



Fakultät für Chemie

Fachgebiet Proteinchemie

**Charakterisierung struktureller und funktioneller
Konsequenzen posttranslationaler Modifikationen
von kleinen GTPasen**

Evelyn Sabine Ramcke

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Chemie der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Prof. Dr. Ville Kaila

Prüfer der Dissertation:

1. Prof. Dr. Aymelt Itzen

2. Prof. Dr. Michael Sattler

Die Dissertation wurde am 31.10.2016 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Chemie am 18.01.2017 angenommen.

vorgelegt von
Evelyn Sabine Ramcke
aus Villingen-Schwenningen
geboren am 13.11.1987

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von Oktober 2012 bis Oktober 2016 an der Fakultät für Chemie der Technischen Universität München unter der Anleitung von Prof. Dr. Aymelt Itzen angefertigt.

Im Rahmen dieser Arbeit ist folgende Veröffentlichung erschienen:

Luitz, M. P., Bomblies, R., Ramcke, E., Itzen, A. & Zacharias, M. (2016) Adenylylation of Tyr77 stabilizes Rab1b GTPase in an active state: A molecular dynamics simulation analysis, *Scientific Reports*. **6**, 19896.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungen/Formelzeichen	V
Zusammenfassung	1
Abstract	3
1 Einleitung	5
1.1 Familie der kleinen GTPasen	5
1.2 Kleine GTPasen als molekulare Schalter	6
1.3 RabGTPasen im Vesikeltransport	8
1.3.1 Rab-Effektor Komplexe.....	9
1.4 Funktionen von RhoGTPasen	9
1.4.1 Rho-Effektor Komplexe.....	9
1.5 Regulation durch GEFs, GAPs und GDIs.....	10
1.6 Bakterielle Proteine manipulieren kleine GTPasen.....	11
1.6.1 RabGTPasen und bakterielle Effektoren.....	11
1.6.2 RhoGTPasen und bakterielle Effektoren.....	13
1.7 Bedeutung von posttranslationalen Modifikationen.....	14
1.7.1 Adenylylierung	14
1.7.2 Phosphocholinierung	16
1.7.3 Prenylierung	17
1.7.4 Phosphorylierung.....	18
1.7.5 Andere PTMs kleiner GTPasen	18
1.7.6 Methoden zur artifiziellen Einführung posttranslationaler Modifikationen in Proteine.....	22
1.8 Proteine als konformationelle Schalter	25
2 Zielsetzung.....	27
3 Ergebnisse.....	29

3.1	Eigenschaften modifizierender Enzyme.....	29
3.1.1	Spezifität von VopS, IbpA und DrrA für Nukleotidanaloga.....	29
3.1.2	Einfluss von Switch II-Aminosäureaustauschen in Rab1 auf Enzymaktivitäten.....	37
3.1.3	Demodifikation eines Rab1-Switch II-Peptides durch SidD	39
3.1.4	Charakterisierung des anti-Rab1-AMP-Antikörpers.....	40
3.2	Einfluss von posttranslationalen Modifikationen auf intrinsische Eigenschaften kleiner GTPasen	42
3.2.1	Produktion und Modifikation von kleinen GTPasen	42
3.2.2	Auswirkung von PTMs auf intrinsische Nukleotidhydrolyse- und Nukleotidaustauschraten	47
3.2.3	Auswirkung von PTMs auf die Interaktion mit Enzymen.....	49
3.2.4	Auswirkung von PTMs auf die thermische Stabilität.....	50
3.3	Auswirkung von PTMs auf die Konformation kleiner GTPasen.....	52
3.3.1	Adenylylierung zwingt Rab1 in die aktive Konformation	52
3.3.2	Die Stacking Interaktion mit F45 ist nicht für die Stabilisierung von Rab1 verantwortlich	55
3.3.3	Mutation von Tyrosin 77 zu Glutamat hat globale Auswirkungen auf die Rab1 Struktur.....	56
3.3.4	Die Phosphocholinierung hat keinen Einfluss auf den Rab1 Aktivitätszustand	58
3.3.5	Adenylylierung von Cdc42 an Tyrosin 32 und Threonin 35 führt zu einer intermediären Konformation.....	60
4	Diskussion und Ausblick.....	63
4.1	Substratspezifitäten adenylylierender Enzyme	63
4.2	Enzymaktivitäten	65
4.3	Auswirkungen von PTMs auf intrinsische Eigenschaften kleiner GTPasen.....	66
4.4	Auswirkungen von PTMs auf die Struktur kleiner GTPasen.....	69
4.5	Modell zur zellulären Auswirkung der Adenylylierung	72
4.6	Ausblick.....	73
5	Material und Methoden.....	75

5.1	Materialien	75
5.1.1	Chemikalien.....	75
5.1.2	Verbrauchsmaterial.....	77
5.1.3	Chromatographiesäulen	78
5.1.4	Enzyme	79
5.1.5	Antikörper	79
5.1.6	Kits	79
5.1.7	Größenstandards.....	80
5.1.8	Plasmide.....	80
5.1.9	Oligonukleotide.....	81
5.1.10	Medien.....	82
5.1.11	E. coli Stämme	83
5.1.12	Antibiotika.....	84
5.1.13	Häufig verwendete Lösungen	84
5.1.14	Geräte	86
5.1.15	Software	88
5.2	Methoden	89
5.2.1	Molekularbiologische Methoden.....	89
5.2.2	Proteinchemische Methoden	92
5.2.3	Chromatographische Methoden.....	94
5.2.4	Analytische und biophysikalische Methoden.....	96
6	Literaturverzeichnis	103
7	Anhang	112
7.1	Massenspektren.....	112
7.2	Biochemische Daten	113
7.3	NMR.....	118
	Danksagung	121
	Eidesstattliche Erklärung	122

