weitgehend unbekannt ist.

6 LITERATURVERZEICHNIS

1. Alberts, B. (2002) *Molecular biology of the cell*, 4. ed., Garland Science, New York, NY
2. Katz, L. A. (2012) Origin and diversification of eukaryotes. *Annu Rev Microbiol* **66**, 411-427
3. Lode, T. (2012) For quite a few chromosomes more: the origin of eukaryotes. *J Mol Biol* **423**, 135-142
4. Kleinig, H., Sitte, P., and Maier, U. (1999) *Zellbiologie*, 4. Aufl. / neubearb. von Hans Kleinig und Uwe Maier ed., Fischer, Stuttgart u.a.
5. Berg, J. M., Tymoczko, J. L., and Stryer, L. (2007) *Biochemistry*, 6. ed., Freeman, New York
6. Hutagalung, A. H., and Novick, P. J. (2011) Role of Rab GTPases in membrane traffic and cell physiology. *Physiol Rev* **91**, 119-149
7. Stenmark, H. (2009) Rab GTPases as coordinators of vesicle traffic. *Nat Rev Mol Cell Biol* **10**, 513-525
8. Zerial, M., and McBride, H. (2001) Rab proteins as membrane organizers. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**, 107-117
9. Segev, N. (2011) GTPases in intracellular trafficking: an overview. *Semin Cell Dev Biol* **22**, 1-2
10. Takai, Y., Sasaki, T., and Matozaki, T. (2001) Small GTP-binding proteins. *Physiol Rev* **81**, 153-208
11. Hurley, J. B., Simon, M. I., et al. (1984) Homologies between signal transducing G proteins and ras gene products. *Science* **226**, 860-862
12. Chiu, V. K., Bivona, T., et al. (2002) Ras signalling on the endoplasmic reticulum and the Golgi. *Nat Cell Biol* **4**, 343-350
13. Burridge, K., and Wennerberg, K. (2004) Rho and Rac take center stage. *Cell* **116**, 167-179
14. Wennerberg, K., and Der, C. J. (2004) Rho-family GTPases: it's not only Rac and Rho (and I like it). *J Cell Sci* **117**, 1301-1312
15. Gorlich, D., Pante, N., et al. (1996) Identification of different roles for RanGDP and RanGTP in nuclear protein import. *EMBO J* **15**, 5584-5594
16. Weis, K. (2003) Regulating access to the genome: nucleocytoplasmic transport throughout the cell cycle. *Cell* **112**, 441-451
17. Weis, K. (2002) Nucleocytoplasmic transport: cargo trafficking across the border. *Curr Opin Cell Biol* **14**, 328-335
18. Haucke, V. (2003) Vesicle budding: a coat for the COPs. *Trends Cell Biol* **13**, 59-60

19. Randazzo, P. A., Nie, Z., Miura, K., and Hsu, V. W. (2000) Molecular aspects of the cellular activities of ADP-ribosylation factors. *Sci STKE* **2000**, re1-
20. Bos, J. L., Rehmann, H., and Wittinghofer, A. (2007) GEFs and GAPs: critical elements in the control of small G proteins. *Cell* **129**, 865-877
21. Colicelli, J. (2004) Human RAS superfamily proteins and related GTPases. *Sci STKE* **2004**, RE13
22. Esters, H., Alexandrov, K., et al. (2000) High-resolution crystal structure of *S. cerevisiae* Ypt51(DeltaC15)-GppNHp, a small GTP-binding protein involved in regulation of endocytosis. *J Mol Biol* **298**, 111-121
23. Huber, S. K., and Scheidig, A. J. (2005) High resolution crystal structures of human Rab4a in its active and inactive conformations. *FEBS Lett* **579**, 2821-2829
24. Rensland, H., Lautwein, A., Wittinghofer, A., and Goody, R. S. (1991) Is there a rate-limiting step before GTP cleavage by H-ras p21? *Biochemistry* **30**, 11181-11185
25. Simon, I., Zerial, M., and Goody, R. S. (1996) Kinetics of interaction of Rab5 and Rab7 with nucleotides and magnesium ions. *J Biol Chem* **271**, 20470-20478
26. Barr, F., and Lambright, D. G. (2010) Rab GEFs and GAPs. *Curr Opin Cell Biol* **22**, 461-470
27. Itzen, A., and Goody, R. S. (2011) GTPases involved in vesicular trafficking: structures and mechanisms. *Semin Cell Dev Biol* **22**, 48-56
28. Traut, T. W. (1994) Physiological concentrations of purines and pyrimidines. *Mol Cell Biochem* **140**, 1-22
29. Novick, P., Field, C., and Schekman, R. (1980) Identification of 23 complementation groups required for post-translational events in the yeast secretory pathway. *Cell* **21**, 205-215
30. Walworth, N. C., Goud, B., Kabcenell, A. K., and Novick, P. J. (1989) Mutational analysis of SEC4 suggests a cyclical mechanism for the regulation of vesicular traffic. *EMBO J* **8**, 1685-1693
31. Salminen, A., and Novick, P. J. (1987) A ras-like protein is required for a post-Golgi event in yeast secretion. *Cell* **49**, 527-538
32. Schmitt, H. D., Wagner, P., Pfaff, E., and Gallwitz, D. (1986) The ras-related YPT1 gene product in yeast: a GTP-binding protein that might be involved in microtubule organization. *Cell* **47**, 401-412
33. Touchot, N., Chardin, P., and Tavitian, A. (1987) Four additional members of the ras gene superfamily isolated by an oligonucleotide strategy: molecular cloning of YPT-related cDNAs from a rat brain library. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**, 8210-8214

34. Pereira-Leal, J. B., and Seabra, M. C. (2001) Evolution of the Rab family of small GTP-binding proteins. *J Mol Biol* **313**, 889-901
35. Pereira-Leal, J. B., and Seabra, M. C. (2000) The mammalian Rab family of small GTPases: definition of family and subfamily sequence motifs suggests a mechanism for functional specificity in the Ras superfamily. *J Mol Biol* **301**, 1077-1087
36. Lazar, T., Gotte, M., and Gallwitz, D. (1997) Vesicular transport: how many Ypt/Rab-GTPases make a eukaryotic cell? *Trends Biochem Sci* **22**, 468-472
37. Khosravi-Far, R., Lutz, R. J., et al. (1991) Isoprenoid modification of Rab proteins terminating in CC or CXC motifs. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 6264-6268
38. Kinsella, B. T., and Maltese, W. A. (1992) Rab GTP-binding proteins with three different carboxyl-terminal cysteine motifs are modified in vivo by 20-carbon isoprenoids. *J Biol Chem* **267**, 3940-3945
39. Alexandrov, K., Simon, I., et al. (1999) Characterization of the ternary complex between Rab7, REP-1 and Rab geranylgeranyl transferase. *Eur J Biochem* **265**, 160-170
40. Alory, C., and Balch, W. E. (2000) Molecular basis for Rab prenylation. *J Cell Biol* **150**, 89-103
41. Anant, J. S., Desnoyers, L., et al. (1998) Mechanism of Rab geranylgeranylation: formation of the catalytic ternary complex. *Biochemistry* **37**, 12559-12568
42. Soldati, T., Shapiro, A. D., Svejstrup, A. B., and Pfeffer, S. R. (1994) Membrane targeting of the small GTPase Rab9 is accompanied by nucleotide exchange. *Nature* **369**, 76-78
43. Ullrich, O., Horiuchi, H., Bucci, C., and Zerial, M. (1994) Membrane association of Rab5 mediated by GDP-dissociation inhibitor and accompanied by GDP/GTP exchange. *Nature* **368**, 157-160
44. Martincic, I., Peralta, M. E., and Ngsee, J. K. (1997) Isolation and characterization of a dual prenylated Rab and VAMP2 receptor. *J Biol Chem* **272**, 26991-26998
45. Schoebel, S., Oesterlin, L. K., et al. (2009) RabGDI displacement by DrrA from Legionella is a consequence of its guanine nucleotide exchange activity. *Mol Cell* **36**, 1060-1072
46. Wu, Y. W., Oesterlin, L. K., et al. (2010) Membrane targeting mechanism of Rab GTPases elucidated by semisynthetic protein probes. *Nat Chem Biol* **6**, 534-540
47. Regazzi, R., Kikuchi, A., Takai, Y., and Wollheim, C. B. (1992) The small GTP-binding proteins in the cytosol of insulin-secreting cells are complexed to GDP dissociation inhibitor proteins. *J Biol Chem* **267**, 17512-17519

48. Oesterlin, L. K., Goody, R. S., and Itzen, A. (2012) Posttranslational modifications of Rab proteins cause effective displacement of GDP dissociation inhibitor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**, 5621-5626
49. Mizuno-Yamasaki, E., Rivera-Molina, F., and Novick, P. (2012) GTPase networks in membrane traffic. *Annu Rev Biochem* **81**, 637-659
50. Nottingham, R. M., and Pfeffer, S. R. (2009) Defining the boundaries: Rab GEFs and GAPs. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 14185-14186
51. Wang, W., and Ferro-Novick, S. (2002) A Ypt32p exchange factor is a putative effector of Ypt1p. *Mol Biol Cell* **13**, 3336-3343
52. Mizuno-Yamasaki, E., Medkova, M., Coleman, J., and Novick, P. (2010) Phosphatidylinositol 4-phosphate controls both membrane recruitment and a regulatory switch of the Rab GEF Sec2p. *Dev Cell* **18**, 828-840
53. Rivera-Molina, F. E., and Novick, P. J. (2009) A Rab GAP cascade defines the boundary between two Rab GTPases on the secretory pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 14408-14413
54. Plutner, H., Cox, A. D., et al. (1991) Rab1b regulates vesicular transport between the endoplasmic reticulum and successive Golgi compartments. *J Cell Biol* **115**, 31-43
55. Sclafani, A., Chen, S., et al. (2010) Establishing a role for the GTPase Ypt1p at the late Golgi. *Traffic* **11**, 520-532
56. Tisdale, E. J., Bourne, J. R., et al. (1992) GTP-binding mutants of Rab1 and Rab2 are potent inhibitors of vesicular transport from the endoplasmic reticulum to the Golgi complex. *J Cell Biol* **119**, 749-761
57. Nuoffer, C., Davidson, H. W., et al. (1994) A GDP-bound of Rab1 inhibits protein export from the endoplasmic reticulum and transport between Golgi compartments. *J Cell Biol* **125**, 225-237
58. Jones, S., Newman, C., Liu, F., and Segev, N. (2000) The TRAPP complex is a nucleotide exchanger for Ypt1 and Ypt31/32. *Mol Biol Cell* **11**, 4403-4411
59. Sacher, M., Jiang, Y., et al. (1998) TRAPP, a highly conserved novel complex on the cis-Golgi that mediates vesicle docking and fusion. *EMBO J* **17**, 2494-2503
60. Wang, W., Sacher, M., and Ferro-Novick, S. (2000) TRAPP stimulates guanine nucleotide exchange on Ypt1p. *J Cell Biol* **151**, 289-296
61. Yamasaki, A., Menon, S., et al. (2009) mTrs130 is a component of a mammalian TRAPP-II complex, a Rab1 GEF that binds to COPI-coated vesicles. *Mol Biol Cell* **20**, 4205-4215

