

Aus dem Institut für Biochemie und Molekularbiologie II

der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Direktor: Univ.-Prof. Dr. Jürgen Scheller

**Anreicherung und Identifizierung von
Austauschfaktoren kleiner GTPasen und
strukturbiologische Untersuchungen eines
Nukleotid-modifizierten Rab-Proteins**

Dissertation

Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin der Medizinischen

Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Daniel Koch

2019

Als Inauguraldissertation gedruckt mit der Genehmigung
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:

Dekan/in: Univ.-Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter/in: Univ.-Prof. Dr.rer.nat. Mohammed R. Ahmadian

Zweitgutachter/in: Univ.-Prof. Dr.rer.nat. Peter Brenneisen

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden unter der Mitbetreuung von Prof. Dr. Roger S. Goody in der Zeit von März 2013 bis Dezember 2014 am Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie in Dortmund erarbeitet.

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Wiegandt D., Vieweg S., Hofmann F., **Koch D.**, Li F., Wu Y., Itzen A., Müller M.P., Goody R.S. (2015): Locking GTPases covalently in their functional states. In: *Nature communications*. 6: 7773.

Koch D., Rai A., Ali I., Bleimling N., Friese T., Brockmeyer A., Janning P., Goud B., Itzen A., Müller M.P., Goody R.S. (2016): A pull-down procedure for the identification of unknown GEFs for small GTPases. In: *Small GTPases*. 7(2): 93-106.

Zusammenfassung

Rab-Proteine gehören zur Ras-Superfamilie kleiner G-Proteine und erfüllen wichtige Funktionen in der Regulation des intrazellulären Vesikeltransportes. Zentrales mechanistisches Merkmal von G-Proteinen ist die Fähigkeit das Nukleotid GTP zu binden und zu GDP zu hydrolysieren. In Abhängigkeit des jeweiligen Nukleotidstatus weisen kleine G-Proteine eine unterschiedliche Konformation auf, welche die jeweiligen Funktionen vermittelt: GTP-gebunden können sie mit sogenannten Effektorproteinen interagieren und somit eine spezifische Funktion ausüben. Im GDP-gebundenen Zustand hingegen sind sie inaktiv. Aufgrund ihrer Fähigkeit einen aktiven oder inaktiven Zustand einzunehmen, werden kleine G-Proteine oft auch als „molekulare Schalter“ bezeichnet. Um die funktionellen Zustände räumlich und zeitlich genau zu kontrollieren sind weitere Proteine nötig: GEFs (engl. Abkürzung von *guanine nucleotide exchange factors*) und GAPs (engl. Abkürzung von *GTPase activating proteins*). Während GEFs den Austausch von GDP zu GTP und damit eine Aktivierung des G-Proteins begünstigen, stimulieren GAPs die Hydrolyse des GTPs zu GDP und damit die Inaktivierung. Um zu verstehen wie genau ein Rab-Protein seine Funktion ausübt, ist es daher notwendig, auch den Kontext seiner Regulation zu kennen. Obwohl über 60 humane Rab-Proteine bekannt sind, weiß man vergleichsweise wenig über ihre Regulation durch GEFs, da bislang nur wenige Rab-GEFs identifiziert wurden. Die Heterogenität ihrer Sequenz und Struktur erschwert zudem eine *in silico* Identifikation weiterer Rab-GEFs über die Suche nach verwandten Genen im Genom.

Um die Identifikation neuer GEFs zu erleichtern wurde in dieser Arbeit ein Protokoll für die Identifikation von GEFs kleiner G-Proteine via sogenannter *Pulldown*-Experimente angepasst und weiterentwickelt. Hierbei wurde der enzymatische Mechanismus von GEFs ausgenutzt, bei dem der intermediäre nukleotidfreie Zustand des G-Proteins stabilisiert wird. In diesem besitzen GEFs eine sehr hohe Affinität zum nukleotidfreien G-Protein, was die Anreicherung begünstigt. Der Nachweis der Anwendbarkeit des Protokolls mit dem bekannten Rab/GEF-Paar Sec4/Sec2 ist im Rahmen dieser Arbeit gelungen.

Um experimentelle Beobachtungen an G-Proteinen auf einen bestimmten Aktivitätszustand zurückführen zu können, ist *in vitro* das Verwenden nicht-hydrolysierbarer Nukleotidanaloga wie GppNHp möglich. *In vivo* können solche Analoga jedoch durch intrazelluläre Nukleotide ausgetauscht werden. Alternative Strategien zur Erstellung konstitutiv aktiver oder inaktiver G-Proteine sind oft ineffektiv oder artefaktbehaftet. Um sichere Kontrolle über den Nukleotidstatus zu erlangen, wurden in der Arbeitsgruppe von Prof. Roger Goody neuartige Nukleotidanaloga entwickelt, welche kovalent an G-Proteine gebunden werden können. Dies verhindert einen Austausch und stellt sicher, dass das Protein in einem definierten Nukleotidstatus arretiert wird. Im Rahmen dieser Arbeit wurde mittels Röntgenkristallstrukturanalyse für das Rab-Protein Ypt7 gezeigt, dass entsprechende GTP-Analoga keinen störenden Effekt die Struktur von Ypt7 ausüben.

Summary

Rab proteins belong to the ras superfamily of small GTPases and play important roles in the regulation of vesicular transport within the eukaryotic cell. The central mechanistic hallmark of all GTPases is their ability to bind the nucleotide GTP and to hydrolyze it to GDP. Dependent on the nucleotide state small GTPases can take specific conformations which serve different roles: GTP-bound small GTPases can interact with so called effector proteins and thereby actively mediate a specific function, whereas in their GDP-bound state, they are inactive. Due to their ability to cycle between an active and inactive state, small GTPases are often called „molecular switches“. In order to control their activity in a spatially and temporally exact manner, additional proteins are necessary: guanine nucleotide exchange factors (short: GEFs) and GTPase activating proteins (short: GAPs). While GEFs facilitate the exchange of GDP for GTP and thereby activate the associated GTPase, GAPs stimulate the hydrolysis of GTP to GDP and thereby inactivate the GTPase. As for any GTPase the knowledge of the regulatory context of a Rab protein is thus crucial to fully understand how it exerts its function. However, although over 60 human Rab proteins have been identified so far, comparatively little is known about the regulation of Rab proteins by their GEFs, since only few Rab-GEFs have been identified. The main reason for this is that the identification of Rab-GEFs by *in silico* approaches which search for cognate genes has been hampered by the huge diversity of structures and sequences of Rab-GEFs.

In order to facilitate the identification of new GEFs for Rab proteins this dissertation presents a protocol that has been adapted and optimized to perform specific pull-down experiments for GEFs. It exploits the enzymatic mechanism of GEFs by stabilizing an intermediate, nucleotide-free state of GTPases in which they have a very high affinity towards their GEF, favoring their enrichment in the pull-down experiments. Evidence of the protocol's applicability is given within this dissertation using the known Rab/GEF-couple Sec4/Sec2 as an example.

To correlate experimental observations of G-proteins with a defined nucleotide state *in vitro*, one can use non-hydrolyzable nucleotide analogs such as GppNHp. *In vivo*, however, these analogs are prone to be exchanged with intracellular nucleotides. Alternative strategies for creating constitutive active or inactive G-proteins are often of dubious efficiency or charged with artefacts. In order to gain definitive control over a G-protein's nucleotide state, the research group of Prof. Roger Goody has developed a new kind of nucleotide analogs which can be covalently linked to the G-protein. The covalent bond prevents nucleotide exchange and ensures a defined nucleotide state. Based on x-ray crystallographic analyses it is shown within this thesis that the modification of the small GTPase Ypt7 with the GTP variant of this new kind of nucleotides does not disturb the structure of Ypt7.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	4
Summary	5
Abkürzungsverzeichnis	9
1 Einleitung	11
1.1 Das Endomembransystem, vesikulärer Transport und deren Regulation . .	11
1.2 Rab-GTPasen	12
1.3 Pathobiochemische Relevanz	17
2 Fragestellung und Zielsetzung	19
3 Material und Methoden	23
3.1 Material	23
3.1.1 Verwendete Chemikalien	23
3.1.2 Häufig verwendete Lösungen, Nährmedien und Zusätze	25
3.1.3 Verwendete Bakterien- und Hefestämme sowie Zelllinien	26
3.1.4 Molekularbiologische Materialien	27
3.1.5 Sonstige Materialien	29
3.1.6 Instrumente	30
3.2 Molekularbiologische Methoden	32
3.2.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	32
3.2.2 Ortsspezifische Mutagenese bei Plasmid-DNA mittels modifizierter Oligonukleotide	32
3.2.3 DNA-Sequenzierung	33
3.2.4 Präparation und Reinigung von Plasmid-DNA	33
3.3 Zellbiologische Methoden	33
3.3.1 Kultivierung von HeLa-Zellen	33
3.3.2 Herstellung von HeLa-Zellysat	34
3.4 Mikrobiologische Methoden	35
3.4.1 Transformation elektro- oder hitzekompetenter <i>Escherichia coli</i> -Zellen	35
3.4.2 Kultivierung von <i>Escherichia coli</i> -Zellen und anschließend induzier- te Proteinexpression	35
3.4.3 Herstellung von <i>Escherichia coli</i> -Zellysat	36
3.4.4 Kultivierung von <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	36
3.4.5 Herstellung von <i>Saccharomyces cerevisiae</i> -Zellysat	36
3.5 Proteinbiochemische Methoden	37
3.5.1 Aufkonzentrierung und Umpuffern von Proteinlösungen	37
3.5.2 Aufreinigung von Proteinen aus <i>Escherichia coli</i> -Zellysat mittels Affinitäts- und Größenausschlusschromatographie	37
3.5.3 Proteinpräzipitation	39

3.5.4	Nukleotidaustausch bei Rab-GTPasen	39
3.5.5	Biotinylierung von Rab-GTPasen	40
3.5.6	<i>Pulldown</i> -Experimente mit biotinylierten Rab-GTPasen	40
3.5.7	Tryptischer Verdau angereicherter Proteine in Lösung	41
3.5.8	Reinigung von Peptidfragmenten für die hochauflösende Massenspektrometrie	42
3.5.9	Aufnahme von Reaktionskinetiken	42
3.6	Analytische Methoden	43
3.6.1	DNA-Konzentrationsbestimmung	43
3.6.2	Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford	43
3.6.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	44
3.6.4	Elektrospray-Ionisations Massenspektrometrie (ESI-MS)	45
3.6.5	Proteinidentifikation in komplexen Lösungen mittels hochauflösender Massenspektrometrie	46
3.6.6	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)	49
3.7	Strukturbiologische Methoden	50
3.7.1	Proteinkristallisation	50
3.7.2	Röntgenkristallstrukturanalyse	50
4	Ergebnisse	51
4.1	Teil 1: Kristallisation und Strukturbestimmung von Ypt7-aGTP	51
4.1.1	Herstellung und Kristallisation hydrolysedefizienter Ypt7-Konstrukte	51
4.1.2	Die Struktur von acryl-GTP modifiziertem Ypt7 _{Q35C,K38I,Q68L}	54
4.2	Teil 2: Weiterentwicklung und Optimierung eines <i>Pulldown</i> -Protokolls zur Anreicherung und Identifikation von Rab-GEFs	56
4.2.1	Reproduktion der initialen <i>Pulldown</i> -Experimente	56
4.2.2	Optimierung der <i>Pulldown</i> -Experimente	57
4.2.3	Proteinidentifikation mittels hochauflösender Massenspektrometrie: Identifikation von Sec2	64
4.2.4	Variation des Zugabezeitpunktes von alkalischer Phosphatase und <i>Pulldown</i> -Experiment mit Sec4:GppNHp	68
4.2.5	<i>Pulldown</i> -Experimente mit Ypt10	68
5	Diskussion und Ausblick	71
6	Anhang	75
6.1	Zur Röntgenkristallstrukturanalyse	75
6.2	Zu den <i>Pulldown</i> -Experimenten	76
6.2.1	Sec4- <i>Pulldown</i> -Experiment unter Variation des Zugabezeitpunktes von alkalischer Phosphatase	76
6.2.2	Sec4:GppNHp- <i>Pulldown</i> -Experiment	78
6.2.3	Ypt10- <i>Pulldown</i> -Experiment	79
6.2.4	Biologisches Replikat des Ypt10- <i>Pulldown</i> -Experimentes	80
6.2.5	Ypt10:GppNHp- <i>Pulldown</i> -Experiment	81
6.2.6	Biologisches Replikat des Ypt10:GppNHp- <i>Pulldown</i> -Experimentes	82
	Literaturverzeichnis	83
	Danksagung	91

Abkürzungsverzeichnis

BSA	Bovines Serumalbumin
bp	Basenpaare
CLAP	Proteaseinhibitorgemisch aus Chymostatin, Leupeptin, Antipain, Pepstatin
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>
ESI-MS	Elektronenspray Ionisations-Massenspektrometrie
g (mg, µg, ng)	Gramm (Milligramm, Mikrogramm, Nanogramm)
GAP	<i>GTPase activating protein</i>
GDI	<i>GDP dissociation inhibitor</i>
GDP	Guanosindiphosphat
GEF	<i>Guanine nucleotide exchange factor</i>
GGTase	Geranylgeranyl-Transferase
GMP	Guanosinmonophosphat
GppNHp	Guanylylimidodiphosphat
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
HeLa	Henriette Lacks
HPLC	<i>High performance liquid chromatography</i>
kDa	kilo Dalton
l (ml, µl, nl)	Liter (Milliliter, Mikroliter, Nanoliter)
LB-Medium	<i>Lysogeny broth</i> Medium
LFQ	Labelfreie Quantifizierung
M (mM, µM, nM)	Mol (Millimol, Mikromol, Nanomol)
MEM	<i>Minimum essential medium</i>
min	Minute
NTA	<i>Nitrilotriacetic acid</i>
NNBs	Nickel-Nitriloessigsäure- <i>Beads</i>
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
rsmd	<i>root-mean-square deviation of atomic positions</i>
rpm	<i>revolutions per minute</i>

s	Sekunde
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SDS-PAGE	<i>Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
SMBs	<i>Streptavidin magnetic beads</i>
U	Enzymeinheit
YPD	<i>Yeast extract peptone dextrose</i>
YPDA	<i>Yeast extract peptone dextrose agar</i>

Für Aminosäuren wurde der Dreibuchstabencode der *International Union of Biochemistry* sowie der von der *IUPAC* empfohlene Einbuchstabencode verwendet (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iupac/AminoAcid>).

1 Einleitung

1.1 Das Endomembransystem, vesikulärer Transport und deren Regulation

Eine Grundvoraussetzung für die Existenz zellulären Lebens ist die Kompartimentierung. Erst die Abgrenzung eines Raumes von der Umwelt macht eine Zelle als kleinste Einheit des Lebens identifizierbar und ermöglicht das Ablaufen chemischer Reaktionen in relativer Unabhängigkeit der zellulären Umwelt.^{1,2} Die wesentliche Abgrenzung des Zellraumes von der Umwelt wird bei allen bislang bekannten Zelltypen durch mindestens eine Zellmembran realisiert. Diese kann bei einigen Prokaryoten und Pflanzenzellen durch eine zweite Zellmembran oder eine Zellwand ergänzt werden, welche den Zellen zusätzliche osmotische Resistenz oder Stabilität verleihen können. Zellmembranen bestehen dabei aus einer ein- oder doppelschichtigen Lipidmembran welche sich hauptsächlich aus Phospholipiden zusammensetzt. Weitere häufige Komponenten sind Sphingolipide, Cholesterin und in die Membran eingelassene oder membranassoziierte Proteine.² Im Laufe der Evolution haben sich bei Eukaryoten eine Vielzahl von weiteren membranbegrenzten Organellen wie z.B. Chloroplasten, Mitochondrien, das endoplasmatische Retikulum, der Golgi-Apparat, Lysosomen und Peroxisomen entwickelt, welche vermutlich teils durch Endosymbiose (wie Chloroplasten und Mitochondrien), teils durch Genduplikation entstanden sind.³⁻⁵ Ausgehend von einem bereits existierenden Organell und der Annahme, dass die Identität eines Organells vornehmlich durch seine Membranknospungs- und Fusionsgene bestimmt wird, könnte demnach die Duplikation der entsprechenden Gene zu neuen Organellen geführt haben.⁶ Die Entwicklung weiterer subzellulärer Kompartimente ermöglicht kompartimentspezifische Reaktionsbedingungen, was die funktionelle Spezialisierung der Organellen und somit eine bessere Anpassung an Umweltbedingungen begünstigt haben mag.³ So ist etwa der im Vergleich zum Zytosol saurere pH-Wert innerhalb der Lysosomen optimal für die Funktion der lysosomalen Hydrolasen und ermöglicht somit einen effizienten Abbau der lysosomalen Substrate beispielsweise nach Phagozytose.² Mit Ausnahme des Zellkerns, der Chloroplasten und der Mitochondrien wird das System aller membranbegrenzter Zellräume als *Endomembransystem* bezeichnet.³ Die Zusammenfassung dieser Organellen zu einem System gründet sich in ihrer funktionellen Komplementarität und im membranösen und intraluminalen Stoffaustausch vermittels Transport von Membranvesikeln zwischen den Organellen. So werden für die Exozytose bestimmte Proteine wie beispielsweise Zelloberflächenrezeptoren an den Ribosomen des endoplasmatischen Retikulums synthetisiert und gefaltet, via Vesikel zum Golgi-Apparat transportiert und dort gegebenenfalls posttranslational modifiziert und anschließend über Vesikel vom Golgi-Apparat zur Zellmembran transportiert.⁷

Die Regulation des vesikulären Transportes innerhalb des eukaryotischen Endomembransystems findet durch ein ebenfalls sehr komplexes System aus Proteinen statt. Wesentliche Anforderungen an die Regulation des Endomembransystems sind etwa die Entstehung von Transportvesikeln mit selektiertem Inhalt, der gerichtete Vesikeltransport, die spezifische Erkennung der Zielmembran und die Fusion der Transportvesikel mit dieser sowie der Erhalt der Organellzusammensetzung trotz des kontinuierlichen Vesikelaustausches. Eine zentrale Gruppe von Proteinen, welche an allen genannten Prozessen beteiligt ist, sind die sogenannten *Rab-GTPasen*.⁷⁻⁹

1.2 Rab-GTPasen

Rab-GTPasen gehören zur Ras-Superfamilie kleiner G-Proteine. Ihre Bedeutung für den Vesikeltransport wurde als erstes in Studien an der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* erkannt.^{10,11} Mittlerweile ist bekannt, dass Rab-GTPasen eine evolutionär hoch konservierte Gruppe von Proteinen sind, welche vermutlich in allen Eukaryoten zu finden ist.^{12,13} Zentrales mechanistisches und namensgebendes Merkmal von G-Proteinen ist die Fähigkeit, das Nukleotid GTP zu binden und zu GDP zu hydrolysieren. In Abhängigkeit des jeweiligen Nukleotidstatus weisen kleine G-Proteine eine unterschiedliche Konformation auf, welche die jeweiligen Funktionen vermittelt: GTP-gebunden können sie mit sogenannten Effektorproteinen interagieren und somit eine spezifische Funktion ausüben. Über die koordinierte Bindung verschiedener Effektorproteine und die örtlich regulierte Aktivität verschiedener Rab-GTPasen spielen diese eine Schlüsselrolle bei der Regulation aller für den Vesikeltransport relevanten Prozesse (Vgl. Abbildung 1.1).^{9,14}

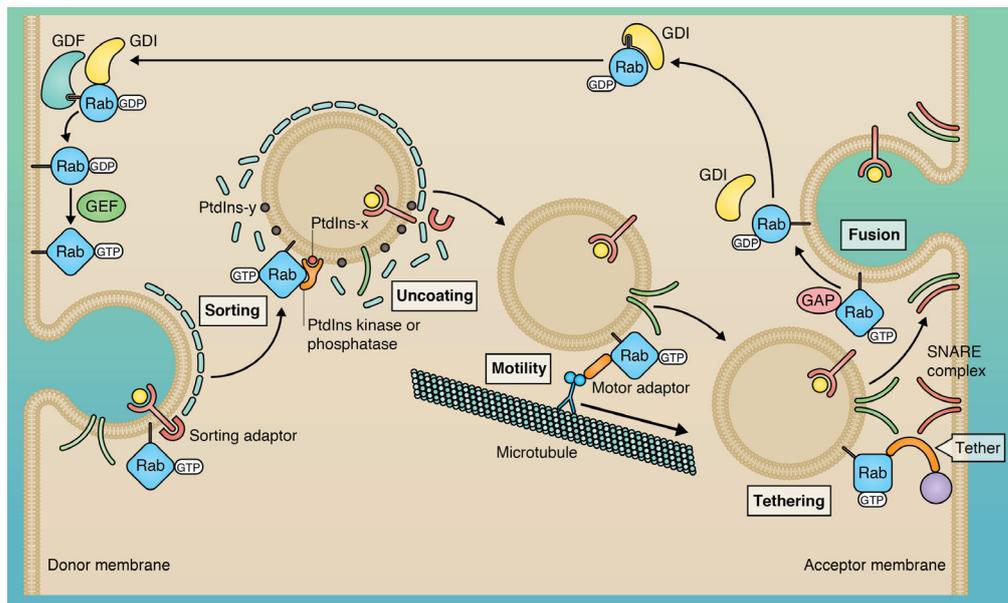


Abbildung 1.1

Regulatorische Funktionen von Rab-GTPasen innerhalb des Vesikeltransportes. Rab-GTPasen sind unter anderem beteiligt an der Entstehung von Transportvesikeln mit selektiertem Inhalt, ihrem gerichteten Transport, der spezifischen Erkennung der Zielmembran und dem Andocken an dieser, sowie der Fusion der Transportvesikel mit der Zielmembran. Beispiele für Effektorproteine, welche von Rab-GTPasen zur Erfüllung dieser Funktionen rekrutiert werden, werden z.B. in⁹ diskutiert. Abbildung nachgedruckt mit Genehmigung aus¹⁴.

Nach der Hydrolyse von GTP zu GDP gehen G-Proteine in den inaktiven Zustand über. Aufgrund ihrer Fähigkeit einen aktiven oder inaktiven Zustand einzunehmen, werden G-Proteine oft auch als „molekulare Schalter“ bezeichnet. Die Ausübung ihrer Funktion im aktiven Zustand erfolgt membrangebunden. Zur Membranbindung besitzen Rab-GTPasen einen Geranyl-geranyl Lipidanker an ihrem C-terminalen Ende.^{8,9}

Obwohl Rab-GTPasen die intrinsische Fähigkeit zur Hydrolyse von GTP zu GDP und zum Austausch von GDP gegen GTP besitzen und prinzipiell selbst zwischen den Aktivitätszuständen alternieren könnten, ist der Ablauf dieser intrinsischen Reaktionen verhältnismäßig langsam.^{15,16} Um die funktionellen Zustände zeitlich und auch räumlich genau zu kontrollieren sind daher weitere Proteine nötig: GEFs (engl. Abkürzung von

guanine nucleotide exchange factors), GAPs (engl. Abkürzung von *GTPase activating proteins*) und GDI (engl. Abkürzung von *GDP dissociation inhibitor*).¹⁷ GEFs katalysieren den Nukleotidaustausch kleiner G-Proteine indem sie über verschiedene Mechanismen die Nukleotidbindung destabilisieren (z.B. durch Induktion einer Konformationsänderung der Nukleotidbindetasche). Obwohl sich die Affinität von Rab-GTPasen zu GDP und GTP kaum unterscheidet, erfolgt mit dem Nukleotidaustausch *in vivo* üblicherweise eine Bindung von GTP, da das intrazelluläre Verhältnis von GTP zu GDP bei etwa 10:1 liegt.¹⁸ Da durch den GEF-katalysierten Nukleotidaustausch somit ein Übergang in den aktiven Zustand der GTPase erfolgt, werden GEFs als Aktivatoren kleiner GTPasen betrachtet. Obgleich unvollständig verstanden und Gegenstand aktueller Diskussionen, scheinen GEFs darüber hinaus eine zentrale Bedeutung für die korrekte intrazelluläre Membranlokalisation von Rab-GTPasen, sowie für den Erhalt der Membranzusammensetzung von Organellen zu besitzen.^{11,20–22} Für die zeitlich und räumliche korrekte Begrenzung der Aktivität von Rab-GTPasen ist die Stimulation ihrer Hydrolyseaktivität via GAPs essentiell. Dies erfolgt in vielen bekannten Beispielen über die Insertion einer Aminosäure in die Nukleotidbindetasche. Als Tandem mit einer zweiten Aminosäure stabilisiert diese den Übergangszustand der Hydrolyse und aktiviert ein Wassermolekül für den nukleophilen Angriff am γ -Phosphat des GTP.¹⁸ So besitzen GAPs mit einer TBC-Domäne einen sogenannten „Arginin-Finger“, welcher in die Nukleotidbindetasche insertiert wird und zusammen mit einem Glutamin über genannten Mechanismus die Hydrolyse von GTP zu GDP stimuliert.¹⁸ Nach der Inaktivierung der Rab-GTPase wird diese durch GDI aus der Membran extrahiert und gebunden. Durch GDI gebundene Rab-GTPasen stellen somit ein zytosolisches Reservoir zur Verfügung, aus dem die erneute Membraninsertion und Aktivierung am jeweiligen Funktionsort erfolgt.²³ Die Abfolge aus Aktivierung, Inaktivierung und GDI-Bindung kann als Aktivitätszyklus der Rab-GTPase bezeichnet werden (Vgl. Abbildung 1.2).

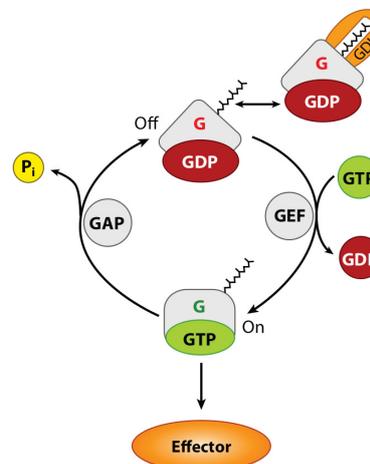


Abbildung 1.2

Aktivitätszyklus von Rab-GTPasen. Aus dem zytosolischen Reservoir GDI-gebundener Rab-GTPasen erfolgt die Membranlokalisation und Aktivierung durch GEFs. Nach Ausübung ihrer Funktion über Effektorproteine erfolgt die Inaktivierung der GTPasen über GAPs. Inaktive GTPasen werden durch GDI aus der Membran extrahiert, zytosolisch gebunden und stehen zur erneuten Lokalisation und Aktivierung zur Verfügung. Abbildung nachgedruckt mit Genehmigung aus¹⁹.

Das humane Genom enthält Gene für über 60 Rab-GTPasen.^{8,10} Abbildung 1.3 gibt einen groben Überblick über die humanen Rab-GTPasen und die durch sie regulierten Transportpfade. Mittlerweile ist bekannt, dass die einzelnen Vesikeltransportpfade, welche durch eine jeweilige Rab-GTPase reguliert werden, nicht unabhängig voneinander sind. Obwohl bislang erst teilweise experimentell bestätigt und die kinetischen Details noch Gegenstand aktueller Diskussion sind, zeichnet sich das sogenannte „Kaskadenmodell“ als ein sehr attraktives Modell zum Verständnis der Interaktion von verschiedenen Vesikeltransportpfade ab.^{9,24} Diesem Modell nach sind die Aktivitätszyklen verschiedener Rab-GTPasen, deren Transportpfade in Sequenz geschaltet sind, ebenfalls miteinander gekoppelt. Diese Kopplung besteht nach dem Kaskadenmodell darin, dass in einer Sequenz aus Rab-GTPasen die erste Rab-GTPase seinen Nachfolger aktiviert indem es dessen GEF als Effektor rekrutiert und der aktivierte Nachfolger seinen Vorgänger inaktiviert, indem es dessen GAP als Effektor rekrutiert. In einer Sequenz Rab A → Rab B → Rab C würde

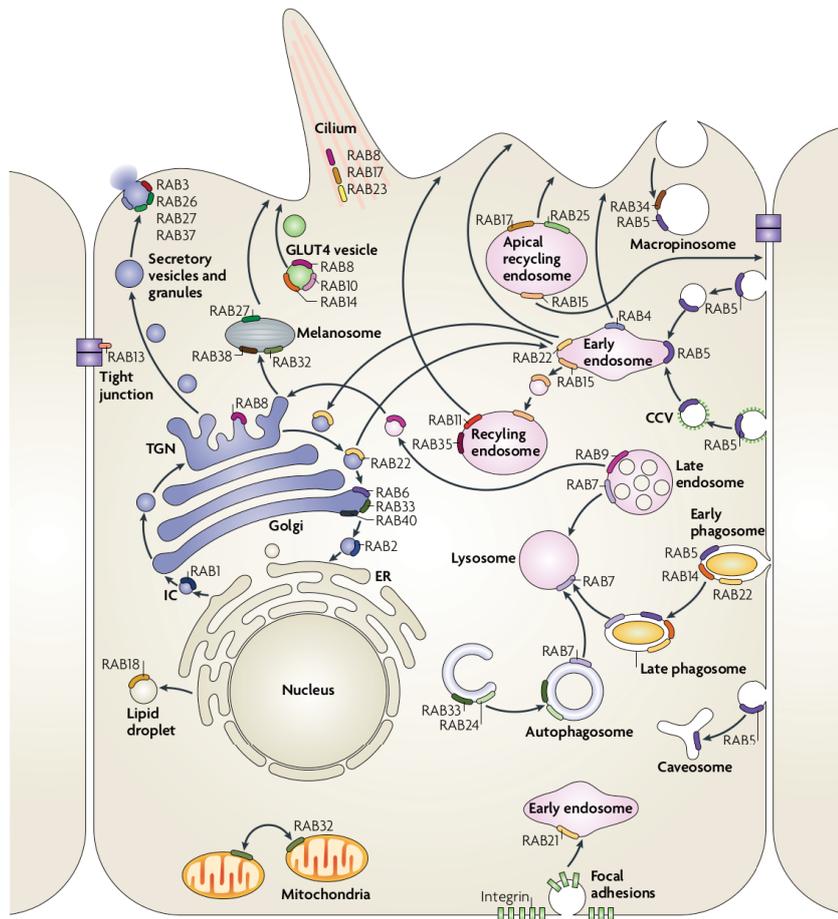


Abbildung 1.3

Überblick über die Lokalisation bekannter Rab-GTPasen und über die durch diese regulierten Transportpfade. Abbildung nachgedruckt mit Genehmigung aus⁸.

demnach Rab A das GEF-Protein von Rab B rekrutieren und damit Rab B aktivieren. Rab B würde nachfolgend Rab A durch Rekrutierung des entsprechenden GAPs inaktivieren und Rab C durch Rekrutierung des entsprechenden GEF-Proteins aktivieren. Rab C wiederum würde Rab B durch Rekrutierung des entsprechenden GAPs inaktivieren. Zwischen Aktivierung und Inaktivierung erfolgt die Ausübung der Funktion über die Rekrutierung spezifischer Effektorproteine. Beispiele für Teilkaskaden sind etwa die Rekrutierung des GEFs Sec2 als Effektor der Rab-GTPase Ypt32 zur Aktivierung der Rab-GTPase Sec4 oder die Rekrutierung des GAPs Gyp1 durch die Rab-GTPase Ypt32 zur Inaktivierung der Rab-GTPase Ypt1.^{9,24}

Obleich einige Vesikeltransportpfade im Wesentlichen unabhängig von anderen sind und andere Organisationsprinzipien der Regulation möglich sind, liegt die Attraktivität des Kaskadenmodells insbesondere darin, dass dessen Generalisierung zu einem Modell führt, in dem sequentiell verschaltete und zusammenhängende Vesikeltransportpfade regulierte Kreisläufe des intrazellulären Membrantransportes ergeben können. In welchem Umfang dieses Modell zutrifft ist aktuell Gegenstand weiterer Forschungen.