ABKÜRZUNGEN/FORMELZEICHEN

AMP	Adenosin-5'-monophosphat
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
°C	Grad Celsius
CD	Circulardichroismus
CRIB	Cdc42/rac interactive-binding
CSP	Chemical shift perturbation
CTP	Cytidin-5'-triphosphat
D ₂ O	schweres Wasser
Da	Dalton
ddH ₂ O	entionisiertes Wasser
dNTP	Desoxynukleotid-5'-triphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl. desoxyribonucleic acid)
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia Coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFR	epidermal growth factor receptor
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
ER	endoplasmatisches Retikulum
FIC	filamentation induced by cyclic AMP
FRET	Förster-Resonanz-Energietransfer
g (mg, µg)	Gramm (Milligramm, Mikrogramm)
GAP	GTPase aktivierendes Protein (engl. GTPase activating protein)
GDI	Guaninnukleotid-Dissoziationsinhibitor (engl. guanine nucleotide dissociation inhibitor)
GDP	Guanosin-5'-diphosphat
GEF	Guaninnukleotidaustauschfaktor (engl. guanine nucleotide exchange factor)
GppNHp	5'-Guanylylimidodiphosphat
GS-ATase	Glutaminsynthetase-Adenylyltransferase
GST	Glutathion-S-Transferase
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
h	Stunde (engl. hour)
HPLC	Hochleistungsflüssigchromatographie (engl. high performance liquid chromatography)
HSQC	heteronuclear single quantum coherence
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
kbar	kilobar
k _{cat}	Wechselzahl
K _M	Michaelis Menten Konstante
l (ml, µl)	Liter (Milliliter, Mikroliter)
LB-Medium	Lysogeny Broth Medium
LCV	<i>Legionella</i> enthaltende Vakuole (engl. <i>Legionella</i> containing vacuole)
<i>L. pneumophila</i>	<i>Legionella pneumophila</i>
M (mM, µM, nM)	molar (millimolar, mikromolar, nanomolar)

m (cm, mm, μm , nm)	Meter (Zentimeter, Millimeter, Mikrometer, Nanometer)
mant	2'3'-O-(N-methyl-anthraniloyl)
MBP	Maltose bindendes Protein
min	Minute
MS	Massenspektrometrie
$M_{\text{theor.}}$	theoretische Masse
MW	Molekulargewicht (engl. molecular weight)
NMR	Kernspinresonanz (engl. nuclear magnetic resonance)
NTA	Nitrilotriessigsäure
NMP	Nukleosidmonophosphat
OD	optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PC	Phosphocholin
PCR	Polymerasekettenreaktion (engl. polymerase chain reaction)
PI4P	Phosphoinositol-4-phosphat
PTM	posttranslationale Modifikation
Rab GGTase	Rab Geranylgeranyl-Transferase
REP	Rab Escort Protein
rpm	Umdrehungen pro Minute (engl. revolutions per minute)
s	Sekunden
SDS	Sodium dodecylsulfate
SNARE	engl. soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment receptor
TAK1	Transforming growth factor- β -activated Kinase 1
TEV	Tobacco Etch Virus
tRNA	transfer-Ribonukleinsäure (transfer ribonucleic acid)
u	unit
UTP	Uridin-5'-triphosphat
UV	Ultraviolett
V (mV)	Volt (Millivolt)
Vis	sichtbar (engl. visible)
(v/v)	Volumenprozent
(w/v)	Massenprozent

Aminosäuren wurden gemäß der Empfehlung der „International Union of Pure and Applied Chemistry“ (IUPAC) und der „International Union of Biochemistry and Molecular Biology“ (IUB) mit Ein- bzw. Dreibuchstabencodes abgekürzt.

ZUSAMMENFASSUNG

Kleine GTPasen sind an einer Vielzahl von Prozessen in der Zelle beteiligt. Sie regulieren den Vesikeltransport, sind in die Organisation des Zytoskeletts involviert und übernehmen Funktionen in anderen zellulären Transportprozessen und der Steuerung der Genexpression. Kleine GTPasen wechseln zwischen einem aktiven GTP-gebundenen und einem inaktiven GDP-gebundenen Zustand. Um dies zu erreichen sind zusätzliche Enzyme, Guaninnukleotidaustauschfaktoren (GEFs) und GTPase aktivierende Proteine (GAPs), notwendig. Die zwei konformationell flexiblen Switch-Regionen der GTPase geben durch ihre Strukturen den Aktivitätszustand der GTPase an nachgeschaltete Bindungspartner weiter. Die Interaktion mit Effektorproteinen erfolgt normalerweise nur im aktiven Zustand. Einige pathogene Bakterien haben Mechanismen entwickelt, um kleine GTPasen gezielt für ihre Zwecke zu manipulieren. Sekretierte bakterielle Enzyme ahmen GEFs und GAPs nach und führen zur Veränderung der GTPase Funktion durch posttranslationale Modifikationen. Dies erlaubt den Bakterien das Überleben und Replizieren in der Wirtszelle. Da die posttranslationalen Modifikationen in den Switch-Regionen der GTPasen erfolgen, ist der Einfluss dieser Modifikationen auf die Funktion und Struktur der kleinen GTPasen von zentraler Bedeutung.

In der vorliegenden Arbeit konnten Einflüsse der posttranslationalen Modifikation auf die intrinsischen biochemischen Eigenschaften und die Struktur der GTPasen Cdc42 und Rab1 beschrieben werden. Die Modifikation von Cdc42 mit AMP verlangsamt die intrinsische Nukleotidhydrolyse und verändert die Nukleotidbindung. Weitere Untersuchungen zeigten, dass auch die Interaktion mit Effektorproteinen durch die Modifikation von Cdc42 beeinflusst wird. An Thr35 adenyliertes Cdc42 kann nicht mehr durch das GEF Dock9 in die aktive Form überführt werden. Die Adenylylierung an Tyr32 führt zu einer verringerten Austauschaktivität. Als weiterer Effekt der posttranslationalen Modifikation wurde die Erhöhung der thermischen Stabilität der GTPasen beobachtet. Diese für die Adenylylierung von Rab1 an Tyr77 besonders stark ausgeprägte Stabilisierung impliziert somit strukturelle Konsequenzen. NMR-Experimente offenbarten eine Stabilisierung von GDP-gebundenem, adenyliertem Rab1 im aktiven Zustand. Dieser Effekt wurde nicht für die Phosphocholinierung von Rab1 und für die Adenylylierung von Cdc42 beobachtet. In dieser Arbeit wird somit erstmals ein neuer Regulationsmechanismus des Aktivitätszustandes der kleinen GTPase Rab1 durch posttranslationale Modifikation beschrieben.