62. Fischer, J., Weide, T., and Barnekow, A. (2005) The MICAL proteins and Rab1: a possible link to the cytoskeleton? *Biochem Biophys Res Commun* **328**, 415-423
63. Allan, B. B., Moyer, B. D., and Balch, W. E. (2000) Rab1 recruitment of p115 into a cis-SNARE complex: programming budding COPII vesicles for fusion. *Science* **289**, 444-448
64. Beard, M., Satoh, A., Shorter, J., and Warren, G. (2005) A cryptic Rab1-binding site in the p115 tethering protein. *J Biol Chem* **280**, 25840-25848
65. Moyer, B. D., Allan, B. B., and Balch, W. E. (2001) Rab1 interaction with a GM130 effector complex regulates COPII vesicle cis-Golgi tethering. *Traffic* **2**, 268-276
66. Barnekow, A., Thyrock, A., and Kessler, D. (2009) Chapter 5: Rab proteins and their interaction partners. *Int Rev Cell Mol Biol* **274**, 235-274
67. Du, L. L., and Novick, P. (2001) Yeast Rab GTPase-activating protein Gyp1p localizes to the Golgi apparatus and is a negative regulator of Ypt1p. *Mol Biol Cell* **12**, 1215-1226
68. Sklan, E. H., Serrano, R. L., et al. (2007) TBC1D20 is a Rab1 GTPase-activating protein that mediates hepatitis C virus replication. *J Biol Chem* **282**, 36354-36361
69. Stein, M. P., Muller, M. P., and Wandinger-Ness, A. (2012) Bacterial Pathogens Commandeer Rab GTPases to Establish Intracellular Niches. *Traffic* (im Druck). DOI: 10.1111/tra.12000
70. Vetter, I. R., and Wittinghofer, A. (2001) The guanine nucleotide-binding switch in three dimensions. *Science* **294**, 1299-1304
71. Wittinghofer, A., and Vetter, I. R. (2011) Structure-function relationships of the G domain, a canonical switch motif. *Annu Rev Biochem* **80**, 943-971
72. Milburn, M. V., Tong, L., et al. (1990) Molecular switch for signal transduction: structural differences between active and inactive forms of protooncogenic Ras proteins. *Science* **247**, 939-945
73. Schlichting, I., Almo, S. C., et al. (1990) Time-resolved X-ray crystallographic study of the conformational change in Ha-Ras p21 protein on GTP hydrolysis. *Nature* **345**, 309-315
74. Pai, E. F., Kabsch, W., et al. (1989) Structure of the guanine-nucleotide-binding domain of the Ha-ras oncogene product p21 in the triphosphate conformation. *Nature* **341**, 209-214
75. Pai, E. F., Krengel, U., et al. (1990) Refined crystal structure of the triphosphate conformation of H-Ras p21 at 1.35 Å resolution: implications for the mechanism of GTP hydrolysis. *EMBO J* **9**, 2351-2359

-
76. Farrar, C. T., Halkides, C. J., and Singel, D. J. (1997) The frozen solution structure of p21 Ras determined by ESEEM spectroscopy reveals weak coordination of Thr35 to the active site metal ion. *Structure* **5**, 1055-1066
 77. Ito, Y., Yamasaki, K., et al. (1997) Regional polysterism in the GTP-bound form of the human c-Ha-Ras protein. *Biochemistry* **36**, 9109-9119
 78. Herrmann, C., Martin, G. A., and Wittinghofer, A. (1995) Quantitative analysis of the complex between p21ras and the Ras-binding domain of the human Raf-1 protein kinase. *J Biol Chem* **270**, 2901-2905
 79. Nassar, N., Horn, G., et al. (1995) The 2.2 Å crystal structure of the Ras-binding domain of the serine/threonine kinase c-Raf1 in complex with Rap1A and a GTP analogue. *Nature* **375**, 554-560
 80. Constantinescu, A. T., Rak, A., et al. (2002) Rab-subfamily-specific regions of Ypt7p are structurally different from other RabGTPases. *Structure* **10**, 569-579
 81. Bourne, H. R., Sanders, D. A., and McCormick, F. (1991) The GTPase superfamily: conserved structure and molecular mechanism. *Nature* **349**, 117-127
 82. Walker, J. E., Saraste, M., Runswick, M. J., and Gay, N. J. (1982) Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *EMBO J* **1**, 945-951
 83. Cherfils, J., and Zeghouf, M. (2011) Chronicles of the GTPase switch. *Nat Chem Biol* **7**, 493-495
 84. Prive, G. G., Milburn, M. V., et al. (1992) X-ray crystal structures of transforming p21 ras mutants suggest a transition-state stabilization mechanism for GTP hydrolysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 3649-3653
 85. Rensland, H., John, J., et al. (1995) 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
 86. Stein, M., Pilli, M., et al. (2012) The interaction properties of the human Rab GTPase family - comparative analysis reveals determinants of molecular binding selectivity. *PLoS One* **7**, e34870
 87. Kloepper, T., Kienle, N., Fasshauer, D., and Munro, S. (2012) Untangling the evolution of Rab G-proteins: implications of a comprehensive genomic analysis. *BMC Biol* **10**, 71
 88. Stenmark, H. (2012) The Rabs: A family at the root of metazoan evolution. *BMC Biol* **10**, 68
 89. Rittinger, K., Walker, P. A., et al. (1997) Structure at 1.65 Å of RhoA and its GTPase-activating protein in complex with a transition-state analogue. *Nature* **389**, 758-762

90. Scheffzek, K., Ahmadian, M. R., et al. (1997) The Ras-RasGAP complex: structural basis for GTPase activation and its loss in oncogenic Ras mutants. *Science* **277**, 333-338
91. Pan, X., Eathiraj, S., Munson, M., and Lambright, D. G. (2006) TBC-domain GAPs for Rab GTPases accelerate GTP hydrolysis by a dual-finger mechanism. *Nature* **442**, 303-306
92. Menetrey, J., Perderiset, M., et al. (2007) Structural basis for ARF1-mediated recruitment of ARHGAP21 to Golgi membranes. *EMBO J* **26**, 1953-1962
93. Newman, C. M., Giannakouros, T., et al. (1992) Post-translational processing of *Schizosaccharomyces pombe* YPT proteins. *J Biol Chem* **267**, 11329-11336
94. Chavrier, P., Gorvel, J. P., et al. (1991) Hypervariable C-terminal domain of Rab proteins acts as a targeting signal. *Nature* **353**, 769-772
95. Ali, B. R., Wasmeier, C., et al. (2004) Multiple regions contribute to membrane targeting of Rab GTPases. *J Cell Sci* **117**, 6401-6412
96. Casadevall, A. (2008) Evolution of intracellular pathogens. *Annu Rev Microbiol* **62**, 19-33
97. Alix, E., Mukherjee, S., and Roy, C. R. (2011) Subversion of membrane transport pathways by vacuolar pathogens. *J Cell Biol* **195**, 943-952
98. Aktories, K. (2011) Bacterial protein toxins that modify host regulatory GTPases. *Nat Rev Microbiol* **9**, 487-498
99. Fields, B. S. (1996) The molecular ecology of legionellae. *Trends Microbiol* **4**, 286-290
100. Swanson, M. S., and Hammer, B. K. (2000) *Legionella pneumophila* pathogenesis: a fateful journey from amoebae to macrophages. *Annu Rev Microbiol* **54**, 567-613
101. Fraser, D. W., Tsai, T. R., et al. (1977) Legionnaires' disease: description of an epidemic of pneumonia. *N Engl J Med* **297**, 1189-1197
102. McDade, J. E., Shepard, C. C., et al. (1977) Legionnaires' disease: isolation of a bacterium and demonstration of its role in other respiratory disease. *N Engl J Med* **297**, 1197-1203
103. Albert-Weissenberger, C., Cazalet, C., and Buchrieser, C. (2007) *Legionella pneumophila* - a human pathogen that co-evolved with fresh water protozoa. *Cell Mol Life Sci* **64**, 432-448
104. Fraser, D. W. (1986) The Peculiarities of "Legionella". *Proc Am Philos Soc* **130**, 330-335
105. Isberg, R. R., O'Connor, T. J., and Heidtman, M. (2009) The *Legionella pneumophila* replication vacuole: making a cosy niche inside host cells. *Nat Rev Microbiol* **7**, 13-24
106. Horwitz, M. A. (1983) The Legionnaires' disease bacterium (*Legionella pneumophila*) inhibits phagosome-lysosome fusion in human monocytes. *J Exp Med* **158**, 2108-2126

107. Horwitz, M. A. (1983) Formation of a novel phagosome by the Legionnaires' disease bacterium (*Legionella pneumophila*) in human monocytes. *J Exp Med* **158**, 1319-1331
108. Heidtman, M., Chen, E. J., Moy, M. Y., and Isberg, R. R. (2009) Large-scale identification of *Legionella pneumophila* Dot/Icm substrates that modulate host cell vesicle trafficking pathways. *Cell Microbiol* **11**, 230-248
109. Hilbi, H., Weber, S., and Finsel, I. (2011) Anchors for effectors: subversion of phosphoinositide lipids by legionella. *Front Microbiol* **2**, 91
110. Shevchuk, O., Batzilla, C., et al. (2009) Proteomic analysis of Legionella-containing phagosomes isolated from Dictyostelium. *Int J Med Microbiol* **299**, 489-508
111. Urwyler, S., Nyfeler, Y., et al. (2009) Proteome analysis of Legionella vacuoles purified by magnetic immunoseparation reveals secretory and endosomal GTPases. *Traffic* **10**, 76-87
112. Hilbi, H., and Haas, A. (2012) Secretive bacterial pathogens and the secretory pathway. *Traffic* **13**, 1187-1197
113. Machner, M. P., and Isberg, R. R. (2007) A bifunctional bacterial protein links GDI displacement to Rab1 activation. *Science* **318**, 974-977
114. Murata, T., Delprato, A., et al. (2006) The *Legionella pneumophila* effector protein DrrA is a Rab1 guanine nucleotide-exchange factor. *Nat Cell Biol* **8**, 971-977
115. Ingmundson, A., Delprato, A., Lambright, D. G., and Roy, C. R. (2007) *Legionella pneumophila* proteins that regulate Rab1 membrane cycling. *Nature* **450**, 365-369
116. Machner, M. P., and Isberg, R. R. (2006) Targeting of host Rab GTPase function by the intravacuolar pathogen *Legionella pneumophila*. *Dev Cell* **11**, 47-56
117. Schoebel, S., Blankenfeldt, W., Goody, R. S., and Itzen, A. (2010) High-affinity binding of phosphatidylinositol 4-phosphate by *Legionella pneumophila* DrrA. *EMBO Rep* **11**, 598-604
118. Brombacher, E., Urwyler, S., et al. (2009) Rab1 guanine nucleotide exchange factor SidM is a major phosphatidylinositol 4-phosphate-binding effector protein of *Legionella pneumophila*. *J Biol Chem* **284**, 4846-4856
119. Goody, R. S., Muller, M. P., et al. (2011) The versatile Legionella effector protein DrrA. *Commun Integr Biol* **4**, 72-74
120. Conover, G. M., Derre, I., Vogel, J. P., and Isberg, R. R. (2003) The *Legionella pneumophila* LidA protein: a translocated substrate of the Dot/Icm system associated with maintenance of bacterial integrity. *Mol Microbiol* **48**, 305-321