Molekulare Struktur kleiner Rab-GTPasen

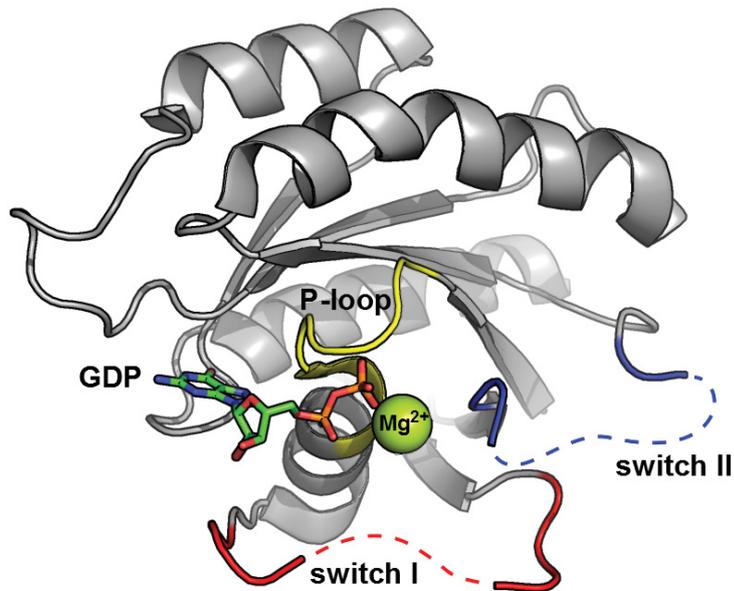
Die molekulare Struktur kleiner GTPasen der Ras-Superfamilie ist gut untersucht. Das gemeinsame strukturelle Grundmerkmal aller Vertreter dieser Gruppe ist die sogenannte *G-Domäne*, welche sich im Falle von Ras und Rab aus 6 β -Faltblättern und 5 α -Helices zusammensetzt. Die G-Domäne wiederum setzt sich aus 5 konservierten Sequenzmotiven (G1-G5) zusammen, welche an der Nukleotidbindung beteiligt sind^{19,25-27}:

- G1: Das Motiv GxxxxGKS/T* ist an der Bindung der Nukleotidphosphate beteiligt und wird daher auch *P-loop* (zu dt. P-Schleife) genannt.
- G2: Enthält lediglich ein konserviertes Threonin und ist Teil der *switch I* (zu dt. Schalter I) Region.
- G3: besteht aus dem Motiv DxxGQ und liegt am Beginn der *switch II* (zu dt. Schalter II) Region. Es ist am H₂O-vermittelten Kontakt zu einem Mg²⁺-Ion beteiligt, welches wichtig für Nukleotidbindung und Hydrolyse ist.
- G4: Das Motiv N/TKxD ist relevant für die Basenspezifität kleiner GTPasen.
- G5: Enthält ein konserviertes Alanin, welches ebenfalls für die Basenspezifität relevant ist.

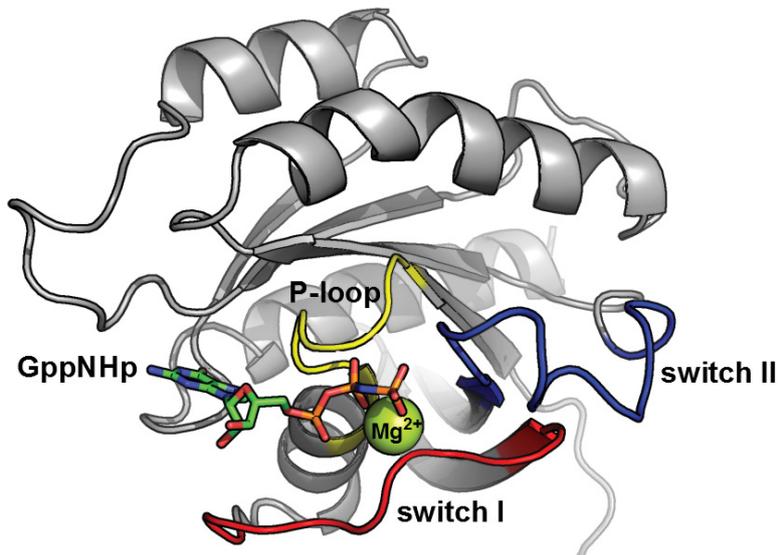
Die molekulare Struktur von Rab-GTPasen ist in Abbildung 1.4 sowohl für die inaktive als auch für aktive Konformation exemplarisch anhand der Rab-GTPase Ypt7 aus der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* dargestellt. Strukturelles Korrelat der funktionellen Zustände sind insbesondere die konformationellen Veränderungen innerhalb der *switch I* und *switch II* Regionen, welche durch Wechsel des Nukleotidstatus induziert werden. In der GDP-gebundenen, inaktiven Konformation weisen diese Regionen eine hohe Flexibilität auf, sodass hier keine geordnete Struktur zu erkennen ist (Vgl. Abbildung 1.4(a), gepunktete Linien). In der GTP-gebundenen, aktiven Konformation hingegen nehmen sie eine rigidere und geordnete Struktur ein (Vgl. Abbildung 1.4(b)). Strukturelle Untersuchungen haben gezeigt, dass in allen bislang bekannten Fällen die *switch*-Regionen ganz oder zumindest teilweise an der Effektorbindung im aktiven Zustand von kleinen GTPasen beteiligt sind, sodass das Einnehmen einer geordneten Struktur als Voraussetzung für die Effektorinteraktion erscheint.²⁵

Grundlage für den Konformationsunterschied beim Wechsel zwischen den Aktivitätszuständen ist der sogenannte *loaded-spring*-Mechanismus (zu dt. Sprungfeder-Mechanismus). Dem *loaded-spring*-Mechanismus zufolge sorgen im GTP-gebundenen Zustand Wasserstoffbrückenbindungen zwischen dem γ -Phosphat und den NH-Gruppen des konservierten G2-Threonins und des G3-Glycins für das Heranziehen von *switch I* und *switch II*, sodass *switch*-Regionen γ -Phosphat gleichsam wie durch eine Metallfeder unter „Spannung“ zusammengezogen werden. Dies induziert die Ausbildung der oben beschriebenen verhältnismäßig starren Konformation der *switch*-Regionen (Vgl. Abbildung 1.5). Durch die Hydrolyse wird das γ -Phosphat abgespalten, sodass die Anziehung durch die Wasserstoffbrückenbindungen entfällt und die *switch*-Regionen relaxieren und die für den inaktiven Zustand typische flexible Konformation einnehmen können.^{19,25}

* x bezeichnet eine beliebige Aminosäure.



(a) Konformation des inaktiven Zustandes



(b) Konformation des aktiven Zustandes

Abbildung 1.4

Struktur von Rab-GTPasen anhand des Beispiels Ypt7 aus *S. cerevisiae*. (a) zeigt die Konformation der inaktiven, mit GDP beladenen Rab-GTPase Ypt7 (PDB Zugangsnummer 1KY3). Die Regionen *switch I* und *switch II* weisen in der inaktiven Konformation eine hohe Flexibilität auf, sodass hier keine geordnete Struktur zu erkennen ist (gepunktete Linien). (b) zeigt die aktive Konformation der mit dem nicht-hydrolysierbaren GTP-Analogen GppNHp beladenen Rab-GTPase Ypt7 (PDB Zugangsnummer 1KY2). In der aktiven Konformation zeigen die Regionen *switch I* und *switch II* eine rigide und geordnete Struktur, welche Voraussetzung für die Interaktion mit Effektorproteinen ist.

1.3 Pathobiochemische Relevanz

In Anbetracht der Vielfalt der durch Rab-GTPasen regulierten Transportprozesse, welche zudem diverse intrazelluläre Signalkaskaden direkt oder indirekt beeinflussen^{10,28}, ist es nicht verwunderlich, dass Rab-GTPasen sowie deren Regulatoren und Interaktionspartner in einer großen Zahl von pathophysiologischen Prozessen involviert sind. Das Spektrum der Krankheiten, in deren Pathophysiologie Rab-GTPasen eine Rolle spielen, reicht von hereditären Erkrankungen wie dem Noonan-Syndrom oder der X-chromosomalen mentalen Retardierung, über neurodegenerative Erkrankungen wie der Alzheimer-Demenz, Infektionskrankheiten wie der Legionellose, bis hin zu Tumorerkrankungen.^{9,29} Entsprechend der Vielzahl dieser Entitäten kann das Netzwerk der Rab-GTPasen an unterschiedlichen Punkten dysreguliert werden: Mutationen oder eine Über- oder Unterexpression von Rab-GTPasen oder deren Interaktionspartnern können ebenso eine abnorme Über- wie Unteraktivität der entsprechenden Prozesse bedingen. Eine evolutionär besonders interessante Möglichkeit ist die Fehlregulation durch bakterielle Regulatoren von Rab-GTPasen des befallenen Wirtes, welche durch Eingriff in die zellulären Transportprozesse beispielsweise den lysosomalen Abbau phagozytierter Bakterien verhindern.³⁰

Die theoretischen pharmakologischen Interventionsmöglichkeiten sind ebenfalls beträchtlich: die Inhibition der Prenylierung könnte die Membranlokalisation der Rab-GTPasen verhindern, Inhibitoren von GAPs oder GEFs könnten die Aktivität der zugehörigen Rab-GTPasen je nach Anforderung steigern oder senken.²⁹ Eine weitere Möglichkeit, deren Umsetzung *in vitro* erst kürzlich gelungen ist, ist die direkte Inhibition der Interaktion von Rab-GTPasen und Effektoren.³¹ Trotz der theoretisch vielen Möglichkeiten gibt es noch sehr wenige pharmakologische Interventionswerkzeuge, sodass das therapeutische Potential der Beeinflussung von Rab-GTPasen bislang kaum nutzbar ist.

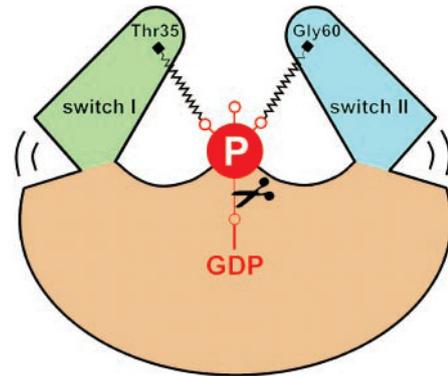


Abbildung 1.5

Darstellung des *loaded-spring*-Mechanismus. Im GTP-gebundenen Zustand sorgen Wasserstoffbrückenbindungen zum γ -Phosphat für eine rigide Konformation der *switch*-Regionen. Wird das γ -Phosphat abgespalten, entfallen die Anziehungskräfte, die *switch*-Regionen relaxieren. Abbildung nachgedruckt mit Genehmigung aus²⁵. (From "Vetter I.R. and Wittinghofer A. The guanine nucleotide-binding switch in three dimensions. *Science*, 294(5545):1299–1304, 2001." Reprinted with permission from AAAS.)

2 Fragestellung und Zielsetzung

Für das Studium der Funktion kleiner GTPasen ist es essentiell, experimentelle Beobachtungen auf einen bestimmten Aktivitätszustand zurückführen zu können. Hierzu ist *in vitro* das Verwenden nicht-hydrolysierbarer Nucleotidanaloga wie GppNHp möglich. *In vivo* können solche Analoga jedoch durch intrazellulär vorhandene Nucleotide ausgetauscht werden, sodass eine Kontrolle des Nucleotidstatus somit nicht möglich ist. Alternative Strategien zur Erstellung konstitutiv aktiver oder inaktiver kleiner GTPasen mittels ortszpezifischer Mutagenese können je nach Rab-GTPase unterschiedlich effektiv sein und sogar unerwünschterweise den gegenteiligen Effekt bewirken.³² Um sichere Kontrolle über den Nucleotidstatus zu erlangen, wurden daher in der Arbeitsgruppe von Prof. Roger Goody neuartige Nucleotidanaloga entwickelt, welche durch einen Kohlenstoff-Linker mit einer endständigen reaktiven Acrylamid-Funktion (Vgl. Abbildung 2.1) kovalent an ein mittels Mutagenese eingefügtes Cystein in der Nucleotidbindetasche kleiner GTPasen gebunden werden können. Dies verhindert einen Austausch und stellt sicher, dass das Protein in einem definierten Nucleotidstatus arretiert wird. Neben der Etablierung eines Protokolls zur Synthese dieser Nucleotidanaloga haben Vorarbeiten in dieser Arbeitsgruppe bereits gezeigt, dass diese Nucleotidanaloga nicht mit der Funktion kleiner GTPasen hinsichtlich der Interaktion mit Proteinen wie Effektoren, GDI, GAPs oder GGTasen interferiert. Ergänzend haben strukturbiologische Untersuchungen in dieser Gruppe bereits gezeigt, dass die Rab-GTPase Ypt7 durch die Modifikation mit acryl-GDP keine relevanten strukturellen Veränderungen erfährt. Ein noch ausstehendes Desiderat ist die Bestimmung der Struktur einer mit acryl-GTP modifizierten kleinen GTPase, da die Konformation GTP-gebundener kleiner GTPasen, wie eingangs erläutert, von hoher Relevanz für die Interaktion mit Effektoren ist. Ein Ziel dieser Arbeit war es daher, die Struktur einer mit acryl-GTP modifizierten kleinen GTPase zu bestimmen.

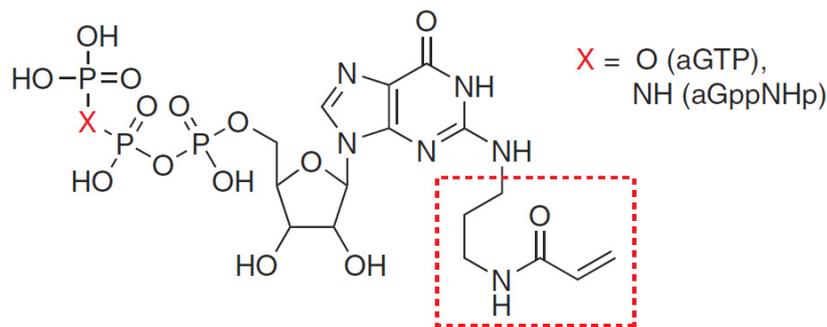


Abbildung 2.1
Strukturformel von Acrylnucleotiden. Abbildung mit Genehmigung aus³³.

Für das Verständnis der Funktion einer Rab-GTPase ist es notwendig, auch den Kontext seiner Regulation zu kennen. Obwohl über 60 humane Rab-GTPasen bekannt sind, weiß man jedoch vergleichsweise wenig über ihre Regulation durch GEFs, da bislang nur relativ wenige Rab-GEFs identifiziert worden sind (Vgl. Abbildung 2.2 und Tabelle 2.1). Die Heterogenität ihrer Sequenz und Struktur¹⁸ erschwert zudem eine *in*

silico Identifikation weiterer Rab-GEFs über die Suche nach verwandten Genen im Genom. Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es daher, ein Protokoll für die Identifikation von bislang unbekanntem Rab-GEFs zu etablieren. Ausgangspunkt hierfür stellt der Mechanismus der durch GEFs katalysierten Nukleotidaustauschreaktion dar^{18,25}:

ausgehend von einem binären Rab/Nukleotid-Komplex kommt durch Bindung des GEFs ein ternärer Rab/Nukleotid/GEF-Komplex zustande. Durch das GEF-induzierte Loslösen des Nukleotids entsteht übergangsweise ein binärer Rab/GEF-Komplex. Durch erneute Bindung eines Nukleotids kommt es wiederum zu einem ternären Komplex. Mit Ablösung des GEFs endet die Austauschreaktion und es entsteht schließlich wieder ein binärer Rab/Nukleotid-Komplex. In dieser prinzipiell auch reversiblen Reaktion stellt der nukleotidfreie Rab/GEF-Komplex den Übergangszustand dar, in welchem Rab-GTPase und GEF die größte Affinität zueinander haben. Dies lässt sich potentiell für die Entwicklung eines Protokolls zur Anreicherung von GEFs ausnutzen. Durch Verwendung von alkalischen Phosphatasen ist es möglich, Nukleotide durch Hydrolyse der Phosphatgruppen vollständig zu Nucleosiden umzuwandeln. Exponiert man immobilisierte Rab-GTPasen mit durch alkalische Phosphatase von Nucleotiden befreitem Zelllysate, bilden sich der Theorie nach daher präferentiell hochaffine Rab/GEF-Komplexe. Nach Anreicherung der GEFs und Entfernung der Phosphatasen ließen sich die GEFs durch Zugabe von Nucleotiden wie GTP spezifisch eluieren und anschließend identifizieren. Erste Versuche von Timon Friese haben zeigen können, dass dieses Anreicherungsprinzip mit bekannten, rekombinant exprimierten und aufgereinigten Einzelkomponenten sehr gut funktioniert.³⁵ Ein Ziel dieser Arbeit ist es daher einerseits, das zugrundeliegende Protokoll so weiterzuentwickeln und zu optimieren, dass sich mit ihm auch endogen exprimierte GEFs aus zellulären Lysaten anreichern lassen. Andererseits soll das Protokoll auch um die massenspektrometrische Identifikation der angereicherten Proteine und um einen kinetischen Validierungsansatz der Nucleotidaustauschaktivität der angereicherten GEFs erweitert werden.

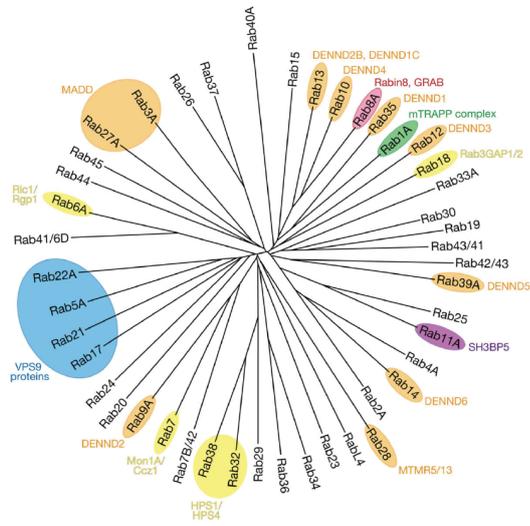


Abbildung 2.2

Grafische Darstellung des Verhältnisses der Anzahl humaner Rab-GTPasen (jeweils nur die A-Isoform) zur Anzahl bekannter GEFs. Abbildung aus³⁴.

Tabelle 2.1

 Liste humaner Rab-GEFs sortiert nach bekannten Gruppen. Tabelle modifiziert nach³⁴.

DENND-Domänen GEFs	Substrate	Referenzen
DENND1A,B	Rab35	36–38
DENND1C	Rab35, Rab13	37,39
DENND2A	Rab9	37
DENND2B	Rab9, Rab13	37,40
DENND2C,D	Rab9	37
DENND3	Rab12	37,41
DENND4A,B,C	Rab10	37
DENND5A,B	Rab39	37
DENND6A,B	Rab14	42
SBF1,SBF2	Rab28	37
MADD	Rab3, Rab27	37,43,44
DENND-ähnliche GEFs		
FLCN	Rab35	45
Vps9-Domänen GEFs		
RABGEF1 (Rabex-5)	Rab5, Rab17, Rab21	37,46–48
GAPVD1 (Gapex-5)	Rab5, Rab22B/31	49–51
RIN1,RIN2,RIN3	Rab5, Rab22B/31	52–55
RINL	Rab5, Rab21, Rab22A, Rab22B/31	56,57
ALS2, ALS2CL	Rab5, Rab22B/31	55,58–60
ANKRD27 (Varp)	Rab21	61,62
Andere GEFs		
Trapp-Komplex	Rab1 (in <i>S. cerevisiae</i> Ypt1p und Ypt31/32p)	63–65
MON1a/CCZ1 (Heterodimer)	Rab7 (in <i>S. cerevisiae</i> Ypt7p)	66,67
HPS1/HPS4 (Heterodimer)	Rab32, Rab38	67
Rab3GAP1/Rab3GAP2 (Heterodimer)	Rab18	68
RIC1/RGP1 (Heterodimer)	Rab6 (in <i>S. cerevisiae</i> Ypt6p)	69,70
Rab3IP (Homodimer)	Rab8	71
Rab3IL1 (Homodimer)	Rab8, Rab3	37,72
RPGR	Rab8	73
REI-1	Rab11	74

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Verwendete Chemikalien

Die folgende Tabelle gibt die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien samt Hersteller/Lieferanten an.

Tabelle 3.1
Chemikalien

Hersteller/Lieferant	Substanz
AppliChem, Darmstadt, Deutschland	Acrylamide 4K-Solution (30%, Mix 37.5 : 1), Isopropyl- β -D-thiogalaktopyranosid (IPTG), Salzsäure (HCl) 25 %, Silbernitrat
Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland	Formaldehyd 37%, 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES), Lithiumchlorid (LiCl), Tetramethylethyldiamin (TEMED), Trifluoressigsäure (TFA), Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris)
Difco Voigt Global Distribution Inc., Lawrence, USA	Bacto-Agar, Bacto-Trypton, Hefeextrakt
GERBU Biotechnik GmbH, Heidelberg, Deutschland	Dithioerythritol (DTE), Dithio-D,L-Threitol (DTT), Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA), Natriumlaurylsulfat (SDS)
Jena Bioscience, Jena, Deutschland	2'-O-(N-methyl-anthraniloyl)-desoxyguanosin- 5'-diphosphat (mant-dGDP)

Kapitel 3. Material und Methoden

Hersteller/Lieferant	Substanz
J.T. Baker/Mallinckrodt Baker B.V., Deventer, Niederlande	Ameisensäure, Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4), Magnesiumchlorid (MgCl_2), Natronlauge 2M (NaOH), Salzsäure 1M, Harnstoff
LGC Promochem, Wesel, Deutschland	Acetonitril (AcN)
Merck, Darmstadt, Deutschland	Imidazol
MP Biomedicals, Illkirch, Frankreich	Natriumdihydrogenphosphat (NaH_2PO_4)
Serva, Feinbiochemica GmbH & Co., Heidelberg, Deutschland	Ammoniumperoxodisulfat (APS), Coomassie Brilliant Blue R 250, Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF), β -Mercaptoethanol
Fluka/Sigma Aldrich, München, Deutschland	Aceton, Acetonitril (HPLC-grade), Guanosin-5'-monophosphat (GMP), Guanosin-5'-diphosphat (GDP), Guanosin-5'-triphosphat (GTP), Guanosin-5'-(β, γ -imido)-triphosphat (GppNHp), Natriumchlorid (NaCl), Natriumdesoxycholat, Trichloressigsäure (TCA), Tris-(2-Carboxyethyl)-phosphin (TCEP)
Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA	Coomassie Protein Assay Reagenz, Ethanol absolut, EZ-Link® Maleimide-PEG ₂ -Biotin
VWR International, Radnor, USA	Methanol

3.1.2 Häufig verwendete Lösungen, Nährmedien und Zusätze

Die folgende Tabelle listet einige sehr häufig verwendete Lösungen, Puffer und Nährmedien samt Zusätze auf. Selbstangesezte Lösungen wurden sämtlich mit ddH₂O angesetzt.

Tabelle 3.2
Häufig verwendete Lösungen und Nährmedien

Lösung/Medium	Zusammensetzung/Hersteller
SDS-Sammelgelpuffer	0.5 M Tris pH 6.8, 0.4% (w/v) SDS
SDS-Trenngelpuffer	1.5 M Tris pH 8.8, 0.4% (w/v) SDS
SDS-Laufpuffer	25 mM Tris, 190 mM Glycin, 0.1% (w/v) SDS
SDS-Färbelösung	44% (v/v) Ethanol, 12% (v/v) Essigsäure, 0.15% (w/v) Coomassie Brilliant Blue R 250
SDS-Probenpuffer (2x)	100 mM Tris pH 6.8, 4% (w/v) SDS, 20% (v/v) Glycerol, 0.2% Bromphenolblau, 5% (v/v) β -Mercaptoethanol
PBS 20x	2.74 M NaCl, 54 mM KCl, 200 mM Na ₂ HPO ₄ , 35 mM KH ₂ PO ₄ , pH 7.0
LB-Flüssigmedium	10 g/l Bacto-Trypton, 10 g/l NaCl, 5 g/l Hefeextrakt, pH 7.2
LB-Festagarplatten	10 g/l Bacto-Trypton, 10 g/l NaCl, 5 g/l Hefeextrakt, 16 g/l Bacto-Agar, pH 7.2
SOC-Flüssigmedium	20 g/l Bacto-Trypton, 0.5 g/l NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM MgCl ₂ , 20 mM Glucose, pH 7.0
MEM-Medium mit nicht-essentiellen Aminosäuren (100x), Fetales Kälberserum (FCS), L-Glutamin 200 mM	Pan Biotech, Aidenbach, Deutschland

3.1.3 Verwendete Bakterien- und Hefestämme sowie Zelllinien

Im Folgenden werden die in dieser Arbeit verwendeten Bakterien- und Hefestämme sowie eukaryotische Zelllinien aufgelistet.

Tabelle 3.3
Bakterien-/Hefestämme und Zelllinien

Stamm/Linie	Genotyp/Spezifikationen	Hersteller/Lieferant
<i>E. Coli</i> BL21 (DE3)	B F- <i>ompT hsdS</i> (rB- mB-) <i>dcm+</i> Tet ^r <i>gal</i> λ(DE3)	Merck, Darmstadt, Deutschland
<i>E. Coli</i> BL21-CodonPlus (DE3)-RIL	B F- <i>ompT hsdS</i> (rB- mB-)) <i>dcm+</i> Tet ^r <i>gal</i> λ(DE3) <i>endA</i> Hte [<i>argU ileY leuW</i> (Cam ^r)]	Stratagene/Agilent, Wald- bronn, Deutschland
<i>E. Coli</i> OmniMAX™2 T1 Phage-Resistant Chemically Competent Cells	F' { <i>proAB lacI^q lacZ</i> ΔM15 <i>Tn10</i> (Tet ^r) Δ(<i>ccdAB</i>)} <i>mcrA</i> Δ(<i>mrr hsdRMS-</i> <i>mcrBC</i>) Φ 80(<i>lacZ</i>)ΔM15 Δ4(<i>lacZYA-argF</i>)U169 <i>endA1 recA1 supE44 thi-1</i> <i>gyrA96 relA1 tonA pand</i>	Invitrogen life technologies, Carlsbad, USA
<i>S. cerevisiae</i> Wildtyp Stamm BJ5459	MATa <i>ura3-52 trp1</i> <i>lys2-801 leu2-delta1</i> <i>his3-delta200 pep4::HIS3</i> <i>prb1-delta1.6R can1 GAL</i>	ATCC, Manassas, USA
<i>HeLa</i> (ATCC® CCL2™)	Ursprung: humanes Cervix- Adenocarcinom, adhären- t wachsend, enthalten HPV- 18 DNA-Sequenzen	ATCC, Manassas, USA

3.1.4 Molekularbiologische Materialien

Plasmide

Die folgende Tabelle gibt einen Überblick über die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide.

Tabelle 3.4
Plasmide

Kodiertes Protein	Konstrukt	Ursprung
Ypt7 ₁₋₁₈₂ Q35C Q68L	3692 pET19 mod Ypt7 1-182 Q35C Q68L	AG Goody, MPI Dortmund
Ypt7 ₁₋₁₈₂ Q35C K38I Q68L	3705 pET19 mod Ypt7 1-182 Q35C K38I Q68L	diese Arbeit
Ypt7 ₁₋₁₈₂ Q35C A39S Q68L	3712 pET19 mod Ypt7 1-182 Q35C A39S Q68L	diese Arbeit
Ypt7 ₁₋₁₈₂ Q35C K38I A39S Q68L	3704 pET19 mod Ypt7 1-182 Q35C K38I A39S Q68L	diese Arbeit
Rab1b L125C	2662 pMAL Rab1b L125C	AG Goody, MPI Dortmund
Sec4 CVIL	2989 Sec4 CVIL	AG Goody, MPI Dortmund
Rab7	1325	AG Goody, MPI Dortmund
Ypt10 _{fl}	3835 pOPIN Ypt10 _{fl}	DPF, MPI Dortmund

Kits

Im Folgenden werden die in dieser Arbeit verwendeten molekularbiologischen Kits aufgelistet.

Tabelle 3.5
molekularbiologische Kits

Kit	Hersteller
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
QuikChange II XL Site-directed Mutagenesis Kit	Stratagene/Agilent, Waldbronn, Deutschland
BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit	Life Technologies, Darmstadt, Deutschland

Enzyme & Größenstandarts

Im Folgenden werden die in dieser Arbeit verwendeten Enzyme und Größenstandarts aufgelistet.

Tabelle 3.6
Enzyme und Größenstandarts

Substanz	Hersteller
Alkalische Phosphatase (aus Kälberdarm)	Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland
Albumin Standard (Bovines Serumalbumin)	Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA
<i>Low Molecular Weight</i> Größenstandard für SDS-Gelelektrophorese	GE Healthcare, München, Deutschland
PreScission Protease, TEV-Protease	Dortmund Protein Facility, Max Planck Institut für Molekulare Physiologie, Dortmund, Deutschland
Phusion [®] High-Fidelity PCR Master Mix	Finnzymes, Vantaa, Finnland
Trypsin/EDTA für Zellkultur	Pan Biotech, Aidenbach, Deutschland
Trypsin aus porzinem Pankreas, geeignet für Proteomics	Sigma Aldrich, München, Deutschland

3.1.5 Sonstige Materialien

Die sonstigen, in dieser Arbeit verwendeten Materialien sind in der folgenden Tabelle aufgelistet.

Tabelle 3.7
Sonstige Materialien

Material	Hersteller
Amicon Ultra Zentrifugalkonzentratoren (MWCO 10 kDa)	Millipore, Schwalbach, Deutschland
Bottle-top Filter	Nalgene Labware, Roskilde, Dänemark
Elektroporationsküvetten 2mm	PeqLab Biotechnology, Erlangen, Deutschland
Empore™2215-C18 Solid Phase Extraction Disc	3M, Eagan, USA
Kristallisationsplatten V-shape 96 wells	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
Kristallisationsplatten Corning Next Generation CrystalEX Microplates 3350	Corning, New York, USA
Kristallisationsplatten Corning 96 well protein crystallization plates	Sigma Aldrich, München, Deutschland
Kristallisationsplatten SuperClear Pregreased 24 Well Plates	Crystalgen, Commack, USA
NAP-5 Gelfiltrationssäulen	GE Healthcare, München, Deutschland
Reaktionsgefäße mit 0.5/1.5/2 ml Volumen	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pipettenspitzen 1-10/20-200/100-1000 µl	nerbe plus GmbH, Winsen/Luhe, Deutschland
P-81 Filterpapier	Whatman International, Kent, UK
Kunststoffküvetten, Schraubröhren 15/50 ml, sterile Plastikpipetten	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Zellkulturflaschen 75/175 cm ² µl	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA

3.1.6 Instrumente

Die folgende Tabelle gibt die in dieser Arbeit verwendeten Instrumente an.

Tabelle 3.8
Instrumente

Instrumente	Hersteller
Allegra X15-R Zentrifuge, Avanti J-20 XP Zentrifuge (Rotor JLA 8.1000 und JA 25.50), DU 650 Spektrophotometer, Optima L-70K Ultrazentrifuge (Rotor Ti-45), Zellzähler Vi-Cell XR	Beckman Coulter, Brea, USA
HPLC-System bestehend aus Waters 600S Controller, Waters 626 Pumpe, Waters 717plus Autosampler und Waters 2487 Dual λ Absorbance Detector	Waters Corporation, Milford, USA
Pipetten 2.5/20/200/1000 μ l, Thermomixer comfort, Tischzentrifugen Eppendorf 5415 C und D	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
ÄKTAprime plus FPLC-Anlage, Hi-Load Superdex 75/200, 16/60 und 26/60 prep grade Säulen	GE Healthcare, München, Deutschland
Brutschrank ED 115	Binder, Tuttlingen, Deutschland
Brutschrank NuAire Autoflow-Inkubator	NuAire, Plymouth, USA
HT Minitron und HT Multitron Schüttelinkubatoren	Infors AG, Bottmingen, Schweiz
PowerPac Basic Spannungsquelle, MicroPulser, SDS-Laufkammer Mini-Protean-3 System, MJ Research PCR-cycler PTC-200	BioRad Laboratories, München, Deutschland
Rock Imager 1000	Formulatrix, Waltham, USA
MICROSTAR Röntgenquelle	Bruker AXS, Madison, USA
MicroMax TM -007 HF Röntgenquelle	Rigaku, Texas, USA

Kapitel 3. Material und Methoden

Instrumente	Hersteller
Mosquito [®] liquid handling Kristallisationsroboter	TTP LabTech, Melbourn, UK
96-Kanal Pipettierer Liquidator96	Steinbrenner Laborsysteme, Wiesenbach, Deutschland
Mar345 Image Plate Detektor	Marresearch, Norderstedt, Deutschland
Microfluidizer M-100S	Microfluidics, Newton, USA
French [®] Press Laboratory Press	Thermo IEC, Needham, USA
pH-Meter 761 Calimatic	Knick Elektronische Messgeräte, Berlin, Deutschland
NanoDrop ND-1000 Spektrophotometer	PeqLab Biotechnology, Erlangen, Deutschland
Pipettierroboter QIAcube	Qiagen, Hilden, Deutschland
HPLC-Pumpe System 525	Bio-Tek Kontron Instruments, Neufahrn, Deutschland
UV-visible Detektor SPD-6AV, C-R6a Chromatopac Schreiber	Latek Labortechnik-Geräte, Heidelberg, Deutschland
Präzisionswaage Kern 572	Kern & Sohn, Balingen, Deutschland
Analysenwaage AM100	Mettler Toledo, Giessen, Deutschland
Agilent 1100 Series HPLC System	Agilent Technologies, Santa Clara, USA
Finnigan LCQ Advantage Max Massenspektrometer	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Geräte für die hochauflösende Massenspektrometrie	Vgl. 3.6.5
Mikroskop Leica DM-IRB	Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland
FluoroMax-3 Fluoreszenzspektrometer	Horiba Jobin Yvon, Edison, USA
SpeedVac Plus SC110A	Savant, Holbrook, USA

3.2 Molekularbiologische Methoden

3.2.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Zur Amplifikation von DNA wurde die Polymerase-Kettenreaktion (engl.: *polymerase chain reaction*, PCR) eingesetzt. Hierbei bedient man sich *in vitro* des Prinzips des zellulären DNA-Syntheseapparates, indem die zu vervielfältigende DNA (das Templat) von einer rekombinant hergestellten DNA-Polymerase durch wiederholte Synthesesyklen bis zur gewünschten Menge vervielfältigt wurde. Die Synthesesyklen setzen sich aus drei Phasen zusammen, die zu Beginn eines jeden Zyklus in der selben Reihenfolge wiederholt durchlaufen werden.