ABSTRACT

Small GTPases are part of various processes in the cell. They regulate vesicular transport, are involved in organizing the cytoskeleton and function in various cellular transport processes and the regulation of gene expression. Small GTPases switch between an active GTP-bound and an inactive GDP-bound state. To achieve this, they need the help of accessory proteins, guanine nucleotide exchange factors (GEFs) and GTPase activating proteins (GAPs). The conformations of the two GTPase Switch-Regions dictate the active and inactive states. GTPases interact with effector proteins only in their active state. Some pathogens have evolved mechanisms to manipulate small GTPase function. Secreted bacterial enzymes mimic GEFs and GAPs and alter the function of GTPases by posttranslational modifications. This allows the pathogens to survive and replicate in the host cell. Since the small GTPases are modified directly in the Switch-Regions, the influence of these posttranslational modifications on function and structure of the small GTPases is of fundamental importance.

The consequences of posttranslational modifications on intrinsic properties and conformations of the GTPases Cdc42 and Rab1 were elucidated in this thesis. Modification of Cdc42 with AMP slows down intrinsic hydrolysis and changes nucleotide binding. Additionally, the interaction with effector proteins is influenced by adenylation of Cdc42. Cdc42 which is adenylylated at Thr35 cannot be interconverted to the active form by the GEF Dock9. Adenylylation of Tyr32 leads to a decrease in the exchange rate. An additional effect of posttranslational modification is the increase in thermal stability. This is especially pronounced for the adenylylation of Rab1 and suggests structural consequences. Successive NMR experiments showed that adenylylated GDP-bound Rab1 is stabilized in an active state. This effect could not be shown for adenylylation of Cdc42 or phosphocholination of Rab1. Therefore, for the first time, a new regulatory mechanism of the activity state of the small GTPase Rab1 by posttranslational modification is described.

1 EINLEITUNG

Proteine bilden als Strukturbestandteil Gerüste für Zellen und Gewebe und sind als Enzyme Katalysatoren für chemische Reaktionen im Zellstoffwechsel. Ihr komplexer dreidimensionaler Aufbau bildet die Grundlage für diese große Diversität. Die kovalente Anbringung funktionaler Gruppen an Proteine, posttranslationale Modifikation (PTM), ist eine zusätzliche Regulations-ebene für ihre Aktivität und Funktion. Auch Bakterien machen sich diese Mechanismen zu Nutze, um Wirtsproteine zu manipulieren und die Infektion voranzutreiben [1]. Als Ziele dieser Manipulationen wurden in dieser Arbeit Proteine der Familie der kleinen GTPasen untersucht. Diese übernehmen vielseitige Aufgaben innerhalb der Zelle und werden räumlich und zeitlich genau reguliert [2]. Die zugrundeliegenden Prozesse werden in den folgenden Kapiteln genauer erläutert.

1.1 Familie der kleinen GTPasen

Proteine der Superfamilie der kleinen GTPasen sind essentielle Regulatoren in einer Vielzahl von intrazellulären Signalprozessen. Sie sind monomere Proteine mit einem Molekulargewicht von 20-40 kDa [3], die in fünf sich funktionell unterscheidende Familien unterteilt werden können [4, 5]. Eine Übersicht ist in Tabelle 1-1 dargestellt. In dieser Arbeit wurde ausschließlich mit GTPasen der Rab und Cdc42 Familie gearbeitet.

Tabelle 1-1: Familien kleiner GTPasen und zugehörige Funktionen.

Familie	Funktion
Ras	Genexpression
Rho/Rac/Cdc42	Zytoskelett Reorganisation; Genexpression
Rab	Intrazellulärer Vesikeltransport
Sar/Arf	Intrazellulärer Vesikeltransport
Ran	Nukleozytoplasmatischer Transport während Zellzyklus; Mikrotubuliorganisation

1.2 Kleine GTPasen als molekulare Schalter

Alle kleinen GTPasen teilen eine konservierte G-Domäne, die durch Bindung von Guanosindiphosphat (GDP) und Guanosintriphosphat (GTP) den Aktivitätszustand der GTPase vorgibt. Diese besteht, wie in Abbildung 1-1 dargestellt, aus einem sechssträngigen β -Faltblatt sowie fünf umgebenden α -Helices, die konservierte Sequenzmotive enthalten und die Nukleotidbindungsregion bilden.

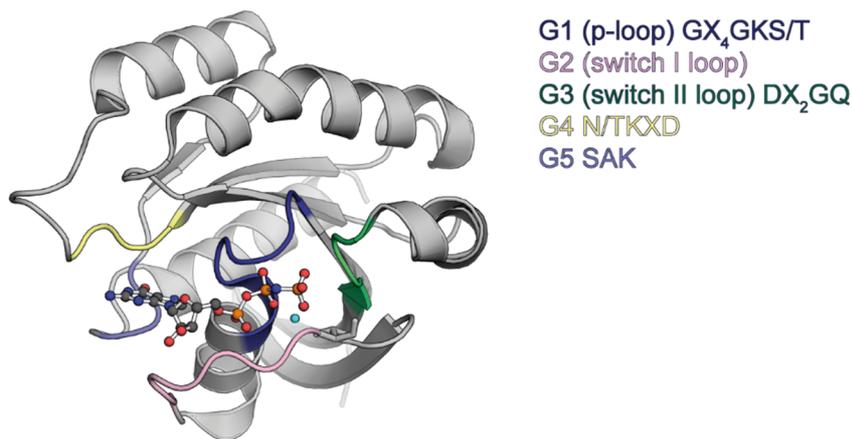


Abbildung 1-1: Konservierte Sequenzmotive kleiner GTPasen. Kleine GTPasen zeichnen sich durch fünf konservierte Sequenzmotive G1-G5 aus, die für ihre Aktivität von essentieller Bedeutung sind. Stäbchendarstellung: GppNHp. PDB ID 3nkv.