121. Derre, I., and Isberg, R. R. (2005) LidA, a translocated substrate of the *Legionella pneumophila* type IV secretion system, interferes with the early secretory pathway. *Infect Immun* **73**, 4370-4380
122. Schoebel, S., Cichy, A. L., Goody, R. S., and Itzen, A. (2011) Protein LidA from *Legionella* is a Rab GTPase supereffector. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 17945-17950
123. Cheng, W., Yin, K., et al. (2012) Structural insights into a unique *Legionella pneumophila* effector LidA recognizing both GDP and GTP bound Rab1 in their active state. *PLoS Pathog* **8**, e1002528
124. Mukherjee, S., Liu, X., et al. (2011) Modulation of Rab GTPase function by a protein phosphocholine transferase. *Nature* **477**, 103-106
125. Goody, P. R., Heller, K., et al. (2012) Reversible phosphocholination of Rab proteins by *Legionella pneumophila* effector proteins. *EMBO J* **31**, 1774-1784
126. Tan, Y., Arnold, R. J., and Luo, Z. Q. (2011) *Legionella pneumophila* regulates the small GTPase Rab1 activity by reversible phosphorylcholine. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 21212-21217
127. Muller, M. P., Peters, H., et al. (2010) The *Legionella* effector protein DrrA AMPylates the membrane traffic regulator Rab1b. *Science* **329**, 946-949
128. Xu, Y., Zhang, R., et al. (2004) Structure of the N-terminal domain of *Escherichia coli* glutamine synthetase adenylyltransferase. *Structure* **12**, 861-869
129. Schrodinger, LLC. (2010) The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.3r1.
130. Aravind, L., and Koonin, E. V. (1999) DNA polymerase beta-like nucleotidyltransferase superfamily: identification of three new families, classification and evolutionary history. *Nucleic Acids Res* **27**, 1609-1618
131. Ibba, M., and Soll, D. (2000) Aminoacyl-tRNA synthesis. *Annu Rev Biochem* **69**, 617-650
132. Lehman, I. R. (1974) DNA ligase: structure, mechanism, and function. *Science* **186**, 790-797
133. Kuchta, K., Knizewski, L., et al. (2009) Comprehensive classification of nucleotidyltransferase fold proteins: identification of novel families and their representatives in human. *Nucleic Acids Res* **37**, 7701-7714
134. Eckmann, C. R., Rammelt, C., and Wahle, E. (2011) Control of poly(A) tail length. *Wiley Interdiscip Rev RNA* **2**, 348-361
135. Stadtman, E. R. (2001) The story of glutamine synthetase regulation. *J Biol Chem* **276**, 44357-44364

-
136. Kingdon, H. S., Shapiro, B. M., and Stadtman, E. R. (1967) Regulation of glutamine synthetase. 8. ATP: glutamine synthetase adenylyltransferase, an enzyme that catalyzes alterations in the regulatory properties of glutamine synthetase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **58**, 1703-1710
 137. Shapiro, B. M., Kingdon, H. S., and Stadtman, E. R. (1967) Regulation of glutamine synthetase. VII. Adenylyl glutamine synthetase: a new form of the enzyme with altered regulatory and kinetic properties. *Proc Natl Acad Sci U S A* **58**, 642-649
 138. Pedersen, L. C., Benning, M. M., and Holden, H. M. (1995) Structural investigation of the antibiotic and ATP-binding sites in kanamycin nucleotidyltransferase. *Biochemistry* **34**, 13305-13311
 139. Yarbrough, M. L., Li, Y., et al. (2009) AMPylation of Rho GTPases by *Vibrio* VopS disrupts effector binding and downstream signaling. *Science* **323**, 269-272
 140. Worby, C. A., Mattoo, S., et al. (2009) The fic domain: regulation of cell signaling by adenylylation. *Mol Cell* **34**, 93-103
 141. Woolery, A. R., Luong, P., Broberg, C. A., and Orth, K. (2010) AMPylation: Something Old is New Again. *Front Microbiol* **1**, 113
 142. Pelletier, H., Sawaya, M. R., et al. (1994) Structures of ternary complexes of rat DNA polymerase beta, a DNA template-primer, and ddCTP. *Science* **264**, 1891-1903
 143. Walsh, C. T., Garneau-Tsodikova, S., and Gatto, G. J., Jr. (2005) Protein posttranslational modifications: the chemistry of proteome diversifications. *Angew Chem Int Ed Engl* **44**, 7342-7372
 144. Ribet, D., and Cossart, P. (2010) Pathogen-mediated posttranslational modifications: A re-emerging field. *Cell* **143**, 694-702
 145. Ribet, D., and Cossart, P. (2010) Post-translational modifications in host cells during bacterial infection. *FEBS Lett* **584**, 2748-2758
 146. Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A. R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**, 5463-5467
 147. Van Duyne, G. D., Standaert, R. F., et al. (1993) Atomic structures of the human immunophilin FKBP-12 complexes with FK506 and rapamycin. *J Mol Biol* **229**, 105-124
 148. Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685
 149. Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248-254

-
150. Gill, S. C., and von Hippel, P. H. (1989) Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. *Anal Biochem* **182**, 319-326
 151. Zhang, Z., and Marshall, A. G. (1998) A universal algorithm for fast and automated charge state deconvolution of electrospray mass-to-charge ratio spectra. *J Am Soc Mass Spectrom* **9**, 225-233
 152. Lobley, A., Whitmore, L., and Wallace, B. A. (2002) DICHROWEB: an interactive website for the analysis of protein secondary structure from circular dichroism spectra. *Bioinformatics* **18**, 211-212
 153. Whitmore, L., and Wallace, B. A. (2004) DICHROWEB, an online server for protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopic data. *Nucleic Acids Res* **32**, W668-673
 154. Whitmore, L., and Wallace, B. A. (2008) Protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopy: methods and reference databases. *Biopolymers* **89**, 392-400
 155. Sreerama, N., and Woody, R. W. (2000) Estimation of protein secondary structure from circular dichroism spectra: comparison of CONTIN, SELCON, and CDSSTR methods with an expanded reference set. *Anal Biochem* **287**, 252-260
 156. Johnson, K. A., Simpson, Z. B., and Blom, T. (2009) Global kinetic explorer: a new computer program for dynamic simulation and fitting of kinetic data. *Anal Biochem* **387**, 20-29
 157. Johnson, K. A., Simpson, Z. B., and Blom, T. (2009) FitSpace explorer: an algorithm to evaluate multidimensional parameter space in fitting kinetic data. *Anal Biochem* **387**, 30-41
 158. Kabsch, W. (1993) Automatic processing of rotation diffraction data from crystals of initially unknown symmetry and cell constants. *J Appl Crystallogr* **26**, 795-800
 159. McCoy, A. J., Grosse-Kunstleve, R. W., et al. (2007) Phaser crystallographic software. *J Appl Crystallogr* **40**, 658-674
 160. Emsley, P., and Cowtan, K. (2004) Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **60**, 2126-2132
 161. Murshudov, G. N., Vagin, A. A., and Dodson, E. J. (1997) Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **53**, 240-255
 162. Adams, P. D., Afonine, P. V., et al. (2010) PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **66**, 213-221
 163. Koch, M. H., Vachette, P., and Svergun, D. I. (2003) Small-angle scattering: a view on the properties, structures and structural changes of biological macromolecules in solution. *Q Rev Biophys* **36**, 147-227

-
164. Putnam, C. D., Hammel, M., Hura, G. L., and Tainer, J. A. (2007) X-ray solution scattering (SAXS) combined with crystallography and computation: defining accurate macromolecular structures, conformations and assemblies in solution. *Q Rev Biophys* **40**, 191-285
 165. Xu, Y., Carr, P. D., Vasudevan, S. G., and Ollis, D. L. (2010) Structure of the adenylylation domain of *E. coli* glutamine synthetase adenylyl transferase: evidence for gene duplication and evolution of a new active site. *J Mol Biol* **396**, 773-784
 166. Wilkins, M. R., Gasteiger, E., et al. (1999) Protein identification and analysis tools in the ExPASy server. *Methods Mol Biol* **112**, 531-552
 167. Chavas, L. M., Torii, S., et al. (2007) Structure of the small GTPase Rab27b shows an unexpected swapped dimer. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **63**, 769-779
 168. Dereeper, A., Guignon, V., et al. (2008) Phylogeny.fr: robust phylogenetic analysis for the non-specialist. *Nucleic Acids Res* **36**, W465-469
 169. Berezin, C., Glaser, F., et al. (2004) ConSeq: the identification of functionally and structurally important residues in protein sequences. *Bioinformatics* **20**, 1322-1324
 170. Ashkenazy, H., Erez, E., et al. (2010) ConSurf 2010: calculating evolutionary conservation in sequence and structure of proteins and nucleic acids. *Nucleic Acids Res* **38**, W529-533
 171. Glaser, F., Pupko, T., et al. (2003) ConSurf: identification of functional regions in proteins by surface-mapping of phylogenetic information. *Bioinformatics* **19**, 163-164
 172. Landau, M., Mayrose, I., et al. (2005) ConSurf 2005: the projection of evolutionary conservation scores of residues on protein structures. *Nucleic Acids Res* **33**, W299-302
 173. Muller, M. P., Shkumatov, A. V., et al. (2012) Characterization of enzymes from *Legionella pneumophila* involved in reversible adenylylation of Rab1. *J Biol Chem*, (im Druck). DOI: 10.1074/jbc.M112.396861
 174. Wittmann, J. G., and Rudolph, M. G. (2004) Crystal structure of Rab9 complexed to GDP reveals a dimer with an active conformation of switch II. *FEBS Lett* **568**, 23-29
 175. Wu, M., Wang, T., et al. (2005) Structural basis for recruitment of RILP by small GTPase Rab7. *EMBO J* **24**, 1491-1501
 176. Holm, L., and Park, J. (2000) DaliLite workbench for protein structure comparison. *Bioinformatics* **16**, 566-567
 177. Derre, I., and Isberg, R. R. (2004) *Legionella pneumophila* replication vacuole formation involves rapid recruitment of proteins of the early secretory system. *Infect Immun* **72**, 3048-3053

-
178. Hubbard, S. J., Campbell, S. F., and Thornton, J. M. (1991) Molecular recognition. Conformational analysis of limited proteolytic sites and serine proteinase protein inhibitors. *J Mol Biol* **220**, 507-530
 179. Sanner, M. F., Olson, A. J., and Spehner, J. C. (1996) Reduced surface: an efficient way to compute molecular surfaces. *Biopolymers* **38**, 305-320
 180. Suh, H. Y., Lee, D. W., et al. (2010) Structural insights into the dual nucleotide exchange and GDI displacement activity of SidM/DrrA. *EMBO J* **29**, 496-504
 181. Zhu, Y., Hu, L., et al. (2010) Structural mechanism of host Rab1 activation by the bifunctional Legionella type IV effector SidM/DrrA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 4699-4704
 182. Goldschmidt, L., Cooper, D. R., Derewenda, Z. S., and Eisenberg, D. (2007) Toward rational protein crystallization: A Web server for the design of crystallizable protein variants. *Protein Sci* **16**, 1569-1576
 183. Smit, C., Blumer, J., et al. (2011) Efficient synthesis and applications of peptides containing adenylylated tyrosine residues. *Angew Chem Int Ed Engl* **50**, 9200-9204
 184. Svergun, D. I., Petoukhov, M. V., and Koch, M. H. (2001) Determination of domain structure of proteins from X-ray solution scattering. *Biophys J* **80**, 2946-2953
 185. Steitz, T. A., Smerdon, S. J., Jager, J., and Joyce, C. M. (1994) A unified polymerase mechanism for nonhomologous DNA and RNA polymerases. *Science* **266**, 2022-2025
 186. Neunuebel, M. R., Chen, Y., et al. (2011) De-AMPylation of the small GTPase Rab1 by the pathogen *Legionella pneumophila*. *Science* **333**, 453-456
 187. Tan, Y., and Luo, Z. Q. (2011) *Legionella pneumophila* SidD is a deAMPyase that modifies Rab1. *Nature* **475**, 506-509
 188. Rigden, D. J. (2011) Identification and modelling of a PPM protein phosphatase fold in the *Legionella pneumophila* deAMPyase SidD. *FEBS Lett* **585**, 2749-2754
 189. Pan, X., Luhrmann, A., et al. (2008) Ankyrin repeat proteins comprise a diverse family of bacterial type IV effectors. *Science* **320**, 1651-1654
 190. Swanson, M. S., and Isberg, R. R. (1995) Association of *Legionella pneumophila* with the macrophage endoplasmic reticulum. *Infect Immun* **63**, 3609-3620
 191. Tilney, L. G., Harb, O. S., et al. (2001) How the parasitic bacterium *Legionella pneumophila* modifies its phagosome and transforms it into rough ER: implications for conversion of plasma membrane to the ER membrane. *J Cell Sci* **114**, 4637-4650