In der ersten Phase wird das Templat durch Erhitzung denaturiert, sodass die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Basen aufgelöst und damit der Doppelstrang der DNA getrennt wird. In der zweiten Phase, dem *Annealing* (zu dt. Abkühlung), wird die Reaktionslösung soweit abgekühlt, dass sequenzspezifische Oligonukleotide (engl. *Primer*), welche die Polymerase zur Initiierung der Synthese benötigt, mit den komplementären Nukleotidsequenzen des zu replizierenden Strang des Templates hybridisieren können. In der letzten Phase, der Elongationsphase, wird die Temperatur auf das Reaktionsoptimum der Polymerase erhöht. Diese katalysiert sodann die Vervielfältigung des Templates durch das beim 3'-OH-Ende des Oligonukleotids beginnende serielle kovalente Aneinanderknüpfen der zum Templat komplementären Desoxynucleosidtriphosphate.

Die folgenden Angaben beschreiben die verwendeten Reagenzien und das Reaktionsprogramm für die PCR.

Tabelle 3.9
PCR

Reagenzien und Reaktionsprogramm		
In ein PCR-Reaktionsgefäß:		
20 ng Templat je 1 μ M komplementäre Oligonukleotide		
25 μ l 2x Phusion High-Fidelity Mastermix		
zu 50 μ l ddH ₂ O		
30 s	98°C	
10 s	98°C	
30 s	50-65°C	(30x)
30 s / 1000 bp	72°C	
10 min	72°C	
∞	4°C	

Abweichungen von den hiesigen Angaben bei speziellen Anwendungen und Varianten der PCR werden in den jeweiligen Kapiteln gesondert behandelt.

3.2.2 Ortsspezifische Mutagenese bei Plasmid-DNA mittels modifizierter Oligonukleotide

Um Mutanten rekombinanter Proteine herzustellen, wurden die Expressionsvektoren der Proteine mittels ortsspezifischer Mutagenese modifiziert. Die in dieser Arbeit verwendeten

Punktmutationen wurden hierbei durch modifizierte Oligonukleotide eingeführt, die an definierter Stelle statt des für die Ausgangsaminosäure codierenden Basentriplets, ein Triplet für die Zielaminosäure tragen. Die einzelnen Schritte wurden dabei mit dem QuikChange II XL Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene/Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland) nach Herstellerangaben durchgeführt. Der Erfolg der Mutagenese wurde durch Sequenzierung überprüft.

3.2.3 DNA-Sequenzierung

Zur Bestimmung von DNA-Sequenzen wurde eine nach Sanger modifizierte Methode verwendet. Die Durchführung erfolgte mit dem BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Life Technologies, Darmstadt, Deutschland), die Reinigung der Proben mit dem DyeEx 2.0 Spin Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland). Für die Sequenzierungs PCR wurde die in Tabelle 3.10 beschriebene Vorgehensweise gewählt.

Tabelle 3.10
Sequenzierungs PCR

Reagenzien und Reaktionsprogramm		
In ein PCR-Reaktionsgefäß:		
0.5-1 µg Template je 100 pmol komplementäre Primer		
4 µl BigDyeDesoxy terminator mix		
zu 10 µl ddH ₂ O		
1 min	96°C	
15 s	96°C	
15 s	42°C	(25x)
4 min	60°C	
∞	4°C	

Die Messung der Proben erfolgte durch die Sequenzierungseinrichtung des Max-Planck-Instituts für molekulare Physiologie (Dortmund).

3.2.4 Präparation und Reinigung von Plasmid-DNA

Zur Extraktion von Plasmid-DNA aus wie in 3.4.2 beschriebenen kultivierten Zellen, wurde ein QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) nach Herstellerangaben verwendet. Alternativ wurde die Extraktion bei großer Probenzahl mittels eines QIAcubes (Qiagen, Hilden, Deutschland) durchgeführt.

3.3 Zellbiologische Methoden

3.3.1 Kultivierung von HeLa-Zellen

Zur späteren Lyse wurden HeLa-Zellen bis zur maximal 47ten Passage in 75cm² oder 175cm² Zellkulturflaschen der Firma Becton Dickinson (Franklin Lakes, USA) kultiviert. Die Zellen wurden in MEM-Nährmedium mit 10% fetalem Kälberserum, 1mM Glutamin und 1% nicht-essentiellen Aminosäuren bei 37°C in einem Inkubator (NuAire

Autoflow-Inkubator, NuAire, Plymouth, USA) unter 5% CO₂ und wasserdampfgesättigter Atmosphäre bis zu einer Konfluenz von etwa 90% herangezogen und anschließend entweder lysiert oder geteilt und in neue Flaschen überführt. Der Wachstumsfortschritt und eventuelle Kontaminationen wurde lichtmikroskopisch kontrolliert (Leica DM-IRB Mikroskop, Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland).

Das Nährmedium wurde bis zur Teilung oder Lyse jeden zweiten Tag gewechselt. Zur Loslösung von der Substratoberfläche wurden die Zellen etwa 5 Minuten mit 1 ml Trypsin/EDTA inkubiert und anschließend 10⁵-10⁶ Zellen in eine neue Kulturflasche überführt und, je nach Flaschengröße, in 12 oder 20 ml des genannten Nährmediums resuspendiert. Die Bestimmung der Zellanzahl erfolgte mittels eines Zellzählers (Vi-Cell XR, Beckman Coulter, Inc., Brea, USA) nach Zugabe von Trypanblau.

3.3.2 Herstellung von HeLa-Zellysat

Zur Herstellung des HeLa-Zellysates für die im Folgenden beschriebenen *Pulldown*-Experimente wurden konfluent bewachsene 75 cm² oder 175 cm² Zellkulturflaschen verwendet. Nach Entnahme des Nährmediums wurden die Zellen mit 1-2 ml PBS pH 7 gewaschen und im Anschluss 1 ml Lysepuffer zu den 75 cm² Flaschen und 2 ml Lysepuffer zu den 175 cm² Flaschen gegeben. Die Zellkulturen wurden 20 Minuten mit dem Lysepuffer bei 4°C und zwischenzeitigem, kurzem Vortexen inkubiert. Hiernach wurden die am Flaschenboden verbliebenen Zellen mit einem Zellkratzer gelöst. Um die bei der Lyse entstandenen unlöslichen Zell- und Organellfragmente zu entfernen, wurde das Lysat für 20 Minuten bei 4°C in einer Eppendorf Tischzentrifuge bei 13000 rpm zentrifugiert und der Überstand in ein neues Eppendorf Gefäß überführt. Im Anschluss wurde die Gesamtproteinkonzentration des abzentrifugierten Lysates mittels Bradford-Test bestimmt (i.d.R. zwischen 1-2 mg/ml) und das Lysat in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

3.4 Mikrobiologische Methoden

3.4.1 Transformation elektro- oder hitzekompetenter *Escherichia coli*-Zellen

Zur Überexpression von rekombinanten Proteinen oder zur Amplifikation von Plasmiden muss die Plasmid-DNA zunächst in die *E. coli*-Zellen inseriert werden. Hierzu wurden diese, je nach Kompetenz des Bakterienstammes, mittels Elektroporation oder Hitzeschock transformiert. Dabei wurde wie im Folgenden beschrieben vorgegangen:

Hitzeschocktransformation

Unmittelbar nach dem Auftauen der hitzekompetenten Zellen wurden 5 µl Plasmid-DNA (50 - 200 ng) zu 100 µl Zellen gegeben und für etwa 25 Minuten auf Eis gelagert. Danach wurden sie für 1 Minute und 15 Sekunden bei 42°C zur Permeabilisierung der Zellmembran erhitzt und anschließend für weitere 5 Minuten auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 900 µl SOC-Medium wurden die Zellen für 45 Minuten bei 37°C und unter Schütteln bei 750 rpm inkubiert. Im Anschluss daran wurde der Inkubationsansatz für 3 Minuten bei 3000 rpm in einer Tischzentrifuge pellettiert. Von dem Überstand wurden 900 µl verworfen. Das Pellett wurde im verbleibenden Überstand resuspendiert und auf eine LB-Platte mit Selektionsmarkern ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

Elektroporation

Zur Transformation elektrokompeter Zellen wurden 2 µl Plasmid-DNA (20 - 80 ng) zu 100 µl Zellen gegeben, welche hiernach in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette überführt wurden. Durch einen kurzen Stromimpuls hoher Spannung (Spannung 1.8 kV, Widerstand 200 Ω, Kapazität 25 µF) wurde die Zellmembran temporär permeabilisiert, was die Aufnahme der Plasmid-DNA ermöglicht. Direkt nach dem Impuls wurde 1 ml LB-Medium zu den Zellen gegeben welche dann für 45 Minuten bei 37°C und unter Schütteln bei 750 rpm inkubiert wurden. Im Anschluss daran wurden die Zellen wie bei der Hitzeschocktransformation beschrieben abzentrifugiert und ausplattiert.

3.4.2 Kultivierung von *Escherichia coli*-Zellen und anschließend induzierte Proteinexpression

Für die spätere Expression von rekombinanten Proteinen wurden die *E. coli*-Zellen (Stamm BL21-CodonPlus (DE3)-RIL oder BL21 (DE3)) nach Transformation von der LB-Platte in 1 ml LB-Medium aufgenommen und in 5 l LB-Medium mit Zusatz von 5 ml Ampicillin (125 mg/ml) und 5 ml Chloramphenicol (34 mg/ml) überführt. Der Ansatz wurde bei 37°C und 190 rpm inkubiert und bis zu einer OD_{600nm} von 0.6 - 0.9 kultiviert. Zur abschließenden Reduktion des Wachstums wurde der Ansatz für 30 Minuten bei 4°C abgekühlt.

Die Induktion der heterologen Proteinexpression einer Kultur erfolgte durch die Zugabe von 0.2 mM IPTG. Anschließend wurde die Kultur über Nacht bei 20°C und 190 rpm weiter inkubiert. Im Anschluss an die Expression wurden die Zellen in einer Avanti J-20 XP Zentrifuge unter Verwendung eines JLA 8.100er Rotors für 30 Minuten bei 4°C und 5000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in Falcontubes gesammelt, mit PBS gewaschen und anschließend wiederum in einer Laborzentrifuge für 15 Minuten bei 4°C und 4000 rpm abzentrifugiert wobei der Überstand verworfen wurde. Die gewaschenen Zellen wurden zum anschließenden Zellaufschluss auf Eis gelagert oder für die spätere Verwendung in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

Zur Anzucht von *E. coli* für die Plasmidpräparation wurden die Zellen (Stamm Omni-MAX™2) einer einzelnen Kolonie nach Transformation in lediglich 5 ml LB mit Zusatz von 5 µl Ampicillin (125 mg/ml) überführt und über Nacht bei 37°C und 190 rpm kultiviert.

3.4.3 Herstellung von *Escherichia coli*-Zelllysate

Die wie in 3.4.2 beschrieben hergestellten Zellpellets wurden für den Aufschluss zunächst in Lysepuffer (20 mM Hepes pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 1 mM PMSF und 1 mM DTE) homogenisiert und anschließend mit einem Microfluidizer (Microfluidics, Newton, USA) lysiert. Der Zelldetritus und die aggregierten Bestandteile wurden durch Zentrifugation in einer Avanti J-20 XP unter Verwendung eines JA 25.50er Rotors für 30 Minuten bei 10°C und 25000 rpm und anschließender Filtrierung (Bottle Top Filter, Nalgene Labware, Roskilde, Dänemark) entfernt.

3.4.4 Kultivierung von *Saccharomyces cerevisiae*

Die aufgetauten Zellen wurden zunächst auf eine YPDA-Platte ausgestrichen und über 2-3 Tage bei 30°C inkubiert. Eine einzelne Kolonie wurde in 50ml YPD überführt und über Nacht bei 30°C und 120 rpm vorkultiviert. Die Vorkultur wurde in 2 l YPD überführt und wiederum über Nacht bei gleichen Bedingungen inkubiert und bis zu einer OD_{600nm} von 1.7-3.0 kultiviert. Anschließend wurde die Kultur für etwa 30 Minuten bei 4°C abgekühlt, bevor sie für 30 Minuten bei 4°C und 6000 rpm (Avanti J-20 XP, JLA 8.1000er Rotor) abzentrifugiert wurde. Nach Verwerfen des Überstands wurden die Zellen auf Eis gelagert oder in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

3.4.5 Herstellung von *Saccharomyces cerevisiae*-Zelllysate

Für den Zellaufschluss mittels Kryopulverisierung wurden die Zellen in 5-10 ml Lysepuffer (PBS pH 7, 1 mM PMSF, 2x CLAP) aufgenommen und resuspendiert. Die Suspension wurde tröpfchenweise in flüssigen Stickstoff überführt und anschließend mit drei Schlagzyklen kryopulverisiert. Das Pulver wurde in Lysepuffer resuspendiert und das Lysat für 30-45 Minuten bei 4°C und 12000 rpm in einer Tischzentrifuge geklärt und anschließend filtriert (Bottle Top Filter, Nalgene Labware, Roskilde, Dänemark). Nach Bestimmung der Proteinkonzentration mittels Bradfordtest (Vgl. Kapitel 3.6.2) wurde das Lysat in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

3.5 Proteinbiochemische Methoden

3.5.1 Aufkonzentrierung und Umpuffern von Proteinlösungen

Das Aufkonzentrieren oder der Pufferwechsel von Proteinlösungen erfolgte mittels Amicon Ultra Zentrifugationseinheiten (Millipore, Schwalbach, Deutschland) bei 4°C und 4000 rpm (Zentrifuge 5810 R, Eppendorf, Hamburg, Deutschland). Die Membran der Zentrifugationseinheiten besitzt eine definierte Porengröße (*Molecular Weight Cut-Off*, MWCO) die alle Bestandteile überhalb eines bestimmten Molekulargewichts zurückhält und je nach Molekulargewicht des jeweiligen Proteins so gewählt wurde, dass dieses die Poren nicht durchdringen kann. Für Moleküle unterhalb des definierten Molekulargewichts erfolgt dabei keine Retention, sodass entweder das Protein aufkonzentriert oder durch kontinuierliche Zugabe eines gewünschten Puffers umgepuffert werden kann.

3.5.2 Aufreinigung von Proteinen aus *Escherichia coli*-Zellysat mittels Affinitäts- und Größenausschlusschromatographie

Das überexprimierte Protein wurde aus dem wie in 3.4.3 beschrieben hergestellte Lysat in mehreren Schritten aufgereinigt. Der erste Schritt besteht dabei in der affinitätschromatographischen selektiven Anreicherung des Proteins mittels eines terminal ans Protein angefügten Affinitätsankers an der stationären Phase. Die in dieser Arbeit verwendeten Proteine wurden mittels eines N-terminal angefügten Hexahistidinankers, dem eine TEV-Protease-Schnittstelle folgt (bei pET19 mod Vektoren), an einer stationären Phase mit kovalent ans Matrixpolymer gebundenen Nickel-Nitrilotriessigsäure-Chelaten (Ni-NTA-Chelate) angereichert. Die Ni-NTA-Chelate können zusätzlich je zwei Histidinreste koordinativ binden, sodass das Protein durch seinen Hexahistidinanker gegenüber Proteinen ohne Affinitätsanker mit höherer Affinität und dadurch selektiv gebunden wird. Im Anschluss wird das angereicherte Protein durch imidazolhaltigen Puffer eluiert. Zur Affinitätsreinigung wurde eine 5ml Ni²⁺ Affinitätssäule (GE Healthcare, München, Deutschland) verwendet. Die proteinhaltigen Sammelfractionen wurden mittels SDS-PAGE untersucht. Ausreichend reine Fraktionen wurden vereinigt und nach Zugabe von TEV-Protease über Nacht in 5l Reinigungspuffer ohne Imidazol dialysiert (im Falle von Ypt10 wurde das Protein in einen pOPIN-Vektor kloniert, sodass PreScission- statt TEV-Protease zugegeben wurde). Bei der Dialyse werden Affinitätsanker und niedermolekulare Bestandteile entfernt. In einer zweiten Affinitätsreinigung an einer Ni²⁺ Affinitätssäule wurde ungeschnittenes Protein, die TEV-Protease, verbleibende Affinitätsanker und unspezifisch bindende Bestandteile zurückgehalten. Ausreichend reine Sammelfractionen des Zielproteins wurden vereinigt und aufkonzentriert. Ein letzter Reinigungsschritt wurde durch eine Gelfiltration (Größenausschlusschromatographie) durchgeführt, ehe das Protein auf die gewünschte Zielkonzentration aufkonzentriert wurde. Für die in dieser Arbeit gereinigten Rab-GTPasen wurde dabei eine Hi-Load Superdex 75 16/60 bzw. bei größeren Mengen eine 26/60 prep grade Gelfiltrationssäule (GE Healthcare, München, Deutschland) verwendet.

Alle Reinigungsschritte wurden bei 4°C an einer FPLC Äkta prime plus (GE Healthcare, München, Deutschland) durchgeführt. Die für die jeweiligen Proteine verwendeten Reinigungs-, Elutions-, Dialyse- und Gelfiltrationspuffer sind in folgender Tabelle zusammengefasst:

Tabelle 3.11
Reinigungspuffer

Protein	Reinigungspuffer	Elutionspuffer
Ypt7 ₁₋₁₈₂ Q35C Q68L, Ypt7 ₁₋₁₈₂ Q35C K38I Q68L,	50 mM Hepes pH 8, 500 mM LiCl, 2 mM β -Mercaptoethanol,	Wie Reinigungspuffer, zusätzlich 500 mM Imidazol
Ypt7 ₁₋₁₈₂ Q35C A39S Q68L, Ypt7 ₁₋₁₈₂ Q35C K38I A39S Q68L	1 mM MgCl ₂ , 10 μ M GDP	
Ypt10 _{fl}	50 mM Hepes pH 8, 300 mM NaCl, 1 mM TCEP, 1 mM MgCl ₂ , 10 μ M GDP	Wie Reinigungspuffer, zusätzlich 500 mM Imidazol
Protein	Dialysepuffer	Gelfiltrationspuffer
Ypt7 ₁₋₁₈₂ Q35C Q68L, Ypt7 ₁₋₁₈₂ Q35C K38I Q68L,	50 mM Hepes pH 8, 100 mM NaCl, 2 mM β -Mercaptoethanol,	20 mM Hepes pH 7.5, 50 mM NaCl, 1mM TCEP,
Ypt7 ₁₋₁₈₂ Q35C A39S Q68L, Ypt7 ₁₋₁₈₂ Q35C K38I A39S Q68L	1 mM MgCl ₂ , 10 μ M GDP	1 mM MgCl ₂ , 10 μ M GDP
Ypt10 _{fl}	50 mM Hepes pH 8, 100 mM NaCl, 2 mM β -Mercaptoethanol, 1 mM MgCl ₂ , 10 μ M GDP, 5% Glycerol	25 mM Hepes pH 8, 100 mM NaCl, 1 mM TCEP, 5 mM MgCl ₂ , 10 μ M GDP, 5% Glycerol

3.5.3 Proteinpräzipitation

Sofern Probenvolumina zu groß waren, um auf ein SDS-Gel aufgetragen zu werden, wurden die Proteine zuvor mittels Natriumdesoxycholat und Trichloressigsäure gefällt⁷⁵ und anschließend in SDS-Probenpuffer resuspendiert. Dabei wurde nach folgendem Protokoll vorgegangen:

Tabelle 3.12
Ablauf der Proteinpräzipitation

Schritt	Beschreibung
1.	Probe wird mit ddH ₂ O auf 1 ml Volumen aufgefüllt und nach Zugabe von 100 µl 1 % (w/v) Natriumdesoxycholat kurz gevortext.
2.	Der Probe wird 200 µl 50%-ige (w/v) Trichloressigsäure zugesetzt. Nach mehrfachem kurzen Vortexen wird die Probe für 15 Minuten in einer Tischzentrifuge bei 13000 rpm zentrifugiert .
3.	Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet mit 1 ml Aceton versetzt und wiederum für 15 Minuten bei 13000 rpm zentrifugiert. Der Acetonüberstand wird abgenommen und das Pellet getrocknet; danach kann die Probe in SDS-Probenpuffer aufgenommen werden.

3.5.4 Nukleotidaustausch bei Rab-GTPasen

Für verschiedene Anwendungen ist es wichtig, dass Rab-GTPasen sich in einem bestimmten Nukleotidzustand befinden. Da die Proteine mit GDP-haltigem Puffer aufgereinigt worden sind und die intrinsische Hydrolyseaktivität ebenfalls zur Hydrolyse von Rab-gebundenem GTP beiträgt, liegen die aufgereinigten Proteine zu einem großen Teil in GDP-gebundener Form vor. Um vorwiegend GDP-, GTP-, GppNHp- sowie mant- oder acryl-Nukleotid-gebundene Proteine zu erhalten, muss daher ein Nukleotidaustausch durchgeführt werden. Das Prinzip ist bei allen Nukleotidaustauschen gleich: durch Zugabe von EDTA werden die Mg²⁺-Ionen im Puffer chelatiert. Die Nukleotidbindung der Rab-Proteine verliert durch die fehlenden Mg²⁺-Ionen in den Nukleotidbindetaschen der Rab-Proteine an Affinität. Ein mehrfacher Überschuss der Nukleotide, welche an die Rab-GTPasen nach dem Austausch gebunden sein sollen, bewirkt eine präferentielle Bindung gegenüber dem Ursprungsnukleotid. Die anschließende Depletion von EDTA und Aufkonzentrierung mit Mg²⁺-Ionen sorgt für eine stabile Bindung der neu gebundenen Nukleotide. Die Modalitäten der Austauschreaktionen für die jeweiligen Nukleotide werden im Folgenden beschrieben.

Austausch mit GTP, GppNHp oder mant-Nukleotiden

Für diese Nukleotide wurde zunächst ein im Verhältnis zur MgCl₂-Konzentration 5-facher Überschuss EDTA zur Proteinlösung hinzugefügt (i.d.R. 5mM). Nach Zugabe eines 20-fachen Überschusses GTP oder GppNHp oder eines 5-fachen Überschusses an mant-Nukleotiden wurde der Ansatz für 2 bzw. 4 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz auf Eis gelagert. Zum Entfernen des EDTAs und des Nukleotidüberschusses wurden entweder kleine NAP5 Gelfiltrationssäulen (GE Healthcare, München, Deutschland) verwendet (Puffer entsprach dem jeweiligen Proteinpuffer zuzüglich 10µM GDP, GTP oder GppNHp, bzw. 1µM mant-Nukleotide) oder, falls es sich

nicht um mant-Nukleotide handelte und das Protein noch aufkonzentriert werden sollte, wurde mit Amiconkammern mehrmals in Puffer (gleicher Puffer wie bei NAP5-Säulen) gewaschen und zum Schluss auf die gewünschte Konzentration gebracht (Vgl. 3.5.1). Im Anschluss an den Austausch wurde der Erfolg mittels HPLC überprüft (Vgl. 3.6.6).

Austausch und Modifikation mit acryl-Nucleotiden

Der Austausch mit acryl-Nukleotiden weicht etwas von dem zuvor beschriebenen Austauschvorgang ab, da nach stattgefundenem Austausch eine kovalente Bindung zwischen dem Acrylamid des Nukleotids und einem durch Mutagenese in die Nukleotidbindetasche eingebrachten Cystein entsteht (Michael-Addition).

Da die Michael-Addition mehr Zeit beansprucht, wurde die Lösung mit EDTA-haltigem und Nukleotidfreien Proteinpuffer bis zu einer Proteinkonzentration von 50 μM verdünnt, um der Aggregation des Proteins vorzubeugen. Die Endkonzentration EDTA entsprach im Verhältnis zur MgCl_2 -Konzentration einem 5-fachen Überschuss. Im Verhältnis zur Proteinkonzentration wurde ein 5-10-facher Überschuss des acryl-Nukleotids hinzugefügt. Die Reaktion wurde bei 25-30°C und 300rpm bis zur vollständigen Modifikation der GTPase mit dem acryl-Nukleotid durchgeführt, was je nach Rab-Protein und Nukleotid zwischen 18h und 7d beansprucht hat. Der Erfolg der Reaktion wurde mittels ESI-MS überprüft (Vgl. Kapitel 3.6.4). Im Anschluss wurde das modifizierte Protein mit Zentrifugalkonzentratoren mehrmals in Puffer (Proteinpuffer ohne EDTA und Nukleotide) gewaschen und auf die gewünschte Konzentration gebracht.

3.5.5 Biotinylierung von Rab-GTPasen

Zur Immobilisierung von Rab-GTPasen auf einer Streptavidinmatrix wurden diese zunächst an einem freien, C-terminalen Cystein biotinyliert. Dabei wurde ein 4-5-facher Stoffmengenüberschuss Maleimide-PEG₂-Biotin zu dem Protein hinzugegeben und der Reaktionsansatz mit PBS pH 7 so verdünnt, dass die Proteinkonzentration 0.5 mM betrug. Die Reaktion wurde solange auf Eis durchgeführt, bis nahezu kein unbiotinyliertes Protein mehr vorhanden war. (Bei verwendeten Rab-Proteinen dauerte dies zwischen 30 min und 8h.) Der Fortschritt der Reaktion wurde dabei mittels ESI-MS kontrolliert (Vgl. Kapitel 3.6.4).

3.5.6 *Pulldown*-Experimente mit biotinylierten Rab-GTPasen

Die ersten *Pulldown*-Experimente wurden ausgehend von Timon Frieses Versuchen nach folgendem Prozedere durchgeführt:

1. Vorbereitung

- 250 μl *Streptavidin Magnetic Beads* (SMBs) dreimal mit 500 μl PBS pH 7 in einem 2 ml Eppendorf-Gefäß waschen und in 500 μl PBS resuspendieren.
- Danach 1.2 nmol der biotinylierten Rab-GTPase zu den Beads geben und 15 Minuten lang auf Eis inkubieren.
- Anschließend die SMBs wiederum dreimal in 500 μl PBS pH 7 waschen.
- 30 Minuten vor Beginn der Inkubation dem Lysat 25 U/ml alkalische Phosphatase hinzufügen und währenddessen auf Eis lagern.

2. Inkubationzyklen

- 1 ml Lysat a 5 μM exogen hinzugefügtem GEF zu den Beads geben und solange mit der Pipette durchmischen, bis sich die Beads vollständig in Suspension befinden.
- Für 30 Minuten auf Eis inkubieren.
- Anschließend dreimal mit 500 μl PBS pH 7 waschen.
- Den Inkubationsschritt weitere 2 mal wiederholen.

3. Elution

- Überstand entfernen und mit 100 μl einer PBS-Lösung mit einem pH von 7 und einer GTP-Konzentration von 100 μM für 10 Minuten auf Eis eluieren.
- Überstand in ein neues Eppendorf-Gefäß für weitere Analysen (z.B. SDS-PAGE) überführen.

Die Weiterentwicklung und die letzte Version des *Pulldown*-Protokolls sind in Kapitel 4.2 dieser Arbeit zu finden.

3.5.7 Tryptischer Verdau angereicherter Proteine in Lösung

Um die bei den *Pulldown*-Experimenten isolierten Proteine identifizieren zu können, wurden die Elutionsfraktionen oder die mit Protein bedeckten SMBs mit Trypsin, einer Serin-Protease, behandelt. Die in dieser Arbeit verwendete Trypsin-Protease (aus Schweinepankreas isoliert) schneidet Proteine spezifisch an der Carboxy-Seite der Aminosäuren Arginin und Lysin. Durch die fest definierten Schnittstellen der Protease entsteht beim vollständigen tryptischen Verdau eines Proteins ein für jedes Protein spezifisches Ensemble von Peptidfragmente, anhand derer es wie in Kapitel 3.6.5 beschrieben identifiziert werden kann.

Der Verdau der Proben erfolgte dabei nach folgendem Protokoll:

Tabelle 3.13

Tryptischer Verdau von Proteinen in Lösung

Stocklösungen:	
50 mM TRIS pH 7.5	
1 M DTT in 50 mM Ammoniumbicarbonat (jedesmal neu angesetzt)	
0.4 $\frac{\mu\text{g}}{\mu\text{l}}$ Trypsin in 10 mM HCl	
1.2 g Harnstoff in 9 ml 50 mM TRIS pH 7.5 (jedesmal neu angesetzt)	
Lösung E1:	Lösung E2:
1.1 μl des DTT-Stocks	Jodacetamid zu 55 mM in 1 ml des
13.75 μl des Trypsin-Stocks	Harnstoff-Stocks (lichtgeschützt)
Harnstoff-Stock zu 1.1 ml	

Arbeitsschritt:

1. Verdau: 100 μ l E1 zu den Proben geben, für 1h bei Raumtemperatur und 40 rpm inkubieren.
 2. Acetylierung: 100 μ l E2 hinzugeben und über Nacht abgedunkelt und bei 37°C inkubieren.
 3. Reaktion abstoppen: 2 μ l Trifluoressigsäure hinzugeben.
-

3.5.8 Reinigung von Peptidfragmenten für die hochauflösende Massenspektrometrie

Ehe die Peptidfragmente der wie in Kapitel 3.5.7 beschrieben verdauten Proteine massenspektrometrisch analysiert werden können, müssen sie zunächst gereinigt werden. Die Reinigung erfolgte dabei nach der von Rappsilber et al.^{76,77} beschriebenen STAGE (engl. *STop And Go Extraction*)-Tip-Methode. Die gereinigten Peptide wurden mit einer SpeedVac (Savant, Holbrook, USA) getrocknet und bis zur Messung bei -20°C gelagert.

3.5.9 Aufnahme von Reaktionskinetiken

Zur Aufzeichnung von Kinetiken der in dieser Arbeit relevanten biochemischen Reaktionen wurden, je nach Anforderung, verschiedene Techniken verwendet, welche im Folgenden vorgestellt werden.

Fluoreszenzspektroskopische Messung von Nukleotid-Austauschreaktionen

Die fluoreszenzspektroskopische Messung der Nukleotid-Austauschreaktionen untersuchter GTPasen beruht auf Beladung der GTPasen mit mant-GDP (Vgl. Kapitel 3.5.4) vor der Messung und der durch den Austausch bedingten Signaländerung. Die Mant-Nukleotide übernehmen dabei die Rolle des Fluorophors, welches bei einer Wellenlänge von 360nm angeregt wird und die absorbierte Energie durch Rotverschiebung bei 440nm wieder emittiert. Ihre Freisetzung durch im Überschuss vorliegendes GDP bei der Austauschreaktion (intrinsisch oder durch Austauschfaktoren katalysiert) bewirkt eine Signaländerung. Der zeitliche Verlauf der aufgezeichneten Signaländerung wird zur kinetischen Charakterisierung der Reaktion herangezogen.