Die Nukleobase interagiert hierbei mit Aminosäuren der G4- und G5 Motive, während β - und γ -Phosphat des Nukleotids Bindungen mit dem konservierten P-Loop (G1) eingehen. Durch die Bindung des G4-Aspartats an die Base und eine Interaktion des G5-Alanin mit dem Proteinrückgrat wird die Spezifität der GTPase für Guaninnukleotide vermittelt. Außerdem stellt das Aspartat des G3-Motivs einen wasservermittelten Kontakt zum Magnesiumion her, welches für die hochaffine Bindung des Nukleotids und die Nukleotidhydrolyse essentiell ist. Das Motiv G2 wird als Switch I-Loop bezeichnet, während G3 in der Switch II-Region liegt [6-8]. Die Bezeichnung *Switch* beruht auf dem Vergleich der Kristallstrukturen von Ras:GDP und Ras:GTP, die in diesen Regionen die größten konformationellen Unterschiede aufweisen [9]. Die Interaktion kleiner GTPasen mit Effektorproteinen findet nur im aktiven GTP-gebundenen Zustand statt. Die Konformationen der Switch-Regionen unterscheiden sich im GDP- und GTP-gebundenen Zustand deutlich. In Abbildung 1-2 ist die Kristallstruktur einer GTPase im GDP- und GTP-gebundenen Zustand dargestellt. Im GDP-gebundenen, inaktiven Zustand liegen die Switch-Regionen ungeordnet vor, während GTP-Bindung zu strukturierten Switch-Regionen führt. Diese erhöhte Flexibilität zeigt sich auch in Kristallstrukturen und NMR (Nuclear magnetic resonance, Kernspinresonanz) Experimenten [9, 10]. Die Bindung mit Effektoren kann somit durch die Erkennung konformationell unterschiedlicher Switch-Regionen in Abhän-

gigkeit des Nukleotidzustands der GTPase erfolgen. Gebundenes GTP wird durch die intrinsische Hydrolysefunktion der GTPase hydrolysiert [2]. Hierbei spielt die Bindung eines Threonins und eines Glycins der Switch-Regionen an das γ -Phosphat von GTP eine wichtige Rolle. Diese Bindungen werden bei Hydrolyse von GTP aufgelöst, was zu konformationellen Veränderungen in Switch I und Switch II der GTPase führt. Dies wird auch als *loaded spring* Mechanismus bezeichnet [6]. Auch das konservierte G3-Glutamin ist von Bedeutung für die intrinsische Hydrolyse, da es den Angriff eines Wassermoleküls auf das γ -Phosphat von GTP ermöglicht [11].

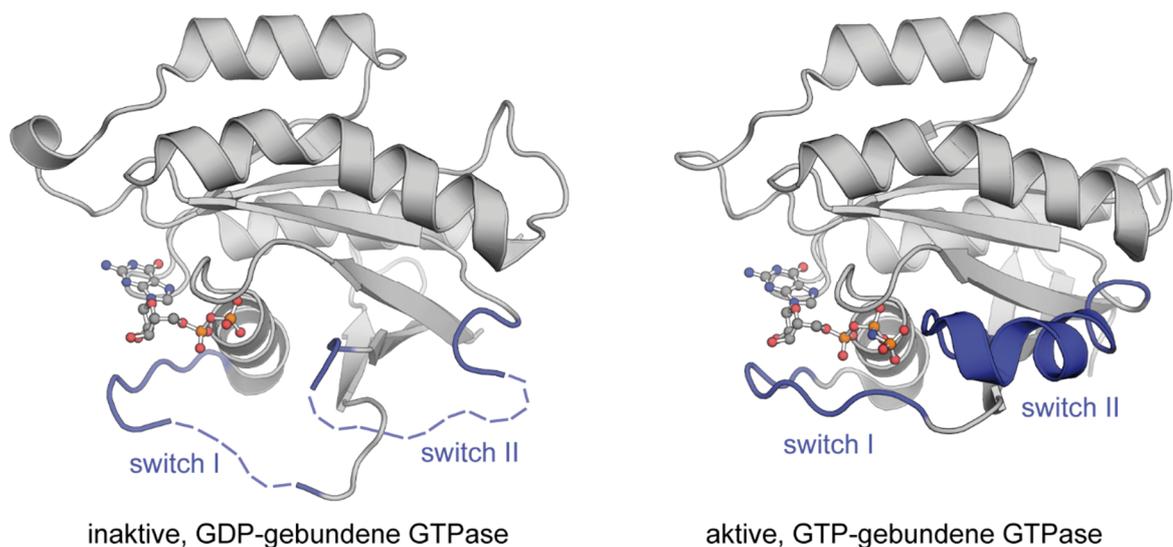


Abbildung 1-2: Kristallstrukturen von GTPase:GDP und GTPase:GTP (PDB IDs: 1ky3; 3nkx). Switch-Regionen sind in blau eingefärbt. Im inaktiven Zustand der GTPase sind die Switch-Regionen ungeordnet, während sie im aktiven Zustand eine hochgeordnete Struktur einnehmen. Die Nukleotide GDP und GTP sind in Stäbchendarstellung abgebildet.