-
192. Arasaki, K., Toomre, D. K., and Roy, C. R. (2012) The *Legionella pneumophila* effector DrrA is sufficient to stimulate SNARE-dependent membrane fusion. *Cell Host Microbe* **11**, 46-57
 193. Rak, A., Pylypenko, O., et al. (2004) Structure of the Rab7:REP-1 complex: insights into the mechanism of Rab prenylation and choroideremia disease. *Cell* **117**, 749-760
 194. Pylypenko, O., Rak, A., et al. (2006) Structure of doubly prenylated Ypt1:GDI complex and the mechanism of GDI-mediated Rab recycling. *EMBO J* **25**, 13-23
 195. Bailly, E., McCaffrey, M., et al. (1991) Phosphorylation of two small GTP-binding proteins of the Rab family by p34cdc2. *Nature* **350**, 715-718
 196. Casey, P. J., and Seabra, M. C. (1996) Protein prenyltransferases. *J Biol Chem* **271**, 5289-5292
 197. Maurer-Stroh, S., Washietl, S., and Eisenhaber, F. (2003) Protein prenyltransferases. *Genome Biol* **4**, 212
 198. Paulmann, N., Grohmann, M., et al. (2009) Intracellular serotonin modulates insulin secretion from pancreatic beta-cells by protein serotonylation. *PLoS Biol* **7**, e1000229
 199. van der Sluijs, P., Hull, M., et al. (1992) Reversible phosphorylation-dephosphorylation determines the localization of Rab4 during the cell cycle. *EMBO J* **11**, 4379-4389
 200. Walther, D. J., Peter, J. U., et al. (2003) Serotonylation of small GTPases is a signal transduction pathway that triggers platelet alpha-granule release. *Cell* **115**, 851-862
 201. Konstantinopoulos, P. A., Karamouzis, M. V., and Papavassiliou, A. G. (2007) Post-translational modifications and regulation of the RAS superfamily of GTPases as anticancer targets. *Nat Rev Drug Discov* **6**, 541-555

7 ANHANG

7.1 Datenstatistik der Röntgenkristallstrukturanalyse

Tabelle 7-1: Datenstatistiken der Rab1b₃₋₁₇₄:GppNHp und SeMet-Mical₁₈₄₁₋₁₉₉₀ Kristalle.

	Rab1b ₃₋₁₇₄ :GppNHp-AMP	SeMet-Mical ₁₈₄₁₋₁₉₉₀ ^[1]
Datensammlung		
Raumgruppe	P2 ₁ (4)	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁ (19)
Zelldimensionen		
a, b, c (Å)	34.97, 100.59, 45.07	51.86, 78.85, 95.56
α, β, γ (°)	90.0, 102.43, 90.0	90.0, 90.0, 90.0
Wellenlänge (Å)	0.9786	
Auflösung (Å)	20.0 – 1.7	47.8 – 2.7
(höchste Schale)	1.8 – 1.7	2.8-2.7
R _{merge} ^[2]	6.4 (35.0)	7.4 (46.4)
I / σ (I)	15.8 (4.5)	16.8 (3.6)
Vollständigkeit (%)	99.8 (100.0)	99.1 (98.5)
Redundanz	4.6 (4.5)	13.3 (13.6)
f' / f''	-	-7.38 / 3.82
Verfeinerung		
Auflösung (Å)	20.0 – 1.7	47.8 – 2.7
(höchste Schale)	(1.74 – 1.70)	(2.77-2.70)
Anzahl der Reflexe	31709	10553
R _{work}	15.6 (19.5)	26.9 (32.5)
R _{free}	19.6 (25.0)	32.3 (38.2)
Anzahl Atome		
Protein	2705	2095
Liganden	136	14
Wasser	245	-
B-Faktoren		
Protein	23	64.2

	Rab1b₃₋₁₇₄:GppNHp-AMP	SeMet-Mical₁₈₄₁₋₁₉₉₀ ^[1]
Liganden	25	64.7
Wasser	29	-
Standardabweichungen		
Bindungslängen (Å)	0.024	0.017
Bindungswinkel (°)	2.049	1.585
PDB Zugangsnummer	3NKV	-

^[1] Datenstatistik für nicht-vereinigte Friedel-Paare.

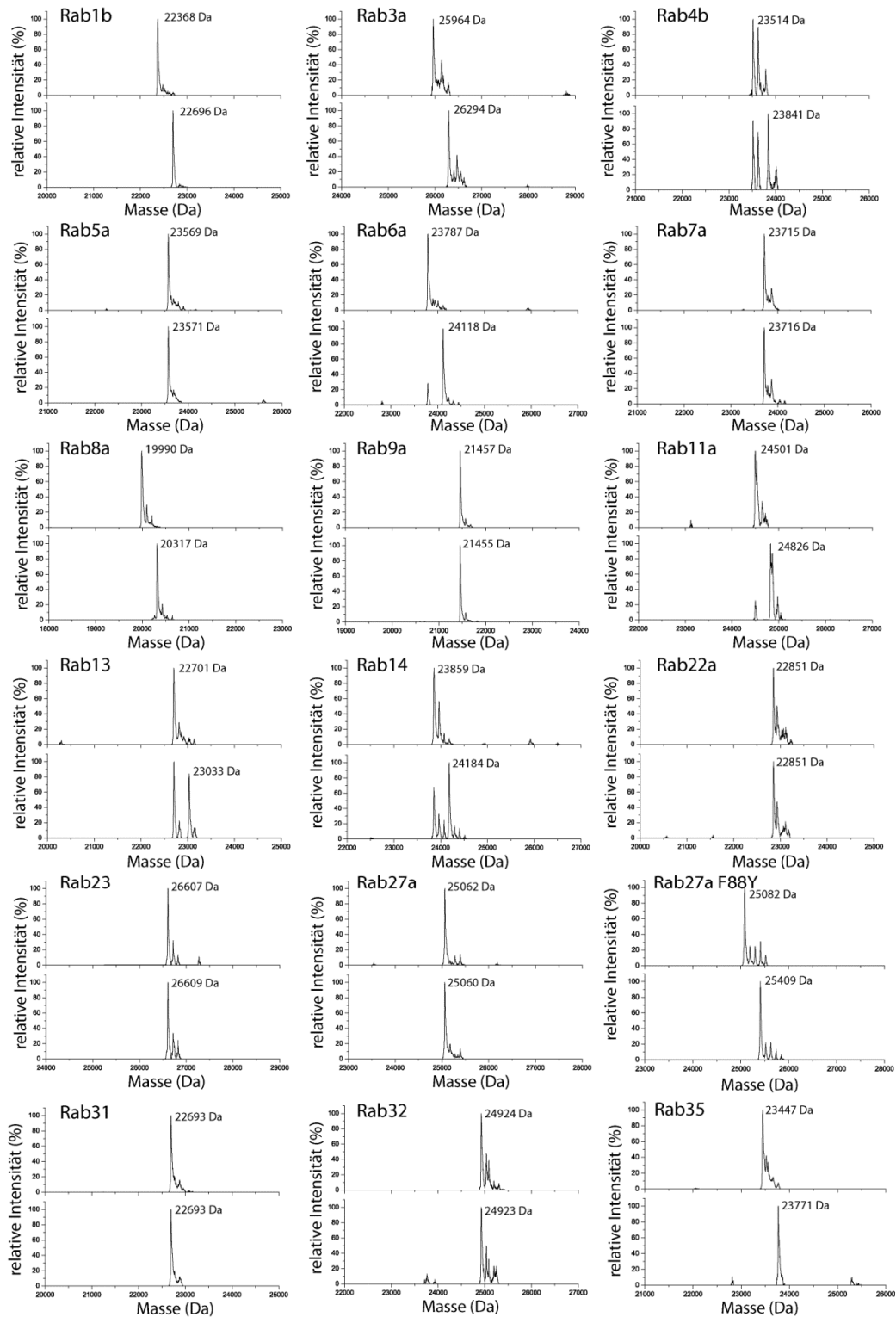
^[2] $R_{\text{merge}} = \frac{\sum(I - \langle I \rangle)}{\sum(I)}$, I und $\langle I \rangle$ sind die beobachteten und mittleren Intensitäten aller Beobachtungen eines Reflexes inklusive seiner Symmetrieverwandten.

^[3] $R_{\text{work}} = \frac{\sum_{hkl} |F_{\text{obs}}| - |F_{\text{calc}}|}{\sum |F_{\text{obs}}|}$, F_{obs} und F_{calc} sind die beobachteten und die berechneten Strukturformfaktoren der hkl Reflexe.

^[4] R_{free} wurde analog zu R_{work} für zufällig gewählte 5% der Reflexe berechnet, die nicht für die Verfeinerung genutzt wurden.

7.2 Massenspektren

7.2.1 Massenspektren zur Analyse der DrrA Spezifität gegenüber Rab-Proteinen



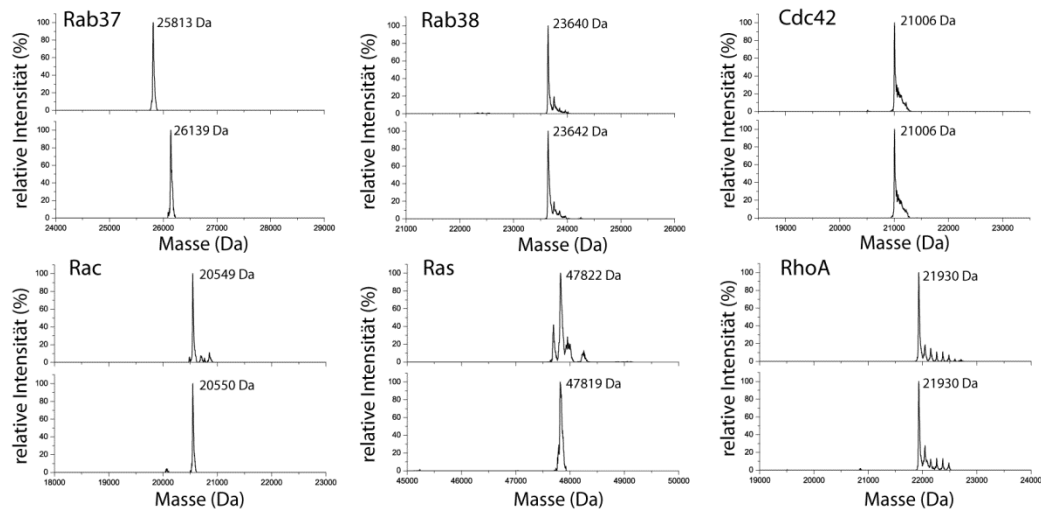


Abbildung 7-1: Massenspektrometrische Analysen kleiner GTPasen zur Bestimmung der Substratspezifität von DrrA. Als Referenz wurden die kleinen GTPasen vor der Inkubation mittels ESI-MS analysiert (oberes Massenspektrum der kleinen GTPasen), das untere Massenspektrum der kleinen GTPasen entspricht dem Spektrum nach Inkubation in Gegenwart von DrrA und ATP (es wurden jeweils 50 μ M der kleinen GTPase in Gegenwart von 20 μ M DrrA und 400 μ M ATP für 2 h bei RT inkubiert und anschließend 10 μ l per ESI-MS analysiert). Die Sequenzen der verwendeten Rab-Proteine Rab3a, Rab5a und Rab23 entsprachen den murinen Varianten, alle anderen waren humane Proteine. Die ermittelten molekularen Massen (Da) sind jeweils angegeben. Gezeigt sind alle Massenspektren für die GDP-gebundenen Varianten der kleinen GTPasen, ausschließlich die Massenspektren für Rab27a F88Y wurden mit dem GppNHp-gebundenen Protein aufgenommen.