Alle Nukleotid-Austauschreaktionen wurden mit einem Fluoromax-3 Fluoreszenzspektrometer (Horiba Jobin Yvon Inc., Edison, USA) gemessen. Die Messung selbst wurde nach Kalibrierung des Gerätes mit dem Lampenspektrum und dem Ramanspektrum von Wasser wie folgt durchgeführt: Zunächst wurde eine Quarzküvette mit 1ml Fassungsvermögen standardmäßig mit entgastem Reaktionspuffer (20 mM HEPES pH 7.5, 50 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 2 mM DTE) befüllt und die Temperatur auf 25°C eingestellt. Anschließend wurde mit der Detektion des Signals begonnen und die einzelnen Komponenten der Reaktion unter Rühren sukzessive hinzugefügt. Als erstes wurde 1 μ M der mant-GDP beladenen GTPase vorgelegt und gewartet bis das Signal ein stabiles Niveau erreichte. Zur Messung intrinsischer Austauschraten wurde weiterhin lediglich 200 μ M GDP hinzugegeben und die Reaktion bis zum erneuten Erreichen eines stabilen Signalniveaus verfolgt. Da die intrinsischen Austauschraten der Rab-GTPasen niedriger sind als bei einem katalysierter Austausch, wurde nur alle 20 Sekunden die Fluoreszenz angeregt und das Signal aufgezeichnet. Zur Messung GEF-katalysierter Austauschreaktionen wurde dabei vor Zugabe von 200 μ M GDP das jeweilige GEF (oder das Protein mit vermuteter GEF-Aktivität) in unterschiedlichen Konzentrationen hinzugefügt. Nach Zugabe von

GDP wurden die Reaktionen ebenfalls bis zum Erreichen eines stabilen Signalniveaus fortgeführt oder vorzeitig durch Zugabe von EDTA beendet. Bei katalysierten Reaktionen wurde das Signal in Intervallen von einer Sekunde registriert.

Da die aufgezeichneten Signale einer exponentiellen Abnahme in Abhängigkeit von der Zeit unterlagen, konnte mittels der Software OriginPro 9.0G (OriginLab, Northampton, US-MA) mit folgender Gleichung eine Kurvenanpassung durchgeführt werden:

$$F(t) = c + Ae^{-t*k_{obs}}$$

$F(t)$: Fluoreszenzsignal zum Zeitpunkt t , c : Ausgangsniveau des Fluoreszenzsignals, A : Fluoreszenzamplitude, k_{obs} : Reaktionsrate

HPLC-basierte Messung der intrinsischen GTP-Hydrolyseaktivität von Rab-GTPasen

Basierend auf dem in Kapitel 3.6.6 beschriebenen Prinzip der HPLC, wurde auch die intrinsische Hydrolyserate von Rab-GTPasen bestimmt. Hierfür wurden die zuvor mit GTP beladenen GTPasen mit ihrem Puffer auf 50µM verdünnt und 500µl dieser Lösung bei 25°C im Autosampler der HPLC-Anlage inkubiert. In zunehmenden Zeitabständen wurden jeweils 10µl der Probe injiziert und die Nukleotidzusammensetzung bestimmt. Anhand der Abnahme von GTP und der Zunahme von GDP in der Lösung über die Zeit lässt sich die intrinsische Hydrolyserate der jeweiligen GTPase bestimmen. Die Messung wurde solange durchgeführt, bis die Änderung der Nukleotidzusammensetzung der Probe sistierte. Das verwendete HPLC-System bestand aus einem Waters 600S Controller, einer Waters 626 Pumpe, einem Waters 717plus Autosampler und einem Waters 2487 Dual λ Absorbance Detector.

Da die Reaktion einem zeitlich exponentiellen Verfall unterlag, wurde sie, wie zuvor beschrieben, mit OriginPro 9.0G an eine exponentielle Gleichung erster Ordnung angepasst (Vgl. Kapitel 3.5.9).

3.6 Analytische Methoden

3.6.1 DNA-Konzentrationsbestimmung

Die Konzentration vorliegender DNA wurde absorptionsspektroskopisch mit einem Nano-Drop ND-1000 Spektralphotometer (peqlab, Erlangen, Deutschland) bestimmt. Bei der Messung wurde das Absorptionsmaximum der DNA bei einer Wellenlänge von 260 nm zugrunde gelegt und 2 µl Probe gegen eine Pufferreferenz gemessen.

3.6.2 Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford

Bei der Konzentrationsbestimmung nach Bradford⁷⁸ wird die Proteinkonzentration mittels des Farbstoffes Coomassie Brilliant Blau G250 bestimmt. Dieser bindet an die kationischen Seitenketten der Aminosäuren Arginin, Lysin und Histidin der Proteine und erfährt eine Verschiebung seines Absorptionsmaximums von 465 nm zu 595 nm.

Für die Messung wurde die Probe auf ein Volumen von 100 µl verdünnt und mit 900 µl Coomassie Protein Assay Reagenz (Thermo Fischer Scientific Inc., USA) versetzt. Nach einer 5-minütigen Inkubationszeit wurde die Absorption der Probe spektrometrisch bei 595 nm mit einer Referenz verglichen. Mithilfe einer Eichkurve von BSA (Bovinem Serumalbumin) bekannter Konzentration wurde die Konzentration der Probe abgeschätzt.

3.6.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese dient der analytischen Auftrennung von Proteinen nach ihrer Größe.⁷⁹ Dabei wird das anionische Tensid Natriumlaurylsulfat (engl.: **Sodium-Dodecyl-Sulfate**) verwendet, um die Eigenladung von Proteinen zu überdecken und somit eine gleichmäßige Ladungsverteilung zu gewährleisten. Die Auftrennung der Proteine an der Laufmatrix bei der Gelelektrophorese hängt somit lediglich von ihrer Größe, nicht von ihrer spezifischen Eigenladung ab.

Durchführung: Zunächst wurde die Proteinlösung oder das Präzipitat mit 2- bzw. 5-fach SDS-Probenpuffer (Vgl. Kapitel 3.1.2) versetzt und für 5 Minuten bei 95°C denaturiert und reduziert. Anschließend wurden die Proben auf ein SDS-PAGE-Gel aufgetragen und für etwa 45 Minuten bei einer Stromstärke von 60mA in SDS-PAGE-Laufpuffer aufgetrennt. Als Referenz wurde ein LMW (*low molecular weight*) Marker der Firma GE Healthcare (München, Deutschland) verwendet. Zur Färbung der Gele wurde eine der unten beschriebenen Methoden verwendet.

Tabelle 3.14
Zusammensetzung der 15%-igen SDS-Polyacrylamidgele (9 Stück)

Lösung	Trenngel	Sammelgel
Gelpuffer (Vgl. Kapitel 3.1.2)	12.5 ml SDS-PAGE Trenngelpuffer	7.5 ml SDS-PAGE Sammelgelpuffer
Acrylamid 4K-Lösung (30%)	25 ml	5 ml
ddH ₂ O	12.5 ml	17.5
10 % (w/v) Ammoniumperoxodisulfat	250 µl	240 µl
TEMED	25 µl	30 µl

Gelfärbungen

Im Anschluss an die Auftrennung der Proteinprobe via SDS-PAGE wurde das Trenngel, je nach gewünschter Sensitivität, mit einer der im Folgenden beschriebenen Methoden gefärbt, um die aufgetrennten Proteine sichtbar zu machen.

Coomassie-Färbung

Hierbei wurden die Gele nach einer nach Fairbanks beschriebenen Methode in leicht abgewandelter Form gefärbt.⁸⁰ Die Gele wurden dabei für 5 Minuten in kurz zuvor aufgekochte Coomassie Brilliant Blue R250-Färbelösung eingelegt und anschließend in 10%iger (v/v) Essigsäure entfärbt.

Kolloidale Coomassie-Färbung

Hierbei wurden die Gele für circa 4 Stunden in kolloidaler Coomassie Brilliant Blue R250-Färbelösung inkubiert und anschließend mehrfach in ddH₂O gewaschen, bis eine möglichst vollständige Entfärbung des Hintergrundes erreicht wurde (Vgl.⁸¹).

Silbernitrat-Färbung

Zur Gewährleistung besonders hoher Sensitivität wurde das Gel mit einer Silbernitrat-Färbung nach Nesterenko behandelt.⁸² Folgende Schritte wurden dabei durchgeführt:

Tabelle 3.15
Ablauf der Silberfärbung

Schritt	Beschreibung
Fixierung	Gel wird 5 min mit 60 ml 50 % (v/v) Aceton, 1,5 ml 50 % (v/v) Trichloressigsäure und 25 µl 35 % (v/v) Formaldehyd behandelt.
Waschen	Gel wird dreimal für einige Sekunden in ddH ₂ O gespült und anschließend für 5 min in ddH ₂ O gelagert und im Anschluss wiederum dreimal für einige Sekunden in ddH ₂ O gespült.
Vorbehandlung	Das Gel wird für 5 min mit 60 ml 50 % (v/v) Aceton behandelt und anschließend für 1 min mit 60 ml ddH ₂ O, 100 µl 10 % (w/v) Na ₂ S ₂ O ₃ • 5 H ₂ O behandelt.
Waschen	Gel wird dreimal für einige Sekunden in ddH ₂ O gespült.
Imprägnieren	Das Gel wird für 8 min mit 60 ml ddH ₂ O, 800 µl 20% (w/v) AgNO ₃ , 600 µl 35 % (v/v) Formaldehyd behandelt.
Waschen	Gel wird dreimal für einige Sekunden in ddH ₂ O gespült.
Entwickeln	Das Gel wird solange in 60 ml ddH ₂ O, 1.2 g Na ₂ CO ₃ , 25 µl 35 % (v/v) Formaldehyd, 25 µl 10 % (w/v) Na ₂ S ₂ O ₃ • 5 H ₂ O inkubiert, bis die Proteinbanden auf dem Gel gut zu erkennen sind.
Entwicklungsabbruch	Sobald das Gel ausreichend entwickelt ist, die Reaktion mit 10 % Essigsäure (v/v) beenden.

3.6.4 Elektrospray-Ionisations Massenspektrometrie (ESI-MS)

Als massenspektrometrisches Verfahren zur Bestimmung der Molekulargewichte verwendeter Proteine wurde die Elektrospray-Ionisations Massenspektrometrie angewandt.

Bevor die Probe ins Einlasssystem des Finnigan LCQ Advantage Max Massenspektrometers (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) gelangte, wurden ihre Einzelkomponenten mithilfe einer dem Einlasssystems vorgeschalteten HPLC-Anlage (Agilent 1100 Series HPLC System; Agilent Technologies, Santa Clara, USA) an einer C4-Säule (214 TP Säule; Grace Vydac, USA) aufgetrennt und entsalzt.

Bei der ESI-MS selbst wird der Analyt durch eine dünne Metallkapillare, welcher eine Spannung anliegt, geleitet. In dem am Kapillarenaustritt bestehenden Taylorkonus akkumulieren Ionen gleicher Ladung und werden in Tröpfchen durch ein zwischen der Kapillare und dem Massenspektrometer befindliches Feld gesprüht. Die geladenen Tröpfchen werden durch das Feld beschleunigt und zum Analysator geleitet. Beim Durchwandern des Feldes verdampft Lösungsmittel der Probe, sodass lediglich die ionisierten Analytmoleküle verbleiben, welche nach ihrem Masse-Ladungsverhältnis aufgetrennt werden. Als Analysator fungierte dabei eine Ionenfalle.

Die so gewonnenen Daten wurden mit den Programmen XCalibur (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) und MagTran⁸³ ausgewertet.

3.6.5 Proteinidentifikation in komplexen Lösungen mittels hochauflösender Massenspektrometrie

Um die wie in Kapitel 3.5.7 und Kapitel 3.5.8 beschrieben produzierten und gereinigten proteolytischen Peptide aus den *Pulldown*-Experimenten zu identifizieren, wurde ein MS-MS/MS basierter Shotgun-Proteomics Ansatz verfolgt, dessen Prinzipien im Folgenden erläutert werden. Die Messung der Proben sowie die Prozessierung und statistische Bewertung der Daten wurden freundlicherweise von Dr. Petra Janning und Andreas Brockmeyer vom HRMS/Proteomics-Service des Max Planck Institutes für molekulare Physiologie übernommen.

Untersucht man ein einzelnes Protein, lässt dieses sich nach tryptischem Verdau oft bereits anhand des Peptidmassen-Fingerabdruckes (engl. auch *mass map* oder *peptide mass fingerprint*) eines normalen MS-Experimentes identifizieren, d.h. am Massenspektrum der proteolytischen Peptide durch Vergleich mit dem theoretischen massenspektrometrischen Profilen der im Genom codierten und in-silico verdauten Proteine. Durch unvollständigen Verdau des Proteins, chemische Modifikationen, fehlende Ionisierung oder zufällige falsch-positive Übereinstimmung der Peptide können beim Peptidmassen-Fingerabdruck jedoch oft nicht alle Proteine angemessen identifiziert werden.⁸⁴ Mit zunehmender Komplexität der verdauten Proteinlösungen verstärkt sich die Problematik soweit, dass keine zuverlässigen Identifikationen mehr möglich sind.

Die in dieser Arbeit durch die *Pulldown*-Experimente gewonnen Proteinlösungen machen daher einen für komplexe Lösungen robusteren und zuverlässigeren Ansatz wie die MS-MS/MS basierte Peptidsequenzierung notwendig, der zudem aufgrund der niedrigen Proteinkonzentrationen mit entsprechend sensitiven und hochauflösenden Geräten umgesetzt wird.^{85,86} Bei diesem Ansatz wird zunächst ein regulärer MS-Scan der verdauten Peptide durchgeführt, dem eine Produktionen-Analyse folgt. Bei der Produktionen-Analyse werden die proteolytischen Peptide als Vorläuferionen in einem ersten Schritt nach ihrem jeweiligen Masse-Ladungs-Verhältnis selektiert, wobei häufig die größten zweifach positiv geladenen Ionen als Vorläuferion gewählt werden, da diese die qualitativ hochwertigsten Daten generieren.⁸⁵ Die jeweiligen Vorläuferionen werden in einem zweiten Schritt in einer Kollisionskammer kontrolliert fragmentiert und das Spektrum dieser als Produktionen bezeichneten Fragmente wird aufgezeichnet (MS/MS-Spektrum). Bei der Kollision entstehen unterschiedliche Fragmente, die je nach Bruchstelle des Peptid-Rückgrates und Ladungsverteilung (N- oder C-terminal) benannt werden. (Siehe Referenz⁸⁵ für Details der Nomenklatur.) Liegt eine Serie gleichartig fragmentierter Ionen vor, entspricht die Massendifferenz benachbarter Peaks im Massenspektrum der Produktionen der Massendifferenz einer Aminosäure, sodass das Vorläuferion anhand der Produktionen sequenziert werden kann (bei niedrigen Kollisionsenergien mit Einschränkung einer Leucin/Isoleucin-Ambiguität, da diese über gleiches Molekulargewicht verfügen). Nach den so sequenzierten Peptiden lässt sich wiederum in einer Datenbank suchen, sodass selbst komplexe Proteinlösungen analysiert werden können.⁸⁵ Dabei werden die Parameter der Experimente so gewählt, dass möglichst viele verschiedene Proteine über ihre zugehörige Peptide identifiziert werden statt eine möglichst gute und vollständige Sequenzabdeckung zu erlangen (sog. *Shotgun*-Ansatz).

Die Messungen der Proben wurden dabei mit einem an ein Nano-HPLC-System gekoppelten Q-Exactive™Hybrid Quadrupole-Orbitrap Massenspektrometer durchgeführt. Abbildung 3.1 zeigt schematisch den Aufbau des Gerätes.

Bei der Aufnahme eines MS-Gesamtspektrums mit dem Q-Exactive Massenspektrometer wird dabei zunächst der hinter die Ionen-Optik geschaltete Quadrupol-Analysator auf Durchgang gestellt. Die Ionen werden in der *C-Trap* gesammelt, zwischengelagert und in

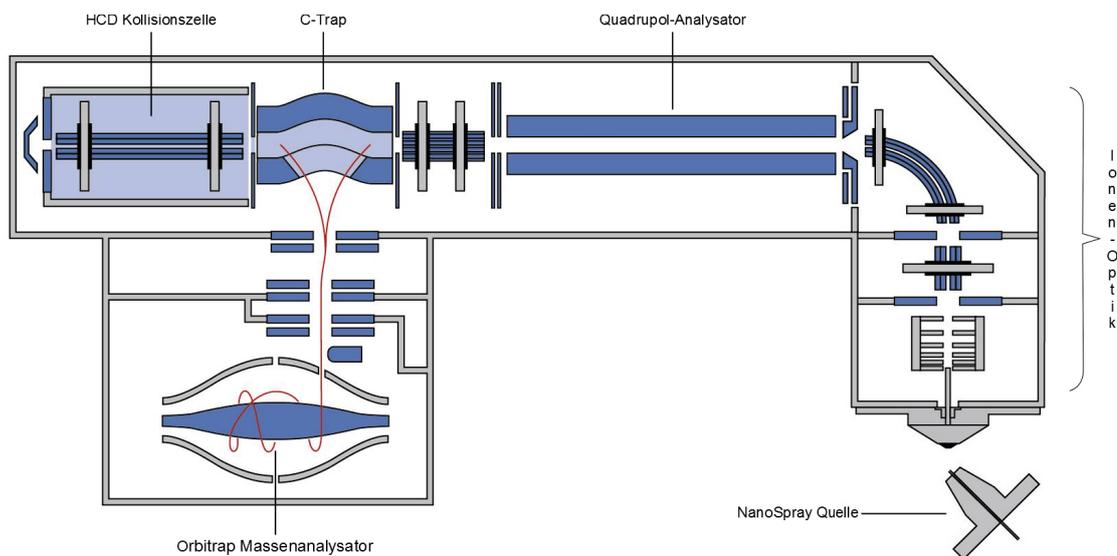


Abbildung 3.1

Schematischer Aufbau des Q-Exactivemassenspektrometers. Abbildung mit Genehmigung nach ⁸⁷

den Orbitrap Massen-Analysator injiziert. Dort oszillieren die injizierten Ionenpakete um die spindelförmige innere Elektrode, sodass ein Strom induziert wird, der über die äußere, koaxial zur inneren Spindelelektrode stehende Elektrode, detektiert wird. Mit Hilfe einer Fourier-Transformation lässt sich das Masse-Ladungs-Verhältnis anhand der Frequenz bestimmen, mit welcher die Ionen oszillieren.⁸⁸

Zur Aufnahme von MS/MS-Spektren werden in dem Q-Exactivemassenspektrometer mit Hilfe des Quadrupol-Analysators zunächst die größten zweifach positiv geladenen Ionen isoliert und zur Fragmentierung in die HCD-Kollisionszelle geleitet. Die dabei entstehenden Produkt-Ionen werden wiederum über die *C-Trap* in den Orbitrap Massenanalysator injiziert, sodass das MS/MS-Spektrum aufgezeichnet werden kann.

Die jeweiligen HPLC- und Massenspektrometrie-Läufe wurden von der HRMS mit den in Tabelle 3.16 aufgelisteten Geräten durchgeführt. Im folgenden sind die Spezifikationen der jeweiligen Läufe beschrieben, welche im wesentlichen Vendrell-Navarro et al.⁸⁹ entnommen sind (Vgl. daher dort für weitere Details):

Die zuvor in 20 µl 0.1 % TFA in ddH₂O resuspendierten und mittels Ultraschall und Zentrifugation geklärten Proben wurden wie folgt mittels Nano-HPLC separiert:

- 3 µl der Probe wurden in eine Vorsäulen-Kartusche injiziert
- Entsalzen der Probe mittels 0.1 % TFA in ddH₂O als Eluent bei einer Flussrate von 30 µl/min für 5 min
- Für den restlichen Lauf wurde die Probe von der Vorsäule zur nano-HPLC-Säule geleitet
- Gradient von 5% Puffer B (0.1 % TFA in Acetonitril) und 95 % Puffer A (0.1 % TFA in ddH₂O) nach 30 % Puffer B und 70 % Puffer A innerhalb von 95 min bei einer Flussrate von 300 nl/min
- Säulentemperatur 40°C
- Waschen der Vorsäule und nano-HPLC-Säule nach dem Probenlauf

Tabelle 3.16
Verwendete Geräte

Gerät	Hersteller
Nano-HPLC: UltiMate™3000 RSLCnano system	Dionex, USA
C18-Säule: Acclaim PepMap RSLC C18, 2 µm, 100 Å, 75 µm ID × 25 cm, nanoViper	Dionex, USA
Vorsäulen-Kartusche: Acclaim PepMap100 C18, 5 µm, 100 Å, 300 µm ID × 5 mm	Dionex, USA
Nano-Spray Emitter: Standard Coated SilicaTip™Emitter, 360 µm OD, 20 µm ID, 10.5 cm	New Objective, USA
Nano-Spray Ionenquelle: Nanospray Flex Ion Source	Thermo Fisher Scientific Inc., USA
Massenspektrometer: Q-Exactive™ Hybrid Quadrupole-Orbitrap Massenspektrometer	Thermo Fisher Scientific Inc., USA

Die massenspektrometrische Analyse erfolgte mit folgenden Parametern:

- Nano-Spray Spannung: 2.1 kV
- Spannweite Massen-Ladungs-Verhältnis: 300 bis 1650
- MS-Gesamtscans bei einer Auflösung von 70000 (bei m/z 200) mit einem Micro-Scan mit einer automatischen Verstärkungsregelung mit einem Ziel von 3×10^6 und einer maximalen Injektionszeit von 20 ms
- Nach Aufnahme des Gesamtspektrums folgten bis zu 10 hochenergetische Kollisionsspaltungen (*high energy collision dissociation*, HCD)-MS/MS Scans der größten zweifach positiv geladenen Ionen bei einer Auflösung von 17500 (bei m/z 200) unter Verwendung einer automatischen Verstärkungsregelung mit einem Ziel von 1×10^5 und einer maximalen Injektionszeit von 120 ms, eines Isolationsfensters von 3 m/z , einer normalisierten Kollisionsenergie (NCE) von 25.0, einem *underfill* Verhältnis von 0.1 %, einer Intensitätsschwelle von 8.3×10^2 sowie eines dynamischen Ausschlusses von 20 s
- Profilspektren wurden sowohl für den MS-Gesamtscan als auch für die MS/MS-Scans aufgenommen

Zur Datenanalyse und Durchsuchung der Datenbank des jeweiligen Organismus (z.B. die Hefedatenbank von SwissProt) wurde die frei zugängliche Software MaxQuant verwendet.⁹⁰ Der Suche lagen folgende Parametereinstellungen zugrunde:

- keine Markierung (*labeling*) der Peptide, labelfreie Quantifizierung (LFQ)
- Modifikationen: Carbamidomethylierung an Cysteinen (fix), Oxidationen von Methionin, Acetylierung des N-Terminus (variabel)
- Maximale Anzahl von Modifikationen/Peptid: 7
- Maximale Ladung der Peptide: 7
- Minimale Länge der Peptide: 7
- *False discovery rate* (FDR): 1 % auf Peptid- und Proteinlevel mit Bezug auf eine *decoy* (= falsche Treffer) Datenbank zur Bestimmung der FDR
- Trypsin-spezifische Peptide mit maximal 2 Fehlsplattungen
- Massengenauigkeit bei Gesamtspektren: 5 ppm
- Massengenauigkeit bei MS/MS-Spektren: 20 ppm

Im Anschluss an die Datenbanksuche via MaxQuant wurden die Daten nach Angaben von Dr. Petra Janning (Abteilung für Chemische Biologie, MPI für Molekulare Physiologie, Dortmund) wie im Folgenden beschrieben gefiltert und statistisch evaluiert:

- Herausgefiltert wurden Proteine, die nicht in mindestens einer Probe oder Kontrolle mit mindestens 2 spezifischen (d.h. *razor + unique*) Peptiden identifiziert wurden, Proteine aus der reversen Datenbank, bekannte Kontaminanten und Proteine, die nur über Seitenketten identifiziert wurden.
- Um eine Aussage über die Signifikanz der Ergebnisse treffen zu können, wurde ein t-Test durchgeführt. Dazu wurden zunächst die Intensitäten nach labelfreier Quantifizierung und Normalisierung (LFQ) zur Basis 2 logarithmiert und zu einer Gruppe der Proben oder zu einer Gruppe der Kontrollen zugewiesen. Alle Proteine, die nicht mindestens zwei LFQ-Quantifizierungen in mindestens einer Gruppe aufwiesen wurden herausgefiltert. Werte, die nicht logarithmiert werden konnten (weil die LFQ-Intensität 0 entsprach), wurden zufällig durch kleine Zahlen anhand der Normalverteilung der restlichen Werte ersetzt. Im Anschluss wurden die Intensitäten der beiden Gruppen mittels t-Test verglichen. Diejenigen Proteine, deren Intensitäten in der Proben-Gruppe sich von denen in der Kontroll-Gruppe unterschied, wurden als signifikant identifiziert eingestuft. (Vgl.⁹¹)

3.6.6 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)

Um den Nukleotidstatus von Rab-Proteinen oder die Nukleotidzusammensetzung nukleotidhaltiger Lösungen zu bestimmen, wurden Proben des jeweiligen Proteins oder der jeweiligen Lösung mittels HPLC (*engl.: high performance liquid chromatography*) analysiert. Bei der hierbei zutrage kommenden Umkehrphasen-Chromatographie werden die Analyten nach ihrer Polarität getrennt. Durch die polaritätsabhängige Wechselwirkung mit der stationären Phase kommt es zu verschiedenen Retentionszeiten, anhand derer die Analyten differenziert werden können.

Als stationäre Phase diente eine C18-Säule (Prontosil 120-5-C18-AQ, Bischoff Analytentechnik und -geräte GmbH, Leonberg), welche mit dem Tetrabutylammoniumbromid (TBABr)-haltigem Elutionspuffer (50 mM Kaliumphosphat pH 6.6, 8 % Acetonitril (25%

bei mant-Nukleotiden), 10 mM TBABr) äquilibriert wurde. Das TBABr fungiert hierbei als Ionenpaarreagenz, d.h. als Tensid bindet es über die Butylgruppen an die unpolaren C18-Reste der Säule und ermöglicht als Ion die Interaktion mit den Nukleotiden, welche hierdurch retardiert werden.

Die Auftrennung wurde mit einem HPLC-System (Bio-Tek Kontron Instruments, Neufahrn, Deutschland) bei einer Flussrate von 1.5 ml/min durchgeführt. Die hierbei eluierten Nukleotide wurden bei einer Wellenlänge von 254nm detektiert und mit dem Laufzeitprofil eines Referenzgemisches aus Guanosin, GMP, GDP, GppNHp und GTP verglichen.

3.7 Strukturbiologische Methoden

Um die Struktur von Proteinen zu bestimmen, wurden in dieser Arbeit Röntgenkristallstrukturanalysen von Proteinkristallen durchgeführt.

3.7.1 Proteinkristallisation

Da die Konditionen, unter denen ein Protein kristallisiert, nicht zu prognostizieren sind, wurde sich im Fall von Ypt7 an den bereits bekannten Bedingungen anderer Ypt7-Konstrukte orientiert. Zusätzlich wurden kommerzielle Screening-Assays (JCSG Core I-IV, JCSG +Suite) mit verschiedenen Bedingungen angewandt. Durch Variation der Konzentrationen der Komponenten, der Proteinkonzentration, der Additive und des pH-Wertes wurden die finalen Kristallisationsbedingungen ermittelt. Ausprobiert wurde dafür sowohl die *sitting-drop* als auch die *hanging-drop* Methode. Die genauen Bedingungen und verwendeten Platten für die jeweiligen Konstrukte sind unter Abschnitt 6.1 des Anhangs zusammengefasst.

3.7.2 Röntgenkristallstrukturanalyse

Aus den Kristallisationsansätzen wurden einzelne Kristalle entnommen, in flüssigem Stickstoff gekühlt und auf ihr Diffraktionsvermögen untersucht. Haben Sie in der Kristallographieeinrichtung des Max-Planck-Institutes hinreichend gut gestreut (Röntgenquelle: MICROSTAR Röntgenquelle, Bruker AXS Inc., Madison, USA; Detektor: Mar345 Image Plate Detektor, Marresearch GmbH, Norderstedt, Deutschland), wurden Sie zum Paul Scherrer Institut in Villigen (Schweiz) gebracht, an dessen Swiss Light Source Röntgenquelle X10SA ein Datensatz aufgenommen wurde.

Ein vollständiger Datensatz wurde von einem einzelnen Kristall erhalten und mittels XDS⁹² prozessiert. Die Strukturlösung erfolgte mittels molekularem Ersatz (phaser⁹³) unter Verwendung der bekannten Struktur von Ypt7:GppNHp (pdb 1KY2). Das Modell wurde anschließend durch manuellen Modellbau in WinCoot⁹⁴ und Verfeinerung in REFMAC5⁹⁵ vollendet (die Datenstatistik ist im Anhang in Kapitel 6.1 dargestellt).

4 Ergebnisse

4.1 Teil 1: Kristallisation und Strukturbestimmung von Ypt7-aGTP

4.1.1 Herstellung und Kristallisation hydrolysedefizienter Ypt7-Konstrukte

Um die Struktur einer mit acryl-GTP modifizierten kleinen GTPase zu bestimmen, wurde die Rab-GTPase Ypt7 aus *S. cerevisiae* verwendet, deren Struktur nach acryl-GDP Modifikation bereits durch Sophie Vieweg bestimmt worden war. Einerseits wurden bereits mehrere Strukturen von Ypt7 veröffentlicht, was den Vergleich mit der Struktur in Komplex mit natürlichen Nukleotiden oder mit GppNHp erleichtert. Andererseits kristallisierte Ypt7 in früheren Experimenten vergleichsweise schnell. Zur Modifikation von Ypt7 mit acryl-Nukleotiden wurde bei dem Protein mittels ortsspezifischer Mutagenese ein Glutamin an Position 35 durch ein Cystein ersetzt. Dies ermöglicht die kovalente Bindung der acryl-Nukleotide via Michael-Addition. Die verwendete Position 35 hat sich in Vorarbeiten von Sophie Vieweg als funktionell neutral herausgestellt und bei der analogen Mutation in Rab1 keine Interferenzen bei der Bindung von Interaktionspartnern verursacht. In ersten Kristallisationsversuchen unter gleichen Bedingungen, in denen die Kristallisation von acryl-GTP-Ypt7_{Q35C} stattgefunden hat, war die intrinsische Hydrolyseaktivität der Rab-Mutante Ypt7_{Q35C} noch zu hoch, um Kristalle der aktiven Konformation der Rab-GTPase zu erhalten. Innerhalb des Zeitraums welcher zur Kristallisation benötigt wurde, lag ein großer Teil des mit acryl-GTP modifizierten Ypt7_{Q35C} bereits in der inaktiven acryl-GDP-Form vor. Um die Hydrolyseaktivität zu senken, wurde mittels ortsspezifischer Mutagenese ein Glutamin an Position 68 nahe des γ -Phosphats durch ein Leucin ersetzt. Von vielen kleinen GTPasen der Ras-Superfamilie mit dieser Mutation ist bekannt, dass sie eine stark reduzierte Hydrolyseaktivität besitzen.^{96,97} Die durch die Mutation Q68L bewirkte Veränderung der Hydrolyserate wurde mittels HPLC bestimmt und entsprach in etwa einer Reduktion um den Faktor 5 ($k_{obs}(Ypt7_{WT}) = 0.10023 \pm 0.004 \text{ h}^{-1}$; $k_{obs}(Ypt7_{Q35C,Q68L}) = 0.02145 \pm 0.00079 \text{ h}^{-1}$).

Für die initialen Kristallisationsexperimente mit dem acryl-GTP modifizierten Konstrukt Ypt7_{Q35C,Q68L} wurden Qiagen JCSG Core I-IV Hochdurchsatztests verwendet. Getestet wurde mittels *sitting-drop* Methode bei einer Proteinkonzentration von 13.75 mg/ml und 27 mg/ml sowie einer Temperatur von 20°C. Konglomerate sehr dünner, nadelartiger und fragiler Kristalle bildeten sich innerhalb von 1-3 Tagen insbesondere bei Kristallisationspuffern auf Basis von PEG 3350 mit einer Konzentration zwischen 20-30% w/v und diversen Salzen wie LiCl, LiNO₃, KNO₃, NH₄NO₃ oder MgCl₂ als weiteren Inhaltsstoffen des Puffers. Sofern bei den Kristallen eine hinreichende Diffraktion festzustellen war, zeigten jedoch sämtliche gelösten Strukturen dieser Kristalle die acryl-GDP-Form der GTPase. Daher wurde zusätzlich versucht, das durch die Hydrolyse entfernte γ -Phosphat mittels eines Mimetikums (AlF_x oder BeF_x) zu ersetzen. Die gelöste molekulare Struktur der dabei resultierenden Kristalle zeigte allerdings, dass auch dieser Ansatz erfolglos war (Daten nicht gezeigt). Diese Experimente zeigen, dass die Reduktion der Hydrolyse noch nicht ausreichte, um im Zeitrahmen der Kristallisation vorwiegend Kristalle von acryl-GTP-Ypt7 zu erhalten.