Aufgrund der sehr langsamen intrinsischen Nukleotiddissoziation und GTP-Hydrolyse benötigen kleine GTPasen sogenannte Guaninnukleotidaustauschfaktoren (engl. *Guanine nucleotide Exchange factors*, GEFs) und GTPase-Aktivierungsproteine (engl. *GTPase activating proteins*, GAPs), um effektiv zwischen GDP- und GTP-Zustand wechseln zu können [12]. Der Zyklus aus Aktivierung und Inaktivierung der GTPase ist in Abbildung 1-3 illustriert. Die GTPase liegt im Cytosol im inaktiven Zustand an Guaninnukleotiddissoziationsinhibitor (guanine nucleotide dissociation inhibitor, GDI) gebunden vor. Austausch von GDP zu GTP mit Hilfe eines GEFs führt zur Aktivierung der GTPase, die in Folge mit Effektorproteinen interagieren kann. Die Inaktivierung durch GAPs führt erneut zur Bindung mit GDI.

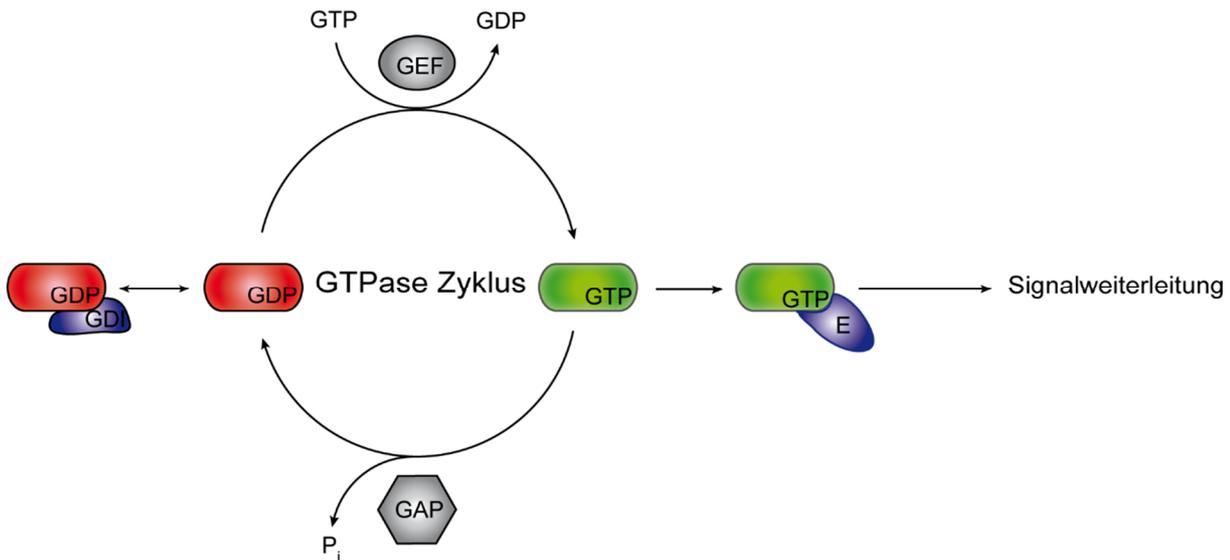


Abbildung 1-3: Der GTPase Zyklus: Die inaktive GTPase liegt im Cytosol an GDI gebunden vor. Durch GEF-katalysierten Nukleotidaustausch von GDP zu GTP wird sie in den aktiven Zustand überführt. Die Bindung von Effektoren führt dann zu diversen Signalweiterleitungsprozessen. Die Inaktivierung erfolgt durch GAPs und führt wieder zum inaktiven GTPase Zustand und Bindung an GDI.

1.3 RabGTPasen im Vesikeltransport

RabGTPasen stellen mit ca. 60 Mitgliedern die größte Familie kleiner GTPasen dar. Ihre Homologie zu Ras Proteinen wurde zuerst im Gehirn von Ratten entdeckt, was zu ihrem Namen *ras related in brain* (rab) führte [13]. Durch ihre reversible Assoziation mit Membranen durch C-terminal angebrachte Geranylgeranylgruppen werden sie zu essentiellen Regulatoren in zellulären Vesikeltransportprozessen. Sie übernehmen Aufgaben in Vesikelknospung, -uncoating, -motilität und Vesikelfusion durch indirekte Interaktionen mit Motoren, SNAREs (engl. *soluble N-ethylmaleimide sensitive factor attachment receptor*) und Mantelkomponenten [14]. Rab1 ist für den Vesikeltransport zwischen Endoplasmatischem Retikulum (ER) und Golgi-Apparat zuständig und ermöglicht die Steuerung und Fusion von Cop II gecoateten Vesikeln mit dem cis-Golgi [15, 16]. Während des Vesikeltransports wechselwirken Rab-Proteine mit diversen Effektoren. Diese interagieren mit wenigen bekannten Ausnahmen nur im GTP-gebundenen Zustand der GTPase. Je nach Signalweg wirken individuelle Effektoren, um konkrete zelluläre Effekte zu erreichen. So werden Effektoren genutzt, um Vesikel aus der Membran abzuknospen, sie entlang des Zytoskeletts zu transportieren, sie an die Zielmembran zu steuern und anzuheften und schließlich mit der Zielmembran zu fusionieren [15]. Hierbei spielen beispielsweise sogenannte *Tethering* Faktoren wie GM130 [16] oder p115 [17] eine Rolle, die das Andocken von Vesikeln an Membranen vermitteln. Für die Rab1-Effektoren Mical-1, -2 und -3 wird eine Rolle in der Verbindung zum Zytoskelett vermutet [18].

1.3.1 Rab-Effektor Komplexe

Rab-Effektor Komplexe werden über die Interaktion von ein oder zwei α -Helices des Effektors mit Switch I, Switch II und Interswitch-Regionen der GTPase und spezifischen zusätzlichen Wechselwirkungen gebildet [19, 20]. Bei vielen Rab-Effektor-Komplexen ist auch eine hydrophobe Triade an der Bindung beteiligt, die aus einem Phenylalanin vom Beginn der Interswitch-Region (bei Rab1b Phe45A), einem Tryptophan (bei Rab1 Trp62) und einem Switch II-Tyrosin (bei Rab1 Tyr77) besteht [21]. Die Spezifität eines bestimmten Effektors für eine ausgewählte RabGTPase wird dann durch Interaktionen mit der hydrophoben Triade und zusätzliche Interaktionen bestimmt [19].