Tabelle 7-2: Liste getesteter kleiner GTPasen als Substrate zur Adenylylierung durch DrrA.

Kleine GTPase	GDP gebunden	GppNHp gebunden
Rab1b	+	+
Rab3a	+	nicht getestet
Rab4b	+	nicht getestet
Rab6a	+	+
Rab8a	+	+
Rab11a	+	+
Rab13	+	nicht getestet
Rab14	+	nicht getestet
Rab35	+	+
Rab37	+	nicht getestet
Rab5a	-	-
Rab22a	-	nicht getestet
Rab23	-	nicht getestet
Rab31	-	nicht getestet
Rab32	-	nicht getestet
Rab38	-	nicht getestet
Rab7a	-	nicht getestet
Rab9a	-	nicht getestet
Rab27a	-	-
Rab27a F88Y	-	+
RhoA	-	nicht getestet
Rac	-	nicht getestet
Ras	-	nicht getestet
Cdc42	-	-

7.2.1.1 Vollständiger Sequenzvergleich aller für die Adenylierung getesteter Rab-Proteine

1	-----MNPEYDYLFKLLLLIGDSGVGKSCLLLRFADDTY-TE	35	Rab1b
1	-----MASATDSRYG---QKESSDQNFDFMKILIIIGNSSVGKTSFLFRYADDSF-TP	49	Rab3a
1	-----MAETYDFLFKFLVIGSAGTGKSCLLHQFIENKF-KQ	35	Rab4b
1	-----MS-----TGGDFGNPLRKFKLVLFLGEQSVGKTSLITRFMYDSF-DN	40	Rab6a
1	-----MAKTYDYLFKLLLLIGDSGVGKTCVLFREFSEDAF-NS	35	Rab8a
1	-----MGTRDDEYDYLFKVVLIGDSGVGKSNLLSRFTRNEF-NL	38	Rab11a
1	-----MAKAYDHLFKLLLLIGDSGVGKTCCLIIRFAEDNF-NN	35	Rab13
1	-----MATAPYNYSYIFKYIIIGDMGVGKSCLLHQFTEKKF-MA	38	Rab14
1	-----MARDYDHLFKLLIIIGDSGVGKSSLLRFADNTF-SG	35	Rab35
1	MTGTPGAVATRDEAPE---RSPPCSPSYDLTGKVMLLGDTGVGKTCFLIQFKDGAFLSG	57	Rab37
1	-----MANRGATRP-----NGPNTGNKICQFKLVLLGESAVGKSSLVLRVFKGQF-HE	47	Rab5a
1	-----MALRELKVCLLGDTGVGKSSIVWRFVEDSF-DP	32	Rab22a
1	-----MLEEDMEVAIKMVVVNGAVGKSSMIQRYCKGIF-TK	36	Rab23
1	-----MAIRELKVCLLGDTGVGKSSIVCRFVQDHF-DH	32	Rab31
1	-----MAGGGAGDPGLGAAAAPAPETREHLFKVLVIGELGVGKTSIIKRYVHQLF-SQ	52	Rab32
1	-----MQAPHKEHLYKLLVIGDLGVGKTSIIKRYVHQNF-SS	36	Rab38
1	-----MTRSRKVLKVIILGDSGVGKTSLMNQYVNKKF-SN	35	Rab7a
1	-----MAGKSSLFKVIILGDSGVGKSSLMNRVVTNKF-DT	34	Rab9a
1	-----MSDGDYDYLIKFLALGDSGVGKTSVLYQYTDGKF-NS	36	Rab27a
	RabSF1 RabSF2		
36	SYISTIGVDFKIRTIE-----LDGKTIKLOIWDTAGQERFRTITSSYYRGAHGII	85	Rab1b
50	AFVSTVGIIDFKVKTIY-----RNDKRIKLOIWDTAGQERYRTITTAYYRGAMGFI	99	Rab3a
36	DSNHTIGVEFGSRVVN-----VGGKTVKLOIWDTAGQERFRSVTRSYYRGAAGAL	85	Rab4b
41	TYQATIGIDFLSKTMY-----LEDRTVRLQLWDTAGQERFRSLIPSYIRDSTVAV	90	Rab6a
36	TFISTIGIDFKIRTIE-----LDGKRIKLOIWDTAGQERFRTITTAYYRGAMGIM	85	Rab8a
39	ESKSTIGVEFATRISIQ-----VDGKTIKACIWDTAGQERYRAITSAYYRGAVGAL	88	Rab11a
36	TYISTIGIDFKIRTVD-----IEGKKIKLOVWDTAGQERFKTITTAYYRGAMGII	85	Rab13
39	DCPHTIGVEFGTRIE-----VSGQKIKLOIWDTAGQERFRAVTRSYYRGAAGAL	88	Rab14
36	SYITTIGVDFKIRTVE-----INGEKVKLOIWDTAGQERFRTITSTYYRGTHGVI	85	Rab35
58	TFIATVGIIDFRNKVVT-----VDGVRVKLOIWDTAGQERFRSVTHAYYRDAQALL	107	Rab37
48	FQESTIGAAFLTQTV-----LDDTTVVKFEIWDTAGQERYHSLAPMYYRGAQAAI	97	Rab5a
33	NINPTIGASFMTKTVQ-----YQNELHKFLIWDTAGQERFRALAPMYYRGSAAAI	82	Rab22a
37	DYKKTIGVDFLERQIQ-----VNDEDVRLMLWDTAGQEEDAITKAYYRGAQACV	86	Rab23
33	NISPTIGASFMTKTV-----CGNELHKFLIWDTAGQERFHSAPMYYRGSAAAV	82	Rab31
53	HYRATIGVDFALKVLNW-----DSRTLVRQLLWDIAGQERFGNMTRVYYKEAVGAF	103	Rab32
37	HYRATIGVDFALKVLHW-----DPETVVRQLLWDIAGQERFGNMTRVYYREAMGAF	87	Rab38
36	QYKATIGADFLTKEVM-----VDDRLLVMIQIWDTAGQERFQSLGVAFYRGADCCV	85	Rab7a
35	QLFHTIGVEFLNKDLE-----VDGHFVMIQIWDTAGQERFRSLRTPFYRGSDCCL	84	Rab9a
37	KEITTVGIDFREKRVVYRASGPDGATGRGQRIHQLLWDTAGQERFRSLTTAFFRDAMGFL	96	Rab27a
	RabF1 RabF2 RabF3 RabF4		
86	VVYDVTQESYANVKQWLQEIDRYAS----ENVNKLLVGNKSDLTTKKVVDN--TTAKEF	139	Rab1b
100	LMYDITNEESFNAVQDWSTQIKTYSW----DNAQVLLVGNKCDMEDERVVSS--ERGRQL	153	Rab3a
86	LVDITNSRETYNSLAAWLTDARTLAS----PNIVVILCGNKKDLDPEREVTF--LEASRF	139	Rab4b
91	VVYDITNVSFQQTWKWIDDVTERG----SDVIIMLVGNKTDLADKRQVSI--EEGERK	144	Rab6a
86	LVDITNEKSFNIRNWRNIEEHAS----ADVEKMILGNKCDVNDKRQVSK--ERGEKL	139	Rab8a
89	LVDIAKHLTYENVERWLKELRDHAD----SNIVIMLVGNKSDLRHLRAVPT--DEARAF	142	Rab11a
86	LVDITDEKSFENIQNMKS IKENAS----AGVERLLGNKCDMEAKRKVQK--EQADKL	139	Rab13
89	MVYDITRRSTYNHLSSWLT DARNLTN----PNTVIILGNKADLEAQRDVTY--EEAKQF	142	Rab14
86	VVYDVTSAESFVNVRWLHEINQNC----DDVCRIILVGNKNDPPERKVVET--EDAYKF	138	Rab35
108	LLYDITNKSSFDNIRAWLTHEIHEYAQ----RDVVIMLVGNKADMSSERVIRS--EDGETL	161	Rab37
98	VVYDITNEESFARAKNWVKELQRQAS----PNIVIALSGNKADLANKRAVDF--QEAQSY	151	Rab5a
83	IVYDITKEETFSTLKNWVKELRQHGP----GNIVVAIAGNKCDLIDVREVME--RDAKDY	136	Rab22a
87	LVFSTIDRESFEAISSWREKVVAEV----DNIPTALVQNKIDLLDDSCIKN--EEAEGE	139	Rab23
83	IVYDITKDSFYTLKKWVKELKEHGP----ENIVMAIAGNKCDLSDIREVPL--DKAKEY	136	Rab31
104	VVFDISRSTFEAVLKWKSDLSKVHLPNGSP IPAVLLANKCDQNKDSSQ--SPSQVDQFC	162	Rab32
88	IVFDVTRPATFEAVAKWKNLDSKLSL PNGKPVSVVLLANKCDQKDVLMNGLKMDQFC	147	Rab38
86	LVFVDTAPNTFKTLDSWRDEFLIQASPRDPENFPFVVLGNKIDLENRQVATK--RAQAWC	143	Rab7a
85	LTFVSDDSQSFNLSNWKKEFIYADVKEPESFPFVILGNKIDISERQVSTE--EAQAWC	142	Rab9a
97	LLFDLTNEQSFLNVRNWSIQLMHAYC---ENPDIIVLGNKSDLEDQRVVKE--EEAIAL	151	Rab27a
	RabF5 RabSF3		

140	ADSLGIPFLETSAKNATNVEQAFMTMAAEIKKRMGPGAASG-----GER----P-----	184	Rab1b
154	ADHLGFEFFFEASAKDNINVKQTFERLVDVICEKMSESLDTA-----DPA----V-----	198	Rab3a
140	AQENELMFLETSALTGENVEEAFKLCARTILNKIDSGELDPERMGSIGQ--YGD-----	191	Rab4b
145	AKELNVMIETSAKAGYNVQLFRRVAAALPGMESTQDRSR-----	185	Rab6a
140	ALDYGIKFMETSAKANINVENAFFTLARDIKAKMDKKLEGN-----SPQ----G-----	184	Rab8a
143	AEKNGLSFIETSAALDSTNVEAAFQITLITEIYRIVSQKQMSDRRE-NDMS----P-----	191	Rab11a
140	AREHGIRFFETSAKSSMNVEAFSSSLARDILLKSGGRRSGN-----GNK----P-----	184	Rab13
143	AEENGLLFLEASAKTGENVEDAFLEAAKKIYQNIQDGSLLDLNAAESGVQ--HKP-----	194	Rab14
139	AGQMGIQLFETSAKENVNVEEMFNCTITELVLRRAKKNLAKQ----QQQ----Q-----	183	Rab35
162	AREYGVPFLETSAKTGMNVELAFLAIAKELKYRAGHQADEP-----	202	Rab37
152	ADDNSLLFMETSAKTSMNVEIFMAIAKKLPKNEPQNPGAN-----	192	Rab5a
137	ADSIHAI FVETSAKNAININELFIEISRRI PSTDANLPSGG-----	177	Rab22a
140	AKRLKLRFYRTSVKEDLNVSEVFKYLAEKHLQKQITEDPEQTHSSSNKIGVFNASVG	199	Rab23
137	AESIGAI VVETSAKNAINIEELFQGISRQIPPLDPHENGN-----	177	Rab31
163	KEHGFAGWFETSAKDNINIEEAARFLVEKILVNHQSFNE-E-----	203	Rab32
148	KEHGFVGFETSAKENINIDEASRCLVKHILANECDLMESIE-----	189	Rab38
144	YKNNIPIYFETSAKEAINVEQAFQTIARNALKQETEVELYNE-----	185	Rab7a
143	RDNGDYPYFETSAKDATNVAAAFEEAVRRVLATEDRSDHLIQ-----	184	Rab9a
152	AEKYGIPYFETSAANGTNISQAIEMLLDLIMKRMERCVDKSWIPEGVVR----S-----	201	Rab27A

