

**Kristallographische und biophysikalische
Untersuchungen der kleinen GTPase Rab4a
und ihres Effektors Rabaptin-5**

Dissertation

**zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
- Dr. rer. nat. -
des Fachbereichs Chemie an der Universität Dortmund**

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

vorgelegt von

**Silke Katrin Huber
aus Dortmund**

Dortmund 2003

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von November 1999 bis Dezember 2003 am Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie in Dortmund unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. Axel J. Scheidig in der Abteilung Physikalische Biochemie von Herrn Prof. Dr. Roger S. Goody durchgeführt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Roger S. Goody
2. Gutachter: Prof. Dr. Herbert Waldmann

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, daß ich diese Arbeit selbständig verfaßt und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt habe.

Dortmund, Dezember 2003

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Guaninnukleotid-bindende Proteine sind Zellregulatoren	1
1.2	Die Ras-Superfamilie	2
1.3	Topologie und konservierte Sequenzmotive der Ras-Superfamilie.....	3
1.4	Rab-Proteine	6
1.4.1	Entdeckung und Lokalisation.....	6
1.4.2	Posttranslationale Modifizierungen.....	7
1.4.3	Regulation des GTP/GDP-Zyklus.....	8
1.4.4	Rab-spezifische Sequenzmotive und Subfamilien	10
1.4.5	Rab4	13
1.4.6	Rab-Effektoren	15
1.4.7	Rabaptin-5	16
1.4.8	Funktion der Rab-Proteine	17
1.5	Zielsetzung	19
2	Material und Methoden	20
2.1	Material	20
2.1.1	Chemikalien	20
2.1.2	Enzyme.....	22
2.1.3	Geräte	22
2.1.4	Säulen	23
2.1.5	Oligodesoxynukleotide.....	24
2.1.6	Vektoren und Expressionsplasmide	24
2.1.7	Bakterienstämme	25
2.1.8	Medien.....	25
2.1.9	Nukleotide	26
2.2	Molekularbiologische Methoden.....	27
2.2.1	Agarose-Gelelektrophorese	27
2.2.2	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	27
2.2.3	Restriktion	27
2.2.4	Ligation	28
2.2.5	Sequenzierung	28

2.2.6	Präparation von DNA.....	28
2.2.7	Herstellung elektrokompeter Zellen für die Elektroporation	28
2.2.8	Transformation durch Elektroporation.....	29
2.2.9	Expression	29
2.3	Proteinchemische Methoden	31
2.3.1	Proteinreinigung	31
2.3.1.1	Rab4a wt mit N-terminalem GST-Affinitätstag.....	31
2.3.1.2	Rab4-t1, -t2, -t3, -t4 mit N-terminalem His-Affinitätstag.....	31
2.3.1.3	R5a-N2, R5b-N1, Rab4-t1 mit N-terminalem His-GST-Affinitätstag.....	32
2.3.1.4	R5b-N1 ohne Affinitätstag.....	33
2.3.2	Abspaltung von Affinitätstags.....	34
2.3.2.1	Proteolyse mit Faktor Xa.....	34
2.3.2.2	Proteolyse mit TEV-Protease.....	34
2.3.3	SDS-Gelelektrophorese.....	35
2.3.4	Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford.....	36
2.3.5	Proteinfragmentierung mit 2-Nitro-5-thiobenzoessäure (NTCB).....	36
2.3.6	Nukleotidaustausch	37
2.3.6.1	EDTA-Methode.....	37
2.3.6.2	Enzymatischer Abbau mit alkalischer Phosphatase.....	37
2.3.7	Nukleotidbefreiung.....	38
2.3.8	Bindungsassay mit Affinitätsmatrix.....	38
2.3.9	Analytische Gelfiltration.....	39
2.3.10	Messung der GTP-Hydrolyse.....	40
2.4	Biophysikalische Methoden.....	41
2.4.1	Massenspektrometrie.....	41
2.4.1.1	MALDI-MS.....	41
2.4.1.2	ESI-MS.....	42
2.4.2	HPLC-Analyse von Nukleotiden	42
2.4.3	Bestimmung von Dissoziationskonstanten mittels Fluoreszenzspektroskopie	42
2.4.4	Röntgenstrukturanalyse.....	43
2.4.4.1	Kristallisation	48
2.4.4.1.1	Suche nach Kristallisationsbedingungen.....	49
2.4.4.1.2	Verfeinerung von Kristallisationsbedingungen.....	50
2.4.4.2	Kristallmontage und Datensammlung.....	50

2.4.4.3	Modellbau und Strukturverfeinerung.....	51
3	Ergebnisse	53
3.1	Expression und Isolierung der rekombinanten Proteine.....	53
3.1.1	Rab4	53
3.1.2	Rabaptin-5 und Rabaptin-5 β	54
3.2	Charakterisierung der Rab4/Rabaptin-5-Komplexe	56
3.2.1	Bindungsassay mit Affinitätsmatrix.....	56
3.2.2	Analytische Gelfiltration	57
3.2.3	Bestimmung der Dissoziationskonstanten der Komplexe.....	60
3.3	GTP-Hydrolyse.....	63
3.4	Kristallisation und Datenaufnahme	67
3.4.1	Rab4-t1•GppNHp	67
3.4.2	Rab4-t1•GDP	69
3.4.3	Rab4-t2•GppNHp	70
3.4.4	Rab4-t2•GDP	74
3.4.5	Rab4-t3•GppNHp	75
3.4.6	Rab4-t3•GDP	78
3.4.7	R5b-N1	80
3.4.8	Rab4-t1•GppNHp/R5b-N1.....	83
3.4.9	Rab4-t2•GppNHp/R5b-N1.....	86
3.5	Aufklärung der Struktur von Rab4a.....	89
3.5.1	Überblick über die Struktur der G-Domäne	90
3.5.2	Erläuterung der funktionellen Bereiche am Beispiel von H-Ras p21	91
3.5.3	Kristallstruktur von Rab4-t3•GppNHp	94
3.5.4	Kristallstruktur von Rab4-t3•GDP.....	98
3.5.5	Analyse der Rab4a-Struktur	101
3.5.5.1	Switch I-Region (Schleife L2)	103
3.5.5.2	Schleife L3	104
3.5.5.3	Switch II-Region (Schleife L4/Helix α 2).....	106
3.5.5.4	Die Kontaktfläche zwischen den Switch-Regionen.....	107
3.5.5.5	Die Nukleotidbindungstasche	111
3.5.5.6	Die Rab-CDR-Regionen	113
4	Diskussion.....	115

4.1	Charakterisierung der Rab4/Rabaptin-5-Interaktion	115
4.1.1	Stabilität der Rab4/Rabaptin-5-Komplexe	115
4.1.2	Einfluß der Effektorbindung auf die intrinsische GTPase-Aktivität.....	117
4.2	Struktur von Rab4a	118
4.3	Strukturelle Determinanten der GTPase-Aktivität	119
4.4	Das Switch-Interface als Determinante der Effektorerkennung	122
5	Zusammenfassung und Ausblick	124
6	Abkürzungsverzeichnis	126
7	Literaturverzeichnis	128
8	Anhang.....	145
8.1	Berechnung von Dissoziationskonstanten aus Gleichgewichtstitrationen	145
8.2	Das Bragg'sche Gesetz	147

1 Einleitung

1.1 Guaninnukleotid-bindende Proteine sind Zellregulatoren

Eukaryotenzellen besitzen einen geordneten, komplexen Aufbau, der durch die Unterteilung in membranumhüllte Kompartimente gekennzeichnet ist. Die Kompartimente ermöglichen die räumliche Trennung der verschiedenen intrazellulären Stoffwechselprozesse. Um die Ordnung der Zelle aufrecht zu erhalten, muß ein gerichteter, koordinierter und kontrollierter Substanz- und Informationsaustausch zwischen den einzelnen Kompartimenten stattfinden. Die Regulation dieses Substanz- und Informationsflusses ist eine der zentralen Fragestellungen der Zellbiologie.

Ein Teil des Informationsflusses wird über den vesikulären Transport reguliert. Dabei entstehen durch Membranabschnürung Transportvesikel am Donor-Kompartiment, die nach dem gerichteten Transport zum Akzeptor-Kompartiment mit dessen Membran verschmelzen. In den achtziger Jahren wurde entdeckt, daß kleine Guaninnukleotid-bindende Proteine an der Regulation des vesikulären Transportes beteiligt sind (Gallwitz *et al.*, 1983; Salminen & Novick, 2003). Diese Proteine erhielten wegen ihre Verwandtschaft zu den Ras-Proteinen den Namen Rab (*ras-like protein from rat brain*; Charakterisierung der ersten Säugetierproteine dieser Familie in Rattenhirn) und bilden inzwischen die größte Untergruppe der Ras-Superfamilie. Mitglieder der Rab-Familie sind an nahezu allen Prozessen des exocytotischen, endocytotischen und transcytotischen Transportes beteiligt (Zerial & Stenmark, 1993; Novick & Brennwald, 1993; Novick & Garrett, 1994; Pfeffer, 1994; Novick & Zerial, 1997; Martinez & Goud, 1998; Woodman, 1998; Zerial & McBride, 2001).

Guaninnukleotid-bindende Proteine regulieren eine Vielzahl zellulärer Prozesse wie z.B. die Zelldifferenzierung und Proliferation, die ribosomale Proteinbiosynthese, den intrazellulären Transport von RNA und die Organisation des Cytoskeletts (Bourne *et al.*, 1990; Takai *et al.*, 2001). Dabei übernehmen sie die Funktion eines Schalters, indem sie zwischen einer aktiven, GTP-gebundenen und einer inaktiven, GDP-gebundenen Form wechseln. In der aktiven GTP-Form rekrutieren die Guaninnukleotid-bindenden Proteine Effektor-Proteine, die durch Interaktion mit weiteren Proteinen die Weitergabe von Signalen ermöglichen. Der zyklische Wechsel zwischen aktiver und inaktiver Form wird durch die Interaktion mit drei verschiedenen Proteinklassen, den Guaninnukleotid-Dissoziations-Inhibitoren (GDI), den Guaninnukleotid-Austausch-Faktoren (GEF) und den GTPase-aktivierenden Proteinen (GAP) reguliert (Boguski & McCormick, 1993).

1.2 Die Ras-Superfamilie

Gunaninnukleotid-bindende Proteine sind an vielen Regulationsmechanismen der eukaryotischen Zelle beteiligt. Gemeinsames Merkmal der GTP-bindenden Proteine ist die G-Domäne, die für die Nukleotidbindung verantwortlich ist. Über diese Domäne wird GTP gebunden und magnesiumabhängig zu GDP und Orthophosphat hydrolysiert. Dabei kommt es zu einer Konformationsänderung der Proteine, die die Basis ihrer Schalterfunktion bildet (Bourne *et al.*, 1990; Bourne *et al.*, 1991; Geyer & Wittinghofer, 1997). Die GTP-bindenden Proteine werden aufgrund von Sequenz und Funktion in fünf verschiedene Superfamilien unterteilt: Untereinheiten des „Signal-erkennenden Partikels“ (*SRP signal recognition particle*); α -Untereinheiten der heterotrimeren G-Proteine, die an der Signaltransduktion beteiligt sind; Translationsfaktoren der Proteinbiosynthese; Superfamilie der ADP-ribosylierenden Faktoren; Superfamilie der Ras-homologen Proteine. Die Ras-Superfamilie zählt weit über hundert Mitglieder, die alle ein Molekulargewicht von 20-30 kDa besitzen und daher auch als kleine GTP-bindende Proteine oder kleine GTPasen bezeichnet werden. Die Proteine der Superfamilie werden im allgemeinen in fünf Unterfamilien eingeteilt, die teilweise in weitere Unterfamilien klassifiziert werden (Abbildung 1.1).

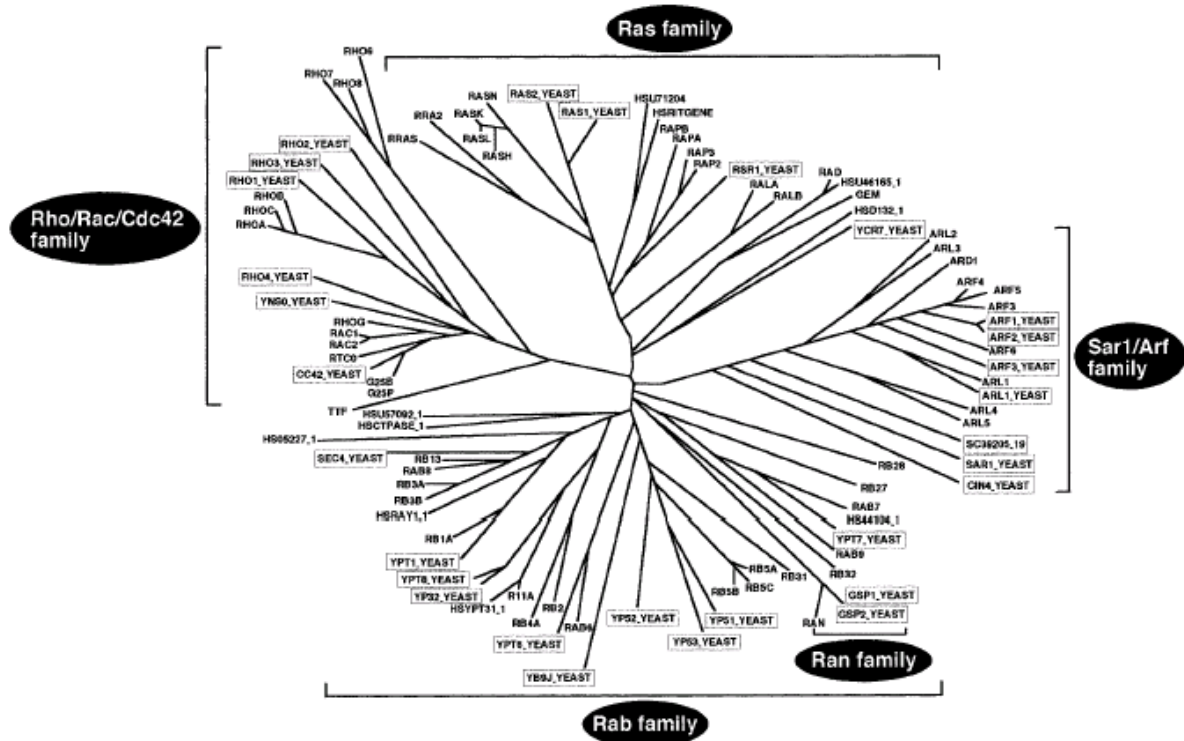


Abbildung 1.1: Dendrogramm der Ras-Superfamilie (übernommen von Takai *et al.*, 2001)

Die Ras-Proteine (Ras, Rap, Ral, Rsr1), die als Protoonkogene entdeckt wurden, sind an der Regulation der Differenzierung und Proliferation von Zellen beteiligt (Harvey, 1964; Kirsten & Mayer, 1967; Der *et al.*, 1982). Rho-Proteine (Rho, Rac, TC10, Cdc42) spielen eine Rolle bei der Organisation des Cytoskeletts (Ridley & Hall, 1992) und der Aktivierung von Transkriptionsfaktoren (Minden *et al.*, 1995; Hill *et al.*, 1995). Die Familie der Ran/TC4-Proteine ist für die Koordination des Proteintransportes durch die Kernmembran essentiell (Melchior *et al.*, 1993; Moore & Blobel, 1993; Ullman *et al.*, 1997) und an der Organisation der Microtubuli beteiligt (Kirckpatrick & Solomon, 1994; Nakamura *et al.*, 1998; Kalab *et al.*, 1999). Arf-Proteine (Arf, Arl, Sar) und Rab-Proteine (Rab, Ypt, Sec, Vps) gehören zu den Regulatoren des vesikulären Transportes. Arf-Proteine wirken bei der Vesikelbildung mit und regulieren die Anlagerung von löslichen *Coat*-Proteinen an die Membran und die *Coat*-Zusammensetzung (Chavrier & Goud, 1999; Wieland & Harter, 1999; Donaldson & Klausner, 1994). Die Rab-Proteine dagegen sind an der Kontrolle des zielgerichteten Transports der Vesikel von der Donor-Membran zur Akzeptor-Membran, des Andockens und der Fusion (Martinez & Goud, 1998; Novick & Zerial, 1997; Zerial & McBride, 2001) beteiligt.

1.3 Topologie und konservierte Sequenzmotive der Ras-Superfamilie

Sequenzanalysen kleiner GTP-bindender Proteine aus verschiedenen Spezies haben ergeben, daß die Primärstruktur der Proteine zwischen 30 und 55% homolog ist. Dabei wurde festgestellt, daß Unterschiede in der Sequenz eher auf unterschiedlichen Funktionen als auf die Herkunft der Proteine zurückzuführen sind. Die Homologie zwischen einzelnen Mitgliedern einer Unterfamilie kann bis zu 90% betragen, diese Proteine werden zu weiteren Gruppen innerhalb der Unterfamilien zusammengefaßt (Valencia *et al.*, 1991). Einige Sequenzmotive sind bei allen Ras-homologen Proteinen hochkonserviert, andere Sequenzbereiche dagegen variieren stark. Die größten Unterschiede findet man in der N-terminalen Region bis zur ersten hochkonservierten Aminosäure Lys5 (Zählweise entspricht H-Ras p21) und in der C-terminalen Region ab der Aminosäure Arg164. Diese Regionen weisen keine Homologien auf und besitzen unterschiedlichen Längen (*hypervariable regions*). Die an der Nukleotidbindung beteiligten Sequenzmotive weisen den höchsten Grad der Konservierung auf.

H-Ras p21 war das erste kleine GTP-bindende Protein, dessen Struktur in der GTP- und GDP-gebundenen Form aufgeklärt wurde (Pai *et al.*, 1990; Milburn *et al.*, 1990; Schlichting *et al.*,

1990). Vergleiche mit den Strukturen anderer GTP-bindender Proteine wie EF-Tu (Kjeldgaard & Nyborg, 1992) und der α -Untereinheit von Transducin (Sondek *et al.*, 1994) zeigten, daß die Bindung des Nukleotids über strukturell ähnliche G-Domänen erfolgt. Die Aufklärung der Strukturen weiterer Mitglieder der Ras-Superfamilie bestätigte die G-Domäne als grundlegendes Strukturmerkmal dieser Proteinfamilie. Die G-Domäne besteht aus einem zentralen β -Faltblatt, aufgebaut aus fünf parallelen und einem anti-parallel verlaufenden β -Faltblattstrang und fünf umgebenden α -Helices sowie den verbindenden Schleifen. Das Guaninnukleotid wird in einer tiefen Furche an der Oberfläche gebunden. Die an der Bindung des Nukleotids beteiligten Sequenzmotive (Abbildung 1.2) befinden sich in den Schleifenregionen (*Loops*) 1, 2, 4, 8 und 10.

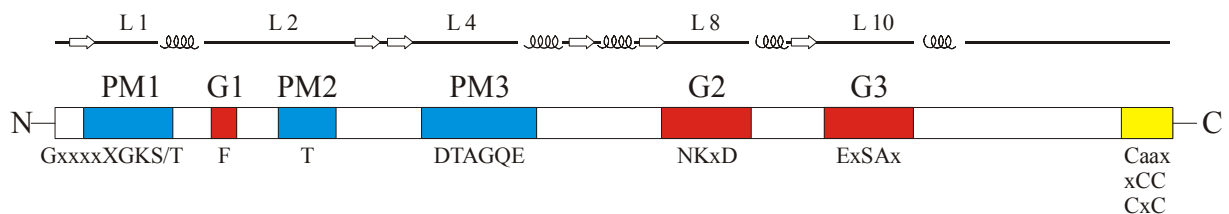


Abbildung 1.2: Konservierte nukleotidbindende Sequenzmotive der Ras-Superfamilie (Valencia *et al.*, 1991) (Takai *et al.*, 2001)

PM1-3 sind die Phosphatbindenden Motive (PM1: P-Loop; PM2: Switch I-Region/Effektor-Loop; PM3: Switch II-Region/katalytischer Loop). G1-3 sind die Guaninbasen-bindenden Motive. X steht für beliebige Aminosäuren, a steht für aliphatische Aminosäuren, L steht für Loop. Die Pfeile symbolisieren β -Faltblattstränge, die Spiralen α -Helices und die Linien Schleifenbereiche. Die Länge der Symbole gibt nicht die tatsächliche Länge der Sekundärstrukturelemente wieder.

Das Motiv PM1 ist Teil des Loops L1, der über Ser17 an der Koordination des essentiellen Magnesiumions mitwirkt. Weitere Wechselwirkungen bestehen mit den α - und β -Phosphatgruppen des Nukleotids. H-Ras p21 besitzt an Position 12 ein Glycin, dessen Substitution durch jede andere Aminosäure außer Prolin zu einem transformierend wirkenden Protein führt (Seeburger *et al.*, 1984). Die Aminosäure Thr35 des PM2-Motivs ist ebenfalls an der Koordination des Magnesiumions beteiligt, darüber hinaus steht sie in direkter Wechselwirkung mit der γ -Phosphatgruppe. Das Motiv PM3 enthält die konservierte Aminosäure Asp57, die mit einem Wassermolekül der Magnesiumkoordinationssphäre interagiert, und die für die GTP-Hydrolyse essentielle Aminosäure Gln61. Die basenspezifische Bindung der Guaninnukleotide wird maßgeblich durch die Seitenkette der

Aminosäure Asp119 des G2-Motives vermittelt. Der Austausch dieser Aminosäure gegen Asparagin wandelt alle bisher untersuchten kleinen GTP-bindenden Proteine in Xanthosin-bindende und –hydrolysierende Proteine um (Rybin *et al.*, 1996; Zhong *et al.*, 1995). Abbildung 1.3 verdeutlicht die räumliche Verteilung der wichtigsten Nukleotid-Protein-Interaktionen.

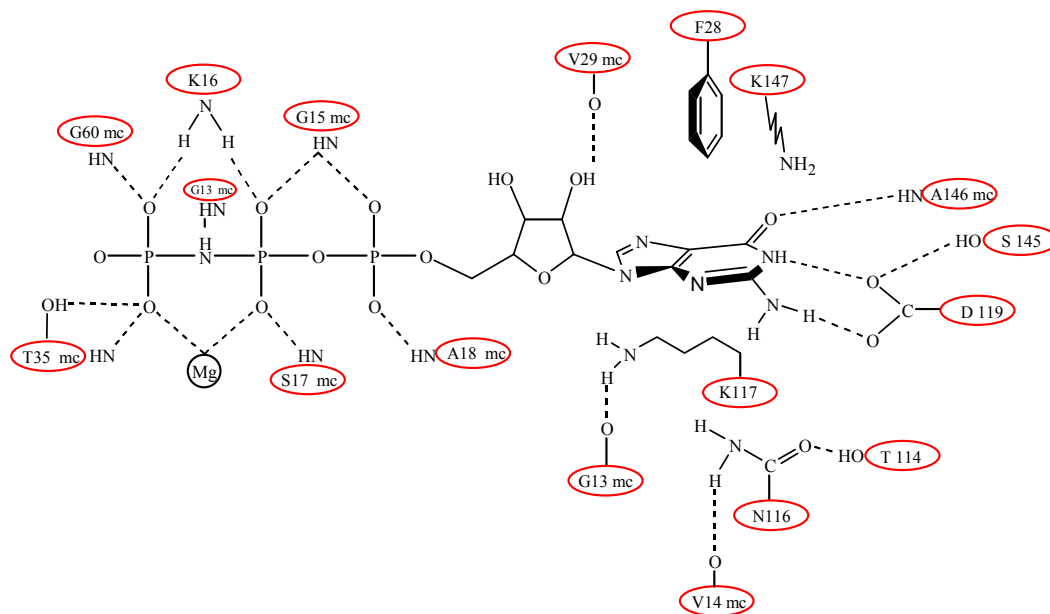


Abbildung 1.3: Schematische Darstellung der wichtigsten Nukleotid-Protein-Interaktionen von H-Ras p21 (modifiziert nach Pai *et al.*, 1990)

Neben den nukleotidbindenden Sequenzmotiven gibt es noch ein weiteres Motiv, das bei fast allen Ras-homologen Proteinen zu finden ist. Der C-Terminus enthält einen hypervariablen Bereich unterschiedlicher Länge (zwischen ~10 bis 130 Aminosäuren), die letzten vier Reste dagegen bilden eine Signalsequenz, bestehend aus einem oder zwei Cysteinresten (Abbildung 1.2), die posttranslational mit Lipidresten modifiziert werden. Über diese Lipidreste wird eine Anlagerung der Proteine an Membranen möglich.

1.4 Rab-Proteine

1.4.1 Entdeckung und Lokalisation

Die Rab-Proteine bilden die größte Untergruppe der Ras-Superfamilie. Ihre Bedeutung für die Regulation des vesikulären Transportes wurde zuerst bei genetischen Untersuchungen in *S. cerevisiae* erkannt. 1980 wurde eine Gruppe von Genen identifiziert, die für Sekretion in Hefe essentiell sind und die Bezeichnung SEC-Gene erhielten (Novick *et al.*, 1980). Später wurde gezeigt, daß das zu dieser Gruppe gehörende SEC4-Gen ein kleines GTP-bindendes Protein kodiert, dessen Beteiligung an der Regulation des vesikulären Transportes durch Experimente mit temperaturempfindlichen Sec4-Mutanten nachgewiesen wurde, in denen die Mutation des SEC4-Gens zu einer Akkumulation der sekretorischen Vesikel führte (Salminen & Novick, 1987; Goud *et al.*, 1990). Das Gen für Ypt1p wurde 1983 von Gallwitz und Mitarbeitern entdeckt (Gallwitz *et al.*, 1983) und einige Zeit später als kleines GTP-bindendes Protein identifiziert (Schmitt *et al.*, 1986). Für Ypt1p konnte die Mitwirkung am Transport von Vesikeln vom Endoplasmatischen Retikulum zum Post-Golgi-Apparat nachgewiesen werden (Segev *et al.*, 1988; Bacon *et al.*, 1989).

Die ersten zu Ypt1p und Sec4p homologen Säugetierproteine wurden aus Rattenhirn isoliert und daher als Rab-Proteine (*ras-like protein from rat brain*) bezeichnet (Haubruck *et al.*, 1987; Touchot *et al.*, 1987). Diese Bezeichnung wurde für die Proteine anderer Spezies beibehalten, die Hefeproteine tragen auch weiterhin die Bezeichnung Ypt). In *S. cerevisiae* wurden elf Ypt/Rab-Proteine gefunden, im Menschen dagegen wurden bis heute ca. sechzig Rab-Proteine (einschließlich der Isoformen) identifiziert (Zerial & McBride, 2001). Die größere Anzahl reflektiert den komplexeren Aufbau eines vielzelligen Organismus, in dem jeder Schritt des vesikulären Transportes durch spezifische Rab-Proteine kontrolliert wird (Bourne, 1988; Novick & Zerial, 1997).

Die spezifische Lokalisierung von Rab-Proteinen an bestimmte Organellen (Abbildung 1.4) wird durch den hypervariablen Bereich am C-Terminus vermittelt. So konnte z.B. Rab5, das Transportschritte an den frühen Endosomen reguliert, durch den Austausch von 35 Aminosäuren der C-terminalen hypervariablen Region von Rab7 zu den späten Endosomen verschoben werden (Chavrier *et al.*, 1991). Die für die biologischen Funktionen essentielle Verankerung der Rab-Proteine an Membranen (Brown & Goldstein, 1993) wird durch die posttranslationale Modifizierung der C-terminalen Cysteinreste ermöglicht, dabei werden die Cysteine über Thioetherbindungen geranylgeranyliert.

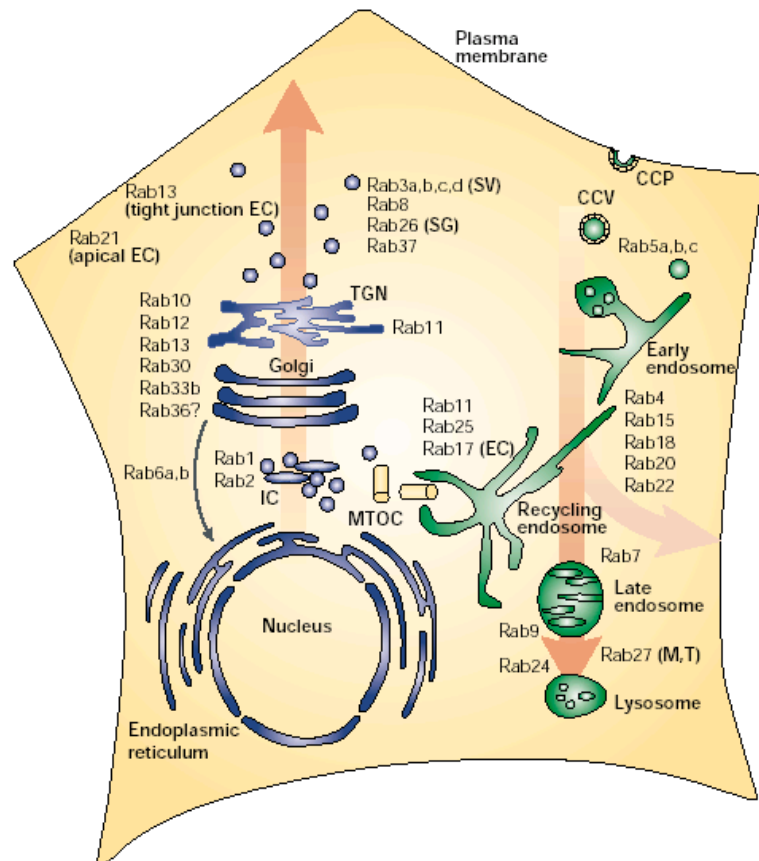


Abbildung 1.4: Intrazelluläre Lokalisation von Rab-Proteinen (übernommen von Zerial *et al.*, 2001)

CCV: *clathrin-coated vesicle*; CCP: *clathrin-coated pit*; EP: Epithelialzellen (*epithelial cells*); IC: *ER-Golgi intermediate compartment*; M: Melanosomen; MTOC: *microtubule-organizing centre*; SG: *secretory granules*; SV: *synaptische Vesikel (synaptic vesicles)*; T: *T-cell granules*; TGN: *trans-Golgi network*

Im Cytosol befinden sich die Rab-Proteine im Komplex mit einem Guaninnukleotid-Dissoziations-Inhibitor (GDI). RabGDIs binden bevorzugt an die GDP-Form der Rab-Proteine und besitzen die Fähigkeit, diese aus der Akzeptormembran zu extrahieren, um sie zur Donormembran zurückzubringen.

1.4.2 Posttranslationale Modifizierungen

Die posttranslationale Modifizierung des C-Terminus mit Lipidresten wird bei allen Ras-homologen Proteinen außer bei den Rad- (Ras-Unterfamilie) und Ran-Proteinen beobachtet und ist essentiell für die biologische Funktion (Brown & Goldstein, 1993), da sonst keine Membranverankerung stattfinden kann. Bis auf die Proteine der Arf-Familie, die an einem C-terminalen Glycinrest durch die N-Myristoyl-Transferase myristoyliert werden (Kahn *et al.*, 1988), werden alle anderen Ras-homologen Proteine an C-terminalen Cysteinresten über Thioetherbindungen farnesyliert (Ras-Familie) oder geranylgeranyliert (Rab- und Rho-

Familie). Die Signalsequenz besteht aus dem Caax-Motiv, wobei a für eine aliphatische Aminosäure steht und x die Determinante für die Farnesylierung ($x = \text{Met, Ser, Glu, Cys}$) durch die Farnesyltransferase (Reiss *et al.*, 1991; Moores *et al.*, 1991; Goldstein *et al.*, 1991) oder die Geranylgeranylierung ($x = \text{L}$) durch die Geranylgeranyl-transferase I (GGTaseI) darstellt (Seabra *et al.*, 1991). Die Rab-Proteine besitzen anstelle des Caax-Motivs verschiedene Motive mit zwei Cysteinresten (CC, CxC, CCxx), die durch die spezifische RabGGTase II erkannt werden. Dazu muß im Gegensatz zu den anderen Transferasen das neu synthetisierte Rab-Protein durch ein weiteres Protein, das *Rab escort protein* (REP) präsentiert werden, um die RabGGTase II zu aktivieren. Nach der Geranylgeranylierung bleibt der Komplex aus REP und Rab-Protein bestehen und das REP transportiert das sonst unlösliche Rab-Protein zum Donorkompartiment (Andres *et al.*, 1993; Alexandrov *et al.*, 1994). Einige Rab-Proteine, wie z.B. Rab8, Rab13 und Rab18, enthalten nur einen C-terminalen Cysteinrest, die Signalsequenz besteht dann aus dem Caax-Motiv (Wilson *et al.*, 1998).

Außer durch Prenyltransferasen werden einige Rab-Proteine auch durch spezifische Kinasen modifiziert. Rab1a und Rab4a werden durch die $p34^{\text{Cdc2}}$ -Kinase phosphoryliert, diese Modifikation führt bei Rab1a zu einer Erhöhung des membrangebundenen Anteils, bei Rab4a tritt der gegensätzliche Effekt, der cytosolische Anteil nimmt zu (Bailly *et al.*, 1991; Van der Sluijs *et al.*, 1992). Van der Sluijs und Mitarbeiter zeigten, daß phosphoryliertes Rab4a im Cytosol in der GTP-Form vorliegt und mit der Peptidyl-Prolyl Isomerase Pin1 einen Komplex bildet (Van Raak *et al.*, 2000). Rab5a, Rab5b und Rab5c, die eine konservierte Erkennungssequenz für Serin/Threonin-Kinasen aufweisen, werden *in vitro* durch spezifische Kinasen phosphoryliert (Chiariello *et al.*, 1999).

1.4.3 Regulation des GTP/GDP-Zyklus

Rab-Proteine fungieren wie die übrigen Ras-homologen Proteine als molekulare Schalter, indem sie zwischen zwei Konformationen wechseln, der aktiven GTP-Form und der inaktiven GDP-Form. Eine Besonderheit der Rab-Proteine ist der damit verbundene Ortswechsel zwischen dem Cytosol und der Membran. Dieser zyklische Ablauf von Aktivierung, Translokation und Inaktivierung (Abbildung 1.5) wird im wesentlichen durch drei regulatorische Proteinklassen gesteuert: Guaninnukleotid-Austausch-Faktoren (GEF), Guaninnukleotid-Dissoziations-Inhibitoren (GDI) und GTPase-aktivierende Proteine (GAP) (Takai *et al.*, 1996; Novick & Zerial, 1997; Martinez & Goud, 1998).

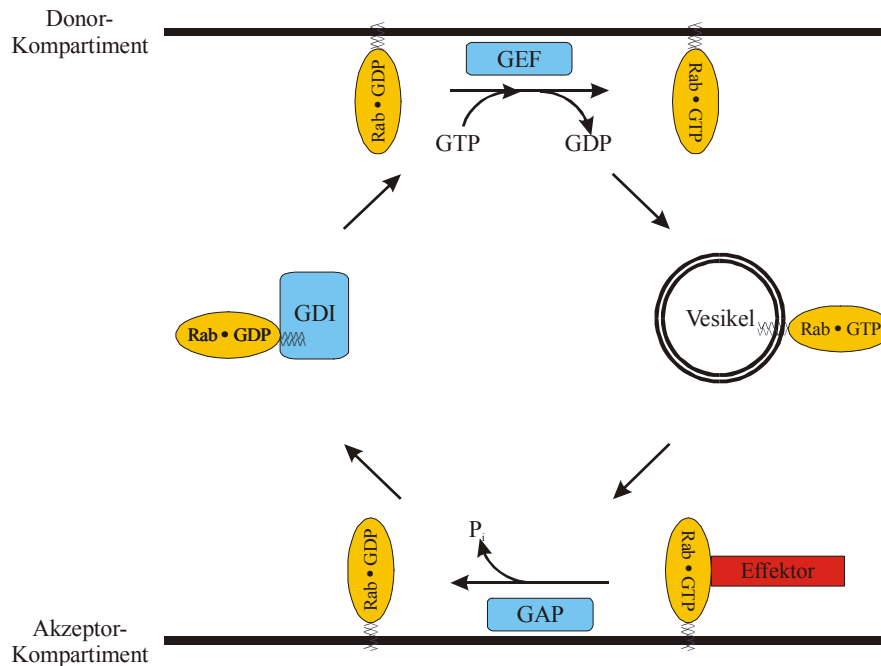


Abbildung 1.5: Schematische Darstellung des Regulationszyklus der Rab-Proteine

GEF: Guaninnukleotid-Austausch-Faktor; GAP: GTPase-aktivierendes Protein; GDI: Guaninnukleotid-Dissoziations-Inhibitor

Im Cytosol befinden sich Rab-Proteine im Komplex mit RabGDIs. Bisher wurden drei Isoformen entdeckt, RabGDI α (RabGDI-1), RabGDI β und RabGDI γ (RabGDI-2), die vergleichbare biochemische Eigenschaften besitzen (Yang *et al.*, 1994; Shisheva *et al.*, 1994; Nishimura *et al.*, 1994; Janoueix-Lerosey *et al.*, 1995; Shisheva *et al.*, 1999). Sie binden bevorzugt an die prenylierte GDP-Form der Rab-Proteine, extrahieren diese nach der GTP-Hydrolyse von der Akzeptormembran und transportieren sie zurück zur Donormembran. Dabei hemmen sie sowohl den basalen als auch den durch GEFs stimulierten Austausch von GDP gegen GTP. Nach der Bindung an die Donormembran wird der Rab•GDP/RabGDI-Komplex durch einen *GDI displacement factor* (GDF) dissoziiert und RabGDI kehrt ins Cytosol zurück, um erneut Rab-Moleküle zu binden (Dirac-Svejstrup *et al.*, 1997; Sakisaka *et al.*, 2002).

Die Aktivierung der Rab-Proteine durch den Austausch von GDP gegen GTP wird durch GEFs katalysiert. Im Gegensatz zum RabGDI existieren spezifische GEFs, die nur mit der jeweiligen Rab-Unterfamilie interagieren, wie z.B. Rab3GEP (*guaninnucleotide exchange protein*), das den Nukleotidaustausch von Rab3a, Rab3c und Rab3d katalysiert, nicht aber den von Rab2, Rab5a, Rab10 und Rab11 (Wada *et al.*, 1997). Interessanterweise bilden einige GEFs Komplexe mit Effektoren. Rabex-5, ein Rab5-spezifischer GEF, bildet mit Rabaptin-5, einem Rab5-Effektor, einen Komplex, wodurch eine Verknüpfung zwischen

Nukleotidaustausch und der Effektor-Rekrutierung geschaffen wird (Horiuchi *et al.*, 1997; Lippé *et al.*, 2001). Ähnliche Regulator/Effektor-Komplexe wurden auch für andere Rab-Proteine gefunden, z.B. der HOPS-Komplex, der als Effektor und GEF für Ypt7p fungiert (Seals *et al.*, 2000; Wurmser *et al.*, 2000).

Neben dem Nukleotidaustausch stellt die GTP-Hydrolyse die zweite zeitliche Komponente der Regulation des vesikulären Transportes durch Rab-Proteine dar. Die langsame intrinsische Hydrolyserate der Rab-Proteine (Simon *et al.*, 1996) wird durch GAPs stimuliert. RabGAPs enthalten kurze *fingerprint*-Sequenzen, die zwischen den verschiedenen Spezies konserviert sind und auch in den GAPs der anderen Ras-homologen Proteine vorkommen. Sie sind *in vitro* weniger spezifisch als die GEFs, z.B. interagiert das in Hefe vorkommende GAP Gyp1p mit Sec4p, Ypt1p und Ypt7p; die Hydrolyserate von Ypt7p wird aber auch durch das GAP Gyp6p stimuliert, das ebenso die Hydrolyserate von Ypt6p erhöht (Walworth *et al.*, 1992; Vollmer & Gallwitz, 1995; Alberts & Gallwitz, 1999a). Ähnliche Beobachtungen wurden für GAPCenA mit Rab6 und Rab4 gemacht (Cuif *et al.*, 1999). Im Gegensatz dazu reagiert Rab3GAP nur mit den Rab3-Isoformen (Fukui *et al.*, 1997). Einige Effektoren verlangsamen die intrinsische Hydrolyse (Rybin *et al.*, 1996; Nagelkerken *et al.*, 2000). Es wird vermutet, daß diese Wechselwirkung der Stabilisierung der aktiven GTP-Form der Rab-Proteine und damit als Gegenpol zu der Wirkung der GAPs dient.

1.4.4 Rab-spezifische Sequenzmotive und Subfamilien

Das gemeinsame Merkmal der kleinen GTP-bindenden Proteine sind die konservierten nukleotidbindenden Sequenzmotive und die daraus resultierende Topologie der G-Domäne (Kapitel 1.3). Aufgrund des hohen Grads der Konservierung eignen sich diese Motive jedoch nicht zur Unterscheidung der Unterfamilien. Auch die Signalsequenz für die Prenylierung ist kein sicheres Unterscheidungsmerkmal, da beispielsweise auch Rab-Proteine mit einem Cxxx-Motiv statt des Rab-typischen Doppel-Cystein-Motivs existieren. Moore und Mitarbeiter (Moore *et al.*, 1995) definierten 1995 erstmals Sequenzmotive im Bereich der Switch I-Region und des G2-Motivs zur Klassifizierung der Rab-Unterfamilien (*subfamilies*). Pereira-Leal und Seabra definierten 2000 auf der Basis umfassender Sequenzanalysen spezifische Motive zur Unterscheidung der Rab-Proteine (RabF *rab family motif*) von den anderen kleinen GTPasen und zur Klassifizierung von Unterfamilien innerhalb der Rab-Familie (RabSF *rab subfamily motif*) (siehe Abbildung 1.6).

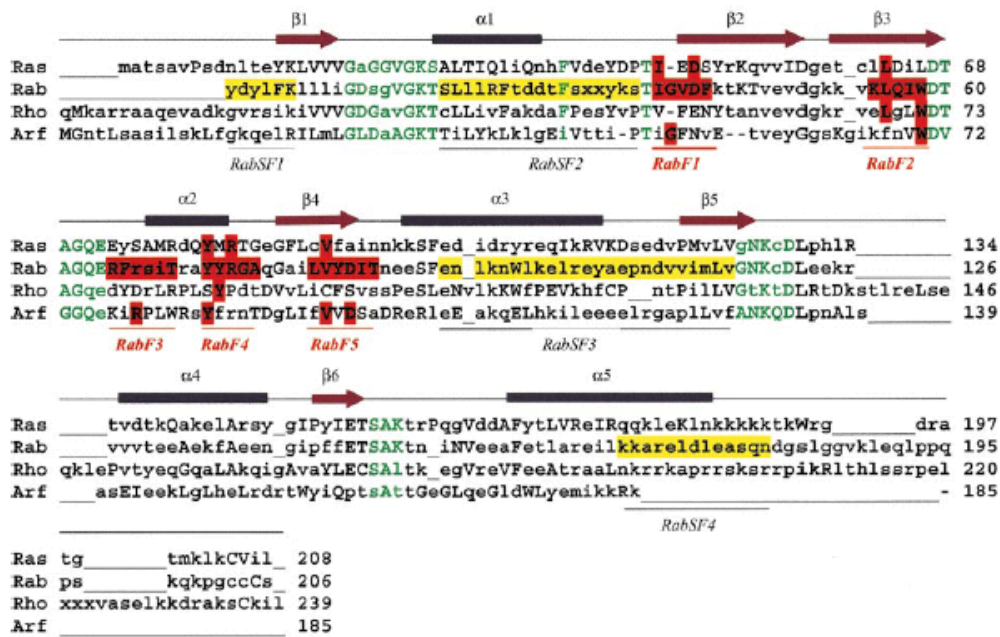


Abbildung 1.6: Sequenzvergleich der Ras-Superfamilie zur Identifizierung von Rab-spezifischen Regionen (übernommen aus Pereira-Leal & Seabra, 2000)

- : Rab-Familien-spezifische Motive (RabF)
- : Rab-Subfamilienspezifische Motive (RabSF)
- : nukleotidbindende Motive (PM/G)

Die fünf RabF-Motive befinden sich alle in der Nähe der Switch I- und Switch II-Regionen und weisen neben Rab-spezifischen Aminosäuren auch einige Reste auf, die in anderen kleinen GTPasen-Familien konserviert sind. RabF1 (IGVDF) ist in der Switch I-Region lokalisiert. Das in Rab-, Arf- und Ran-Proteinen hochkonservierte Glycin stellt gegenüber den Ras- und Rho-Proteinen eine Insertion dar. In der Struktur von Rab3a•GTP spielt diese Aminosäure eine wichtige Rolle bei Interaktion der Switch-Regionen (Dumas *et al.*, 1999). RabF2 (KLQIW) grenzt an das hochkonservierte PM3-Motiv, RabF3 (RFRSIT), RabF4 (YYRGA) und RabF5 (LYYDIT) folgen dicht aufeinander im Bereich der Helix $\alpha 2$ bis zum Faltblattstrang $\beta 4$. In Kombination mit den konservierten nukleotidbindenden Motiven ermöglichen die RabF-Motive die Unterscheidung eines Rab-Proteins von den anderen Familien der Ras-Superfamilie.

Innerhalb der Rab-Familie gibt es Rab-Proteine mit hoher Sequenzhomologie, die als Isoformen bezeichnet und in Unterfamilien eingeteilt werden. Isoformen besitzen meist ähnliche Funktionen und interagieren mit den gleichen Effektoren (Lazar *et al.*, 1997; Schimmöller *et al.*, 1998; Chavrier & Goud, 1999). Pereira-Leal und Seabra wiesen anhand ihrer Sequenzanalysen nach, daß Isoformen durch Sequenzmotive charakterisiert werden können, die innerhalb der Rab-Unterfamilie deutlich höhere Homologien aufweisen als

bezogen auf die Gesamtsequenz. Sie definierten vier RabSF-Motive (Abbildung 1.6), die auch die bereits von Moore und Mitarbeitern erkannten Motive umfassen. Bemerkenswert ist die Übereinstimmung des in der C-terminalen, hypervariablen Region gelegenen RabSF4-Motivs innerhalb einer Rab-Unterfamilie. Die durchschnittliche Homologie dieser Region zwischen verschiedenen Rab-Proteinen liegt bei $\sim 14\%$, bei Isoformen sind es dagegen $\sim 58\%$. Die RabSF-Motive spielen eine wichtige Rolle bei der Effektorerkennung, wie anhand der Struktur des Rab3a/Rabphilin-3a-Komplexes (Ostermeier & Brünger, 1999) gezeigt werden konnte. Die Bindung zwischen Rab3a und Rabphilin-3a wird neben den Switch-Regionen über eine weitere Kontaktfläche vermittelt, die aus drei als RabCDR (*Rab complementary-determining regions*) bezeichneten Sequenzbereichen gebildet wird. Diese RabCDRs stimmen mit den RabSF-Motiven RabSF1 (RabCDR I), RabSF3 (RabCDR II) und RabSF4 (RabCDR III) überein. Das in Abbildung 1.7 dargestellte Strukturmodell von Rab3a•GTP mit den darin gekennzeichneten RabF- und RabSF-Motiven verdeutlicht die Trennung zwischen dem für die spezifische Effektorerkennung verantwortlichen Bereich und den Switch-Regionen.

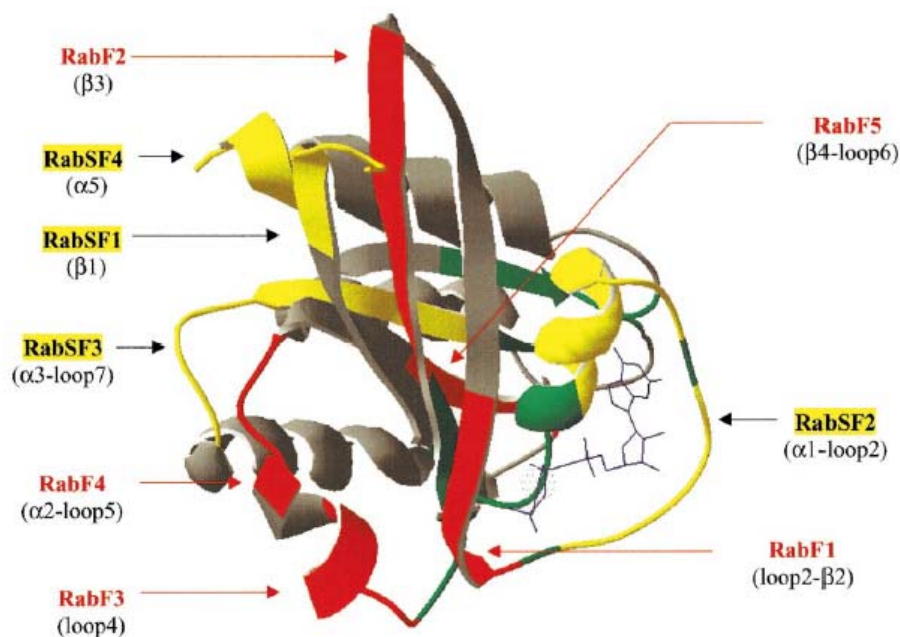


Abbildung 1.7: Strukturmodell von Rab3a•GTP mit RabF- und RabSF-Motiven (übernommen aus (Pereira-Leal & Seabra, 2000))

- : Rab-Familien-spezifische Motive (RabF)
- : Rab-Subfamilie-spezifische Motive (RabSF)
- : nukleotidbindende Motive (PM/G)

Das RabSF2-Motiv befindet sich auf der gegenüberliegenden Seite der aus RabSF1, RabSF3 und RabSF4 gebildeten Kontaktfläche in der Nähe der Switch I-Region und stellt möglicherweise eine weitere Kontaktfläche für die Interaktion mit anderen Effektoren dar (Pereira-Leal & Seabra, 2000). Die RabF-Motive liegen alle in der Nähe zu den Switch-Regionen, die bei der GTP-Hydrolyse eine Konformationsänderung erfahren. Die Interaktion mit diesen Bereichen ermöglicht die Erkennung des Nukleotidzustands durch Effektoren und Regulatoren, wobei die RabF-Motive die Rab-spezifischen Komponenten der Bindung darstellen könnten.

1.4.5 Rab4

Schon bald nach der (teils zufälligen) Entdeckung der ersten Ras-homologen Proteine begann die gezielte Suche nach weiteren Mitgliedern der Ras-Superfamilie. Rab4 wurde erstmals 1987 in Experimenten identifiziert, in denen cDNA aus Rattenhirn mit Oligonukleotiden untersucht wurde, deren Sequenz komplementär zu dem in allen Ras-homologen Proteinen konservierten PM3-Motiv war (Touchot *et al.*, 1987). Zwei Jahre später klonierten Tavitian und Mitarbeiter das humane Protein, exprimierten es in *E. coli* und zeigten, daß seine Eigenschaften bezüglich der Nukleotidbindung und der GTPase-Aktivität den bereits bekannten Ras-homologen Proteinen vergleichbar war (Zahraoui *et al.*, 1989). Nach der Entdeckung eines weiteren Rab-Proteins mit 82%-Sequenzidentität zu Rab4 (Chavrier *et al.*, 1990 (Cocker Spaniel); Huang *et al.*, 1999 (Mensch)) erhielt das zuerst entdeckte Protein die Bezeichnung Rab4a und das zweite die Bezeichnung Rab4b. Die zwei Isoformen bilden eine eigene Unterfamilie innerhalb der Rab-Familie. Rab4a ist 213 Aminosäuren lang und hat ein Molekulargewicht von 23871 Da, Rab4b hat bei gleicher Länge ein Molekulargewicht von 23587 Da. Beide Proteine weisen am C-Terminus ein CxC-Prenylierungsmotiv (²¹¹CGC) auf. Im Gegensatz zu den meisten Rab-Proteinen steht im G3-Motiv an der Stelle des Lysins ein Leucin (¹⁵¹SAL statt SAK). Rab4a besitzt im C-terminalen Bereich eine Erkennungssequenz für die p34^{Cdc2}-Kinase (¹⁹⁹SPRR)¹, die in Rab4b nicht enthalten ist.

Rab4 ist ebenso wie Rab5 auf den frühen Endosomen lokalisiert, die beiden Rab-Proteine kontrollieren jedoch entgegengesetzte Transportwege. Rab5 reguliert sowohl den Vesikeltransport von der Plasmamembran zu den frühen Endosomen als auch die

¹ Die Position des Serins wird von Bailly *et al.* (Bailly *et al.*, 1991) und Van der Sluijs *et al.* (Van der Sluijs *et al.*, 1992) mit 196 angegeben, in der ersten Veröffentlichung der humanen Sequenz (Zahraoui *et al.*, 1989) und in der Swiss-Prot-Datenbank (P20338) steht das Serin an Position 199.

homotypische Fusion zwischen frühen Endosomen. Rab4 ist an der Regulation des Recycling von den frühen Endosomen zum *recycling compartment* oder direkt zur Plasmamembran (*fast recycling*) beteiligt, wie am Beispiel des Transferrin-Rezeptors (TfR) gezeigt werden konnte (Bucci *et al.*, 1992; Van der Sluijs *et al.*, 1992). Die Überexpression von Rab4 führt zu einer Umverteilung des TfR von den frühen Endosomen zur Plasmamembran. Gleichzeitig wird durch die Akkumulation des Transferrins in nicht-sauren Vesikeln der frühen Endosomen das Recycling dieses Liganden behindert, da die Entladung des Eisens nur in Vesikeln mit saurem pH-Wert stattfindet (McCaffrey *et al.*, 2001). Ein weiteres Beispiel für die Beteiligung von Rab4 an *recycling*-Transportprozessen ist die Translokation des Glukosetransporters GLUT4 vom intrazellulären Vorratskompartiment zur Plasmamembran. Die insulin-induzierte erhöhte Translokation von GLUT4 zur Plasmamembran wird durch die Expression eines Rab4-Konstruktes ohne das C-terminale Prenylierungsmotiv (Rab4 Δ C) inhibiert, das nicht in der Lage ist, an Membranen zu binden. Dieser Effekt wird nicht beobachtet, wenn das Rab4-Konstrukt eine zusätzliche Mutation aufweist, die die Bindung von GTP verhindert (Rab4 Δ C S22N). Es wird vermutet, daß das C-terminal verkürzte Rab4-Konstrukt in der GTP-Form Effektoren bindet, die dann nicht mehr für die Rekrutierung zur Membran zur Verfügung stehen. In Übereinstimmung mit diesen Vermutungen wurde festgestellt, daß Rab4 Δ C mit Rab4ip, einem Rab4-Effektor, interagieren kann (Cormont *et al.*, 2001).