Bei anderen Rab-GTPasen mit der zu Q68L analogen Mutation fällt die relative Senkung der Hydrolyseaktivität zum Teil deutlich stärker aus. Sie entspricht etwa im Falle der Rab-GTPase Ypt1 einer Reduktion um das 25-Fache bei intrinsischer Hydrolyse.⁹⁶ Daher wurde nach einer Strategie gesucht, die Aktivität weiter zu senken. Basierend auf einem Vergleich der überlagerten Strukturen von Rab1b (PDB-ID: 3NKV), dem humanen Ypt1-Homolog, und Ypt7 (PDB-ID: 1KY2) wurde nach weiteren Positionen im Radius von 7Å des γ -Phosphats gesucht, die sich zwischen Rab1b und Ypt7 unterscheiden. Da diese Unterschiede möglicherweise eine Rolle bei der intrinsischen Hydrolyse spielen, könnte das zusätzliche Angleichen solcher Positionen von Ypt7 an Rab1 die Hydrolyserate weiter senken.

Durch den Vergleich wurden die Positionen 38 und 39 in Ypt7 identifiziert: statt eines Lysins an Position 38 und eines Alanins an Position 39 befinden sich an den analogen Positionen in Rab1b ein Isoleucin bzw. Serin (Vgl. Abbildung 4.1).

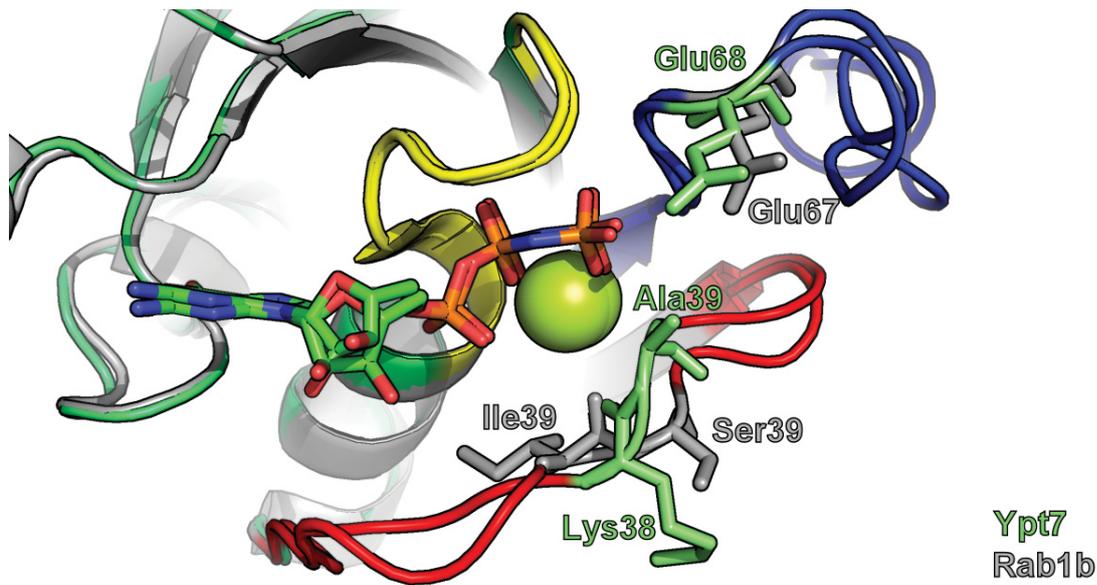
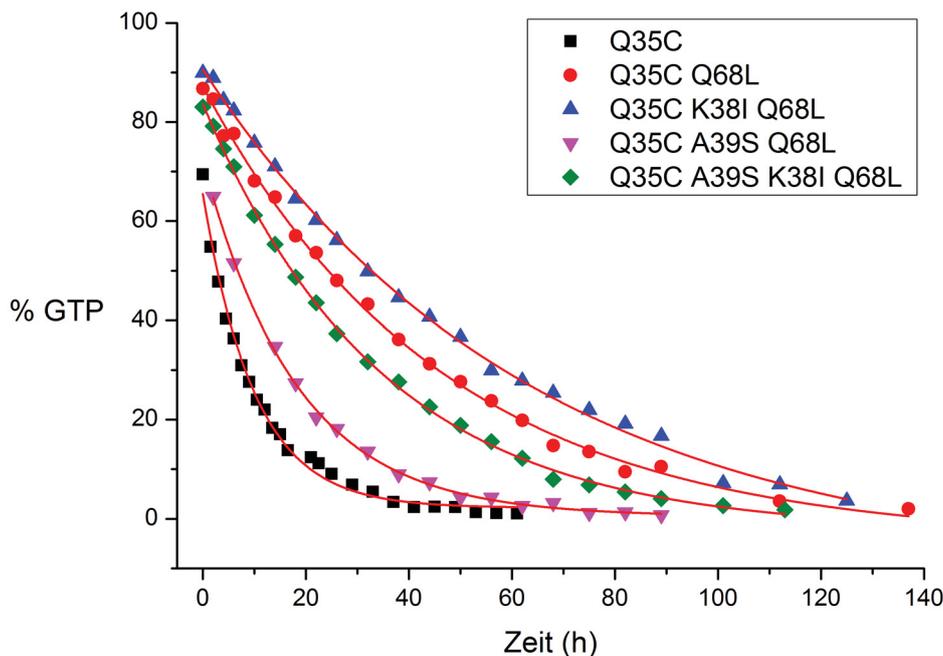


Abbildung 4.1

Vergleich der überlagerten Strukturen von Rab1b (grau) und Ypt7 (grün). Innerhalb eines Radius von 7Å um das γ -Phosphat (orange) unterscheiden sich die Positionen 38 (Lysin) und 39 (Alanin) in Ypt7 von denen in Rab1b (Isoleucin 38 und Serin 39). Ebenfalls hervorgehoben sind die Regionen *P-loop* (gelb), *switch I* (rot) und *switch II* (blau).

Dementsprechend wurden weitere Ypt7-Konstrukte mittels ortsspezifischer Mutagenese erstellt: Ypt7_{Q35C,K38I,Q68L}, Ypt7_{Q35C,A39S,Q68L} und Ypt7_{Q35C,K38I,A39S,Q68L}. Nach erfolgreicher Expression und Aufreinigung wurde die intrinsische Hydrolyserate aller Konstrukte mittels HPLC bestimmt und miteinander verglichen. Dabei stellte sich das Konstrukt Ypt7_{Q35C,K38I,Q68L} als dasjenige mit der niedrigsten Hydrolyseaktivität heraus ($k_{obs} = 0.01578 \pm 0.00069 \text{ h}^{-1}$), wohingegen die zusätzliche Mutation A39S einen gegenteiligen Effekt zu haben scheint (Abbildung 4.2). Das Konstrukt Ypt7_{Q35C,K38I,Q68L} wurde daher für alle weiteren Kristallisationsversuche verwendet.

Um nach Kristallisationsbedingungen für das acryl-GTP-modifizierte Konstrukt Ypt7_{Q35C,K38I,Q68L} zu suchen, wurden wiederum Qiagen JCSG Core I-IV Hochdurchsatztests via *sitting-drop* Methode angewandt. Die Proteinkonzentrationen betragen 14.5 und 29 mg/dl. Zusätzlich wurden die Kristallisationsansätze bei 4°C durchgeführt, um die Hydrolysereaktion weiter zu verzögern. Kristalle wurden wiederum in verschiedenen Bedin-



Konstrukt	$k_{obs} \pm \text{Fehler} [h^{-1}]$
Ypt7 _{Q35C}	0.10023 \pm 0.004
Ypt7 _{Q35C,Q68L}	0.02145 \pm 7.9×10^{-4}
Ypt7 _{Q35C,K38I,Q68L}	0.01578 \pm 6.9×10^{-4}
Ypt7 _{Q35C,A39S,Q68L}	0.0548 \pm 1.26×10^{-3}
Ypt7 _{Q35C,K38I,A39S,Q68L}	0.02868 \pm 6.07×10^{-4}

Abbildung 4.2

Intrinsische Hydrolyserate mutierter Ypt7-Konstrukte. Angepasste Kurven sind in rot dargestellt.

gungen auf Basis von PEG 3350 gefunden, welche morphologisch den Nadelkonglomeraten der vorherigen Konstrukte ähnelten. Da die Kristalle auf den größeren Kristallisationsplatten nicht reproduzierbar waren, wurde versucht die Kristalle mittels Aussaat von Kristallfragmenten zu reproduzieren, was jedoch ebenfalls erfolglos war.

Zur weiteren Optimierung wurden Hochdurchsatztests mit verschiedenen Additiven für einige der Grundbedingungen, bei denen Kristalle wuchsen, durchgeführt. Hierzu wurde die Qiagen JCSG +Suite verwendet. Unter der Bedingung 0.2 M LiCl, 20% w/v PEG 3350, 0.01 M Yttrium(III)-chlorid-hexahydrat und bei einer Proteinkonzentration von 29 mg/ml wurden dabei Kristalle neuer Morphologie gefunden. Die in Abbildung 4.3 gezeigten zylindrischen Kristalle streuten an der institutseigenen MICROSTAR Röntgenquelle (Bruker AXS Inc.) bis etwa 3 Å. Ein erster ebenda aufgenommener Datensatz zeigte nach Prozessierung jedoch, dass die Position des an der Nukleotidbindung beteiligten Mg²⁺-Ions nicht vollständig besetzt war. Dieses Problem konnte durch die Erhöhung der MgCl₂-Konzentration auf 5 mM im Proteinpuffer gelöst werden. Die mit dem neuen Proteinpuffer wiederholten Kristallisationsansätze waren bei sonst gleichen Kristallisati-

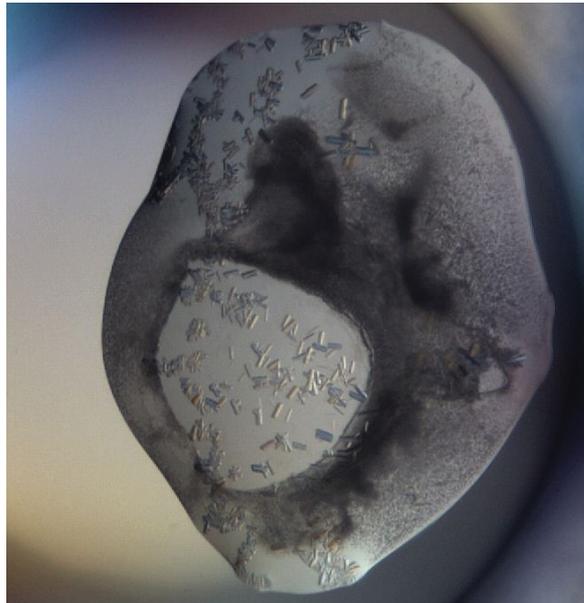


Abbildung 4.3

Kristalle von aGTP-Ypt7₁₋₁₈₂ Q35C K38I Q68L bei einer Proteinkonzentration von 29 mg/ml, 4°C. Kristallisationspuffer zusammengesetzt aus 0.2 M LiCl, 20% w/v PEG 3350 und 0.01 M Yttrium(III)-chlorid-hexahydrat.

onsbedingungen reproduzierbar. Ein Datensatz dieser Kristalle wurde an der Swiss Light Source Röntgenquelle des Paul Scherrer Institut in Villigen (Schweiz) aufgenommen und führte zur Lösung der Struktur von acryl-GTP modifiziertem Ypt7_{Q35C,K38I,Q68L}.

4.1.2 Die Struktur von acryl-GTP modifiziertem Ypt7_{Q35C,K38I,Q68L}

Die gelöste molekulare Struktur von aGTP-Ypt7_{Q35C,K38I,Q68L} (Abbildung 4.4(a)) wurde mit der Struktur von Ypt7-GppNHp (Abbildung 4.4(b)) verglichen, welche als Referenz für die aktive Konformation des nativen Proteins diente. Hierbei zeigte sich zum einen, dass die Acrylverbindung zwischen dem Protein und dem Nukleotid ausreichend Flexibilität gewährleistet, um die reguläre Bindung des Nukleotids in der Bindungstasche zu ermöglichen (Abbildung 4.4(a)). Ein Vergleich durch virtuelle Überlagerung beider Strukturmodelle in PyMOL zeigte zudem, dass nur sehr geringe strukturelle Unterschiede zwischen beiden Ypt7-Varianten vorhanden sind (rmsd = 0.382 Å) (Abbildung 4.4(c)). Von Relevanz sind in diesem Zusammenhang die Strukturen der *P-loop* Region sowie insbesondere der *switch I* und *switch II* Regionen. Letztere unterliegen, wie eingangs erwähnt, bei Änderung des Nukleotidstatus den stärksten Konformationsänderungen und stellen die wesentlichen strukturellen Voraussetzungen für die Interaktion mit Effektoren dar. Sie sind somit für die Funktionalität kleiner GTPasen unabdingbar. Die hohe strukturelle Übereinstimmung auch in diesen Regionen deutet daher darauf hin, dass der eingeführte Linker zwischen Protein und Nukleotid die aktive Konformation und die Funktionalität des Proteins nicht beeinträchtigt.

Die Struktur von aGTP-Ypt7_{Q35C,K38I,Q68L} wurde in der PDB-Datenbank unter der Kennung 4PHG hinterlegt und veröffentlicht. Die Statistiken zur Röntgenkristallstrukturanalyse sind im Anhang unter Kapitel 6.1 zu finden.

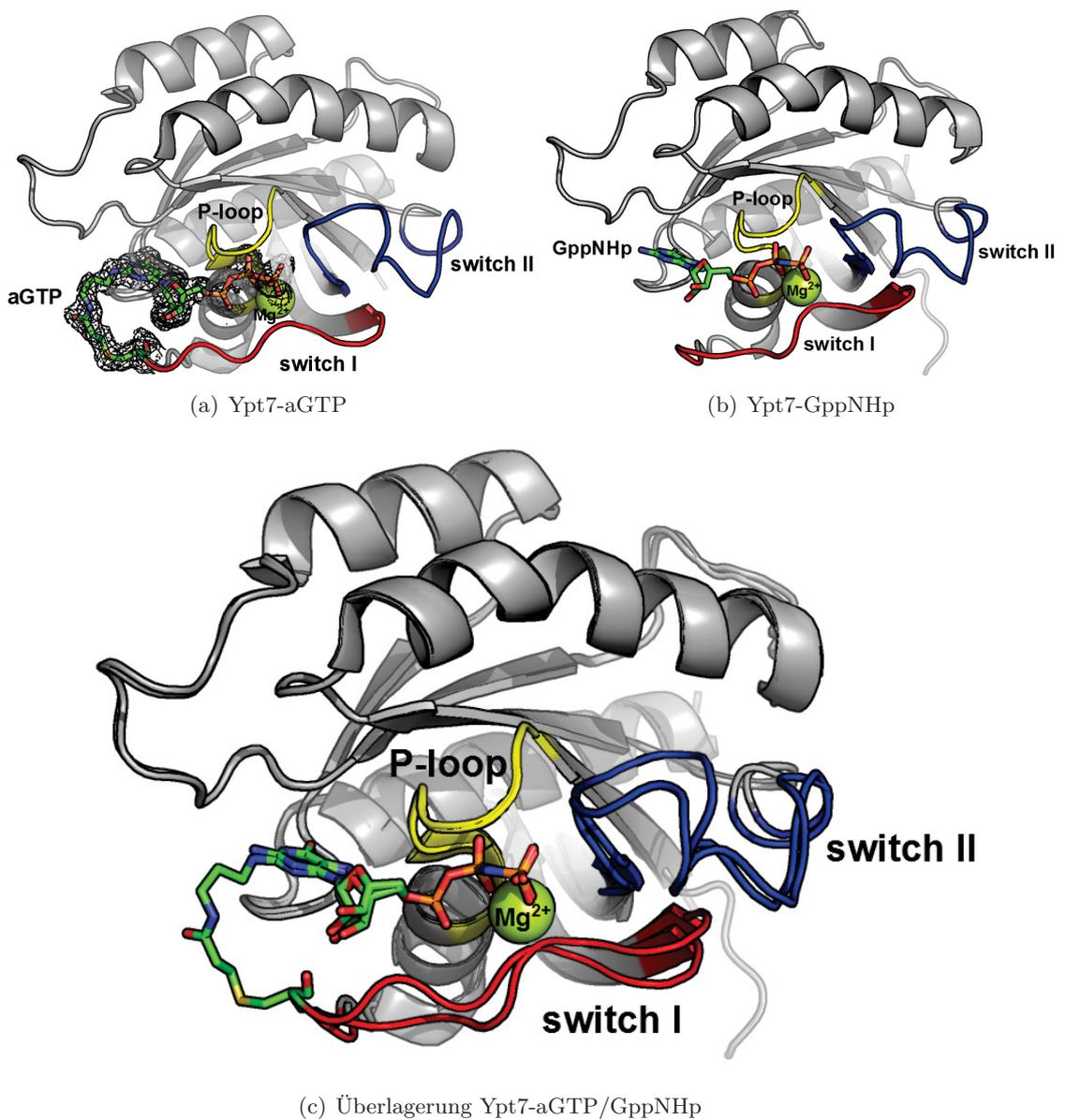


Abbildung 4.4

Vergleich der Strukturen von Ypt7 in aGTP-gebundener (a) und GppNHp-gebundener (b) Variante (PDB Zugangsnummer 1KY2). Hervorgehoben sind jeweils die *switch I* und *switch II* Regionen in rot bzw. blau, die P-loop Region in gelb, das an der Bindung der Phosphate beteiligte Magnesium-Ion in hellgrün und das jeweilige Nukleotid. Zusätzlich zu dem Stab-Modell des acryl-GTPs ist in (a) die Karte der Elektronendichte als schwarzes Gitter eingeblendet. (c) zeigt die direkte Überlagerung beider Modelle (rmsd = 0.382 Å).

4.2 Teil 2: Weiterentwicklung und Optimierung eines *Pulldown*-Protokolls zur Anreicherung und Identifikation von Rab-GEFs

4.2.1 Reproduktion der initialen *Pulldown*-Experimente

Um das von Timon Friese etablierte Protokoll der *Pulldown*-Experimente zu optimieren, wurden zunächst die Ergebnisse mit Rab1b und der GEF-Domäne des Legionellenproteins DrrA reproduziert (verwendetes Konstrukt: DrrA_{340–647}, die GEF Domäne entspricht den Aminosäuren 340–520). Dabei wurde zuerst das Rab-Protein wie in Kapitel 3.5.5 beschrieben biotinyliert und der Erfolg der Reaktion mittels ESI-MS kontrolliert. Die eigentlichen *Pulldown*-Experimente wurden wie in Kapitel 3.5.6 beschrieben durchgeführt. Die Inkubationsschritte erfolgten mit *E. Coli* BL21-CodonPlus (DE3)-RIL Lysat, welchem die DrrA GEF-Domäne bis zu einer Endkonzentration von 5 μ M exogen zugegeben wurde. Die SDS-PAGE der einzelnen Probenfraktionen zeigt das Signal während der jeweiligen (Zwischen-)Schritte (Abbildung 4.5).

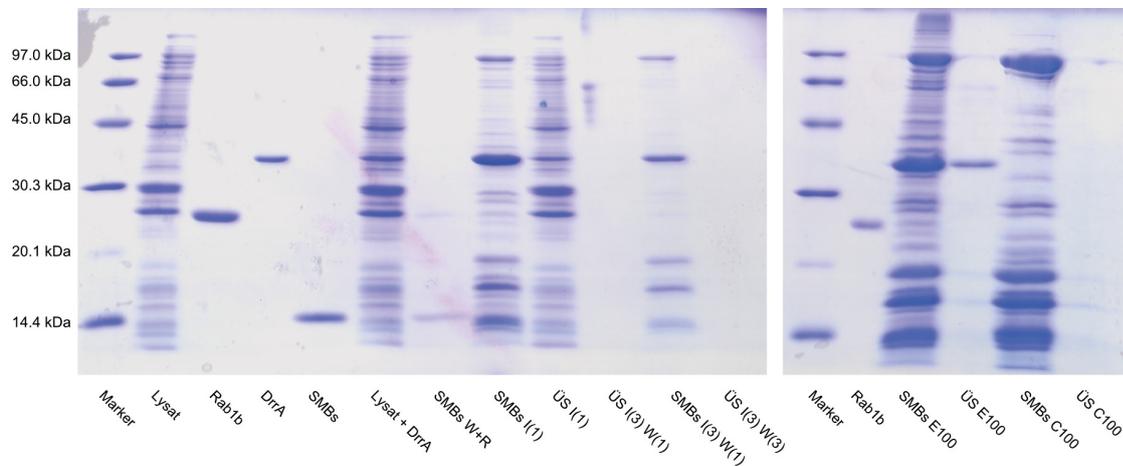


Abbildung 4.5

Reproduktion des *Pulldowns* der DrrA GEF-Domäne mittels Rab1b. Fraktionen von links nach rechts: Marker als Größenreferenz, Referenzen für Lysat, Rab-Köder, DrrA_{340–647}, Hintergrundsignal der SMBs, Lysat nach Zugabe von DrrA; SMBs W+R: Probe nach Waschen der SMBs und Bindung des Rab-Köders, SMBs I(1): Probe der SMBs nach dem ersten Inkubationszyklus, ÜS I(1): Probe des Überstands nach dem ersten Inkubationszyklus, ÜS I(3) W(1): Probe des Überstands nach dem ersten Waschzyklus nach dem letzten Inkubationszyklus, SMBs I(3) W(1): Probe der SMBs nach dem ersten Waschzyklus nach dem letzten Inkubationszyklus, ÜS I(3) W(3): Probe des Überstands nach dem letzten Waschzyklus nach dem letzten Inkubationszyklus, SMBs E100: Probe der SMBs nach Elution mit PBS a 100 μ M GTP, ÜS E100: Probe der Elutionsfraktion mit PBS a 100 μ M GTP, SMBs C100: Probe der SMBs der Negativkontrolle nach Elution mit PBS a 100 μ M GTP, ÜS C100: Probe der Elutionsfraktion mit PBS a 100 μ M GTP der Negativkontrolle.

Wie die Spalte ÜS E100 zeigt, konnte die DrrA GEF-Domäne nach Anreicherung durch das Waschen der SMBs mit 100 μ l PBS a 100 μ M GTP relativ spezifisch eluiert werden. Die entsprechende Spalte der Negativkontrolle ÜS C100 zeigt hingegen keine Bande auf Höhe der DrrA-Referenz. Ein Vergleich der SMBs-Fraktionen nach Elution zeigt, dass DrrA an den Rab1b-beschichteten SMBs angereichert wurde (Spalte SMBs E100), nicht aber den SMBs der Negativkontrolle ohne Rab1b (Spalte SMBs C100). Ein Vergleich der Spalten SMBs E100 und ÜS E100 zeigt allerdings auch, dass nach der Elution noch ein großer Teil der DrrA GEF-Domäne an den SMBs verblieb und nicht eluiert wurde.

4.2.2 Optimierung der *Pulldown*-Experimente

Variation der GTP-Konzentration in der Elutionslösung

Um als eine erste Optimierungsmaßnahme die Ausbeute des eluierten GEFs zu erhöhen, wurde in einer zweiten Versuchsreihe die GTP-Konzentration der Elutionslösung erhöht. Grund hierfür war die Annahme, dass die Nukleotidbindung und damit die Aufhebung der Rab/GEF-Komplexe sich unter höherer GTP-Konzentration verbessert.

Als Rab/GEF-Paar wurde wiederum Rab1b und die DrrA GEF-Domäne verwendet, von welcher bis zu einer Endkonzentration von 5 μM exogen zu *E. Coli* BL21-CodonPlus (DE3)-RIL Lysat gegeben wurde. Es wurden vier technische Replikate des *Pulldown*-Experimentes samt einer Negativkontrolle ohne Rab1b-Köder durchgeführt. Nach den Inkubationszyklen wurde die GEF-Domäne mit jeweils 250 μM , 500 μM , 1 mM und 10 mM GTP eluiert. Im Falle der Negativkontrolle wurde mit 250 μM GTP eluiert.

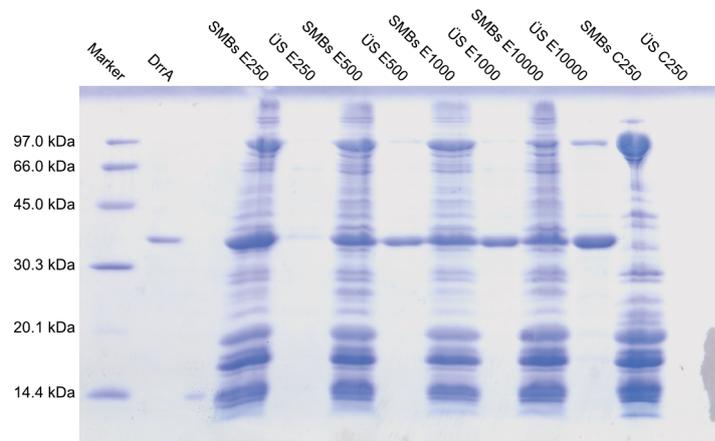
Abbildung 4.6 (a) zeigt das Coomassie-gefärbte Gel nach SDS-PAGE mit den SMBs und den Überständen nach Elution. Wie zu sehen ist, steigt mit zunehmender GTP-Konzentration der Anteil der eluierten DrrA GEF-Domäne in den Überständen, bzw. sinkt der auf den SMBs verbleibende Anteil. Zusätzlich zeigte sich jedoch im Überstand der 10 mM Elutionsfraktion eine zweite Bande etwa auf Höhe der 97 kDa Referenzbande. Weitere, nur sehr schwach sichtbare Banden zeigten sich zudem in allen Spalten der Überstände. Um diese vermutlich ko-eluierten Proteinbanden sichtbar zu machen, wurde das Gel zunächst durch Lagerung in Aceton entfärbt und anschließend mit sensitiveren Methoden erneut eingefärbt (Abbildung 4.6 (b) und (c)). Wie die kolloidale Coomassie-Färbung und insbesondere die Silbernitrat-Färbung zeigt, steigt mit zunehmender GTP-Konzentration auch die Elution anderer Proteine. Vor allem die Spalte ÜS E10000 zeigt in der Silbernitrat-Färbung einen hohen Anteil weiterer Proteinbanden. Eine Erklärung hierfür wäre, dass GTP in zu hohen Konzentrationen nicht nur durch Bindung an die Rab-Proteine das GEF eluiert, sondern durch ionische Wechselwirkungen auch die unspezifisch gebundenen Proteine aufgrund der hohen Ionenstärke von den SMBs löst.

Für die weiteren *Pulldown*-Experimente wurde folgendes Prozedere gewählt: In einem ersten Elutionsschritt wurde mit 100 μl PBS einer GTP-Konzentration von 500 μM eluiert. Bei dieser Konzentration zeigen Abbildung 4.6 (a)-(c) eine Elutionsausbeute von schätzungsweise 50% im Überstand, sowie eine deutlich höhere Ausbeute gegenüber einer Elution mit 100 μM und 250 μM GTP. Zudem ist die Ausbeute der DrrA GEF-Domäne gegenüber einer Elution mit 1000 μM nicht wesentlich geringer bei gleichzeitig deutlich geringerer Elution unspezifisch gebundener Proteine im Vergleich zu einer GTP-Konzentration von 10 mM. In einem zweiten Elutionsschritt wurde anschließend mit 100 μl PBS einer GTP-Konzentration von 10 mM eluiert, um die verbleibenden GEF-Proteine ebenfalls von den SMBs zu lösen. Da die zweite Elutionsfraktion erwartungsgemäß stärker durch unspezifisches Material verunreinigt sein sollte, wurde diese separat zu der ersten analysiert.

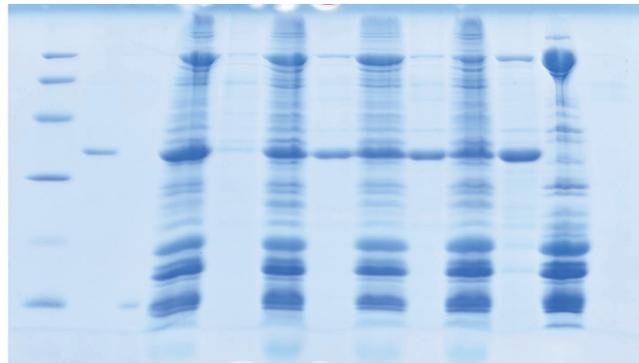
Bestimmung der SDS-PAGE-Nachweisgrenze des eluierten GEFs

In einer weiteren Versuchsreihe wurde die Konzentration der exogen zugegebenen DrrA GEF-Domäne zunehmend verringert, um eine optische Nachweisgrenze für die SDS-PAGE-Analyse der *Pulldown*-Experimente zu bestimmen.

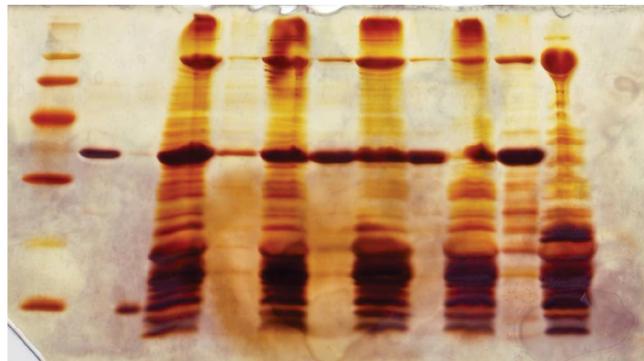
Wie zuvor wurde Rab1b und die DrrA GEF-Domäne als Rab/GEF-Paar verwendet. Die *Pulldown*-Experimente wurden mit Lysat durchgeführt, welchem die DrrA GEF-Domäne exogen bis zu einer Endkonzentration von 1, 0,2, 0,04 und 0,008 μM zugegeben wurde. Wie Abbildung 4.7 (a) zeigt, ließ sich die DrrA GEF-Domäne mit kolloidaler Coomassie-



(a) Coomassie-Färbung



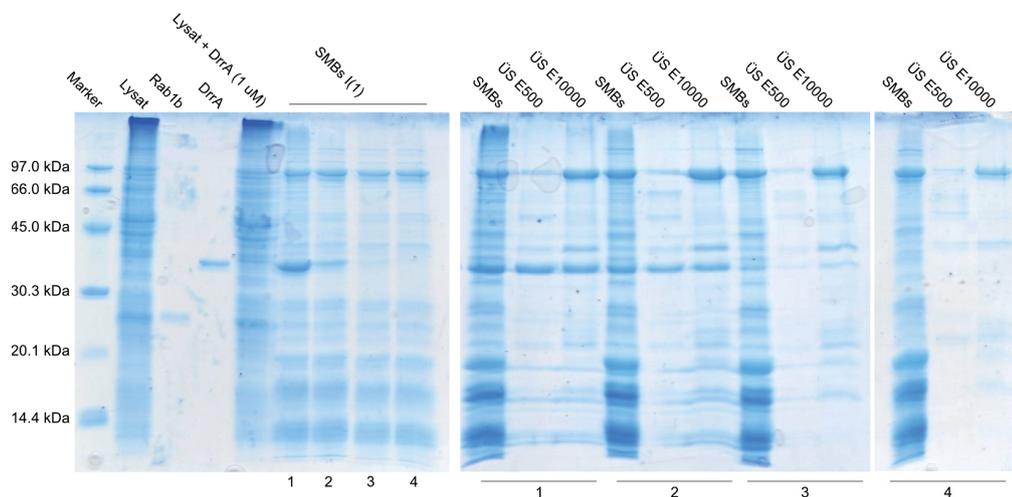
(b) Kolloidale Coomassie-Färbung



(c) Silbernitrat-Färbung

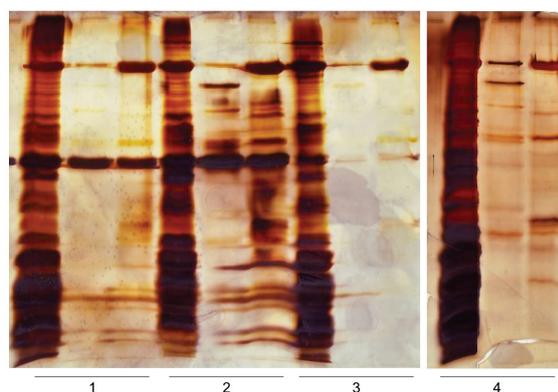
Abbildung 4.6

Pulldown-Experimente unter Variation der GTP-Konzentration der Elutionslösung. Gezeigt sind neben Größenmarker und Referenz der DrrA GEF-Domäne die SMBs und die Überstände der Elutionsfraktionen (E X , wobei X die GTP-Konzentration in μM bezeichnet).