RabSF4

185	-----NL--KIDSTPVK-----PAGGGCC---	201	Rab1b
199	-----TGAKQ--GPQLTDQQA----PPHQDCAC---	220	Rab3a
192	-----ASLRQ--LRQPRSAQA----VAPQPCGC---	213	Rab4b
186	-----E-DMIDIKLEKPQE----QPVSEGGCSC-	208	Rab6a
185	-----SNQ--GVKITPDQQ----KRSSFFRCVLL	207	Rab8a
192	-----SNNVV--PIHVPPTTE----NKPVKQCCQNI	216	Rab11a
185	-----PST--DLKTCDDK-----NTNKCSLG	203	Rab13
195	-----SAPQG--GRL-TSEFQ----PQREGCGC---	215	Rab14
184	-----QND--VVKLTKNS-----KRKKRCC---	201	Rab35
203	-----SF--QIRDYVESQ-----KKRSSCCSFM	223	Rab37
193	-----SARGRGVDLTEPAQ----PARS-QCCSN-	215	Rab5a
178	-----KGFKLRRQPS----EPKR-SCC---	194	Rab22a
200	SHLGQNSSSLNGGDVINLRPNKQRTKRTRNPFSSCSVP	237	Rab23
178	-----GTIKVEKPTM----QASR-RCC---	194	Rab31
204	-----NDVDKIKLDQETLR-AENKSQCC---	225	Rab32
190	-----PDVVKPHLT--STK-VASCSGCAKS-	211	Rab38
186	-----FPEPIKLDKNDR----AKASAESCSC-	207	Rab7a
185	-----T-DTVN--LHRK----PKPSSSCC---	201	Rab9a
202	-----NGHAS--TD--QLSEE----KEKGACGC---	221	Rab27A

Abbildung 7-2: Vollständiges Sequenzalignment aller Rab-Proteine, die als Substrate für die Adenylierung durch DrrA getestet wurden. Der Sequenzvergleich wurde am 23.08.2012 mit dem Programm clustalo (<http://www.uniprot.org/align/>) durchgeführt. Das modifizierte Y77 in Rab1 sowie die homologen Tyrosine in anderen Rab-Proteinen ist rot markiert. Ausschließlich die Rab-Proteine oberhalb der schwarzen Linie wurden durch DrrA adenyliert. Aminosäuren, die möglicherweise an der Bindung durch die Adenylyltransferasedomäne von DrrA beteiligt sind und somit die Spezifität bestimmen könnten, sind rot hinterlegt. RabF-Motive sind unterhalb der Sequenzen in cyan, RabSF-Motive in orange gezeit.

7.2.3 Massenspektren zur Analyse der DrrA Spezifität unterschiedlicher Nukleotide

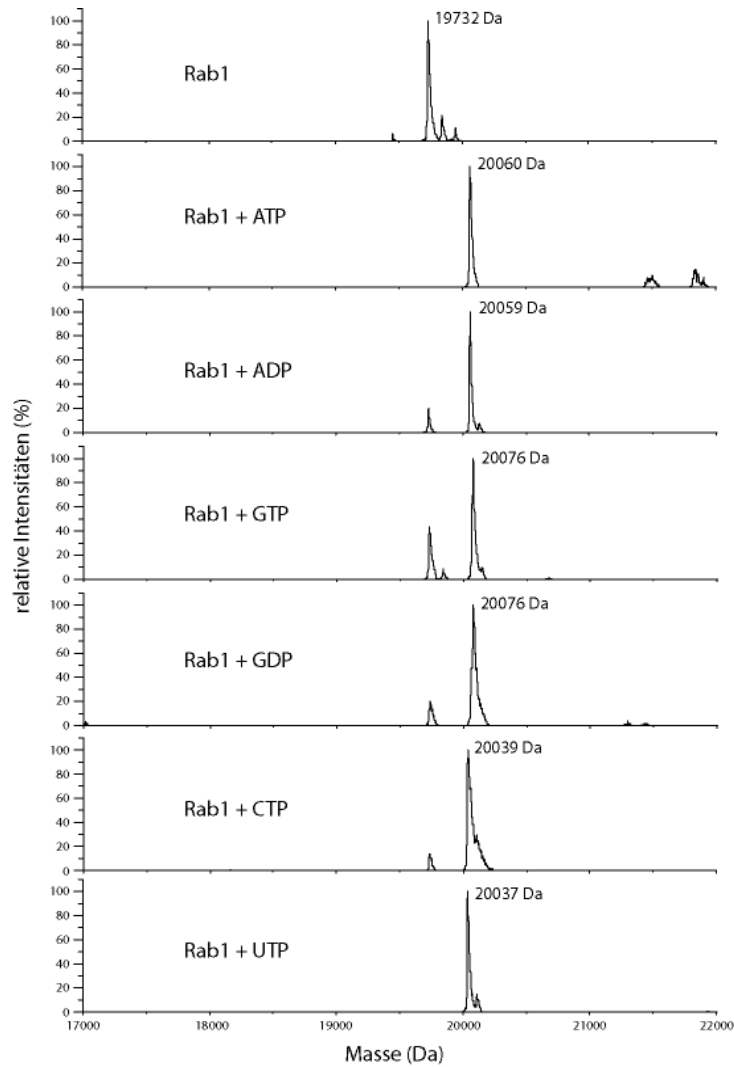


Abbildung 7-3: Massenspektrometrische Analyse zur Bestimmung der Nukleotidspezifität von DrrA. Die Massenspektren wurden jeweils nach der Fluoreszenzmessung (vgl. Kapitel 4.3.1) aufgenommen.

7.3 Progresskurven

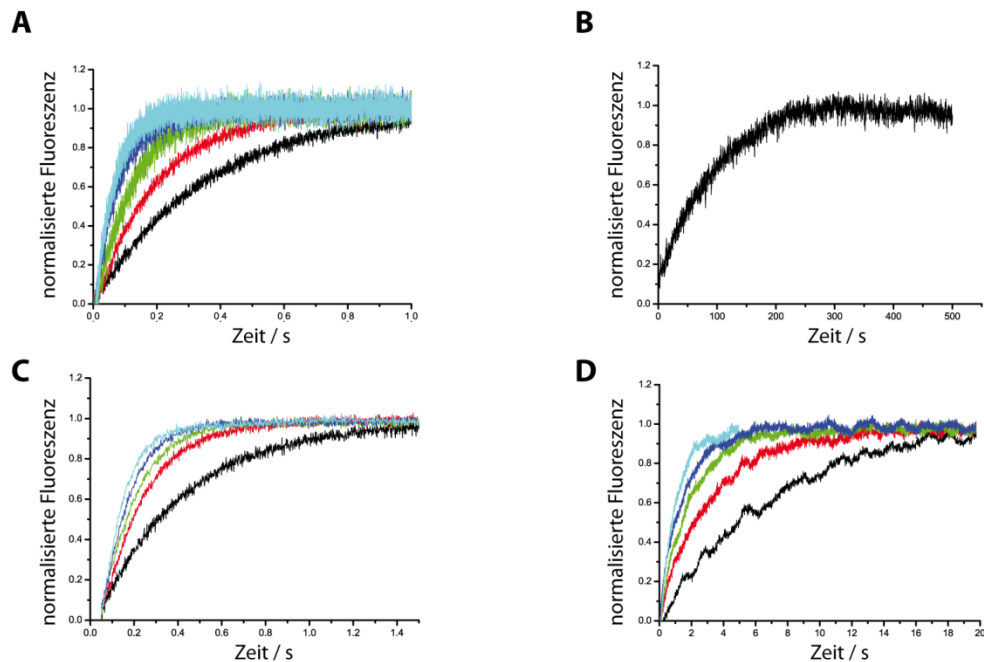


Abbildung 7-4: Progresskurven der in dieser Arbeit gemessenen Kinetiken der GAP Proteine LepB und TBC1D20.

(A) Normalisierte Fluoreszenzänderung von $0.5 \mu\text{M}$ Rab1:mantGTP in Gegenwart von $5 \mu\text{M}$ (schwarz), $10 \mu\text{M}$ (rot), $20 \mu\text{M}$ (grün), $40 \mu\text{M}$ (blau) und $60 \mu\text{M}$ (cyan) LepB₃₂₅₋₆₁₈ bei 25°C (Spaltbreiten $0.2/0.2 \text{ nm}$) gemessen mittels *stopped flow*. Die Anregung erfolgte bei 365 nm , die Emission wurde mit einem 395 nm cut-off Filter gemessen. (B) Normalisierte Fluoreszenzänderung von $0.5 \mu\text{M}$ Rab1-AMP:mantGTP in Gegenwart von $60 \mu\text{M}$ LepB₃₂₅₋₆₁₈ bei 25°C (Spaltbreiten $0.2/0.2 \text{ nm}$) gemessen mittels *stopped flow*. Die Anregung erfolgte bei 365 nm , die Emission wurde mit einem 395 nm cut-off Filter gemessen. (C) Normalisierte Fluoreszenzänderung von $0.5 \mu\text{M}$ Rab1:mantGTP in Gegenwart von $5 \mu\text{M}$ (schwarz), $10 \mu\text{M}$ (rot), $15 \mu\text{M}$ (grün), $20 \mu\text{M}$ (blau) und $30 \mu\text{M}$ (cyan) TBC1D20₁₋₃₆₂ bei 25°C (Spaltbreiten $0.2/0.2 \text{ nm}$) bei gemessen mittels *stopped flow*. Die Anregung erfolgte bei 365 nm , die Emission wurde mit einem 395 nm cut-off Filter gemessen. (D) Normalisierte Fluoreszenzänderung von $0.5 \mu\text{M}$ Rab1-AMP:mantGTP in Gegenwart von $5 \mu\text{M}$ (schwarz), $10 \mu\text{M}$ (rot), $15 \mu\text{M}$ (grün), $20 \mu\text{M}$ (blau) und $30 \mu\text{M}$ (cyan) TBC1D20₁₋₃₆₂ bei 25°C (Spaltbreiten $0.2/0.2 \text{ nm}$) gemessen mittels *stopped flow*. Die Anregung erfolgte bei 365 nm , die Emission wurde mit einem 395 nm cut-off Filter gemessen.