Eine wichtige Bedeutung kommt Rab4 möglicherweise bei der Regulierung des Zellzyklus zu. Der Transport zwischen den verschiedenen Organellen und der Plasmamembran wird während der Mitose inhibiert und einige Organellen, wie z.B. das Endoplasmatische Reticulum und der Golgi-Apparat, zerfallen in kleinere Fragmente. Es wird angenommen, daß die Fragmentierung der Organellen der Verteilung zwischen der Mutter- und Tochterzelle dient und durch fortwährendes Abschnüren von Vesikeln bei gleichzeitiger Inhibition der Vesikelfusion stattfindet. Die molekularen Mechanismen der Inhibition des vesikulären Transportes während der Zellteilung sind nicht vollständig bekannt, es steht jedoch fest, daß die Modifikation von Proteinen durch Phosphorylierung eine Schlüsselrolle spielt. Rab4a wird während der Mitose durch die p34^{cdc2}-Kinase phosphoryliert (Bailly *et al.*, 1991; Van der Sluijs *et al.*, 1992). Dies bewirkt eine Translokation von Rab4a in der aktiven GTP-Form von der Membran in das Cytosol, wo die phosphorylierte GTPase mit der Peptidyl-Prolyl Isomerase Pin1 einen Komplex bildet (In der nicht-phosphorylierten Form wird keine Komplexbildung mit Pin1 beobachtet.). Durch die Verlagerung der aktiven Form von Rab4a in das Cytosol wird wahrscheinlich die Rekrutierung von Effektoren an die Membran verhindert und die Rab4a-abhängigen Transportprozesse stark eingeschränkt bzw. inhibiert (Gerez *et al.*, 2000).

1.4.6 Rab-Effektoren

Die Weitergabe der durch die Rab-Proteine übermittelten Signale zur Regulierung von Transportprozessen geschieht durch die Interaktion mit sogenannten Effektoren. Dabei handelt es sich um lösliche Proteine, die mit der GTP-Form der Rab-Proteine interagieren. Im Gegensatz zu den Rab-Proteinen bilden die Rab-Effektoren keine einheitliche Proteinfamilie, obwohl es einige Rab-Effektoren gibt, die strukturelle Ähnlichkeiten besitzen. So weisen zum Beispiel sowohl der Rab1-Effektor p115 als auch die Rab5-Effektoren Rabaptin-5 und EEA1 Sequenzbereiche auf, die für *coiled coil*-Domänen charakteristisch sind; EEA1 und Rabenosyn-5, ein weiterer Rab5-Effektor, enthalten beide ein *zinc finger*-Motiv.

Ursprünglich wurde vermutet, daß jeder Transportschritt durch ein spezifisches Rab-Protein kontrolliert wird, inzwischen wurde jedoch für einige Rab-Proteine die Beteiligung an mehreren Transportschritten nachgewiesen. Rab5 beispielsweise wirkt an der Einschließung von liganden-beladenen Rezeptoren in clathrin-umhüllten Vesikeln (*clathrin coated vesicles*) mit (McLauchlan *et al.*, 1998), es stimuliert die Assoziation von Endosomen an und die Bewegung entlang von Microtubuli (Nielsen *et al.*, 1999) und ist sowohl am Andocken von endosomalen Vesikeln als auch an der Fusion derselben beteiligt (Christoforidis *et al.*, 1999; McBride *et al.*, 1999). Diese Ergebnisse zeigen, daß ein gegebenes Rab-Protein die Transportwege eines definierten intrazellulären Kompartiments reguliert und nicht nur einzelne Transportschritte. Grundlage für die Funktion der Rab-Proteine als Regulatoren multipler Transportschritte ist die Interaktion mit verschiedenen Effektoren. So wurden 1999 allein für Rab5 in einem Experiment, in dem Zellextrakt aus Rinderhirn mit einer Rab5-Affinitätssäule getestet wurde, über zwanzig Proteine gefunden, die direkt oder indirekt mit der GTP-Form von Rab5 interagieren (Christoforidis *et al.*, 1999), darunter bereits bekannte wie Rabaptin-5 (Stenmark *et al.*, 1995), Rabaptin-5 β (Gournier *et al.*, 1998) und EEA1 (Christoforidis *et al.*, 1999) und einige, die inzwischen charakterisiert wurden, wie Rabaptin-4 (Nagelkerken *et al.*, 2000) und Rabenosyn-5 (Nielsen *et al.*, 2000). Interessanterweise interagieren die Rabaptin-Proteine und Rabenosyn-5 auch mit Rab4, dabei findet die Interaktion mit dem jeweiligen Rab-Protein über spezifische Domänen statt. (Vitale *et al.*, 1998; De Renzis *et al.*, 2002). Es wird vermutet, daß über diese sogenannten divalenten Effektoren Transportprozesse miteinander verknüpft werden.

1.4.7 Rabaptin-5

Rabaptin-5 wurde 1995 von Zerial und Mitarbeitern als essentieller Rab5-Effektor für die Rab5-vermittelte Membranfusion von frühen Endosomen identifiziert (Stenmark *et al.*, 1995). Das Protein hat eine Länge von 862 Aminosäuren und ein Molekulargewicht von ~100 kDa. Im Bereich des N- und des C-Terminus befinden sich *heptad repeats*, die für *coiled coil*-Domänen charakteristisch sind. Vitale *et al.* bestätigten über CD-Spektroskopie den α -helicalen Charakter des Proteins und wiesen durch Quervernetzungs- und Gel-filtrationsexperimente nach, daß Rabaptin-5 in Lösung Dimere bildet. Zusätzlich zu der Rab5-bindenden Domäne am C-Terminus (Aminosäure 789-832) entdeckten sie eine Rab4-bindende Domäne am N-Terminus (Aminosäure 5-135) und stellten die Hypothese auf, daß Transportschritte, die durch verschiedene Rab-Proteine reguliert werden, über die Interaktion mit gemeinsamen Effektoren miteinander verknüpft werden (Vitale *et al.*, 1998). Gournier *et al.* identifizierten bei der Suche nach Rab5-interagierenden Proteinen ein Protein mit 42% Sequenzidentität zu Rabaptin-5, das den Namen Rabaptin-5 β erhielt. Rabaptin-5 β hat eine Länge von 551 Aminosäuren und ein Molekulargewicht von ~62 kDa. Es bildet wie Rabaptin-5 in Lösung Dimere, dabei findet jedoch keine Heterodimerbildung statt (Gournier *et al.*, 1998). Nagelkerken *et al.* entdeckten bei der Suche nach Rab4a-interagierenden Proteinen ein weiteres Homolog zu Rabaptin-5, das zunächst den Namen Rabaptin-4 erhielt (Nagelkerken *et al.*, 2000). Korobko *et al.* beschrieben die Entdeckung weiterer Rabaptin-5-Proteine (Smirnova *et al.*, 2000 (Rabaptin-5 δ); Korobko *et al.*, 2002 (Rabaptin-5 γ)), die sich als *splice*-Varianten von Rabaptin-5 herausstellten. Da Rabaptin-4 ebenfalls eine *splice*-Variante von Rabaptin-5 darstellt (Korobko *et al.*, 2002), wurde der Name in Rabaptin-5 α geändert (Deneka *et al.*, 2003).

Rabaptin-5 bildet im Cytosol einen Komplex mit dem Rab5-GEF Rabex-5. Der Komplex induziert durch die Aktivierung von Rab5 die eigene Rekrutierung an die Membran. Da Rabaptin-5 die intrinsische GTPase-Aktivität von Rab5 herabsetzt, wird die aktive Form von Rab5 an der Membran stabilisiert, wodurch die Rekrutierung weiterer Effektoren ermöglicht wird (Rybin *et al.*, 1996; Horiuchi *et al.*, 1997). So wird z.B. die Rekrutierung des Rab5-Effektors EEA1 an die Membran durch Rab5•GTP und PI(3)P, einem weiteren Rab5-Effektor, vermittelt. Angesichts der großen Anzahl Rab5-interagierender Proteine und der Vernetzung von Transportwegen durch divalente Effektoren (vgl. Kapitel 1.4.6) ergibt sich das Bild einer komplexen Maschinerie zur Regulation des endosomalen Transportes. Darüber hinaus interagiert Rabaptin-5 mit dem Rab3-Effektor Rabphilin-3a, wodurch eine Verbindung

zwischen der Regulation des endocytotischen und des exocytotischen Transportes hergestellt werden könnte (Ohya *et al.*, 1998; Coppola *et al.*, 2001).

1.4.8 Funktion der Rab-Proteine

Der komplexe Aufbau der eukaryotischen Zelle erfordert eine strikte Kontrolle der Transportprozesse, um die Integrität der intrazellulären Kompartimente zu gewährleisten. Der Transport zwischen zwei Organellen läßt sich dabei grob in vier Teilschritte gliedern: Bildung eines Transportvesikels an der Donormembran (*budding*), Transport des Vesikels durch die Zelle zum Zielort, das Andocken (*tethering/docking*) und schließlich die Verschmelzung des Vesikels mit der Akzeptormembran (*fusion*). Rab-Proteine und ihre Effektoren sind an allen Aspekten des vesikulären Transportes beteiligt. So konnte z.B. gezeigt werden, daß Rab1, welches den COPII-vermittelten Transport zwischen dem Endoplasmatischen Reticulum und dem Golgi-Apparat reguliert, den *tethering*-Faktor p115 an sich bildende Vesikel rekrutiert. p115 interagiert seinerseits mit einem Komplex aus Membrin, rbet1 und Syntaxin-5, einem SNARE-Komplex. Dieser Komplex ist für den gerichteten Transport und die Fusion von COPII-Vesikeln mit dem Golgi-Apparat essentiell. Möglicherweise stellt die Rekrutierung dieses Komplexes bereits bei der Bildung der Vesikel die Informationen für den Zielort bereit (Allan *et al.*, 2000). Der Transport von Membranvesikeln durch die Zelle erfolgt in Wechselwirkung mit dem Cytoskelett der Zelle. Ein Beispiel für die Beteiligung der Rab-Proteine an diesen Transportschritten ist Rab6a, dessen Effektor Rabkinesin6, einem Kinesin-ähnlichen Protein mit einer ATPase-Domäne, mit den Mikrotubuli interagiert (Echard *et al.*, 1998). Für Rab4 konnten Wechselwirkungen mit der *cytoplasmic dynein light intermediate chain*, einem Motorprotein, nachgewiesen werden, deren Funktion bisher allerdings noch unklar sind (Bielli *et al.*, 2001).

Die Annäherung zwischen einem Transportvesikel und der Akzeptormembran wird als *tethering* bezeichnet. Es ist wahrscheinlich, daß dieser erste Kontakt über eine gewisse Distanz hin stattfindet. Bis heute wurden verschiedene Faktoren identifiziert, denen eine Beteiligung am *tethering*-Prozeß zugeschrieben wird, darunter lange *coiled coil*-Proteine und große Proteinkomplexe mit mehreren Untereinheiten. Ein mögliches Modell wäre, daß die *coiled coil*-Proteine mit einem Ende an der Membran verankert sind und mit dem anderen Ende die Umgebung nach passenden Vesikeln „absuchen“ und schließlich binden. Bisher fehlen für einen solchen Mechanismus direkte Beweise, obwohl gezeigt werden konnte, daß *coiled coil*-Proteine an die Akzeptormembran und/oder die Vesikelmembran binden. Die oligomeren *tethering*-Proteinkomplexe werden in zwei Gruppen eingeteilt. Die erste Gruppe weist eine

gemeinsame Domäne im N-terminalen Bereich der Untereinheiten auf. Die Anzahl der Untereinheiten beträgt ein Vielfaches von vier, daher werden diese Komplexe auch als *quatrefoil*-Komplexe bezeichnet. Ein Vertreter dieser Gruppe ist der Exocyst, ein Komplex aus acht Untereinheiten (Sec5p, Sec6p, Sec8p, Sec10p, Sec15p, Exo70, Exo84) aus Hefe, der zuerst als Effektor für die kleine GTPase Sec4p identifiziert wurde (TerBush & Novick, 1995). Die zweite Gruppe der *tethering*-Komplexe besitzt unterschiedlich viele Untereinheiten, die keine gemeinsamen Domänen besitzen. Ein Mitglied dieser Gruppe ist der HOPS-Komplex, der an der Regulierung der homotypischen und heterotypischen Fusion der Vacuole und am Transport vom Golgi-Apparat und den Endosomen zur Vacuole beteiligt ist (Raymond *et al.*, 1997; Price *et al.*, 2000). Der Basis-Komplex besteht aus vier Untereinheiten (Vps11p, Vps16p, Vps18p und Vps33p), die an der Vacuole weitere Untereinheiten (Vps39p, Vps41p) rekrutieren (Wickner, 2002). Vps39p zeigt GEF-Aktivität für Ypt7p, die Aktivierung der GTPase trägt möglicherweise ihrerseits wieder zur Regulierung des Komplexes bei, der auch als Effektor für Ypt7p fungiert (Price *et al.*, 2000; Wurmser *et al.*, 2000). Die genaue Funktion der Rab-Proteine innerhalb des *tethering*-Prozesses ist bisher nicht geklärt, es scheint jedoch keinen allgemeingültigen Mechanismus zu geben, da einige Rab-Proteine vor den *tethering*-Faktoren in Aktion treten, wie im Falle des Exocyst-Komplexes, während andere von *tethering*-Faktoren beeinflusst werden, wie im Falle des HOPS-Komplexes.

Nach der Annäherung durch die *tethering*-Faktoren erfolgt die Membranfusion durch die Interaktion von v- (*vesicle*) und t- (*target*) SNARE-Proteinen auf der Vesikel- und der Akzeptormembran. Verschiedene Studien zeigen, daß Rab-Effektoren direkt mit SNARE-Proteinen wechselwirken. Der Rab5-Effektor EEA1 bildet Komplexe mit den t-SNARE-Proteinen Syntaxin-13 und Syntaxin-6, die wahrscheinlich die Fusion zwischen Endosomen bzw. Transportvesikeln vom Golgi-Apparat mit Endosomen vermitteln (McBride *et al.*, 1999; Simonsen *et al.*, 1999). Ähnliche Interaktionen wurden auch für Ypt7p-Effektorproteine und den SNARE Vam3-Komplex berichtet (Price *et al.*, 2000).

1.5 Zielsetzung

Die Proteine der Rab-Familie sind essentielle Regulatoren des vesikulären Transportes in der Zelle. Der Wechsel zwischen zwei verschiedenen definierten Konformationen durch die Hydrolyse des gebundenen GTP ermöglicht ihnen eine Funktion als molekulare Schalter, die zusammen mit der Lokalisation an spezifische intrazelluläre Kompartimente und der Interaktion mit einer Vielzahl von Effektoren eine zeitliche und räumliche Kontrolle des vesikulären Transportes erlaubt.

Die Untersuchungen der Kristallstrukturen von kleinen GTP-bindenden Proteinen im Komplex mit GDP oder GTP haben wichtige Informationen über den Mechanismus der GTP-Hydrolyse und den möglichen Effektor-bindenden Domänen geliefert. Innerhalb der Rab-Familie wird eine Varianz der intrinsischen Hydrolyseraten beobachtet, die durch die weitgehend konservierten an der Nukleotidbindung beteiligten Aminosäuren nicht erklärt werden kann. Zu Beginn dieser Arbeit lagen noch keine strukturellen Informationen über Rab-Proteine in der GDP-gebundenen Form vor. Die röntgenkristallographische Strukturaufklärung von Rab4a in der GTP- und der GDP-gebundenen Form sollte daher zum Verständnis auf molekularer Ebene beitragen und Vergleiche mit anderen GTP-bindenden Proteinen ermöglichen. Desweiteren sollte die Wechselwirkung von Rab4a mit der Rab4-bindenden Domäne der Effektoren Rabaptin-5 und Rabaptin-5 β charakterisiert und röntgenkristallographisch untersucht werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien waren, wenn nicht anders angegeben, vom Reinheitsgrad „p. a.“ bzw. „reinst“ und wurden von den folgenden Firmen bezogen:

Acetonitril	LGC Promochem GmbH (Wesel)
Acrylamid/Bisacrylamidlösung (37,5:1) 30%	AppliChem (Darmstadt)
ADA	Fluka (Steinheim)
Agar-Agar	Difco (Heidelberg)
Ammoniumdihydrogenphosphat	Fluka (Steinheim)
Ammoniumpersulfat	Serva (Heidelberg)
Ammoniumsulfat	AppliChem (Darmstadt), Fluka (Steinheim)
Ampicillin	Gerbu (Gaiberg)
Bactotrypton	Difco (Heidelberg)
Benzamidin	Sigma-Aldrich (Steinheim)
BICINE	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Calciumchlorid	Baker (Deventer, Holland)
α -Cyano-4-hydroxymizimtsäure	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Coomassie Brilliant Blau R250	Serva (Heidelberg)
Dikaliumhydrogenphosphat	Baker (Deventer, Holland)
Dimethylsulfoxid	Serva (Heidelberg)
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck (Darmstadt)
DTT	Gerbu (Gaiberg)
EDTA	Fluka (Steinheim)
Essigsäure 100%	Baker (Deventer, Holland)
Ethanol	Merck (Darmstadt)
Ethidiumbromid	Serva (Heidelberg)
Glutathion	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Glycerin	Gerbu (Gaiberg), Fluka (Steinheim)
Glycin	Roth (Karlsruhe)

Guaninidin-HCl	Gerbu (Gaiberg)
Hefeextrakt	Difco (Heidelberg)
HEPES	Gerbu (Gaiberg), Fluka (Steinheim)
Imidazol	Merck (Darmstadt)
Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid	Gerbu (Gaiberg)
Kaliumchlorid	Baker (Deventer, Holland)
Kaliumdihydrogenphosphat	Baker (Deventer, Holland)
Kaliumnatriumtartrat	Fluka (Steinheim)
Magnesiumacetat	Fluka (Steinheim)
Magnesiumchlorid	Baker (Deventer, Holland)
Magnesiumsulfat	Fluka (Steinheim)
2-Mercaptoethanol	Serva (Heidelberg)
MES	Fluka (Steinheim)
Monomethylether PEG 550 und 2000	Fluka (Steinheim)
Natriumacetat	Baker (Deventer, Holland), Fluka (Steinheim)
Natriumchlorid	Fluka (Steinheim)
Natriumcitrat	Fluka (Steinheim)
Natriumdihydrogenphosphat	Baker (Deventer, Holland)
Natriumdodecylsulfat	Gerbu (Gaiberg)
Natriumhydroxid	Baker (Deventer, Holland)
Natriumkakodylat	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Natriummalat	Fluka (Steinheim)
Nickelsulfat	Riedel-de-Haen (Seelze)
2-Nitro-5-thiobenzoessäure	Sigma-Aldrich (Steinheim)
PEG 4000, 8000 und 20000	Fluka (Steinheim)
Phenylmethylsulfonylfluorid	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Salzsäure (36%)	Baker (Deventer, Holland)
Sinapinsäure	Sigma-Aldrich (Steinheim)
TEMED	Serva (Heidelberg)
Tetrabutylammoniumbromid	Fluka (Steinheim)
Trifluoressigsäure	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan	Roth (Karlsruhe), Fluka (Steinheim)
Tween20	Serva (Heidelberg)
Wasserstoffperoxid (30%)	Serva (Heidelberg)

Zinkacetat	Fluka (Steinheim)
Zinkchlorid	Fluka (Steinheim)

2.1.2 Enzyme

Restriktionsenzyme	New England Biolabs (Beverly, USA)
	Invitrogen (Karlsruhe)
Pfu-Polymerase	Stratagene (La Jolla, USA)
DNase I	Roche (Mannheim)
Faktor Xa	New England Biolabs (Beverly, USA)
alkalische Phosphatase (Kälberdarm)	Roche (Mannheim)
Phosphodiesterase I Typ II aus <i>Crotalus adamanteus</i>	Sigma-Aldrich (Steinheim)

Die TEV-Protease (mit His-Tag) wurde von D. Jahnert (AG Scheidig) exprimiert und gereinigt.

2.1.3 Geräte

Agarose Minigelkammer	MWG Biotech (Ebersberg)
Analysenwaage Sartorius Basic BP110 S	Sartorius (Göttingen)
Centricon 10 kDa MWG cut-off	Millipore (Bedford, USA)
Centrifuge 5415 C	Eppendorf (Hamburg)
Centrifuge 5810 R	Eppendorf (Hamburg)
Fluoreszenzspektrometer Aminco SLM8100	Sopra GmbH (Büttelborn)
Gelelektrophoreseapparatur Mini Protean2	BioRad (München)
Geltrockner Modell 543	BioRad (München)
Heizblock Dri-Block DB2A	Techne (Cambridge, Großbritannien)
HPLC-System Gold, Pumpensystem 125, Dioden-Array Detektor-Modul 168, Analog- Interface-Modul 406	Beckmann (München)
Microcon 10 kDa MWG cut-off	Millipore (Bedford, USA)
Microfluidizer	Microfluidics (Newton, Massachusetts, USA)
Netzgerät Power PAC 300	BioRad (München)

pH-Meter 761 Calimatic	Knick (Berlin)
Polaroid Kamera MP4+	Hoefler Scientific Instruments (San Francisco, USA)
Schreiber	Linseis (Selb)
Schüttler (für Expressionskulturen)	New Brunswick Scientific Co. Inc. (Edison, USA)
Schüttler KS 250 basic (für Gele)	IKA Labortechnik (Staufen)
Sorval Centrifuge RC-5B	Kendro (Düsseldorf)
Ultraschallbad Sonorex Super RK 103 H	Bandelin (Berlin)
UV-Visible-Spectrophotometer	Shimadzu (Düsseldorf)
Waters 650E Advanced Protein Purification System mit 490E Multiwavelength Detector	Millipore (Bedford, USA)

2.1.4 Säulen

GSH Superflow (Matrix)	Amersham Biosciences (Freiburg)
HiTrap HIC Selection Kit	Amersham Biosciences (Freiburg)
HiTrap IEX Selection Kit	Amersham Biosciences (Freiburg)
Hypersil-C18 25/4,6 (HPLC)	Bischoff (Leonberg)
Ni-NTA Superflow (Matrix)	Qiagen (Hilden)
PD-10 (Gelfiltration)	Amersham Biosciences (Freiburg)
Q-Sepharose (Matrix)	Amersham Biosciences (Freiburg)
Superdex 75 16/60 (Gelfiltration)	Amersham Biosciences (Freiburg)
Superdex 75 HR10/30 (Gelfiltration)	Amersham Biosciences (Freiburg)

Leersäulen für die Säulenmatrices wurden von der ZE Wissenschaftliche Meßtechnik gebaut.

2.1.5 Oligodesoxynukleotide

Name	Sequenz (5'→3')	Verwendung	Firma
pGEX-5'	GGGCTGGCAAGCCACGTTTGGTG	Sequenzierung	Amersham Biosciences (Freiburg)
pGEX-3'	CCGGGAGCTGCATGTGTCAGAGG	Sequenzierung	Amersham Biosciences (Freiburg)
GST-Rab4-Rev1	TCCTACTCGAGCTACTCCTGAGCG TTCGGGGCCTGGGCGCGCCC	PCR, Rab4-t2 aus pGEX-5X-1-Rab4	IBA GmbH (Göttingen)
GST-Rab4-Rev2	TACTGCTCGAGCTAGCCCATCTT TCTGG	PCR, Rab4-t3 aus pGEX-5X-1-Rab4	IBA GmbH (Göttingen)
GST-Rab4-Rev3	TCTGGCTCGAGCTAACCTGATTCTG ATTTTG	PCR, Rab4-t4 aus pGEX-5X-1-Rab4	IBA GmbH (Göttingen)
GST-Rab4-Dir	CCCCGATTTCCATATGTCCGAAAC CTACG	PCR für Rab4-t2, -t3, -t4 aus pGEX-5X-1- Rab4	IBA GmbH (Göttingen)
T7 Promotor	TAATACGACTCACTATAGGG	Sequenzierung	Invitrogen (Karlsruhe)
T7 Terminator	GCTAGTTATTGCTCAGCGG	Sequenzierung	Invitrogen (Karlsruhe)

2.1.6 Vektoren und Expressionsplasmide

pGEX-5X-1	mit Faktor Xa-Protease-Schnittstelle zur Entfernung des N-terminalen GST-Affinitätstags, Amersham Biosciences (Freiburg)
pET22b	Novagen (Bad Soden)
pGATEV	pGAT-2 (Peränen <i>et al.</i> , 1996) mit TEV-Protease-Schnittstelle zur Entfernung des N-terminalen 6His-GST-Affinitätstags (V. Yurchenko & A. Iakovenko, Max-Planck-Institut, Dortmund)
pHISTEV	mit TEV-Protease-Schnittstelle zur Entfernung des N-terminalen 6His-Affinitätstags (V. Yurchenko & A. Iakovenko, Max-Planck-Institut, Dortmund)

Für die Expression der Proteine wurden die folgenden Plasmide verwendet:

pGEX-5X-1-Rab4	Rab4a wt (Wildtyp)	(M. Zerial) ²
pHISTEV-Rab4-t1	Rab4-t1 ¹ (Rab4a (Δ C 15))	(A. Scheidig, M. Rothmann) ³
pHISTEV-Rab4-t2	Rab4-t2 (Rab4a (Δ C 3))	(R. Krebs, S. Huber) ³
pHISTEV-Rab4-t3	Rab4-t3 (Rab4a (Δ C 29))	(R. Krebs, S. Huber) ³
pHISTEV-Rab4-t4	Rab4-t4 (Rab4a (Δ C 37))	(R. Krebs, S. Huber) ³
pGATEV-Rab4-t1	Rab4-t1 (Rab4a (Δ C 15))	(A. Scheidig, M. Rottmann) ³
pGATEV-R5a-N2	R5a-N2 (Rabaptin-5 α 1-135)	(A. Scheidig, M. Rottmann) ³
pGATEV-R5b-N1	R5b-N1 (Rabaptin-5 β 1-178)	(A. Scheidig, M. Rottmann) ³
pET22b-R5b-N1	R5b-N1 (Rabaptin-5 β 1-178)	(R. Krebs) ³

1: Rab4-t1 steht für Rab4a truncated construct 1

2: MPI für molekulare Zellbiologie und Genetik

3: AG Scheidig

2.1.7 Bakterienstämme

<i>E. coli</i> XL1-Blue	Klonierung, DNA-Präparation
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	Expression (pHISTEV-Rab4-t1, pGATEV-Rab4-t1, pGATEV-R5a-N2, pGATEV-R5b-N1)
<i>E. coli</i> BL21(DE3 RIL)	Expression (pHISTEV-Rab4-t2, pHISTEV-Rab4-t3, pHISTEV-Rab4-t4, pGEX-5X-1-Rab4, pET22b-R5b-N1)

2.1.8 Medien

LB-Medium	1% (w/v) Bactotrypton, 0,5% (w/v) Hefeextrakt, 1% (w/v) NaCl,
LB-Agar	1% (w/v) Bactotrypton, 0,5% (w/v) Hefeextrakt, 1% (w/v) NaCl, 1,5% (w/v) Agar-Agar

LB-Medium und LB-Agar-Platten mit verschiedenen Antibiotika wurden von der ZE Biotechnologie hergestellt.

2.1.9 Nukleotide

Guanosindiphosphat (GDP) und Guanosintriposphat (GTP) wurden von der Firma Fluka (Steinheim) mit einem Reinheitsgrad von 95% bezogen. Die nicht hydrolysierbaren GTP-Analoga Guanosin-5'-O-(β,γ -imidodiphosphat) (GppNHp) und Guanosin-5'-O-(β,γ -methylendiphosphat) (GppCH₂p) wurden von den Firmen Sigma-Aldrich (Steinheim) und Pharma Waldhoff (Düsseldorf) bezogen und von S. Gentz (AG Goody) nachgereinigt. Fluoreszenzmarkiertes Methylanthaniloyl-GppNHp (mant-GppNHp) wurde von S. Gentz synthetisiert.

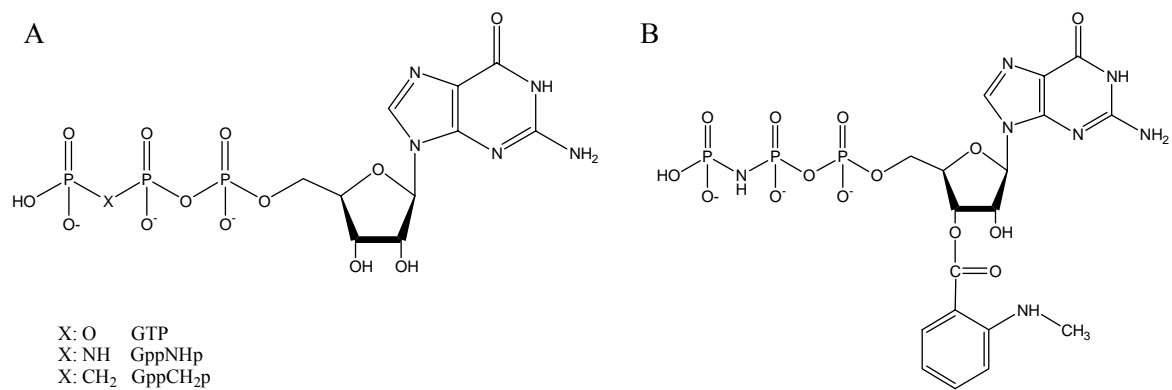


Abbildung 2.1: Strukturen von GTP bzw. GTP-Analoga (A) und mant-GppNHp (B)

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 Agarose-Gelelektrophorese

Die Analyse und Reinigung von DNA-Fragmenten erfolgte in 1%igen Agarosegelen in TAE-Puffer, denen zur Färbung der DNA 0,5 µg/ml Ethidiumbromid zugesetzt wurde. Die Proben wurden vor dem Auftragen mit 1/6 Volumenäquivalent Probenpuffer versetzt. Die Elektrophorese wurde in Flachbettkammern bei 90 V durchgeführt. Die Detektion der DNA wurde bei 312 nm mit einem UV-Transiluminator durchgeführt und mit einer Polaroidkamera dokumentiert. Zur Bestimmung der Fragmentgröße wurde ein DNA-Größenstandard (DNA Ladder, New England Biolabs (Beverly, USA)) aufgetragen.

- TAE-Puffer: 200 mM Tris/Acetat pH 8,0, 5 mM EDTA
- Probenpuffer : 0,25% (w/v) Bromphenolblau, 30% (v/v) Glycerin

2.2.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Amplifizierung von DNA-Fragmenten erfolgte mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR *polymerase chain reaction*) (Mullis *et al.*, 1992). Der PCR-Ansatz setzte sich zusammen aus 50 ng DNA, 20 pmol jedes Primers, 20 µmol dNTPs (Roche, Mannheim), 5 µl 10x Puffer und 1 µl Pfu-Polymerase in einem Gesamtvolumen von 50 µl. Die DNA-Amplifizierung wurde in 25 Zyklen mit je drei Schritten durchgeführt: 1. Denaturierung der dsDNA bei 96°C für 45 s, Hybridisierung der Primer bei 60°C für 45 s und DNA-Polymerisation bei 72°C für 90 s. Die Reinigung des PCR-Ansatzes wurde mit dem Qiaquick PCR Purification Kit von Qiagen (Hilden) durchgeführt.

2.2.3 Restriktion

Die Restriktion der DNA wurde mit Restriktionsenzymen von New England Biolabs (Beverly, USA) und Invitrogen (Karlsruhe) in den mitgelieferten Puffern durchgeführt. Zur Linearisierung des pHISTEV-Vektors wurden die Enzyme Nde I und Sal I verwendet, die Restriktion der PCR-Fragmente erfolgte mit Nde I und Xho I. Für den Reaktionsansatz wurden ~ 2 µg DNA mit 5 U Enzym/µg DNA im jeweiligen Reaktionspuffer gemischt und 1 h bei 37°C inkubiert. Die Reinigung des Reaktionsansatzes wurde mit dem Gel Extraction Kit von Qiagen (Hilden) durchgeführt.

2.2.4 Ligation

Zur Ligation des linearisierten pHISTEV-Vektors und des Inserts (PCR-Fragment nach Restriktion) wurden ~ 70 ng des Vektors mit ~ 15 ng des PCR-Fragmentes mit 1 U T4-Ligase in 10 µl Ligasepuffer 4 h bei Raumtemperatur inkubiert, danach wurde die Ligase durch Inkubation des Ansatzes bei 65°C für 10 min inaktiviert. Der Ligationsansatz wurde ohne weitere Nachreinigung direkt für die Transformation (Kapitel 2.2.8) in XL1-Blue-Zellen verwendet.

2.2.5 Sequenzierung

Für die DNA-Sequenzierung wurde das BigDye Terminator Sequencing Kit (Applied Biosystems, Weiterstadt) verwendet. Die Analyse erfolgte mit dem ABI 3100 DNA Sequenzierungsapparat (Applied Biosystems, Weiterstadt) und wurde von R. Anders (ZE Biotechnologie) durchgeführt.

2.2.6 Präparation von DNA

Die Isolierung von Plasmid-DNA wurde mit dem Plasmid Mini Kit von Qiagen (Hilden) durchgeführt. Dazu wurden je 3 ml LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin mit Einzelkolonien von Agarplatten (nach Transformation des Ligationsansatzes bzw. von ausgestrichener Dauerkultur) angeimpft und über Nacht bei 37°C kultiviert. Die Übernachtskulturen wurden zentrifugiert (5 min, 5000×g, 25°C) und die Zellpellets nach der Anleitung des Herstellers aufgearbeitet. Die gereinigte DNA wurde in sterilem Wasser aufgenommen und bei -20°C gelagert.

2.2.7 Herstellung elektrokompenter Zellen für die Elektroporation

Für die Herstellung elektrokompenter Zellen wurden 500 ml LB-Medium ohne Antibiotikum mit einer Übernachtskultur so angeimpft, daß eine OD₆₀₀ von ~ 0,05 erreicht wurde. Die Zellen wurden bis zu einer OD₆₀₀ von ~ 0,8 bei 37°C kultiviert und dann 20 min auf Eis inkubiert. Durch Zentrifugation (15 min, 4°C, 2700×g) wurden die Zellen vom Medium getrennt, in 400 ml 5%igem sterilem, eiskalten Glycerin resuspendiert und erneut zentrifugiert. Der Vorgang wurde wiederholt und das erhaltene Zellpellet in 20 ml 20%igem sterilem, eiskalten Glycerin resuspendiert. Die Zellsuspension wurde zentrifugiert und die

Zellen in 2,5 ml 20%igem sterilem, eiskaltem Glycerin aufgenommen, aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C aufbewahrt.

2.2.8 Transformation durch Elektroporation

Die DNA wurde für die Transformation möglichst salzfrei präpariert. Für die Herstellung von Plasmid-DNA wurden die Plasmide in den *E. coli*-Stamm XL1-Blue, für die Expression von rekombinanten Proteinen in die *E. coli*-Stämme BL21 (DE3) und BL21 (DE3, RIL) transformiert. Die Transformation wurde durch Elektroporation durchgeführt, indem die Membran der *E. coli*-Zellen durch einen kurzen Stromstoß für die Plasmide durchlässig gemacht wurde. 80 μl einer 20%igen Glycerinlösung kompetenter Zellen wurden mit 20 ng DNA versetzt und 1 min auf Eis inkubiert. Der Transformationsansatz wurde dann in eine spezielle gekühlte Elektroporationsküvette gefüllt und in das Transformationsgerät eingesetzt. Die elektrische Entladung wurde bei einem Elektrodenabstand von 2 mm mit einer Spannung von 2,5 kV, einem Widerstand von 800 Ω , einer Kapazität von 25 μF und mit einer Zeitkonstante von 5-10 ms durchgeführt. Danach wurde der Transformationsansatz in 1 ml LB-Medium ohne Antibiotikum aufgenommen und 1 h bei 37°C im Schüttler inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden 10 und 100 μl des Transformationsansatzes auf antibiotikahaltigen LB-Agarplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

2.2.9 Expression

Die verschiedenen Rab4- und Rabaptin-5-Konstrukte wurden rekombinant in den *E. coli*-Stämmen BL21 (DE3) und BL21 (DE3, RIL) exprimiert. In den zur Expression verwendeten Vektoren steht das Zielgen unter der Kontrolle eines T7-Polymerase spezifischen Promotors. Die Stämme BL21 (DE3) und BL21 (DE3, RIL) enthalten den defekten Prophagen DE3, der das Gen für die T7-Polymerase enthält. Die Transkription dieses Gens wird von dem IPTG-induzierbaren lacUV5-Promotor kontrolliert. Nach der Zugabe von IPTG wird das Zielgen transkribiert, wodurch eine kontrollierte Überexpression des Proteins möglich ist. Der Stamm BL21 (DE3, RIL) besitzt darüber hinaus ein weiteres Plasmid, das zusätzliche tRNAs kodiert, deren Triplet-Codons in *E. coli* selten verwendet werden (R: Arginin, I: Isoleucin, L: Leucin), wodurch häufig die Ausbeute eukaryotischer Proteine erhöht werden kann. Für die Expression wurden 5 l LB-Medium mit 100 $\mu\text{g/ml}$ Ampicillin mit einer Übernachtskultur so angeimpft, daß eine OD_{600} von 0,05-0,1 erreicht wurde. Die Expressionskultur wurde in Schikanekolben bei 30°C in einem Schüttelinkubator kultiviert

(150 rpm). Zur Induktion der Überexpression wurden bei einer OD_{600} von 0,6-0,8 0,3 mM IPTG zugesetzt. Die Ernte der Bakterien erfolgte 3 h nach der Induktion durch Zentrifugation ($\sim 4200\times g$, $4^\circ C$, 15 min), das Zellpellet wurde in eisgekühltem ST-Puffer² bzw. STE-Puffer resuspendiert und nach erneuter Zentrifugation in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei $-80^\circ C$ gelagert.

- ST-Puffer: 150 mM NaCl, 20 mM Tris/HCl, pH 7,5
- STE-Puffer: ST-Puffer mit 1 mM EDTA

² ST-Puffer bei Verwendung von Ni-NTA-Matrix nach dem Aufschluß, um Inaktivierung der Matrix durch Komplexierung der Ni-Ionen zu vermeiden.

2.3 Proteinchemische Methoden

2.3.1 Proteinreinigung

Die Säulenchromatographie wurde für alle gereinigten Proteine mit dem Waters-System bei 4°C durchgeführt. Die Puffer wurden filtriert und entgast.

2.3.1.1 Rab4a wt mit N-terminalem GST-Affinitätstag

Die Zellen wurden aufgetaut, in Lysepuffer resuspendiert und in einem Microfluidizer bei einem Druck von 600 kPa aufgeschlossen, wobei die Druckzelle gekühlt wurde. Nach dem Aufschluß wurden 0,1% Tween20 zugefügt und 15 min bei 4°C gerührt. Die Abtrennung der Zelltrümmer erfolgte durch Zentrifugation (48000×g, 4°C, 1 h). Der Überstand wurde filtriert und mit einer Flußrate von 1 ml/min auf eine mit Puffer A äquilibrierte GSH-Superflow Affinitätssäule (Säulenvolumen 10 ml) aufgetragen. Nach dem Auftragen wurde die Säule mit Puffer A bis zum Erreichen der Basislinie gewaschen. GST-Rab4a wt wurde in einem linearen Gradienten von 0-100% Puffer B über 6 Säulenvolumina eluiert. GST-Rab4a wt-haltige Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE identifiziert, vereinigt, über Nacht bei 4°C gegen 3 l Puffer C dialysiert und am nächsten Tag durch Membranfiltration konzentriert. Das Protein wurde dann in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

- Lysepuffer: 15 mM NaP_i pH 7,5, 150 mM NaCl, 5 mM 2-Mercaptoethanol, 1 mM MgCl₂, 5% (v/v) Glycerin, 1 mM PMSF, 1 mM Benzamidin, 100 µg DNase I
- Puffer A: 15 mM NaP_i pH 7,5, 150 mM NaCl, 5 mM 2-Mercaptoethanol, 1 mM MgCl₂, 5% (v/v) Glycerin, 0,1% (v/v) Tween20
- Puffer B: Puffer A mit 20 mM Glutathion
- Puffer C: 50 mM Tris/HCl pH 8,0, 150 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 5 mM 2-Mercaptoethanol

2.3.1.2 Rab4-t1, -t2, -t3, -t4 mit N-terminalem His-Affinitätstag

Die Zellen wurden wie in Kapitel 2.3.1.1 beschrieben aufgeschlossen, zentrifugiert und der filtrierte Überstand mit einer Flußrate von 1 ml/min auf eine mit Puffer A äquilibrierte Ni-NTA-Superflow Affinitätssäule aufgetragen. Die Säule wurde mit Puffer A bis zum Erreichen der Basislinie gewaschen, unspezifisch gebundene Proteine wurden durch Waschen mit 6

Säulenvolumina 4% Puffer B entfernt. His-Rab4-Konstrukte wurden in einem linearen Gradienten von 4-100% Puffer B über 8 Säulenvolumina eluiert. His-Rab4-haltige Fraktionen wurden mittels SDS-Page identifiziert, vereinigt, über Nacht gegen 3 l Puffer C dialysiert und am nächsten Tag durch Membranfiltration konzentriert. Je nach Verwendung wurde dann der His-Tag abgespalten (Kapitel 2.3.2.2) oder das Protein in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

- Lysepuffer: 25 mM NaP_i pH 7,5, 300 mM NaCl, 2 mM 2-Mercaptoethanol, 1 mM MgCl_2 , 5% (v/v) Glycerin, 1 mM PMSF, 1 mM Benzamidin, 100 μg DNase I
- Puffer A: 25 mM NaP_i pH 7,5, 300 mM NaCl, 2 mM 2-Mercaptoethanol, 1 mM MgCl_2 , 5% (v/v) Glycerin, 0,1% (v/v) Tween20
- Puffer B: Puffer A mit 500 mM Imidazol
- Puffer C: 50 mM Tris/HCl pH 8,0, 150 mM NaCl, 1 mM MgCl_2 , 1 mM 2-Mercaptoethanol

2.3.1.3 R5a-N2, R5b-N1, Rab4-t1 mit N-terminalem His-GST-Affinitätstag

Der Zellaufschluß und die Reinigung über eine GSH-Superflow Affinitätssäule erfolgten wie in Kapitel 2.3.1.1 beschrieben. Die GST-Fusionsproteine wurden in einem linearen Gradienten von 0-100% Puffer B über 6 Säulenvolumina eluiert. Die proteinhaltigen Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE identifiziert, vereinigt, über Nacht gegen 3 l Puffer C dialysiert und am nächsten Tag durch Membranfiltration konzentriert. Je nach Verwendung wurde der His-GST-Tag abgespalten (Kapitel 2.3.2.2) oder das Protein in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

- Lysepuffer: 15 mM NaP_i pH 7,5, 150 mM NaCl, 5 mM DTT, 5% (v/v) Glycerin, 1 mM PMSF, 1 mM Benzamidin, 100 μg DNase I
- Puffer A: 15 mM NaP_i pH 7,5, 150 mM NaCl, 5 mM DTT, 5% (v/v) Glycerin, 0,1% (v/v) Tween20
- Puffer B: Puffer A mit 20 mM Glutathion
- Puffer C: 50 mM Tris/HCl pH 8,0, 150 mM NaCl, 5 mM 2-Mercaptoethanol

Bei der Reinigung von Rab4-t1 als GST-Fusionsprotein enthielten die Puffer zusätzlich 1 mM MgCl_2 .

2.3.1.4 R5b-N1 ohne Affinitätstag

Die Zellen wurden wie in Kapitel 2.3.1.1 beschrieben aufgeschlossen, der filtrierte Überstand wurde mit einer Flußrate von 1,5 ml/min auf eine mit Puffer A äquilibrierte Q-Sepharose Anionenaustauschersäule aufgetragen und die Säule bis zum Erreichen der Basislinie mit Puffer A gewaschen. R5b-N1 wurde mit 8 Säulenvolumina 5% Puffer B eluiert, die anderen zellulären Proteine wurden in einem linearen Gradienten von 5-100% Puffer B über 8 Säulenvolumina eluiert. R5b-N1-haltige Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE identifiziert, vereinigt, über Nacht gegen 3 l Puffer C dialysiert und durch Membranfiltration konzentriert. Für den zweiten Reinigungsschritt wurde erneut die Q-Sepharose Anionenaustauschersäule verwendet. R5b-N1 wurde auf die mit Puffer C äquilibrierte Säule aufgetragen und mit einem Stufengradienten von 6 Säulenvolumina 10% Puffer D und 6 Säulenvolumina 15% Puffer D eluiert. Dem Stufengradienten folgte ein linearer Gradient über 8 Säulenvolumina 15-100% Puffer D, in dem verbliebene zelluläre Proteine eluierten. Die R5b-N1-haltigen Fraktionen wurden über SDS-PAGE ermittelt, vereinigt und durch Membranfiltration konzentriert. Bis zur weiteren Verwendung wurde R5b-N1 in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

- Lysepuffer: 25 mM NaP_i pH 7,0, 25 mM NaCl, 2 mM 2-Mercaptoethanol, 1 mM PMSF, 1 mM Benzamidin, 100 µg DNase I
- Puffer A: 20 mM NaP_i pH 7,0, 25 mM NaCl, 2 mM 2-Mercaptoethanol
- Puffer B: Puffer A mit 1 M NaCl
- Puffer C: 50 mM Tris/HCl pH 7,5, 2 mM 2-Mercaptoethanol
- Puffer D: Puffer C mit 1 M NaCl

2.3.2 Abspaltung von Affinitätstags

2.3.2.1 Proteolyse mit Faktor Xa

Rab4a wt wurde mit einem N-terminalen GST-Affinitätstag hergestellt. Das Fusionsprotein wies eine Schnittstelle für Faktor Xa auf, um den Affinitätstag abtrennen zu können. Rab4a wt wurde in Faktor Xa-Spaltpuffer umgepuffert und nach Zugabe des Enzyms (Verhältnis Enzym:Protein 1:500) 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Die Spaltungsreaktion wurde mittels SDS-PAGE überprüft. Dabei stellte sich heraus, daß Faktor Xa Rab4a wt unspezifisch abbaut, deshalb wurde nach mehreren Testversuchen die Reaktion nicht mehr durchgeführt.

- Faktor Xa-Spaltpuffer: 20 mM Tris/HCl pH 8,0, 100 mM NaCl, 2 mM CaCl₂

2.3.2.2 Proteolyse mit TEV-Protease

Rab4-t1, Rab4-t2, Rab4-t3, Rab4-t4, R5a-N2 und R5b-N1 wurden als N-terminale His- bzw. His-GST-Tag-Fusionsproteine mit einer TEV-Proteaseschnittstelle produziert. Die Proteine wurden in TEV-Spaltpuffer umgepuffert, im molaren Verhältnis 25:1 mit TEV-Protease versetzt und über Nacht bei 4°C inkubiert. Die Reinigung des Spaltungsansatzes erfolgte über eine Ni-NTA-Superflow Affinitätssäule, wobei die TEV-Protease und der abgespaltene His- bzw. His-GST-Tag abgetrennt wurden. Das abgespaltene Protein befand sich im Durchfluß. Nach dem Einengen durch Membranfiltration wurde als letzter Reinigungsschritt eine Gelfiltration über eine Superdex 75 Säule angeschlossen. Die proteinhaltigen Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE ermittelt, vereinigt und eingengt. Das konzentrierte Protein wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

- TEV-Spaltpuffer: 50 mM Tris/HCl pH 8,0, 150 mM NaCl, 2 mM 2-Mercaptoethanol
- Gelfiltrationspuffer (Rabaptin-5-Konstrukte): 50 mM Tris/HCl pH 7,5, 150 mM NaCl, 2 mM 2-Mercaptoethanol
- Gelfiltrationspuffer (Rab4-Konstrukte): 50 mM Tris/HCl pH 7,5, 150 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 2 mM 2-Mercaptoethanol, 10 µM GDP

2.3.3 SDS-Gelelektrophorese

Die Auftrennung von Proteinen zur Reinheits- und Molekulargewichtsbestimmung wurde nach der Methode der diskontinuierlichen Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) nach Laemmli (Laemmli, 1970) durchgeführt. Die Proteine wurden im Verhältnis 1:1 mit SDS-Probenpuffer vermischt und durch Erhitzen bei 95°C für 5 min denaturiert. Danach wurden die Proben auf ein aus Sammel- und Trenngel bestehendes Polyacrylamidgel aufgetragen und durch Anlegen eines elektrischen Feldes (40 mA pro Gel) getrennt. Nach der Elektrophorese wurde das Gel 15 min in Coomassie-Lösung gefärbt und anschließend in Entfärbelösung entfärbt. Als Molekulargewichtsstandard wurde der LMW (*low molecular weight*) Marker von Amersham Biosciences (Freiburg) mit den folgenden Proteinen verwendet: Phosphorylase b (94 kDa), Rinderserumalbumin (66 kDa), Ovalbumin (45 kDa), Carboanhydrase (30 kDa), Trypsininhibitor (20,1 kDa), α -Lactalbumin (14,4 kDa).

- Sammelgel: 5% Acrylamid/Bisacrylamid (37,5:1), 125 mM Tris/HCl pH 6,8, 0,06% (w/v) SDS, 50 μ l 10% (w/v) APS und 5 μ l TEMED pro 10 ml Gel zum Polymerisationsstart
- Trenngel: 15% Acrylamid/Bisacrylamid (37,5:1), 375 mM Tris/HCl pH 8,8, 0,1% (w/v) SDS, APS- und TEMED-Zugabe s. Sammelgel
- Sammelgelpuffer: 0,5 M Tris/HCl pH 6,8, 0,4% (w/v) SDS
- Trenngelpuffer: 1,5 M Tris/HCl pH 8,8, 0,4% SDS (w/v) SDS
- SDS-Probenpuffer: 62,5 mM Tris/HCl pH 6,8, 25% (v/v) Glycerin, 2% (w/v) SDS, 0,04% (w/v) Bromphenolblau, 20% (v/v) β -Mercaptoethanol
- Laufpuffer: 250 mM Tris-Base, 2 M Glycin, 1% (w/v) SDS
- Coomassie-Lösung: 0,1% (w/v) Coomassie Blau R250, 40% (v/v) Ethanol, 10% (v/v) Essigsäure
- Entfärbelösung: 10% (v/v) Ethanol, 5% (v/v) Essigsäure

2.3.4 Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford

Die Konzentration von Proteinlösungen wurde nach der Methode von Bradford (Bradford, 1976) bestimmt. Dabei wurden 5-10 μl Proteinlösung (0,1-1 mg/ml) mit Wasser auf 800 μl aufgefüllt, mit 200 μl Bradfordreagenz gemischt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Extinktion wurde bei 595 nm gemessen und die Proteinkonzentration über den Vergleich mit einer BSA-Eichgerade ermittelt. Die Konzentrationsbestimmung wurde als Doppelbestimmung durchgeführt.

- Bradford-Reagenz, BSA-Eichlösung: Bradford-Kit von BioRad (München)

2.3.5 Proteinfragmentierung mit 2-Nitro-5-thiobenzoessäure (NTCB)

Proteine wurden für analytische Zwecke mit NTCB spezifisch vor Cysteinen gespalten (Wu *et al.*, 1996). Dazu wurden ca. 40 μg Protein mit 20 μl NTCB-Lösung versetzt und 30 min bei 25°C inkubiert. Danach wurde der pH-Wert durch Zugabe von 3 M Tris auf \sim pH 9 gebracht und der Reaktionsansatz 16 h bei 37°C inkubiert. Für die massenspektrometrische Analyse (Kapitel 2.4.1.1) der entstandenen Fragmente wurden die Proben 1:50 mit 50% Acetonitril/0,05% TFA verdünnt.

- NTCB-Lösung: 1 mg NTCB in 500 μl 10 mM Tris/HCl pH 8,0, 6 M Guanidin/HCl

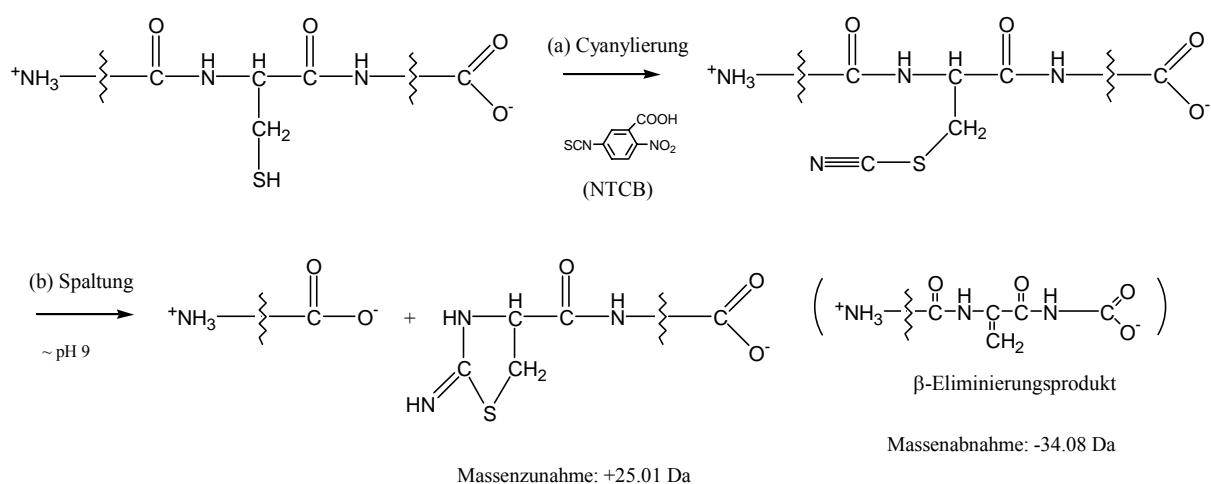


Abbildung 2.2: Reaktionsschema der NTCB-Spaltung

2.3.6 Nukleotidaustausch

Die verschiedenen Rab4-Konstrukte wurden als 1:1 Komplexe mit GDP, das über ein Magnesiumion koordiniert ist, gereinigt. Für den Nukleotidaustausch wurden zwei Verfahren angewendet, die EDTA-Methode und der enzymatische Abbau mit alkalischer Phosphatase (Tucker *et al.*, 1986).