(a) Kolloidale Coomassie-Färbung

1 = 1 nmol DrrA / ml Lysat
 2 = 0.2 nmol DrrA / ml Lysat
 3 = 0.04 nmol DrrA / ml Lysat
 4 = 0.008 nmol DrrA / ml Lysat



(b) Silbernitrat-Färbung

Abbildung 4.7

Pull-down-Experimente unter Variation der DrrA-Konzentration des Lysats zur Bestimmung der optischen Nachweisgrenze der SDS-PAGE.

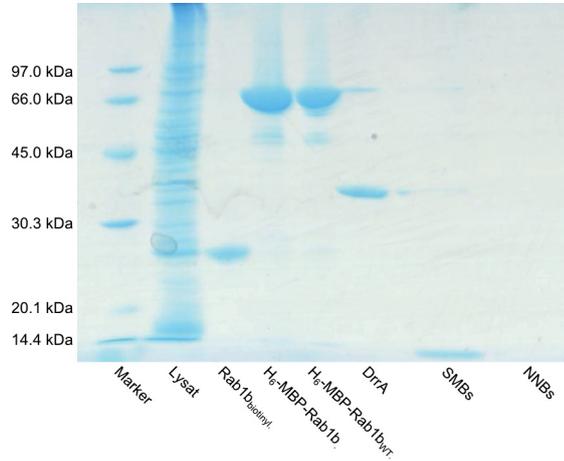
Färbung noch bei einer Ausgangskonzentration von 0.04 μM in beiden Elutionsfraktionen gut nachweisen (Spalten ÜS E500 und ÜS E10000 des dritten *Pull-down*-Experiments). Bei einer Ausgangskonzentration von 0.008 μM war dies immerhin noch in der zweiten Elutionsfraktion der Fall (Spalte ÜS E10000 des vierten *Pull-down*-Experiments). Wie in Abbildung 4.7 (b) zu sehen, ließ sich mit einer Silbernitrat-Färbung die DrrA GEF-Domäne auch bei einer Ausgangskonzentration von 0.008 μM in beiden Elutionsfraktionen deutlich nachweisen.

Test einer alternativen Anreicherungsmatrix: Nickel-NTA-Beads

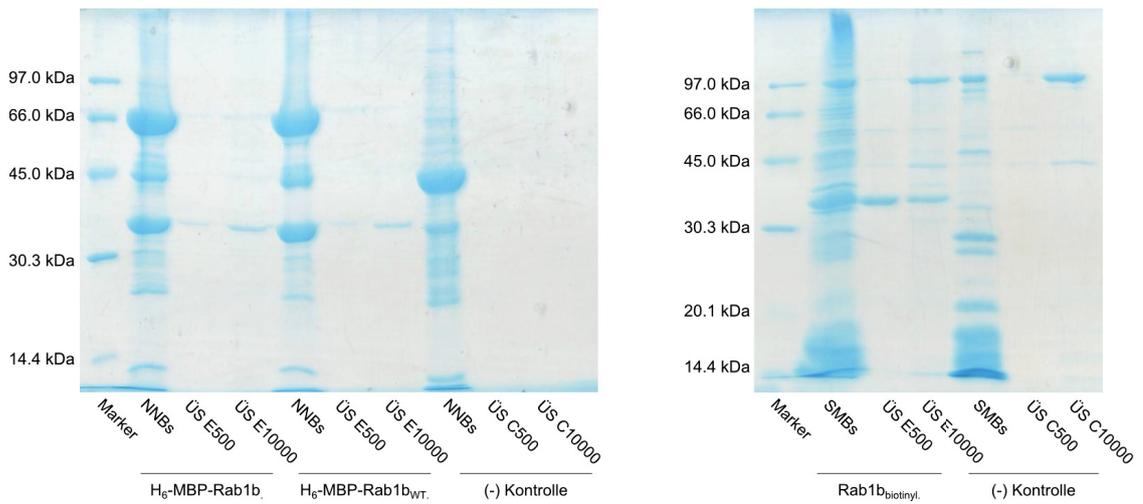
Die bislang beschriebenen *Pull-down*-Experimente wurden sämtlich mit biotinylierten Rab-GTPasen durchgeführt. Da jedoch die Biotinylierung des Köder-Proteins einen weiteren Schritt zwischen Proteinaufreinigung und dem eigentlichen *Pull-down*-Experiment darstellt, wurde versucht, dieses Prozedere zu vereinfachen. Vielen der im Labor dieser Arbeitsgruppe verwendeten Konstrukte von Rab-Proteinen wurde zu Aufreinigungszwecken ein Hexahistidin(His₆)-Affinitätsanker angefügt, welcher normalerweise vor dem letzten Aufreinigungsschritt enzymatisch abgespalten wird. Es bestand daher die Idee, den letzten Reinigungsschritt auszulassen und den His₆-Affinitätsanker nicht abzuspalten,

sondern die *Pulldown*-Experimente direkt nach der Reinigung unter Ausnutzung des His₆-Affinitätsankers durchzuführen. Als Anreicherungsmatrix fungierten in diesem Fall *Nickel-NTA-Beads* (im weiteren als NNBs bezeichnet). Als Rab/GEF-Paar wurden wiederum Rab1b und die DrrA GEF-Domäne verwendet. Die verwendeten Rab-Konstrukte waren das mit einem Aminosäureaustausch modifizierte Rab1b_{L125C} samt nicht abgespaltenen His₆-Affinitätsankers und Maltose-bindendem Protein (MBP) sowie die Wildtyp-Variante von Rab1b, bei welcher ebenfalls MBP und His₆-Affinitätsankers nicht abgespalten wurden. Die DrrA GEF-Domäne wurde bis zu einer Endkonzentration von 5 µM exogen zu *E. Coli* BL21-CodonPlus (DE3)-RIL Lysat gegeben. Das Prozedere des *Pulldown*-Experimentes blieb unverändert.

Wie Abbildung 4.8 (b) zeigt, ist das Eluat nach SDS-PAGE optisch weniger verunreinigt. Allerdings ist auch die Ausbeute der eluierten DrrA GEF-Domäne unter Verwendung von His₆-MBP-Rab1b Ködern und NNBs im Vergleich zu den bisherigen Experimenten wesentlich geringer, obwohl anhand der entsprechenden Banden die Beladung der NNBs mit DrrA sehr hoch erscheint. Obgleich optisch nicht erkennbar, wäre es möglich, dass es zum Verlust eines Teils der Rab-Köderproteine während des Waschvorganges aufgrund einer im Vergleich zu Biotin und Streptavidin geringeren Wechselwirkung zwischen dem Affinitätsanker und den NNBs kommt. Alternativ kommt eine Reduktion der Effizienz der Elution mit GTP oder eine stärkere unspezifische Anreicherung von DrrA zur Erklärung infrage. Eine verringerte Effizienz der Elution könnte durch Interaktion zwischen dem in den NNBs komplexierten Nickel mit GTP zustande kommen. Unspezifisch angereichertes DrrA würde durch GTP nicht spezifisch eluiert werden und somit ebenfalls die verringerte Effizienz erklären. Auch denkbar wäre, dass aufgrund des MBPs eine größere Fraktion von fehlgefaltenem Rab1 in Lösung gehalten wird, sodass weniger Rab1 für die spezifische Anreicherung von DrrA zur Verfügung steht. In allen weiteren *Pulldown*-Experimenten wurden daher wieder biotinylierte Rab-Köder und SMBs verwendet.



(a) Referenzspalten von Lysat, Köder, DrrA und SMBs bzw. NNbs



(b) Elutionsfraktionen bei unterschiedlicher Anreicherungsmatrix (NNbs bzw. SMBs) und unterschiedlichen Köder-Konstrukten

Abbildung 4.8

Pulldown-Experimente unter Variation der Anreicherungsmatrix und unterschiedlichen Rab1-Köderkonstrukten.

Fluoreszenzspektroskopische Analyse der Austauschaktivität des Eluats aus *Pulldown*-Experimenten mit endogen exprimierten GEFs

Nachdem die bisherigen *Pulldown*-Experimente stets mit exogen zu dem Lysat gegebenem GEF durchgeführt wurden, sollten weitere Experimente die Funktionsweise des Prinzips auch mit endogen exprimierten GEF-Proteinen belegen. Auch hierzu wurden bereits erste Experimente von Timon Friese mit Sec4 und *Saccharomyces cerevisiae*-Lysat durchgeführt, die allerdings keine eindeutige Aussage zuließen. Erste eigene Experimente mit biotinyliertem Sec4, deren Ziel es war, endogen exprimiertes Sec2 aus Lysat des *Saccharomyces cerevisiae* Stammes BJ5459 zu isolieren, ergaben ähnliche Ergebnisse: Wie Abbildung 4.9 zeigt, lässt sich in der SDS-PAGE der Elutionsfraktionen keine deutliche Bande zwischen der 97 kDa und 66 kDa Referenz des Markers ausmachen. In diesem Bereich würde man bei einer theoretischen Masse von circa 85 kDa eine Bande für Sec2 erwarten.

Um auf anderem Weg zu testen, ob Proteine mit GEF-Aktivität bei dem *Pulldown*-Experiment isoliert worden sind, wurde das Eluat wie in Kapitel 3.5.9 beschrieben fluoresszenzspektroskopisch auf das Vermögen hin untersucht, die Nukleotidaustauschrates von Sec4 zu stimulieren. Abbildung 4.10 zeigt, dass die Zugabe von Eluat die Nukleotidaustauschrates von Sec4 stimulieren kann. Die Höhe der Stimulation ist darüber hinaus Abhängig von der Konzentration des Eluats. Dies zeigt, dass Proteine mit GEF-Aktivität gegenüber Sec4 in dem *Pulldown*-Experiment mit *Saccharomyces cerevisiae*-Lysat angereichert werden konnten. Eluat aus den Negativkontrollen zeigten hingegen keine Stimulation der Nukleotidaustauschrates von Sec4.

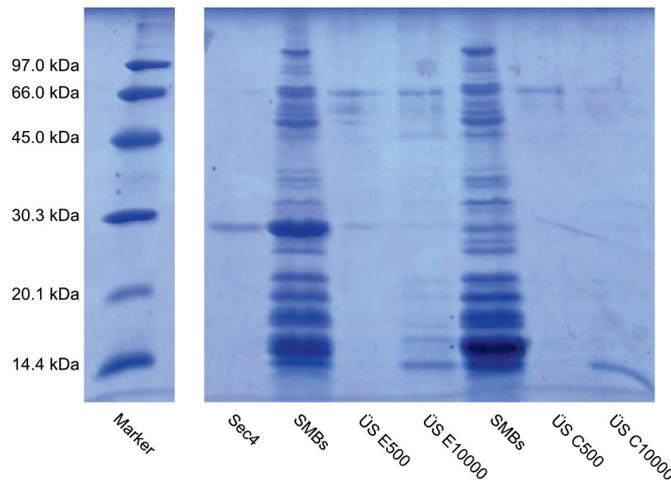
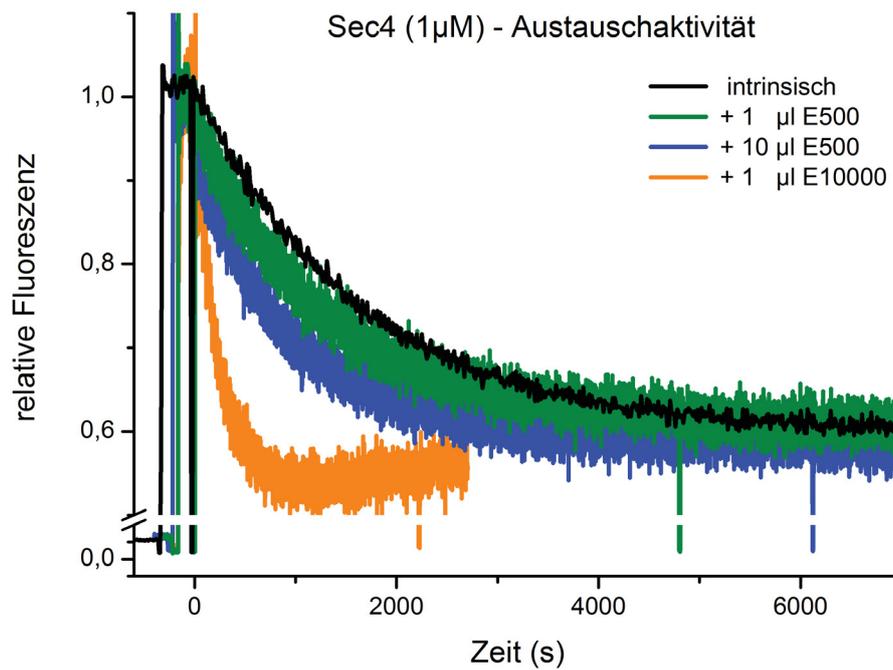


Abbildung 4.9

Pulldown-Experiment mit biotinyliertem Sec4 und *Saccharomyces cerevisiae*-Lysat (Stamm BJ5459).



Messung & Kurve	$k_{obs} \pm \text{Fehler} [s^{-1}]$
Sec4 intrinsisch	$(6.15 \pm 0.031) \times 10^{-4}$
Sec4 + 1 μl E500	$(7.71 \pm 0.066) \times 10^{-4}$
Sec4 + 10 μl E500	$(9.12 \pm 0.062) \times 10^{-4}$
Sec4 + 1 μl E10000	$(48.11 \pm 0.885) \times 10^{-4}$

Abbildung 4.10

Nukleotidaustauschraten von Sec4 in Abhängigkeit der Zugabe von Eluat aus *Pulldown*-Experimenten mit *Saccharomyces cerevisiae*-Lysat. Die schwarze Kurve zeigt die intrinsische Austauschreaktion von Sec4, die grüne, blaue und orange Kurve die Austauschreaktion von Sec4 unter Zugabe unterschiedlicher Volumina der Eluatfraktionen E500 und E10000. Die aus der Kurvenanpassung erhaltenen Ratenkonstanten des Nukleotidaustausches sind in der unteren Tabelle angegeben.

Optimiertes Protokoll für die *Pulldown*-Experimente

Nach den oben beschriebenen Experimenten zur Optimierung der *Pulldown*-Experimente und dem Nachweis, dass es sich auch zur Anreicherung endogen exprimierter GEFs aus zellulären Lysaten eignet, wurden alle weiteren Experimente nach folgendem Protokoll durchgeführt:

1. Vorbereitung

- 250 μl *Streptavidin Magnetic Beads* (SMBs) dreimal mit 500 μl PBS pH 7 in einem 2 ml Eppendorf-Gefäß waschen und in 500 μl resuspendieren.
- Danach 1.5 nmol der biotinylierten Rab-GTPase zu den SMBs geben und 15 Minuten lang auf Eis inkubieren.
- Anschließend die SMBs wiederum dreimal in 500 μl PBS pH 7 waschen.
- Eine Stunde vor Beginn der Inkubation dem Lysat 25 U/ml alkalische Phosphatase hinzufügen. Dabei ist das Lysat ebenfalls auf Eis zu lagern.

2. Inkubationzyklen

- 1 ml Lysat zu den SMBs geben und solange mit der Pipette durchmischen, bis sich die SMBs vollständig in Suspension befinden.
- Für 30-45 Minuten auf Eis inkubieren, gegebenenfalls unter leichter Durchmischung durch einen Schüttler bei etwa 50 rpm.
- Anschließend dreimal mit 500 μl PBS pH 7 waschen.
- Den Inkubationsschritt weitere 2-4 mal wiederholen.

3. Elution

- Überstand entfernen und mit 100 μl einer PBS-Lösung mit einem pH von 7 und einer GTP-Konzentration von 500 μM für 10 Minuten auf Eis eluieren.
- Überstand in ein neues Eppendorf-Gefäß überführen.
- Ein weiteres Mal mit 100 μl einer PBS-Lösung mit einem pH von 7 und einer GTP-Konzentration von 10 mM für 10 Minuten auf Eis eluieren.
- Überstand in ein neues Eppendorf-Gefäß überführen.

Im Anschluss können die Elutionsfraktionen für die Auftrennung per SDS-PAGE präzipitiert werden, wie in Kapitel 4.2.2 beschrieben auf GEF-Aktivität getestet werden, für die massenspektrometrische Analyse nach tryptischem Verdau vorbereitet werden, oder in flüssigem Stickstoff gekühlt und bei -80°C gelagert werden.

4.2.3 Proteinidentifikation mittels hochauflösender Massenspektrometrie: Identifikation von Sec2

Um zu überprüfen, ob es sich bei dem GEF, welches bei dem *Pulldown*-Experiment mit Sec4 im Eluat angereichert wurde, um Sec2 handelt, wurden die Eluatbanden mittels Trypsin wie in Kapitel 3.5.7 beschrieben verdaut. Die anschließende Messung der verdauten Proben mittels Elektrospray-Ionisations Massenspektrometrie konnte zwar einige wenige Peptide von Sec2 identifizieren, allerdings war das Signal zu schlecht und gegenüber den Negativkontrollen nicht signifikant, um dies als valide Identifikation zu werten. Um die Identifikation der in den *Pulldown*-Experimenten angereicherten Proteine zu verbessern,

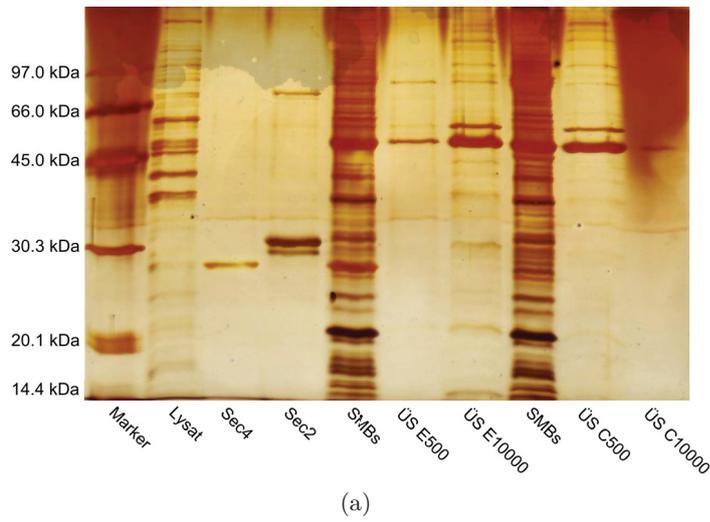
wurde ein Protokoll zur Probenpräparation für die Messung mittels hochauflösender Massenspektrometrie (Vgl. Kapitel 3.5.8) adaptiert. Die eigentliche Messung der Proben mittels hochauflösender Massenspektrometrie sowie die statistische Evaluation der Messergebnisse (Vgl. Kapitel 3.6.5) erfolgte durch Dr. Petra Janning oder Andreas Brockmeyer (Abteilung für Chemische Biologie, MPI für Molekulare Physiologie, Dortmund).

Identifikation von Sec2

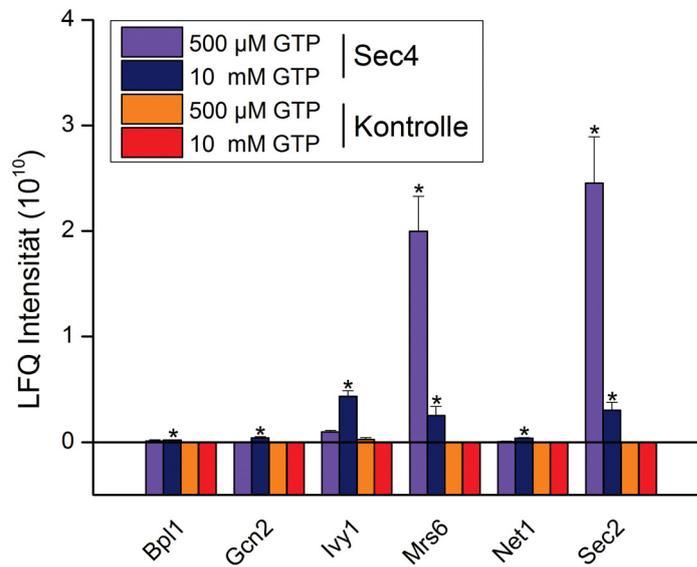
Um Sec2 zu identifizieren, wurden die *Pulldown*-Experimente mit Sec4 und *Saccharomyces cerevisiae*-Lysat wiederholt. Die Eluatfraktionen wurden wie oben erwähnt verdaut, für die Messung mittels hochauflösender Massenspektrometrie vorbereitet und zur Messung übergeben. Das silbergefärbte Gel der SDS-PAGE des Pulldowns zeigte dieses mal in der Spalte ÜS E500 eine Bande zwischen dem 66 kDa und 97 kDa Marker, welche Sec2 entsprechen könnte (Abbildung 4.11(a)). Die Bande lässt sich allerdings nicht klar von einer Bande der Negativkontrolle auf gleicher Höhe abgrenzen. Mittels der hochauflösenden Massenspektrometrie konnten Peptide von Sec2 in den Eluatfraktionen der Proben mit Sec4-Köder deutlich nachgewiesen werden. In den Negativkontrollen hingegen ließen sich erwartungsgemäß keine bis lediglich vereinzelt Sec2-Peptide nachweisen. Abbildung 4.11(b) zeigt alle identifizierten Proteine, welche gegenüber den Negativkontrollen - gemessen an der Intensität der labelfreien Quantifizierung - statistisch signifikant angereichert wurden.

Obleich die Ergebnisse des oben beschriebenen Experimentes eine deutliche Identifikation von Sec2 in den Elutionsfraktionen zeigen und die Negativkontrollen keine Peptide von Sec2 aufweisen, ist die Aussagekraft eines einzelnen *Pulldown*-Experimentes stark begrenzt. Dies trifft insbesondere aufgrund der Komplexität der Liste aller identifizierten Proteine zu. So wurden in dem oben beschriebenen *Pulldown*-Experiment trotz Filterung von üblichen Kontaminanten noch Peptide von beinahe 500 verschiedenen Proteinen identifiziert. Auf Anraten von Dr. Petra Janning wurden daher alle Experimente mindestens als technisches Triplikat (jeweils mindestens drei Proben mit Rab-Köder und drei Negativkontrollen) durchgeführt. Die Triplikate erlauben eine erste statistische Evaluation der Ergebnisse und dadurch eine Reduktion der Liste der identifizierten Proteine auf die statistisch signifikanten Identifikationen. Darüber hinaus wurde von allen Experimenten ein unabhängiges, biologisches Replikat (d.h. unter Verwendung neu aufgereinigter und biotinylierter Proteine sowie neu hergestelltem Hefe-Lysat) angefertigt. Dementsprechend wurde das *Pulldown*-Experiment mit Sec4 und *Saccharomyces cerevisiae*-Lysat biologisch repliziert (und wiederum als technisches Triplikat durchgeführt).

Auf dem Gel des biologischen Replikates ist in den Elutionsfraktionen jeweils eine Bande zwischen dem 66 kDa und 97 kDa Marker zu erkennen, welche Sec2 entsprechen könnte und nicht in den Elutionsfraktionen der Negativkontrollen zu erkennen ist (Vgl. Abbildung 4.12 (a)). Die massenspektrometrische Analyse bestätigte die signifikante Anreicherung von Sec2. Abbildung 4.12(b) listet alle identifizierten Proteine, welche gegenüber den Negativkontrollen statistisch signifikant angereichert wurden. Weiterhin bestätigte das biologische Replikat auch die signifikante Anreicherung und Identifizierung der durch Mrs6, Ivy1 und Net1 codierten Proteine. Zusätzlich wurden einige Proteine angereichert, die im ersten Experiment nicht identifiziert wurden. Erwähnenswert ist in diesem Zusammenhang die Anreicherung von Dss4, welches ebenfalls eine geringe GEF-Aktivität gegenüber Sec4 besitzt.⁹⁸ Mrs6 codiert zudem für das Hefe-Homolog des Rab escort protein (REP), welches ebenfalls mit Rab-GTPasen interagiert. Auch von Ivy1 ist bekannt, dass es mit der Rab-GTPase Ypt7 interagiert, sodass eine indirekte Interaktion mit Sec4 ebenfalls möglich erscheint.



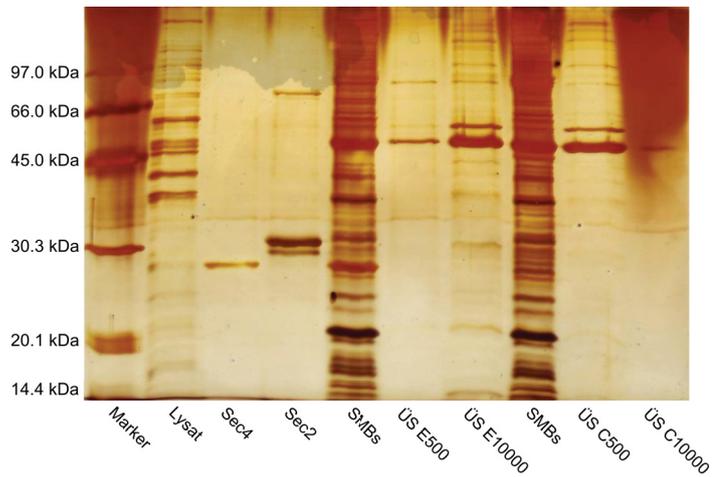
(a)



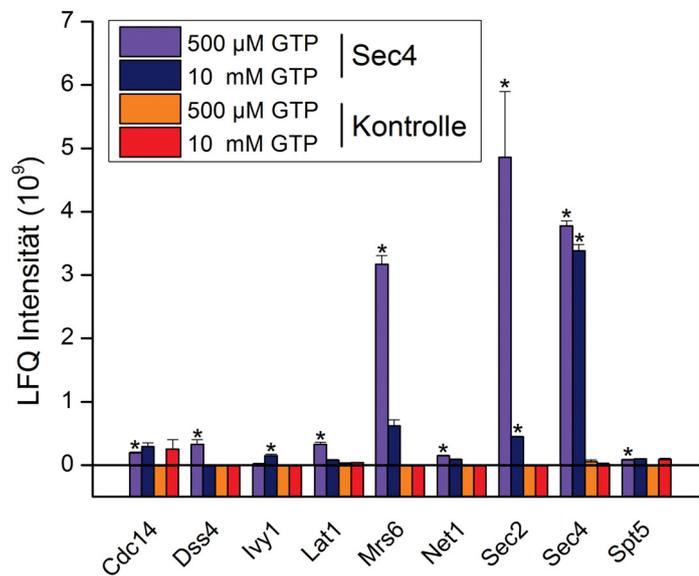
(b)

Abbildung 4.11

Pulldown-Experiment mit biotinyliertem Sec4 und *Saccharomyces cerevisiae*-Lysat (Stamm BJ5459). (a) Gel der SDS-PAGE. (b) Ergebnisse der hochauflösenden Massenspektrometrieanalyse für das *Pulldown*-Experiment. Aufgelistet wurden alle Proteine, welche in einer der beiden Elutionsfraktionen E500 oder E10000 statistisch signifikant ($*p < 0.05$) gegenüber den Elutionsfraktionen C500 und C10000 der Negativkontrollen angereichert wurden (gemessen an der Intensität der lautfreien Quantifizierung (LFQ)). Angaben jeweils als Mittelwert und Standardabweichung bestimmt anhand von $n = 3$ technisch unabhängigen Experimenten.



(a)



(b)

Abbildung 4.12

Biologisches Replikat des *Pulldown*-Experimentes mit biotinyliertem Sec4 und *Saccharomyces cerevisiae*-Lysat (Stamm BJ5459). (a) Gel der SDS-PAGE. (b) Ergebnisse der hochauflösenden Massenspektrometrieanalyse für das *Pulldown*-Experiment. Aufgelistet wurden alle Proteine, welche in einer der beiden Elutionsfraktionen E500 oder E10000 statistisch signifikant (* $p < 0.05$) gegenüber den Elutionsfraktionen C500 und C10000 der Negativkontrollen angereichert wurden (gemessen an der Intensität der labelfreien Quantifizierung (LFQ)). Angaben jeweils als Mittelwert und Standardabweichung bestimmt anhand von $n = 3$ technisch unabhängigen Experimenten.

Zusammengefasst zeigen die Ergebnisse der *Pulldown*-Experimente, dass die endogen exprimierten GEFs Sec2 und zu geringerem Anteil auch Dss4 sowie weitere Interaktionspartner von Rab-GTPasen mit dem beschriebenen *Pulldown*-Protokoll erfolgreich aus *Saccharomyces cerevisiae*-Lysat angereichert und massenspektrometrisch valide identifiziert werden können.

4.2.4 Variation des Zugabezeitpunktes von alkalischer Phosphatase und *Pulldown*-Experiment mit Sec4:GppNHp

Variation des Zugabezeitpunktes von alkalischer Phosphatase

Da vermutet wurde, dass sich der Zugabezeitpunkt der alkalischen Phosphatase auf die Effizienz der GEF-Anreicherung auswirken könnte, wurde ein weiteres *Pulldown*-Experiment mit Sec4 und *Saccharomyces cerevisiae*-Lysat durchgeführt, bei dem unter sonst gleichen Bedingungen die alkalische Phosphatase jeweils erst zu Beginn der Inkubation mit dem Lysat hinzugegeben wurde. Dies führte jedoch nicht zu einer Verbesserung der GEF-Anreicherung, sondern hatte lediglich eine höhere Anzahl mutmaßlich falsch-positiver Identifikationen zur Folge (Vgl. Anhang, Abbildung 6.1 und 6.2).

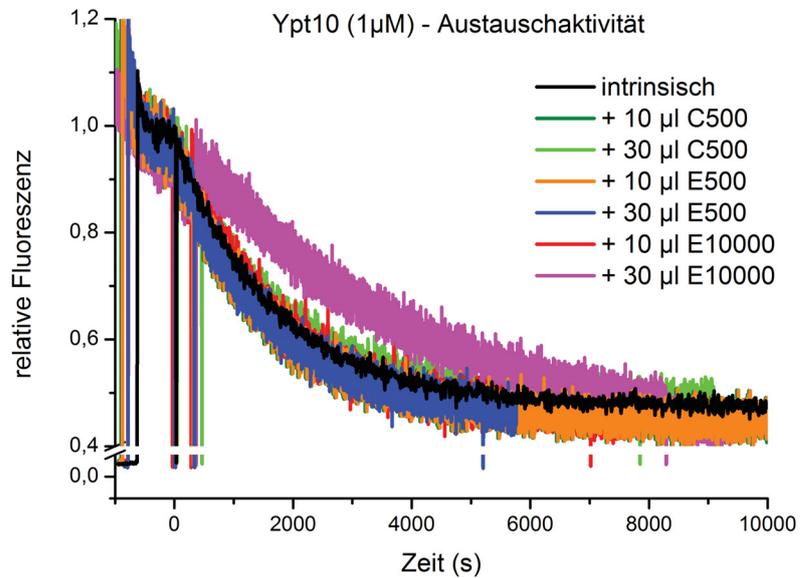
Pulldown-Experiment mit Sec4:GppNHp

Aufgrund der Identifikation weiterer Interaktionspartner von Rab-GTPasen in den bisherigen *Pulldown*-Experimenten wurde ein weiteres *Pulldown*-Experiment mit aktivem Sec4 als Positivkontrolle durchgeführt. Im Gegensatz zu den bisherigen *Pulldown*-Experimenten wurde keine alkalische Phosphate zur Nukleotiddepletion zum Lysat gegeben. Stattdessen wurde Sec4 vor der Biotinylierung mit dem GTP-Analogen GppNHp beladen, um zu gewährleisten, dass Sec4 sich während des *Pulldown*-Experimentes in der aktiven Konformation befindet. Zudem wurde im Anschluss an die Inkubationszyklen nicht eluiert, sondern die SMBs wurden nach den Waschschritten direkt mit Trypsin behandelt. Das sonstige Prozedere unterschied sich jedoch nicht von den bisherigen *Pulldown*-Experimenten. Die massenspektrometrische Analyse des *Pulldown*-Experimentes zeigte im Einklang mit dem Anreicherungsprinzip, dass in diesem Experiment kein Sec2 angereichert wurde (Vgl. Anhang, Abbildung 6.3). Die Proteine Mrs6 und Ivy1 wurden jedoch durch das aktive Sec4 ebenfalls angereichert und identifiziert. Im Einklang mit dem aktiven Zustand von Sec4 konnte auch das Sec4-Effektorprotein Sro7 angereichert und identifiziert werden. Zudem wurden einige weitere Proteine signifikant angereichert und identifiziert, welche in den vorherigen Experimenten mit nukleotidfreiem Sec4 nicht nachgewiesen worden sind. Erwähnenswert scheint in diesem Zusammenhang insbesondere das Golgin Imh1, von dem bekannt ist, dass es funktionell mit der Rab-GTPase Ypt6 assoziiert ist, jedoch nicht mit diesem interagiert.^{99,100} Da Imh1 zudem eine sogenannte *coiled-coil*-Domäne besitzt, welche in mehreren Interaktionspartnern von Rab-GTPasen vorkommt¹⁰¹, besteht die Möglichkeit, dass Imh1 ein bislang unbekanntes Effektorprotein von Sec4 ist.