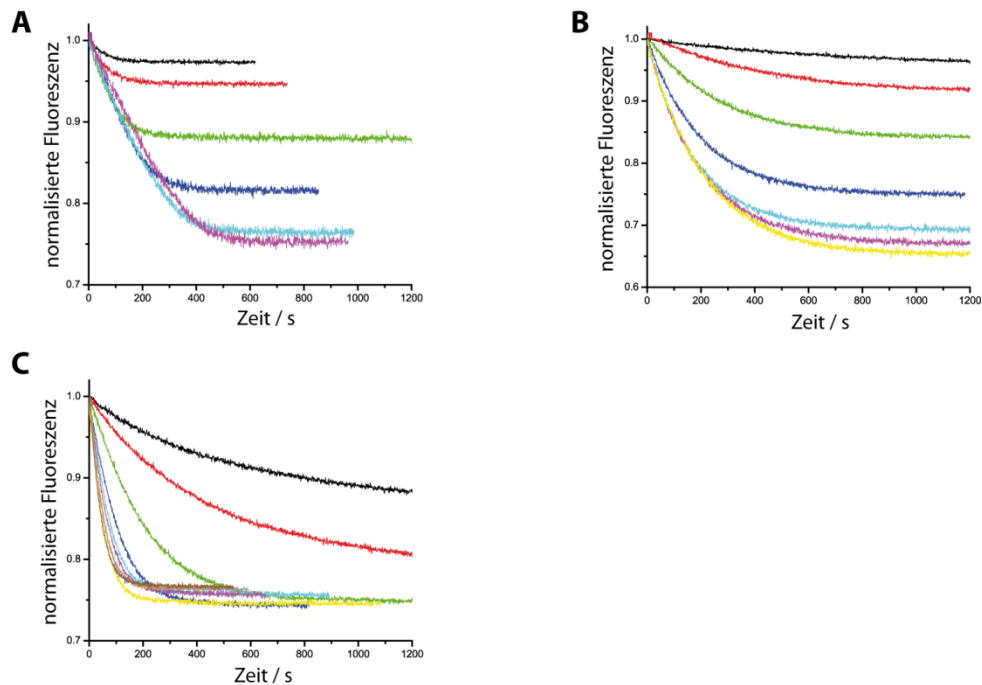


Abbildung 7-5: Progresskurven der in dieser Arbeit gemessenen Kinetiken der Adenylylierung durch DrrA. (A) Normalisierte Tryptophanfluoreszenzänderung von 10 μM (schwarz), 20 μM (rot), 50 μM (grün), 100 μM (blau), 150 μM (cyan) und 200 μM (violett) Rab₁₃₋₁₇₄:GppNHp in Gegenwart von 15 nM DrrA_{fl} N451A R453A D480A S483A und 2 mM ATP bei 25 °C (Anregungswellenlänge: 297 nm, Emissionswellenlänge: 340 nm, Spaltbreiten: je 1 nm, Puffer: 20 mM Hepes pH 7.5, 100 mM NaCl und 5 mM MgCl₂). (B) Normalisierte Tryptophanfluoreszenzänderung von 20 μM (schwarz), 50 μM (rot), 100 μM (grün), 200 μM (blau), 300 μM (cyan), 450 μM (violett) und 600 μM (gelb) Rab₁₃₋₁₇₄:GDP in Gegenwart von 5 μM DrrA_{fl} N451A R453A D480A S483A und 2 mM ATP bei 25 °C (Anregungswellenlänge: 297 nm, Emissionswellenlänge: 340 nm, Spaltbreiten: je 1 nm, Puffer: 20 mM Hepes pH 7.5, 100 mM NaCl und 5 mM MgCl₂). (C) Normalisierte Tryptophanfluoreszenzänderung von 10 μM Rab₁₃₋₁₇₄:GppNHp in Gegenwart von 5 μM DrrA_{fl} N451A R453A D480A S483A und 7.3 μM (schwarz), 14.7 μM (rot), 36.7 μM (grün), 73.5 μM (blau), 110 μM (cyan), 147 μM (violett), 220 μM (gelb), 294 μM (orange), 367 μM (grau) und 551 μM (braun) ATP bei 25 °C (Anregungswellenlänge: 297 nm, Emissionswellenlänge: 340 nm, Spaltbreiten: 1 nm (Exzitation) und 5 nm (Emission), Puffer: 20 mM Hepes pH 7.5, 100 mM NaCl und 5 mM MgCl₂). Alle Messungen wurden in Gegenwart von 2.5 u Pyrophosphatase (New England Biolabs, Frankfurt, Deutschland) durchgeführt. Initialgeschwindigkeiten wurden aus der Anfangssteigung und durch Umrechnung auf die Gesamtamplitude der Reaktion bestimmt.

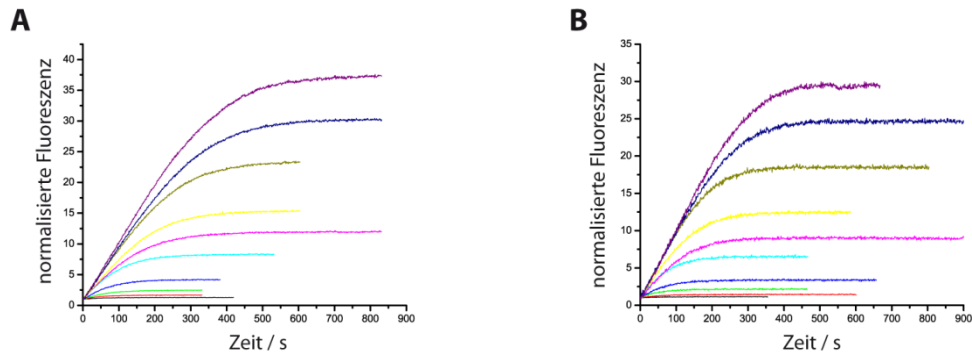
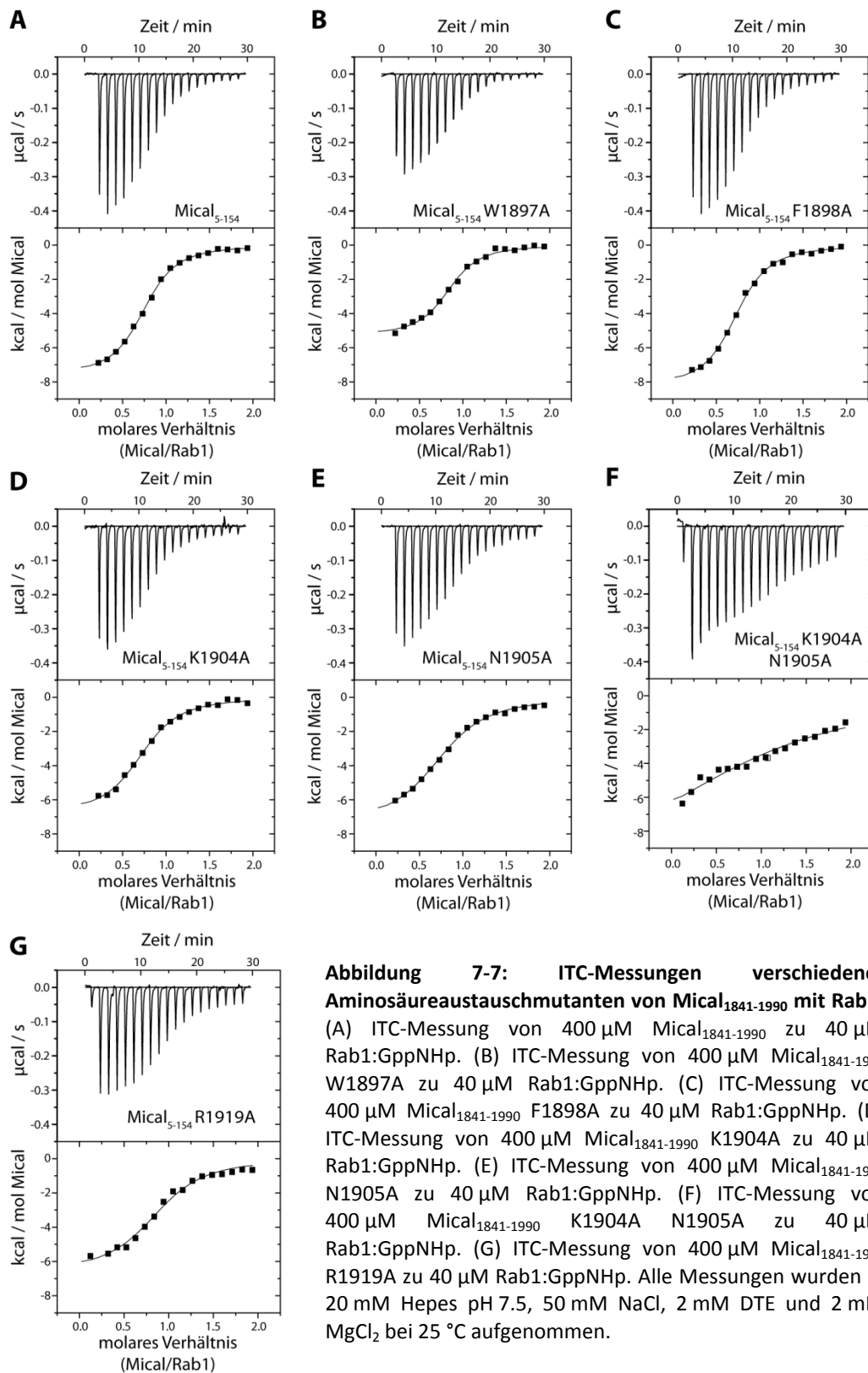


Abbildung 7-6: Progresskurven der in dieser Arbeit gemessenen Kinetiken der Deadenylylierung durch SidD. (A) Normalisierte Tryptophanfluoreszenzänderung von 0.25 μM (schwarz), 0.5 μM (rot), 1 μM (grün), 2 μM (blau), 4 μM (cyan), 6 μM (pink), 8 μM (gelb), 12 μM (oliv), 16 μM (dunkelblau) und 20 μM (violett) Rab1_{fi}AMP:GDP in Gegenwart von 4 nM SidD₃₆₋₅₀₇ bei 25 °C (Anregungswellenlänge: 297 nm, Emissionswellenlänge: 340 nm, Spaltbreiten: je 1 nm, Puffer: 20 mM Hepes pH 7.5, 50 mM NaCl und 5 mM MgCl₂). (B) Normalisierte Tryptophanfluoreszenzänderung von 0.25 μM (schwarz), 0.5 μM (rot), 1 μM (grün), 2 μM (blau), 4 μM (cyan), 6 μM (pink), 8 μM (gelb), 12 μM (oliv), 16 μM (dunkelblau) und 20 μM (violett) Rab1_{fi}AMP:GppNHp in Gegenwart von 4 nM SidD₃₆₋₅₀₇ bei 25 °C (Anregungswellenlänge: 297 nm, Emissionswellenlänge: 340 nm, Spaltbreiten: je 1 nm, Puffer: 20 mM Hepes pH 7.5, 50 mM NaCl und 5 mM MgCl₂). Initialgeschwindigkeiten wurden aus der Anfangssteigung und durch Umrechnung auf die Gesamtamplitude der Reaktion bestimmt.

7.4 Charakterisierung der Mical-3 Aminosäureaustauschmutanten



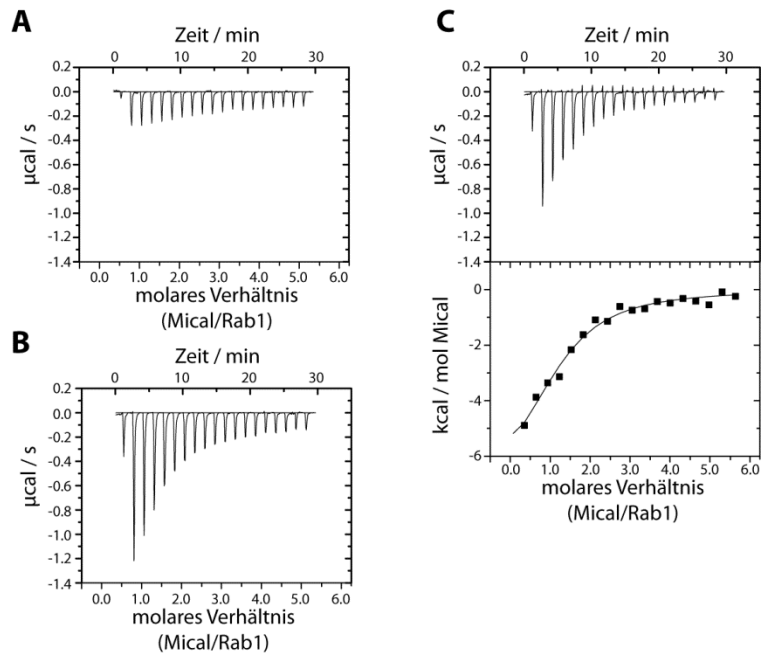


Abbildung 7-8: ITC-Messungen von Mical₁₈₄₁₋₁₉₉₀ K1904A N1905A mit Rab1. (A) ITC-Messung von 1164 μM Mical₁₈₄₁₋₁₉₉₀ K1904A N1905A zu 20 mM Hepes pH 7.5, 50 mM NaCl, 2 mM DTE und 2 mM MgCl₂. (B) ITC-Messung von 1164 μM Mical₁₈₄₁₋₁₉₉₀ K1904A N1905A zu 40 μM Rab1:GppNHp. (C) Puffer-korrigierte ITC-Messung von 1164 μM Mical₁₈₄₁₋₁₉₉₀ K1904A N1905A zu 40 μM Rab1:GppNHp. Alle Messungen wurden in 20 mM Hepes pH 7.5, 50 mM NaCl, 2 mM DTE und 2 mM MgCl₂ bei 25 °C aufgenommen.