2.3.6.1 EDTA-Methode

Bei der EDTA-Methode wurde die Dissoziation von gebundenem Nukleotid durch die Zugabe von EDTA und der damit verbundenen Komplexierung der Magnesiumionen erhöht. Dadurch konnte im Überschuß angebotenes Nukleotid gebunden und durch die erneute Zugabe von Magnesiumionen fixiert werden.

Die Proteinlösung wurde mit 20 mM EDTA versetzt und 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. EDTA, freies Nukleotid und Magnesiumionen wurden durch Gelfiltration (Puffer A) über eine PD-10-Säule abgetrennt. Das auszutauschende Nukleotid wurde im 10-15fachen Überschuß zugegeben und der Ansatz eine weitere Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Zugabe von 30 mM Magnesiumchlorid zur Fixierung des Nukleotids wurde nicht gebundenes Nukleotid durch Gelfiltration (Puffer B) über eine PD-10-Säule abgetrennt. Der Austausch wurde mittels HPLC-Analyse überprüft (Kapitel 2.4.2).

- Puffer A: 40 mM HEPES/NaOH pH 7,5, 5 mM 2-Mercaptoethanol
- Puffer B: 40 mM HEPES/NaOH pH 7,5, 5 mM MgCl₂, 5 mM 2-Mercaptoethanol

2.3.6.2 Enzymatischer Abbau mit alkalischer Phosphatase

Der enzymatische Abbau von GDP durch alkalische Phosphatase wurde für den Austausch von GDP gegen nicht hydrolysierbare Nukleotide wie GppNHp verwendet. Durch den vollständigen Abbau von GDP konnte mit einem geringeren Überschuß an Nukleotid gearbeitet werden. Nach dem Austausch wurde das Nukleotid durch Zugabe von Magnesiumionen fixiert.

Die Proteinlösung wurde durch Gelfiltration über eine PD-10-Säule in NE-Puffer umgepuffert, das darin enthaltene Ammoniumsulfat erhöhte die Dissoziation des gebundenen GDP. Das auszutauschende Nukleotid wurde im 3-5fachen Überschuß zugegeben, der Abbau des GDP erfolgte durch die Zugabe von 5 U/mg alkalischer Phosphatase. Der Ansatz wurde bei Raumtemperatur inkubiert und die Reaktion über HPLC-Analyse verfolgt. Nach dem

vollständigen Abbau des GDP wurden zur Fixierung des Nukleotids 10 mM Magnesiumchlorid zugesetzt. Überschüssiges Nukleotid und das Abbauprodukt Guanosin wurden durch Gelfiltration über eine PD-10-Säule abgetrennt.

- NE-Puffer: 50 mM Tris/HCl pH 8,5, 200 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 5 mM DTT, 10 μM ZnCl_2
- Gelfiltrationspuffer: 20 mM Tris/HCl pH 7,5, 25 mM NaCl, 5 mM MgCl_2 , 1 mM 2-Mercaptoethanol, oder 40 mM HEPES/NaOH pH 7,5, 5 mM MgCl_2 , 5 mM 2-Mercaptoethanol

2.3.7 Nukleotidbefreiung

Die Nukleotidbefreiung erfolgte in zwei Schritten. Im ersten Schritt wurde ein Nukleotidaustausch mit alkalischer Phosphatase durchgeführt, wobei GDP gegen das nicht hydrolysierbare GTP-Analogon GppCH₂p ausgetauscht wurde. Im zweiten Schritt wurde GppCH₂p durch Inkubation mit Phosphodiesterase zu Guanosin abgebaut.

Der Austausch (siehe Kapitel 2.3.6.2) wurde über Nacht bei 4°C durchgeführt. Nach dem vollständigen Abbau von GDP zu Guanosin wurden dem Ansatz 5 $\mu\text{l}/\text{mg}$ Phosphodiesteraselösung (2 U/ml) zugegeben und einen Tag bei 4°C inkubiert. Der Abbau des GppCH₂p wurde über HPLC-Analyse verfolgt. Das nukleotidfreie Protein wurde durch Gelfiltration über eine PD-10-Säule von Guanosin befreit, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C aufbewahrt.

- Gelfiltrationspuffer: 40 mM HEPES/NaOH pH 7,5, 5 mM 2-Mercaptoethanol

2.3.8 Bindungsassay mit Affinitätsmatrix

2-4 nmol GST-Fusionsprotein wurden mit dem entsprechenden Komplexpartner (molares Verhältnis Rab4:Rabaptin-5 1:2) 1 h bei 4°C unter Schütteln inkubiert. 50 μl GSH Agarose wurden durch dreimaliges Waschen mit 200 μl Puffer A äquilibriert. Der Komplexansatz wurde zu der äquilibrierten Matrix gegeben und eine weitere Stunde bei 4°C inkubiert. Nach der Inkubation wurde der Überstand abgenommen und die Matrix 3x mit 200 μl Puffer A gewaschen, um nicht gebundene Proteine zu entfernen. Die gebundenen Proteine wurden entweder mit 2x 200 μl Puffer B eluiert und dann mittels SDS-Gelelektrophorese analysiert oder die Matrix wurde direkt mit SDS-Probenpuffer versetzt, erhitzt und der Überstand auf das Gel aufgetragen. Die unspezifische Bindung von Proteinen ohne Affinitätstag wurde

überprüft, indem diese Proteine allein mit GSH-Matrix inkubiert wurden. Die Matrix wurde anschließend mit SDS-Probenpuffer erhitzt und der Überstand auf einem SDS-Gel analysiert.

- Puffer A: 20 mM Tris/HCl pH 7,5, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 5 mM 2-Mercaptoethanol
- Puffer B: Puffer A mit 20 mM Glutathion

2.3.9 Analytische Gelfiltration

50-60 µM Rab4 wurden mit 100-120 µM Rabaptin-5 versetzt und 1,5 h bei 4°C inkubiert. 100 µl des Ansatzes wurden auf eine äquilibrierte Superdex 75 HR10/30 Gelfiltrationssäule aufgetragen und mit einer Flußrate von 0,15 ml/min eluiert. Die Fraktionen wurden mit SDS-Gelelektrophorese und MALDI-Massenspektrometrie analysiert. Mit Hilfe einer Eichgeraden konnte das Molekulargewicht der Proteine bzw. der Komplexe ermittelt werden.

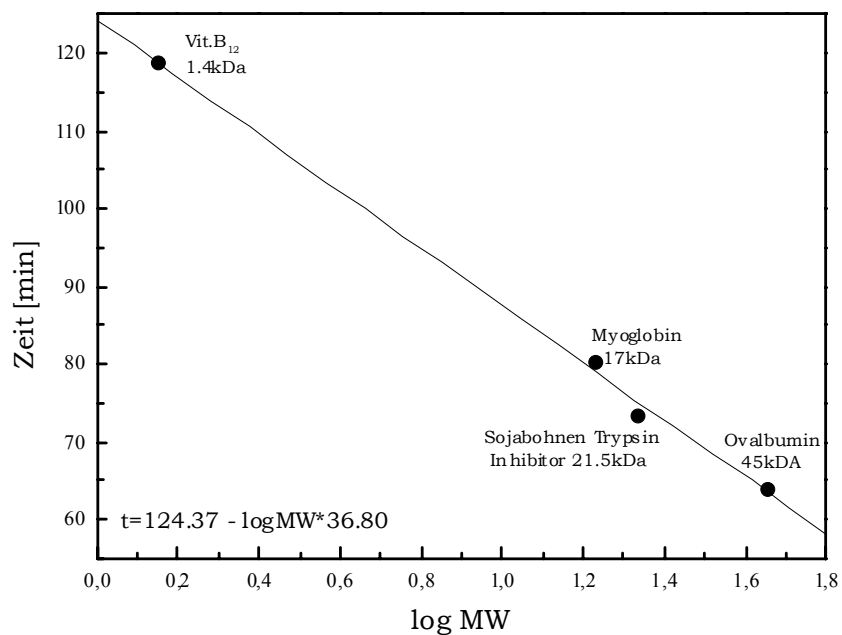


Abbildung 2.3: Eichgerade zur analytischen Gelfiltration (Superdex 75 HR10/30, Flußrate: 0,15 ml/min)

Zur Erstellung der Eichgeraden wurde die analytische Gelfiltration mit Standardproteinen durchgeführt, deren Molekulargewicht bekannt war. Die Retentionszeiten der Proteine wurden gegen den Logarithmus des Molekulargewichtes aufgetragen und an eine Geradengleichung angepaßt.

Tabelle 2.1: Standardproteine für die analytische Gelfiltration (Sigma-Aldrich, Steinheim)

	Molekulargewicht (kDa)	Retentionszeit (min)
		Flußrate: 0,15 ml/min
Ovalbumin	45,0	64,0
Sojabohnen Trypsin Inhibitor	21,5	73,5
Myoglobin	17,0	80,5
Vitamin B ₁₂	1,4	119,0

- Gelfiltrationspuffer: 20 mM Tris/HCl pH 7,5, 25 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 1 mM 2-Mercaptoethanol, 10 µM Nukleotid (GDP, GppNHp)

2.3.10 Messung der GTP-Hydrolyse

Die intrinsische GTP-Hydrolyserate von Rab-Proteinen ist langsam (Simon *et al.*, 1996) und wird *in vivo* durch GAP-Proteine erhöht. Zur Untersuchung des Einflusses des Effektors Rabaptin-5 auf die GTPase-Aktivität von Rab4 wurde der einmalige Umsatz (*single turnover*) von GTP mit und ohne Rabaptin-5 bestimmt.

60-80 µM nukleotidfreies Rab4 in Meßpuffer wurde mit der 1,5fachen Menge GTP und 5 mM MgCl₂ versetzt und bei 24°C im Wasserbad inkubiert. Bei Experimenten mit dem Effektor wurde die doppelte Menge Rabaptin-5 zugesetzt. Zu festgelegten Zeiten wurden Proben entnommen und zum Abstoppen der Reaktion in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Analyse wurde mit der HPLC (Kapitel 2.4.2) durchgeführt. Die Bestimmung der GDP-Konzentration erfolgte über die Integration der Peakflächen. Um den Fehler durch das aufgetragene Probenvolumen zu verringern, wurde die GDP-Konzentration im Verhältnis zur Gesamtnukleotidmenge, dargestellt durch den Quotienten $[GDP]/([GDP]+[GTP])$, betrachtet. Die erhaltenen Werte wurden gegen die Zeit aufgetragen und die Hydrolyserate durch eine Anpassung der Daten an eine exponentielle Funktion ($y = A \cdot (1 - e^{-kt})$) bestimmt.

- Meßpuffer: 40 mM HEPES/NaOH pH 7,5, 5 mM 2-Mercaptoethanol

2.4 Biophysikalische Methoden

2.4.1 Massenspektrometrie

Die Massenspektrometrie ermöglicht eine sehr genaue Bestimmung des Molekulargewichtes von Proteinen. Mit dieser Technik wurden die gereinigten Proteine auf das korrekte Molekulargewicht überprüft, Komplexe und Proteinkristalle analysiert. Es wurden zwei verschiedene Methoden verwendet.

2.4.1.1 MALDI-MS

Die Abkürzung MALDI-MS bedeutet Matrix-unterstützte Laserdesorptions/Ionisations-Massenspektrometrie (*matrix-assisted laser desorption ionisation mass spectrometry*). Bei dieser Methode werden die Proteine in eine Matrix aus kleinen organischen Molekülen eingebettet, wodurch die Ionisierung der Proteinmoleküle erleichtert und die Fragmentierung vermindert wird.

Die Proteinproben wurden bei hohem Salzgehalt zunächst mit Wasser verdünnt. Für die Messung wurden Verdünnungen (1:10, 1:100) mit 50% Acetonitril/0,05% TFA hergestellt. Als Matrix wurden Sinapinsäure (für Proteine) und α -Cyano-4-hydroxycimtsäure (für Proteinfragmente) verwendet. Auf der Probenplatte wurden je 1 μ l Matrix- und 1 μ l Proteinlösung gemischt und nach dem Trocknen an einer MALDI-TOF VoyagerTm-DE Pro Biospectrometry Workstation (Applied Biosystems, Weiterstadt) gemessen. Die Fehlerabweichung der erhaltenen Massen betrug zwischen 0,1 und 0,2%.

- Matrixlösung: gesättigte Lösung von Sinapinsäure bzw. α -Cyano-4-hydroxycimtsäure (CHCA) in 50% Acetonitril/0,05 TFA

2.4.1.2 ESI-MS

ESI-MS steht für Elektronenspray-Ionisations-Massenspektrometrie (*electrospray ionisation mass spectrometry*). Bei der ESI-MS wird das Protein in Wasser oder einem niedrig konzentrierten, flüchtigen Puffer gelöst und an der Spitze einer Kapillare in einem elektrischen Feld zerstäubt. Nichtflüchtige Puffer, Salze und Detergenzien beeinträchtigen den Ionisationsprozeß und müssen daher vor der Messung entfernt werden.

Die Proteinproben wurden über extensive Dialyse gegen 10 mM Tris/HCl pH 7,5 umgepuffert und 20 min zentrifugiert. Die Messung wurde an einem LQC Massenspektrometer (Finnigan, Bremen) durchgeführt. Die Fehlerabweichung der erhaltenen Massen betrug weniger als 0,05%.

2.4.2 HPLC-Analyse von Nukleotiden

Die Analyse von Nukleotiden zur Reinheitskontrolle, zur Überprüfung des Nukleotid-austausches und der Nukleotidbefreiung sowie zur Messung der GTP-Hydrolyse von Rab4 wurde mit Hilfe der *reversed phase*-HPLC durchgeführt. Für die Analyse wurde eine Hypersil-C18-Säule verwendet. Die Proben wurden zentrifugiert und auf die mit Puffer A äquilibrierte Säule aufgetragen. Die Elution erfolgte isokratisch mit einer Flußrate von 1,5 ml/min. Die Nukleotide wurden bei 254 nm detektiert. Mant-GppNHp wurde in einem Gradienten über 20 min von 0-100% Puffer B eluiert, die Detektion erfolgte bei 254 und 330 nm.

- Puffer A (isokratische Methode) : 100 mM KP_i pH 6,5, 10 mM TBABr, 6% Acetonitril
- Puffer A (für mant-GppNHp) : 50 mM KP_i pH 6,5
- Puffer B (für mant-GppNHp): 50 mM KP_i pH 6,5, 50% Acetonitril

2.4.3 Bestimmung von Dissoziationskonstanten mittels Fluoreszenzspektroskopie

Die Fluoreszenzmessungen wurden an dem Aminco SLM 8100 Fluoreszenzspektrometer bei 15°C in Fluoreszenzmeßpuffer durchgeführt. Die Dissoziationskonstanten der Rab4/Rabaptin-5-Komplexe wurden durch Gleichgewichtstitrationen bestimmt. Das Rab4-Konstrukt wurde vorgelegt und die Veränderung der intrinsischen Tryptophanfluoreszenz bei der schrittweisen Titration von R5b-N1 gemessen. Die Tryptophanfluoreszenz wurde mit einer Bandbreite von 1 nm bei 290 nm angeregt und die Emission mit einer Bandbreite von 16 nm bei 340 nm

gemessen. Für die Bestimmung der Dissoziationskonstanten K_d wurde das Fluoreszenzsignal nach jedem Titrationsschritt in Beziehung zu der Konzentration des zugegebenen Bindungspartners gesetzt, dabei wurde das gemessene Fluoreszenzsignal hinsichtlich der Volumenänderung in der Küvette korrigiert. Mit den erhaltenen Werten wurde eine Kurvenanpassung nach der quadratischen Gleichung 2.1 vorgenommen (Herleitung der Gleichung s. Anhang 8.1). Die freien Parameter K_d , F_0 und F_{\max} wurden mit dem Programm GraFit (Version 3.09b, Erithacus Software Ltd., Staines, Großbritannien) iterativ an die gemessenen Daten angepaßt.

$$F = F_0 + (F_{\max} - F_0) \cdot \frac{\frac{[A]_0 + [B]_0 + K_d}{2} - \sqrt{\left(\frac{[A]_0 + [B]_0 + K_d}{2}\right)^2 - [A]_0 \cdot [B]_0}}{[A]_0} \quad (\text{Gl. 2.1})$$

- F: Volumen-korrigierte Fluoreszenzemission bei einer bestimmten Proteinkonzentration
 F_0 : Fluoreszenz des freien Fluorophors
 F_{\max} : Fluoreszenz bei Substratsättigung
 $[A]_0$: Gesamtkonzentration des fluoreszierenden Proteins A
 $[B]_0$: Gesamtkonzentration des Proteins B
 K_d : Dissoziationskonstante des Komplexes

- Fluoreszenzmesspuffer: 20 mM Tris/HCl pH 7.5, 25 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 20 µM Nucleotid (GDP, GppNHp)

2.4.4 Röntgenstrukturanalyse

Die Röntgenstrukturanalyse ermöglicht den Einblick in den dreidimensionalen Aufbau von Proteinen. Die Kenntnis der Struktur eines Proteins trägt wesentlich zum Verständnis seiner Funktion bei. Grundvoraussetzung für die Röntgenstrukturanalyse sind Proteinkristalle, die im Röntgenstrahl als Beugungsgitter wirken, dabei werden die Röntgenstrahlen an den Elektronen der im Kristall periodisch angeordneten Proteinmoleküle gebeugt. Durch konstruktive Interferenz der abgelenkten Strahlen entsteht das Diffraktionsmuster des Kristalls, das mit Hilfe eines Detektors als zweidimensionales Bild symmetrisch angeordneter Punkte (Reflexe) sichtbar gemacht werden kann (siehe Abbildung 2.4). Die Symmetrie des Diffraktionsmusters steht in direkter Beziehung zu der Symmetrie des Kristalls, die Intensität der Reflexe ergibt sich aus der Art der Atome und deren räumlicher Anordnung im Kristall.

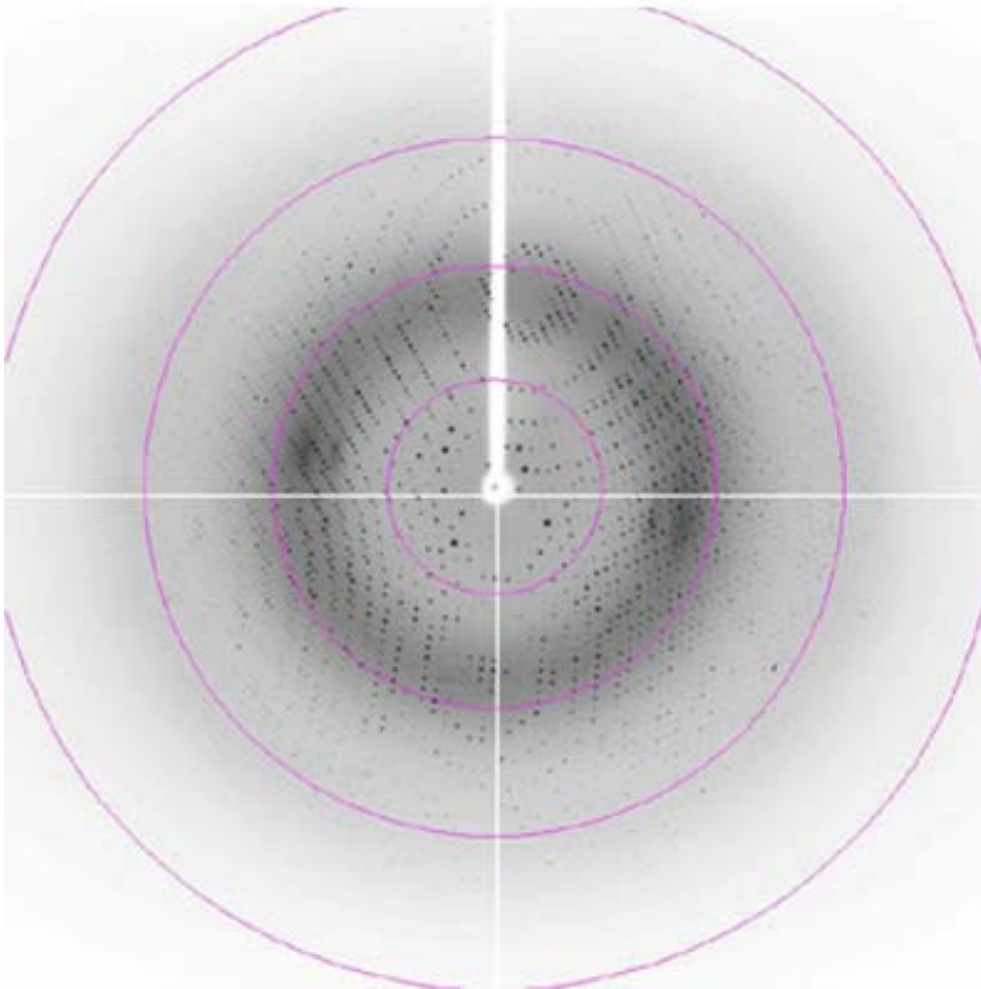


Abbildung 2.4: Rotations-Diffraktionsbild eines Rab4-t3•GppNHp-Kristalles. Die Aufnahme dieser Röntgendiffraktionsdaten erfolgte an der Meßstation ID14-4 (Röntgenwellenlänge: 1,008 Å) am ESRF in Grenoble (Frankreich). Die Daten wurden mit einem Q4R ADSC Detektor bei 100 K aufgenommen. Die Kreise kennzeichnen die Auflösungsgrenzen 6,5 Å, 3,23 Å, 2,12 Å und 1,6 Å (von innen nach außen). Für diesen Kristall konnten Daten bis 1,6 Å aufgenommen werden.

W. H. Bragg und W. L. Bragg entdeckten, daß die Diffraktion der Röntgenstrahlen im Kristall der Reflexion von Licht an einem ebenen Spiegel vergleichbar ist und konstruktive Interferenz nur auftritt, wenn der Gangunterschied der an benachbarten Gitterebenen reflektierten Röntgenstrahlen ein ganzzahliges Vielfaches der Wellenlänge der Röntgenstrahlen beträgt (zur Herleitung des Bragg'schen Gesetzes siehe Anhang 8.2)

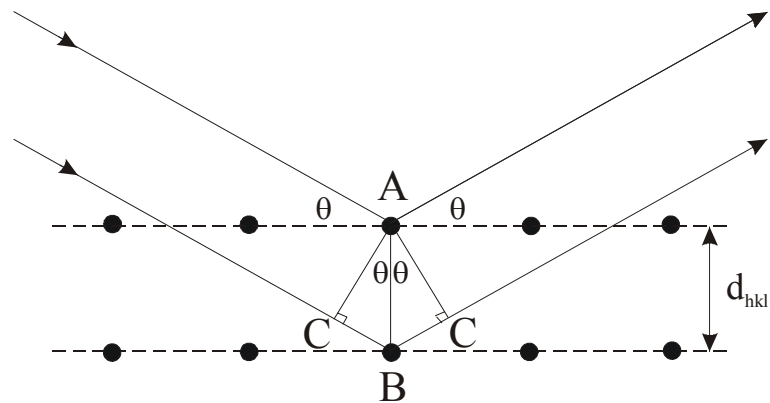


Abbildung 2.5: Geometrische Darstellung des Bragg'schen Gesetzes

$$2 \cdot d_{hkl} \cdot \sin\theta = n \cdot \lambda \quad (\text{Gl. 2.2})$$

d_{hkl} : Abstand der Gitterebenen
 θ : Streuwinkel
 n : ganze Zahl
 λ : Wellenlänge der Röntgenstrahlung

Mit Hilfe des Bragg'schen Gesetzes lassen sich die Abmessungen der Einheitszelle und die Symmetrie des Kristalls bestimmen. Mit Gleichung 2.2 kann jedoch keine Aussage über die gemessenen Reflexintensitäten gemacht werden. Zur Auswertung dieser Information ist die mathematische Behandlung der Beugung durch Fouriertransformation nötig.

Röntgenstrahlen werden mathematisch durch einfache Wellenfunktionen beschrieben:

$$f(x) = F \cos 2\pi (hx + \alpha) \quad (\text{Gl. 2.3})$$

oder
$$f(x) = F \sin 2\pi (hx + \alpha) \quad (\text{Gl. 2.4})$$

F : Amplitude
 h : Frequenz
 α : Phase

Die gemessenen Reflexe werden durch konstruktive Interferenz vieler gebeugter Röntgenstrahlen hervorgerufen, die daraus resultierende Wellenfunktion kann daher nicht mehr durch die einfachen Gleichungen 2.3 oder 2.4 beschrieben werden. Jede periodische Funktion kann aber durch eine Summe einfacher Sinus- und Cosinusfunktionen, einer sogenannten Fourierreihe, ausgedrückt werden. Ein auf den Detektor auftreffender Röntgenstrahl setzt sich

aus Beiträgen aller Atome in der Einheitszelle zusammen. Die entsprechende Fourierreihe wird als Strukturfaktorengleichung (Gl. 2.5) bezeichnet:

$$F_{hkl} = f_A + f_B + \dots + f_N \quad (\text{Gl. 2.5})$$

F_{hkl} : Strukturfaktor des Reflexes hkl
 f_A : Strukturfaktor des Atoms A
 f_B : Strukturfaktor des Atoms B
 \vdots
 f_N : Strukturfaktor des Atoms N'

Da bei der Röntgenbeugung nicht das Atomzentrum, sondern die umgebenden Elektronen mit den elektromagnetischen Wellen in Wechselwirkung treten, wird Gl. 2.5 besser dargestellt als:

$$F_{hkl} = f(\rho_1) + f(\rho_2) + \dots + f(\rho_m) + \dots + f(\rho_n) \quad (\text{Gl. 2.6})$$

F_{hkl} : Strukturfaktor des Reflexes hkl
 $f(\rho_m)$: Strukturfaktor des Volumenelementes m
 ρ_m : mittlere Elektronendichte im Volumenelement m

Dabei wird die Elektronendichte in der Einheitszelle in n Volumenelemente aufgeteilt. Die Strukturfaktorengleichung setzt sich dann zusammen aus den Strukturfaktoren der Volumenelemente. Der Strukturfaktor eines Volumenelementes beschreibt den Beitrag der darin enthaltenen Elektronen zur Diffraktion. Über die mathematische Operation der Fouriertransformation kann die Elektronendichteverteilung $\rho(x, y, z)$ aus den gemessenen Reflexintensitäten berechnet werden, sofern auch die Phaseninformation zur Verfügung steht. Die dafür verwendete Beziehung lautet:

$$\rho(x, y, z) = \frac{1}{V} \sum_h \sum_k \sum_l |F_{hkl}| e^{-2\pi i(hx+ky+lz-\alpha'_{hkl})} \quad (\text{Gl. 2.7})$$

$\rho(x, y, z)$: Elektronendichte-Wert am Ort x, y, z
 $|F_{hkl}|$: Strukturfaktoramplitude
 α'_{hkl} : Phase
h, k, l: Miller'sche Indizes, hkl-te Ordnung der Beugung
x, y, z: Ortskoordinaten in der Kristallelementarzelle

Während einer Röntgenmessung können nur die Intensitäten gemessen werden, aus denen sich die Strukturfaktoramplituden berechnen lassen; die Phaseninformation kann aus technischen Gründen nicht gemessen werden. Zur Lösung des sogenannten Phasenproblems werden verschiedene Methoden verwendet, die direkte Methode (nur für kleine Moleküle anwendbar), die Methode der isomorphen Substitution durch Schweratome (MIR *multiple isomorphous replacement*), die Methode der molekularen Ersetzung (MR *molecular replacement*) und die Bestimmung der Phasen durch anomale Streuung (MAD *multiwavelength anomalous diffraction*). Die in dieser Arbeit beschriebenen Strukturen wurden mit der Methode der molekularen Ersetzung gelöst. Bei dieser Methode erfolgt die Bestimmung der Phasen über den Vergleich mit einer bereits gelösten Struktur als Modell. Voraussetzung ist eine hinreichende Ähnlichkeit zwischen der bereits bekannten und der gesuchten Struktur. Das bekannte Strukturmodell wird in der Elementarzelle der unbekannt Struktur so plaziert, daß seine Orientierung und Position der der gesuchten Struktur entspricht. Das Suchproblem wird dabei in die Suche nach der besten Orientierung durch Rotation und der besten Position durch Translation aufgeteilt. Zuerst wird die Orientierung mit Hilfe von Patterson-Funktionen ermittelt. Patterson-Funktionen sind Fourierreihen ohne Phasen:

$$P(u, v, w) = \frac{1}{V} \sum_h \sum_k \sum_l |F_{hkl}^2| e^{-2\pi i(hu + kv + lw)} \quad (\text{Gl. 2.8})$$

Die Strukturfaktoramplituden sind proportional zu den gemessenen Intensitäten der Reflexe, daher läßt sich die Patterson-Funktion aus den gemessenen Intensitäten ohne Phaseninformation berechnen. Zur Ermittlung der Orientierung des Suchmodells werden zwei Patterson-Funktionen berechnet, die eine mit den Strukturfaktoramplituden, die aus den Koordinaten des Suchmodells berechnet wurden und die zweite mit den Strukturfaktoramplituden, die aus den gemessenen Reflexintensitäten bestimmt wurden. Durch eine Produktfunktion werden die zwei Patterson-Vektorensätze miteinander korreliert, indem der eine Vektorensatz gegen den anderen in kleinen Winkelschritten um alle drei Rotationsachsen gedreht wird. Die erhaltene Rotationsfunktion hat einen hohen Wert, wenn eine gute Übereinstimmung vorliegt. Nach der Orientierung des Suchmodells erfolgt die Positionierung durch Translation in alle drei Raumrichtungen, wobei die Korrelation mit den gemessenen Strukturfaktoramplituden als Kriterium für eine gute Übereinstimmung dient. Wenn das Suchmodell richtig in der Elementarzelle plaziert wurde und eine hinreichende

Ähnlichkeit mit der gesuchten Struktur aufweist, läßt sich das Diffraktionsmuster des Kristalls mit dem berechneten Diffraktionsmuster des Modells näherungsweise erklären und die fehlenden Phasenwerte für die gesuchte Struktur ableiten. Diese Phasen stellen den Ausgangspunkt für die Berechnung der ersten Elektronendichte der unbekanntes Struktur dar. Über manuelle Anpassung des Suchmodells mittels Graphikprogrammen und rechnerischer Optimierung der Strukturparameter wird das Suchmodell der realen Struktur angeglichen. Als Qualitätskriterium dient dabei der Vergleich der berechneten Struktur Faktoren mit den experimentell bestimmten Reflexintensitäten.

2.4.4.1 Kristallisation

Grundvoraussetzung für die Röntgenstrukturanalyse von Proteinen sind gut beugende, stabile Kristalle. Proteine werden wie kleine Moleküle aus übersättigten Lösungen kristallisiert. Übersättigte Lösungen sind thermodynamisch instabile Systeme, die durch Bildung einer festen Phase in ein stabiles Gleichgewicht übergehen. Idealerweise ist die feste Phase ein einziger Kristall, in der Praxis beobachtet man die Bildung vieler kleiner, auch fehlgeordneter Kristalle oder amorphen Präzipitats. Im Gegensatz zu Salzkristallen sind Proteinkristalle sehr empfindlich gegenüber mechanischen Einflüssen und Änderungen der Umgebungsbedingung. Dafür gibt es mehrere Gründe: Proteinmoleküle sind nicht kugelsymmetrisch, daher sind dichteste Packungen wie bei Salzkristallen nicht möglich. Die Stabilität der Salzkristalle beruht auf der elektrostatischen Anziehungskraft der geladenen Ionen. In Proteinkristallen gibt es diese starken Anziehungskräfte nicht, die Proteinmoleküle werden hauptsächlich durch Wasserstoffbrückenbindungen zusammengehalten, die viel schwächer als Ionenbindungen sind. Desweiteren sind Proteine keine starren Moleküle, Konformation und Oberflächenladungen ändern sich mit der Temperatur, dem pH-Wert und der Ionenstärke der Lösung. Je beweglicher die einzelnen Domänen eines Proteins sind, desto niedriger ist die Wahrscheinlichkeit, daß ein geordnetes Kristallgitter entstehen kann. Denaturierte Proteinmoleküle verhindern eine erfolgreiche Kristallisation, daher muß bei der Wahl der Kristallisationsbedingungen darauf geachtet werden, daß die native Struktur des Proteins erhalten bleibt (Ducruix & Giegé, 1992).

2.4.4.1.1 Suche nach Kristallisationsbedingungen

Die Kristallisation von Proteinen ist ein weitgehend empirischer Prozess, da eine Vielzahl von Faktoren das Kristallisationsverhalten beeinflusst, deren Zusammenwirken schwierig zu erforschen ist. Für die Suche nach geeigneten Kristallisationsbedingungen für Rab4, Rabaptin-5 und des Komplexes wurden die *Crystal Screens* von Hampton Research (Laguna Niguel, USA) verwendet, die auf der Arbeit von Jancarik und Kim (Jancarik & Kim, 1991) beruhen, die erfolgreiche Kristallisationsexperimente analysierten. Die pipettierfertigen Lösungen decken eine Vielzahl an Fällungsmitteln, Salzen, Puffersystemen und Additiven ab. Die Kristallisationsexperimente wurden nach der Methode des hängenden Tropfens (siehe Abbildung 2.6) in Linbro Zellkulturschalen (6×4 Vertiefungen) durchgeführt, die mit Deckgläschen, an denen die Kristallisationstropfen hingen, verschlossen wurden.

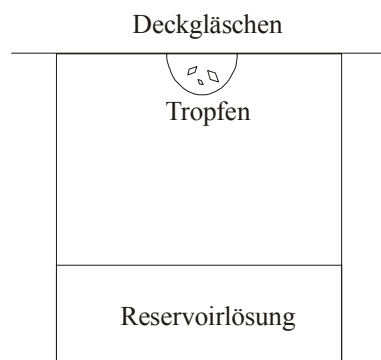


Abbildung 2.6: Darstellung der Methode des hängenden Tropfens

Die Ränder der Vertiefungen wurden mit Silikonpaste (Baysilone-Paste, mittelviskos, Bayer AG (Leverkusen)) eingefettet. In die Vertiefungen wurden 500 μ l Reservoirlösung pipettiert. Der Kristallisationstropfen setzte sich aus je 2 μ l Reservoir- und Proteinlösung zusammen. Die Konzentration der Proteinlösung betrug 10-25 mg/ml. Die Kristallisationsansätze wurden fast ausschließlich bei 20°C pipettiert und aufbewahrt. Sie wurden regelmäßig unter einem Mikroskop kontrolliert. Kristallisationsexperimente wurden mit Rab4-t1•GppNHp, Rab4-t1•GDP, Rab4-t2•GppNHp, Rab4-t2•GDP, Rab4-t3•GppNHp, Rab4-t3•GDP, R5b-N1 und den Komplexen Rab4-t1•GppNHp/R5b-N1 und Rab4-t2•GppNHp/R5b-N1 durchgeführt.

2.4.4.1.2 Verfeinerung von Kristallisationsbedingungen

Die Kristalle, die aus den ersten *Screens* erhalten werden, sind häufig noch nicht geeignet für Röntgenmessungen, da sie beispielsweise zu klein sind und ihr Streuvermögen nicht ausreicht. Es kommt auch vor, daß bei den anfänglichen Kristallisationsexperimenten keine Kristalle erhalten werden, dafür aber kristallines Präzipitat. Diese Bedingungen liefern oft einen guten Ausgangspunkt für weitere Kristallisationsexperimente, indem man Parameter wie Temperatur, Art und Konzentration des Fällungsmittels, pH-Wert, Puffersystem und die Proteinkonzentration variiert, bis optimale Bedingungen für die Kristallisation gefunden werden. Bei kleinen oder verwachsenen Kristallen kann die Methode des *seeding* verwendet werden, um die Größe und Qualität der Kristalle zu optimieren. Beim *micro seeding* werden die Kristalle zerdrückt, die entstandene Kristallsplittersuspension wird verdünnt und zum Impfen des neuen Kristallisationstropfens verwendet. Beim *streak seeding* wird die Spitze einer dünn ausgezogenen Glaskapillare oder eines Katzenhaares zuerst durch die Kristallsplittersuspension und anschließend durch den neuen Kristallisationstropfen gezogen. Beim *macro seeding* wird ein kleiner Kristall in einen neuen Kristallisationstropfen überführt, damit er dort weiterwachsen kann. Wenn die Verfeinerung von Kristallisationsbedingungen ohne Ergebnis bleibt oder keine Kristalle erhalten werden, kann unter Umständen ein neues Konstrukt des zu kristallisierenden Proteins erstellt werden, indem zum Beispiel flexible Bereiche, die die Kristallisation behindern, entfernt werden.

Die Verfeinerung von Kristallisationsbedingungen erfolgte ebenfalls nach der Methode des hängenden Tropfens, das Reservoirvolumen betrug 500 µl und die Kristallisationstropfen wurden aus je 2 µl Reservoir- und Proteinlösung gemischt. Die Experimente wurden meist als sogenannter *grid screen* durchgeführt, z. B. wurden sechs verschiedenen pH-Werte und vier verschiedene Fällungsmittelkonzentrationen getestet.

2.4.4.2 Kristallmontage und Datensammlung

Die Datensammlung erfolgte zur Vermeidung von Strahlenschäden bei einer Temperatur von 100 K. Die Kristalle wurden mit einer Nylonschlinge aus den Kristallisationstropfen gefischt und für 1-5 min in einer Gefrierschutzlösung inkubiert, um Schäden durch das Einfrieren zu vermeiden. Die Gefrierschutzlösungen enthielten gewöhnlich 20-25% Glycerin in Reservoirlösung. Nach der Inkubation in Gefrierschutzlösung wurden die Kristalle in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Messung darin gelagert. Die Diffraktionsdaten wurden mit Röntgenstrahlung der Wellenlänge 1,54 Å (Kupfer

K_{α} -Strahlung) aufgenommen, die mit Hilfe einer Kupferdrehanode (Enraf-Nonius, Belft) erzeugt wurde. Die Fokussierung erfolgte mit einem Osmicspiegel (OSMIC, Auburn Hills, USA), die Diffraktionsbilder wurden mit einem MAR345 Phosphor-Bildplatten-Detektor (MarResearch, Norderstedt) aufgenommen. Nach der Aufnahme einiger Diffraktionsbilder, sogenannter Datenframes, konnten die Abmessungen der Einheitszelle und die Raumgruppe bestimmt werden. Hochaufgelöste Datensätze wurden am ESRF (europäisches Elektronensynchrotron) in Grenoble und am BESSY (Berliner Elektronenspeicherring-Gesellschaft für Synchrotronstrahlung) in Berlin aufgenommen. Die Datensätze wurden mit den Programmen XDS und XSCALE (Kabsch, 1993) prozessiert. Das Ergebnis der Datenprozessierung war eine Liste der indizierten Reflexintensitäten (=quadrierte Strukturfaktoramplituden), die bezüglich Strahlen- und Absorptionsschäden korrigiert worden waren.

2.4.4.3 Modellbau und Strukturverfeinerung

Die Strukturen von Rab4-t3•GppNHp und Rab4-t3•GDP wurden mit der Methode der molekularen Ersetzung (Rossmann, 1990) gelöst. Als Suchmodell wurde die Struktur von Rab5c•GppNHp (100 K) (PDB-Eintrag: 1HUQ, Merithew *et al.*, 2001) ohne das Nukleotid, das Magnesiumion und die Wassermoleküle benutzt. Anhand dieser Struktur wurde mit dem Programm MODELLER (Sali & Blundell, 1993) ein homologes Rab4-Modell (Aminosäure 6-172) erstellt und damit die Startphasenwerte für Rab4-t3•GppNHp ermittelt. Die Struktur von Rab4-t3•GppNHp diente dann als Suchmodell für die Berechnung der Startphasenwerte von Rab4-t3•GDP (wieder ohne das Nukleotid, das Magnesiumion und die Wassermoleküle). Die Berechnung der Rotations- und Translationsfunktionen zur Positionierung des Suchmodells in der Elementarzelle wurde mit dem Programm MOLREP (Vagin & Teplyakov, 1997) durchgeführt. Die Verfeinerung des Strukturmodells wurde mit den Programmen CNS (Brünger *et al.*, 1998) und REFMAC (implementiert in das CCP4-Softwarepaket) (CCP4, 1994; Winn *et al.*, 2001; Murshudov *et al.*, 1997) durchgeführt. Dabei wurde CNS zu Beginn der Verfeinerung für den Einbau der Nukleotide eingesetzt, danach wurde REFMAC verwendet. Nach jedem Verfeinerungszyklus wurde die Geometrie des Strukturmodells mit dem Programm PROCHECK (Laskowski *et al.*, 1993) überprüft. Die Übereinstimmung des Strukturmodells mit der berechneten Elektronendichte wurde mit dem Graphikprogramm O (Jones *et al.*, 1991) kontrolliert. Dabei wurden fehlerhafte Bereiche korrigiert, Aminosäuren am N- und C-Terminus ergänzt und in späteren Verfeinerungszyklen,

bei weitestgehend kompletten Proteinmodell und nach dem Einbau von Wassermolekülen, weitere Moleküle wie z. B. Glycerin aus dem Gefrierschutzpuffer eingefügt. Der automatische Einbau der Wassermoleküle wurde mit dem Programm Arp/Waters (Lamzin & Wilson, 1993) in Kombination mit REFMAC unter Berücksichtigung geometrischer Kriterien (Möglichkeit der Wasserstoffbrückenbildung) und noch unbesetzter Elektronendichte durchgeführt und mit dem Programm O überprüft. Der Verlauf der Verfeinerung wurde anhand stereogeometrischer Richtlinien und des freien R-Faktors (Brünger, 1992) beurteilt. Der R-Faktor ist ein Maß für die Übereinstimmung des berechneten Strukturmodells mit den experimentellen Diffraktionsdaten:

$$R_{\text{cryst}} = \frac{\sum_{\text{hkl}} \left| |F_{\text{obs}}(\text{hkl})| - |F_{\text{calc}}(\text{hkl})| \right|}{\sum_{\text{hkl}} |F_{\text{obs}}(\text{hkl})|} \cdot 100\% \quad (\text{Gl. 2.9})$$

F_{obs} : beobachtete Strukturfaktoramplituden
 F_{calc} : berechnete Strukturfaktoramplituden

Bei einer hohen Auflösung und optimalen Verfeinerung der Struktur liegt der R-Faktor um 20% und niedriger. Für die Berechnung des freien R-Faktors wurden zu Beginn der Verfeinerung 5% der experimentellen Daten ausgeschlossen, so daß sie in der Verfeinerung nicht berücksichtigt wurden. Als weitere Qualitätskriterien dienten das Ramachandran-Diagramm und der Temperaturfaktor. Ramachandran und Sasisekharan erstellten aufgrund theoretischer Betrachtungen und sehr gut bestimmter Peptidmodelle eine Auftragung der erlaubten und nicht erlaubten Φ - und Ψ -Winkel benachbarter C_{α} -N- und C_{α} -C-Einfachbindungen (Ramachandran & Sasisekharan, 1968). In diesem so genannten Ramachandranplot sind die Zonen der erlaubten Konformationen für α -Helices und β -Faltblätter klar getrennt. Bei der Auftragung der experimentell erhaltenen Werte für die Φ - und Ψ -Winkel konnten Abweichungen von den theoretischen Werten und damit eventuelle Fehler erkannt werden. Durch den Temperaturfaktor, der auch als B-Faktor bezeichnet wird, wurden die Vibrationen der Atome im Kristall berücksichtigt. Er gibt die Genauigkeit der Koordinatenbestimmung einzelner Atome bzw. einer Atomgruppe (z. B. Seitenkette einer Aminosäure) an, dabei gilt, je kleiner der B-Faktor, desto genauer die Koordinatenbestimmung des Atoms.

3 Ergebnisse

3.1 Expression und Isolierung der rekombinanten Proteine

3.1.1 Rab4

Das Expressionsplasmid für Rab4a wt (1-213) als GST-Fusionsprotein mit Faktor Xa-Schnittstelle wurde von M. Zerial (MPI für molekulare Zellbiologie und Genetik) zur Verfügung gestellt. Aus diesem Plasmid wurde von A. Scheidig und M. Rottmann (AG Scheidig) für Kristallisationsexperimente das C-terminal verkürzte Konstrukt Rab4-t1 (1-198) entwickelt, da Kristallisationsstudien mit unverkürztem und verschiedenen C-terminal verkürzten Varianten von Rab7 (Brachvogel *et al.*, 1997) und H-Ras p21 (John *et al.*, 1989) zeigten, daß die strukturelle Auflösung des C-Terminus relativ schlecht ist. Diese Ergebnisse weisen auf eine hohe Flexibilität der C-terminalen Reste hin, die die Kristallisation behindern. Da die Kristallisationsexperimente mit Rab4-t1 keine zufriedenstellenden Resultate lieferten (siehe Kapitel 3.4.1 und 3.4.2), wurden zusammen mit R. Krebs (AG Scheidig) weitere C-terminal verkürzte Konstrukte anhand eines Sequenzvergleiches (mit kombinierter Sekundärstrukturvorhersage) mit anderen kleinen GTP-bindenden Proteinen entwickelt (Abbildung 3.1).

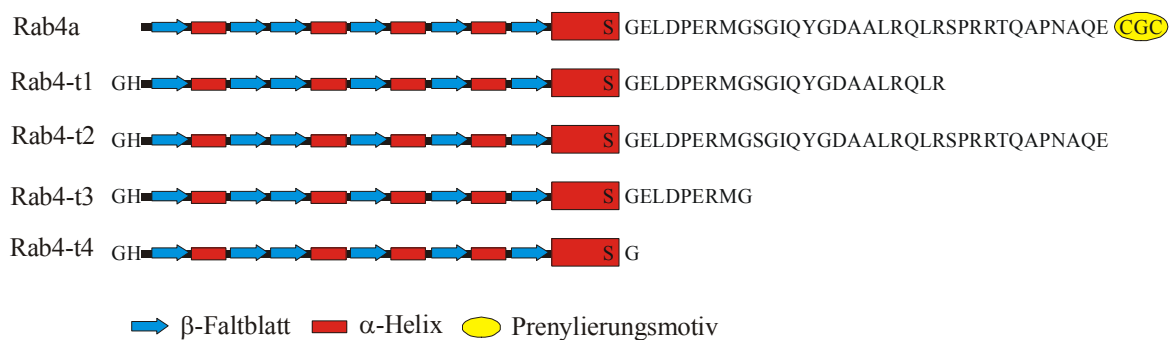


Abbildung 3.1: Schematische Darstellung der Rab4-Konstrukte mit Sekundärstrukturelementen (beruhend auf multipler Primärsequenzanalyse). Die C-terminal verkürzten Konstrukte weisen am N-Terminus zwei zusätzliche Aminosäuren (GH) auf, die bei der Spaltung der Fusionsproteine am Rab4-Konstrukt verbleiben.

Das Konstrukt Rab4-t2 (1-210) besaß einen bis auf das Prenylierungsmotiv intakten C-Terminus. Das Prenylierungsmotiv ist für die biologische Aktivität unbedingt notwendig, da sonst die Verankerung an der Membran nicht möglich ist (Gorvel *et al.*, 1991). Es wurde jedoch gezeigt, daß die Interaktion von kleinen GTP-bindenden Proteinen mit Nukleotiden durch die C-terminale Verkürzung nicht beeinträchtigt wird (John *et al.*, 1989; Simon *et al.*, 1996). Die Bestimmung der intrinsischen Hydrolyseraten der Rab4-Konstrukte bestätigte diese Ergebnisse (Kapitel 3.3). Das Konstrukt Rab4-t3 (1-184) war gegenüber Rab4-t1 (1-198) um weitere zwölf Aminosäuren verkürzt, während bei dem Konstrukt Rab4-t4 (1-176) der flexible Teil des C-Terminus vollständig entfernt wurde.

Die Expression von Rab4a wt, Rab4-t1, Rab4-t2, Rab4-t3 und Rab4-t4 erfolgte wie in Kapitel 2.2.9 beschrieben, wobei für alle Proteine bis auf Rab4-t4 eine starke Überproduktion nach IPTG-Induktion nachgewiesen werden konnte. Rab4-t4 wurde nur in geringen Mengen überexprimiert und war nach der Reinigung über die Ni-NTA Affinitätssäule immer noch durch Fremdproteine verunreinigt, die sich nicht vollständig abtrennen ließen. Die Reinigung der anderen Rab4-Konstrukte erfolgte wie in Kapitel 2.3.1 beschrieben, die Proteine konnten in ausreichender Menge und hoher Reinheit (> 98%), nachgewiesen durch SDS-Gelelektrophorese und Massenspektrometrie, erhalten werden. Für die Expression von Rab4-t1 erwies sich das Fusionsprotein mit HisTag aufgrund der höheren Ausbeute als die günstigere Variante. Rab4a wt wurde nur als GST-Fusionsprotein verwendet, da Rab4a wt bei der Proteolyse mit Faktor Xa abgebaut wurde und nur das GST-Protein übrig blieb. Bei der Proteolyse mit TEV-Protease zur Entfernung der Affinitätstags der Fusionsproteine aus dem pHISTEV-Vektor traten keinerlei Schwierigkeiten auf.

3.1.2 Rabaptin-5 und Rabaptin-5β

Rabaptin-5 wurde zunächst als Rab5-Effektor identifiziert (Stenmark *et al.*, 1995), die Wechselwirkung mit Rab4 wurde erstmals 1998 von Vitale *et al.* (Vitale *et al.*, 1998) beschrieben. Mit der Methode des *Yeast-Two-Hybrid-Screens* wiesen sie nach, daß die Interaktion mit Rab4 über den N-terminalen Bereich (Aminosäure 1-135) von Rabaptin-5 stattfindet. Rabaptin-5 und das homologe Rabaptin-5β (Abbildung 3.2) weisen laut Sekundärstrukturanalyse am N- und am C-Terminus *coiled coil*-Domänen auf (Vitale *et al.*, 1998; Gournier *et al.*, 1998), die eine flexible Stäbchenform der Proteine bedingen. Für die Kristallisationsexperimente wurden daher verkürzte Konstrukte entworfen, die nur die Rab4-bindende Domäne am N-Terminus von Rabaptin-5 bzw. Rabaptin-5β enthielten.

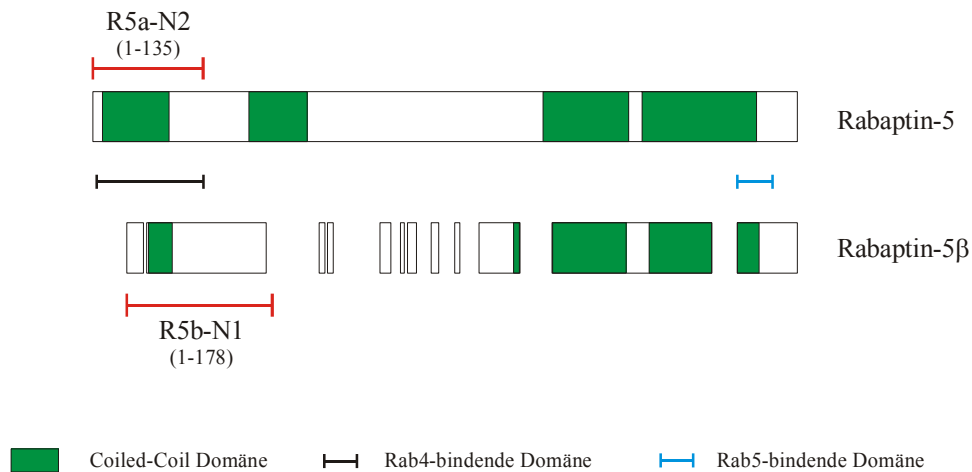


Abbildung 3.2: Schematische Darstellung der Rabaptin-5-Konstrukte. Bei der Expression mit dem pGATEV-Vektor wiesen die Konstrukte nach der Proteolyse mit der TEV-Protease am N-Terminus zwei zusätzliche Aminosäuren (GH) auf.

Die Expressionsplasmide pGATEV-R5a-N2 und pGATEV-R5b-N1 wurden von A. Scheidig und M. Rottmann (AG Scheidig) zur Verfügung gestellt. Vor Beginn dieser Arbeit waren erste Expressionversuche unternommen worden, es existierte jedoch noch kein feststehendes Reinigungsprotokoll. Die Reinigung der GST-Fusionsproteine erfolgte wie in Kapitel 2.3.1.3 beschrieben. Bei der Reinigung des TEV-Spaltungsansatzes über die Ni-NTA Affinitätssäule konnten das abgespaltene GST und die TEV-Protease jedoch nicht vollständig abgetrennt werden, da Rabaptin-5 und Rabaptin-5β unspezifisch an die Affinitätssäule gebunden wurden. Die unspezifische Bindung von Rabaptin-5 and Ni-NTA wurde ebenfalls von Lippé *et al.* (Lippé *et al.*, 2001) beschrieben und zur Reinigung des Rabaptin-5/Rabex-5-Komplexes aus Rinderhirn genutzt. Versuche zur Optimierung der Reinigung über die Ni-NTA Affinitätssäule lieferten kein ausreichend sauberes Protein. Weitere Reinigungsansätze über Ionenaustausch- und hydrophobe Interaktionschromatographie (HIC) führten zu hohen Proteinverlusten, ohne daß die Verunreinigungen vollständig abgetrennt werden konnten. Daher wurde R5b-N1 in den Vektor pET22b umkloniert, so daß es ohne Affinitätstag exprimiert werden konnte. Die Klonierung wurde von R. Krebs (AG Scheidig) durchgeführt. R5b-N1 wurde wie in Kapitel 2.3.1.4 beschrieben über eine Ionenaustauschersäule gereinigt, das Protein konnte in ausreichender Menge mit einer Reinheit von ~ 95% erhalten werden. Da in den Experimenten zur Charakterisierung der Komplexe keine Bindung zwischen R5a-N2

und den Rab4-Konstrukten nachgewiesen werden konnte, wurde auf die Umklonierung von R5a-N2 verzichtet.