1.4 Funktionen von RhoGTPasen

Im humanen Genom sind 22 Mitglieder der Rho Familie kleiner GTPasen kodiert [22]. Sie sind an wichtigen Signalweiterleitungsprozessen beteiligt, die Zytoskelettorganisation, Proliferation, Apoptose, Zellpolarität, Adhäsion und Motilität regulieren [23-25]. RhoGTPasen können prenyliert und palmitoyliert werden. Die Prenylierung des Cysteins im C-terminalen CAAX Motiv ist Bedingung für die Translokation zwischen Membranen und Zytosol [26, 27]. Auch die Phosphorylierung, Ubiquitinierung und SUMOylierung von RhoGTPasen sind wichtige Regulationsebenen [28].

Die RhoGTPase Cdc42 ist ein wichtiger Regulator der Aktin-Zytoskelett-Architektur. Aufgrund der hohen Zahl Cdc42-regulierter Effektorproteine und Signalwege wird aber angenommen, dass seine zelluläre Funktion deutlich komplexer ist. So wurde gezeigt, dass Cdc42 in humanen Zellen am Golgi lokalisiert ist [29] und aktives Cdc42 mit COP I assoziiert [30]. Dies impliziert eine Funktion in Transportprozessen, die zugrundeliegenden Mechanismen sind allerdings unbekannt. Außerdem wird eine Funktion von Cdc42 in *Epidermal Growth Factor Receptor* (EGFR) vermittelten Signalwegen vermutet, da unter anderem aktives Cdc42 die EGFR-Ubiquitinierung verhindert [31].

1.4.1 Rho-Effektor Komplexe

Die Interaktion von RhoGTPasen mit Effektorproteinen erfolgt primär über die Switch-Regionen, es wurden aber auch Interaktionen außerhalb der Switch-Bereiche beobachtet [32]. RhoGTPasen haben zusätzlich eine zwölf Aminosäuren lange Insertionsregion. Diese ist für die Aktivierung einiger Effektorproteine (bspw. NADPH-Oxidase) nötig und liefert somit eine zusätzliche spezifitätsvermittelnde Region [33]. Effektorproteine, die das sogenannte CRIB (*Cdc42/Rac interactive-binding*) Motiv enthalten, können sowohl Cdc42 als auch Rac binden [34], während andere spezifisch an Cdc42 binden [35]. NMR-Strukturen der GTPase-Effektor-

Komplexe zeigen, dass die GTPase-Bindung in den Effektoren signifikante Konformationsänderungen auslöst [36]. So erfolgt die Effektoraktivierung durch RhoGTPasen häufig über die Auflösung intramolekularer autoinhibitorischer Interaktionen [37].

1.5 Regulation durch GEFs, GAPs und GDIs

Der GEF-katalysierte Nukleotidaustausch wird durch die Bildung eines niedrigaffinen Komplexes zwischen GEF und GDP-gebundener GTPase eingeleitet. Es kommt zur Dissoziation von GDP und Bildung eines hochaffinen Komplexes zwischen GEF und nukleotidfreier GTPase. Die Bindung von im Zytosol in hoher Konzentration (1 mM) vorliegendem GTP führt schließlich zur Dissoziation des GEFs von der GTPase [2, 38, 39]. Das Beispiel eines nukleotidfreien GTPase-GEF Komplexes von Rab1b:DrrA in Abbildung 1-4 zeigt, dass die Nukleotidbindungs-tasche der GTPase weit geöffnet und dem Lösungsmittel zugänglich ist. Die Freisetzung des Nukleotids führt außerdem zu erhöhter struktureller Flexibilität der G4- und G5-Motive [40]. Kürzlich wurde durch Blümer *et al.* [41] gezeigt, dass Rab-GEFs auch für das spezifische Targeting von Rabs an die richtige Membran zuständig sind. Die Rekrutierung von Rab5 an Mitochondrien war in den Experimenten von der Aktivität des Rab5-GEFs Rabex-5 abhängig.

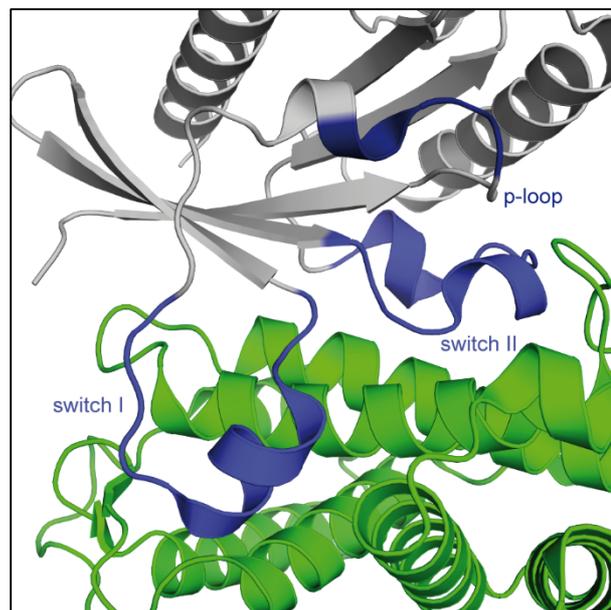


Abbildung 1-4: Kristallstruktur des nukleotidfreien Rab1:DrrA-Komplexes. Die Nukleotidbindungstasche ist weit geöffnet. Rab1 ist in grau, Switch-Regionen in blau und DrrA in grün dargestellt [40]. PDB ID 3JZA.

Nach Erfüllung ihrer zellulären Aufgabe werden kleine GTPasen durch GAPs inaktiviert. Erste Untersuchungen von GAP-Proteinen zeigten einen Mechanismus, bei dem eine Argininseitenkette des GAPs die partiell negative Ladung am Übergangszustand stabilisiert und das konservierte Switch II-Glutamin in cis für die Aktivierung eines Wassermoleküls zur Ausführung des nukleophilen Angriffs auf GTP positioniert [2, 42, 43]. Nicht alle GAPs arbeiten allerdings

nach diesem Mechanismus, bei der Familie der TBC-enthaltenden GAPs beispielsweise wird das Switch II-Glutamin durch ein Glutamin des GAPs in trans ersetzt [44].