4.2.5 *Pulldown*-Experimente mit Ypt10

Ypt10 gehört zu den bislang am wenigsten charakterisierten Rab-GTPasen in *Saccharomyces cerevisiae*. Da bislang noch keine GEFs, GAPs oder Effektorproteine für Ypt10 bekannt sind, kann jeder identifizierte und validierte Interaktionspartner das funktionelle Verständnis der Rolle dieser Rab-GTPase erweitern. Daher wurden *Pulldown*-Experimente mit Ypt10 sowohl unter Zugabe von alkalischer Phosphatase als auch mit vorheriger GppNHp-Beladung durchgeführt. Die Ergebnisse der massenspektrometrischen Analysen hierzu befinden sich im Anhang unter Kapitel 6.2.3 bzw. 6.2.5. Die fluoreszenzspektroskopische Untersuchung der Elutionsfraktionen des *Pulldown*-Experimentes mit nukleotidfreiem Ypt10 zeigte keine GEF-Aktivität gegenüber Ypt10 (Vgl. Abbildung 4.13). Abbildung 6.4 (Anhang) zeigt die dazugehörigen massenspektrometrischen Analyse der Eluatfraktionen. Auch das Eluat des biologischen Replikates des Experimentes zeigte keine Austauschaktivität. Abbildung 6.5 (Anhang) zeigt die dazugehörigen massenspektrometrischen Analyse der Eluatfraktionen.

Durch die massenspektrometrische Untersuchung des *Pulldown*-Experimentes mit GppNHp-beladenem Ypt10 konnten einige Proteine identifiziert werden, die nicht durch nukleotidfreies Ypt10 angereichert worden sind (Vgl. Anhang, Abbildung 6.6). In einem biologischen Replikat des Experimentes konnten hiervon allerdings lediglich die Proteine Tda9, Bpl1 und Pet122 bestätigt werden (Vgl. Anhang, Abbildung 6.7).



Messung & Kurve	$k_{obs} \pm \text{Fehler} [s^{-1}]$
Ypt10 intrinsisch	$(5.98 \pm 0.028) \times 10^{-4}$
Ypt10 + 10 µl C500	$(5.97 \pm 0.036) \times 10^{-4}$
Ypt10 + 30 µl C500	$(6.01 \pm 0.020) \times 10^{-4}$
Ypt10 + 10 µl E500	$(6.11 \pm 0.048) \times 10^{-4}$
Ypt10 + 30 µl E500	$(5.31 \pm 0.026) \times 10^{-4}$
Ypt10 + 10 µl E10000	$(6.27 \pm 0.033) \times 10^{-4}$
Ypt10 + 30 µl E10000	$(2.69 \pm 0.018) \times 10^{-4}$

Abbildung 4.13

Nukleotidaustauschraten von Ypt10 in Abhängigkeit der Zugabe von Eluat aus *Pulldown*-Experimenten mit *Saccharomyces cerevisiae*-Lysat. Die schwarze Kurve zeigt die intrinsische Austauschreaktion von Ypt10, die anderen Kurven die Austauschreaktion von Ypt10 unter Zugabe unterschiedlicher Volumina der verschiedenen Elutionsfraktionen. Die aus der Kurvenanpassung erhaltenen Ratenkonstanten des Nukleotidaustausches sind in der unteren Tabelle angegeben.

5 Diskussion und Ausblick

Mit der Lösung der Struktur einer acryl-GTP-modifizierten Rab-GTPase und dem Vergleich mit der bereits bekannten Struktur der GppNHp-gebundenen GTPase konnte die strukturbiochemische Fragestellung dieser Arbeit zufriedenstellend beantwortet werden. Kurz nach Lösung der Struktur der acryl-GTP-modifizierten Rab-GTPase ist es gelungen, das GTP-Analogon GppNHp ebenfalls als Acrylnukleotid zu synthetisieren, was die Kristallisation von acryl-GppNHp modifiziertem Ypt7_{Q35C} ermöglichte. Die Lösung der Struktur dieses Proteins, das abgesehen von der Cysteinmutation keine weiteren Mutationen beinhaltet, bestätigte nochmals die Ergebnisse dieser Arbeit. Weitere Untersuchungen aus dieser Arbeitsgruppe haben zudem zeigen können, dass Acrylnukleotide nicht mit der Funktion kleiner GTPasen hinsichtlich der Interaktion mit Proteinen wie Effektoren, GDI, GAPs oder Rab-GGTasen interferieren. Zusammengefasst zeigen die unbeeinflusste Struktur und die funktionellen Untersuchungen, dass Acrylnukleotide ein valides Instrument zur Untersuchung kleiner GTPasen sind. Im Vergleich dazu haben bisherige mutagenetische Ansätze bei Rab-GTPasen gravierende Limitationen. So konnten Langemeyer *et al.* zeigen, dass Mutationen des *switch II* Glutamins, welche im Falle von Ras zur konstitutiven Aktivierung führen, bei Rab-GTPasen stark divergierende Effekte haben und die Interaktionen von Rabs mit ihren GEFs und GAPs unterschiedlich beeinflussen können. So kann etwa der GEF-induzierte Nukleotidaustausch beeinträchtigt werden und je nach GTPase ebenfalls die intrinsische oder GAP-stimulierte Hydrolyse von GTP: So kann im Falle von Rab1 die Mutation Q67A zwar die GAP-induzierte Hydrolyse verlangsamen, jedoch nicht die basale Hydrolyse, sodass eine vollständige Aktivität der GTPase nicht sicher gewährleistet ist. Im Falle von Rab35 bewirkt die Mutation Q67A eine starke Beeinträchtigung des Nukleotidaustausches durch das GEF DENND1 ohne dabei die intrinsische Hydrolyseaktivität zu senken. Funktionell kommt es bei Rab35 dadurch zur konstitutiven Inaktivität statt zur beabsichtigten konstitutiven Aktivität.³² Acrylnukleotide sind daher ein wesentlich zuverlässigerer Ansatz zur Kontrolle des Nukleotidstatus. Eine weitere interessante Frage ist, in wie weit sich dieser Ansatz zukünftig auch auf andere G-Protein-Familien oder gar auf ATP-bindende Proteine übertragen lässt.

Auch das zweite Ziel dieser Arbeit, die Weiterentwicklung eines Protokolls zur selektiven Anreicherung und Identifizierung von Rab-GEFs, wurde mit der mit Anreicherung und Identifikation von endogen exprimiertem Sec2 aus *Saccharomyces cerevisiae*-Lysat erreicht. Durch die mechanistische Ähnlichkeit vieler kleiner GTPasen sollte das Protokoll zudem auch mit Vertretern anderer Familien von kleinen GTPasen durchführbar sein. Bislang wurden GEFs kleiner GTPasen eher zufällig und unsystematisch identifiziert, indem phenotypische oder funktionelle Beobachtungen zur weiteren Untersuchung der GEF-Aktivität Anlass gegeben haben. Die dabei notwendigen Arbeitsschritte waren jedoch oftmals aufwendiger als das hier vorgestellte Protokoll.

In einem ersten Versuch, dieses Protokoll auf Ypt10 zu übertragen, konnten zwar einige potentielle Interaktionspartner massenspektrometrisch identifiziert werden, eine erhöhte Nukleotidaustauschaktivität im Eluat konnte fluoreszenzspektroskopisch jedoch nicht festgestellt werden. Somit ergibt sich bislang kein Hinweis auf ein angereichertes Ypt10-GEF unter den identifizierten Proteinen. Neben den weiter unten erwähnten Problematiken wäre es möglich, dass die Expression eines Ypt10-GEFs zu niedrig um die

katalytische Aktivität mit dem in dieser Arbeit verwendete GEF-Assay zu detektieren. Zudem wäre denkbar, dass die GEFs einiger Rab-GTPasen nur unter speziellen zellulären Bedingungen (z.B. bei Energiemangel/Autophagie) exprimiert werden oder aus mehreren Untereinheiten bestehen, was die Anreicherung erschweren könnte. Die Validierung anderer in dieser Arbeit identifizierter möglicher Interaktionspartner sowohl von Sec4 als auch von Ypt10 steht gegenwärtig noch aus.

Eine weitere Erkenntnis aus den durchgeführten Experimenten ist, dass die massenspektrometrische Analyse des Eluates zu einer Vielzahl mutmaßlich unspezifischen und falsch-positiven Identifikationen führt. So ist bei einer Vielzahl von metabolischen Enzymen oder in Transkription oder Translation involvierten Proteinen nicht davon auszugehen, dass der massenspektrometrischen Identifikation eine biologische Interaktion mit Rab-GTPasen korrespondiert. Um die unspezifischen Interaktionen bei den *Pulldown*-Experimenten weiter zu reduzieren wäre es eventuell möglich, die Salzkonzentration bei den Waschschritten noch etwas zu erhöhen. Da eine heterologe rekombinante Proteinexpression und Proteinaufreinigung zu Validierungszwecken bei der Vielzahl der Identifikationen sehr aufwendig ist, wären vergleichsweise schnelle und mit wenig Aufwand verbundene Methoden zur Validierung potentieller Interaktionen wünschenswert. Eine Möglichkeit wäre es beispielsweise mittels *Real-time*-PCR zu überprüfen, ob eine Über- und/oder Unterexpression der in den *Pulldown*-Experimenten als Köder verwendeten Rab-GTPase zu einer signifikanten Änderung in der Expression der zu den identifizierten Proteinen zugehörigen Gene führt. Sollte dies der Fall sein, erhöht dies die Wahrscheinlichkeit einer echten Interaktion. Da ein großer Teil der Regulation von Rab-GTPasen auf Proteinebene stattfindet, besteht dabei jedoch die Gefahr, bei fehlender genetischer Regulation eine Interaktion auf Proteinebene zu übersehen. Daher wurde im Anschluss an diese Arbeit basierend auf dem sogenannten *Gateway*-Klonierungssystem ein Protokoll zur Validierung möglicher Protein-Protein-Interaktionen entwickelt. Mit den Vektoren des *Gateway*-Klonierungssystems ist es einerseits möglich, innerhalb kurzer Zeit die identifizierten Proteine in einem zellfreien Expressionssystem zu exprimieren und fluoreszenzspektroskopisch auf GEF-Aktivität zu überprüfen. Andererseits erlauben die Vektoren durch die Verwendung in einem *Yeast-Two-Hybrid-Screening* auch die Identifikation anderweitiger Protein-Protein-Interaktionen, selbst wenn diese nicht auf einer Rab/GEF-Relation beruhen. Dass dieses Konzept zu Validierungszwecken einsetzbar ist, konnte im Anschluss an diese Arbeit erfolgreich durch Amrita Rai und Natalie Bleimling gezeigt werden.

Eine noch offene Frage ist es, welche Rolle die Membranbindung von GEFs für die Anwendbarkeit des in dieser Arbeit präsentierten Protokolls spielt. Zum einen könnte es bei der Aufbereitung des Lysates ein Problem darstellen, wenn ein GEF ein Membranprotein ist oder durch hochaffine Membranbindung nicht ausreichend solubilisiert werden kann, sodass nicht genügend GEF-Proteine zur Anreicherung im Lysat vorhanden sind. Dies ließe sich jedoch eventuell durch die Zugabe geeigneter Detergenzien wie Polysorbat 20 beheben und kann gegebenenfalls in weiteren Versuchen untersucht werden. Da Detergenzien jedoch oftmals die Sensitivität für die massenspektrometrische Detektion von Peptiden reduzieren, ist ein Erfolg dieser Strategie nicht garantiert bzw. macht es gegebenenfalls nötig, die Detergenzien vor der Probenvorbereitung für die Massenspektrometrie wieder zu entfernen.¹⁰² Weiterhin könnte eine Solubilisierung durch Detergenzien auch die GEF-Funktionalität stark beeinträchtigen. Ein erster Hinweis hierfür ist, dass das erst kürzlich identifizierte Rab11-GEF REI-1 aus *C. elegans* nur in Gegenwart von Liposomen seine Austauschaktivität gegenüber Rab11 zeigt.⁷⁴ Sollte die eigentliche Membranbindung der GEFs oder ihrer Substrate eine wichtige Rolle für die Austauschaktivität spielen, könnte die Solubilisierung solcher GEFs ihre Austauschaktivität und damit die Anwendbarkeit des in dieser Arbeit vorgestellten Protokolls beeinträchtigen. Diese Überlegung erhält weitere

Relevanz durch eine kurz vor Beendigung dieser Arbeit publizierte Studie von Peurois *et al.*, welche zeigt, dass die Membranbindung von kleinen GTPasen im Allgemeinen einen großen Einfluss auf die von GEFs katalysierten Austauschreaktionen haben kann.¹⁰³

Sollte die fehlende membranäre molekulare Umgebung die Anwendbarkeit des in dieser Arbeit vorgestellten Protokolls tatsächlich limitieren, bestünde eventuell die Möglichkeit magnetische Liposomen (wie sie etwa in der liposomalen Applikation einiger Chemotherapeutika eingesetzt werden) statt der SMBs als Anreicherungsmatrix zu verwenden. Ein anderer Lösungsansatz wäre die Adaption einer von Mousnier *et al.* publizierten *in vitro*-Anreicherungs-methode, welche zwar von dem in dieser Arbeit verwendeten Anreicherungsprinzip abweicht, sich jedoch auch für die Anreicherung von Membranproteinen eignet¹⁰⁴: Hierbei würde das Rab-Köderprotein in einem Expressionsvektor mit einer Hexahistidin- und einer für das Enzym BirA spezifischen Biotinylierungssequenz zur Aufreinigung versehen. *In vitro* auftretende Interaktionskomplexe werden dann mittels Formaldehyd quervernetzt, sodass die Interaktionspartner bei Aufreinigung co-aufgereinigt werden und anschließend identifiziert werden können. Um den nukleotidfreien Zustand der entsprechenden GTPasen *in vivo* zu gewährleisten, wäre das Einfügen von Mutationen möglich, welche die Nukleotidaffinität für GDP und GTP stark reduzieren. Bei diesem Ansatz wäre zwar eine spezifische Elution durch GTP nicht mehr möglich, jedoch würde die Quervernetzung durch Formaldehyd eine Reduktion unspezifischer Anreicherungen durch stärkeres Waschen ermöglichen. Zudem könnte dieser Ansatz geeignet sein, um auch GEFs anzureichern, welche aus mehreren Untereinheiten bestehen die Rahmen des Waschvorgangs beim bisherigen Protokoll verloren gehen könnten.

6 Anhang

6.1 Zur Röntgenkristallstrukturanalyse

Tabelle 6.1
Datenstatistiken der Ypt7₁₋₁₈₂ Q35C K38I Q68L - aGTP Kristalle

Aufgenommener Datensatz	
Raumgruppe:	P2 ₁ (4)
Zelldimensionen	
a,b,c:	32.97, 53.16, 46.91
α,β,γ :	90.0, 106.353, 90.0
Wellenlänge (Å):	1.0
Auflösung (Å):	45.01 - 1.9
höchste Schale:	2.0 - 1.9
R _{merge} :	8.3 (43.3)
I\sigma(I):	11.15 (2.85)
Vollständigkeit (%):	99.5 (99.8)
Redundanz:	3.3 (3.2)
Verfeinerung	
Auflösung (Å):	45.01 - 1.9
höchste Schale:	1.95 - 1.9
Anzahl der Reflexe:	11694
R _{work} (%):	17.5 (23.3)
R _{free} (%):	23.2 (34.3)
Anzahl der Atome	
Protein:	1361
Liganden:	44
Wasser:	52
B-Faktoren	
Protein:	31.4
Liganden:	26.7
Wasser:	29.2
Standartabweichungen	
Bindungslängen (Å):	0.019
Bindungswinkel (°):	1.908
PDB-Kennung:	4PHG

6.2 Zu den *Pulldown*-Experimenten

6.2.1 *Sec4-Pulldown*-Experiment unter Variation des Zugabezeitpunktes von alkalischer Phosphatase

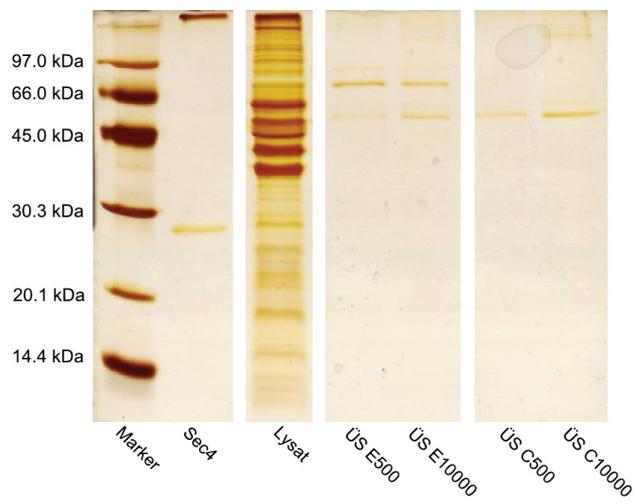


Abbildung 6.1

Gel der SDS-PAGE des *Pulldown*-Experimentes mit biotinyliertem Sec4 und *Saccharomyces cerevisiae*-Lysat (Stamm BJ5459) unter Variation des Zugabezeitpunktes von alkalischer Phosphatase.

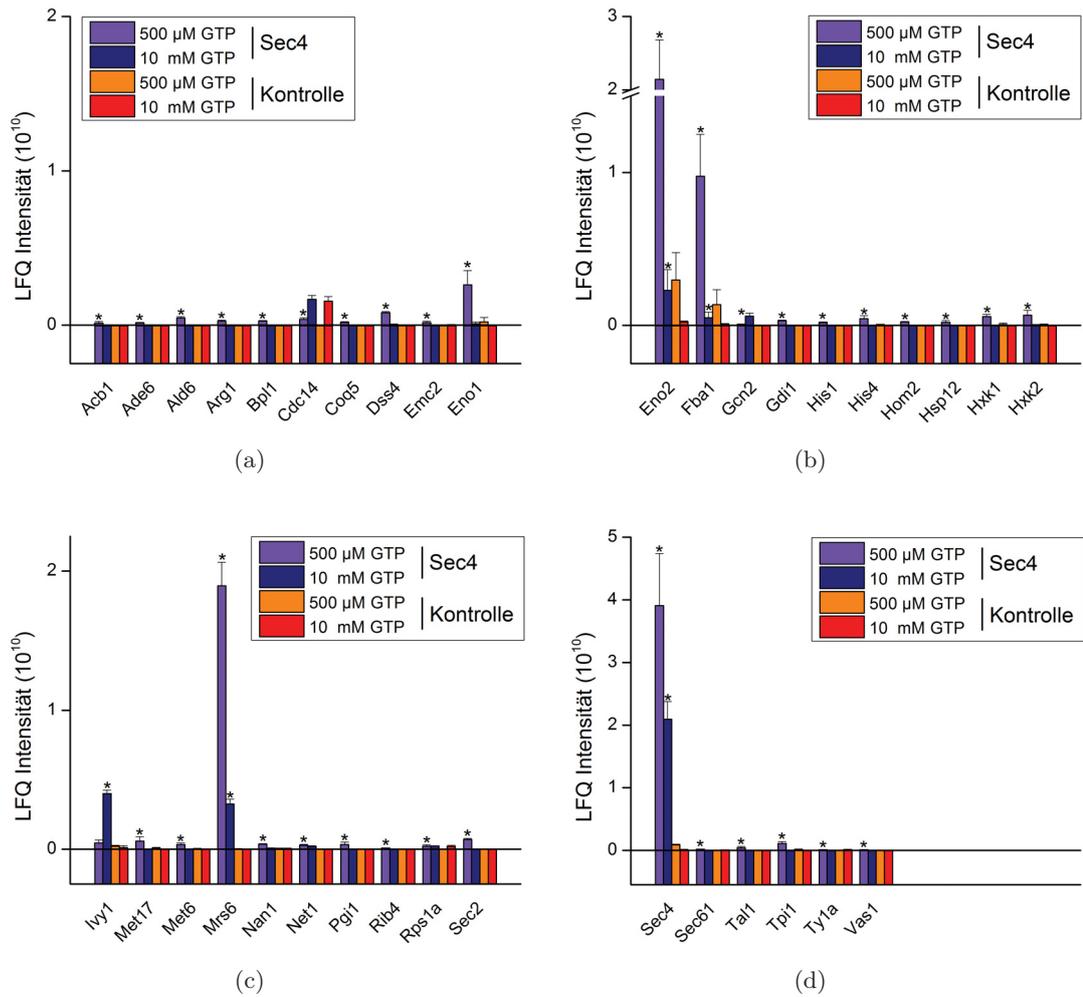


Abbildung 6.2

Pulldown-Experiment mit biotinyliertem Sec4 und *Saccharomyces cerevisiae*-Lysat (Stamm BJ5459) unter Variation des Zugabezeitpunktes von alkalischer Phosphatase. (a)-(d) Ergebnisse der hochauflösenden Massenspektrometrieanalyse für das *Pulldown*-Experiment. Aufgelistet wurden alle Proteine, welche in einer der beiden Elutionsfraktionen E500 oder E10000 statistisch signifikant ($*p < 0.05$) gegenüber den Elutionsfraktionen C500 und C10000 der Negativkontrollen angereichert wurden (gemessen an der Intensität der labelfreien Quantifizierung (LFQ)). Angaben jeweils als Mittelwert und Standardabweichung bestimmt anhand von $n = 3$ technisch unabhängigen Experimenten.

6.2.2 Sec4:GppNHp-Pulldown-Experiment

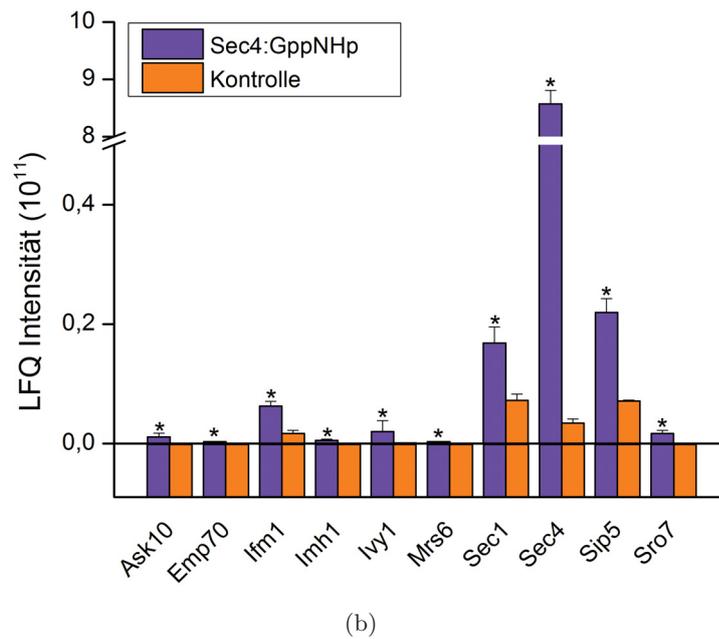
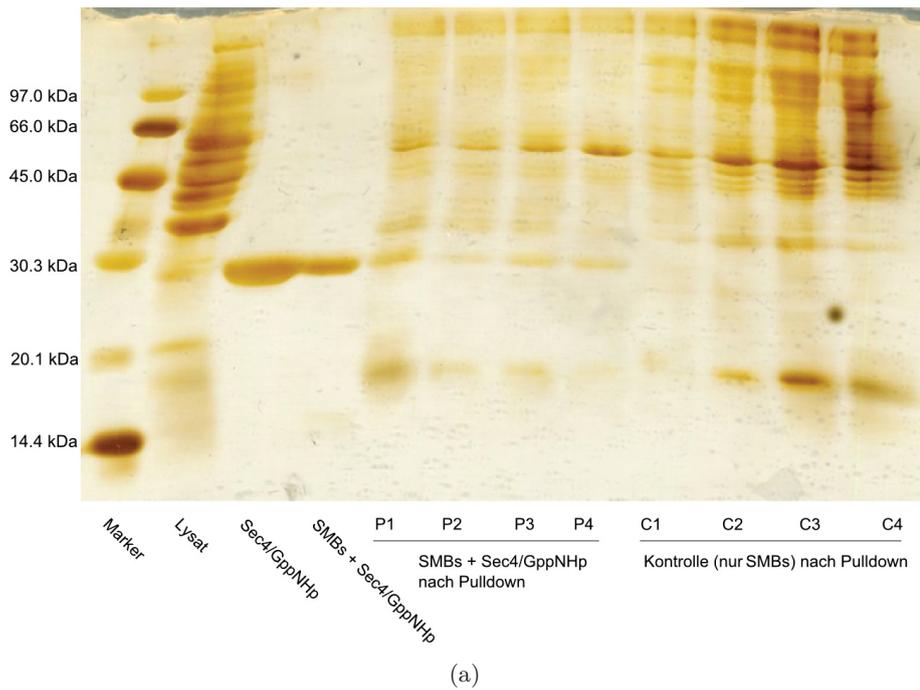


Abbildung 6.3

Pulldown-Experiment mit biotinyliertem sowie GppNHp-beladenem Sec4 und *Saccharomyces cerevisiae*-Lysat (Stamm BJ5459). (a) Gel der SDS-PAGE. (b) Ergebnisse der hochauflösenden Massenspektrometrieanalyse für das *Pulldown*-Experiment. Aufgelistet wurden alle Proteine, welche in den Sec4:GppNHp enthaltenden Proben statistisch signifikant (* $p < 0.05$) gegenüber den Negativkontrollen angereichert wurden (gemessen an der Intensität der labelfreien Quantifizierung (LFQ)). Angaben jeweils als Mittelwert und Standardabweichung bestimmt anhand von $n = 4$ technisch unabhängigen Experimenten.

6.2.3 Ypt10-*Pulldown*-Experiment

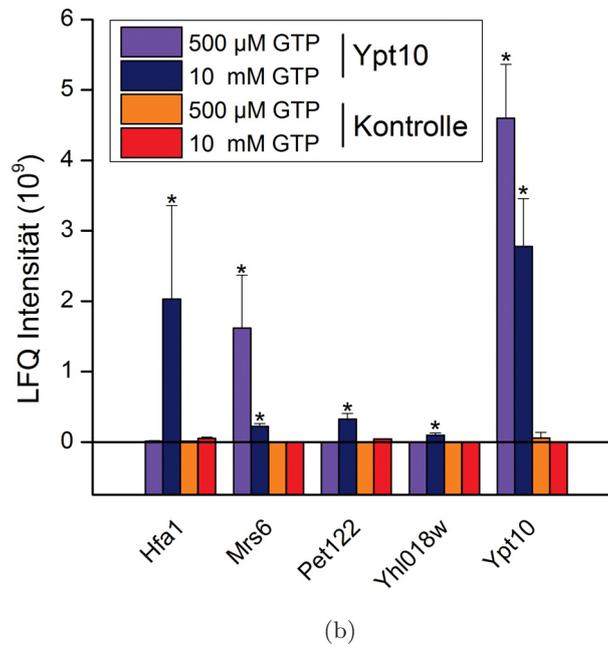
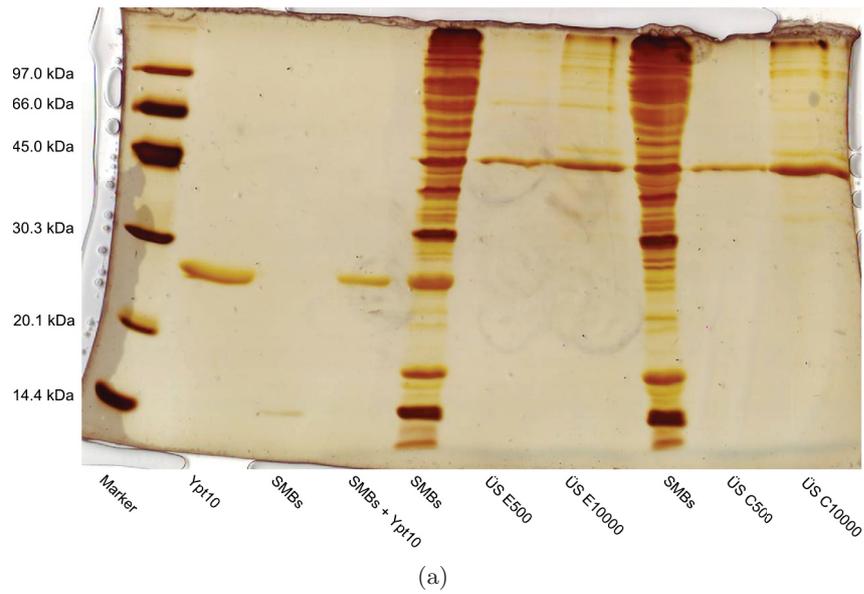


Abbildung 6.4

Pulldown-Experiment mit biotinyliertem Ypt10 und *Saccharomyces cerevisiae*-Lysat (Stamm BJ5459). (a) Gel der SDS-PAGE. (b) Ergebnisse der hochauflösenden Massenspektrometrieanalyse für das *Pulldown*-Experiment. Aufgelistet wurden alle Proteine, welche in den Sec4:GppNHp enthaltenen Proben statistisch signifikant (* $p < 0.05$) gegenüber den Negativkontrollen angereichert wurden (gemessen an der Intensität der labelfreien Quantifizierung (LFQ)). Angaben jeweils als Mittelwert und Standardabweichung bestimmt anhand von $n = 3$ technisch unabhängigen Experimenten.

6.2.4 Biologisches Replikat des Ypt10-*Pulldown*-Experimentes

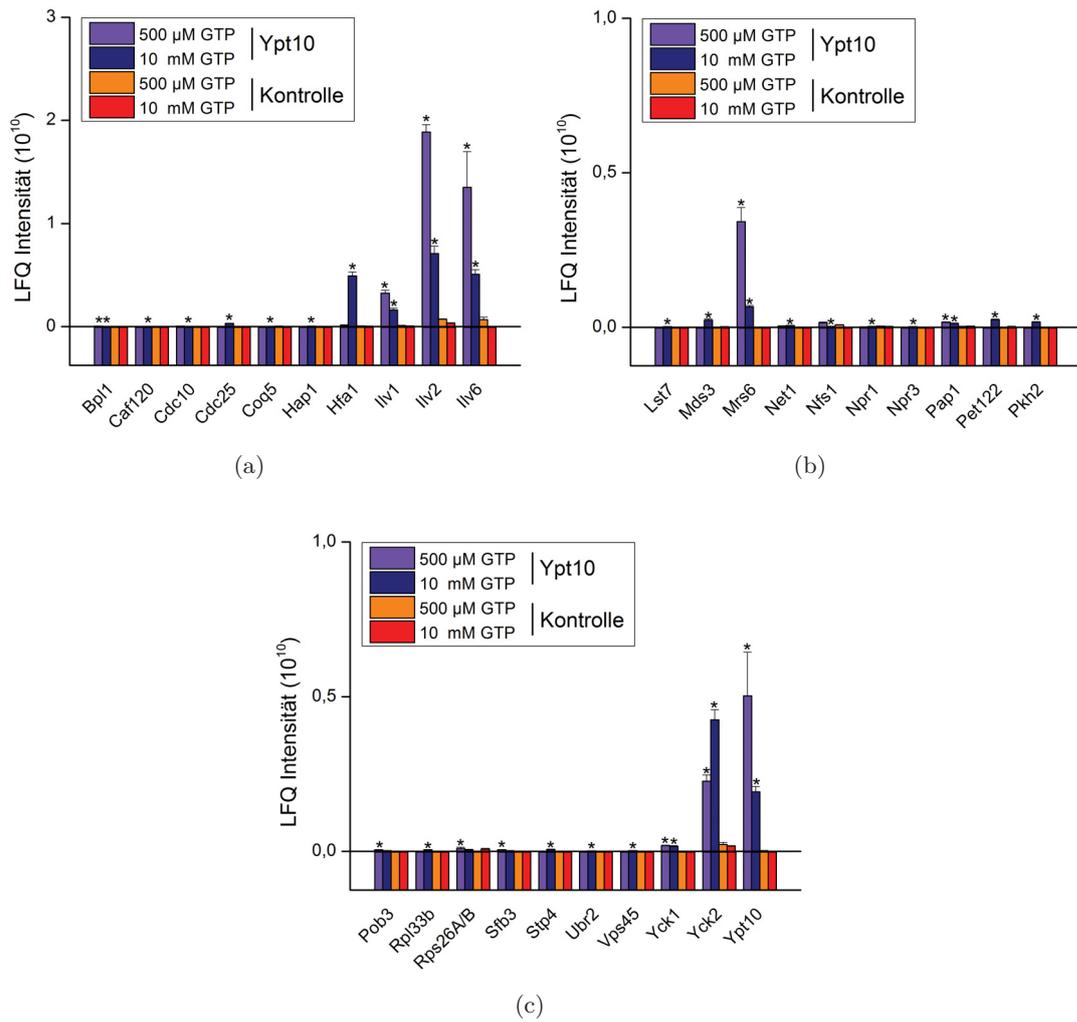


Abbildung 6.5

Biologisches Replikat des *Pulldown*-Experimentes mit biotinyliertem Ypt10 und *Saccharomyces cerevisiae*-Lysat (Stamm BJ5459). (a)-(c) Ergebnisse der hochauflösenden Massenspektrometrieanalyse für das *Pulldown*-Experiment. Aufgelistet wurden alle Proteine, welche in einer der beiden Elutionsfraktionen E500 oder E10000 statistisch signifikant ($*p < 0.05$) gegenüber den Elutionsfraktionen C500 und C10000 der Negativkontrollen angereichert wurden (gemessen an der Intensität der labelfreien Quantifizierung (LFQ)). Angaben jeweils als Mittelwert und Standardabweichung bestimmt anhand von $n = 3$ technisch unabhängigen Experimenten.