3.2 Charakterisierung der Rab4/Rabaptin-5-Komplexe

3.2.1 Bindungsassay mit Affinitätsmatrix

Ein wichtiger Aspekt bei Experimenten mit verkürzten Proteinkonstrukten ist die Frage, inwiefern die Verkürzung die Eigenschaften des Proteins verändert. Die Auswirkung der C-terminalen Verkürzung von Rab4 auf die Interaktion mit R5a-N2 und R5b-N1 wurde in Ko-Elutionsexperimenten mit einer Affinitätsmatrix untersucht. Dabei wurde jeweils ein Bindungspartner mit Affinitätstag und ein Bindungspartner ohne Affinitätstag eingesetzt und mit der Matrix inkubiert. Der Vorteil der Methode besteht in der einfachen Abtrennung des nichtgebundenen Bindungspartners ohne Affinitätstag durch Waschen der Matrix mit Puffer.

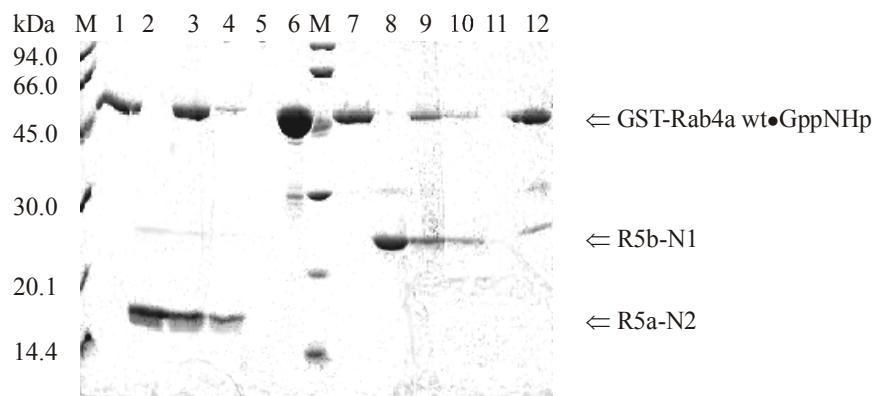


Abbildung 3.3: SDS-Gel zu Bindungstests mit GSH Affinitätsmatrix

2-4 nmol GST-Fusionsprotein wurden mit dem entsprechenden Bindungspartner (molares Verhältnis Rab4:Rabaptin-5 1:2) vorinkubiert und dann zu der GSH Agarose gegeben. Nach einer Inkubation von 1 h bei 4°C wurde die Matrix mehrfach mit Puffer gewaschen und gebundene Proteine mit 20 mM Glutathion eluiert. (M) Molekulargewichtsstandard (1) GST-Rab4a wt•GppNHp (2) R5a-N2 (3) GST-Rab4a wt•GppNHp mit R5a-N2 (4) Überstand nach Inkubation (5) Waschfraktion (6) Elution (7) GST-Rab4a wt•GppNHp (8) R5b-N1 (9) GST-Rab4a wt•GppNHp mit R5b-N1 (10) Überstand nach Inkubation (11) Waschfraktion (12) Elution.

Inkubiert man GST-Rab4a wt•GppNHp und R5a-N2 bzw. R5b-N1 mit GSH-Agarose, so ko-eluiert nur R5b-N1 mit GST-Rab4a wt•GppNHp (Abbildung 3.3 Bahn 12), mit R5a-N2 wird keine Ko-Elution beobachtet (Abbildung 3.3 Bahn 6). Das gleiche Ergebnis erhält man bei der Inkubation von GST-Rab4-t1•GppNHp mit R5a-N2 bzw. R5b-N1 (Tabelle 3.1).

Tabelle 3.1: Ergebnisse der Bindungstests mit GSH-Agarose

	GST-R5ba-N2	R5a-N2	GST-R5b-N1	R5b-N1
GST-Rab4a wt•GppNHp		-		+
GST-Rab4t-1•GppNHp		-		+
Rab4-t1•GppNHp	-		+	
Rab4-t2•GppNHp	-		+	
Rab4-t3•GppNHp	-		-	
Rab4-t4•GppNHp	-		-	

Ko-Elution: + ja - nein

R5a-N2 bildet auch als GST-Fusionsprotein keine Komplexe mit den C-terminal verkürzten Rab4-Konstrukten. Rab4-t1•GppNHp ($\Delta C-15$) und Rab4-t2•GppNHp ($\Delta C-3$) ko-eluierten mit GST-R5b-N1, Rab4-t3•GppNHp ($\Delta C-29$) und Rab4-t4•GppNHp ($\Delta C-37$) dagegen nicht. Diese Ergebnisse zeigen, daß der C-Terminus von Rab4 an der Interaktion mit dem Effektor maßgeblich beteiligt ist. Effektoren interagieren mit der GTP-Form der kleinen GTP-bindenden Proteine, nicht aber mit der GDP-Form. Dementsprechend wird bei der Verwendung der Rab4-Konstrukte in der GDP-Form keine Interaktion mit R5a-N2 oder R5b-N1 beobachtet.

3.2.2 Analytische Gelfiltration

Rabaptin-5 und Rabaptin-5 β weisen am N – und C-Terminus *heptad repeats* auf (Gournier *et al.*, 1998; Stenmark *et al.*, 1995), die charakteristisch für *coiled coil*-Domänen sind. *Coiled coils* bestehen aus zwei bis fünf α -Helices (Lupas, 1996), die zu einer Superhelix verdreht sind. Dabei können α -Helices mehrerer Polypeptidketten beteiligt sein, die auf diese Weise stabile Oligomere bilden. CD-Messungen bestätigen, daß die Sekundärstruktur von Rabaptin-5 zu $\sim 70\%$ aus α -Helices besteht (Vitale *et al.*, 1998). Vitale *et al.* wiesen durch Quervernetzungs- und Gelfiltrationsexperimente nach, daß sowohl cytosolisches als auch

rekombinantes Rabaptin-5 Dimere bildet. Die Stöchiometrie des Rab4/Rabaptin-5-Komplexes ist bisher nicht bekannt, denkbar sind ein 2:2-Komplex (zwei Rab4-Moleküle binden an ein Rabaptin-5-Dimer) oder ein 1:2-Komplex (ein Rab4-Molekül bindet an ein Rabaptin-5-Dimer). Die Dimerisierung der verkürzten Rabaptin-5-Konstrukte und die Stöchiometrie der Rab4/Rabaptin-5-Komplexe wurden mittels Gelfiltration mit einer Sephadex 75-Säule untersucht (Kapitel 2.3.9). Für die Untersuchung der Komplexe wurden Rab4- und Rabaptin-5-Konstrukte im molaren Verhältnis 1:2 1,5 h bei 4°C vorinkubiert und dann auf die Säule aufgetragen. Die Elution wurde anhand der Absorption bei 280 nm verfolgt. Über die Retentionszeiten wurden mittels einer Eichkurve die Molekulargewichte der Proteine bestimmt (vgl. Tabelle 3.2). Die für R5a-N2 und R5b-N1 erhaltenen Werte sind größer, als für ein Dimer zu erwarten wäre und entsprechen eher einem Trimer. Die Ursache dafür ist wahrscheinlich die durch die *coiled coil*-Domäne bedingte Stäbchenform der Rabaptin-5-Konstrukte, da die Eichgerade mit globulären Proteinen erstellt wurde. Die Proportionalität zwischen Retentionszeit und dem Logarithmus des Molekulargewichts gilt nur eingeschränkt für längliche Proteine.

Tabelle 3.2: Vergleich der theoretisch berechneten Molekulargewichte mit den aus der Gelfiltration erhaltenen Werten

Konstrukt	Molekulargewicht (kDa)	
	aus Proteinsequenz	experimentell
R5a-N2	15,9 (Dimer 31,8)	43,7
R5b-N1 (pGATEV)	19,9 (Dimer 39,8)	65,6
R5b-N1 (pET22b)	19,7 (Dimer 39,4)	67,4
Rab4-t1	22,5	19,4
Rab4-t2	23,8	21,7
Rab4-t3	21,0	19,1
Rab4-t4	20,0	15,7

In Abbildung 3.4 sind die Elutionsprofile für Rab4-t1, R5b-N1, Rab4-t1•GDP mit R5b-N und Rab4-t1•GppNHp mit R5b-N1 dargestellt. Das Elutionsprofil für Rab4-t1•GDP mit R5b-N1 zeigt Peaks bei 57 und 77 min, die Retentionszeiten entsprechen denen der Einzelproteine. Die Höhe der Peaks gibt nicht das molare Mengenverhältnis der Proteine wieder, da R5b-N1 lediglich eine aromatische Aminosäure (Tyr84) aufweist und daher bei 280 nm nur geringe

Absorption zeigt. Im Elutionsprofil für Rab4-t1•GppNHp mit R5b-N1 ist der Peak bei 77 min fast verschwunden, die Höhe des Peaks bei 57 min dagegen hat deutlich zugenommen.

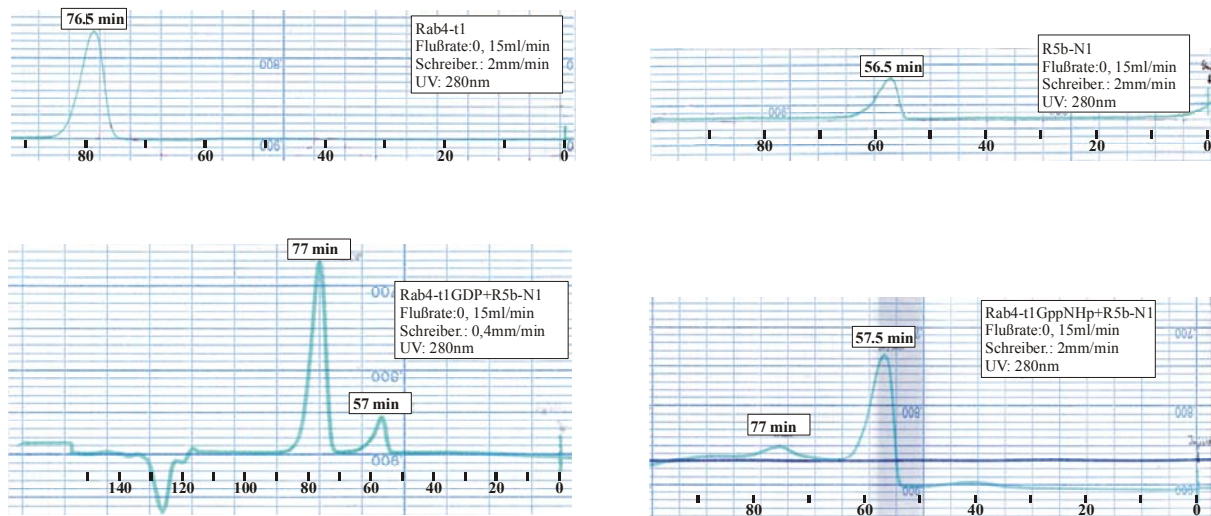


Abbildung 3.4: Elutionsprofile zur analytischen Gelfiltration

50 μ M Rab4-t1•GDP bzw. Rab4-t1•GppNHp wurden mit 100 μ M R5b-N1 versetzt, 1,5 h bei 4°C inkubiert und 100 μ l des Ansatzes auf die Gelfiltrationssäule (Superdex 75 HR10/30) aufgetragen. Die Elution der Proteine erfolgte mit einer Flußrate von 0,15 ml/min.

Die Zunahme der Absorption wird durch die Ko-Elution von Rab4-t1•GppNHp mit R5b-N1 verursacht, die durch MALDI-Massenspektrometrie nachgewiesen wird (Abbildung 3.5). Sowohl Rab4-t1•GppNHp als auch R5b-N1 werden detektiert, d. h. der Komplex eluiert mit der gleichen Retentionszeit wie R5b-N1 allein. Aufgrund des Molekulargewichtes wurde für den Komplex eine kürzere Retentionszeit erwartet, es wäre jedoch möglich, daß der Rab4-t1•GppNHp/R5b-N1-Komplex eine globuläre Form aufweist (im Gegensatz zur Stäbchenform eines R5b-N1-Dimers) und daher die Anforderungen für die Proportionalitätsbeziehung zwischen der Retentionszeit und dem Logarithmus des Molekulargewichts erfüllt. Das über die Retentionszeit ermittelte Molekulargewicht von 66-67 kDa entspräche einem 1:2-Komplex (~ 63 kDa). Unter den gleichen Bedingungen hätte ein 2:2-Komplex (~ 85 kDa) eine Retentionszeit von ~ 53 min. Angesichts dieser geringen Unterschiede ist eine definitive Aussage über die Stöchiometrie des Komplexes nicht möglich.

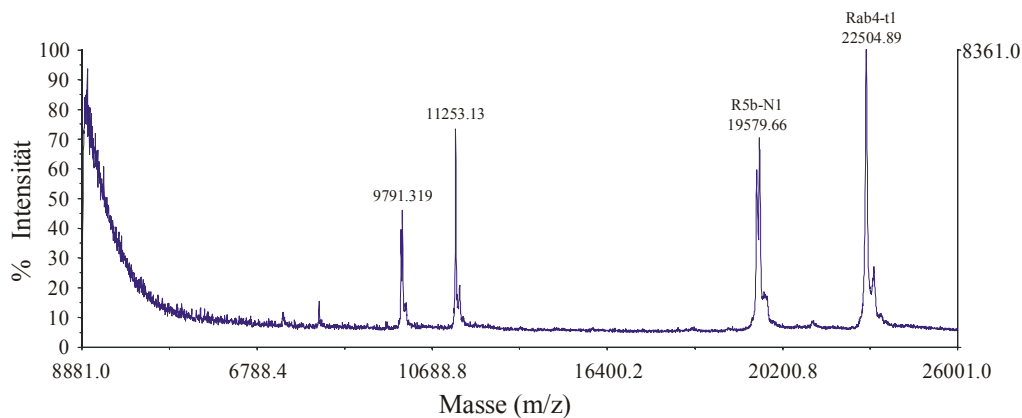


Abbildung 3.5: MALDI-Massenspektrum des Rab4-t1•GppNHp/R5b-N1-Komplexes (Elutionsfraktion bei 57 min)

Rab4-t2•GppNHp eluiert ebenfalls zusammen mit R5b-N1, Rab4-t3•GppNHp und Rab4-t4•GppNHp dagegen nicht. Keines der Rab4-Konstrukte eluiert zusammen mit R5a-N2. Diese Beobachtungen entsprechen den Ergebnissen der Bindungstests mit der GSH-Agarose (Kapitel 3.2.1).

3.2.3 Bestimmung der Dissoziationskonstanten der Komplexe

Die Ergebnisse der Bindungstests mit GSH-Agarose (Kapitel 3.2.1) und der analytischen Gelfiltration (Kapitel 3.2.2) zeigen, daß die Verkürzung des C-Terminus von Rab4 die Affinität zu R5b-N1 verringert. Zur quantitativen Charakterisierung der Affinität wurden die Dissoziationskonstanten der Komplexe durch Gleichgewichtstitrationen mittels Fluoreszenzspektroskopie ermittelt. Für diese Messungen wurde die intrinsische Tryptophanfluoreszenz der Rab4-Konstrukte genutzt, da bei der Verwendung von mant-GppNHp und Cystein-gekoppelten Fluoreszenzfarbstoffen (IANBD-Amid, TMR, Eosin) keine ausreichenden Signalveränderungen gemessen werden konnten. Rab4 weist insgesamt fünf Cysteine auf, die zwei Cysteine des Prenylierungsmotivs sind in den verkürzten Konstrukten nicht enthalten. Die übrigen drei befinden sich in der Nähe der Nukleotidbindungsstelle (Cys23), innerhalb des zentralen β -Faltblatts (Cys119) und in der Helix α 5 (Cys165). R5b-N1 weist ein Cystein an der Position 66 auf. Rab4 weist zwei Tryptophane an den Positionen 62 und 102 auf. Diese Positionen sind in Rab-Proteinen konserviert (Valencia *et al.*, 1991). Trp62 grenzt an das hochkonservierte DTAGQE-Motiv an und ist Teil einer β -Faltblattstruktur (β 3), Trp102 liegt innerhalb einer α -Helix (α 3). Beide Tryptophane liegen

in der Nähe der Switch I- und Switch II-Regionen, die während der GTP-Hydrolyse eine Konformationsänderung erfahren. Die Switch I-Region wird auch als Effektorschleife (Loop 2) bezeichnet, da sie die Erkennung des Aktivitätszustands der GTPase durch den Effektor vermittelt (Pai *et al.*, 1989).

Voraussetzung für die Durchführung von Fluoreszenzmessungen ist eine Änderung der lokalen Umgebung des Fluorophors bei der Zugabe des Bindungspartners, durch die sich die Quantenausbeute des Signals verändert. Abbildung 3.6 zeigt Fluoreszenzemissionsspektren von 2 μM Rab4-t1•GppNHp ohne Effektor und in Gegenwart von 5 μM R5b-N1. Die Bindung von R5b-N1 an Rab4-t1•GppNHp bewirkt scheinbar eine Erhöhung der Fluoreszenzemission um den Faktor 1,5. Allerdings wird diese Erhöhung zum Teil durch die Fluoreszenzemission von R5b-N1 (Abbildung 3.6 R5b-N1 (·····)) verursacht, deren Ursprung nicht geklärt ist. Rabaptin-5 β weist an Position 277 ein Tryptophan auf, das in R5b-N1 (1-178) jedoch nicht enthalten ist.

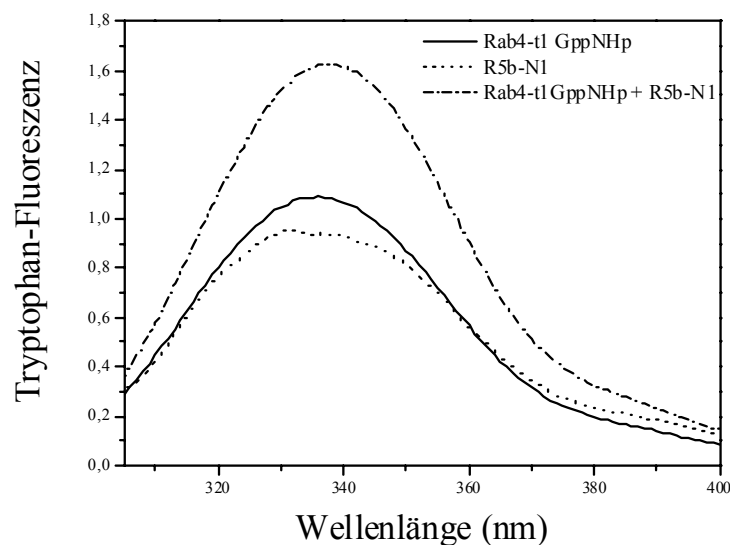


Abbildung 3.6: Fluoreszenzemissionsspektrum von Rab4-t1•GppNHp und R5b-N1

Die Aufnahme der Spektren erfolgte in Fluoreszenzmeßpuffer bei 15°C und einer Anregungswellenlänge von 290 nm. Das Emissionsmaximum lag bei 336 nm. Die Abbildung zeigt die Fluoreszenzemissionsspektren von 2 μM Rab4-t1•GppNHp (—), 2 μM Rab4-t1•GppNHp mit 5 μM R5b-N1 (— · — ·) und 5 μM R5b-N1 (·····).

Aufgrund des anomalen Fluoreszenzverhaltens von R5b-N1 setzt sich das in den Titrationen gemessene Emissionssignal aus zwei Beiträgen zusammen: Die Emissionsänderung durch die Interaktion der Rab4-Konstrukte mit R5b-N1 und die Fluoreszenzerhöhung in Folge der zunehmenden R5b-N1-Konzentration. Zur Eliminierung des Beitrags von R5b-N1 wurden die

Bindungskurven aus dem Differenzsignal der Titration von R5b-N1 gegen die Konstrukte und einer Referenztitration von R5b-N1 gegen Fluoreszenzmeßpuffer ermittelt.

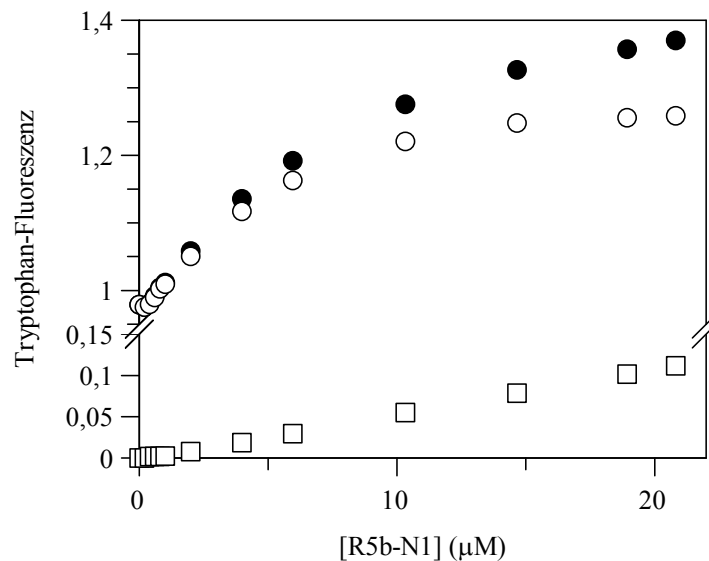


Abbildung 3.7: Fluoreszenztitration von Rab4-t1•GppNHp mit R5b-N1

4 µM Rab4-t1•GppNHp wurden mit R5b-N1 bei 15°C im Meßpuffer titriert und die Tryptophanfluoreszenz gemessen (●). Für die Referenztitration wurde Fluoreszenzmeßpuffer vorgelegt und mit R5b-N1 titriert (□). Die Bindungskurve zur Ermittlung der Dissoziationskonstanten wurde durch Differenzbildung ermittelt (○)

Die Dissoziationskonstanten wurden dann durch die Angleichung der Bindungskurve an eine quadratische Gleichung berechnet (Abbildung 3.8). Die Affinität von R5b-N1 zu Rab4-t1•GppNHp (Abbildung 3.8A $K_d=2,8 \mu\text{M}$) und Rab4-t2•GppNHp (Abbildung 3.8B $K_d=3,7 \mu\text{M}$) ist vergleichbar, Rab4-t3•GppNHp (Abbildung 3.8C $K_d >40\mu\text{M}$) dagegen bindet nur sehr schwach an R5b-N1. Zur Kontrolle der Erkennung des Aktivitätszustandes der Rab4-Konstrukte durch R5b-N1 wurde Rab4-t1•GDP mit R5b-N1 titriert (Abbildung 3.8D (○)). Das Emissionssignal nimmt im Verlauf der Titration ab, der Vergleich mit einer Referenztitration von Rab4-t1•GDP mit Fluoreszenzmeßpuffer (Abbildung 3.8D (▲)) zeigt, daß diese Signalabnahme wahrscheinlich auf *Bleaching*-Effekte zurückzuführen ist. Eine Bindung von R5b-N1 an Rab4-t1•GDP wird nicht beobachtet.

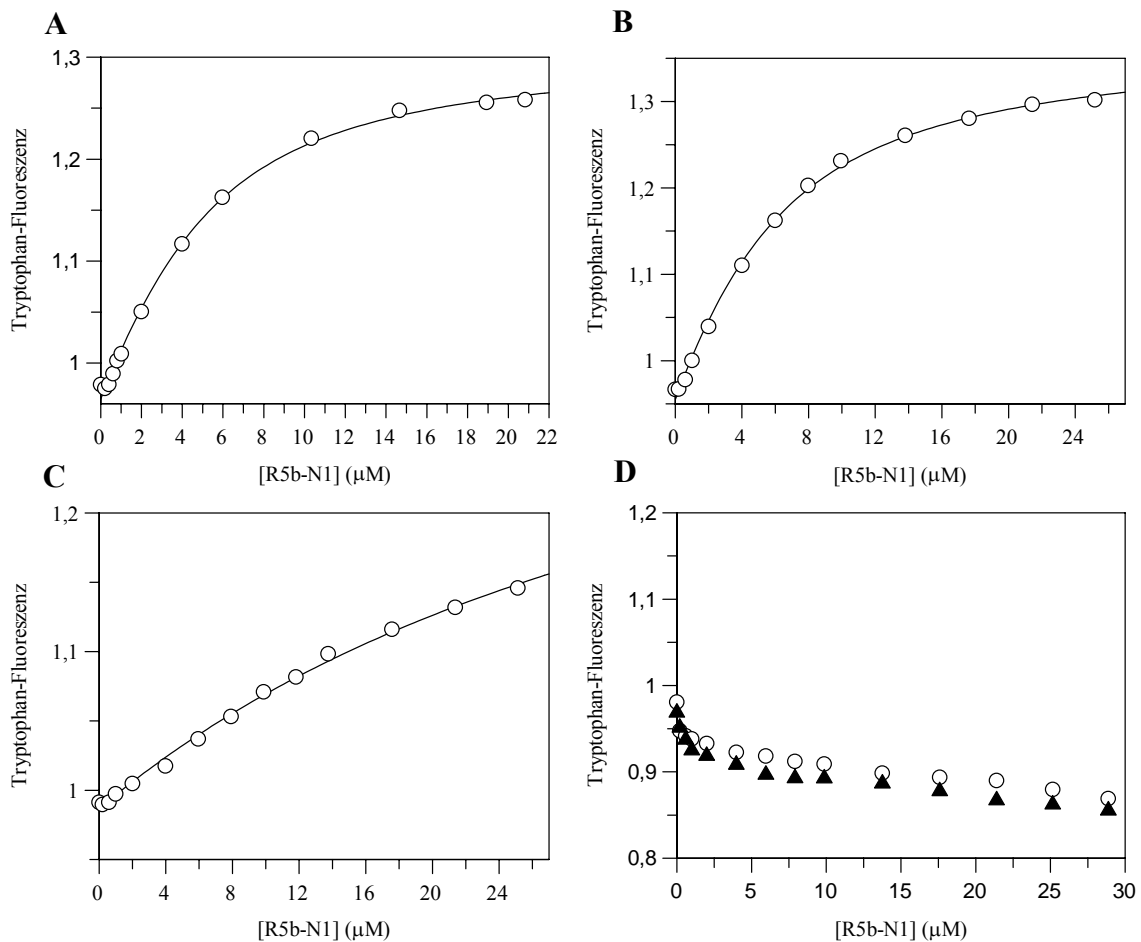


Abbildung 3.8: Differenzkurven zu den Gleichgewichtstitrationen der Rab4-Konstrukte mit R5b-N1

Die Bindungskurven wurden aus dem Differenzsignal der Titration der Rab4-Konstrukte mit R5b-N1 und einer Referenztitration von Meßpuffer mit R5b-N1 ermittelt. Die Dissoziationskonstanten wurden durch die Angleichung der Bindungskurve an eine quadratische Gleichung (Kapitel 2.4.3, Gl. 2.1) berechnet. (A) Rab4-t1•GppNHp mit R5b-N1 (B) Rab4-t2•GppNHp mit R5b-N1 (C) Rab4-t3•GppNHp mit R5b-N1 (D) Rab4-t1•GDP mit R5b-N1 (○) und Meßpuffer mit R5b-N1 (▲)

3.3 GTP-Hydrolyse

Rab-Proteine wirken wie die anderen Mitglieder der Ras-Superfamilie als molekulare Schalter, die durch GTP-Hydrolyse von der aktiven GTP-Form in die inaktive GDP-Form übergehen. Dabei ist zwischen intrinsischer und stimulierter Hydrolyse zu unterscheiden. Die vergleichsweise langsame intrinsische Hydrolyse der kleinen GTP-bindenden Proteine wird durch die Interaktion mit GTPase aktivierenden Proteinen (GAP) beschleunigt. Einige Effektoren dagegen zeigen inhibitorische Wirkung (Nagelkerken *et al.*, 2000; Rybin *et al.*, 1996).

Die intrinsischen Hydrolyseraten einiger Rab-Proteine wurden bereits bestimmt (vgl. Tabelle 3.3), dabei wurden deutliche Unterschiede zwischen den einzelnen Proteinen festgestellt. Viele der analysierten Rab-Proteine hydrolysieren GTP sehr langsam ($\sim 10^{-5} \text{s}^{-1}$) mit Hydrolyseraten in der gleichen Größenordnung wie die nicht katalysierte Nukleotid-dissoziation. Rab5 dagegen besitzt eine Hydrolyserate von $5,5 \cdot 10^{-4} \text{s}^{-1}$ (bei 25°C) und ist damit z.B. 12 mal schneller als Rab7. Die Variation der Hydrolyseraten ist angesichts der hohen Sequenz- und Strukturhomologie der Rab-Proteine sehr interessant, da insbesondere die an der Hydrolyse beteiligten Aminosäuren hochkonserviert sind. Daher stellt sich die Frage, welche Aminosäuren für diese Variation verantwortlich sind und ob es einen Zusammenhang zwischen der Hydrolysegeschwindigkeit und den Transportwegen gibt, die durch das jeweilige Rab-Protein kontrolliert werden. Der Vergleich der Hydrolyseraten der C-terminal verkürzten Konstrukte von Rab5 und Rab7 mit den Wildtyp-Proteinen zeigt, daß die Verkürzung die GTP-Hydrolyse nicht beeinflusst, somit ist die biologische Relevanz der kristallographischen Ergebnisse bei der Verwendung von verkürzten Konstrukten gewährleistet.

Tabelle 3.3: Intrinsische Hydrolyseraten verschiedener Rab-Proteine bei 37° und 25°C

	$k \text{ (s}^{-1}\text{) bei } 37^\circ\text{C}$		$k \text{ (s}^{-1}\text{) bei } 25^\circ\text{C}$
Rab5	$0,002^{\text{a}}/0,0012^{\text{b}}$	Rab3a	$0,0007^{\text{f}}$
Rab5($\Delta\text{N11}\Delta\text{C25}$)	$0,0010^{\text{b}}$	Rab5	$0,00055^{\text{a}}$
Rab7	$0,00009^{\text{a}}/0,000085^{\text{c}}$	Rab7	$0,000045^{\text{a}}$
Rab7(ΔC5)	$0,000093^{\text{c}}$	Ypt1	$0,00004^{\text{e}}/0,00003^{\text{b}}$
Rab7(ΔC10)	$0,000085^{\text{c}}$	Ypt7	$0,00004^{\text{e}}/0,00002^{\text{b}}$
Rab7(ΔC25)	$0,00010^{\text{c}}$	Ypt51	$0,00009^{\text{e}}/0,00006^{\text{b}}$
		Ypt52	$0,0014^{\text{d}}$
		Ypt53	$0,0002^{\text{d}}$

a: (Simon *et al.*, 1996) b: (Esters, 2000) c: (Neu *et al.*, 1997) d: (Alberts & Gallwitz, 1999a) e: (Alberts *et al.*, 1999b) f: (Kikuchi *et al.*, 1988)

Zur Bestimmung der intrinsischen Hydrolyseraten der C-terminal verkürzten Rab4-Konstrukte wurden die nukleotidfreien Proteine mit der 1,5fachen molaren Menge GTP und 5 mM MgCl_2 bei 24°C inkubiert und der Nukleotidgehalt zu verschiedenen Zeitpunkten über HPLC bestimmt. Die Reaktion wurde anhand der Zunahme der GDP-Konzentration verfolgt.

Dabei wurde die GDP-Konzentration im Verhältnis zur Gesamtnukleotidmenge betrachtet, um den Fehler des aufgetragenen Probenvolumens zu verringern. Zur Untersuchung des Einflusses von R5b-N1 auf die Hydrolyse wurde den Reaktionsansätzen die 2fache molare Menge R5b-N1 zugesetzt. Die Hydrolyserate wurde durch eine Anpassung der erhaltenen Werte an eine einfache exponentielle Funktion bestimmt (Abbildung 3.9).

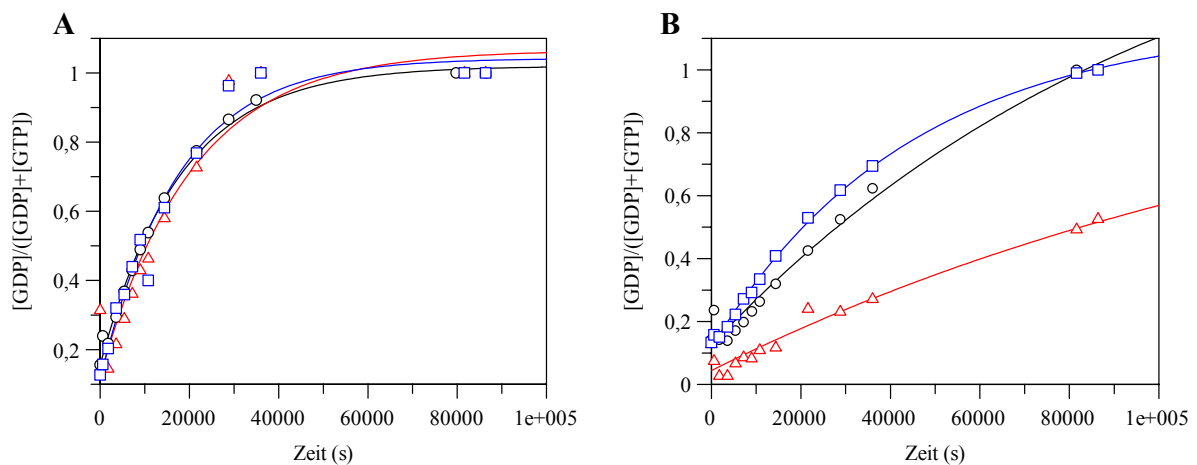


Abbildung 3.9: Bestimmung der intrinsischen Hydrolyseraten der Rab4-Konstrukte ohne (A) und mit R5b-N1 (B)

Rab4-t1 (○), Rab4-t2 (△) und Rab4-t3 (□) wurden mit der 1,5fachen molaren Menge GTP und 5 mM $MgCl_2$ bei 24°C inkubiert. Bei den Experimenten mit R5b-N1 wurde die 2fache molare Menge R5b-N1 zugesetzt. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden Proben genommen und der Nukleotidgehalt über HPLC-Analyse bestimmt.

Tabelle 3.4: GTP-Hydrolyseraten von Rab4-t1, Rab4-t2 und Rab4-t3 ohne und mit R5b-N1

	k (s^{-1})		k (s^{-1})
Rab4-t1	0,000055	Rab4-t1+R5b-N1	0,00001
Rab4-t2	0,000051	Rab4-t2+R5b-N1	0,000006
Rab4-t3	0,000057	Rab4-t3+R5b-N1	0,00002

Die Bestimmung der Hydrolyseraten von Rab4-t1, Rab4-t2 und Rab4-t3 (Tabelle 3.4) zeigt, daß Rab4 wie Rab7 zu den sehr langsamen GTPasen gehört. Der Vergleich der Hydrolyseraten der drei Rab4-Konstrukte bestätigt, daß die C-terminale Verkürzung keinen Einfluß auf die GTP-Hydrolyse hat. R5b-N1 verlangsamt die Hydrolyse, dabei ist der Effekt bei Rab4-t3 geringer als bei den anderen beiden Konstrukten. Diese Abstufung spiegelt die Stabilität der

Komplexe wieder, da bei der Bestimmung der Dissoziationskonstanten (Kapitel 3.2.3) festgestellt wurde, daß Rab4-t3 nur sehr schwach an R5b-N1 bindet.

Die Verlangsamung der Hydrolyse durch Effektoren wurde auch bei Rab5 mit Rabaptin-5 (Rybin *et al.*, 1996) und bei Rab4 mit Rabaptin-4 (Nagelkerken *et al.*, 2000) beobachtet. Im Gegensatz dazu stimuliert Rabphilin-3a die GTP-Hydrolyse von Rab3a, der Effekt ist allerdings sehr schwach (Kishida *et al.*, 1993; Nagelkerken *et al.*, 2000). Gleichzeitig wird die GAP-stimulierte Hydrolyse durch Rabphilin-3a stark gehemmt. Es wird vermutet, daß die Herabsetzung der intrinsischen Hydrolyserate bzw. die Inhibition der GAP-stimulierten Hydrolyse wie bei Rab3a einen weiteren Teilaspekt der Regulation des GTP/GDP-Zyklus der Rab-Proteine darstellt.

3.4 Kristallisation und Datenaufnahme

3.4.1 Rab4-t1•GppNHp

Erste Kristallisationsexperimente (Hampton Screen I und II) mit Rab4-t1•GppNHp und Rab4-t1•GDP waren bereits von A. Scheidig durchgeführt worden; dabei wurde mit Ammoniumsulfat und PEGs als Fällungsmittel mikrokristallines Präzipitat beobachtet. Zur Optimierung der Kristallisationsbedingungen wurde die Ammoniumsulfatkonzentration, die Konzentration und das Molekulargewicht des PEG sowie der pH-Wert in einem *grid screen* variiert. Die Experimente wurden bei 20°C durchgeführt. In Tabelle 3.5 sind die Bedingungen aufgeführt, bei denen Kristalle erhalten wurden. Die Proteinlösung setzte sich zusammen aus 23 mg/ml Rab4-t1•GppNHp in 20 mM Tris/HCl pH 7,5, 25 mM NaCl, 5 mM MgCl₂ und 1 mM β-Mercaptoethanol.

Tabelle 3.5: Kristallisationsbedingungen von Rab4-t1•GppNHp

Nr.	Bedingung	Kristalle	Dauer
1	1,4 M (NH ₄) ₂ SO ₄ , 5% v/v MME PEG550, 0,1 M HEPES/NaOH pH 7,5	Einkristalle	5 Tage
2	1,4 M (NH ₄) ₂ SO ₄ , 5% v/v MME PEG550, 0,1 M Tris/HCl pH 8,5	Einkristalle	5 Tage
3	1,4 M (NH ₄) ₂ SO ₄ , 5% v/v MME PEG550, 0,1 M ADA pH 5,0	Einkristalle	7 Tage
4	1,4 M (NH ₄) ₂ SO ₄ , 5% v/v MME PEG550, 0,1 M ADA pH 5,5	Einkristalle	9 Tage
5	1,6 M (NH ₄) ₂ SO ₄ , 5% v/v MME PEG550, 0,1 M ADA pH 5,5	mit Phasentrennung	9 Tage
6	1,6 M (NH ₄) ₂ SO ₄ , 5% v/v MME PEG550, 0,1 M HEPES/NaOH pH 7,5	mit Aufwachsungen	12 Tage
7	0,5 M (NH ₄) ₂ SO ₄ , 20% MME PEG 2000, 0,1 M ADA pH 5.5	mit Aufwachsungen	20 Tage
8	0,5 M (NH ₄) ₂ SO ₄ , 20% PEG 3350, 0,1 M ADA pH 5.5	mit Phasentrennung	20 Tage
9	1,6 M (NH ₄) ₂ SO ₄ , 5% v/v MME PEG550, 0,1 M Tris/HCl pH 8,5	mit Aufwachsungen	21 Tage
10	1,2 M (NH ₄) ₂ SO ₄ , 5% v/v MME PEG550, 0,1 M ADA pH 5,5	„verwischte“ Konturen	1,5 Monate
11	1,2 M (NH ₄) ₂ SO ₄ , 5% v/v MME PEG550, 0,1 M HEPES/NaOH pH 7,5	Einkristalle	1,5 Monate

Die Kristalle hatten die Form hexagonaler Bipyramiden. Sie wurden in einer Gefrierschutzlösung mit 25% Glycerin in Reservoirolösung inkubiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei 100 K auf ihre Streueigenschaften getestet. Die Qualität der Diffraktionsdaten war sehr schlecht, die Reflexe waren teilweise überlagert oder aufgespalten, die Auflösung betrug 4 Å und weniger. Es stellte sich heraus, daß die Form der Reflexe nicht

durch Risse im Kristall verursacht wurde, sondern auf die großen Abmessungen der Einheitszelle zurückzuführen war (eine Achse $> 300 \text{ \AA}$). Zur Optimierung der Kristallisation wurden folgende Parameter getestet: Einfluß der Temperatur, Veränderung des pH-Wertes, Einfluß von Additiven, Variation der Kristallisationsmethode (sitzender statt hängender Tropfen), Feinabstimmung der Ammoniumsulfat- und der PEG-Konzentration. Die besten Kristalle wurden mit 1,45 M Ammoniumsulfat, 5% MME PEG 550 und 0,1 M ADA pH 5,5 bei 20°C mit der Methode des hängenden Tropfens erhalten (Abbildung 3.10) und zur Aufnahme eines Datensatzes an der Beamline ID14-2 des ESRF in Grenoble verwendet.

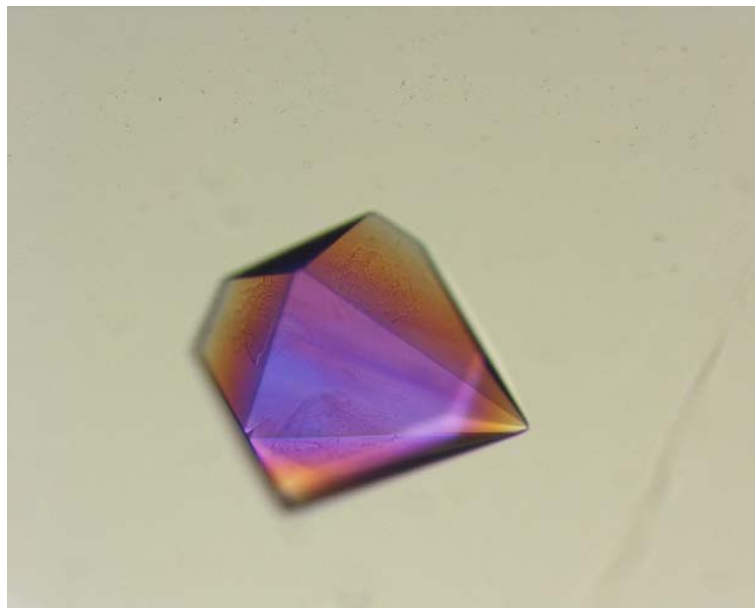


Abbildung 3.10: Kristall von Rab4-t1•GppNHp (Reservoirlösung: 1,45 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 5% MME PEG, 0,1 M ADA pH 5,5)

Es konnten Daten bis zu einer Auflösung von $3,2 \text{ \AA}$ gesammelt werden. Aufgrund der äußeren Form der Kristalle war zunächst eine hexagonale Raumgruppe ($a = b \neq c$, $\alpha = \beta = 90^\circ$, $\gamma = 120^\circ$) vermutet worden, nach der Bestimmung der Zellparameter mit $a = 116,8 \text{ \AA}$, $b = 119,8 \text{ \AA}$, $c = 320,9 \text{ \AA}$, $\alpha = 89,9^\circ$, $\beta = 89,6^\circ$, $\gamma = 61,0^\circ$ erfolgte jedoch die Zuordnung zu der triklinen Raumgruppe P1 ($a \neq b \neq c$, $\alpha \neq \beta \neq \gamma$) mit ~ 75 Rab4-t1-Molekülen pro asymmetrischer Einheit (basierend auf einem Matthews-Parameter von $2,3 \text{ \AA}^3/\text{Da}$). Da die Verfeinerung einer Struktur mit 75 Molekülen in der asymmetrischen Einheit einen unverhältnismäßig hohen Aufwand darstellt und angesichts der niedrigen Auflösung von $3,2 \text{ \AA}$ ein Vergleich der Rab4-t1•GppNHp-Struktur mit bereits gelösten Rab-Strukturen

(Rab5c•GppNHp 1,8 Å (Merithew *et al.*, 2001), Rab3a•GppNHp mit Rabphilin3a 2,6 Å (Ostermeier & Brünger, 1999), Ypt51p•GppNHp 1,47 Å (Esters *et al.*, 2000), Rab5a•GppNHp/GDP/AlF₃ 1,5 –1,8 Å (Zhu *et al.*, 2003), Rab6•GDP 2,3 Å (Chattopadhyay *et al.*, 2000), Rab3a•GppNHp 2,0 Å (Dumas *et al.*, 1999), Sec4p•GppNHp 2,0 Å/GDP 1,8 Å (Stroupe & Brünger, 2000)) keine detaillierten Ergebnisse erwarten ließ, wurde der Datensatz nicht weiter ausgewertet.

3.4.2 Rab4-t1•GDP

Die in Kapitel 3.4.1 beschriebenen Kristallisationsexperimente, die auf den Beobachtungen von A. Scheidig nach der Durchführung der Hampton Screens basierten, wurden auch mit Rab4-t1•GDP durchgeführt. Dabei wurden mit 1,4 M (NH₄)₂SO₄, 3-7% MME PEG 550, 0,1 M ADA pH 5.0 und pH 5,5 mikrokristallines Präzipitat und Spherulite (Abbildung 3.11) erhalten.

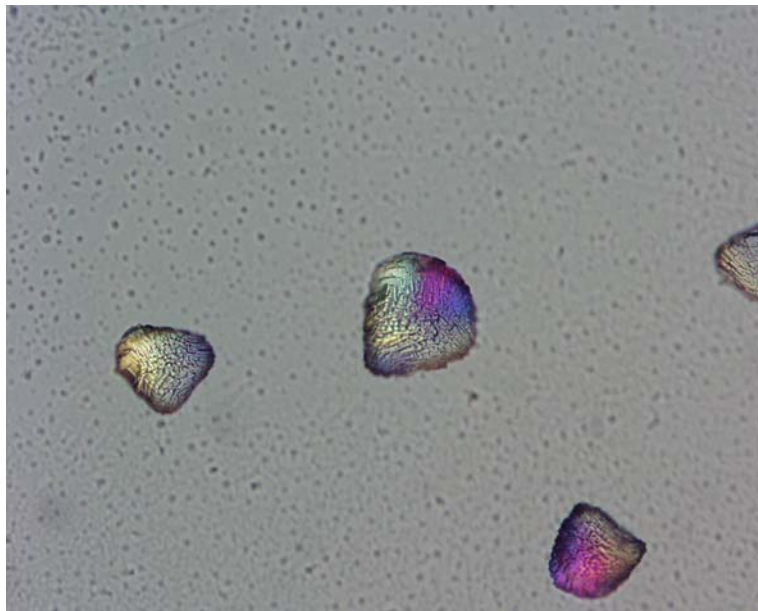


Abbildung 3.11: Spherulite von Rab4-t1•GDP (Reservoirlösung: 1,5 M (NH₄)₂SO₄, 3% MME PEG 550, 0,1 M ADA pH 5,5)

Ähnlich wie bei Rab4-t1•GppNHp wurde eine Optimierung der Kristallisationsbedingungen durch Variation der Temperatur, des pH-Wertes, der Ammoniumsulfatkonzentration und der

PEG-Konzentration versucht und *micro seeding*-Experimente durchgeführt. Es konnten jedoch keine Einkristalle erhalten werden.

3.4.3 Rab4-t2•GppNHp

Die ersten Kristallisationsexperimente mit Rab4-t2•GppNHp wurden mit den Hampton Screens I, II und dem PEG/Ion-Screen durchgeführt. Zusätzlich wurde der *grid screen* durchgeführt, mit dem die ersten Kristalle von Rab4-t1•GppNHp erhalten wurden. Die Proteinlösung enthielt 17,6 mg/ml Rab4-t2•GppNHp in 20 mM Tris/HCl pH 7,5, 25 mM NaCl, 1 mM MgCl₂ und 1 mM 2-Mercaptoethanol. Nach dreieinhalb Monaten wurden die in Abbildung 3.12 abgebildeten Kristalle beobachtet, die aus dicht übereinandergelagerten dünnen Plättchen bestanden. Die Reservoirlösung enthielt 1,4 M Ammoniumsulfat und 0,1 M HEPES/NaOH pH 7,5, es handelte sich dabei um eine Bedingung des *grid screens* von Rab4-t1•GppNHp. In den Kristallisationsansätzen mit den Lösungen der Hampton Screens wurden keine Kristalle beobachtet.

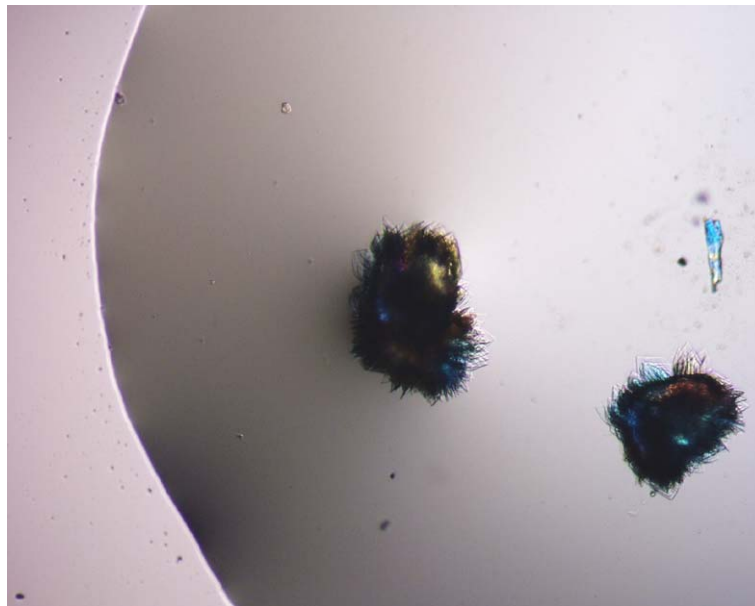


Abbildung 3.12: Kristalle von Rab4-t2•GppNHp (Reservoirlösung: 1,4 M (NH₄)₂SO₄, 0,1 M HEPES/NaOH pH 7,5)

Der Versuch, die Kristalle in neuen Ansätzen zu reproduzieren und die Kristallisationsdauer durch *micro seeding* zu verkürzen verlief negativ, es konnten keine neuen Kristalle erhalten

werden. Beim Animpfen der Tropfen der ursprünglichen Kristallisationsansätze, in denen sich bis dahin keine Kristalle gebildet hatten, wurden dagegen erneut die dünnen Plättchenstapel beobachtet (Abbildung 3.13).

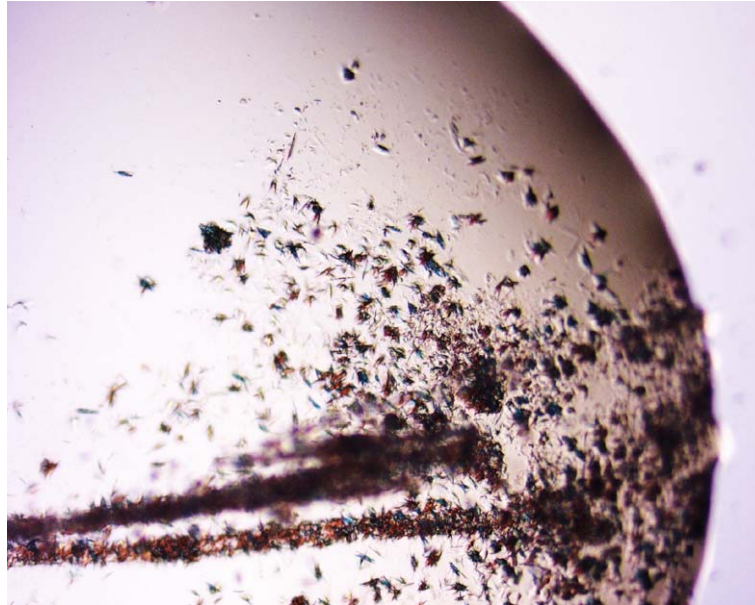


Abbildung 3.13: *Streak-seeding*-Experiment: Der Tropfen wurde mit Hilfe eines Katzenhaares angeimpft, die Kristallplättchen bildeten sich nach einem Tag (Reservoirlösung: 1,4 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,1 M HEPES/NaOH pH 7,0).

Die Ergebnisse der Reproduktionsversuche und der lange Zeitraum bis zur Bildung der ersten Kristallplättchen ließen auf einen möglichen Abbau des Proteins schließen. Daher wurden sowohl die ursprüngliche Rab4-t2•GppNHp-Lösung, die bei -80°C gelagert wurde, als auch die Kristalle, die bei 20°C entstanden waren, massenspektrometrisch untersucht.

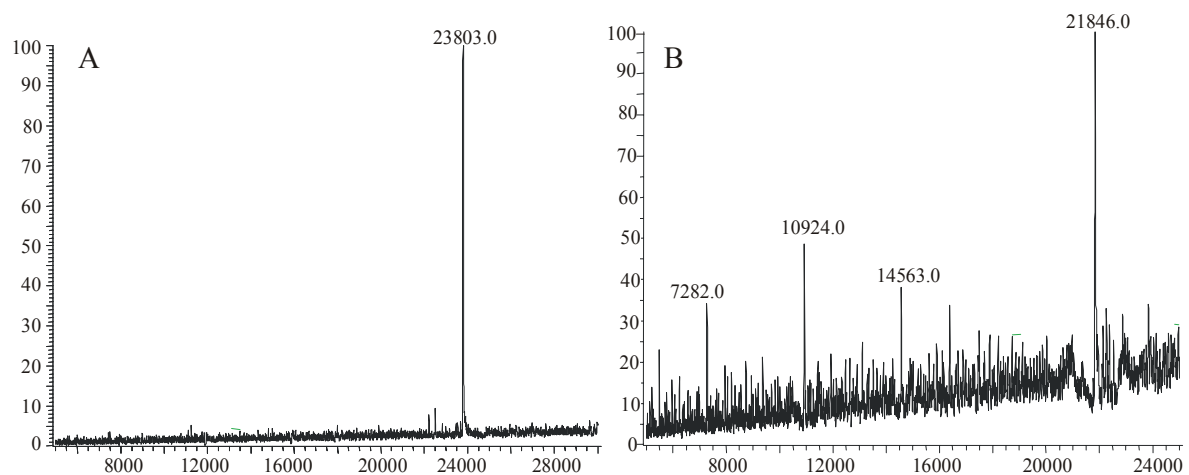


Abbildung 3.14: ESI-Massenspektren von Rab4-t2•GppNHp (A) und der Kristallplättchen (B)

Das theoretische Molekulargewicht von Rab4-t2 wurde aus der Proteinsequenz berechnet, der Vergleich mit den Ergebnissen der ESI-Messungen zeigte (Tabelle 3.6), daß das Protein zu Beginn der Kristallisationsexperimente die korrekte Masse besaß.