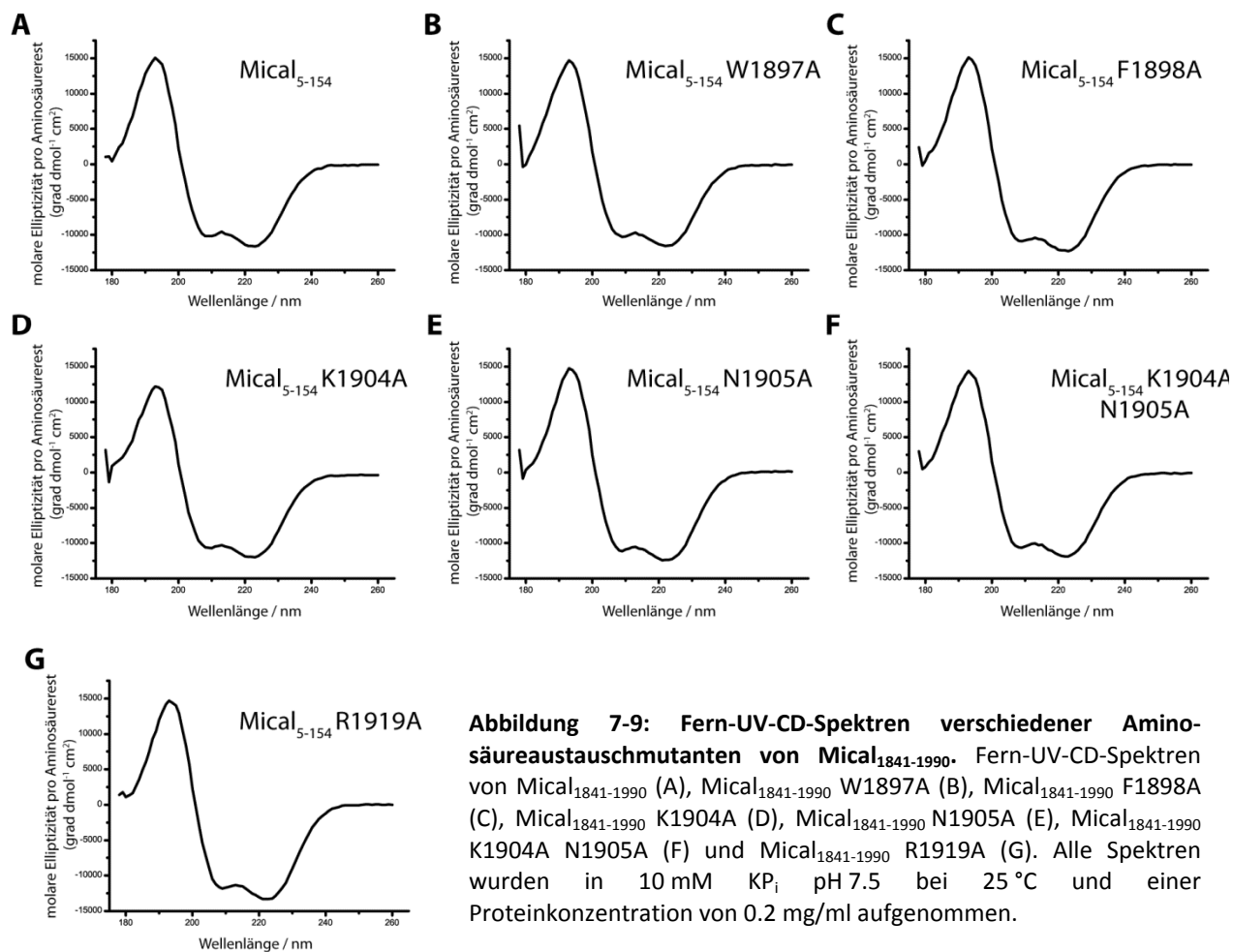


Abbildung 7-9: Fern-UV-CD-Spektren verschiedener Aminosäureaustauschmutanten von Mical₁₈₄₁₋₁₉₉₀. Fern-UV-CD-Spektren von Mical₁₈₄₁₋₁₉₉₀ (A), Mical₁₈₄₁₋₁₉₉₀ W1897A (B), Mical₁₈₄₁₋₁₉₉₀ F1898A (C), Mical₁₈₄₁₋₁₉₉₀ K1904A (D), Mical₁₈₄₁₋₁₉₉₀ N1905A (E), Mical₁₈₄₁₋₁₉₉₀ K1904A N1905A (F) und Mical₁₈₄₁₋₁₉₉₀ R1919A (G). Alle Spektren wurden in 10 mM KP_i pH 7.5 bei 25 °C und einer Proteinkonzentration von 0.2 mg/ml aufgenommen.

Tabelle 7-3: Aminosäureaustauschmutanten von Mical-3 und deren Sekundärstrukturelemente (berechnet mittels DichroWeb^(153,154) unter Verwendung des Referenz Datensatzes 1.

	α -Helix (%)	β -Faltblatt (%)	Schleife (%)	ungeordnet (%)
Mical ₁₈₄₁₋₁₉₉₀	33	15	23	29
Mical ₁₈₄₁₋₁₉₉₀ W1897A	32	16	23	29
Mical ₁₈₄₁₋₁₉₉₀ F1898A	35	14	24	28
Mical ₁₈₄₁₋₁₉₉₀ K1904A	35	13	25	28
Mical ₁₈₄₁₋₁₉₉₀ N1905A	36	13	24	27
Mical ₁₈₄₁₋₁₉₉₀ K1904A N1905A	34	14	24	28
Mical ₁₈₄₁₋₁₉₉₀ R1919A	39	12	23	26

7.5 SAXS-Daten

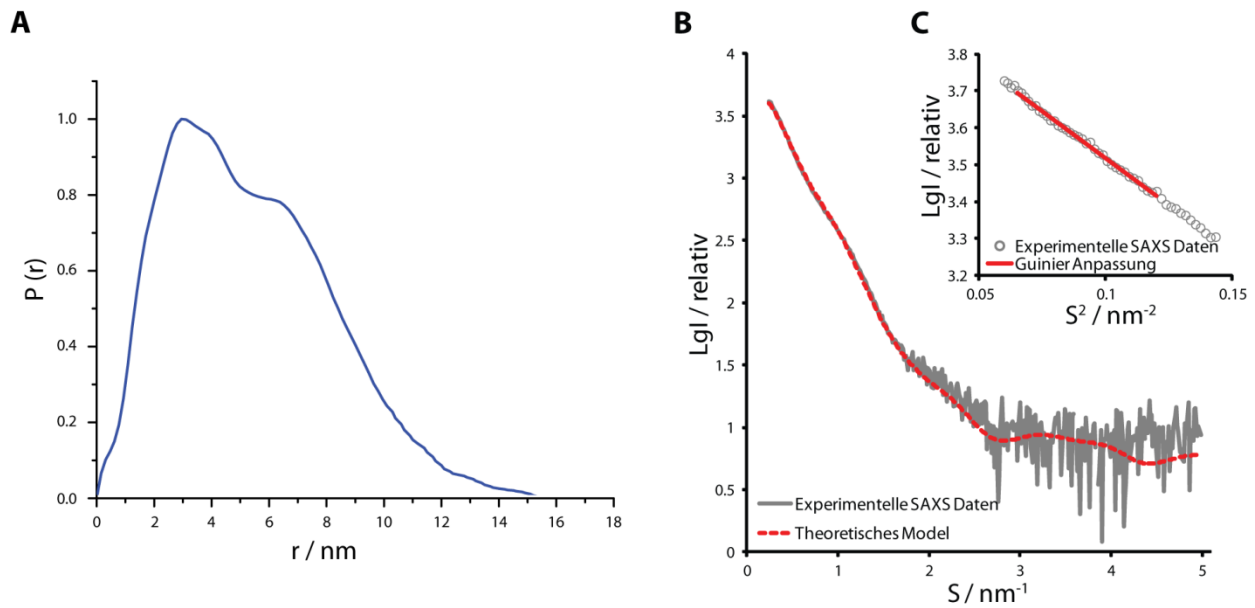


Abbildung 7-10: SAXS Daten. (A) Gezeigt ist die Paar-Abstandsverteilungsfunktion für die Generierung des *ab initio* Modells. (B) Die experimentellen Streudaten von DrrA_{fl}:Rab1₃₋₁₇₄ (grau) und der Vergleich mit der berechneten Kurve des generierten Modells (rot) zeigen eine gute Übereinstimmung. (C) Die Linearität des Guinier-Plots zeigt die Abwesenheit starker Partikel-Interaktionen in Lösung. Die Auswertung der SAXS-Daten erfolgte durch Dr. Alexander V. Shkumatov (EMBL, Hamburg). Abbildung modifiziert nach ⁽¹⁷³⁾.

DANKSAGUNG

Mein Dank gilt:

Prof. Dr. Roger S Goody und Prof. Dr. Aymelt Itzen für ein faszinierendes Projekt und eine hervorragende Betreuung während dieser Dissertation.

Prof. Dr. Winter für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Heide Behrmann (geb. Peters) und Prof. Dr. Wulf Blankenfeldt für die vorangegangenen Arbeiten, ohne die dieses Projekt nicht möglich gewesen wäre.

Nathalie Bleimling und Janine Beine für die Unterstützung und viele hilfreiche Tipps sowie der AG Goody und der Abteilung III für eine ausgesprochen gute Arbeitsatmosphäre.

Der IMPRS (Christa Hornemann, Dr. Waltraud Hofmann-Goody, Prof. Dr. Martin Engelhard) für viele interessante Möglichkeiten zur Weiterbildung und die generelle Unterstützung.

Allen aktuellen und ehemaligen Mitgliedern der Kristallographie (Dr. Ingrid Vetter, Georg Holtermann, Prof. Dr. Wulf Blankenfeldt, Dr. Michael Weyand) für hervorragende Möglichkeiten und Unterstützung bei vielen Fragen.

Der DPF (Tina Rogowsky, Astrid Sander, Melina Terbeck und Dr. Tim Bergbrede) für zahlreiche Klonierungen und Proteinreinigungen.

Dr. Petra Janning für Hilfestellung bei massenspektrometrischen Fragen.

Dem Kletterteam (Conny, Steffi, Maja) für Abwechslung außerhalb der Arbeit.

Yashar, Shyamal and Stefan for lots of fun and distracting activities.

Meinen Eltern und meinen Brüdern!

EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle wörtlichen oder inhaltlichen Zitate sind als solche gekennzeichnet und im Literaturverzeichnis aufgeführt.

Diese Arbeit wurde noch keiner Prüfungskommission zur Begutachtung vorgelegt.

Dortmund, im November 2012

(Matthias Müller)