Guaninnukleotiddissoziationsinhibitoren können am C-Terminus prenylierte Rho und Rab GTPasen aus Membranen extrahieren und die GTPasen in einem solubilisierten, inaktiven Komplex halten [2]. Für RabGTPasen wurde gezeigt, dass der Komplex mit GDI nur hochaffin ist, wenn die GTPase prenyliert und im GDP-Zustand vorliegt (nanomolare Affinität). Bei aktiven und/oder unprenylierten Rabs nimmt die Affinität auf hohe mikromolare Werte ab [45, 46].

1.6 Bakterielle Proteine manipulieren kleine GTPasen

Intrazelluläre, bakterielle Pathogene injizieren eine Vielzahl von Effektorproteinen in die Wirtszelle, um ihr Überleben zu garantieren. Sie etablieren intrazelluläre Nischen, in denen sie sich multiplizieren und differenzieren oder entkommen aus dem Lysosom und replizieren im Zytoplasma. Dafür haben die Pathogene unterschiedliche Mechanismen evolviert. Durch das Nachahmen eukaryotischer GEFs, GAPs und GDIs nehmen sie Einfluss auf GTPase kontrollierte Prozesse in der Zelle. Sie manipulieren intrazelluläre Transportprozesse und Zytoskelettmaschinerien. Auch die kovalente Modifikation von kleinen GTPasen durch bakterielle Enzyme dient zur Manipulation der GTPase-Aktivität während der Infektion. Da die Switch-Regionen äußerst wichtig für die Bindung von Effektoren sind, ist es nicht verwunderlich, dass gerade diese Regionen das Ziel posttranslationaler Modifikationen sind [2, 47, 48].

1.6.1 RabGTPasen und bakterielle Effektoren

Immunolokalisationsstudien zeigten, dass Rab1 mit der Legionellen-enthaltenden Vakuole (engl. *Legionella containing vacuole*, LCV) assoziiert [49]. *Legionella pneumophila* ist der Auslöser der sogenannten Legionärskrankheit, die durch Inhalation von verunreinigtem Wasser ausgelöst wird, welches mit Legionellen kontaminiert ist. Sie führt im Menschen durch die Infektion alveolarer Makrophagen zu einer schweren Form der Lungenentzündung. Der primäre Wirt für *L. pneumophila* sind Süßwasserslammen [50]. Um dem Immunsystem des Wirtes zu entkommen, translozieren die Pathogene über ein Dot/Icm Typ IV Sekretionssystem bakterielle Effektorproteine in die Wirtszelle, die ihr Überleben in der LCV gewährleisten. Einer dieser Effektoren ist DrrA (*Defects in Rab1 recruitment protein A*), das zu einem frühen Zeitpunkt der Infektion in die Wirtszelle sekretiert wird. Die N-terminale Domäne zeigt strukturelle Ähnlichkeiten mit der C-terminalen Domäne der Glutaminsynthetase-Adenylyltransferase, was die Vermutung hervorbrachte, dass DrrA Adenylylaseaktivität besitzt könnte. Mittlerweile ist der Aufbau dieses multifunktionalen Proteins bekannt. Es besteht aus drei Domänen: einer C-terminalen Phosphatidylinositol-4-phosphat (PI4P) Bindungsdomäne, einer Rab GEF Domäne und einer N-terminalen Adenylyltransferase Domäne, die Rab1 spezifisch modifiziert [51-53].

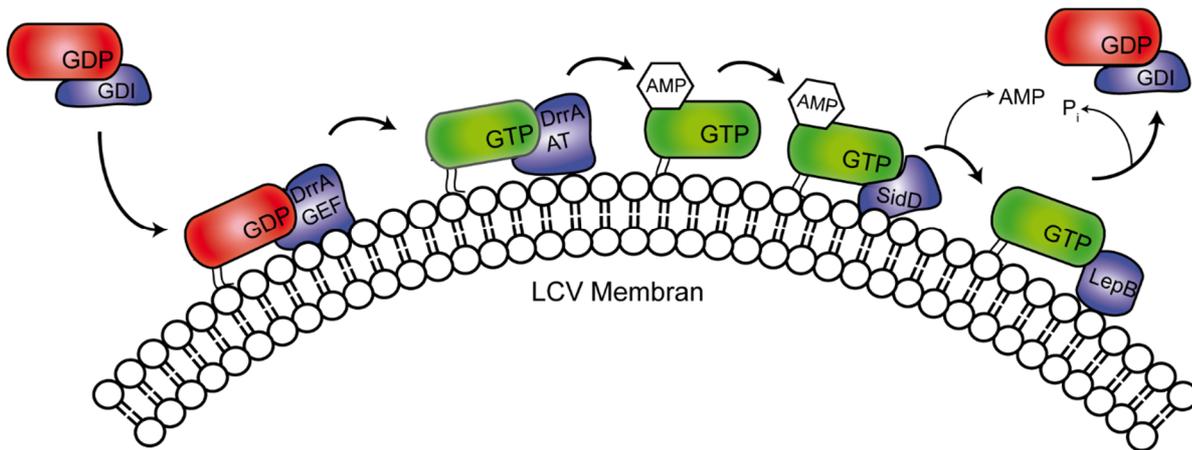


Abbildung 1-5: Interaktion von bakteriellen Effektorproteinen mit RabGTPasen an der LCV. RabGTPasen sind je nach Aktivitätszustand in rot oder grün dargestellt, Effektorproteine sind violett eingefärbt. Durch die DrrA GEF Aktivität wird Rab1 an die LCV rekrutiert und aktiviert. Es folgt die Adenylierung durch DrrA, die Rab1 im aktiven Zustand in der Membran hält. Zu einem späteren Zeitpunkt der Infektion spaltet SidD AMP ab, Rab1 kann inaktiviert und aus der Membran extrahiert werden.