Tabelle 3.6: Vergleich des theoretisch berechneten Molekulargewichtes von Rab4-t2 mit den experimentell bestimmten Werten

	Molekulargewicht (Da)
theoretisch berechneter Wert	23801,9
Rab4-t2	23803,0
Kristallplättchen	21846,0

Die Abweichung zwischen dem Wert für Rab4-t2 vor der Kristallisation und dem der Kristallplättchen betrug 1957 Da, dies entsprach einem Abbau von 16-17 Aminosäuren am N- oder C-Terminus des Proteins. Das bei der Kristallisation entstandene Abbauprodukt wurde einer Proteinfragmentierung mit NTCB (Kapitel 2.3.5) mit anschließender massenspektrometischer Analyse unterworfen, um festzustellen, an welchem Terminus der Abbau des Proteins stattgefunden hatte. Für das Experiment wurde ein ca. 1 Monat alter Kristallisationsansatz von Rab4-2•GppNHp gewählt, um mögliche Zwischenstufen des

Abbaus nachweisen zu können. Proteine werden bei der Reaktion mit NTCB spezifisch an Cysteinresten gespalten. Rab4-t2 weist 3 Cysteine auf (Cys 23, Cys 119, Cys 165), daher wurden 4 Fragmente erwartet, von denen jedoch nur drei detektiert wurden (Tabelle 3.7).

Tabelle 3.7: Erwartete Fragmente von Rab4-t2•GppNHp nach Proteinfragmentierung mit NTCB

Fragment	Länge	theor. Molekulargewichte (Da)	exp. Molekulargewichte (Da)
1	1-22+2 ¹	2619,2	2623,67
2	23-118	10943,5 (+25/-34,1) ²	-
3	119-166	5196,7 (+25/-34,1) ²	5227,38
4	167-210	50975,5 (+25/-34,1) ²	5125,19

1: Rab4-t2 weist am N-Terminus aufgrund der TEV-Schnittstelle zwei zusätzliche Aminosäuren (GH) auf.

2: +25/Massenzunahme nach Cyanylierung/Spaltung, -34.1 Massenabnahme durch β -Eliminierung

Fragment 2 wurde weder beim NTCB-Verdau von Rab4-t2 noch beim Verdau des Abbauproduktes der Kristallisation beobachtet. In Abbildung 3.15 ist das MALDI-Massenspektrum des NTCB-Verdaus des Kristallisationstropfens dargestellt.

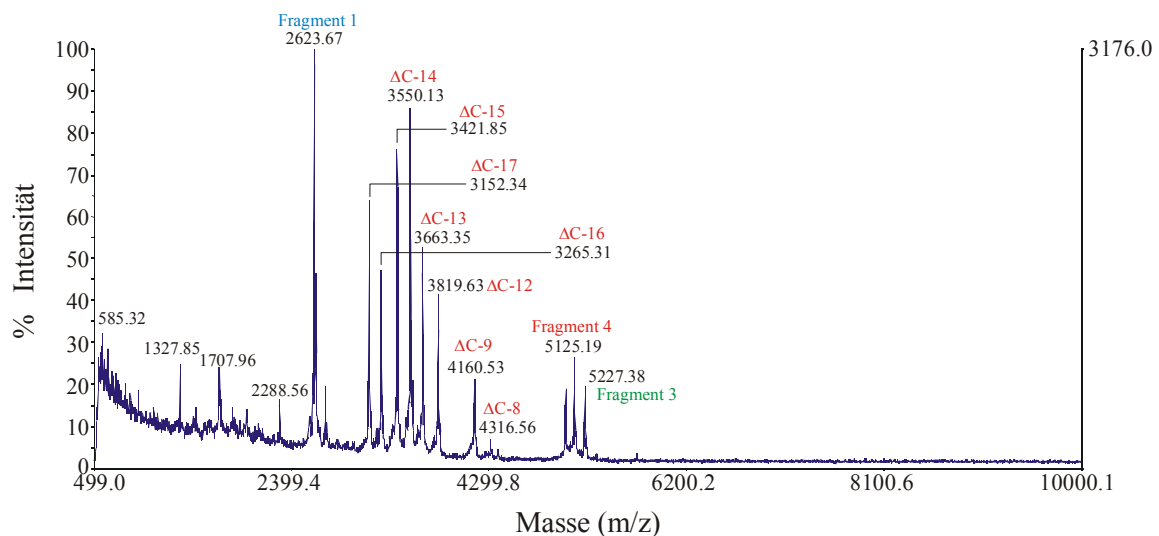


Abbildung 3.15: MALDI-Massenspektrum des NTCB-Verdaus des Kristallisationstropfens

Der stufenweise Abbau von Fragment 4 war deutlich zu erkennen, das kürzeste detektierte Fragment entsprach Fragment 4 Δ C-17. Demnach hatte ein C-terminaler Abbau von

Rab4-t2•GppNHp stattgefunden. Damit war gezeigt worden, daß Rab4-t2•GppNHp bei 20°C instabil und daher zur Kristallisation ungeeignet war.

3.4.4 Rab4-t2•GDP

Für die Suche nach Kristallisationsbedingungen für Rab4-t2•GDP wurden die Hampton Screens I, II und der PEG/Ion Screen verwendet. Die Proteinlösung enthielt 20,9 mg/ml Rab4-t2•GDP in 20 mM Tris/HCl pH 8,0, 25 mM NaCl, 5 mM MgCl₂ und 5 mM 2-Mercaptoethanol. Nach zwei Monaten wurden die in Abbildung 3.16 gezeigten Kristalle beobachtet.

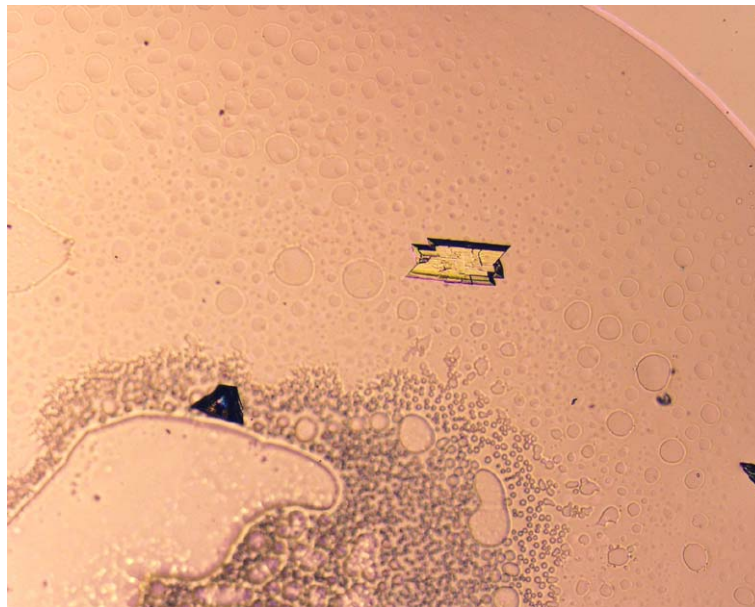


Abbildung 3.16: Verwachsene Kristalle von Rab4-t2•GDP (Reservoirlösung: 0,2 M (NH₄)₂SO₄, 30% PEG 8000, 0,1 M Natriumkacodylat pH 6,5)

Die Kristalle bestanden ähnlich wie bei Rab4-t2•GppNHp aus miteinander verwachsenen Plättchen. Experimente zur Reproduktion der Kristalle verliefen negativ und aufgrund der Ergebnisse der Kristallisationsexperimente mit Rab4-t2•GppNHp lag die Vermutung nahe, daß die Kristalle aus einem Abbauprodukt von Rab4-t2•GDP bestanden. Angesichts der bereits bekannten Instabilität von Rab4-t2•GppNHp wurde auf eine weitergehende Analyse verzichtet.

3.4.5 Rab4-t3•GppNHp

Die Kristallisationsbedingungen für Rab4-t3•GppNHp wurden mit den Hampton Screens I und II ermittelt. Die Proteinlösung enthielt 21 mg/ml Rab4-t3•GppNHp in 20 mM Tris/HCl pH 7,5, 25 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 1 mM 2-Mercaptoethanol und 0,1 mM NaN₃. Die ersten Kristalle wurden bereits drei Stunden nach dem Ansetzen erhalten. In Tabelle 3.8 sind alle Kristallisationsbedingungen aufgeführt. Generell wurde eine starke Tendenz zur Bildung von zusammengewachsenen Kristallen beobachtet (Abbildung 3.17).

Tabelle 3.8: Kristallisationsbedingungen von Rab4-t3•GppNHp

Bedingung	Kristalle	Dauer
2 M (NH ₄) ₂ SO ₄ , 0,1 M Tris/HCl pH 8,5	kleine, verwachsene Zacken	3 Stunden
30% PEG 4000, 0,2 M Ammoniumacetat, 0,1 M Natriumcitrat pH 5,6	Einkristalle	1,5 Monate
30% PEG 8000, 0,2 M (NH ₄) ₂ SO ₄ , 0,1 M Natriumkakodylat pH 6,5	Einkristall	2 Wochen
1,5 M Li ₂ SO ₄ , 0,1 M HEPES/NaOH pH 7,5	verwachsene Kristalle	1,5 Monate
30% PEG 4000, 0,2 M Li ₂ SO ₄ , 0,1 M Tris/HCl pH 7,5	Kristall mit aufgewachsenen Ecken	1,5 Monate
20% PEG 8000, 0,1 M Magnesiumacetat, 0,1 M Natriumkakodylat pH 6,5	Spherulite	1,5 Monate
0,8 M Kaliumnatriumtartrat, 0,1 M HEPES/NaOH pH 7,5	stark verwachsener Kristall mit vielen Zacken	1,5 Monate
2 M Natriumformiat, 0,1 M Natriumacetat pH 4,6	Kristall mit leichten Aufwachsungen	1,5 Monate
0,8 NaH ₂ PO ₄ , 0,1 M HEPES/NaOH pH 7,5	Spherulite	1,5 Monate
2% PEG 400, 2 M (NH ₄) ₂ SO ₄ , 0,1 M HEPES/NaOH pH 7,5	Einkristalle	4 Tage
30% MME PEG 2000, 0,2 M (NH ₄) ₂ SO ₄ , 0,1 M Natriumacetat pH 4,6	Spherulite	2 Wochen
1 M Li ₂ SO ₄ , 0,5 M (NH ₄) ₂ SO ₄ , 0,1 M Natriumcitrat pH 5,6	verwachsene Kristalle	4 Tage
1,6 MgSO ₄ , 0,1 M MES pH 6,5	Einkristalle	1 Tag
10% Dioxan, 0,1 M MES pH 6,5, 1,6 M (NH ₄) ₂ SO ₄	verwachsenen Kristalle	2 Wochen
1,6 M (NH ₄) ₂ SO ₄ , 0,1 M HEPES/NaOH pH 7,5, 0,1 NaCl	Einkristall	1 Tag
12% Glycerin, 1,5 M (NH ₄) ₂ SO ₄ , 0,1 M Tris/HCl pH 8,5	spitzzulaufendens Stäbchen	1 Tag
1,6 M (NH ₄) ₂ SO ₄ , 0,1 M Tris/HCl pH 8,5	Pyramiden mit quadratischer Grundfläche	2 Wochen
Additiv: 2,2,2-Trifluoroethanol		
1,6 M (NH ₄) ₂ SO ₄ , 0,1 M Tris/HCl pH 8,5		
Additiv: 1,6-Hexandiol	Einkristall	1,5 Monate

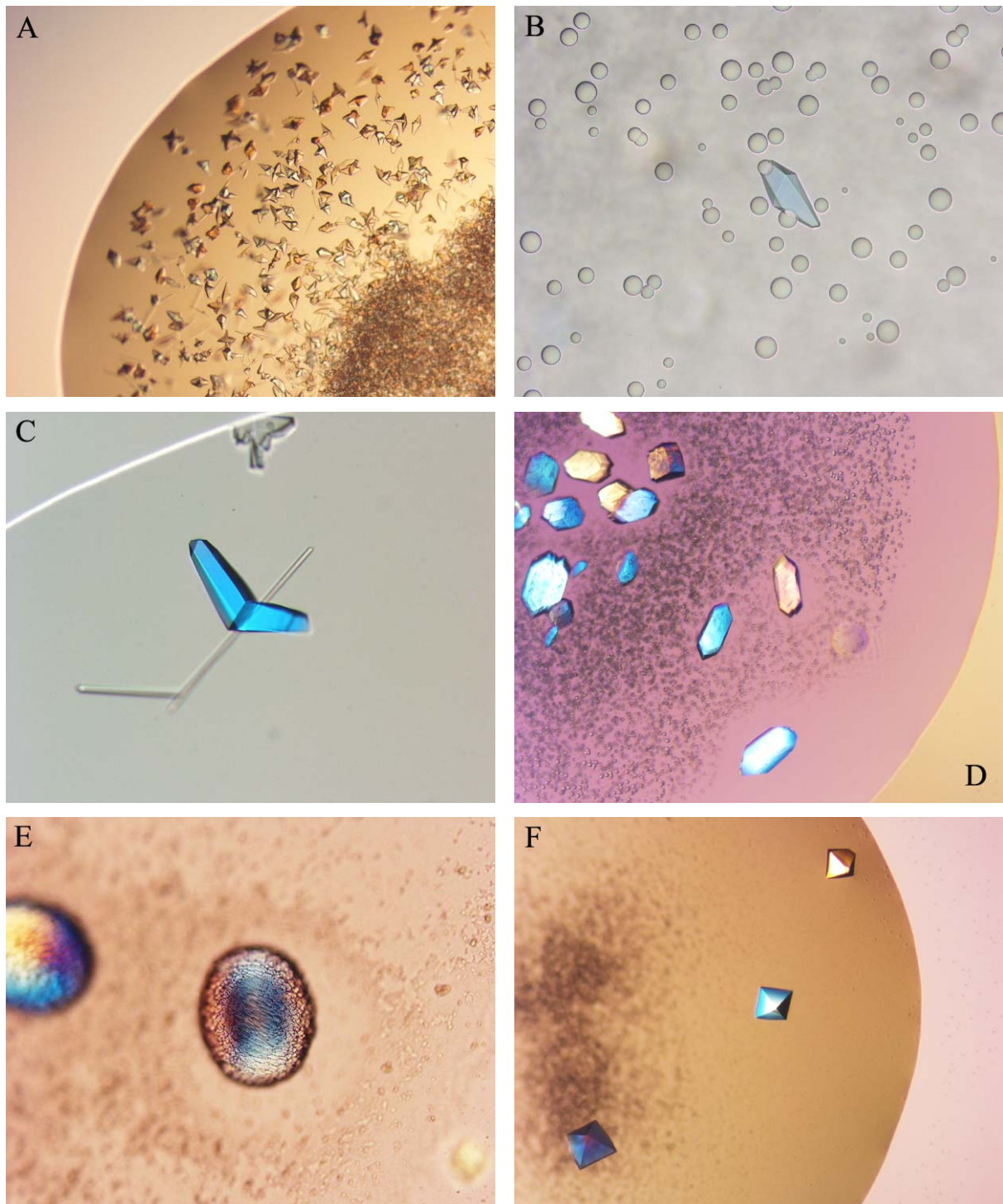


Abbildung 3.17: Kristalle und Spherulite von Rab4-t3•GppNHp (Reservoirlösungen A: 2,0 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,1 M Tris/HCl pH 8,5; B: 1,6 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,1 M NaCl, 0,1 M HEPES/NaOH pH 7,5; C: 1,6 M MgSO_4 , 0,1 M MES pH 6,5; D: 30% (v/v) PEG 400, 0,2 M Ammoniumacetat, 0,1 M Natriumcitrat pH 5,6; E: 0,8 M $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, 0,1 M HEPES/NaOH pH 7,5; F: 1,6 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,1 M Tris/HCl pH 8,5, Additiv: 2,2,2-Trifluoroethanol)

Die Kristalle wurden mit einem Loop passender Größe aus den Tropfen gefischt, in Gefrierschutzlösungen inkubiert (Reservoirlösung mit 20-25% Glycerin, bei hohem PEG-Anteil ohne Glycerin), in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei 100 K auf ihre Streueigenschaften getestet. Mehrere der aus den Hampton Screens erhaltenen Kristalle zeigten gute Streueigenschaften. Das beste Ergebnis wurde mit einem Kristall erzielt, der mit 30% PEG 8000, 0,2 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,1 M Natriumkacodylat pH 6,5 erhalten wurde. Zunächst wurde an der Röntgenanlage des MPI ein Datensatz bis 2,6 Å Streuauflösung aufgenommen. Ein weiterer Datensatz bis 1,6 Å Auflösung wurde an der Beamline ID14-4 des ESRF in Grenoble aufgenommen. Die Elementarzellparameter waren $a = 99,79 \text{ \AA}$, $b = 99,79 \text{ \AA}$, $c = 95,54 \text{ \AA}$, $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$. Die Raumgruppe war $P4_3$ (Nr.78). Der Datensatz wurde mit dem Programm XDS prozessiert und für die weitere Verfeinerung benutzt.

3.4.6 Rab4-t3•GDP

Die Ausgangsbedingungen für die Kristallisation von Rab4-t3•GDP wurden mit den Hampton Screen I und II ermittelt. Die Proteinlösung enthielt 22 mg/ml Rab4-t3•GDP in 20 mM HEPES/NaOH pH 7,5, 25 mM NaCl, 1 mM MgCl₂ und 5 mM 2-Mercaptoethanol. Die ersten Kristalle in Form verwachsener kurzer Stäbchen (Abbildung 3.18, B) wurden nach zwei Tagen beobachtet. Weitere Kristallisationsbedingungen sind in Tabelle 3.9 aufgeführt.

Tabelle 3.9: Kristallisationsbedingungen von Rab4-t3•GDP

Bedingung	Kristalle	Dauer
30% PEG 4000, 0,2 M Ammoniumacetat, 0,1 M Natriumcitrat pH 5,6	Spherulite	5 Tage
1,0 M NH ₄ H ₂ PO ₄ , 0,1 M Natriumcitrat pH 5,6	gedrehte Stapel aus sehr dünnen Plättchen	1 Monat
30% PEG 8000, 0,2 M (NH ₄) ₂ SO ₄ , 0,1 M Natrium-kakodylat pH 6,5	winzige Spherulite	5 Tage
2,0 M Natriumformiat, 0,1 M Natriumacetat pH 4,6	verwachsene, quadratischen Plättchen	3 Tage
8% PEG 4000, 0,1 M Natriumacetat pH 4,6	dünne Stäbchen, kristallines Präzipitat	3 Tage
2% Isopropanol, 20% PEG 4000, 0,1 M Natriumcitrat pH 5,6	verwachsene Pyramiden mit abgeflachter Spitze	2 Wochen
2,0 M NaCl, 0,1 M Natriumacetat pH 4,6	verwachsen, kurze Stäbchen	2 Tage
1 M Li ₂ SO ₄ , 0,5 M (NH ₄) ₂ SO ₄ , 0,1 M Natriumcitrat pH 5,6	winzige Spherulite	3 Wochen
30% PEG MME 5000, 0,2 m (NH ₄) ₂ SO ₄ , 0,1 M MES pH 6,5	winzige Spherulite	5 Tage
20% Jeffamin M-600, 0,1 M HEPES/NaOH pH 7,5	winzige Nadeln	2 Wochen
3,4 M 1,6-Hexandiol, 0,2 M MgCl ₂ , 0,1 M Tris/HCl pH 8,5	winzige Spherulite	1 Monat

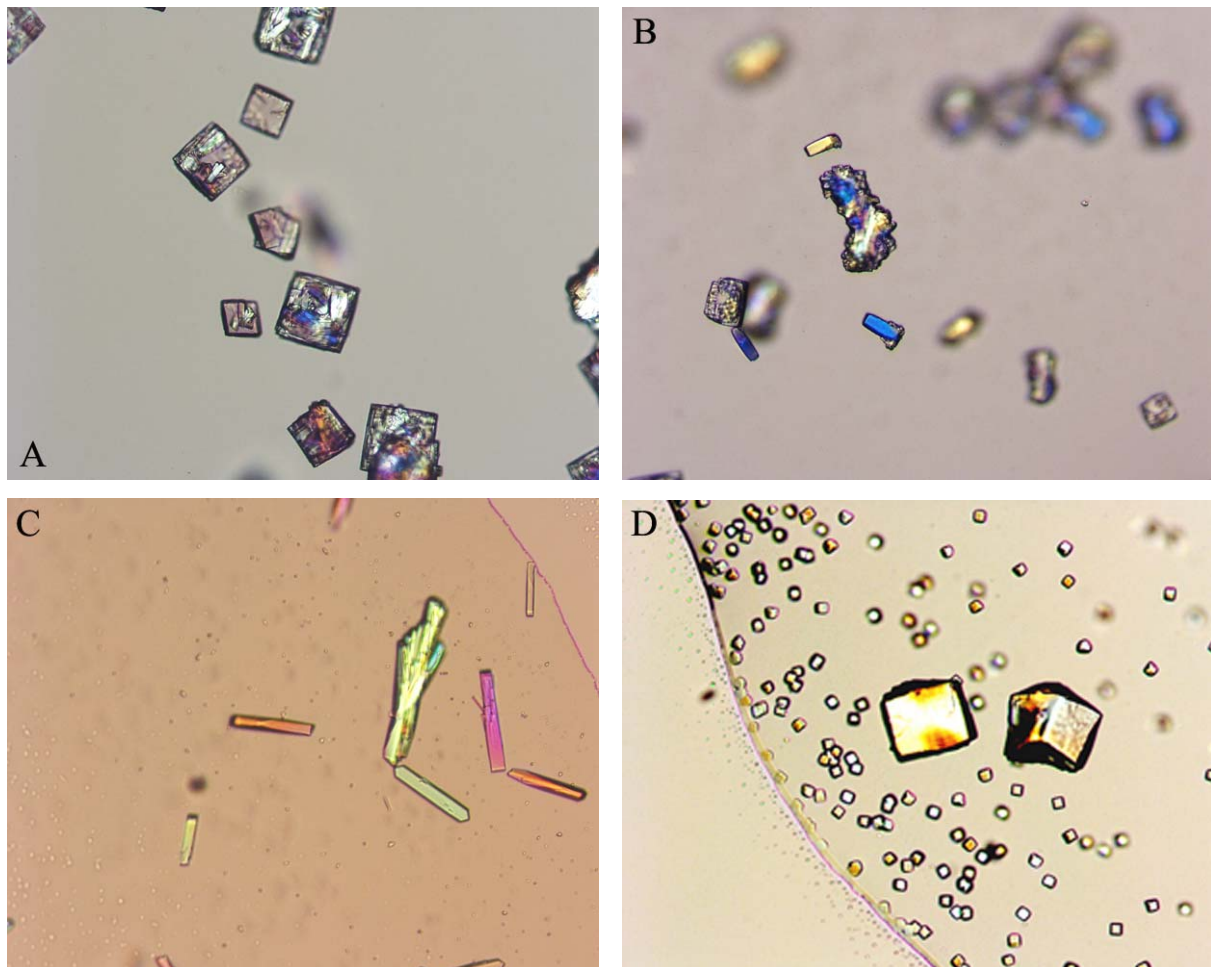


Abbildung 3.18: Kristalle und Spherulite von Rab4-t3•GDP (Reservoirlösungen A: 2,0 M Natriumformiat, 0,1 M Natriumacetat pH 4,6; B: 2,0 M NaCl, 0,1 M Natriumacetat pH 4,6; C: 8% (w/v) PEG 4000, 0,1 M Natriumacetat pH 4,6; D: 1,0 M $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, 0,1 M Natriumcitrat pH 5,6)

Alle der in Abbildung 3.18 gezeigten Kristalle konnten reproduziert werden. Aufgrund der starken Verwachsungen und der geringen Größe (10-40 μm Länge) der Kristalle war eine Optimierung der Kristallisationsbedingungen erforderlich. Für die Verfeinerung wurde die Bedingung mit 8% (w/v) PEG 4000 und 0,1 M Natriumacetat pH 4,6 ausgewählt, bei der neben amorphem Präzipitat und Kristallbüscheln auch einzelne Stäbchen erhalten wurden. Variiert wurden die Temperatur, der pH-Wert, die PEG-Konzentration und –Größe, zusätzlich wurde versucht, durch *seeding* einzelne Kristalle zu erhalten. Die besten Kristalle wurden bei 25°C mit 8% (w/v) PEG 4000 und 0,1 M Natriumacetat pH 4,0 (Abbildung 3.19) erhalten, wobei der Großteil der Stäbchen immer noch Verwachsungen aufwies.



Abbildung 3.19: Kristallstäbchen von Rab4-t3•GDP (Reservoirlösung: 8% (w/v) PEG 4000, 0,1 M Natriumacetat pH 4,0)

Die Stäbchen wurden 2 min in Gefrierschutzlösung (Reservoirlösung mit 20% Glycerin) inkubiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei einer Temperatur von 100 K gemessen. Ein Datensatz bis 1,8 Å Auflösung wurde an der Beamline BL1 des BESSY in Berlin aufgenommen. Die Zellparameter waren $a = 71,14 \text{ \AA}$, $b = 63,75 \text{ \AA}$, $c = 32,28 \text{ \AA}$, $\alpha = \gamma = 90,0^\circ$, $\beta = 100,03^\circ$. Die Raumgruppe war C2 (Nr.5). Der Datensatz wurde mit dem Programm XDS prozessiert und für die weitere Verfeinerung benutzt.

3.4.7 R5b-N1

R5b-N1 wurde mit zwei verschiedenen Expressionsplasmiden produziert (Kaptel 3.1.2). Für die Kristallisationsexperimente wurde nur das Protein verwendet, das ohne Affinitätstag exprimiert und gereinigt worden war, da das GST-Fusionsprotein nicht in ausreichender Menge hergestellt werden konnte. Die ersten Kristallisationsexperimente umfaßten die Hampton Screens I, II, Lite und den PEG/Ion Screen. Die Proteinlösung enthielt 17,7 mg/ml R5b-N1 in 20 mM Tris/HCl pH 7,5, 20 mM NaCl und 1 mM 2-Mercaptoethanol. Nach zwei Tagen wurden in einem Großteil der Kristallisationstropfen amorphes Präzipitat beobachtet. Die ersten Kristalle entstanden nach zwei Wochen, sie hatten die Form eines Würfels mit einer Kantenlänge $< 5 \mu\text{m}$ (Abbildung 3.20) und waren unter dem Mikroskop schwer zu erkennen.

Nach einem Monat wurden weitere Kristalle in Form sehr kleiner, dünner Nadeln beobachtet. Die Kristallisationsbedingungen für beide Kristallformen sind in Tabelle 3.10 aufgeführt.

Tabelle 3.10: Kristallisationsbedingungen von R5b-N1

Bedingung	Kristalle	Dauer
2,0 M Na-Formiat	Würfel (Kantenlänge <math><5\mu\text{m}</math>)	14 Tage
0,2 M Na-Acetat, 15% PEG 8000, 0,1 M Na-Kakodylat pH 6,5	Nadel“sternchen“	1 Monat
0,2 M Zn-Acetat, 9% PEG 8000, 0,1 M Na-Kakodylat pH 6,5	amorphes Präzipitat mit sehr dünnen Nadeln	1 Monat
0,2 M Na-Acetat, 0,1 M Na-Kakodylat pH 6,5	winzige Nadeln	1 Monat
0,2 M Mg-Acetat, 0,1 M Na-Kakodylat pH 6,5	winzige Nadeln	1 Monat

Die würfelförmigen Kristalle wurden bei gleichen Bedingungen reproduziert, die Größe war jedoch für ein Röntgenexperiment nicht ausreichend. Zur Optimierung der Kristallisationsbedingungen wurde die Natriumformiatkonzentration variiert, der Zusatz von Puffer-substanzen und die Verwendung anderer Formiatsalze getestet. Die Größe der Kristalle konnte durch diese Experimente nicht beeinflusst werden.

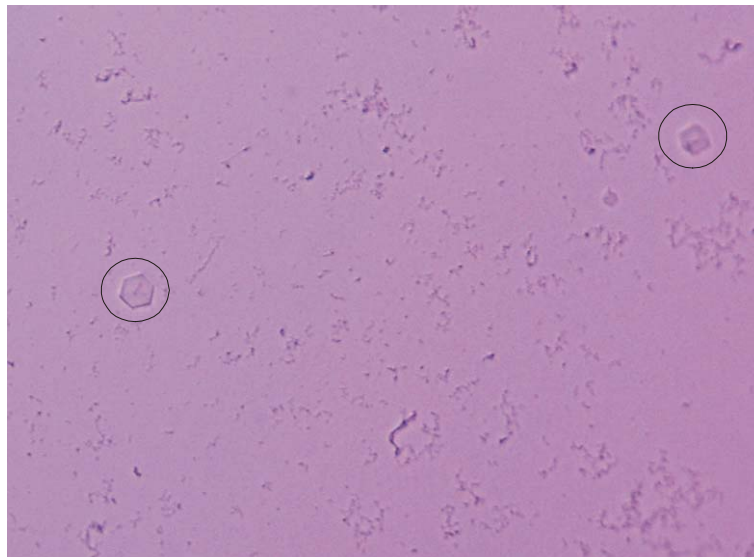


Abbildung 3.20: Würfelförmige Kristalle von R5b-N1 (Reservoirlösung: 2,0 M Na-Formiat)

Die nadelförmigen Kristalle, die aus den Hampton Screens erhalten wurden, waren sehr klein und dünn. Ausgehend von diesen Bedingungen wurden weitere Experimente durchgeführt, wobei verschiedene Salze (Acetate, Zink-, Natrium- und Magnesiumsalze), PEGs, Puffersubstanzen und pH-Werte ausprobiert wurden. Die größten Nadeln (Abbildung 3.21) wurden nach zwei Monaten mit 0,2 M Na-Acetat, 15% PEG 4000 und 0,1 M Tris/HCl pH 8,5 erhalten.



Abbildung 3.21: Nadelförmige Kristalle von R5b-N1 (Reservoirlösung: 0,2 M Na-Acetat, 15% PEG 4000, 0,1 M Tris/HCl pH 8,5)

Die Kristalle besaßen eine Länge von 6-8 μm . Sie wurden für 5 min in einem Gefrier-schutzpuffer (Reservoirlösung mit 25% Glycerin) inkubiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Im Röntgenexperiment zeigte sich, daß die Kristalle zu klein waren und kein ausreichendes Streuvermögen besaßen.

3.4.8 Rab4-t1•GppNHp/R5b-N1

Der Komplex aus Rab4-t1•GppNHp und R5b-N1 wurde über eine Gelfiltrationssäule gereinigt. Für die ersten Kristallisationsexperimente wurde der Komplex mit dem R5b-N1-Konstrukt aus dem pGATEV-Vektor hergestellt. Die Proteinlösung enthielt 8 mg/ml des Komplexes in 20 mM Tris/HCl pH 7,5, 25 mM NaCl, 5 mM MgCl₂ und 1 mM DTT. Für die Suche nach geeigneten Kristallisationsbedingungen wurden die Hampton Screens I, II, Lite und der PEG/Ion verwendet. Nach vier Tagen wurden mit 1,6 M Magnesiumsulfat und 0,1 M MES pH 6,5 Kristalle in Form winziger Nadeln (< 5 µm) erhalten, zusätzlich wurde in dem Tropfen Phasentrennung beobachtet. Ähnliche Nadeln wurden bei verschiedenen anderen Bedingungen erhalten, desweiteren wurde die Bildung von Spheruliten beobachtet.

Tabelle 3.11: Kristallisationsbedingungen des Rab4-t1•GppNHp/R5b-N1-Komplexes

Bedingung	Kristalle	Dauer
1,0 M (NH ₄) ₂ PO ₄ , 0,1 M Na-Citrat pH 5,6	Spherulite	25 Tage
0,2 M MgSO ₄ , 30% (v/v) Isopropanol, 0,1 M HEPES/NaOH pH 7,5	Nadelbüschel	7 Tage
0,2 M (NH ₄) ₂ SO ₄ , 30% (w/v) PEG 8000, 0,1 M Na-Kakodylat pH 6,5	kleine Spherulite, Präzipitat	2 Monate
0,2 M (NH ₄) ₂ SO ₄ , 25% (w/v) PEG 4000, 0,1 M Na-Acetat pH 4,6	kleine Spherulite, Präzipitat	25 Tage
0,2 M MgCl ₂ , 30% (v/v) PEG 400, 0,1 M HEPES/NaOH pH 7,5	Nadeln	7 Tage
0,2 M Ca-Acetat, 18% (w/v) PEG 8000, 0,1 M Na-Kakodylat pH 6,5	Spherulite	25 Tage
25 (v/v) Ethylenglycol	Nadelbüschel	7 Tage
1,6 M MgSO ₄ , 0,1 M MES pH 6,5	Nadeln, mit Phasentrennung	4 Tage
1,8 M (NH ₄) ₂ SO ₄ , 0,01 N CoCl ₂ , 0,1 M MES pH 6,5	Spherulite	1 Monat
20% Jeffamin M-600 [®] , 0,1 M HEPES/NaOH pH 7,5	Nadelbüschel	7 Tage
4,3 M NaCl, 0,1 M HEPES/NaOH pH 7,5	Nadeln	14 Tage
1,0 M Li ₂ SO ₄ , 0,01 M NiCl ₂ , 0,1 M Tris/HCl pH 8,5	Nadeln	7 Tage
0,01 M NiCl ₂ , 20% (v/v) PEG MME 550, 0,1 M Tris/HCl pH 8,5	Nadeln	5 Tage
4% (w/v) PEG 8000, 0,1 M Tris/HCl pH 8,5	Nadeln	6 Tage
0,2 M MgCl ₂ , 0,1 M Tris/HCl pH 8,5	Nadelbüschel	22 Tage
0,75 M Li ₂ SO ₄ , 0,1 M HEPES/NaOH pH 7,5	Nadelbüschel	9 Tage
0,2 M Li ₂ SO ₄ , 0,1 M Tris/HCl pH 8,5	Nadelbüschel	1 Monat

Die Nadeln waren ausnahmslos sehr klein (2-5 µm) und daher für Röntgenexperimente nicht geeignet. Zur Optimierung der Kristallisationsbedingungen wurden folgende Parameter variiert: Temperatur, Salze, Fällungsmittelkonzentration, pH-Wert, *micro seeding*. Die Variation der Parameter führte jedoch nicht zu einer Verbesserung der Kristalle.

Nach der Klonierung und Reinigung des R5b-N1-Konstruktes ohne Affinitätstag wurden die ersten Kristallisationsexperimente wiederholt, da die Sequenzen der beiden Konstrukte geringfügige Unterschiede aufwiesen (R5b-N1 aus pGATEV besaß aufgrund der TEV-Proteaseschnittstelle am N-Terminus die zusätzlichen Aminosäuren Glycin und Histidin.). Der Komplex wurde wieder über die Gelfiltrationssäule gereinigt. Die Proteinlösung für die Kristallisation enthielt 22,5 mg/ml des Komplexes in 20 mM Tris/HCl pH 7,5, 25 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM 2-Mercaptoethanol und 5 µM GppNHp. Angesetzt wurden die Hampton Screens I und II. In Tabelle 3.12 sind die Bedingungen aufgeführt, bei denen mikrokristallines Präzipitat beobachtet wurde. Nach 11 Tagen wurden mit 0,8 M Kaliumnatriumtartrat und 0,1 M HEPES/NaOH pH 7,5 Nadeln in kleinen, kompakten Büscheln erhalten. Einzelne, unter dem Mikroskop kaum sichtbare Nadeln wurden nach 1 Monat bei 30% (w/v) PEG 20000 und 0,1 M MES pH 6,5 beobachtet.

Tabelle 3.12: Mikrokristallines Präzipitat des Rab4-t1•GppNHp/R5b-N1-Komplexes (R5b-N1 ohne Affinitätstag)

Bedingung	Dauer
2,0 M (NH ₄) ₂ SO ₄ , 0,1 M Tris/HCl pH 8,5	fiel direkt aus
0,2 M MgCl ₂ , 30% (w/v) PEG 4000, 0,1 M Tris/HCl pH 8,5	fiel direkt aus
0,2 M CaCl ₂ , 28% (v/v) PEG 400, 0,1 M HEPES/NaOH pH 7,5	3 Tage
0,2 M (NH ₄) ₂ SO ₄ , 30% (w/v) PEG 8000, 0,1 M Na-Kakodylat pH 6,5	fiel direkt aus
0,2 M Li ₂ SO ₄ , 30% (w/v) PEG 4000, 0,1 M Tris/HCl pH 8,5	3 Tage
0,2 M Na-Acetat, 30% (w/v) PEG 4000, 0,1 M Tris/HCl pH 8,5	fiel direkt aus
2,0 M (NH ₄) ₂ SO ₄	fiel direkt aus
4,0 M Na-Formiat	fiel direkt aus
2,0 M (NH ₄) ₂ SO ₄ , 2% (v/v) PEG 400	fiel direkt aus
10% (v/v) Isopropanol, 20% (w/v) PEG 4000, 0,1 M HEPES/NaOH pH 7,5	3 Tage
2,0 M (NH ₄) ₂ SO ₄ , 5% (v/v) Isopropanol	fiel direkt aus
2,5 M Hexandiol, 0,1 M Na-Citrat pH 5,6	6 Tage
1,6 M MgSO ₄ , 0,1 M MES pH 6,5	3 Tage
1,8 M (NH ₄) ₂ SO ₄ , 0,01 M CoCl ₂ , 0,1 M MES pH 6,5	9 Tage
0,2 M (NH ₄) ₂ SO ₄ , 30% (w/v) PEG MME 5000, 0,1 M MES pH 6,5	3 Tage
0,5 M (NH ₄) ₂ SO ₄ , 30% (v/v) MPD, 0,1 M HEPES/NaOH pH 7,5	3 Tage
1,6 M (NH ₄) ₂ SO ₄ , 0,1 M NaCl, 0,1 M HEPES/NaOH pH 7,5	1 Tag
1,8 M (NH ₄) ₂ SO ₄ , 12% (v/v) Glycerin, 0,1 M Tris/HCl pH 8,5	3 Tage

Die vielversprechendsten Bedingungen aus Tabelle 3.12 wurden erneut angesetzt, wobei die Konzentration der Fällungsmittel und der pH-Wert variiert wurden. Auffällig war, daß elf der achtzehn Reservoirlösungen Ammoniumsulfat enthielten, das sich bei der Kristallisation der Rab4-Konstrukte als gut geeignetes Fällungsmittel erwies. Daher mußte in Betracht gezogen werden, daß das gebildetete Präzipitat unter Umständen lediglich aus Rab4-t1•GppNHp bestand und nicht aus dem Komplex. Bei den Experimenten zur Optimierung konnte keine Verbesserung der Bedingungen erreicht werden, teilweise wurde statt des mikrokristallinen Präzipitates amorphes Präzipitat erhalten.

Zur Optimierung der Nadelbüschel, die mit 0,8 M Kaliumnatriumtartrat und 0,1 M HEPES/NaOH pH 7,5 erhalten wurden, wurde die Fällungsmittelkonzentration und der pH-Wert variiert. Daneben wurden noch weitere Tartrate und verwandte Salze (z. B. Malat, Malonat) getestet. Bei diesen Experimenten wurde neben den bereits bekannten Nadelbüscheln (Abbildung 3.22) nur amorphes Präzipitat erhalten, Einkristalle des Komplexes wurden nicht beobachtet.

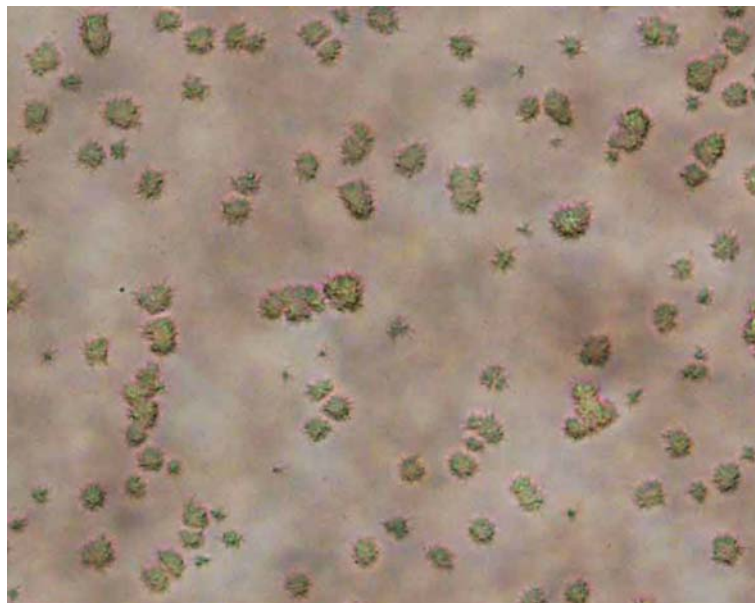


Abbildung 3.22: Nadelbüschel des Komplexes Rab4-t1•GppNHp/R5b-N1 (Reservoirlösung: 0,8 M K₂Na-Tartrat, 0,1 M BICINE pH 9,0)

3.4.9 Rab4-t2•GppNHp/R5b-N1

In Kapitel 3.4.3 wurde bereits beschrieben, daß bei Rab4-t2•GppNHp während der Kristallisationsexperimente der C-terminale Abbau des Proteins um siebzehn Aminosäuren nachgewiesen werden konnte. Angesichts der Instabilität des Rab4-Konstruktes schienen Kristallisationsexperimente mit dem Komplex Rab4-t2•GppNHp/R5b-N1 wenig erfolgversprechend. Daher wurden lediglich während der Optimierungsversuche für den Komplex Rab4-t1•GppNHp/R5b-N1 (Kapitel 3.4.8) einige der Bedingungen auch mit Rab4-t2•GppNHp und R5b-N1 angesetzt. Der Komplex wurde nicht über die Gelfiltrationssäule gereinigt, stattdessen wurden die Proteine vor dem Ansetzen der Tropfen im molaren Verhältnis 1:2 (Rab4-t2•GppNHp:R5b-N1) gemischt. Der Puffer der Rab4-t2•GppNHp-Lösung enthielt 20 mM Tris/HCl pH 7,5, 25 mM NaCl, 1 mM MgCl₂ und 1 mM 2-Mercaptoethanol, der Puffer der R5b-N1-Lösung setzte sich zusammen aus 20 mM Tris/HCl pH 7,5, 20 mM NaCl und 1 mM 2-Mercaptoethanol. Die Proteine wurden so gemischt, daß die Endkonzentration der Lösung ca. 20 mg/ml betrug. Mit 0,5 M Natriummalat und 0,1 M Tris/HCl pH 8,0 entstanden nach zweieinhalb Monaten die in Abbildung 3.23 dargestellten Kristalle, deren äußere Form den Kristallen gleicht, die mit Rab4-t3•GppNHp erhalten wurden.

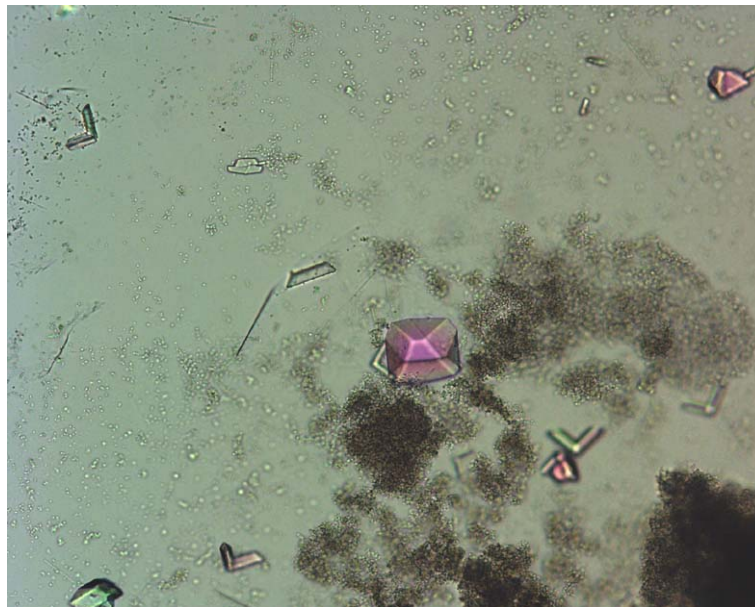


Abbildung 3.23: Kristalle mit Rab4-t2•GppNHp und R5b-N1 (Reservoirlösung: 0,57 M Na-Malat, 0,1 M Tris/HCl pH 8.0)

Zur Klärung der Frage, ob die Kristalle aus Rab4-t2•GppNHp, dem bereits bekannten Abbauprodukt von Rab4-t2•GppNHp, R5b-N1, dem Komplex Rab4-t2•GppNHp/R5b-N1 oder dem theoretisch denkbaren Komplex Abbauprodukt von Rab4-t2•GppNHp mit R5b-N1 bestehen, wurden einige Kristalle aus dem Tropfen gefischt und massenspektrometrisch analysiert. Die Analyse verlief negativ, da keine Proteine detektiert werden konnten. Aufgrund der geringen Größe der Kristalle (< 50 µm) fehlte das Material für weitergehende Analysen, daher wurde zunächst die Reproduktion der Kristalle versucht. Bei ähnlichen Bedingungen konnten nach einem Monat die gleichen Kristalle erhalten werden. Die Größe der Kristalle lag wieder bei weniger als 50 µm. Neben den Tropfen, die sowohl Rab4-t2•GppNHp als auch R5b-N1 enthielten, wurden auch Ansätze pipettiert, die nur Rab4-t2•GppNHp oder R5b-N1 enthielten. Dabei wurden einen Tag, nachdem die Kristalle in dem Komplexansatz beobachtet wurden, Kristalle von Rab4-t2•GppNHp bei den gleichen Bedingungen gefunden (Abbildung 3.24). Diese ähnelten zunächst den Kristallen aus dem Komplexansatz, nach einem weiteren Tag waren die Kristalle sehr stark verwachsen und dabei deutlich größer geworden (bis zu 100 µm lang). In den Tropfen, die mit R5b-N1 angesetzt wurden, waren keine Kristalle zu sehen.

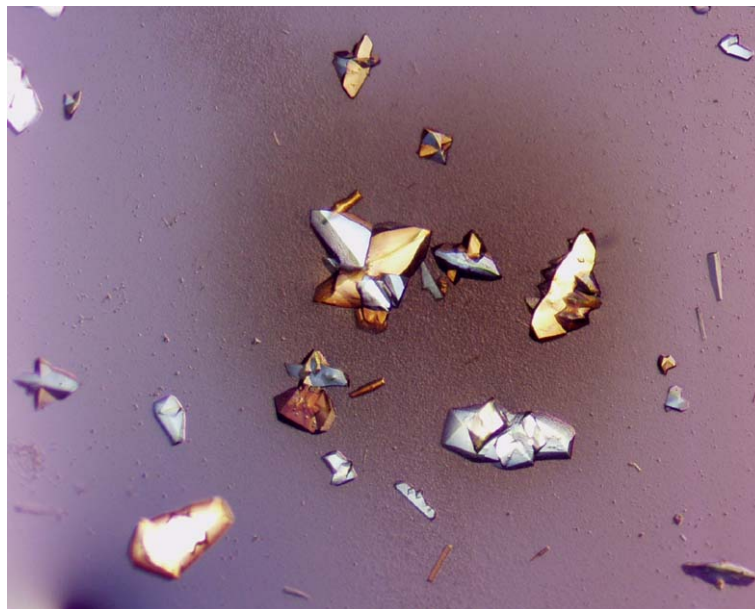


Abbildung 3.24: Kristalle von Rab4-t2•GppNHp (Reservoirlösung: 0,5 M Na-Malat, 0,1 M Tris/HCl pH 8,0)

Ein Kristall aus dem reproduzierten Komplexansatz wurde 1 min in Gefrierschutzpuffer (Reservoirlösung mit 20% Glycerin) inkubiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und an der Röntgenanlage des MPI getestet. Die Auflösung betrug ca. 2,8 Å, mit den gemessenen Diffraktionsdaten konnten die Elementarzellparameter abgeschätzt werden ($a \sim 68$ Å, $b \sim 77$ Å, $c \sim 94$ Å, $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$) die auf eine orthorhombische Raumgruppe hindeuteten. Ein Datensatz mit 2,8 Å Auflösung wurde an der Beamline ID29 des ESRF in Grenoble aufgenommen. Die Daten wurden mit XDS prozessiert, die Elementarzellparameter lauteten: $a = 66,85$ Å, $b = 73,94$ Å, $c = 92,93$ Å, $\alpha = \beta = \gamma = 90$. Die Raumgruppe war $P2_12_12_1$ (Nr.19). Es wurde eine molekulare Ersetzung mit der Struktur von Rab4-t3•GppNHp durchgeführt, die mit 2 Rab4-t2•GppNHp-Molekülen in der asymmetrischen Einheit eine sinnvolle Lösung ergab. Mit dem erhaltenen Startphasensatz wurde die Verfeinerung mit CNS begonnen und eine Elektronendichtekarte erstellt. In dieser Elektronendichtekarte ist deutlich zu erkennen, daß in der asymmetrischen Einheit nur die beiden Rab4-t2•GppNHp-Moleküle vorhanden sind, es war keine weitere undefinierte Elektronendichte zu sehen. Damit war gezeigt worden, daß die Kristalle aus dem Ansatz mit Rab4-t2•GppNHp und R5b-N1 nur die GTPase, nicht aber den Effektor enthielten.

3.5 Aufklärung der Struktur von Rab4a

Zahlreiche kristallographische und NMR-Analysen von kleinen Guaninnukleotid-bindenden Proteinen (z.B. Ras (Pai *et al.*, 1990), Ran (Scheffzek *et al.*, 1995), Arf1 (Amor *et al.*, 1994), Rac1 (Hirshberg *et al.*, 1997)) haben gezeigt, daß trotz der konservierten Topologie der G-Domäne kleine, aber signifikante Unterschiede zwischen den verschiedenen Familien der Ras-homologen Proteinen existieren. Diese sind meist in den Bereichen lokalisiert, die für die Interaktion mit Regulatoren und Effektoren verantwortlich gemacht werden.

Die ersten Rab-Strukturen wurden erst 1999 gelöst. Dumas und Mitarbeiter lösten die Struktur von Rab3a•GppNHp (Dumas *et al.*, 1999), Ostermeier und Brünger die Komplexstruktur von Rab3a•GppNHp mit der Rab-bindenden Domäne des Effektors Rabphilin-3a (Ostermeier & Brünger, 1999). Smith und Mitarbeiter lösten 2000 die Struktur von Rab6 aus *plasmodium falciparum* in der GDP-Form (Chattopadhyay *et al.*, 2000), im gleichen Jahr veröffentlichten Stroupe und Brünger die Struktur von Sec4p in der GTP- und der GDP-Form, wodurch erstmals der Vergleich beider Formen für ein Rab-Protein ermöglicht wurde (Stroupe & Brünger, 2000). Bis heute wurden die Strukturen von sieben Rab-Proteinen gelöst: Rab3a, Ypt51p (Esters *et al.*, 2000), Rab6, Sec4p, Rab5c (Merithew *et al.*, 2001), Rab5a (Zhu *et al.*, 2003) und Ypt7p (Constantinescu *et al.*, 2002), davon drei (Sec4p, Rab5a, Ypt7p) sowohl in der GTP- als auch in der GDP-Form. Die Rab-Proteine zeigen beträchtliche Unterschiede bezüglich der GTPase-Aktivität (vgl. Kapitel 3.3), die angesichts des hohen Grads der Konservierung der an der Nukleotidbindung und der Hydrolyse beteiligten Aminosäuren durch die Mitwirkung weiterer, nicht konservierter Aminosäuren bestimmt sein müssen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Struktur eines C-terminal verkürzten Konstruktes von Rab4a in der GTP-Form (mit dem nicht hydrolysierbaren GTP-Analogon GppNHp) und in der GDP-Form gelöst.

3.5.1 Überblick über die Struktur der G-Domäne

Die Faltung der G-Domäne besteht aus einem zentralen β -Faltblatt, bestehend aus fünf parallelen und einem anti-parallel verlaufenden β -Faltblattstrang und fünf umgebenden α -Helices. Die Sekundärstrukturelemente werden durch 10 Schleifen (*loops*) miteinander verbunden (Abbildung 3.25).

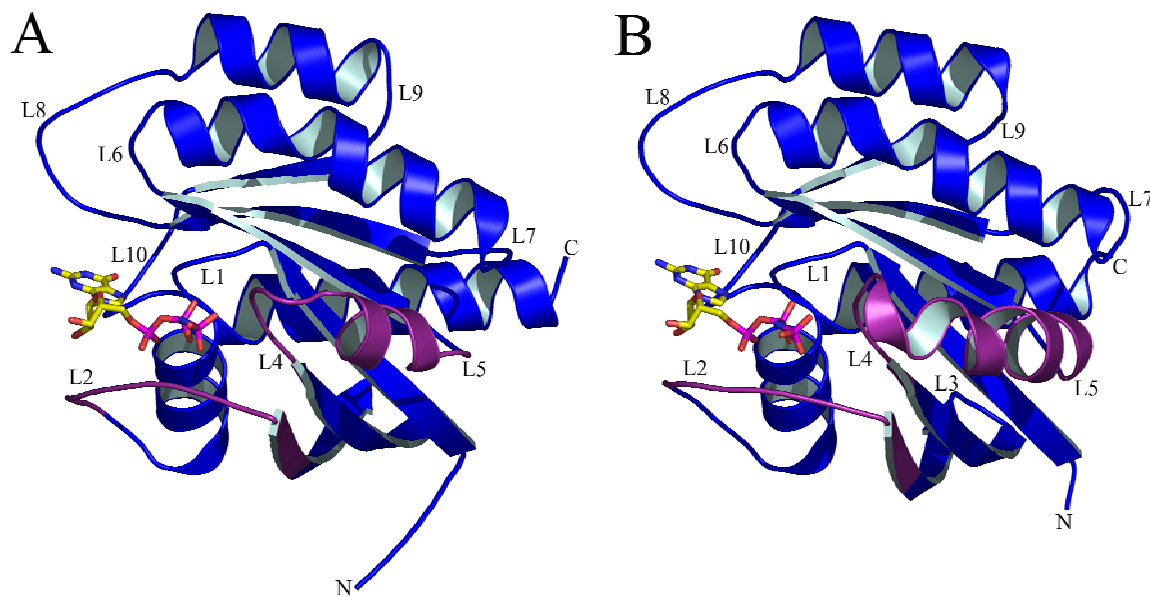


Abbildung 3.25: Schematische Darstellung der dreidimensionalen Strukturen von Rab4-t3•GppNHp (A) und H-Ras p21•GppNHp (B) (Scheidig *et al.*, 1999)

Die Polypeptidkette ist als kontinuierliches blaues Band dargestellt, die violett gefärbten Bereiche entsprechen den Switch-Regionen. Die α -Helices werden durch Spiralen, β -Faltblattstränge durch breite Pfeile dargestellt. Die Nukleotide sind als Stäbchenmodelle (*sticks*) dargestellt, die Magnesiumionen wurden nicht abgebildet. Die zehn Loops werden mit L1-10 gekennzeichnet, die Termini mit N bzw. C. Die Abbildungen wurden mit dem Programm Pymol (DeLano, 2002) erstellt.