6.2.5 Ypt10:GppNHp-Pulldown-Experiment

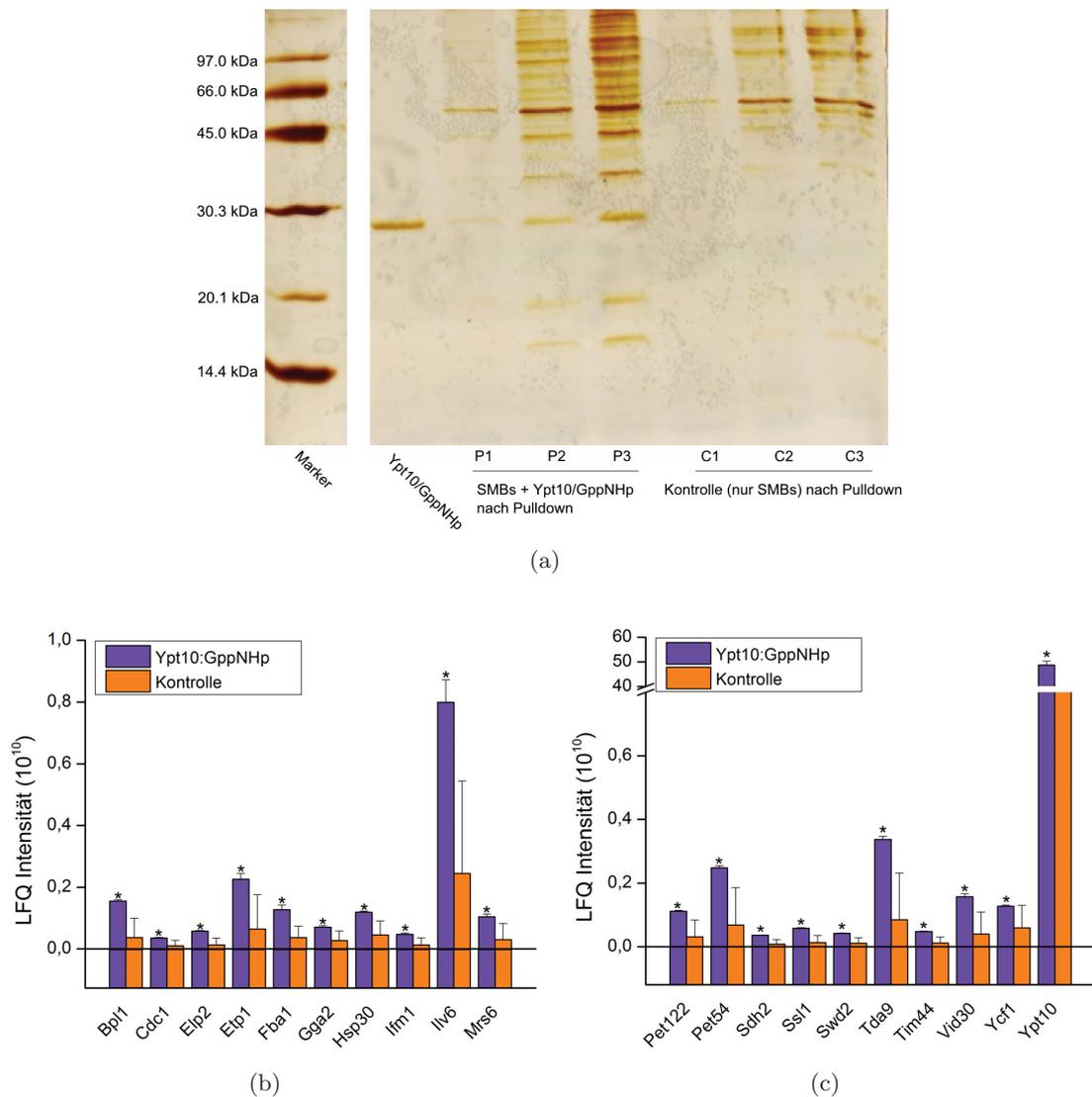


Abbildung 6.6

Pulldown-Experiment mit biotinyliertem sowie GppNHp-beladenem Ypt10 und *Saccharomyces cerevisiae*-Lysat (Stamm BJ5459). (a) Gel der SDS-PAGE. (b) und (c) Ergebnisse der hochauflösenden Massenspektrometrieanalyse für das *Pulldown*-Experiment. Aufgelistet wurden alle Proteine, welche in den Sec4:GppNHp enthaltenden Proben statistisch signifikant ($*p < 0.05$) gegenüber den Negativkontrollen angereichert wurden (gemessen an der Intensität der labelfreien Quantifizierung (LFQ)). Angaben jeweils als Mittelwert und Standardabweichung bestimmt anhand von $n = 4$ technisch unabhängigen Experimenten.

6.2.6 Biologisches Replikat des Ypt10:GppNHp-*Pulldown*-Experimentes

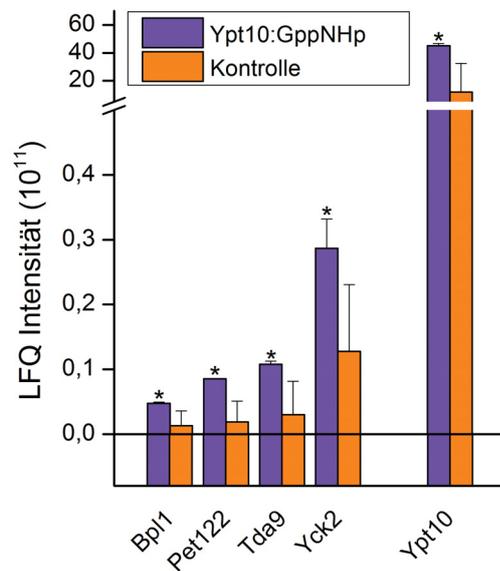


Abbildung 6.7

Biologisches Replikat des *Pulldown*-Experimentes mit biotinyliertem und GppNHp-beladenem Ypt10 und *Saccharomyces cerevisiae*-Lysat (Stamm BJ5459). Ergebnisse der hochauflösenden Massenspektrometrieanalyse für das *Pulldown*-Experiment. Aufgelistet wurden alle Proteine, welche in einer der beiden Elutionsfraktionen E500 oder E10000 statistisch signifikant (* $p < 0.05$) gegenüber den Elutionsfraktionen C500 und C10000 der Negativkontrollen angereichert wurden (gemessen an der Intensität der labelfreien Quantifizierung (LFQ)). Angaben jeweils als Mittelwert und Standardabweichung bestimmt anhand von $n = 4$ technisch unabhängigen Experimenten.

Literaturverzeichnis

- [1] Martin W. and Russell M.J. On the origins of cells: A hypothesis for the evolutionary transitions from abiotic geochemistry to chemoautotrophic prokaryotes, and from prokaryotes to nucleated cells. *Phil Trans R Soc Lond B*, 358:59–85, 2003.
- [2] G. Karp. *Cell and Molecular Biology. Concepts and Experiments*. Wiley, 2013.
- [3] Schlacht A., Herman E.K., Klute M.J., Field M.C., and Dacks J.B. Missing pieces of an ancient puzzle: Evolution of the eukaryotic membrane-trafficking system. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 6:a016048, 2014.
- [4] Ramadas R. and Thattai M. New organelles by gene duplication in a biophysical model of eukaryote endomembrane evolution. *Biophys J*, 104:2553–2563, 2013.
- [5] Dacks J.B., Poon P.P., and Field M.C. Phylogeny of endocytic components yields insight into the process of nonendosymbiotic organelle evolution. *Proc Natl Acad Sci USA*, 105:588–593, 2008.
- [6] Dacks J.B. and Field M.C. Evolution of the eukaryotic membrane-trafficking system: origin, tempo and mode. *J Cell Sci*, 120:2977–2985, 2007.
- [7] Segev N. Ypt/rab GTPases: Regulators of protein trafficking. *Sci Signal*, 100:re11, 2001.
- [8] Stenmark H. Rab GTPases as coordinators of vesicle traffic. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 10:513–525, 2009.
- [9] Hutagalung A.H. and Novick P.J. Role of rab GTPases in membrane traffic and cell physiology. *Physiological Reviews*, 91:119–149, 2011.
- [10] Schwartz S.L., Cao C., Pylypenko O., Rak A., and Wandinger-Ness A. Rab GTPases at a glance. *J Cell Sci*, 120:3905–3910, 2007.
- [11] Barr F.A.. Rab GTPases and membrane identity: Causal or inconsequential? *J Cell Biol*, 202(2):191–199, 2013.
- [12] Stenmark H. and Olkkonen V.M. The rab gtpase family. *Genome Biol*, 2: reviews3007.1–reviews3007.7, 2001.
- [13] Brighouse A., Dacks J.B., and Field M.C. Rab protein evolution and the history of the eukaryotic endomembrane system. *Cell Mol Life Sci*, 67:3449–3465, 2010.
- [14] Cellular functions of rab gtpases at a glance. 128:3171–3176.
- [15] Goody R.S. and Hofmann-Goody W. Exchange factors, effectors, gaps and motor proteins: Common thermodynamic and kinetic principles for different functions. *Eur Biophys J*, 31:268–274, 2002.
- [16] Colicelli J. Human ras superfamily proteins and related gtpases. *Sci Signal*, 250: re13, 2004.

- [17] Barr F.A. and Lambright D.G. Rab GEFs and GAPs. *Curr Opin Cell Biol*, 22: 461–470, 2010.
- [18] Cherfils J. and Zeghouf M. Regulation of small GTPases by GEFs, GAPs, and GDIs. *Physiol Rev*, 93(1):269–309, 2013.
- [19] Wittinghofer A. and Vetter I.R. Structure-function relationships of the g domain, a canonical switch motif. *Annu Rev Biochem*, 80:943–971, 2011.
- [20] Blümer J., Wu Y.-W., Goody R.S., and Itzen A. Specific localization of rabs at intracellular membranes. *Biochem Soc Trans*, 40:1421–1425, 2012.
- [21] Blümer J., Rey J., Dehmelt L., Mazel T., Y.-W. Wu, Bastiaens P., Goody R.S., and Itzen A. RabGEFs are a major determinant for specific rab membrane targeting. *J Cell Biol*, 200(3):287–300, 2013.
- [22] Nottingham R.M. and Pfeffer S.R. Defining the boundaries: Rab GEFs and GAPs. *Proc Natl Acad Sci USA*, 106(36):14185–14186, 2009.
- [23] Pfeffer S.R. and Aivazian D. Targeting rab GTPases to distinct membrane compartments. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 5:886–896, 2004.
- [24] Mizuno-Yamasaki E., Rivera-Molina F., and Novick P. GTPase networks in membrane traffic. *Annu Rev Biochem*, 81:637–659, 2012.
- [25] Vetter I.R. and Wittinghofer A. The guanine nucleotide-binding switch in three dimensions. *Science*, 294(5545):1299–1304, 2001.
- [26] Itzen A. and Goody R.S. GTPases involved in vesicular trafficking: Structures and mechanisms. *Semin Cell Dev Biol*, 22:48–56, 2011.
- [27] Müller M.P. and Goody R.S. Molecular control of rab activity by gefs, gaps and gdi. *Small GTPases*, 0:1–17, 2017.
- [28] Bucci C. and Chiariello M. Signal transduction grabs attention. *Cell Signal*, 16:1–8, 2006.
- [29] Agolaa J.O., Jima P.A., Warda H.H., BasuRay S., and Wandinger-Ness A. Rab gtpases as regulators of endocytosis, targets of disease and therapeutic opportunities. *Clin Genet*, 80:305–318, 2011.
- [30] Goody R.S. and Itzen A. Modulation of small gtpases by legionella. In Hilbi H., editor, *Molecular Mechanisms in Legionella Pathogenesis*. Springer, 2013.
- [31] Spiegel J., Cromm P.M., Itzen A., Goody R.S., Grossmann T.N., and Waldmann H. Direct targeting of rab-gtpase-effector interactions. *Angew Chem Int Ed*, 53: 2498–2503, 2014.
- [32] Langemeyer L., Nunes B.R., Cai Y., Itzen A., Reinisch K.M., and Barr F.A. Diversity and plasticity in rab gtpase nucleotide release mechanism has consequences for rab activation and inactivation. *eLife*, 3:e01623, 2014.
- [33] Wiegandt D., Vieweg S., Hofmann F., Koch D., Li F., Wu Y.-W., Itzen A., Müller M.P., and Goody R.S. Locking gtpases covalently in their functional states. *Nat Comm*, 6:7773, 2015.

- [34] Ishida M., Oguchi M.E., and Fukuda M. Multiple types of guanine nucleotide exchange factors (gefs) for rab small gtpases. *Cell Struct Funct*, 41:61–79, 2016.
- [35] Friese T. *Entwicklung eines Verfahrens zur selektiven Anreicherung und Identifizierung von Rab-GEFs*. Master Thesis. Technische Universität Dortmund, Dortmund, 2013.
- [36] Allaire P.D., Marat A.L., Dall’Armi C., Di Paolo G., McPherson P.S., and Ritter B. The connectin domain: A gef for rab35 mediating cargo-specific exit from early endosomes. *Mol Cell*, 37:370–382, 2010.
- [37] Yoshimura S.-I., Gerondopoulos A., Linford A., Rigden D.J., and Barr F.A. Family-wide characterization of the connectin domain rab gdp-gtp exchange factors. *J Cell Biol*, 191:367–381, 2010.
- [38] Fukuda M., Kobayashi H., Ishibashi K., and Ohbayashi N. Genome-wide investigation of the rab binding activity of run domains: Development of a novel tool that specifically traps gtp-rab35. *Cell Struct Funct*, 36:155–170, 2011.
- [39] Marat A.L. and McPherson P.S. The connectin family, rab35 guanine nucleotide exchange factors interfacing with the clathrin machinery. *J Biol Chem*, 285:10627–10637, 2010.
- [40] Ioannou M.S., Bell E.S., Girard M., Chaineau M., Hamlin J.N.R., Daubaras M., Monast A., Park M., Hodgson L., and McPherson P.S. Dennd2b activates rab13 at the leading edge of migrating cells and promotes metastatic behaviour. *J Cell Biol*, 208:629–648, 2015.
- [41] Matsui T., Noguchi K., and Fukuda M. Dennd3 functions as a guanine nucleotide exchange factor for small gtpase rab12 in mouse embryonic fibroblasts. *J Biol Chem*, 289:13986–13995, 2014.
- [42] Linford A., Yoshimura S.-I., Bastos R.N., Langemeyer L., Gerondopoulos A., Rigden D.J., and Barr F.A. Rab14 and its exchange factor fam116 link endocytic recycling and adherens junction stability in migrating cells. *Dev Cell*, 22:952–966, 2012.
- [43] Wada M., Nakanishi H., Satoh A., Hirano H., Obaishi H., Matsuura Y., and Takai Y. Isolation and characterization of a gdp/gtp exchange protein specific for the rab3 subfamily small g proteins. *J Biol Chem*, 272:3875–3878, 1997.
- [44] Figueiredo A.C., Wasmeier C., Tarafder A.K., Ramalho J.S., Baron R.A., and Seabra M.C. Rab3gep is the non-redundant guanine nucleotide exchange factor for rab27a in melanocytes. *J Biol Chem*, 283:23209–23216, 2008.
- [45] Nookala R.K., Langemeyer L., Pacitto A., Ochoa-Montan B., Donaldson J.C., Blaszczyk B.K., Chirgadze D.Y., Barr F.A., Bazan J.F., and Blundell T.L. Crystal structure of folliculin reveals a hidden function in genetically inherited renal cancer. *Open Biol*, 2:120071, 2012.
- [46] Horiuchi H., Lippé R., McBride H.M., Rubino M., Woodman P., Stenmark H., Rybin V., Wilm M., Ashman K., Mann M., and Zerial M. A novel rab5 gdp/gtp exchange factor complexed to rabaptin-5 links nucleotide exchange to effector recruitment and function. *Cell*, 90:1149–1159, 1997.

- [47] Delprato A., Merithew E., and Lambright D.G. Structure, exchange determinants, and family-wide rab specificity of the tandem helical bundle and vps9 domains of rabex-5. *Cell*, 118:607–617, 2004.
- [48] Mori Y., Matsui T., and Fukuda M. Rabex-5 protein regulates dendritic localization of small gtpase rab17 and neurite morphogenesis in hippocampal neurons. *J Biol Chem*, 288:9835–9847, 2013.
- [49] Sato M., Sato K., Fonarev P., Huang C.-J., Liou W., and Grant B.D. Caenorhabditis elegans RME-6 is a novel regulator of RAB-5 at the clathrin-coated pit. *Nat Cell Biol*, 7:559–569, 2005.
- [50] Kitano M., Nakaya M., Nakamura T., Nagata S., and Matsuda M. Imaging of rab5 activity identifies essential regulators for phagosome maturation. *Nature*, 453(7192): 241–245, 2008.
- [51] Lodhi I.J., Chiang S.-H., Chang L., Vollenweider D., Watson R.T., Inoue M., Pessin J.E., and Saltiel A.R. Gapex-5, a rab31 guanine nucleotide exchange factor that regulates glut4 trafficking in adipocytes. *Cell Metab*, 5(1):59–72, 2007.
- [52] Tall G.G., Barbieri M.A., Stahl P.D., and Horazdovsky B.F. Ras-activated endocytosis is mediated by the rab5 guanine nucleotide exchange activity of RIN1. *Dev Cell*, 1(1):73–82, 2001.
- [53] Saito K., Murai J, Kajihō H., Kontani K., Kurosu H., and Katada T. A novel binding protein composed of homophilic tetramer exhibits unique properties for the small GTPase rab5. *J Biol Chem*, 277:3412–3418, 2002.
- [54] Kajihō H., Saito K., Tsujita K. and Kontani K., Araki Y., Kurosu H., and Katada T. RIN3: A novel rab5 GEF interacting with amphiphysin II involved in the early endocytic pathway. *J Cell Sci*, 116:4159–4168, 2003.
- [55] Kajihō H., Sakurai K., Minoda T., Yoshikawa M., Nakagawa S., Fukushima S., Kontani K., and Katada T. Characterization of RIN3 as a guanine nucleotide exchange factor for the rab5 subfamily GTPase rab31. *J Biol Chem*, 286(27): 24364–24373, 2011.
- [56] Woller B., Luiskandl S., Popovic M., Prieler B.E.M., Ikonge G., Mutzl M., Rehmann H., and Herbst R. Rin-like, a novel regulator of endocytosis, acts as guanine nucleotide exchange factor for rab5a and rab22. *Biochim Biophys Acta*, 1813(6): 1198–1210, 2011.
- [57] Kajihō H., Fukushima S., Kontani K., and Katada T. RINL, guanine nucleotide exchange factor rab5-subfamily, is involved in the EphA8-degradation pathway with odin. *PLoS One*, 7(1):e30575, 2012.
- [58] Otomo A., Hadano S., Okada T., Mizumura H., Kunita R., Nishijima H., Showguchi-Miyata J., Yanagisawa Y., Kohiki E., Suga E., Yasuda M., Osuga H., Nishimoto T., Narumiya S., and Ikeda J.-E. ALS2, a novel guanine nucleotide exchange factor for the small GTPase rab5, is implicated in endosomal dynamics. *Hum Mol Genet*, 12 (14):1671–1687, 2003.
- [59] Topp J.D., Gray N.W., Gerard R.D., and Horazdovsky B.F. Alsin is a rab5 and rac1 guanine nucleotide exchange factor. *J Biol Chem*, 279:24612–24623, 2004.

- [60] Hadano S., Otomo A., Suzuki-Utsunomiya K., Kunita R., Yanagisawa Y., Showguchi-Miyata J., Mizumura H., and Ikeda J.-E. ALS2cl, the novel protein highly homologous to the carboxy-terminal half of ALS2, binds to rab5 and modulates endosome dynamics. *FEBS Lett*, 575(1):64–70, 2004.
- [61] Zhang X., He X., Fu X.-Y., and Chang Z. Varp is a rab21 guanine nucleotide exchange factor and regulates endosome dynamics. *J Cell Sci*, 119:1053–1062, 2006.
- [62] Tamura K., Ohbayashi N., Ishibashi K., and Fukuda M. Structure-function analysis of VPS9-ankyrin-repeat protein (varp) in the trafficking of tyrosinase-related protein 1 in melanocytes. *J Biol Chem*, 286(9):7507–7521, 2011.
- [63] Wang W., Sacher M., and Ferro-Novick S. Trapp stimulates guanine nucleotide exchange on ypt1p. *J Cell Biol*, 151:289–296, 2000.
- [64] Jones S., Newman C., Liu F., and Segev N. The trapp complex is a nucleotide exchanger for ypt1 and ypt31/32. *Mol Biol Cell*, 11:4403–4411, 2000.
- [65] Yamasaki A., Menon S., Yu S., Barrowman J., Meerloo T., Oorschot V., Klumperman J., Satoh A., and Ferro-Novick S. mtrs130 is a component of a mammalian trappii complex, a rab1 gef that binds to copi-coated vesicles. *Mol Biol Cell*, 20:4205–4215, 2009.
- [66] Nordmann M., Cabrera M., Perz A., Bröcker C., Ostrowicz C., Engelbrecht-Vandré S., and Ungermann C. The mon1-ccz1 complex is the gef of the late endosomal rab7 homolog ypt7. *Curr Biol*, 20:1654–1659, 2010.
- [67] Gerondopoulos A., Langemeyer L., Liang J.-R., Linford A., and Barr F.A. Bloc-3 mutated in hermansky-pudlak syndrome is a rab32/38 guanine nucleotide exchange factor. *Curr Biol*, 22:2135–2139, 2012.
- [68] Gerondopoulos A., Bastos R.N., Yoshimura S.-I., Anderson R., Carpanini S., Aligiannis I., Handley M.T., and Barr F.A. Rab18 and a rab18 gef complex are required for normal er structure. *J Cell Biol*, 205:707–720, 2014.
- [69] Siniosoglou S., Peak-Chew S.Y., and Pelham H.R.B. Ric1p and rgp1p form a complex that catalyses nucleotide exchange on ypt6p. *EMBO J*, 19:4885–4894, 2000.
- [70] Pusapati G.V., Luchetti G., and Pfeffer S.R. Ric1-rgp1 complex is a guanine exchange factor for the late golgi rab6a gtpase and an effector of the medial golgi rab33b gtpase. *J Biol Chem*, 287:42129–42137, 2012.
- [71] Hattula K., Furuholm J., Arffman A., and Peränen J. A rab8-specific gdp/gtp exchange factor is involved in actin remodeling and polarized membrane transport. *Mol Biol Cell*, 13:3268–3280, 2012.
- [72] Luo H.R., Saiardi A., Nagata E., Ye K., Yu H. and Jung T.S., Luo X., Jain S., Sawa A., and Snyder S.H. Grab: A physiologic guanine nucleotide exchange factor for rab3a, which interacts with inositol hexakisphosphate kinase. *Neuron*, 31:439–451, 2001.
- [73] Murga-Zamalloa C.A., Atkins S.J., Peranen J., Swaroop A., and Khanna H. Interaction of retinitis pigmentosa gtpase regulator (rpgr) with rab8a gtpase: Implications for cilia dysfunction and photoreceptor degeneration. *Hum Mol Genet*, 19:3591–3598, 2010.

- [74] Sakaguchi A., Sato M., Sato K., Gengyo-Ando K., Yorimitsu T., Nakai J., Hara T., Sato K., and Sato K. Rei-1 is a guanine nucleotide exchange factor regulating rab-11 localization and function in *c. elegans* embryos. *Dev Cell*, 35:211–221, 2015.
- [75] Bensadoun A. and Weinstein D. Assay of proteins in the presence of interfering materials. *Anal Biochem*, 70:241–250, 1976.
- [76] Rappsilber J., Mann M., and Ishihama Y. Protocol for micro-purification, enrichment, pre-fractionation and storage of peptides for proteomics using stagetips. *Nat Protoc*, 2:1896–1906, 2007.
- [77] Rappsilber J., Ishihama Y., and Mann M. Stop and go extraction tips for matrix-assisted laser desorption/ionization, nanoelectrospray, and lc/ms sample pretreatment in proteomics. *Anal Chem*, 75:663–670, 2003.
- [78] Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72:248–254, 1976.
- [79] Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage t4. *Nature*, 227:680–685, 1970.
- [80] Fairbanks G., Steck T.L., and Wallach D.F.H. Electrophoretic analysis of the major polypeptides of the human erythrocyte membrane. *Biochemistry*, 10:2606–2617, 1971.
- [81] Kang D., Gho Y. S., Myungkoo S., and Kang C. Highly sensitive and fast protein detection with coomassie brilliant blue in sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Bull Korean Chem Soc*, 23:1511–1512, 2002.
- [82] Nesterenko M.V., Tilley M., and Upton S.J. A simple modification of blum’s silver stain method allows for 30 minute detection of proteins in polyacrylamide gels. *J Biochem Biophys Methods*, 28:239–42, 1994.
- [83] Zhang Z. and A.G. Marshall. A universal algorithm for fast and automated charge state deconvolution of electrospray mass-to-charge ratio spectra. *J Am Soc Mass Spectrom*, 9:225–233, 1998.
- [84] Hernandez P., Binz P.-A., and Wilkins M.R. *Proteome Research: Concepts, Technology and Application*. Springer, 2007.
- [85] Ashcroft A.E. Protein and peptide identification: The role of mass spectrometry in proteomics. *Nat Prod Rep*, 20:202–215, 2003.
- [86] Yates J.R. The revolution and evolution of shotgun proteomics for large-scale proteome analysis. *J Am Chem Soc*, 135:1629–1640, 2013.
- [87] Michalski A., Damoc E., Hauschild J.P., Lange O., Wieghaus A., Makarov A., Nagaraj N., Cox J., Mann M., and Horning S. Mass spectrometry-based proteomics using q exactive, a high-performance benchtop quadrupole orbitrap mass spectrometer. *Mol Cell Proteomics*, 10:1–11, 2011.
- [88] Hu Q., Noll R.J., Li H., Makarov A., Hardman M., and Cooks R.G. The orbitrap: A new mass spectrometer. *J Mass Spectrom*, 40:430–443, 2005.

- [89] Vendrell-Navarro G., Brockmeyer A., Waldmann H., Janning P., and Ziegler S. Identification of the targets of biologically active small molecules using quantitative proteomics. In Hempel J.E., Williams C.H., and Hong C.C., editors, *Chemical Biology*. Humana Press, 2015.
- [90] Cox J. and Mann M. Maxquant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification. *Nat Biotechnol*, 26:1367–1372, 2008.
- [91] Koch D., Rai A., Ali I., Bleimling N., Friese T., Brockmeyer A., Janning P., Goud B., Itzen A., Müller M.P., and Goody R.S. A pull-down procedure for the identification of unknown gefs for small gtpases. *Small GTPases*, 7:93–106, 2016.
- [92] Kabsch W. Automatic processing of rotation diffraction data from crystals of initially unknown symmetry and cell constants. *J Appl Crystallogr*, 26:795–800, 1993.
- [93] McCoy A.J., Grosse-Kunstleve R.W., Adams P.D., Winn M.D., Storoni L.C., and Read R.J. Phaser crystallographic software. *J Appl Crystallogr*, 40:658–674, 2017.
- [94] Emsley W. and Cowtan K. Coot: Model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 60:2126–2132, 2004.
- [95] Murshudov G.N., Vagin A.A., and Dodson E.J. Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 53:240–255, 1997.
- [96] Richardson J.R., Jones S., Litt R.J., and Segev N. Gtp hydrolysis is not important for ypt1 gtpase function in vesicular transport. *Mol Cell Biol*, 18:827–838, 1998.
- [97] Scheffzek K., Ahmadian M.R., Kabsch W., Wiesmüller L., Lautwein A., Schmitz F., and Wittinghofer A. The ras-rasgap complex: Structural basis for gtpase activation and its loss in oncogenic ras mutants. *Science*, 277:333–339, 1997.
- [98] Itzen A., Pylypenko O., Goody R.S., K. Alexandrov, and A. Rak. Nucleotide exchange via local protein unfolding—structure of rab8 in complex with mss4. *EMBO J*, 25:1445–1455, 2006.
- [99] Li B. and Warner J.R. Mutation of the rab6 homologue of *saccharomyces cerevisiae*, ypt6, inhibits both early golgi function and ribosome biosynthesis. *J Biol Chem*, 271:16813–16819, 1996.
- [100] Tsukada M., Will E., and Gallwitz D. Structural and functional analysis of a novel coiled-coil protein involved in ypt6 gtpase-regulated protein transport in yeast. *Mol Biol Cell*, 10:63–75, 1996.
- [101] Sinka R., Gillingham A.K., Kondylis V., and Munro S. Golgi coiled-coil proteins contain multiple binding sites for rab family g proteins. *J Cell Biol*, 183:607–615, 2008.
- [102] Yeung Y.-G., Nieves E., Angeletti R.H., and Stanley E.R. Removal of detergents from protein digests for mass spectrometry analysis. *Anal Biochem*, 382:135–137, 2008.

- [103] Peurois F., Veyron S., Ferrandez Y., Ladid I., Benabdi S., Zeghouf M., Peyroche G., and Cherfils J. Characterization of the activation of small gtpases by their gefs on membranes using artificial membrane tethering. *Biochem J*, DOI: 10.1042/BCJ20170015, 2017.
- [104] Mousnier A., Schroeder G.N., Stoneham C.A., So E.C., Garnett J.A., Yu L., Matthews S.J., Choudhary J.S., Hartland E.L., and Frankel G. A new method to determine in vivo interactomes reveals binding of the legionella pneumophila effector piee to multiple rab gtpases. *MBio*, 5:e01148–14, 2014.

Danksagung

Prof. Dr. Roger S. Goody gilt mein herzlicher Dank für das faszinierende Thema, seine hervorragende Betreuung, für die Möglichkeit die Ergebnisse dieser Dissertation in seinem Labor erarbeitet zu haben, sowie seine fortwährende Unterstützung.

Dr. Matthias P. Müller danke ich für die hervorragende Betreuung, für die Geduld hinsichtlich unzähliger Fragen und für den freundschaftlichen Kontakt über die Arbeit hinaus.

Nathalie Bleimling gebührt mein Dank für ihre wertvolle Unterstützung, praktische Hilfe sowie für ihre herzliche Art.

Der gesamten AG Goody danke ich für ein tolles und inspirierendes Arbeitsklima.

Prof. Dr. Mohammed Reza Ahmadian danke ich für die netten und anregenden Gespräche bei einer Tasse Jasmin-Tee.

Dr. Petra Janning und Andreas Brockmeyer danke ich für die Unterstützung bei der Massenspektrometrie.

Dr. Florian Horn gilt mein Dank für die Anregung mich ausserhalb der medizinischen Fakultät um eine Promotion zu bewerben.

Petra Göbbels und meinen Eltern danke ich für ihre liebevolle Unterstützung während der gesamten Studienzeit und darüber hinaus.