Das Nukleotid wird in einer tiefen Bindungstasche an der Oberfläche des Proteins gebunden. Das für die Bindung des Nukleotids notwendige Magnesiumion wird durch das Serin bzw. Threonin des PM1-Motivs und die β -Phosphatgruppe des Nukleotids koordiniert, in der GTP-Form erfolgte eine zusätzliche Koordination durch das Threonin des PM2-Motivs und die γ -Phosphatgruppe des Nukleotids. Die an der Nukleotidbindung und Magnesiumkoordination beteiligten Aminosäuren liegen in den Schleifenbereichen L1, L2, L4, L8 und L10. Die Schleifen L1, L2 und L4 umgeben dabei die γ -Phosphatgruppe des Nukleotids und bilden

zusammen mit dem Magnesiumion das aktive Zentrum der GTP-Hydrolyse, während die Schleifen L2, L8 und L10 mit der Guaninbase des Nukleotids interagieren. L2 wird auch als Effektorschleife (Switch I-Region) und L4 als katalytische Schleife (Switch II-Region) bezeichnet. Diese funktionellen Zuordnungen resultieren hauptsächlich aus Aktivitätsanalysen von H-Ras p21-Mutanten und Bindungsstudien von H-Ras p21 mit Effektorproteinen.

3.5.2 Erläuterung der funktionellen Bereiche am Beispiel von H-Ras p21

Die an der Nukleotidbindung und an der Hydrolyse beteiligten Aminosäuren sind innerhalb der Ras-Superfamilie streng konserviert. Diese für alle Ras-homologen Proteine charakteristischen funktionellen Bereiche (Abbildung 1.2) werden zunächst am Beispiel von H-Ras p21 (Pai *et al.*, 1989; Pai *et al.*, 1990; Milburn *et al.*, 1990; Scheidig *et al.*, 1999) erläutert, bevor auf die Einzelheiten der Strukturen von Rab4a•GppNHp und Rab4a•GDP (Kapitel 3.5.5) eingegangen wird. Für die Diskussion der Rab4-Strukturen werden im wesentlichen die Kristallstrukturen von Rab3a•GppNHp (Dumas *et al.*, 1999), Rab5c•GppNHp (Merithew *et al.*, 2001) und Rab6•GDP (Chattopadhyay *et al.*, 2000) zum Vergleich herangezogen. In Tabelle 3.13 sind die wichtigsten funktionellen Bereiche und Aminosäuren aufgeführt.

Tabelle 3.13: Funktionelle Bereiche und zugehörige Aminosäuren von H-Ras p21, Rab4a, Rab5c und Rab6

Funkt. Bereich	H-Ras p21	Rab4a	Rab3a	Rab5c	Rab6
Phosphatbindung					
Loop L1	¹⁰ GAGGVGKS	¹⁵ GNAGTGKS	²⁹ GNSSVGKT	²⁸ GESAVGKS	¹⁸ GEQAVGKT
Loop L4	⁶⁰ GQEE	⁶⁵ AGQ		⁷⁹ GQ	
Mg ²⁺ -Koordination					
Loop L1	S17	S22	T36	S35	T25
Loop L2	T35	T40	T54	T53	T43
Guaninbasenbindung					
G1-Motiv	F28	F33	F47	F46	F36
G2-Motiv	N116-D119	N121-D124	N135-D137	N134-D137	N124-D127
G3-Motiv	S145-K147	S151,A152,L153	S165-K167	S164-K166	S154-K156
weitere Reste	F82,I84,L113,V114, V152,Q165				
Switch I-Region					
Loop L2/β2	D30-Y40	K31-G45	P49-I57	V42-I59	D34-F48
Switch II-Region					
β3/Loop L4	⁵⁷ DTAGQEEY	⁶³ DTAGQERF	⁷⁷ DTAGQERY	⁷⁶ DTAGQERY	⁶⁶ DTAGQERF
Helix α2	S65-T74	R71-75 (₃₁₀ -Helix η ₁ E68-F70)	R85-R93	E81-A87	Q70-S75

Die Guaninbase des Nukleotids wird durch hydrophobe Wechselwirkungen mit der aromatischen Seitenkette von Phe28 und der aliphatischen Seitenkette von Lys117 oberhalb und unterhalb der Base in der Nukleotidbindungstasche orientiert und über Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den polaren Gruppen des Guanin einerseits und den Aminosäuren der Sequenzmotive G2 (Asn116, Lys117, Asp119) und G3 (Ser145, Ala146, Lys147) andererseits stabilisiert. Zusätzlich zu den Wechselwirkungen mit dem Nukleotid bilden die Aminosäuren Asn116 und Lys117 weitere Wasserstoffbrückenbindungen zu den Carbonylgruppen der Hauptkette von Gly13 und Gly14 aus, wodurch die Schleifen L1 und L8 gegeneinander stabilisiert werden. Die spezifische Bindung der Guaninbase wird durch Wasserstoffbrückenbindungen mit der Hauptketten-NH-Gruppe von Ala146 und der Seitenketten-Carbonsäuregruppe von Asp119 erzeugt. Der Austausch von Asp119 gegen Asparagin ändert die Nukleotidspezifität von Guanin- zu Xanthinnukleotiden, wie am Beispiel von H-Ras p21 und Rab5 gezeigt werden konnte (Zhong *et al.*, 1995; Rybin *et al.*, 1996).

Der Riboseteil des Nukleotids liegt in der 2'-endo Konformation vor, die 2'-OH- und 3'-OH-Gruppe sind zum Lösungsmittel hin exponiert. Die 2'-OH-Gruppe bildet eine Wasserstoffbrückenbindung mit dem Hauptkettenatom Val29-O aus.

Die Interaktion mit den Phosphatgruppe des Nukleotids findet über die Schleifen L1, L2, L4 und das Magnesiumion statt. Die Schleife L2, die auch als P-Loop oder Walkersequenz bezeichnet wird (Walker *et al.*, 1982 ; Saraste *et al.*, 1990), windet sich quasi um die β - und γ -Phosphatgruppen. Diese werden durch Wasserstoffbrückenbindungen mit den Hauptketten-NH-Gruppen von Gly13, Gly15 und Ser17 sowie der ϵ -Aminogruppe von Lys16 stabilisiert. Die α -Phosphatgruppe bildet eine Wasserstoffbrückenbindung mit Ala18 aus. Weitere Wechselwirkungen bestehen zwischen der γ -Phosphatgruppe und dem Thr35 der Schleife L2 sowie Gly60 der Schleife L4. Durch den Verlust dieser Wechselwirkungen bei der GTP-Hydrolyse werden die spezifischen Konformationsänderungen der beiden Schleifen induziert, die zu den Bezeichnungen Switch I- und Switch II-Region geführt haben. Die Sequenz der Schleife L2 ist bis auf das hoch konservierte Thr35 hypervariabel. Durch Mutationsstudien und Sequenzvergleiche wurde erkannt, daß dieser Bereich für die Wechselwirkung zwischen Effektoren und der aktiven GTP-Form verantwortlich ist, weshalb diese Schleife auch als Effektor-Loop bezeichnet wird. Das Magnesiumion wird in der Triphosphatkonformation oktaedrisch durch Ser17, Thr35, die β - und γ -Phosphatgruppen und zwei Wassermoleküle koordiniert. In der Diphosphatkonformation fallen die Interaktionen mit Thr35 und der γ -Phosphatgruppe weg.

Die Aufklärung des Hydrolysemechanismus und der Modulation der Hydrolyserate ist seit der Aufklärung der ersten hochaufgelösten Struktur von H-Ras p21 (Pai *et al.*, 1990) ein zentrales Anliegen. Über chirale Isotopenmarkierung der endständigen Phosphatgruppe von GTP γ S konnte nachgewiesen werden, daß die Hydrolyse durch Inversion der Phosphatgruppe über einen trigonal-bipyramidalen Übergangszustand erfolgt (Feuerstein *et al.*, 1989). Privè und Mitarbeiter diskutierten erstmals eine Beteiligung der Seitenkette von Gln61 zur Stabilisierung des Übergangszustandes (Privè *et al.*, 1992). Studien mit p21-Mutanten, die die Basizität der endständigen γ -Phosphatgruppe mit der intrinsischen Hydrolyserate korrelierten, deuten auf einen geschwindigkeitsbestimmenden Protonierungsschritt unter der Beteiligung der γ -Phosphatgruppe als wahrscheinlichem Protonenakzeptor hin (Schweins *et al.*, 1995). In hochaufgelösten Kristallstrukturen von H-Ras p21 und H-Ras p21-Mutanten konnte ein Wassermolekül in unmittelbarer Nachbarschaft zu der γ -Phosphatgruppe identifiziert werden, daß als angreifendes Nukleophil fungieren könnte. Dieses Wassermolekül (Wat175 in H-Ras p21(1-166)•GppNHp, PDB-Eintrag 5P21) wird durch die Aminosäuren Thr35 und

Gln61 aktivierend polarisiert und optimal für einen S_N2 -Angriff positioniert. Der Austausch von Gln61 gegen jede andere Aminosäure außer Glutamat verlangsamt bzw. inhibiert sowohl die intrinsische als auch die GAP-stimulierte Hydrolyseaktivität (Gideon *et al.*, 1992). Da die intrinsischen Hydrolyseraten der kleinen GTP-bindenden Proteine beträchtlich variieren, müssen neben Gln61 weitere Aminosäuren an der Modulation der GTP-Hydrolyse beteiligt sein.

3.5.3 Kristallstruktur von Rab4-t3•GppNHp

Für die Kristallisation von Rab4a wurden verschiedene C-terminal verkürzte Konstrukte verwendet, von denen sich Rab4-t3 (1-184 plus Glycin und Histidin der TEV-Spaltungssequenz am N-Terminus) am geeignetsten erwies (Kapitel 3.4.5 und 3.4.6). Rab4-t3•GppNHp (21 mg/ml in 20 mM Tris/HCl pH 7,5, 25 mM NaCl, 1 mM $MgCl_2$, 1 mM 2-Mercaptoethanol, 0,1 mM NaN_3) wurde bei 20°C mit 30% (w/v) PEG 8000 und 0,2 M $(NH_4)_2SO_4$ als Fällungsmittel in 0,1 M Natriumkaskodylatpuffer (pH 6,5) kristallisiert. Nachdem zunächst an der Röntgenanlage des MPI ein Datensatz bis 2,6 Å Auflösung aufgenommen wurde, konnte am Synchrotron (ESRF, Beamline ID14-4) ein Datensatz mit 1,6 Å Auflösung aufgenommen werden, der für die Analyse der Struktur verwendet wurde.

Rab4-t3•GppNHp kristallisiert in der Raumgruppe $P4_3$ mit vier Proteinmolekülen in der asymmetrischen Einheit. Das endgültige Modell enthält vier Moleküle Rab4-t3 (1-184 plus die zusätzlichen Aminosäuren Gly und His der TEV-Schnittstelle am N-Terminus), von denen jedoch nur die Aminosäuren 2-177 (Molekül A), 3-175 (Molekül B und D) und 2-175 (Molekül C) anhand durchgehender und wohldefinierter Elektronendichte erkennbar sind. Desweiteren sind vier Moleküle GppNHp, vier Magnesiumionen, 680 geordnete Wassermoleküle, vier Tris-Moleküle und zwei 2-Mercaptoethanol-Moleküle in dem Modell enthalten. In Tabelle 3.14 sind die statistischen Werte der Datensammlung, Prozessierung und Strukturverfeinerung zusammengefaßt.

Tabelle 3.14: Statistik der Datensammlung, Prozessierung und Strukturverfeinerung des Modells von Rab4-t3•GppNHp

Synchrotron/Meßstation	ESRF/ID14-4
Detektor	Q4R ADSC
Temperatur (K)	100
Wellenlänge (nm)	1,008
max. Auflösung (Å)	1,57
Raumgruppe	P4 ₃ (Nr. 78)
Elementarzellparameter: Längen (Å) Winkel (°)	a = b = 99,79; c = 95,54 α = β = γ = 90,0
Gesamtzahl gemessener Reflexe	800522
Redundanz (-fach)	6,7
R _{sym} ¹ (%)	5,7
Anzahl der unabhängigen Reflexe	128819
Vollständigkeit des Datensatzes (%)	100
Suchmodell für MR	Rab5c (PDB-Eintrag: 1HUQ)
R _{cryst} (%) / R _{free} (%)	19,2/22,6 (22,8/26,8) ²
Anzahl der Atome ohne Wassermoleküle	5734
Anzahl der Wassermoleküle	680
rms-Abweichung	
der Standardbindungsängen (Å)	0,018
der Standardbindungswinkel (°)	1,851
Mittlerer B-Faktor/ Standardabweichung (Å ²)	
Hauptkettenatome (A B C D)	24,40/7,68 19,74/5,09 22,19/6,43 28,54/9,95
Seitenkettenatome (A B C D)	28,13/9,34 23,94/8,31 25,95/8,67 32,39/12,03
GppNHp + Mg ²⁺ (E F I L)	22,40/2,76 16,83/1,77 17,80/1,63 22,32/2,50
Wassermoleküle	36,76/8,51
Trismoleküle	39,38/6,72
2-Mercaptoethanolmoleküle	39,80/7,07

$$1: R_{\text{sym}} = \sum_{hkl} \sum_i \frac{|I_i| + \langle I \rangle}{\sum_{hkl} n_i \cdot \langle I \rangle}$$

2: höchste Auflösungsschale: 1,565-1,606 Å

Abbildung 3.26 zeigt die Ramachandran-Diagramme des Strukturmodells. 95% der Aminosäuren liegen in den Kernbereichen (rot), die übrigen liegen in den erlaubten Bereichen (gelb). Lediglich Molekül D weist eine Aminosäure auf, deren φ,ψ-Winkel nicht zulässig sind. Dabei handelt es sich um Ser111, das in der sehr engen Schleife L7 liegt und einen

vergleichsweise hohen B-Faktor von $\sim 51 \text{ \AA}^2$ (mittlerer B-Faktor Molekül D $28,54 \text{ \AA}^2$) aufweist.

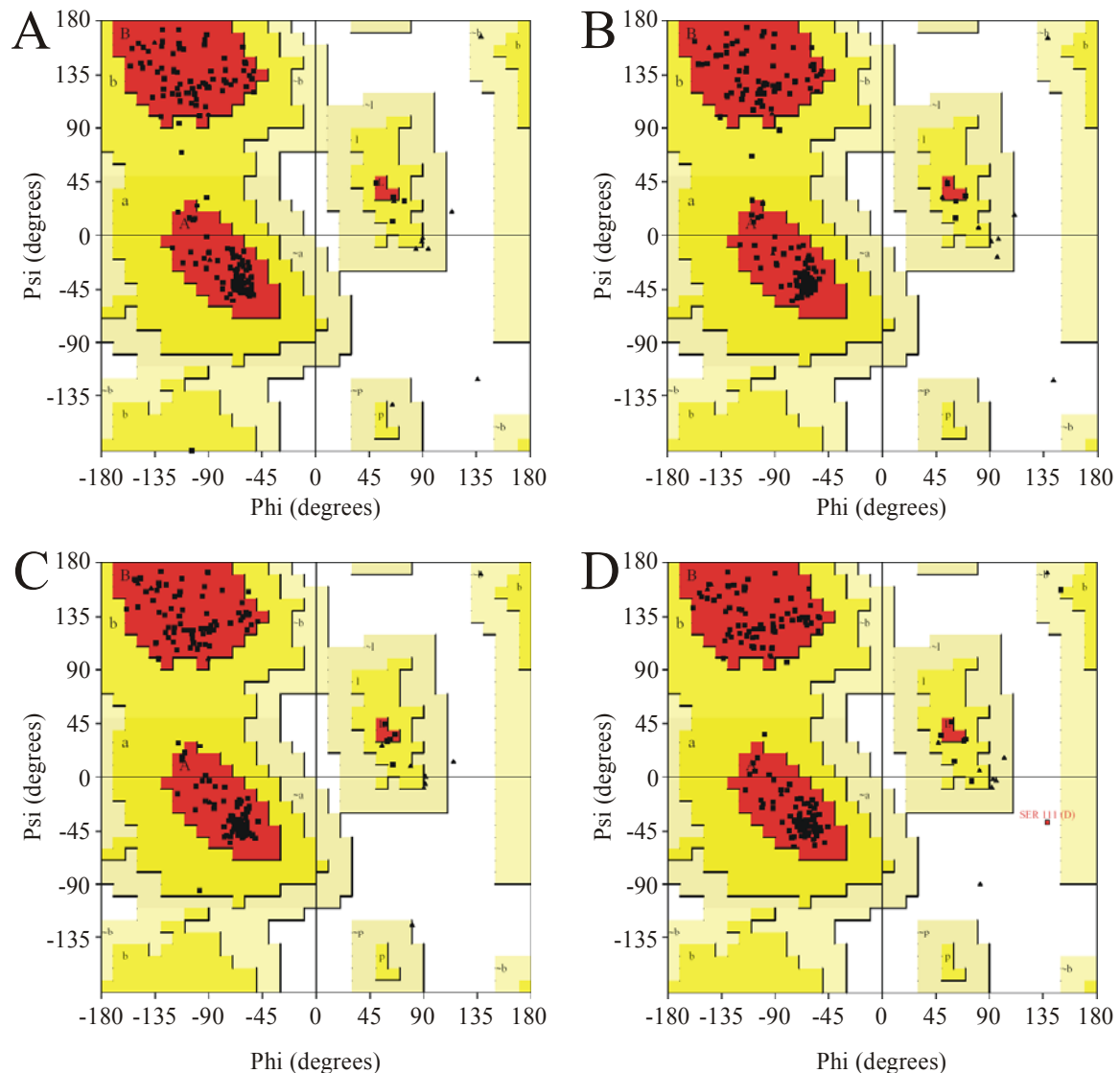


Abbildung 3.26: Ramachandran-Diagramme der Struktur von Rab4-t3•GppNHp

(A) Molekül A (B) Moleküle B (C) Molekül C (D) Molekül D. A,B und L bezeichnen sterisch günstige Regionen für α -Helices, β -Faltblätter und linksgängige α -Helices. Die umgrenzten Bereiche beschreiben Kernbereich (rot), erlaubte Bereiche (gelb), zulässige Bereiche (beige) und verbotene Bereiche (weiß) der ϕ, ψ -Kombinationen des Proteinerückgrats. Den Definitionen liegt dabei eine Statistik von 118 Strukturen mit einer Auflösung von $\leq 2 \text{ \AA}$ und einem $R_{\text{free}} \leq 20\%$ zugrunde. Glycinreste sind durch Dreiecke (\blacktriangle) gekennzeichnet, alle anderen Aminosäuren außer Prolin durch Vierecke (\blacksquare). Die Diagramme wurden mit dem Programm PROCHECK erstellt (Laskowski *et al.*, 1993).

Für den Vergleich der vier Moleküle der asymmetrischen Einheit wurden Überlagerungen der C α -Atome mit dem Programm O durchgeführt (Jones *et al.*, 1991). Es zeigte sich, daß trotz allgemeiner Übereinstimmung der Strukturen in einigen Bereichen signifikante Abweichungen auftreten (Abbildung 3.27). Dabei sind die Abweichungen zwischen den Molekülen A und B (Standardabweichung 0,234 Å) bzw. C und D (Standardabweichung 0,308 Å) geringer als im Vergleich mit den übrigen Molekülen. Für den Vergleich mit der Rab4-t3•GDP-Struktur und den anderen Rab-Strukturen wurde Molekül B ausgewählt, da es die geringsten Abweichungen zu den anderen drei Molekülen zeigt und den niedrigsten mittleren B-Faktor aufweist (vgl. Tabelle 3.14).

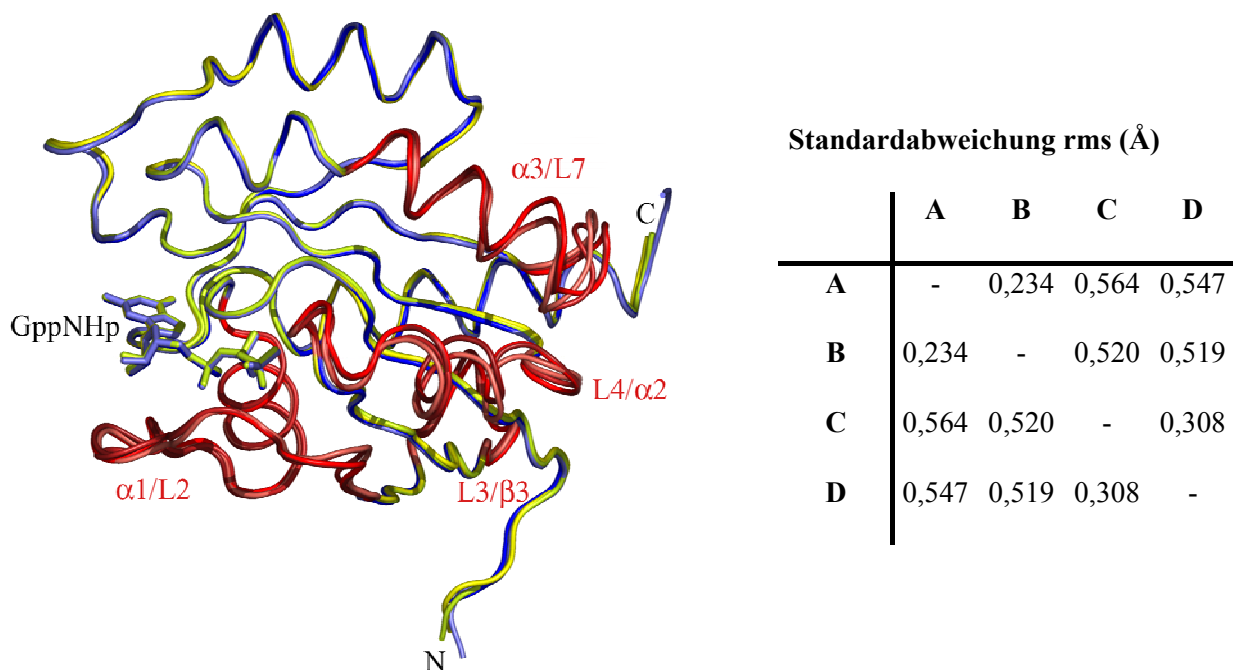


Abbildung 3.27: Überlagerung der Moleküle der asymmetrischen Einheit

Die Polypeptidketten sind als kontinuierliche Bänder dargestellt (Moleküle: A (blau), B (hellblau), C (gelb) und D (grün)). Die voneinander abweichenden Bereiche sind rot gekennzeichnet, α bezeichnet α -Helices, L Schleifen. Die Nukleotide sind als Stäbchenmodelle dargestellt, die Magnesiumionen sind nicht abgebildet. Die Überlagerung wurde mit dem Programm O (Jones *et al.*, 1991) berechnet, die Standardabweichungen sind in der Tabelle wiedergegeben.

Die größten Abweichungen zwischen vier Molekülen befinden sich in den Bereichen Helix α 3/Loop7 (Aminosäure 99-114), Loop4/Helix α 2 (Aminosäure 66-81) und Helix α 1/Loop2 (Aminosäure 20-45), geringfügigere Abweichung treten im Bereich

Loop3/ β 3 (Aminosäure 50-57) auf. Dabei handelt es sich um Bereiche mit erhöhter Flexibilität, wie der Vergleich mit den B-Faktoren (Molekül B) zeigt (Abbildung 3.28).

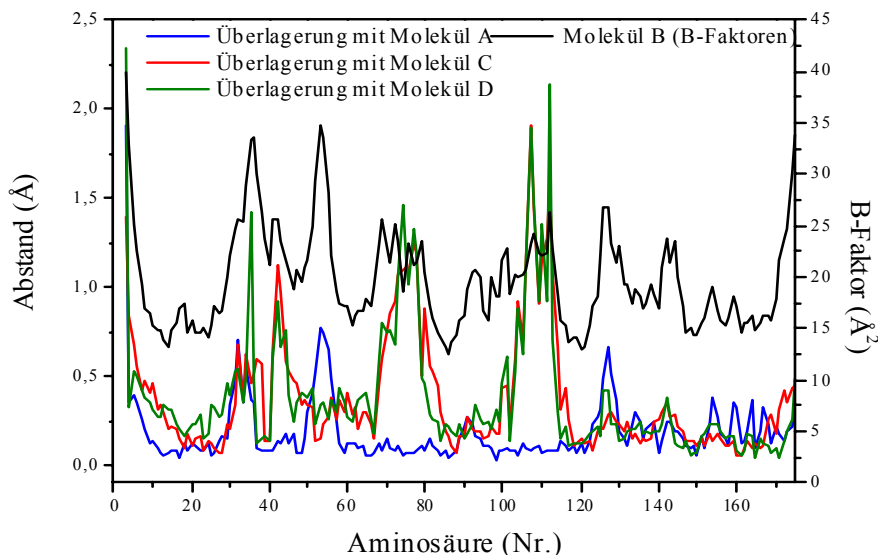


Abbildung 3.28: Standardabweichung der Hauptkettenatome bei der Überlagerung der Moleküle A (—), C (—) und D (—) mit Molekül B. Zusätzlich sind die B-Faktoren der Hauptkettenatome für Molekül B (—) dargestellt.

3.5.4 Kristallstruktur von Rab4-t3•GDP

Rab4-t3•GDP (22 mg/ml in 20 mM HEPES/NaOH pH 7,5, 25 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 5 mM 2-Mercaptoethanol) wurde bei 25°C mit 8% (w/v) PEG 4000 als Fällungsmittel in 0,1 M Natriumacetatpuffer (pH 4,0) kristallisiert. Aufgrund der geringen Größe der Kristalle (40×4×4 μ m) konnte diese nicht an der Röntgenanlage des MPI gemessen werden, am Synchrotron (BESSY, Beamline BL1) wurde ein Datensatz bis 1,8 Å Auflösung aufgenommen, der für die Analyse der Struktur verwendet wurde.

Rab4-t3•GDP kristallisiert in der Raumgruppe C2 mit einem Proteinmolekül in der asymmetrischen Einheit. Das endgültige Modell enthält ein Rab4-t3-Molekül, ein GDP-Molekül, 171 geordnete Wassermoleküle und zwei Glycerinmoleküle. Die Aminosäuren Gly-2 bis Glu3 (Glycin und Histidin sind Überreste der TEV-Schnittstelle nach Entfernen des His-Tags), Asp35 bis Val43, Glu181 bis Gly184 und ein Magnesiumion sind in der Elektronendichte nicht zu erkennen und wurden daher nicht in das Modell aufgenommen. In

Tabelle 3.15 sind die statistischen Werte der Datensammlung, Prozessierung und Strukturverfeinerung zusammengefaßt.

Tabelle 3.15: Statistik der Datensammlung, Prozessierung und Strukturverfeinerung von des Modells von Rab4-t3•GDP

Synchrotron/Meßstation	BESSY/BL1
Detektor	MAR CCD
Temperatur (K)	100
Wellenlänge (nm)	1,0721
max. Auflösung (Å)	1,8
Raumgruppe	C2 (Nr. 5)
Elementarzelle: Längen (Å)	a = 71,14; b = 63,75; c = 38,28
Winkel (°)	$\alpha = 90,00; \beta = 100,03; \gamma = 90,00$
Gesamtzahl gemessener Reflexe	67453
Redundanz (-fach)	4,3
R_{sym}^1 (%)	7,1
Anzahl der unabhängigen Reflexe	15669
Vollständigkeit des Datensatzes (%)	99,4
Suchmodell	Rab4-t3•GppNHp
R_{cryst} (%) / R_{free} (%)	15,8/20,9 (18,9/27,9) ²
Anzahl der Atome ohne Wassermoleküle	1410
Anzahl der Wassermoleküle	171
rms-Abweichung	
der Standardbindungenlängen (Å)	0,012
der Standardbindungswinkel (°)	1,501
Mittlerer B-Faktor/ Standardabweichung (Å ²)	
Hauptkettenatome	14,95/7,61
Seitenkettenatome	18,54/9,63
GDP	13,09/2,45
Wassermoleküle	29,36/8,40
Glycerinmoleküle	23,16/3,91

$$1: R_{\text{sym}} = \frac{\sum_{hkl} \sum_i |I_i| + \langle I \rangle}{\sum_{hkl} n_i \cdot \langle I \rangle}$$

2: höchste Auflösungsschale: 1,8-1,846 Å

Abbildung 3.29 zeigt das Ramachandran-Diagramm des Strukturmodells. 93% der Aminosäuren liegen in den Kernbereichen (rot), 6% liegen in den erlaubten Bereichen (gelb) und 1% in den verbotenen Bereichen (weiß). Dabei handelt es sich um Tyr5 und Phe70. Tyr5 liegt am N-Terminus und ist durch die Elektronendichteverteilung in dieser Position am besten definiert. Phe70 liegt am Übergang von Schleife L4 zur Helix α_2 , die Aminosäurekette beschreibt an dieser Stelle eine sehr enge Windung, die Phe70 in diese Konformation zwingt.

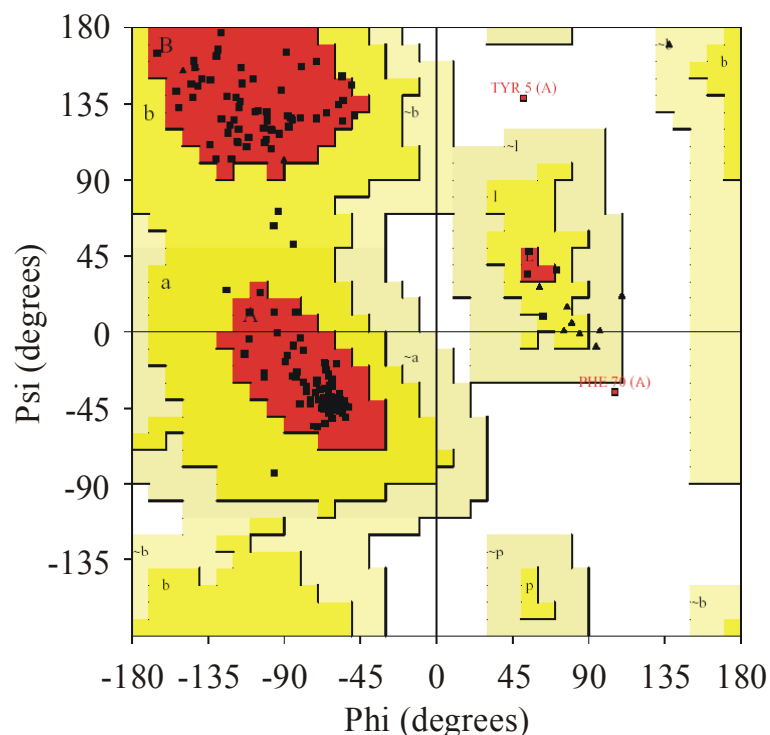


Abbildung 3.29: Ramachandran-Diagramm der Struktur von Rab4-t3•GppNHp (Erläuterungen zur Darstellung siehe Abbildung 3.26)

Die Struktur der GDP-gebundenen Form von Rab4 besitzt verglichen mit der GppNHp-gebundenen Form eine erhöhte Flexibilität, die sich durch eine wesentlich höhere Standardabweichung von den mittleren B-Faktoren ($\sim 50\%$ für GDP-Form, 25-30% für GppNHp-Form) auszeichnet. Besonders deutlich wird dies im Bereich der Schleife L2, in der die Aminosäuren 35-43 nicht durch Elektronendichte definiert sind. Weitere Bereiche sind die Schleife L4 mit dem Beginn der darauffolgenden Helix α_2 , die Schleife L7 und die Schleife L9, in denen einige Aminosäuren lediglich bis zum C_β -Atom klar in der Elektronendichte erkennbar sind.

3.5.5 Analyse der Rab4a-Struktur

Die Strukturen von Rab4-t3•GppNHp, Rab4-t3•GDP, Rab3a•GppNHp, Rab5c•GppNHp und Rab6•GDP sind sehr ähnlich, wie auch aus den Werten für die mittlere Standardabweichung der Anordnung der C_α-Atome abgeleitet werden kann (Abbildung 3.30 C).

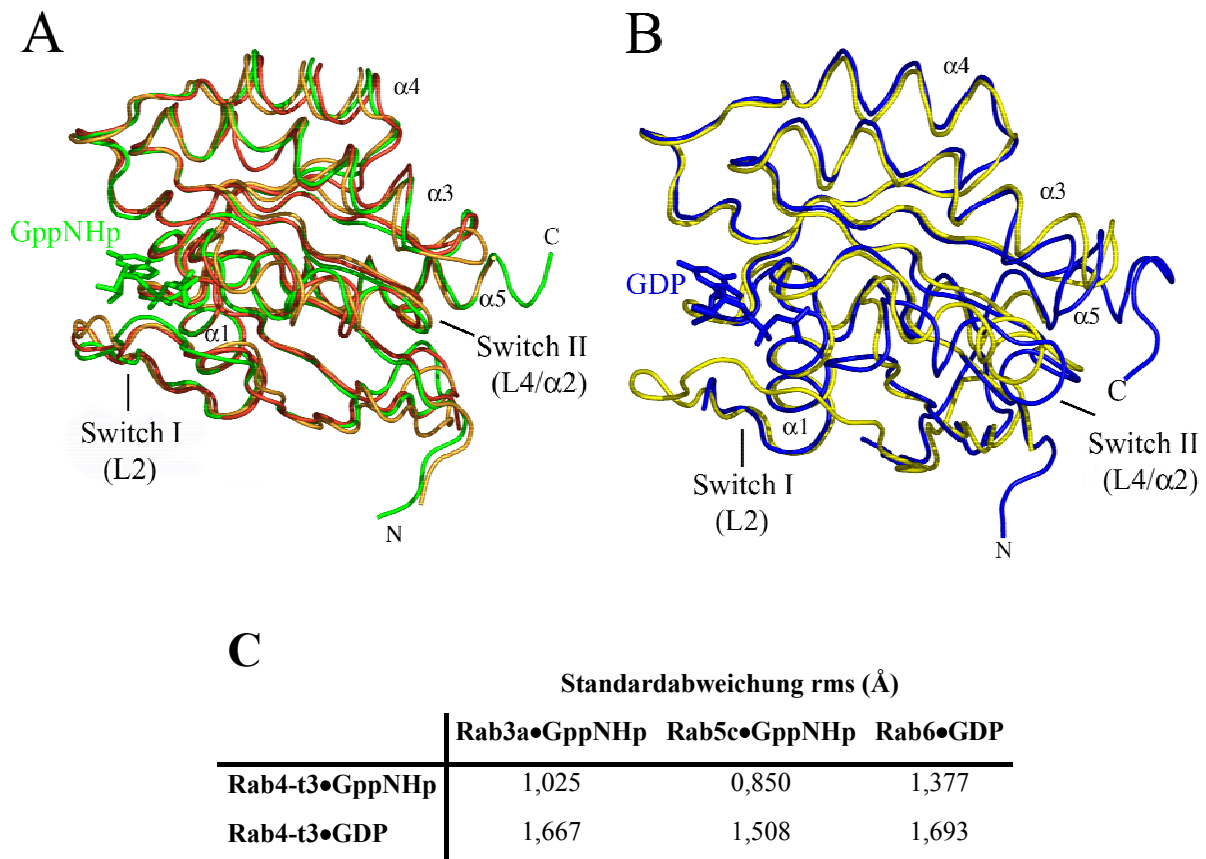


Abbildung 3.30: Überlagerung der Strukturen von Rab4-t3•GppNHp und Rab4-t3•GDP mit anderen Rab-Strukturen

(A) Überlagerung der C_α-Atome von Rab4-t3•GppNHp (grün) mit Rab3a•GppNHp (orange) und Rab5c•GppNHp (rot) (B) Überlagerung der C_α-Atome von Rab4-t3•GDP (blau) mit Rab6•GDP (gelb). Die Überlagerung wurde mit den Programmen O (Jones *et al.*, 1991) und Pymol (DeLano, 2002) erstellt. (C) Mittlere Standardabweichung der C_α-Atome.

Die niedrigsten Abweichungen ergeben sich im Vergleich mit Rab5c, was möglicherweise darauf beruht, daß beide Rab-Proteine an der Regulation des endocytotischen Transportes beteiligt sind. Signifikante Unterschiede sind in den Schleifen L2 (Switch I-Region), L3, L4 mit der darauffolgenden Helix α 2 (Switch II-Region) und L7 (RabSF3/Rab CDR III) sichtbar. Beim Vergleich der Strukturen wird neben der Numerierung für Rab4-t3 die entsprechende Numerierung für die anderen Proteine angegeben. Zur generellen Übersicht ist in

Abbildung 3.31 ein Sequenzvergleich dargestellt, in den die humanen Sequenzen von Rab3a, Rab5c und Rab6 aufgenommen wurden, um mögliche Spezies-spezifische Unterschiede zu berücksichtigen. Zusätzlich wurden die Sequenzen von Ypt51p und Sec4p eingeschlossen, deren Strukturen ebenfalls bereits gelöst wurden.

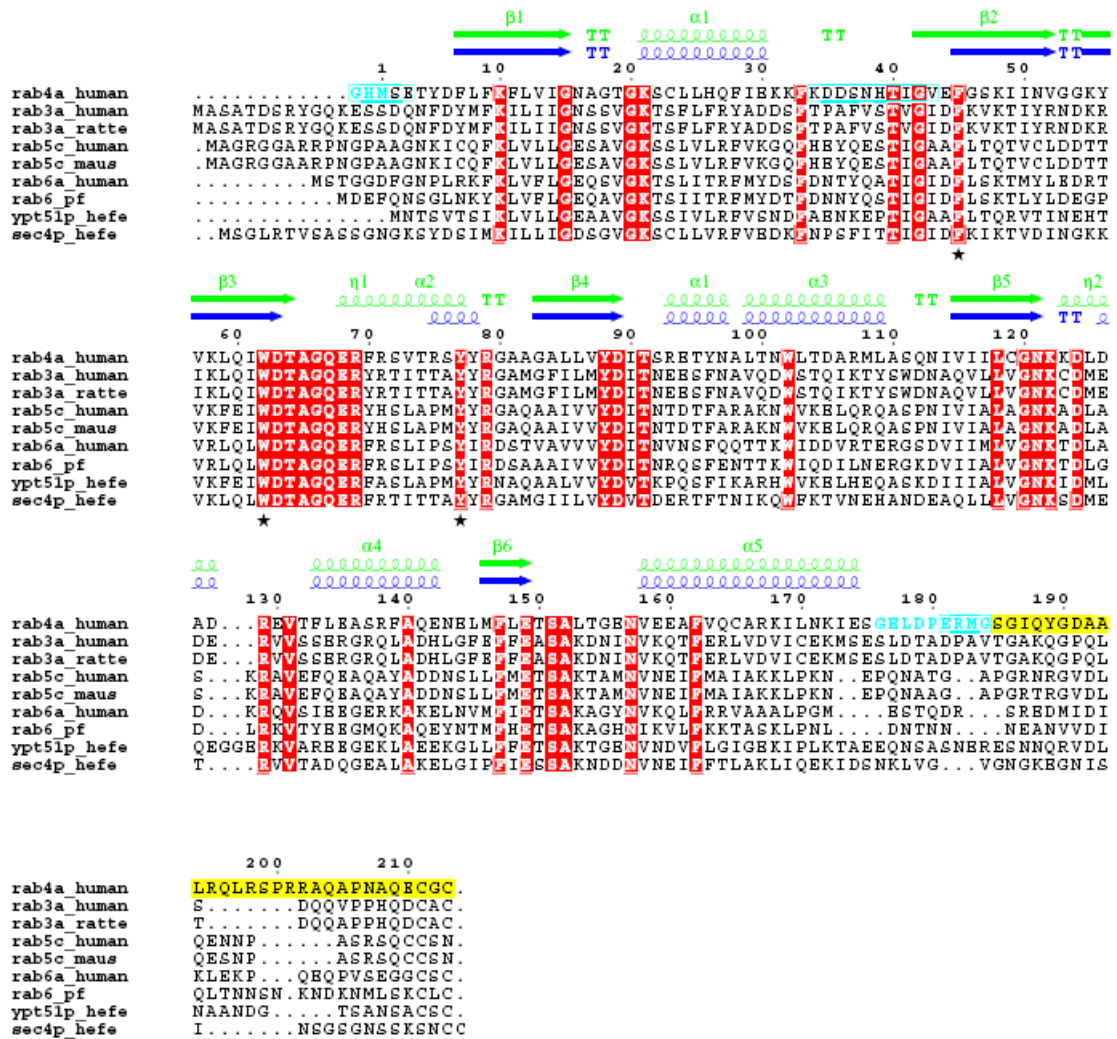


Abbildung 3.31: Sequenzvergleich von Rab4a mit Rab3a, Rab5c, Rab6, Ypt51p und Sec4p.

Der Sequenzvergleich wurde mit den Programmen Clustal W (Higgins & Gibson, 1994) und ESPrift (Gouet *et al.*, 1999) erstellt. Die Numerierung entspricht der Zählweise für Rab4a. Die Sekundärstrukturelemente (Rab4-t3•GppNH grün, Rab4-t3•GDP blau) wurden mit dem Programm DSSP (Kabsch & Sander, 1993) bestimmt. ■: konservierte Reste ■: Reste im Konstrukt Rab4-t3 nicht enthalten x: Reste in der Struktur von Rab4-t3•GppNp nicht sichtbar □: Reste in der Struktur von Rab4-t3•GDP nicht sichtbar

3.5.5.1 Switch I-Region (Schleife L2)

Der Vergleich der Strukturen von Rab4-t3•GppNHp und Rab4•GDP erlaubt eine definitive Zuordnung der Switch-Regionen (Abbildung 3.32). Die Effektorschleife L2 ändert ihre Konformation nach der hydrolytischen Abspaltung der endständigen Phosphatgruppe von GTP, wie u.a. durch zeitaufgelöste Röntgenexperimente gezeigt werden konnte (Schlichting *et al.*, 1990; Scheidig *et al.*, 1995). Statische NMR-Analysen und Kristallstrukturanalysen haben ergeben, daß durch die Konformationsänderung die Schleife in der GDP-gebundenen Form deutlich weniger geordnet ist als in der GTP-gebundenen Form.

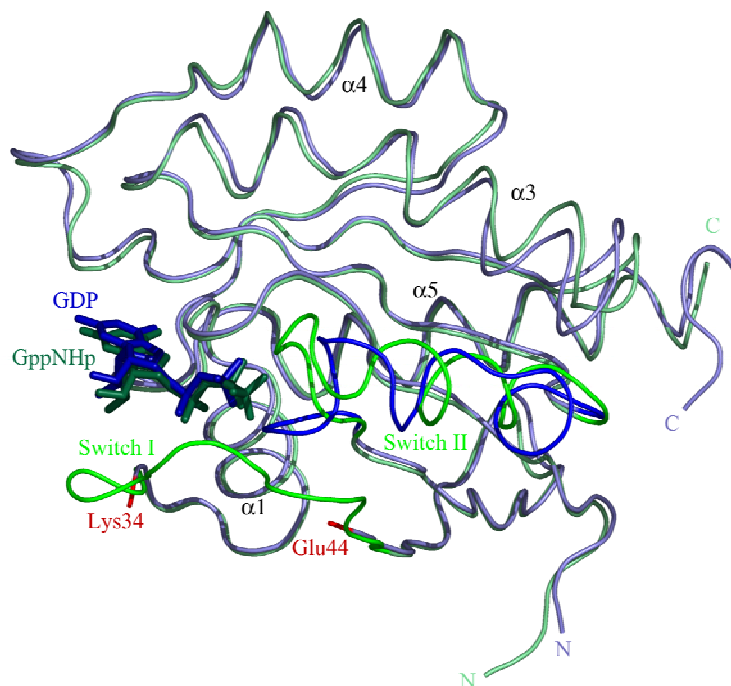


Abbildung 3.32: Überlagerung der Strukturen von Rab4-t3•GDP mit Rab4-t3•GppNHp

Die Polypeptidketten sind in hellblau (Rab4-t3•GDP) bzw. hellgrün (Rab4-t3•GppNHp) dargestellt, die Switch-Regionen sind blau (GDP-Form) und grün (GppNHp-Form) hervorgehoben. Die Nukleotide (GDP dunkelblau, GppNHp dunkelgrün) sind als Stäbchenmodelle dargestellt, das Magnesiumion ist nicht abgebildet. Die Überlagerung der C_α-Atome wurde mit dem Programmen O (Jones *et al.*, 1991) und Pymol (DeLano, 2002) erstellt.

In der Kristallstruktur von Rab4-t3•GDP äußert sich diese Konformationsänderung durch den fast vollständigen Verlust der geordneten Faltung in der Switch I-Region. Die hochkonservierte Aminosäure Phe33 des G1-Motivs ist aufgrund der Koordination mit der Guaninbase in ihrer Position fixiert und gut durch Elektronendichte definiert, das

darauffolgende Lys34 geht in der GppNHp-gebundenen Form eine Wasserstoffbrückenbindung mit der 2'-OH-Gruppe der Ribose ein. In der GDP-gebundenen Form ist die Peptidbindung jedoch um 180° gedreht, wodurch der Kontakt mit der Ribose verlorenght. Die Aminosäuren Asp35 bis Val43 sind aufgrund der stark erhöhten Flexibilität in der Elektronendichtekarte von Rab4-t3•GDP nicht definiert. Ab Glu44 ist der Verlauf der Polypeptidkette wieder deutlich zu erkennen, daher werden die Aminosäuren Phe33 bis Glu44 als Switch I-Region von Rab4-t3 definiert. Die Flexibilität der Switch I-Region zeigt sich auch beim Vergleich der vier Moleküle der asymmetrischen Einheit des Strukturmodells von Rab4-t3•GppNHp, die Hauptkettenatome der Aminosäuren Ile42 bis Glu44 sind bis zu 1,1 Å gegeneinander verschoben. Dabei nimmt die in der Familie der Rab-Proteine konservierte Aminosäure Gly42 jedoch in allen vier Molekülen eine ähnliche Konformation ein. Diese Aminosäure stellt im Vergleich mit H-Ras p21 eine Insertion dar. Die Aminosäuren ⁴¹IGV zeigen in Rab4-t3•GppNHp dieselbe nach außen weisende Wölbung, die bereits für andere Rab-Proteine beschrieben wurde und in einer im Vergleich zu H-Ras p21 dichteren Packung des Endes der Effektorschleife gegen die Helix α 2 der Switch II-Region resultiert.

Die wohlgeordnete Faltung der Switch I-Region der GppNHp-gebundenen Form wird durch die Kontakte von His39 und Thr40 mit dem Nukleotid fixiert. Die Abweichung der Positionen der C α -Atomen der vier Rab4-t3•GppNHp-Moleküle beträgt für diese Aminosäuren lediglich zwischen 0,08 und 0,16 Å. Allerdings existieren an der Grenzfläche zwischen Molekül A und B Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Hauptkettenatomen von Ile41A/Phe45B, Val43A/Val43B und Phe45A/Ile41B, die die Konformation der Schleife stabilisieren. Für Molekül D und C gibt es keine vergleichbaren Interaktionen, daher kann davon ausgegangen werden, daß die Konformation der Switch I-Region im wesentlichen durch die intrinsischen Eigenschaften des Proteins und nicht durch die Kristallpackung bestimmt ist.

3.5.5.2 Schleife L3

Die Schleife L3 befindet sich zwischen den β -Faltblattsträngen β 2 und β 3, es handelt sich dabei um einen β -turn. In Rab4-t3 befinden sich an den Positionen 53 und 54 Glycinreste, die aufgrund ihrer geringen Größe oft in engen Schleifenbereichen zu finden sind. Der β -turn wird durch eine Wasserstoffbrückenbindung zwischen Val52-O und Lys55-N der angrenzenden β -Faltblattstränge β 2 und β 3 stabilisiert. Eine zusätzliche Stabilisierung entsteht durch eine weitere Wasserstoffbrückenbindung zwischen der Seitenkette von Asn51 (β 2) und Gly54-N. Die Konformation des β -turns ist in den vier Rab4-t3•GppNHp-Molekülen und

Rab4-t3•GDP sehr ähnlich mit Verschiebungen der C_{α} -Atome zwischen 0,4 und 1,0 Å. In Rab5c ist die entsprechende Sequenz 64 CLDDT, der β -turn nimmt eine ähnliche Konformation ein wie bei Rab4-t3. In Rab3a (65 YRNDK) und Rab6 (54 YLDEG) befinden sich an den entsprechenden Positionen je ein Rest mit längeren Seitenketten, deren Platzbedarf zu einer Verdrillung des β -turn führt (Abbildung 3.33). In der Struktur von Ypt51p•GppNHp wird über die Schleife L3 ein zweites Nukleotid gebunden, für das jedoch keine biologische Funktion nachgewiesen werden konnte. Da in keiner der anderen bisher gelösten Rab-Strukturen an dieser Stelle ein Nukleotid gebunden wird, muß davon ausgegangen werden, daß es sich bei der zweiten Nukleotidbindungsstelle von Ypt51p•GppNHp um ein Artefakt der Kristallisation handelt (Esters *et al.*, 2000).

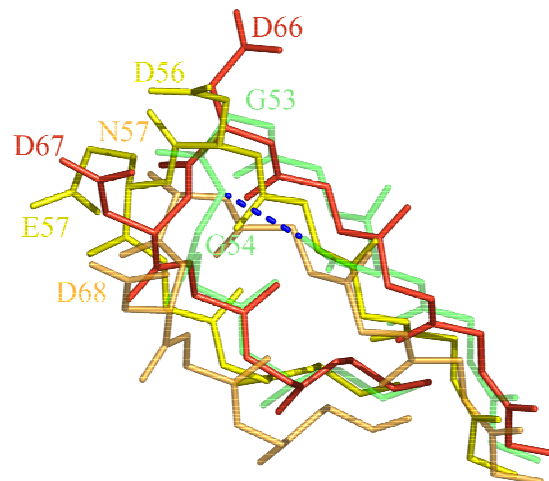


Abbildung 3.33: Überlagerung der Schleife L3 von Rab4-t3•GppNHp, Rab5c•GppNHp, Rab3a•GppNHp und Rab6•GDP

Die Aminosäuren der Schleife L3 mit den Hauptkettenatomen (N, C_{α} , C, O) der angrenzenden Aminosäuren der β -Faltblattstränge β_3 und β_4 sind als Stäbchenmodell dargestellt: Rab4-t3•GppNHp grün, Rab3a•GppNHp orange, Rab5c•GppNHp rot und Rab6•GDP gelb. Die blau gestrichelte Linie bezeichnet die Wasserstoffbrückenbindung zwischen Gly54-N und Asn51-OD1 in Rab4-t3•GppNHp.

3.5.5.3 Switch II-Region (Schleife L4/Helix $\alpha 2$)

Die katalytische Schleife L4 durchläuft wie die Effektorschleife L2 bei der GTP-Hydrolyse eine ausgeprägte Konformationsveränderung, die sich auch auf die nachfolgende Helix $\alpha 2$ auswirkt (Abbildung 3.32), daher wird als Switch II-Region von Rab4-t3 der Bereich von Thr64 bis Gly80 definiert. Im Gegensatz zur Schleife L2 sind die Hauptkettenatome und der größte Teil der Seitenkettenatome der Schleife L4 auch in der GDP-gebundenen Form in der Elektronendichte definiert.

Im Bereich von $\beta 3/L4$ befindet sich das hochkonservierte Sequenzmotiv ⁶²WDTAGQER (DxxG-Motiv/PM3 in Ras-homologen Proteinen). In der GppNHp-gebundenen Form wechselwirken die Aminosäuren Asp63 und Gly66 mit einem Wasser der Magnesiumkoordinationssphäre bzw. direkt mit der γ -Phosphatgruppe des Nukleotids. Die Seitenkette von Gln67 (Gln61 in H-Ras p21, Gln81 in Rab3a, Gln66 in Ypt51p) geht eine Wasserstoffbrückenbindung mit W670 ein, dessen Position den Wassermolekülen W1019 in Ypt51p und W309 in Rab3a entspricht. Diese Wassermoleküle sind höchstwahrscheinlich äquivalent zu dem hydrolysierenden Wassermolekül W175 in H-Ras p21 (Pai *et al.*, 1990), dessen Position sich jedoch in einem Abstand von 1,0-1,5 Å zu diesen befindet. Die Aminosäuren ⁶⁸ERF bilden eine 3_{10} -Helix, an die sich direkt die Helix $\alpha 2$ (⁷¹RSVTRSY) anschließt. Diese Sekundärstrukturkombination wurde auch schon bei Rab3a•GppNHp und Ypt51p beobachtet.

In der Struktur von Rab4-t3•GDP ist die Switch II-Region deutlich weniger geordnet. Die 3_{10} -Helix existiert nicht mehr, die Helix $\alpha 2$ ist auf vier Reste verkürzt. Die Konformationsänderungen ermöglichen den Kontakt zwischen Glu68 und der β -Phosphatgruppe über das Wassermolekül W74, wodurch möglicherweise die fehlende Interaktion mit dem Magnesiumion kompensiert wird, das in der GDP-Struktur nicht enthalten ist (vgl. Kapitel 3.5.5.5). In der Struktur von Rab6•GDP beschreibt die Schleife L4 einen anderen Verlauf, aufgrund dessen diese Wechselwirkung unmöglich ist. Dort ist jedoch das Nukleotid auch nach der Abspaltung der γ -Phosphatgruppe weiterhin über das Magnesiumion koordiniert. Gln67 nimmt durch die Konformationsänderungen einen Platz auf der abgewandten Seite des Nukleotids ein. (Abbildung 3.34).

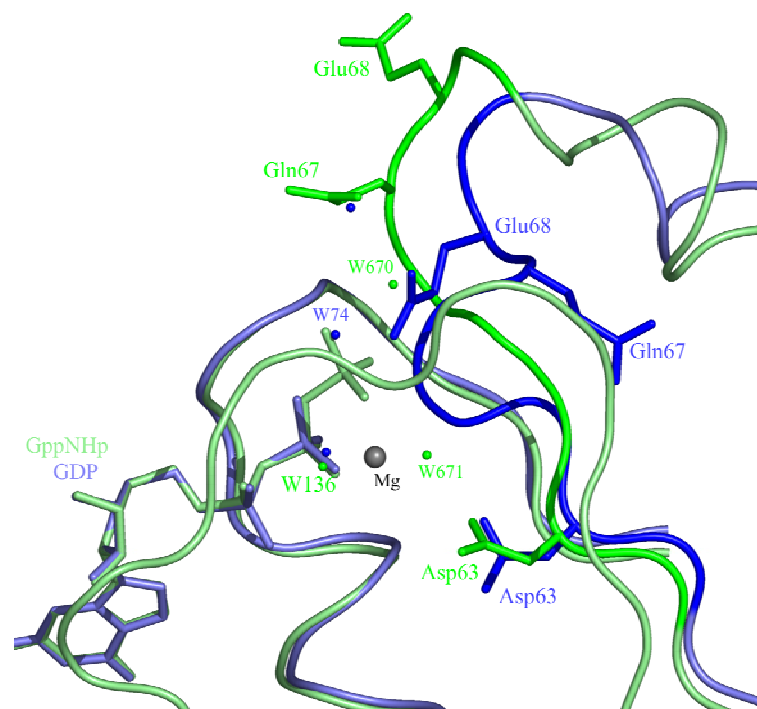


Abbildung 3.34: Überlagerung der Schleife L4 von Rab4-t3•GppNHp mit Rab4-t3•GDP

Die Überlagerung der Schleife L4 wurde anhand der äquivalenten Atome der Nukleotide GppNHp und GDP mit dem Programm O berechnet. Die Hauptkette von Rab4-t3•GppNHp (grün) und Rab4-t3•GDP (blau) ist als kontinuierliches Band dargestellt, die Seitenketten der namentlich gekennzeichneten Aminosäuren sind als Stäbchenmodelle gezeigt. Das Magnesiumion (grau) gehört zur Rab4-t3•GppNHp-Struktur.

3.5.5.4 Die Kontaktfläche zwischen den Switch-Regionen

Die Analyse der Kristallstrukturen von Rab3a•GppNHp (Dumas *et al.*, 1999) und Rab5c•GppNHp (Merithew *et al.*, 2001) hat ergeben, daß die aktive Konformation von Rab-Proteinen durch ein hydrophobes Interface zwischen den Switch-Regionen stabilisiert wird. In der von Ostermeier und Brünger gelösten Struktur des Komplexes aus Rab3a•GTP und der Rab3a-bindenden Domäne des Effektors Rabphilin-3a wurden drei invariante Reste dieses Interface identifiziert, die eine wichtige Rolle bei der Interaktion der Switch-Regionen mit dem Effektor spielen. Diese invarianten Reste nehmen in den Strukturen von Rab3a•GppNHp und Rab5c•GppNHp verschiedene Konformationen ein, die durch nichtkonservierte Substitutionen an verschiedenen Positionen im hydrophoben Inneren der Proteine moduliert werden (Merithew *et al.*, 2001). Da diese drei Aminosäuren Teil der innerhalb der Rab-Familie konservierten RabF-Motive sind (Phe/RabF1, Trp/RabF2, Tyr/RabF4), wurde die

Vermutung aufgestellt, daß die strukturelle Plastizität der invarianten hydrophoben Triade eine Determinante der Effektorerkennung darstellt.

Abbildung 3.35 zeigt die Lage der Aminosäuren Phe45, Trp62 und Tyr77 in den Strukturen von Rab4-t3•GppNHp und Rab4-t3•GDP im Verhältnis zu der Nukleotidbindungstasche und den angrenzenden Switch-Regionen (A) sowie eine Detailansicht der drei Aminosäuren (B).

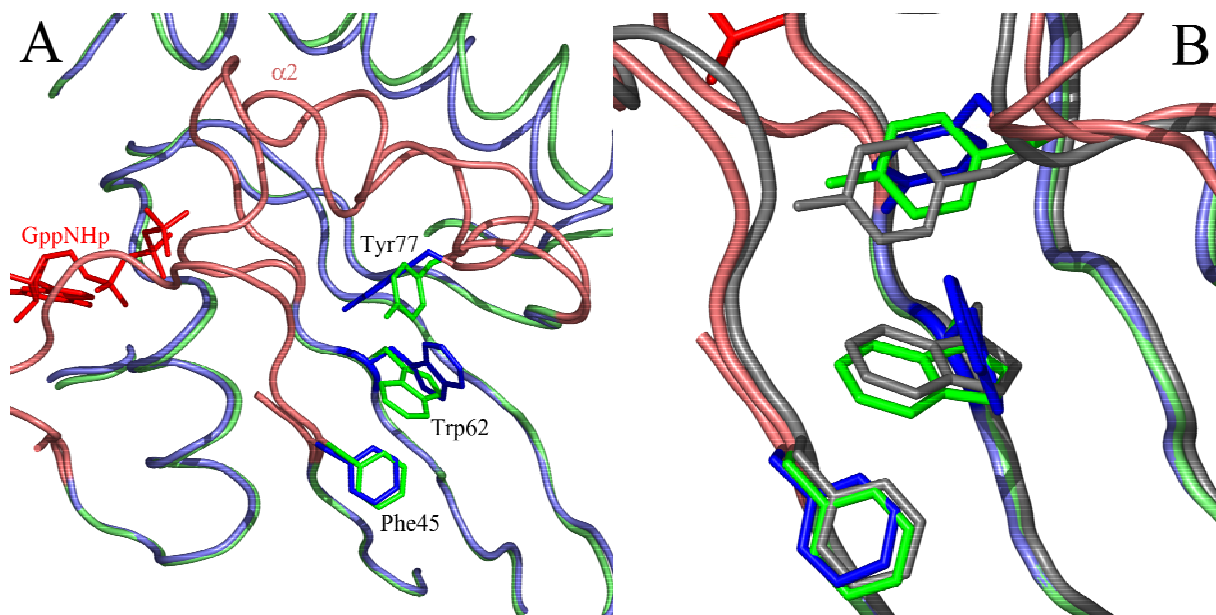


Abbildung 3.35: Übersicht und Detailansicht der hydrophoben invarianten Triade

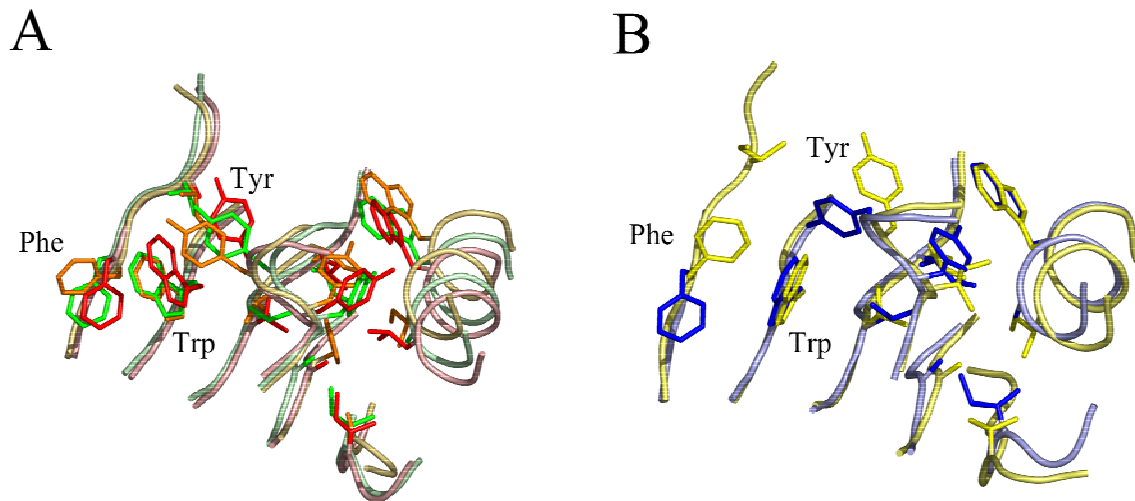
(A) Überlagerung der Strukturen von Rab4-t3•GppNHp (grün) mit Rab4-t3•GDP (blau). Die Switch-Regionen und das GppNHp-Molekül sind rot gekennzeichnet. (B) Detailansicht der hydrophoben invarianten Triade. Zusätzlich zur GDP-Struktur (blau) wurde Molekül C (grau) der Rab4-t3•GppNHp-Struktur mit Molekül B (grün) überlagert.

Die Konformation von Phe45 wird durch den Nukleotidbindungsstatus der GTPase nicht beeinflusst, obwohl diese Aminosäure sich direkt neben dem C-terminalen Ende der Switch I-Region befindet. Anders sieht es bei Trp62 und Tyr77 aus. Die Seitenkette von Trp62 ist in der GDP-Form gegenüber der GppNHp-Form um 60° gedreht, während der Verlauf der Hauptkette nicht verändert wird. Tyr77 liegt am C-terminalen Ende der Helix α_2 in der Switch II-Region. Durch die Konformationsänderung in der GDP-Form nimmt die Ordnung der Faltung in diesem Bereich ab. Aus dem neuen Verlauf der Hauptkette resultiert eine

Versetzung der C_α-Position von Tyr77 um 1,95 Å beim Vergleich der GDP-Form mit Molekül B der Rab4-t3•GppNHp-Struktur. Der Unterschied zwischen der GDP-Form und Molekül C der Rab4-t3•GppNHp-Struktur beträgt dagegen nur 1,09 Å, zwischen Molekül B und C ist die Position um 1,26 Å versetzt (vgl. Abbildung 3.35 (B)). Aufgrund der auch in der GppNHp-gebundenen Form vorhandenen Flexibilität der Switch II-Region kann der Abstand zwischen den C_α-Positionen daher für den Vergleich zwischen den verschiedenen Nukleotidzuständen nicht herangezogen werden. Anders sieht es beim Vergleich der Konformation der Hauptkette und der Orientierung der Seitenkette von Tyr77 aus. Die Hauptkette beschreibt in Molekül B und C den gleichen Verlauf und könnte durch eine einfache Translation zur Deckung gebracht werden, wobei die planaren Ringe der Tyrosine annähernd übereinander liegen würden. Im Gegensatz dazu ist in der GDP-gebundenen Form die Konformation der Hauptkette gegenüber der GppNHp-gebundenen Form verdreht. Die Seitenkette von Tyr77 nimmt dadurch eine um 90° gedrehte Position ein, wodurch Platz für die Seitenkette von Trp62 geschaffen wird.

Merithew *et al.* stellten 2001 anhand des Vergleichs der Strukturen von Rab5c•GppNHp, Rab3a•GppNHp, Rab3a•GTP/Rabphilin-3a, Rab6•GDP und Ypt51p•GppNHp die Hypothese auf, daß die Anordnung der hydrophoben Triade in der GppNHp-gebundenen Form die Zugehörigkeit zu Unterfamilien innerhalb der Gruppe der Rab-Proteine widerspiegelt und so die Effektorerkennung durch die RabCDR-Regionen ergänzt. In der GDP-gebundenen Form ginge diese spezifische Anordnung wegen der Flexibilität der Switch-Regionen verloren (Merithew *et al.*, 2001). Sie identifizierten eine Reihe von nicht konservativ substituierten Aminosäuren im Inneren der Proteine, die an der Modulierung der Konformation der invarianten hydrophoben Triade beteiligt sind.

In Abbildung 3.36 ist ein Vergleich der Anordnung der invarianten und nicht konservativ substituierten Reste in Rab4-t3•GppNHp, Rab4-t3•GDP, Rab3a•GppNHp, Rab5c•GppNHp und Rab6•GDP dargestellt.



	invariante Triade			nicht konservative Substitutionen						
Rab4a	F45	W62	Y77	Y78	A84	L12	V14	V43	I114	A106
Rab5c	F58	W75	Y90	Y91	A97	V25	L27	A56	I127	L119
Rab3a	F59	W76	Y91	Y92	F98	L26	I28	I57	A128	I120
Rab6	F48	W65	Y80	I81	A87	V15	L17	I46	V117	I109

Abbildung 3.36: Vergleich der Anordnung der invarianten hydrophoben Triade in den Strukturen von Rab4-t3•GppNHp, Rab4-t3•GDP, Rab5c•GppNHp, Rab3a•GppNHp und Rab6•GDP

(A) Überlagerung von Rab4-t3•GppNHp (grün) mit Rab3a•GppNHp (orange) und Rab5c•GppNHp (rot). (B) Überlagerung von Rab4-t3•GDP (blau) mit Rab6•GDP (gelb). Die Überlagerung basiert auf den Aminosäuren 45-52, 57-63 und 77-81 von Rab4-t3 mit den äquivalenten Aminosäuren der anderen Rab-Proteine. Für die Überlagerung von Rab4-t3•GDP wurden die Bereiche 45-50, 57-63 und 80-84 einbezogen. Die Tabelle gibt die Positionen der Aminosäuren der invarianten hydrophoben Triade und der nicht konservativen Substitutionen im hydrophoben Inneren der Proteine an.

Die Überlagerung der Strukturen zeigt deutlich die vielfältigen Kombinationsmöglichkeiten für die Anordnung der invarianten Reste. Die Unterschiede zwischen Rab4-t3•GppNHp und Rab4-t3•GDP wurden bereits beschrieben. Beim Vergleich von Rab4-t3•GppNHp mit Rab3a•GppNHp fällt sofort die fast völlige Übereinstimmung der Konformation der Tryptophanreste auf. Diese ist auch bei Rab4-t3•GDP und Rab6•GDP, dort in der um 60° gedrehten Konformation, zu beachten. Die Vermutung liegt nahe, daß diese beiden Konformationen ein generelles Merkmal des GppNHp- und des GDP-gebundenen Zustands

darstellen. In den Strukturen von Ypt7p•GDP und Ypt7p•GppNHp wird jedoch keine derart ausgeprägte Konformationsänderung des Tryptophanrestes beobachtet (Constantinescu *et al.*, 2002).

3.5.5.5 Die Nukleotidbindungstasche

Die Nukleotidbindungstasche wird von Aminosäuren aus den Schleifen L1, L2, L4, L8 und L10 gebildet (Abbildung 3.37). Der Phosphatteil wird über die Schleifen L1, L2 und L4 gebunden, während an der Koordination der Guaninbase Aminosäuren aus den Schleifen L2, L8 und L10 beteiligt sind. Die an der Nukleotidbindung beteiligten Aminosäuren sind weitgehend konserviert, daher ist eine zentrale Fragestellung die strukturelle Grundlage der innerhalb der Rab-Familie auftretenden Varianz der intrinsischen Hydrolyseraten.

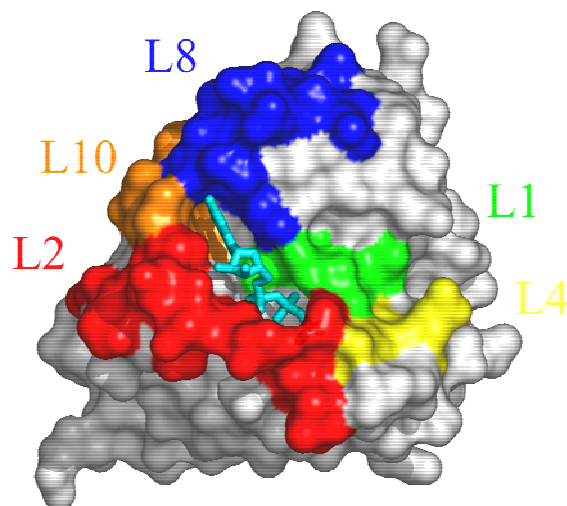


Abbildung 3.37: Anordnung der an der Nukleotidbindung beteiligten Schleifen in Rab4-t3•GppNHp

Die Nukleotidbindungstasche ist in beiden Rab4-t3-Strukturen sehr gut in der Elektronendichte definiert. In der Rab4-t3•GppNHp-Struktur finden sich alle bekannten charakteristischen Wechselwirkungen der GppNHp-Bindung, in der Rab4-t3•GDP-Struktur dagegen fehlt das Magnesiumion (Abbildung 3.38).

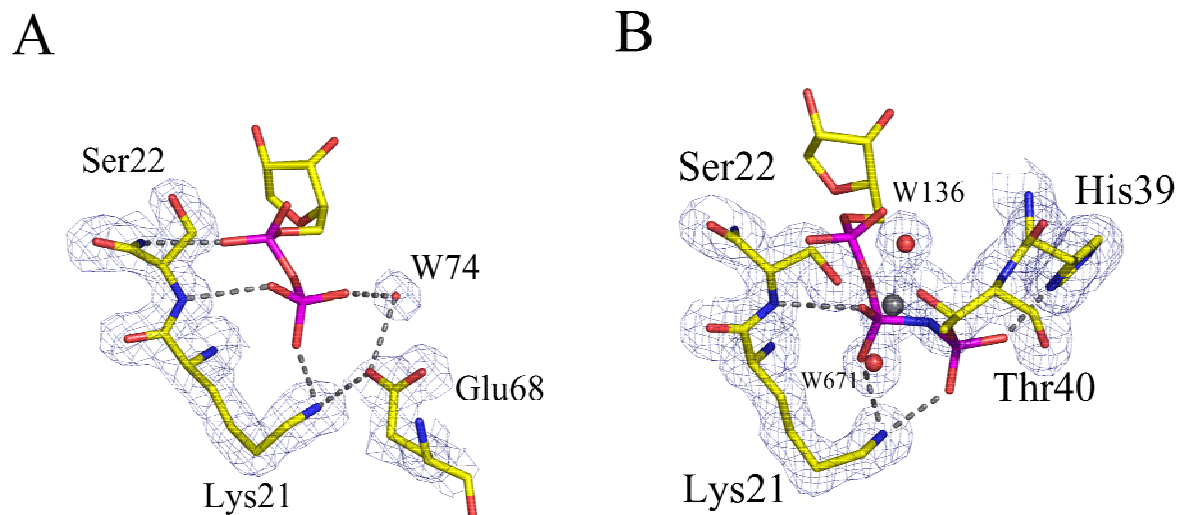


Abbildung 3.38: Koordination des Nukleotids in Rab4t3•GDP (A) und Rab4-t3•GppNHp (B)

Die Aminosäuren und das Nukleotid sind als Stäbchenmodell dargestellt, zu besserer Übersicht wurde die Guaninbase weggelassen. Die grau gestrichelten Linien geben Wasserstoffbrückenbindungen wieder. Die Aminosäuren, die Wassermoleküle und das Magnesiumion (grau) der GppNHp-Struktur wurden mit der 2F_o-F_c-Elektronendichtekarte (blau) überlagert (cut-off: 1σ). Die Abbildung wurde mit dem Programm Pymol erstellt.

Die Magnesiumkoordinationssphäre wird in der GppNHp-gebundenen Form von den Seitenketten der Aminosäuren Ser22 und Thr40, den O2B- und O2G-Atomen der β- und γ-Phosphatgruppe sowie zwei Wassermolekülen gebildet. In der GDP-gebundenen Form fällt die Interaktion mit Thr40 und O2G der γ-Phosphatgruppe weg. In fast allen bekannten GDP-gebundenen Strukturen kleiner GTP-bindender Proteine werden die freiwerdenden Valenzen durch zwei Wassermoleküle abgesättigt, wodurch die oktaedrische Koordination des Magnesiums erhalten bleibt. Vergleicht man beispielsweise Rab4-t3•GppNHp und Rab6•GDP, so befinden sich die zusätzlichen Wassermoleküle in der Rab6-Struktur an den annähernd gleichen Positionen wie das Sauerstoffatom der OH-Gruppe des Threonins und das O2G-Atom der γ-Phosphatgruppe. In der Rab4-t3•GDP-Struktur ist die Seitenkette des Ser22 um etwa 100° gedreht, so daß das Sauerstoffatom der OH-Gruppe in die vom Nukleotid abgewandte Richtung zeigt. Es stellt sich die Frage, ob und welche anderen Wechselwirkungen an die Stelle der fehlenden Koordination durch das Magnesiumion treten, um das Nukleotid zu binden.

Shimizu *et al.* veröffentlichten 2000 die Struktur der kleinen GTPase RhoA im GDP-gebundenen, magnesiumfreien Zustand (Shimizu *et al.*, 2000). Die Konformation der

Switch I-Region dieser Struktur unterscheidet sich deutlich von den ebenfalls bekannten Strukturen von RhoA•GppNHp/Mg²⁺ (Ihara *et al.*, 1998) und RhoA•GDP/Mg²⁺ (Wei *et al.*, 1997). Im Gegensatz zu Rab4-t3•GDP ist dieser Bereich in der Elektronendichtekarte von RhoA gut definiert, obwohl keine Wechselwirkungen mehr zwischen der Switch I-Region und dem Nukleotid bestehen. Als zusätzliche nukleotidstabilisierende Interaktion identifizierten sie Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Lys18 und Glu64 (Lys21 und Glu68 in Rab4-t3) sowie zwischen Glu64 und einem Wassermolekül, das seinerseits mit einem Sauerstoff der β -Phosphatgruppe wechselwirkt. Diese Wasserstoffbrückenbindungen werden auch in der Struktur von Rab4-t3•GDP beobachtet (Lys21 \leftrightarrow Glu68, Glu68 \leftrightarrow W74, W74 \leftrightarrow O3B). Eine weitere mögliche Wasserstoffbrückenbindung besteht zwischen W74 und Gly66, das in der GppNHp-Form mit O3G der γ -Phosphatgruppe wechselwirkt. Da bei der Koordination der Ribose und der Guaninbase keine signifikanten Unterschiede zwischen der GppNHp- und der GDP-gebundenen Form bestehen, muß davon ausgegangen werden, daß die zusätzlichen Wasserstoffbrückenbindungen in der Lage sind, die fehlenden Interaktionen mit dem Magnesiumion zu kompensieren.

In Rab3a•GppNHp und Rab5c•GppNHp werden zusätzlich zu den bekannten charakteristischen Wechselwirkungen zwischen Protein und Nukleotid weitere Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Seitenketten zweier Serinreste (Ser31 und Ser52 in Rab3a, Ser30 und Ser52 in Rab5c) und dem O1G-Atom der γ -Phosphatgruppe beobachtet. Diesen wird eine katalytische Rolle bei der Stabilisierung des Übergangszustands der GTP-Hydrolyse zugeschrieben, die für die vergleichsweise hohe Hydrolyserate von Rab3a und Rab5 verantwortlich gemacht wird (Dumas *et al.*, 1999). In Rab4a stehen an diesen Positionen ein Alanin (Ala17) und ein Histidin (His39). Das Histidin geht eine Wasserstoffbrückenbindung zum O1G-Atom der γ -Phosphatgruppe ein. Aufgrund seiner Größe blockiert es vermutlich den Zugang zur γ -Phosphatgruppe und behindert den Austritt des abgespaltenen Orthophosphats, wodurch die sehr niedrige Hydrolyserate von Rab4a erklärt werden könnte.

3.5.5.6 Die Rab-CDR-Regionen

Ostermeier und Brünger identifizierten in der Komplexstruktur von Rab3a/Rabphilin-3a drei Rab-CDR-Regionen (*complementary determining regions*), die zusammen einen der zwei Kontaktflächen zwischen der GTPase und dem Effektor bilden (Ostermeier & Brünger 1999). Die Rab-CDR-Regionen stimmen mit den RabSF1-, RabSF3- und RabSF4-Motiven überein, die Pereira-Leal und Seabra anhand ausführlicher Sequenzanalysen definierten (Pereira-Leal

& Seabra 2000) (vgl. Kapitel 1.4.4). Dabei handelt es sich um Motive im Bereich des N- und C-Terminus und der Schleife L7 zwischen der Helix $\alpha 3$ und dem β -Faltblattstrang $\beta 5$.

Die vier Moleküle der Rab4-t3•GppNHp-Struktur weisen in diesen Bereichen eine erhöhte Flexibilität auf (vgl. Kapitel 3.5.3, Abbildung 3.27), die keine Identifizierung spezifischer Konformationen erlaubt, die Rückschlüsse auf mögliche Effektorinteraktionen geben könnten. Möglicherweise stellt diese Flexibilität die Basis für die Wechselwirkung mit verschiedenen Effektoren dar, indem sich die Bereiche der Rab-CDR-Regionen den Effektoren anpassen.

4 Diskussion

4.1 Charakterisierung der Rab4/Rabaptin-5-Interaktion

4.1.1 Stabilität der Rab4/Rabaptin-5-Komplexe

Im Rahmen dieser Arbeit sollten die strukturellen Grundlagen der Rab4/Rabaptin-5-Interaktion untersucht werden. Dazu wurden verschiedene C-terminal verkürzte Konstrukte von Rab4a auf ihre Wechselwirkung mit den Rab4-bindenden Domänen von Rabaptin-5 (Konstrukt R5a-N2) und Rabaptin 5 β (Konstrukt R5b-N1) getestet. Für die Kristallisation von Rab4a war die C-terminale Verkürzung unbedingt erforderlich, da aus röntgenkristallographischen Untersuchungen anderer kleiner GTPasen bereits bekannt war, daß der C-Terminus keine geordnete Faltung besitzt und durch seine Flexibilität eine erfolgreiche Kristallisation behindert.

Rabaptin-5 wurde zunächst als Rab5-Effektor identifiziert (Stenmark *et al.*, 1995) und als solcher ausführlich charakterisiert. Im Rahmen dieser Untersuchungen wurde zusätzlich zu der Rab5-bindenden Domäne am C-Terminus eine Rab4-bindende Domäne am N-Terminus des Effektors identifiziert (Vitale *et al.*, 1998). Da sich die Forschung auf die Funktion von Rabaptin-5 als Rab5-Effektor konzentriert, ist über die Bedeutung der Rab4a/Rabaptin-5-Interaktion bisher wenig bekannt. Das gleiche gilt für das homologe Rabaptin-5 β .

Für die Kristallisation von Komplexen ist eine stabile Wechselwirkung zwischen den beteiligten Proteinen notwendig, damit der Komplex während der zur Kristallisation erforderlichen Zeit nicht wieder zerfällt. Die Interaktion zwischen den Rab4-bindenden Domänen von Rabaptin-5 und Rabaptin-5 β mit den C-terminal verkürzten Konstrukten von Rab4a wurde zunächst in einem Bindungsassay getestet, in dem die Komplexe über den Affinitätstag eines Bindungspartners an einer entsprechenden Affinitätsmatrix isoliert wurden. Dabei stellte sich bereits heraus, daß die Verkürzung des C-Terminus von Rab4a einen negativen Einfluß auf die Interaktion mit den Effektoren hat, da für die zwei kürzesten Konstrukte Rab4-t3 und Rab4-t4 keine Komplexbildung nachgewiesen werden konnte. Für die Rab4-bindende Domäne von Rabaptin-5 konnte auch mit den längeren Konstrukten Rab4-t1 und Rab4-t2 und dem ungekürzten Rab4a keine Komplexbildung gezeigt werden. Um auszuschließen, daß der Affinitätstag die Interaktion zwischen den Proteinen behindert, wurden diese nach der Abtrennung mittels analytischer Gelfiltration untersucht. Die Ergebnisse dieser Experimente bestätigten die Ergebnisse des Bindungsassays. Da für die Rab4-bindende Domäne von Rabaptin-5 keine Interaktion mit den verkürzten Rab4-

Konstrukten nachgewiesen werden konnte, wurde dieses Konstrukt in die nachfolgenden Experimente nicht einbezogen. Die Komplexe Rab4-t1•GppNHp/R5b-N1 und Rab4t2•GppNHp/R5b-N1 konnten präparativ über Gelfiltration isoliert werden. Die Bestimmung der Stöchiometrie der Komplexe mittels analytischer Gelfiltration erbrachte kein eindeutiges Ergebnis, da die Retentionszeiten von R5b-N1 aufgrund seiner *coiled coil*-Struktur nicht mit dem tatsächlichen Molekulargewicht korreliert werden konnten. Zur quantitativen Charakterisierung der Affinität wurden die Dissoziationskonstanten der Komplexe durch Gleichgewichtstitrationen mittels Fluoreszenzspektroskopie bestimmt. Für diese Messungen wurde die intrinsische Tryptophanfluoreszenz der Rab4-Konstrukte genutzt, da bei der Verwendung von mant-GppNHp und Cystein-gekoppelten Fluoreszenzfarbstoffen keine ausreichenden Signalveränderungen gemessen werden konnten. Dabei ergab sich die Schwierigkeit, daß R5b-N1 trotz nicht vorhandener Tryptophanreste Fluoreszenzemission zeigte. Zur Eliminierung des Beitrags von R5b-N1 zum Fluoreszenzsignal wurden die Bindungskurven aus dem Differenzsignal der Titration von R5b-N1 gegen die Rab4-Konstrukte und einer Referenztitration von R5b-N1 gegen Fluoreszenzmeßpuffer ermittelt, wodurch trotz des anomalen Fluoreszenzverhaltens von R5b-N1 die Dissoziationskonstanten der Komplexe bestimmt werden konnten. Die Affinität von R5b-N1 zu Rab4-t1•GppNHp ($K_d=2,8 \mu\text{M}$) und Rab4-t2•GppNHp ($K_d=3,7 \mu\text{M}$) ist vergleichbar, überraschenderweise zeigt auch Rab4-t3•GppNHp eine extrem schwache Interaktion mit R5b-N1 ($K_d > 40 \mu\text{M}$), die in den anderen Experimenten nicht beobachtet werden konnte. Der über die Gelfiltrationssäule gereinigte Komplex Rab4-t1•GppNHp/R5b-N1 wurde für die Suche nach geeigneten Kristallisationsbedingungen genutzt, die jedoch nicht ermittelt werden konnten. Rab4-t2 erwies sich in den Kristallisationsexperimenten als instabil, daher wurden nur wenige Ansätze mit dem Komplex Rab4-t2•GppNHp/R5b-N1 durchgeführt. Dabei wurden zwar Kristalle erhalten, diese stellten sich aber nach der Aufnahme eines Datensatzes bis $2,8 \text{ \AA}$ Streauflösung und der ersten Verfeinerung jedoch als Rab4-t2 ohne R5b-N1 heraus.

4.1.2 Einfluß der Effektorbindung auf die intrinsische GTPase-Aktivität

Die intrinsische Hydrolyserate der kleinen GTP-bindenden Proteine wird durch die Wechselwirkung mit GTPase-aktivierenden Proteinen (GAP) um ein Vielfaches erhöht. Die Modulation der Hydrolyserate stellt einen Kontrollmechanismus der Schalterfunktion der kleinen GTP-bindenden Proteine dar, da die Interaktion mit den Effektoren nur im GTP-Zustand stattfindet. Einige Effektoren, darunter Rabaptin-5, zeigen inhibitorische Wirkungen, wodurch der aktive Zustand der GTPase aufrecht erhalten wird. Interessanterweise bildet Rabaptin-5 *in vivo* einen Komplex mit dem Rab5-GEF Rabex-5. Der Komplex induziert durch die Aktivierung von Rab5 die eigene Rekrutierung an die Membran und stabilisiert durch die Kopplung von Inhibition und Nukleotidaustausch die Interaktion mit der GTPase. Für die Rab4-bindende Domäne von Rabaptin-5 α (ehemals Rabaptin-4, s. Kapitel 1.4.7) wurde eine vergleichbare inhibitorische Wirkung auf die intrinsische GTPase-Aktivität von Rab4a nachgewiesen (Nagelkerken *et al.*, 2000).

Für die Interpretation der aus röntgenkristallographischen Untersuchungen gewonnenen Daten ist die biologische Funktionalität der verwendeten Proteinkonstrukte von entscheidender Bedeutung. Die Verkürzung des C-Terminus hat auf die Hydrolyseraten der kleinen GTP-bindenden Proteine keinen Einfluß, wie am Beispiel von Rab7 und Rab5 gezeigt werden konnte (Neu *et al.*, 1997; Esters, 2000). Die Bestimmung der Hydrolyseraten von Rab4-t1 ($k=5,5 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$), Rab4-t2 ($k=5,1 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$) und Rab4-t3 ($k=5,7 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$) bestätigt diese Ergebnisse. Die Lage des C-Terminus auf der, bezogen auf die Nukleotidbindungstasche, entgegengesetzten Seite des Proteins, erklärt den fehlenden Einfluß der C-terminalen Verkürzung auf die intrinsische Hydrolysegeschwindigkeit.

R5b-N1 verlangsamt die Hydrolyse, dabei ist eine Abstufung des inhibitorischen Effekts zu beobachten, die mit der Länge des C-Terminus der Rab4-Konstrukte korreliert werden kann. Unter der Annahme, daß die Bindung von Rabaptin-5 an Rab4a ähnlich der Interaktion von Rab3a mit Raphilin-3a über eine Kontaktfläche, gebildet aus den RabSF-Motiven 1, 3 und 4, vermittelt wird, läßt dies auf eine maßgebliche Beteiligung des C-Terminus an der Bildung dieser Kontaktfläche schließen.

4.2 Struktur von Rab4a

Die Struktur von Rab4-t3•GppNHp weist alle bekannten Charakteristika einer kleinen GTPase mit einer Grundstruktur bestehend aus einem zentralen β -Faltblatt mit fünf parallelen und einem anti-parallelen Strang und fünf umgebenden α -Helices auf. Sie zeigt eine hohe Übereinstimmung mit den bisher gelösten Rab-Strukturen, besonders zu Rab5c (Standardabweichung 0,850 Å bei der Überlagerung der C_{α} -Atome), das wie Rab4a an der Regulation des endocytotischen Transportes beteiligt ist. Die Unterschiede in den Bereichen der Switch-Regionen, der Schleife L3, des Switch-Interface und den RabCDR-Regionen wurden bereits in Kapitel 3.5.5 analysiert. Die Struktur von Rab4-t3•GDP unterscheidet sich von den meisten bisher gelösten Strukturen kleiner GTPasen in der GDP-gebundenen Form durch das Fehlen des koordinierenden Magnesiumions. Die Seitenkette des in der GppNHp-Form an der Koordination des Magnesiumions beteiligten Ser22 ist um $\sim 100^{\circ}$ gedreht, so daß das Sauerstoffatom der OH-Gruppe in die vom Nukleotid abgewandte Richtung zeigt (vgl. Abbildung 3.38). Da Ser22 in der Elektronendichte sehr gut definiert und durch einen niedrigen B-Faktor charakterisiert ist ($12,8 \text{ \AA}^2$ gegenüber einem mittleren B-Faktor von $16,8 \text{ \AA}^2$ für das gesamte Molekül), kann davon ausgegangen werden, daß es sich nicht nur um eine alternative Konformation handelt. Die fehlenden Interaktionen zur Bindung des Phosphatparts des Nukleotids werden durch neue Wechselwirkungen ersetzt. Genannt seien die Konformationsänderungen in der Switch II-Region, die Glu68 in die Nähe des Nukleotids bringen, wodurch neue Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Seitenketten von Glu68 und Lys21 und, über ein Wassermolekül (W74), zwischen der Seitenkette von Glu68 und dem β -Phosphat möglich werden. Diese Kompensation des Verlustes der magnesiumvermittelten Koordination des Nukleotids wird auch in der magnesiumfreien Struktur von RhoA•GDP (PDB-Eintrag 1DPF) beobachtet (Shimizu *et al.*, 2000). Die Ribose und die Guaninbase werden in beiden Strukturen durch die bekannten Wechselwirkungen gebunden. Im Gegensatz zu Rab4-t3•GDP ist die Switch I-Region von RhoA durch Elektronendichte definiert, die Konformation ähnelt der von Ha-Ras im Komplex mit seinem GEF Sos (Boriack-Sjodin *et al.*, 1998). In Rab4-t3•GDP ist die Flexibilität der Switch I-Region so groß, daß keine Konformation bestimmt werden konnte. Möglicherweise stellt die magnesiumfreie Konformation die Vorstufe für den Nukleotidaustausch dar.

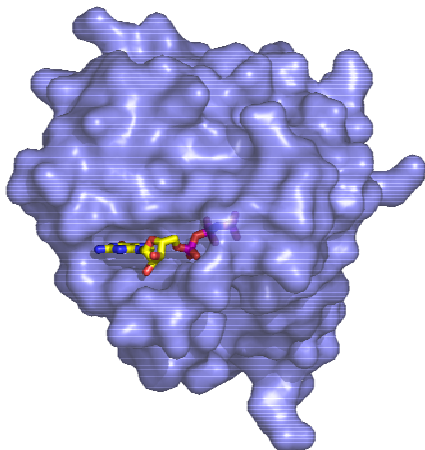
4.3 Strukturelle Determinanten der GTPase-Aktivität

In den Strukturen von Rab3a•GppNHp und Rab5c•GppNHp werden neben den bekannten charakteristischen Wechselwirkungen zwischen Protein und Nukleotid zusätzliche Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Seitenketten zweier Serinreste (Ser31 und Ser53 in Rab3a, Ser30 und Ser52 in Rab5c) und dem O1G-Atom der γ -Phosphatgruppe beobachtet. Diesen wird basierend auf den nachfolgend beschriebenen bisherigen biochemischen und strukturellen Studien eine mögliche Beteiligung an der Modulation der Hydrolyserate zugeschrieben. Biochemische Studien haben gezeigt, daß die Mutation des hochkonservierten Glutaminrestes Gln61 (Gln67 in Rab4a) in Ras die intrinsische Hydrolyserate reduziert (Der *et al.*, 1986). Diesem wird eine Beteiligung an der GTP-Hydrolyse zugeschrieben, indem er ein Wassermolekül in die optimale Position für einen S_N2 -Angriff auf die Phosphatgruppe bringt. In kristallographischen Studien von kleinen GTPasen im Komplex mit GDP-AlF₄, das den Übergangszustand der GTP-Hydrolyse simuliert, konnte gezeigt werden, daß die Seitenkette des konservierten Glutaminrestes über Wasserstoffbrückenbindungen mit einem Sauerstoffatom der γ -Phosphatgruppe und dem des potentiell nukleophilen Wassers den Übergangszustand stabilisiert. In Rab3a könnte diese Interaktion durch Ser31 behindert werden. Die Mutation der Aminosäure zu einem Glycin erhöht die intrinsische Hydrolyserate, ohne die GAP-Erkennung zu behindern (Brondyk *et al.*, 1993), während die umgekehrte Mutation von Gly12 zu Serin in Ras die intrinsische Hydrolyserate vermindert, die GAP-Erkennung blockiert und Ras in ein Onkogen umwandelt (Barbacid, 1997). Diese Beobachtungen unterstützen die These, daß Ser31 einen negativen Einfluß auf die GTPase-Aktivität besitzt. Im Gegensatz zur sterisch gehinderten Interaktion von Ser31 mit dem Sauerstoff der γ -Phosphatgruppe könnte Ser51 durch eine einfache Rotation um die C $_{\alpha}$ -C $_{\beta}$ -Bindung die Geometrie der Wasserstoffbrückenbindung in einem pentavalenten Übergangszustand positiv beeinflussen. Geringfügige Veränderungen der Konformation der flexiblen Switch I-Region könnten möglicherweise die Stereochemie dieser Interaktion weiter optimieren (Dumas *et al.*, 1999). Diese Hypothese wird durch die bisher bestimmten Hydrolyseraten von Rab3a, Rab5 und Rab7 bestätigt. Rab3a und Rab5, die an den oben diskutierten Positionen Serinreste aufweisen, besitzen vergleichbare Hydrolyseraten (Brondyk *et al.*, 1993). Rab7, das in der Switch I-Region an dieser Stelle ein Alanin aufweist, ist bei 37°C um Faktor 20 langsamer als Rab5 (Simon *et al.*, 1996). Ras weist an keiner der Positionen Serinreste auf, seine Hydrolyserate liegt zwischen der von Rab5 und Rab7. Ein weiterer Hinweis auf die Bedeutung dieser Reste für die Hydrolysegeschwindigkeit ist die

zehnfach verminderte Hydrolyserate von Rab3a, wenn Ser53 gegen ein Alanin ausgetauscht wird.

Die Hydrolyserate von Rab4a ist sehr niedrig und liegt in der gleichen Größenordnung wie die von Rab7. Rab4a besitzt an der Position in der Switch I-Region (Ser53 in Rab3a, Ser52 in Rab5c) einen Histidinrest (His39), der in der GppNHp-gebundenen Form eine vergleichbare Wasserstoffbrückenbindung mit dem O1G-Atom der γ -Phosphatgruppe eingeht, die mit 2,62 Å jedoch kürzer ist als bei Rab3a (2,98 Å) und Rab5c (2,79 Å). An der Position im P-Loop (Ser31 in Rab3a, Ser30 in Rab5c) steht ein Alanin (Ala17). Die Rigidität des P-Loops wird in Rab4a durch eine Wasserstoffbrückenbindung zwischen der Seitenkette von Thr19 und der Carbonylgruppe von Asn16 noch verstärkt. In den meisten Rab-Proteinen befindet sich an dieser Stelle ein Valin, das keine vergleichbare Wechselwirkung eingehen kann. Das Zusammenspiel dieser Faktoren ist möglicherweise für die niedrige Hydrolyserate von Rab4a verantwortlich. Der Histidinrest an Position 39 ist erheblich größer als die Serinreste Rab3a und Rab5c an den entsprechenden Positionen und könnte daher die Ausbildung des Übergangszustands behindern. Abbildung 4.1 zeigt eine Darstellung der Moleküloberflächen von Rab4-t3•GppNHp und Rab5c•GppNHp. Die Nukleotidbindungstasche ist bei Rab5c•GppNHp weiter geöffnet als bei Rab4-t3•GppNHp, wo γ - und β -Phosphatgruppe des Nukleotids vom Protein verdeckt werden. Möglicherweise wird durch His39 auch der Austritt der abgespaltenen Phosphatgruppe behindert.

A



B

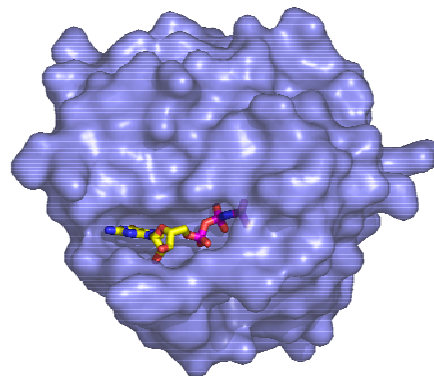


Abbildung 4.1: Vergleich der Nukleotidbindungstasche von Rab4-t3•GppNHp (A) und Rab5c•GppNHp (B)

In der Rab4-t3•GDP-Struktur geht durch den Verlust der γ -Phosphatgruppe die Interaktion der Switch I-Region mit dem Nukleotid verloren. Daraus resultiert eine erhöhte Flexibilität dieser Region, die durch das Fehlen definierter Elektronendichte belegt ist. Denkbar wäre ein schnelles Auf- und Zuklappen, wodurch trotz des fehlenden Magnesiumions die Abdissoziation des Nukleotids behindert würde. Der Alaninrest an Position 17 ist etwas kleiner als die entsprechenden Serinreste in Rab3a (Ser31) und Rab5c (Ser30) und kann keine Wasserstoffbrückenbindung zur γ -Phosphatgruppe des Nukleotids ausbilden. Aufgrund der Größe wäre die Blockierung von Gln67 weniger stark als bei einem Serin, aber nicht völlig auszuschließen.

Für die Signifikanz der Identität der Aminosäuren an den zwei diskutierten Positionen in der Switch I-Region und im P-Loop spricht auch der Vergleich der Hydrolyseraten von Ypt51p (Pro38 und Ala16) und Ypt52p (Ser34 und Ser12). Der Unterschied beträgt ungefähr Faktor 15 (Alberts & Gallwitz, 1999a; Alberts *et al.*, 1999b) und liegt damit in der gleichen Größenordnung wie beim Vergleich von Rab5c und Rab3a mit Rab7 und Rab4a, was auf eine Beteiligung des Serinrestes in der Switch I-Region an der Modulierung der Hydrolyseraten hindeutet.

4.4 Das Switch-Interface als Determinante der Effektorerkennung

Kleine GTP-bindende Proteine interagieren mit einer Vielzahl von Regulatoren und Effektoren. Dabei gibt es deutliche Unterschiede in der Spezifität der Wechselwirkungen. Rab-GEFs (Guaninnukleotid-Austausch-Faktoren) reagieren meist spezifisch mit einem Rab-Protein bzw. einer Unterfamilie. Bei den Rab-GAPs (GTPase-aktivierenden Proteinen) sind sowohl spezifische Vertreter bekannt als auch solche, die für verschiedene Rab-Proteine Austauschaktivität zeigen. Die Interaktion von Effektoren mit Rab-Proteinen erfolgt fast immer spezifisch mit nur einem Rab-Protein. Divalente Effektoren wie Rabaptin-5 interagieren zwar mit verschiedenen Rab-Proteinen, die Wechselwirkung findet jedoch über voneinander getrennte Domänen statt.

Effektoren binden nur an die aktive Form der Rab-Proteine, daher muß neben der Identität auch der Nukleotidbindungsstatus erkannt werden. Aufgrund ausführlicher Aktivitätsanalysen von H-Ras p21 Mutanten und Bindungsstudien von H-Ras p21 mit Effektorproteinen wurde zunächst die Switch I-Region, die auch als Effektorschleife bezeichnet wird, für die spezifische Interaktion mit Effektoren verantwortlich gemacht. Angesichts der hohen Sequenzidentität der Rab-Proteine in diesem Bereich stellt sich jedoch die Frage, wie Effektoren zwischen verschiedenen Rab-Proteinen unterscheiden können. Ostermeier und Brünger identifizierten in der Komplexstruktur von Rab3a mit Rabphilin-3a zwei räumlich voneinander getrennte Kontaktflächen zwischen den Proteinen (Ostermeier & Brünger, 1999). Die erste befindet sich auf Seiten von Rab3a im Bereich der Switch-Regionen, die zweite wird durch die Aminosäuren 19 bis 22 am N-Terminus, der Schleife L7 und dem C-terminalen Ende der Helix $\alpha 5$ gebildet, die zusammen eine Bindungstasche formen. Die Sequenz dieser innerhalb der Rab-Familie hypervariablen Regionen zeigt zwischen den Mitgliedern der Rab3-Unterfamilie eine deutlich höhere Übereinstimmung als zu den übrigen Rab-Proteinen, daher erhielten diese Regionen die Bezeichnung *rab complementary determining regions*. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde die Hypothese aufgestellt, daß die Erkennung des Nukleotidbindungsstatus über die Kontaktfläche an den Switch-Regionen erfolgt, während die Identität des Rab-Proteins über die RabCDR-Regionen vermittelt wird.

Merithew *et al.* stellten beim Vergleich der von ihnen gelösten Struktur von Rab5c•GppNHp mit der Struktur Rab3a•GppNHp fest, daß drei invariante Reste (Phe59, Trp76, Tyr91 in Rab3a, Phe58, Trp75, Tyr90 in Rab5c) des Interface zwischen den Switch-Regionen in den beiden Strukturen deutlich verschiedene Konformationen einnehmen, die zu einer Inkompatibilität der Oberfläche von Rab5c mit der Kontaktfläche von Rabphilin-3a führen.

Desweiteren zeigten sie beim Vergleich mit der Struktur von Rab6•GDP, daß die Seitenketten des Tryptophan- und des Tyrosinrestes weitere, von Rab3a und Rab5c verschiedene Rotamer-Konformationen einnehmen, obwohl sich die Position der Hauptkettenatome in der GDP-Form nicht nennenswert verschoben hat. Sie führen die Konformationsänderungen der invarianten Reste zwischen Rab5c und Rab3a auf nicht konservative Substitutionen im hydrophoben Inneren der Proteine zurück.

Die Konformation der invarianten Reste in Rab4-t3•GppNHp und Rab4-t3•GDP im Vergleich zu Rab3a, Rab5c und Rab6 wurden bereits in Kapitel 3.5.5.4 analysiert. Die Anordnung der Reste in der GppNHp-gebundenen Form unterscheidet sich deutlich von der GDP-gebundenen Form, gleichzeitig aber auch von den anderen Strukturen. Diese Beobachtungen sprechen für die Möglichkeit, daß über diese Aminosäuren die spezifische Effektorerkennung unterstützt werden könnte. Der Konformationswechsel erklärt auch die großen Veränderungen der intrinsischen Tryptophanfluoreszenz zwischen dem GTP- und dem GDP-Zustand von Rab-Proteinen, wie sie z.B. bei Rab5 und Ypt51 beobachtet wurden (Pan *et al.*, 1995; Esters, 2000), da sich die Umgebung des Tryptophans stark verändert.

5 Zusammenfassung und Ausblick

Das kleine GTP-bindende Protein Rab4a gehört zu der Familie der Rab-Proteine, die bei der Regulation des vesikulären Transportes eine wichtige Rolle als molekulare Schalter übernehmen. Grundlage ihrer Schalterfunktion ist ein Wechsel zwischen der aktiven, GTP-gebundenen und inaktiven, GDP-gebundenen Form, der durch Guaninnukleotid-Austauschfaktoren (GEF) und GTPase-aktivierende Proteine (GAP) moduliert wird. Die Weitergabe der durch die Rab-Proteine übermittelten Signale geschieht über die Interaktion mit spezifischen Effektoren, die an die GTP-gebundene Form der Rab-Proteine binden. Die Wechselwirkung zwischen Rab-Protein und Effektor wird durch die intrinsische bzw. GAP-vermittelte Hydrolyse des gebundenen GTP beendet. Die Rab-Proteine zeigen eine breite Varianz der intrinsischen Hydrolyseraten, die durch die hochkonservierten, an der Nukleotidbindung beteiligten Aminosäuren nicht erklärt werden kann.

Ziel dieser Arbeit war die strukturelle Charakterisierung von Rab4a in der GTP- und der GDP-Form, um zu einem besseren Verständnis der Hydrolysemodulation auf molekularer Ebene beizutragen und den Vergleich mit anderen GTP-bindenden Proteinen zu ermöglichen. Dazu wurden verschiedene C-terminal verkürzte Konstrukte von Rab4a entwickelt, um eine Behinderung der Kristallisation durch den flexiblen C-Terminus zu vermeiden. Desweiteren sollte die Wechselwirkung von Rab4a mit den Rab4-bindenden Domänen der Effektoren Rabaptin-5 und Rabaptin-5 β charakterisiert und röntgenkristallographisch untersucht werden. Dafür wurden die Proteine rekombinant in *E. coli* überexprimiert und in gereinigter Form für die Experimente verwendet.

Die Wechselwirkung der Rab4-bindenden Domänen der Effektoren mit Rab4a wurden mit einem *pull-down assay* und mittels analytischer Gelfiltration untersucht. In diesen Experimenten konnten keine Interaktionen zwischen R5a-N2 (Rabaptin-5 1-135) und den Rab4-Konstrukten nachgewiesen werden, daher wurden alle weiteren Experimente nur mit R5b-N1 (Rabaptin-5 β 1-178) durchgeführt. Die Bestimmung der Dissoziationskonstanten der Komplexe Rab4-t1•GppNHp ($K_d=2,8 \mu\text{M}$), Rab4-t2•GppNHp ($K_d=3,7 \mu\text{M}$) und Rab4-t3•GppNHp ($K_d > 40\mu\text{M}$) wies auf eine Bedeutung des C-Terminus für die Effektorbindung hin. Diese Ergebnisse wurden durch *single-turnover*-Hydrolyseexperimente bestätigt. Dabei galt: Je kürzer das Rab4-Konstrukt, desto schwächer die Inhibition der Hydrolyse durch den Effektor. Für den GTPase/Effektor-Komplex konnten keine geeigneten Kristallisationsbedingungen ermittelt werden, was wahrscheinlich auf die zu schwachen Wechselwirkungen der Proteine zurückzuführen ist.

Die Struktur von Rab4a konnte mit Hilfe des Konstruktes Rab4-t3 in der GppNHp- und der GDP-gebundenen Form in hoher Auflösung (1,6 Å für GppNHp und 1,8 Å für GDP) bestimmt werden. Die Struktur von Rab4-t3•GppNHp weist eine hohe strukturelle Übereinstimmung zu den bereits bekannten Strukturen anderer Rab-Proteine auf, wobei kleine, aber signifikante Unterschiede in den Switch-Regionen, im Bereich des hydrophoben Interface zwischen den Switch-Regionen und der Nukleotidbindungstasche nachgewiesen werden konnten. So befindet sich z.B. an Position 39 ein Histidin, welches ähnlich den Serinresten in Rab3a (Ser53) und Rab5c (Ser52) eine Wasserstoffbrückenbindung mit der γ -Phosphatgruppe eingehen kann, aufgrund seiner Größe aber wahrscheinlich die GTP-Hydrolyse behindert.

Die Struktur von Rab4-t3•GDP enthält kein koordinierendes Magnesiumion und ist damit das erste bekannte Beispiel für eine Rab-Struktur in der magnesiumfreien, GDP-gebundenen Form. Die fehlenden Interaktionen des Magnesiumions mit dem Nukleotid werden durch neue Wechselwirkungen kompensiert, die ähnlich in der Struktur der kleinen GTPase RhoA im magnesiumfreien, GDP-gebundenem Zustand beobachtet wurden.

Die aus der Strukturanalyse gewonnenen Daten könnten bei der Entwicklung von Experimenten zu Untersuchung der Hydrolyse genutzt werden, so wären beispielweise ein Austausch des His39 gegen ein Serin oder Glycin denkbar, um die Hydrolyserate zu beeinflussen. Für die strukturelle Charakterisierung des GTPase/Effektor-Komplexes ist die Entwicklung neuer Rabapin-5-Konstrukte vonnöten, um, wenn möglich, eine stärkere Interaktion mit der GTPase zu erzielen. Eventuell ließe sich auch Rabex-5, das *in vivo* im Komplex mit Rabapin-5 vorliegt, in diese Experimente miteinbeziehen.

6 Abkürzungsverzeichnis

APS	Ammoniumpersulfat
BSA	<i>bovine serum albumine</i>
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ESI-MS	Elektronenspray-Ionisations-Massenspektrometrie
GAP	<i>GTPase activating protein</i>
GDF	<i>GDP dissociation factor</i>
GDI	<i>GDP dissociation inhibitor</i>
GDP	Guanosindiphosphat
GEF	<i>guanidine nucleotide exchange factor</i>
GEP	<i>guanidine nucleotide exchange proteins</i>
GppNHp	Guanosin 5'-O-(β,γ -imidodiphosphat)
GST	Glutathion-S-Transferase
GTP	Guanosintrisphosphat
GTP γ S	Guanosin 5'-O-(3-thiotriphosphat)
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N'-(2-ethansulfonsäure)
HIC	Hydrophobe Interaktionschromatographie
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
Ni-NTA	<i>nitrilotriacetic acid charged with nickel</i> (Säulenmatrix)
NTCB	2-Nitro-5-thiobenzoessäure
PAGE	<i>polyacrylamide gel electrophoresis</i>
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RabCDR	<i>Rab complementary determining region</i>
REP	<i>Rab escort protein</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecylsulphate</i>)
SNARE	<i>soluble N-Ethylmaleimide sensitive factor attachment protein receptor</i>
TBABr	Tetrabutylammoniumbromid
Tris	Tris-(hydroxymethyl)aminomethan
TFA	<i>Trifluoroacetic acid</i>
MALDI-MS	<i>matrix assisted laser desorption ionisation mass spectrometry</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid

CHCA	α -Cyano-4-hydroxymzimtsäure
dsDNA	doppelsträngige DNA

Abkürzungen für die Aminosäuren:

Alanin	Ala	A
Arginin	Arg	R
Asparagin	Asn	N
Asparaginsäure	Asp	D
Cystein	Cys	C
Glutamin	Gln	Q
Glutaminsäure	Glu	E
Glycin	Gly	G
Histidin	His	H
Isoleucin	Ile	I
Leucin	Leu	L
Lysin	Lys	K
Methionin	Met	M
Phenylalanin	Phe	F
Prolin	Pro	P
Serin	Ser	S
Threonin	Thr	T
Tryptophan	Trp	W
Tyrosin	Tyr	Y
Valin	Val	V

7 Literaturverzeichnis

- Alberts, S. & Gallwitz, D. (1999a). Two new members of a family of Ypt/Rab GTPase activating proteins. Promiscuity of substrate recognition. *J. Biol. Chem.* **274**, 33186-33189.
- Alberts, S., Will, E. & Gallwitz, D. (1999b). Identification of the catalytic domains and their functionally critical arginine residues of the two yeast GTPase-activating proteins specific for Ypt/Rab transport GTPases. *EMBO J.* **18**, 5216-5225.
- Alexandrov, K., Horiuchi, H., Steele-Mortimer, O., Seabra, M. C. & Zerial, M. (1994). Rab escort protein-1 is a multifunctional protein that accompanies newly prenylated rab proteins to their target membranes. *EMBO J.* **13**, 5262-5273.
- Allan, B. B., Moyer, B. D. & Balch, W. E. (2000). Rab1 recruitment of p115 into a cis-SNARE complex: programming budding COPII vesicles for fusion. *Science* **289**, 444-448.
- Amor, J. C., Harrison, D. H., Kahn, R. A. & Ringe, D. (1994). Structure of the human ADP-ribosylation factor1 complexed with GDP. *Nature* **372**, 704-708.
- Andres, D. A., Seabra, M. C., Brown, M. S., Armstrong, S. A., Smeland, T. E., Cremers, F. P. M. & Goldstein, J. L. (1993). cDNA cloning of component A of Rab geranylgeranyl transferase and demonstration of its role as a Rab escort protein. *Cell* **73**, 1091-1099.
- Bacon, R. A., Salminen, A., Ruohola, H., Novick, P. & Ferro-Novick, S. (1989). The GTP-binding protein Ypt1 is required for transport in vitro: The golgi apparatus is defective in Ypt1 mutants. *J. Cell Biol.* **109**, 1015-1022.
- Bailly, E., McCaffrey, M., Touchot, N., Zahraoui, A., Goud, B., & Bornes, M. (1991). Phosphorylation of two small GTP-binding proteins of the Rab family by p34cdc2. *Nature* **350**, 715-718.
- Barbacid, M. (1997). Ras genes. *Annu. Rev. Biochem.* **56**, 779-827.
- Bielli, A., Thörnqvist, P.-O., Hendrick, A. G., Finn, R., Fitzgerald, K., & McCaffrey, M. (2001). The small GTPase Rab4a interacts with the central region of cytoplasmic dynein light intermediate chain-1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **281**, 1141-1153.
- Boguski, M. S. & McCormick, F. (1993). Proteins regulating Ras and its relatives. *Nature* **366**, 643-653.

- Boriack-Sjodin, P. A., Margarit, S. M., Bar-Sagi, D., & Kuriyan, J. (1998). The structural basis of the activation of Ras by Sos. *Nature* **394**, 337-343.
- Bourne, H. R. (1988). Do GTPases direct membrane traffic in secretion? *Cell* **53**, 669-671.
- Bourne, H. R., Sanders, D. A. & McCormick, F. (1990). The GTPase superfamily: conserved switch for diverse cellular functions. *Nature* **348**, 125-132.
- Bourne, H. R., Sanders, D. A. & McCormick, F. (1991). The GTPase superfamily: conserved structure and molecular mechanism. *Nature* **34**, 117-127.
- Brachvogel, V., Neu, M. & Metcalf, P. (1997). Rab7: Crystallization of intact and C-terminal truncated constructs complexed with GDP and GppNHp. *Proteins* **27**, 210-212.
- Bradford, 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.
- Brondyk, W. H., McKiernan, C. J., Burstein, E. S. & Macara, I. G. (1993). Mutants of Rab3a analogous to oncogenic Ras mutants. Sensitivity to Rab3A-GTPase activating protein and Rab3A-guanine nucleotide releasing factor. *J. Biol. Chem.* **268**, 9410-9415.
- Brown, M. S. & Goldstein, J. L. (1993). Protein prenylation. Mad bet for Rab. *Nature* **366**, 14-15.
- Brünger, A. T. (1992). Free R value. A novel statistical quantity for assessing the accuracy of crystal structures. *Nature* **355**, 472-475.
- Brünger, A. T., Adams, P. D., Clore, G. M., Delano, W. L., Gros, P., Grosse-Kunstleve, R. W., Jiang, J.-S., Kuszewski, J., Nilges, N., Pannu, N. S., Read, R. J., Rice, L. M., Simonson, T. & Warren, G. L. (1998). Crystallography and NMR systems (CNS): A new software system for macromolecular structure determination. *Acta Cryst. D* **54**, 905-921.
- Bucci, C., Parton, R. G., Mather, I. H., Stunnenberg, H., Simons, K., Hoflack, B. & Zerial, M. (1992). The small GTPase Rab5 functions as a regulator in the early endocytic pathway. *Cell* **70**, 715-728.
- CCP4 (1994). The CCP4 Suite -Programs for Protein Crystallography. *Acta Cryst. D* **50**, 760-763.

- Chattopadhyay, D., Langsley, G., Carson, M., Recacha, R., DeLucas, L. & Smith, C. (2000). Structure of the nucleotide-binding domain of *Plasmodium falciparum* Rab6 in the GDP-bound form. *Acta Cryst. D* **56**, 937-944.
- Chavrier, P., Gorvel, J.-P., Steltzer, E., Simons, K., Gruenberg, J. & Zerial, M. (1991). Hypervariable C-terminal domain of Rab proteins act as a targeting signal. *Nature* **353**, 769-772.
- Chavrier, P. & Goud, B. (1999). The role of Arf and Rab GTPases in the membrane transport. *Curr. Opin. Cell Biol.* **11**, 466-475.
- Chavrier, P., Vingron, M., Sander, C., Simons, K. & Zerial, M. (1990). Molecular cloning of YPT1/SEC4-related cDNAs from an epithelial cell line. *Mol. Cell. Biol.* **10**, 6578-6585.
- Chiariello, M., Bruni, C. B. & Bucci, C. (1999). The small GTPases Rab5a, Rab5b and Rab5c are differentially phosphorylated in vitro. *FEBS Letters* **453**, 20-24.
- Christoforidis, S., McBride, H. R., Burgoyne, R. D. & Zerial, M. (1999). The rab5 effector EEA1 is a core component of endosome docking. *Nature* **397**, 621-625.
- Constantinescu, A.-T., Rak, A., Alexandrov, K., Esters, H., Goody, R. S. & Scheidig, A. J. (2002). Rab-subfamily-specific regions of Ypt7p are structurally different from other RabGTPases. *Structure* **10**, 569-579.
- Coppola, T., Hirling, H., Perret-Menoud, V., Gattesco, S., Catsicas, S., Joberty, G., Macara, I. G. & Regazzi, R. (2001). Rabphilin dissociated from Rab3 promotes endocytosis through interaction with Rabaptin-5. *J. Cell Sci.* **114**, 1757-1764.
- Cormont, M., Gautier, N., Ilc, K. & Le Marchand-Brustel, Y. (2001). Expression of a prenylation-deficient Rab4 inhibits the GLUT4 translocation induced by active phosphatidylinositol 3-kinase and protein kinase B. *Biochem. J.* **356**, 143-149.
- Cuif, M. H., Possmayer, F., Zander, H., Bordes, N., Jollivet, F., Couedel-Courteille, A., Janoueix-Lerosey, I., Langsley, G., Bornes, M. & Goud, B. (1999). Characterization of GAPCenA, a GTPase activating protein for rab6, part of which associates with the centrosome. *EMBO J.* **18**, 1772-1782.
- De Renzis, S., Sönnichsen, B. & Zerial, M. (2002). Divalent Rab effectors regulate the sub-compartmental organization and sorting of early endosomes. *Nature Cell Biology* **4**, 124-133.

- DeLano, W. L. (2002) The PyMOL Molecular Graphics System. San Carlos, CA, USA
- Deneka, M., Neeft, M., Popa, I., Van Oort, M., Sprong, H., Oorschot, V., Klumperman, J., Schu, P. V. & Van der Sluijs, P. (2003). Rabaptin-5 α /rabaptin-4 serves as a linker between rab4 and γ 1-adaptin in membrane recycling from endosomes. *EMBO J.* **22**, 2645-2657.
- Der, C. J., Finkel, T. & Cooper, G. M. (1986). Biological and biochemical properties of human rasH genes. *Cell* **44**, 167-176.
- Der, C. J., Krontiris, T. G. & Cooper, G. M. (1982). Transforming genes of human bladder and lung carcinoma cell lines are homologous to the ras genes of Harvey and Kirsten sarcoma viruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**, 3637-3640.
- Dirac-Svejstrup, A. B., Sumizawa, T. & Pfeffer, S. R. (1997). Identification of a GDI displacement factor that releases endosomal Rab GTPases from Rab-GDI. *EMBO J.* **16**, 465-472.
- Donaldson, J. G. & Klausner, R. D. (1994). ARF: a key regulatory switch in membrane traffic and organelle structure. *Curr. Opin. Cell Biol.* **6**, 527-532.
- Ducruix, A. & Giegé, R. (1992). Crystallization of Nucleic Acids and Proteins.
- Dumas, J. J., Zhu, Z., Connolly, J. L. & Lambright, D. G. (1999). Structural basis of activation and GTP hydrolysis in Rab proteins. *Structure* **7**, 413-423.
- Echard, A., Jollivet, F., Martinez, O., Lacapère, J., Rousselet, A., Janoueix-Lerosey, I. & Goud, B. (1998). Interaction of a Golgi-Associated Kinesin-Like Protein with Rab6. *Science* **279**, 580-585.
- Esters, H. (2000) Vergleichende biophysikalische Untersuchungen der am vesikulären Transport beteiligten GTPasen Ypt51, Ypt1 und Rab5 sowie deren Wechselwirkungen mit Regulatoren. *Dissertation*, Münster
- Esters, H., Alexandrov, K., Constantinescu, A.-T., Goody, R. & Scheidig, A. J. (2000). High-resolution Crystal Structure of *S. cerevisiae* Ypt51(Δ C15)-GppNHp, a Small GTP-binding Protein Involved in Regulation of Endocytosis. *J. Mol. Biol.* **298**, 111-121.

- Feuerstein, J., Goody, R. S. & Webb, M. R. (1989). The mechanism of guanine nucleotide hydrolysis by p21 c-Ha: the stereochemical course of the GTPase reaction. *J. Biol. Chem.* **264**, 6188-6190.
- Fukui, K., Sasaki, T., Imazumi, K., Matura, Y., Nakanishi, H. & Takai, Y. (1997). Isolation and characterization of a GTPase activating protein specific for the Rab3 subfamily of small G proteins. *J. Biol. Chem.* **272**, 4655-4658.
- Gallwitz, D., Donath, C. & Sander, C. (1983). A yeast gene encoding a protein homologous to the human c-ha/bas proto-oncogene product. *Nature* **306**, 704-707.
- Gerez, L., Mohrmann, K., Van Raak, M., Jongeneelen, M., Zhou, X. Z., Lu, K. P. & Van der Sluijs, P. (2000). Accumulation of rab4GTP in the Cytoplasm and Association with the Peptidyl-Prolyl Isomerase Pin1 during Mitosis. *Mol. Biol. Cell* **11**, 2201-2211.
- Geyer, M. & Wittinghofer, A. (1997). GEFs, GAPs, GDIs and effectors: taking a closer (3D) look at the regulation of Ras-related GTP-binding proteins. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **7**, 786-792.
- Gideon, P., John, J., Frech, M., Lautwein, A., Clark, R., Scheffler, J. E. & Wittinghofer, A. (1992). Mutational and kinetic analyses of the GTPase-activating protein (GAP)-p21 interaction: the c-terminal domain of GAP is not sufficient for full activity. *Mol. Cell. Biol.* **12**, 2050-2056.
- Goldstein, J. L., Brown, M. S., Stradley, S. J., Reiss, Y. & Gierasch, L. M. (1991). Nonfarnesylated tetrapeptide inhibitors of protein farnesyltransferase. *J. Biol. Chem.* **266**, 15575-15578.
- Gorvel, J.-P., Charvier, P., Zerial, M. & Gruenberg, J. (1991). Rab5 controls early endosome fusion in vitro. *Cell* **64**, 915-925.
- Goud, B., Zahraoui, A., Tavitian, A. & Saraste, J. (1990). Small GTP-binding protein associated with Golgi cisternae. *Nature* **345**, 553-556.
- Gouet, P., Courcelle, E., Stuart, D. I. & Métoz, F. (1999). ESPript: analysis of multiple sequence alignments in PostScript. *Bioinformatics* **15**, 305-308.
- Gournier, H., Stenmark, H., Rybin, V., Lippé, R. & Zerial, M. (1998). Two distinct effectors of the small GTPase Rab5 cooperate in endocytic membrane fusion. *EMBO J.* **17**, 1930-1940.

- Harvey, J. J. (1964). An unidentified virus which causes the rapid production of tumours in mice. *Nature* **204**, 1104-1105.
- Haubruck, H., Disela, C., Wagner, P. & Gallwitz, D. (1987). The Ras-related Ypt protein is an ubiquitous eukaryotic protein: Isolation and sequence analysis of mouse cDNA clones highly homologous to the yeast Ypt gene. *EMBO J.* **6**, 4049-4053.
- Higgins, D. G. & Gibson, T. J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* **22**, 4673-4680.
- Hill, C. S., Wynne, J. & Treisman, R. (1995). The Rho family GTPases RhoA, Rac 1 and Cdc42Hs regulate transcriptional activation by SRF. *Cell* **81**, 1159-1170.
- Hirshberg, M., Stockley, R. W., Dodson, G. & Webb, M. R. (1997). The crystal structure of human rac1, a member of the rho-family complexed with a GTP analogue. *Nat. Struc. Biol.* **4**, 147-152.
- Horiuchi, H., Lippé, R., McBride, H. M., Rubino, M., Woodman, P., Stenmark, H., Rybin, V., Wilm, M., Ashman, K., Mann, M. & Zerial, M. (1997). A novel Rab5 GDP/GTP exchange factor complexed to Rabaptin-5 links nucleotide exchange to effector recruitment and function. *Cell* **90**, 1149-1159.
- Huang, C., Wu, T., Xu, S., Gu, W., Wang, Y., Han, Z. & Chen, Z. (1999). Novel genes expressed in hematopoietic stem/progenitor cells from myelodysplastic syndromes patient. *Swiss-Prot-Datenbank*.
- Ihara, K., Muraguchi, S., Kato, M., Shimizu, T., Shirakawa, M., Kuroda, S., Kaibuchi, K. & Hakoshima, T. (1998). Crystal structure of human RhoA in a dominantly active form complexed with GTP analogue. *J. Biol. Chem.* **273**, 9656-9666.
- Jancarik, J. & Kim, S.-H. (1991). Sparse matrix sampling: screening method for crystallization of proteins. *J. Appl. Cryst.* **24**, 409-411.
- Janoueix-Lerosey, I., Jollivet, F., Camonis, J., Marche, P. N. & Goud, B. (1995). Two-hybrid system screen with the small GTP-binding protein Rab6. Identification of a novel mouse GDP dissociation inhibitor isoform and two other potential partners of Rab6. *J. Biol. Chem.* **270**, 14801-14808.

- John, J., Schlichting, I., Schlitz, E., Rösch, P. & Wittinghofer, A. (1989). C-terminal truncation of p21H preserves crucial kinetics and structural properties. *J. Biol. Chem.* **264**, 13086-13092.
- Jones, T. A., Zou, J.-Y., Cowan, S. W. & Kjeldgaard, M. (1991). Improved Methods for Building Protein Models in Electron Density Maps and the Location of Errors in these Models. *Acta Cryst. A* **47**, 110-119.
- Kabsch, W. (1993). Automatic processing of rotation diffraction data from crystals of initially unknown symmetry and cell constants. *J. Appl. Cryst.* **26**, 795-800.
- Kabsch, W. & Sander, C. (1993). Dictionary of protein secondary structure. Pattern recognition of hydrogen bonded and geometrical features. *Biopolymers* **22**, 2577-2637.
- Kahn, R. A., Goddard, C. & Newkirk, M. (1988). Chemical and immunological characterization of the 21kDa ADP-ribosylation factor of adenylate cyclase. *J. Biol. Chem.* **263**, 8287.
- Kalab, P., Pu, R. T. & Dasso, M. (1999). The ran GTPase regulates mitotic spindle assembly. *Curr. Biol.* **9**, 481-484.
- Kikuchi, A., Sun, N., Honzatko, R. B. & Fromm, H. J. (1988). Purification and characterization of a novel GTP-binding protein with a molecular weight of 24000 from bovine brain membranes. *J. Biol. Chem.* **263**, 2897-2904.
- Kirckpatrick, D. & Solomon, F. (1994). Overexpression of yeast homologs of the mammalian checkpoint gene RCC1 suppresses the class of α -tubulin mutations that arrest with excess microtubules. *Genetics* **137**, 381-392.
- Kirsten, W. H. & Mayer, L. A. (1967). Morphologic response to a murine erythroblastosis virus. *J. Natl. Cancer. Inst.* **39**, 311-321.
- Kishida, S., Shirataki, H., Sasaki, T., Kato, M., Kaibuchi, K. & Takai, Y. (1993). Rab3a GTPase-activating Protein-inhibiting activity of Raphilin-3a, a putative Rab3a target protein. *J. Biol. Chem.* **268**, 22259-22261.
- Kjeldgaard, M. & Nyborg, J. (1992). Refined structure of elongation factor EF-Tu from *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* **223**, 721-742.

- Korobko, E. V., Kiselev, S. L. & Korobko, I. V. (2002). Multiple Rabaptin-5-like transcripts. *Gene* **292**, 191-197.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Lamzin, S. & Wilson, K. S. (1993). Automated refinement of protein models. *Acta Cryst. D* **49**, 129-149.
- Laskowski, R. A., MacArthur, M. W., Moss, D. S. & Thornton, J. M. (1993). Procheck - A Programm to Check the Stereochemical Quality of Protein Structures. *J. Appl. Cryst.* **26**, 283.
- Lazar, T., Gotte, M. & Gallwitz, D. (1997). Vesicular transport: how many Ypt/Rab-GTPases make a eukaryotic cell? *Trends Biochem. Sci.* **22**, 468-472.
- Lippé, R., Horiuchi, H., Runge, A. & Zerial, M. (2001). Expression, Purification, and Characterization of Rab5 Effector Complex, Rabaptin-5/Rabex5. *Methods Enzymol.* **329**, 132-145.
- Lippé, R., Miaczynska, M., Rybin, V., Runge, A. & Zerial, M. (2001). Functional Synergy between Rab5 Effector Rabaptin-5 and Exchange Factor Rabex-5 When Physically Associated in a Complex. *Mol. Biol. Cell* **12**, 2219-2228.
- Lupas, A. (1996). Coiled coils: new structures and new functions. *Trends Biochem. Sci.* **21**, 375-382.
- Martinez, O. & Goud, B. (1998). Rab proteins. *Biochim. Biophys. Acta* **1404**, 101-112.
- McBride, H. M., Rybin, V., Murphy, C., Giner, A., Teasdale, R. & Zerial, M. (1999). Oligomeric complexes link Rab5 effectors with NSF and drive membrane fusion via interactions between EEA1 and syntaxin 13. *Cell* **98**, 377-386.
- McCaffrey, M., Bielli, A., Cantalupo, G., Mora, S., Roberti, V., Santillo, M., Drummond, F. & Bucci, C. (2001). Rab4 affects both recycling and degradative endosomal trafficking. *FEBS Letters* **495**, 21-30.
- McLauchlan, H., Newell, J., Morrice, N., Osborne, A., Went, M. & Smythe, E. (1998). A novel role for Rab5-GDI in ligand sequestration into clathrin-coated pits. *Curr. Biol.* **8**, 34-45.

- Melchior, F. B., Paschal, B., Evans, J. & Gerace, L. (1993). Inhibition of nuclear protein import by nonhydrolysable analogues of GTP and identification of the small GTPase Ran/TC4 as an essential transport factor. *J. Cell Biol.* **123**, 1649-1659.
- Merithew, E., Hatherly, S., Dumas, J. J., Lawe, D. C., Heller-Harrison, R. & Lambright, D. G. (2001). Structural Plasticity of an Invariant Hydrophobic Triad in the Switch Regions of RabGTPases is a Determinant of Effector recognition. *J. Biol. Chem.* **276**, 13982-13988.
- Milburn, M. V., Tong, L., de Vos, A. M., Brünger, A. T., Yamaizumi, Z., Nishimura, S. & Kim, S. H. (1990). Molecular switch for signal transduction : structural differences between active and inactive forms of protooncogenic ras proteins. *Science* **247**, 939-945.
- Minden, A., Lin, A., Claret, F.-X., Abo, A. & Karin, M. (1995). Selective activation of the JNK signaling cascade and c-Jun transcriptional activity by the small GTPase Rac and Cdc42Hs. *Cell* **81**, 1147-1157.
- Moore, I., Schell, J. & Palme, K. (1995). Subclass-specific sequence motifs identified in RabGTPases. *Trends Biochem. Sci.* **20**, 10-12.
- Moore, M. S. & Blobel, G. (1993). The GTP-binding protein Ran/TC4 is required for protein import into the nucleus. *Nature* **365**, 661-663.
- Moores, S. L., Schaber, M. D., Mosser, S. D., Rands, E., O'Hara, M. B., Garsky, V. M., Marshall, M. S., Pompliano, D. L. & Gibbs, J. B. (1991). Sequence dependence of protein isoprenylation. *J. Biol. Chem.* **266**, 14603-14610.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G. & Ehrlich, H. (1992). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Biotechnology* **24**, 17-27.
- Murshudov, G. N., Vagin, A. & Dodson, E. J. (1997). Refinement of Macromolecular Structures by the Maximum-Likelihood Method. *Acta Cryst. D* **53**, 240-255.
- Nagelkerken, B., Van Anken, E., Van Raak, M., Gerez, L., Mohrmann, K., Van Uden, N., Holthuizen, J., Pelkmans, L. & Van der Sluijs, P. (2000). Rapatin4, a novel effector of the small GTPase rab4a, is recruited to perinuclear recycling vesicles. *Biochem. J.* **346**, 593-601.
- Nakamura, M., Masuda, H., Horii, J., Kuma, K., Yokoyama, N., Ohba, T., Nishitani, H., Miyata, T., Tanaka, M., & Nishimoto, T. (1998). When overexpressed, a novel centrosomal

- protein, RanBPM, causes epitopic microtubule nucleation similar to γ -tubulin. *J. Cell Biol.* **143**, 1041-1052.
- Neu, M., Brachvogel, V., Oschkinat, H., Zerial, M. & Metcalf, P. (1997). Rab7: NMR and Kinetics Analysis of Intact and C-Terminal Truncated Constructs. *Proteins* **27**, 204-209.
- Nielsen, E., Christoforidis, S., Uttenweiler-Joseph, S., Miaczynska, M., Dewitte, F., Wilm, M., Hoflack, B. & Zerial, M. (2000). Rabenosyn-5, a Novel Rab5 Effector, Is Complexed with hVPS45 and Recruited to Endosomes through a FYVE Finger Domain. *J. Cell Biol.* **151**, 601-612.
- Nielsen, E., Severin, F., Backer, J. M., Hyman, A. A. & Zerial, M. (1999). Rab5 regulates motility of early endosomes on microtubules. *Nature Cell Biology* **1**, 376-382.
- Nishimura, N., Nakamura, H., Takai, Y. & Sano, K. (1994). Molecular cloning and characterization of two rab GDI species from rat brain: brain-specific and ubiquitous types. *J. Biol. Chem.* **269**, 14191-14198.
- Novick, P. & Brennwald, P. (1993). Friends and family: The role of Rab GTPases in vesicular transport. *Cell* **75**, 597-601.
- Novick, P., Field, C. & Schekman, R. (1980). Identification of 23 complementation groups required for posttranslational events in the yeast secretory pathway. *Cell* **21**, 205-215.
- Novick, P. & Garrett, M. D. (1994). No exchange without receipt. *Nature* **369**, 18-19.
- Novick, P. & Zerial, M. (1997). The diversity of Rab proteins in vesicle transport. *Curr. Opin. Cell Biol.* **9**, 496-504.
- Ohya, T., Sasaki, T., Kato, M. & Takai, Y. (1998). Involvement of Rabphilin3 in endocytosis is through interaction with Rabaptin5. *J. Biol. Chem.* **273**, 613-617.
- Ostermeier, C. & Brünger, A. T. (1999). Structural Basis of Rab Effector Specificity: Crystal Structure of the small G Protein Rab3A Complexed with the Effector Domain of Rabphilin-3A. *Cell* **96**, 363-374.
- Pai, E. F., Kabsch, W., Krengel, U., Holmes, K. C., John, J. & Wittinghofer, A. (1989). Structure of the guanine-nucleotide-binding domain of the Ha-ras oncogene product p21 in the triphosphate conformation. *Nature* **341**, 209-214.

- Pai, E. F., Petsko, G. A., Goody, R. S., Kabsch, W. & Wittinghofer, A. (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.
- Pan, J. Y., Sanford, J. C. & Wessling-Resnick, M. (1995). Effect of guanine nucleotide binding on the intrinsic tryptophan fluorescence properties of Rab5. *J. Biol. Chem.* **270**, 24204-24208.
- Peränen, J., Rikkonen, M., Hyövenen, M. & Kääriäinen, L. (1996). T7 vectors with modified T7 lac promoter for expression of proteins in *Escherichia coli*. *Anal. Biochem.* **236**, 371-373.
- Pereira-Leal, J. & 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.
- Pfeffer, S. R. (1994). Rab GTPases: master regulators of membrane trafficking. *Curr. Opin. Cell Biol.* **6**, 522-526.
- Price, A., Seals, D. F., Wickner, W. & Ungermann, C. (2000). The docking stage of yeast vacuole fusion requires the transfer of proteins from a cis-SNARE complex to a Rab/Ypt protein. *J. Cell Biol.* **148**, 1231-1238.
- Price, A., Wickner, W. & Ungermann, C. (2000). Vacuole protein sorting (Vps) proteins needed for transport vesicle budding from the Golgi are also required for the docking step of homotypic vacuole fusion. *J. Cell Biol.* **148**, 1223-1230.
- Privè, G. G., Milburn, M. V., Tong, L., de Vos, A. M., Yamaizumi, Z., Nishimura, N. & Kim, S. H. (1992). X-ray crystal structure of transforming p21 Ras mutants suggest a transition-state stabilization mechanism for GTP hydrolysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 3649-3653.
- Ramachandran, G. N. & Sasisekharan, V. (1968). Conformation of polypeptides and proteins. *Adv. Prot. Chem.* **23**, 283-483.
- Raymond, C. K., Howaldstevenson, I., Vater, C. A. & Stevens, T. H. (1997). Morphological classification of the yeast vacuolar protein sorting mutants - evidence for a prevacuolar compartment in class-E vps mutants. *Mol. Biol. Cell* **3**, 1389-1402.

- Reiss, Y., Stradley, S. J., Gierasch, L. M., Brown, M. S. & Goldstein, J. L. (1991). Sequence requirement for peptide recognition by rat brain p21 Ras protein farnesyltransferase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 732-736.
- Ridley, A. J. & Hall, A. (1992). The small GTP-binding protein Rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors. *Cell* **70**, 389-399.
- Rossmann, M. G. (1990). The molecular replacement method. *Acta Cryst. A* **46**, 73-82.
- Rybin, V., Ullrich, O., Rubino, M., Alexandrov, K., Simon, I., Seabra, M. C., Goody, R. S. & Zerial, M. (1996). GTPase activity of Rab5 acts as a timer for endocytic membrane fusion. *Nature* **383**, 266-269.
- Sakisaka, T., Meerlo, T., Matteson, J., Plutner, H. & Balch, W. E. (2002). Rab-alpha GDI activity is regulated by a hsp90 chaperone complex. *EMBO J.* **21**, 6125-6135.
- Sali, A. & Blundell, T. L. (1993). Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. *J. Mol. Biol.* **234**, 779-815.
- Salminen, A. & Novick, P. (1987). A ras-like protein is required for a post -Golgi event in yeast secretion. *Curr. Biol.* **49**, 527-538.
- Salminen, A. & Novick, P. (2003). Ras-like protein is required for a post-golgi event in yeast secretion. *Cell* **49**, 527-538.
- Saraste, M., Sibbald, P. R. & Wittinghofer, A. (1990). The P-Loop a common motif in ATP- and GTP-binding proteins. *TIBS* **15**, 430-434.
- Scheffzek, K., Klebe, C., Fritz-Wolf, K., Kabsch, W. & Wittinghofer, A. (1995). Crystal structure of the Ras-related protein Ran in its GDP-bound form. *Nature* **374**, 378-381.
- Scheidig, A. J., Burmester, C. & Goody, R. S. (1999). The pre-hydrolysis state of p21ras in complex with GTP: New insights into the role of water molecules in the GTP hydrolysis reaction of Ras like proteins. *Structure* **7**, 1311-1324.
- Scheidig, A. J., Franken, S. M., Corrie, J. E. T., Reid, G. P., Wittinghofer, A., Pai, E. F. & Goody, R. S. (1995). X-ray crystal structure analysis of the catalytic domain of the oncogen product p21 H-Ras complexed with caged GTP and mant-GppNHp. *J. Mol. Biol.* **253**, 132-150.

Schimmöller, F., Simon, I. & Pfeffer, S. R. (1998). Rab GTPases, directors of vesicle docking. *J. Biol. Chem.* **273**, 22161-22164.

Schlichting, I., Almo, S. C., Rapp, G., Wilson, K., Petratos, K., Lentfer, A., Wittinghofer, A., Kabsch, W., Pai, E. F., Petsko, G. A. & Goody, R. S. (1990). Time-resolved X-ray crystallography study of the conformational change in Ha-ras p21 protein on GTP hydrolysis. *Nature* **345**, 309-315.

Schmitt, H. D., Wagner, P., Pfaff, E. & 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.

Schweins, T., Geyer, M., Scheffzek, K., Warshal, A., Kalbitzer, H. R. & Wittinghofer, A. (1995). Substrate-assisted catalysis as a mechanism for GTP hydrolysis of p21 Ras and other GTP-binding proteins. *Struc. Biol.* **2**, 36-44.

Seabra, M. C., Reiss, Y., Casey, P. J., Brown, M. S. & Goldstein, J. L. (1991). Protein farnesyltransferase and geranylgeranyltransferase share a common alpha subunit. *Cell* **65**, 429-434.

Seals, D. F., Eitzen, G., Margolis, N., Wickner, W. & Price, A. (2000). A Ypt/Rab effector complex containing the Sec1 homolog Vps33p is required for homotypic vacuole fusion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 9402-9407

Seeburger, P. H., Colby, W. W., Capon, D. J., Goeddel, D. V. & Levison, A. D. (1984). Biological properties of human c-Ha-ras 1 genes mutated at codon 12. *Nature* **312**, 71-77.

Segev, N., Mulholland, J. & Botstein, D. (1988). The yeast GTP binding protein Ypt1 Protein and an mammalian counterpart are associated with the secretory machinery. *Cell* **52**, 915-924.

Shimizu, T., Ihara, K., Maesaki, R., Kuroda, S., Kaibuchi, K. & Hakoshima, T. (2000). An Open Conformation of Switch I Revealed by the Crystal Structure of a Mg²⁺-free Form of RHOA Complexed with GDP. *J. Biol. Chem.* **275**, 18311-18317.

Shisheva, A., Chinni, S. R. & DeMarco, C. (1999). General role of GDP dissociation inhibitor 2 in membrane release of Rab proteins: Modulations of its functional interactions by in vitro and in vivo structural modifications. *Biochemistry* **38**, 11711-11721.

- Shisheva, A., Südhof, T. C., & Czech, M. P. (1994). Cloning, characterization, and expression of a novel GDP dissociation inhibitor isoform from skeletal muscle. *Mol. Cell. Biol.* **14**, 3459-3468.
- Simon, I., Zerial, M. & Goody, R. S. (1996). Kinetics of the interaction of Rab5 and Rab7 with nucleotides and Magnesium ions. *J. Biol. Chem.* **271**, 20470-20478.
- Simonsen, A., Gaullier, J., D'Arrigo, A. & Stenmark, H. (1999). The rab5 Effector EEA1 Interacts Directly with Syntaxin-6. *J. Biol. Chem.* **274**, 28857-28860.
- Smirnova, E. V., Kiselev, S. L. & Georgiev, G. P. (2000). Identification of a novel alternatively spliced Rabaptin-5 transcript interacting with the protein kinase MAK-V. *Dokl. Acad. Nauk* **370**, 119-121.
- Sondek, J., Lambright, D. G., Noel, J. P., Hamm, H. E. & Sigler, P. B. (1994). The GTPase mechanism of G proteins based on the 1.7 Å crystal structure of transducin α .GDP.AIF⁴⁻. *Nature* **369**, 621-628.
- Stenmark, H., Vitale, G., Ullrich, O. & Zerial, M. (1995). Rabaptin-5 is a direct effector of the small GTPase Rab5 in endocytic membrane fusion. *Cell* **83**, 423-432.
- Stroupe, C. & Brünger, A. T. (2000). Crystal Structures of a Rab Protein in its Inactive and Active Conformations. *J. Mol. Biol.* **304**, 585-598.
- Takai, Y., Sasaki, T. & Matozaki, T. (2001). Small GTP-Binding Proteins. *Physiol. Rev.* **81**, 153-208.
- Takai, Y., Sasaki, T., Shirataki, H. & Nakanishi, H. (1996). Rab3A small GTP-binding protein in Ca²⁺-dependent exocytosis. *Genes Cells* **1**, 615-632.
- TerBush, D. R. & Novick, P. (1995). Sec6, sec8, and sec15 are components of a multisubunit complex which localizes to small bud tips in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.* **130**, 299-312.
- Touchot, N., Chardin, P. & Tavittian, A. (1987). Four additional members of the ras superfamily isolated by an oligonucleotide strategy: Molecular cloning of YPT-related cDNAs from a rat brain library. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 8210-8214.

- Tucker, J., Sczakiel, G., Feuerstein, J., John, J., Goody, R. S. & Wittinghofer, A. (1986). Expression of p21 proteins in *E. coli* and stereochemistry of the nucleotide binding site. *EMBO J.* **5**, 1351-1358.
- Ullman, K. S., Powers, M. A. & Forbes, D. J. (1997). Nuclear export receptors: From Importin to Exportin. *Cell* **90**, 967-970.
- Vagin, A. & Teplyakov, A. (1997). MOLREP: An automated programm for molecular replacement. *J. Appl. Cryst.* **30**, 1022-1025.
- Valencia, A., Chardin, P., Wittinghofer, A. & Sander, C. (1991). The ras Protein family: Evolutionary Tree and Role of Conserved Amino Acids. *Biochemistry* **30**, 4637-4648.
- Valencia, A., Kjeldgaard, M., Pai, E. F. & Sander, C. (1991). GTPase domains of Ras p21 oncogen protein and elongation factor Tu: analysis fo three-dimensional structures, sequence families and functional sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 5443-5447.
- Van der Sluijs, P., Hull, M., Huber, L. A., Male, P., Goud, B. & Mellman, I. (1992). Reversible phosphorylation-dephosphorylation determines the localisation of Rab4 during the cell cycle. *EMBO J.*, 4379-4389.
- Van der Sluijs, P., Hull, M., Webster, P., Mâle, P., Goud, B. & Mellman, I. (1992). The small GTP-binding protein rab4 controls an early sorting event on the endocytic pathway. *Cell* **70**, 729-740.
- Van Raak, M., Jongeneelen, M., Zhou, X. Z., Lu, K. P. & Van der Sluijs, P. (2000). Accumulation of rab4GTP in the Cytoplasm and Association with the Peptidyl-Prolyl Isomerase Pin1 during Mitosis. *Mol. Biol. Cell* **11**, 2201-2211.
- Vitale, G., Rybin, V., Christoforidis, S., Thornqvist, P.-Ö., McCaffrey, M., Stenmark, H. & Zerial, M. (1998). Distinct Rab-binding domains mediate the interaction of Rababtin-5 with GTP-bound rab4 and rab5. *EMBO J.* **17**, 1941-1951.
- Vollmer, P. & Gallwitz, D. (1995). High expression cloning, purification and assay of Ypt-GTPase-activating proteins. *Methods Enzymol.* **257**, 118-128.
- Wada, M., Nakanishi, H., Satoh, A., Hirano, H., Obaishi, H., Matura, Y. & Takai, Y. (1997). Isolation and characterization of a GDP/GTP exchange protein specific for the Rab3 subfamily. *J. Biol. Chem.* **272**, 3875-3878.

- Walker, J. E., Saraste, M., Runswick, M. J. & Gay, N. J. (1982). Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATPase synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *EMBO J.* **1**, 945-951.
- Walworth, J. E., Brennwald, P., Kabcenell, A. K., Garrett, M. D. & Novick, P. (1992). Hydrolysis of GTP by Sec4 protein plays an important role in vesicular transport and is stimulated by a GTPase-activating protein in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **12**, 2017-2028.
- Wei, Y., Zhang, Y., Derewenda, U., Liu, X., Minor, W., Nakamoto, R. K., Somlyo, A. V., Somlyo, A. P. & Derewenda, Z. S. (1997). Crystal structure of RhoA-GDP and its functional implications. *Nat. Struct. Biol.* **4**, 699-703.
- Wickner, W. (2002). Yeast vacuoles and membrane fusion. *EMBO J.* **21**, 1241-1247.
- Wieland, F. & Harter, C. (1999). Mechanisms of vesicle formation: Insights from the COP system. *Curr. Opin. Cell Biol.* **11**, 440-446.
- Wilson, A. L., Erdman, R. A., Castellano, F. & Maltese, W. A. (1998). Prenylation of Rab8 GTPase by type I and type II geranylgeranyltransferase. *Biochem. J.* **333**, 497-504.
- Winn, M. D., Isupov, N. N., & Murshudov, G. N. (2001). Use of TLS parameters to model anisotropic displacements in macromolecular refinement. *Acta Cryst. D* **57**, 122-133.
- Woodman, P. (1998). Vesicle transport: More work for the Rabs? *Curr. Biol.* **8**, 199-201.
- Wu, J., Gage, D. A. & Watson, J. T. (1996). A Strategy to locate cysteine residues in proteins by specific chemical cleavage followed by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Anal. Biochem.* **235**, 161-174.
- Wurmser, A. E., Sato, K. & Emr, S. D. (2000). New Component of the Vacuolar Class C-Vps Complex couples Nucleotide Exchange on the Ypt7 GTPase to SNARE-dependent Docking and Fusion. *J. Cell Biol.* **151**, 551-562.
- Yang, C., Slepnev, V. I. & Goud, B. (1994). Rab proteins form in vivo complexes with two isoforms of the GDP-dissociation inhibitor protein (GDI). *J. Biol. Chem.* **269**, 31891-31899.

Zahraoui, A., Touchot, N., Chardin, P. & Tavitian, A. (1989). The Human Rab Genes Encode a Family of GTP-binding Proteins Related to Yeast YPT1 and SEC4 Products Involved in Secretion. *J. Biol. Chem.* **264**, 12394-12401.

Zerial, M. & McBride, H. M. (2001). Rab proteins as membrane organizers. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2**, 107-119.

Zerial, M. & Stenmark, H. (1993). Rab GTPases in vesicular transport. *Curr. Opin. Cell Biol.* **5**, 613-620.

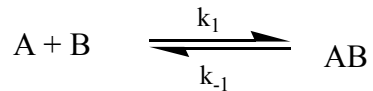
Zhong, J. M., Chen-Hwang, M. C. & Hwang, Y. W. (1995). Switching nucleotide specificity of Ha-Ras p21 by a single amino acid substitution at aspartate 119. *J. Biol. Chem.* **270**, 10002-10007.

Zhu, G., Liu, J., Terzyan, S., Zhai, P., Li, G. & Zhang, X. C. (2003). High Resolution Crystal Structures of Human Rab5a and five Mutants with Substitutions in the Catalytically Important Phosphate-binding Loop. *J. Biol. Chem.* **278**, 2452-2460.

8 Anhang

8.1 Berechnung von Dissoziationskonstanten aus Gleichgewichtstirationen

Die Bindung eines Proteins A an ein Protein B lässt sich wie folgt beschreiben:



Die Dissoziationskonstante K_d ist der Quotient aus der Dissoziationsrate k_{-1} und der Assoziationsrate k_1 . Die Dissoziationskonstante lässt sich über eine Angleichung der über Fluoreszenztitration ermittelten Bindungskurve an eine quadratische Gleichung bestimmen.

Nach der Massenerhaltung gilt:

$$\begin{aligned} [A]_0 &= [A] + [AB] \\ [B]_0 &= [B] + [AB] \end{aligned} \quad (\text{Gl. 7.1.1})$$

[A]₀: Gesamtkonzentration des Proteins A
 [A]: Konzentration an freiem Protein A
 [B]₀: Gesamtkonzentration des Protein B
 [B]: Konzentration an freiem Protein B
 [AB]: Konzentration des Protein-Komplexes

Die Gleichgewichtskonstante K_d ergibt sich zu:

$$K_d = \frac{[A] \cdot [B]}{[AB]} \quad (\text{Gl. 7.1.2})$$

Die Kombination von Massenerhaltung (Gl. 7.1.1) und Massenwirkungsgesetz (Gl. 7.1.2) liefert:

$$K_d = \frac{([A]_0 - [AB]) \cdot ([B]_0 - [AB])}{[AB]} \quad (\text{Gl. 7.1.3})$$

Durch Auflösen nach [AB] erhält man die beiden Lösungen

$$[AB] = \frac{[A]_0 + [B]_0 + K_d}{2} \pm \sqrt{\left(\frac{[A]_0 + [B]_0 + K_d}{2}\right)^2 - [A]_0 \cdot [B]_0} \quad (\text{Gl. 7.1.4})$$

von denen nur die Lösung mit dem negativem Vorzeichen vor der Wurzel physikalisch sinnvoll ist. Meßgröße ist die Veränderung der Fluoreszenzemission des fluoreszierenden Proteins A, die proportional zum Bindungsgrad $[AB]/[A]_0$ ist. Proportionalitätskonstante ist die Fluoreszenzveränderung ΔF_{\max} , die man bei Sättigung (Bindungsgrad = 1) erhält:

$$\Delta F = \Delta F_{\max} \cdot \frac{[AB]}{[A]_0} \quad (\text{Gl. 7.1.5})$$

Die gemessene Gesamtfluoreszenz F in jedem Titrationsschritt setzt sich aus der Grundfluoreszenz F_0 des freien, fluoreszierenden Proteins A und der Fluoreszenzveränderung ΔF durch Zugabe von Protein B zusammen. Kombiniert mit Gleichung 7.1.5 ergibt sich:

$$F = F_0 + (\Delta F_{\max} - F_0) \cdot \frac{[AB]}{[A]_0} \quad (\text{Gl. 7.1.6})$$

Einsetzen des Ausdruck für $[AB]$ aus Gleichung 7.1.4 liefert für die Gesamtfluoreszenz F :

$$F = F_0 + (F_{\max} - F_0) \cdot \frac{\frac{[A]_0 + [B]_0 + K_d}{2} - \sqrt{\left(\frac{[A]_0 + [B]_0 + K_d}{2}\right)^2 - [A]_0 \cdot [B]_0}}{[A]_0} \quad (\text{Gl. 7.1.7})$$

- F: Fluoreszenzintensität
- F_0 : Gesamtfluoreszenz des vorgelegten Proteins A
- ΔF_{\max} : maximale Änderung der Fluoreszenzintensität bei Sättigung
- $[A]_0$: Gesamtkonzentration des fluoreszierenden Proteins A
- $[B]_0$: Gesamtkonzentration des Proteins B
- K_d : Gleichgewichtsdissoziationskonstante

Die über Fluoreszenztitration gemessene Bindungskurve besteht aus Werten für F in Abhängigkeit von $[A]_0$ oder $[B]_0$. Mit $[A]_0$ oder $[B]_0$ als Konstante und F_0 , ΔF_{\max} und K_d als Fitparameter läßt sich durch Anpassung einer Kurve an die experimentellen Daten unter Verwendung von Gl. 7.1.7 die jeweilige Dissoziationskonstante K_d bestimmen.

8.2 Das Bragg'sche Gesetz

W. H. Bragg und W. L. Bragg entdeckten, daß die Geometrie der Diffraktion im Kristall der Reflektion von Licht an einem ebenen Spiegel vergleichbar ist.

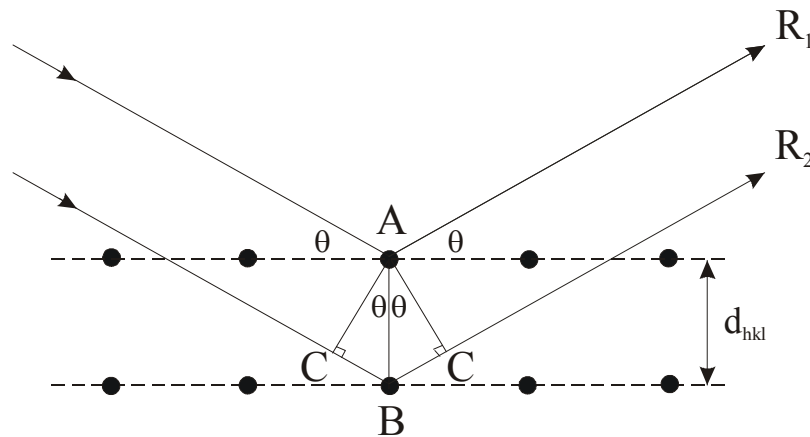


Abbildung 8.1: Geometrische Darstellung des Bragg'schen Gesetzes

Der Kristall wird als Schar paralleler Ebenen mit dem Abstand d_{hkl} betrachtet. Die Röntgenstrahlen R_1 und R_2 mit der Wellenlänge λ treffen im Winkel θ auf benachbarte Gitterebenen auf, der Winkel der reflektierten Strahlen ist ebenfalls θ . Dabei legt der Strahl R_2 die gleiche Weglänge zurück wie Strahl R_1 plus die zusätzliche Weglänge $2BC$. Wenn dieser Gangunterschied $2BC$ ein ganzzahliges Vielfaches der Wellenlänge λ der Röntgenstrahlung beträgt, sind die Strahlen R_1 und R_2 in Phase und interferieren konstruktiv, d. h. es entsteht ein Reflex:

$$2BC = n \cdot \lambda \quad (\text{Gl. 7.2.1})$$

Über eine einfache geometrische Beziehung erhält man für die Weglänge BC den folgenden Ausdruck:

$$BC = AB \cdot \sin\theta = d_{hkl} \cdot \sin\theta \quad (\text{Gl. 7.2.2})$$

Setzt man den Ausdruck für BC in Gleichung 7.2.1 ein, erhält man das Bragg'sche Gesetz:

$$2 \cdot d_{hkl} \cdot \sin\theta = n \cdot \lambda \quad (\text{Gl. 7.2.3})$$

Konstruktive Interferenz entsteht demnach nur bei bestimmten Einfallswinkeln, die das Bragg'sche Gesetz erfüllen, bei allen anderen Winkeln interferieren die reflektierten Strahlen destruktiv und es entstehen keine Reflexe.

9 Danksagung

Prof. Roger S. Goody danke ich für die Aufnahme in seine Abteilung und die Übernahme des Erstgutachtens.

Prof. Herbert Waldmann danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Bei Prof. Dr. Axel J. Scheidig bedanke herzlich ich mich für das interessante Projekt, die Betreuung und die unzähligen Erklärungen in Sachen kleine GTPasen und Kristallographie.

Dr. Marino Zerial danke ich für die Überlassung des Rab4a-Plasmids.

Sascha Gentz danke ich für die Reinigung der Nukleotide, außerdem für die Hilfe bei HPLC-Problemen jeglicher Art.

Diana Jahnert danke ich für all die Arbeit im Labor, angefangen von der perfekten Ordnung bis zur Reinigung der TEV-Protease. Danke auch für die kleinen Gesprächspausen zwischendurch, die den Alltag bereichern haben.

Meine Kollegen Tresfore und Björn danke ich für die gute Arbeitsatmosphäre, lebhafte Diskussionen und den Spaß beim Praktikum, ganz besonders aber für die Aufnahme von Datensätzen am Synchrotron.

Ich möchte auch meinen Bürokollegen Janina, Lili, Goran und Paul danken für ausgiebige Diskussionen, die nicht immer nur der Arbeit galten.

Ein besonderer Dank geht an Dr. Ruth Krebs für die Einführung in die Molekularbiologie, die Zusammenarbeit bei der Entwicklung der Rab4-Konstrukte und die Umklonierung des R5b-N1-Konstruktes. Danke auch an Martina Rottmann für die Vorarbeit mit den Plasmiden der anderen Konstrukte.

Bei Michael, Olli, Agni, Andrea, Wulf und Dr. Ingrid Vetter möchte ich mich herzlich für die zahlreichen Erklärungen, Tips und Tricks zur Datenauswertung bedanken. Danke schön auch an Wulf für die Aufnahme des vermeintlichen Komplexdatensatzes.

Ein herzliches Dankeschön an Sandra für die Erklärungen zur Fluoreszenzspektroskopie, das Korrekturlesen und die Schwimabend.

Nicht zuletzt ein großes Dankeschön an meine Eltern und Robert, die immer für mich da waren.

9.1 LEBENS LAUF

Name:		Silke Katrin Huber
Anschrift:		Egerstr. 56 44225 Dortmund Tel.: 0231-7903384
Geburtsdatum:		29. 10. 1973
Geburtsort:		Dortmund
Familienstand:		ledig
Eltern:		Jürgen K. Huber Barbara Huber, geb. Gerling
Staatsangehörigkeit:		deutsch
Ausbildung:	1980-84	Kirchhörder Grundschule, Dortmund
	1984-93	Mallinckrodt-Gymnasium, Dortmund
	06/85-12/85	Aufenthalt in Rochester, New York, USA Besuch der Elementary School
	10/93	Beginn des Studiums der Chemie an der Universität zu Köln
	04/96	Vordiplom
	10/98	Diplomprüfungen
	11/98-08/99	Diplomarbeit am Fachbereich Chemie der Universität zu Köln unter der Leitung von Prof. Dr. D. Schomburg und Dr. P. Reinemer (Bayer AG) Thema: Charakterisierung von murinem Interleukin-4
Tätigkeiten:	08/94-09/94	Arbeit als studentische Hilfskraft am Max- & Planck-Institut für molekulare Physiologie, Dortmund
	07/95-09/95	
	07/96-09/96	Arbeit als studentische Hilfskraft im Unilever Research Colworth Laboratory, England

	01/99-07/99	Arbeit bei der Bayer AG, Pharmaforschungszentrum Wuppertal (im Rahmen der Diplomarbeit)
	11/99-12/03	wissenschaftliche Mitarbeiterin am Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie, Dortmund
Promotion:	11/99-12/03	Promotion am Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie in Dortmund in der Abteilung von Prof. Dr. R. S. Goody unter der Leitung von Prof. Dr. A. J. Scheidig Thema: Kristallographische und biophysikalische Untersuchungen der kleinen GTPase Rab4a und ihres Effektors Rabaptin-5