Die Manipulation von Rab1 durch Effektorproteine von *L. pneumophila* ist in Abbildung 1-5 dargestellt. LCV-lokalisiertes DrrA rekrutiert und aktiviert Rab1 und führt so zu dessen Bindung an die LCV-Membran. Die Adenylierungsaktivität für Rab1:GTP ist signifikant höher als für Rab1:GDP. Aktiviertes Rab1:GTP kann somit nun adenyliert werden, was zur Inhibition der Deaktivierung von Rab1 durch GAPs (LepB) führt [54]. Damit Rab1 in den GDP-Zustand überführt und somit aus der Membran extrahiert werden kann, muss es deadenyliert werden. Dies erfolgt durch den Legionelleneffektor SidD, welcher AMP von Rab1 hydrolytisch abspaltet. Die Menge an transloziertem DrrA nimmt ab zwei Stunden nach der Infektion ab, wohingegen SidD und LepB während der Infektion in zunehmender Menge in der Zelle vorhanden sind [55]. Die Adenylierung von Rab1 findet an Tyr77 in der Switch II-Region statt [53].

Auch ein bakterielles *Filamentation induced by cyclic AMP* (FIC) Protein ist in die Modifikation von Rab1 involviert. FIC Domänen mit der Konsensussequenz HXFXX(G/A)N(G/K)R sind häufige Motive in Prokaryoten [56]. AnkX von *Legionella pneumophila* kann Rab1 reversibel an Serin 76 phosphocholinieren [57]. Der Effektor Lem3 kann die Modifikation von Rab1 hydrolytisch entfernen [58]. AnkX phosphocholiniiert Rab1:GDP mit etwa ähnlicher Aktivität wie Rab1:GTP. Dadurch kann Rab1 auch durch Phosphocholinierung in der GDP-Form an die Membran rekrutiert und die Interaktion mit zellulären Effektoren verhindert werden [57]. Auch Phosphorylierung, Ubiquitinierung, Glykosylierung und Alkylierung spielen im Infektionszyklus von *L. pneumophila* eine Rolle [59].

1.6.2 RhoGTPasen und bakterielle Effektoren

Auch Rho, Rac und Cdc42 sind Ziele bakterieller posttranslationaler Modifikation. Enzyme der Pathogene *Vibrio parahaemolyticus* (VopS) und *Histophilus somni* (IbpA) nutzen diesen Mechanismus, um in der Wirtszelle zu überleben. Die Infektion mit *V. parahaemolyticus* erfolgt durch den Verzehr von rohen Muscheln und führt zu einer Lebensmittelvergiftung [60, 61]. *Histophilus somni* infiziert vor allem Rinder und führt zu diversen Symptomen wie Fieber, Lungenentzündung und Herzmuskelentzündungen [62].

VopS (*Vibrio outer protein S*) und IbpA (*Immunglobulin binding protein A*) werden über Typ III Sekretionssysteme in die Wirtszelle injiziert und adenylieren Rho, Rac und Cdc42. Die Adenylierung führt zur Inhibition der GTPasen und somit zum Zusammenbruch des Aktinzytoskeletts und zur begleitenden Zellrundung [60, 63]. Die Adenylierung durch VopS und IbpA findet im Unterschied zu Rab1 in der Switch I-Region statt. VopS bringt die Modifikation am Thr35 (Cdc42) an, während IbpA das Tyr32 adenyliert [61, 64]. Alle Modifikationsstellen der bakteriellen Effektoren sind in den GTPase Kristallstrukturen in Abbildung 1-6 grün markiert. VopS besitzt eine C-terminale FIC Domäne, wohingegen IbpA zwei C-terminale FIC Domänen aufweist, von denen jede einzelne zum Zusammenbruch des Aktinzytoskeletts führt. Für beide FIC Proteine sind keine bakteriellen Enzyme bekannt, die die Modifikation entfernen. Die AMP Gruppe am Tyr32 kann allerdings *in vitro* durch eine Phosphodiesterase aus Schlangengift entfernt werden [63, 64].

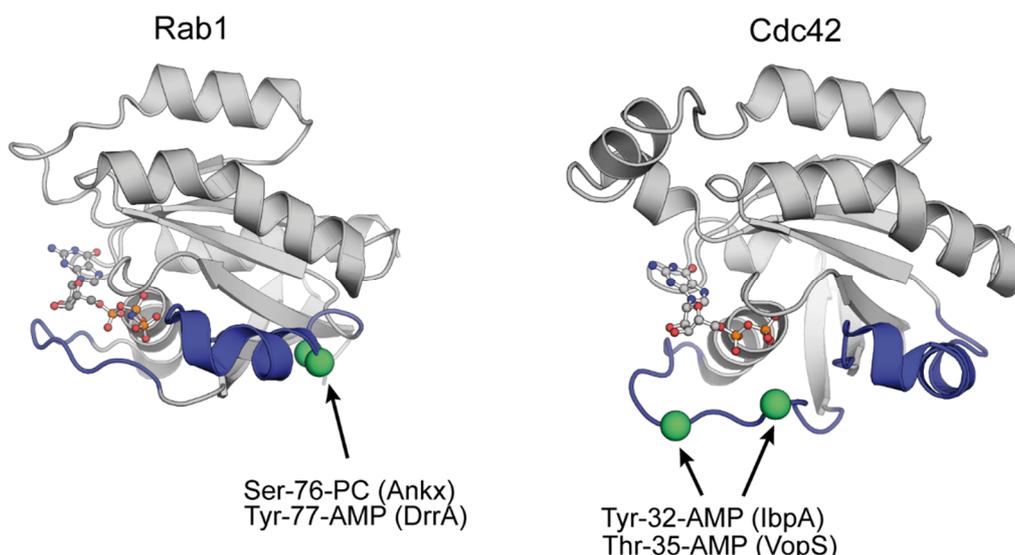


Abbildung 1-6: In dieser Arbeit untersuchte Modifikationsstellen in Rab1 und Cdc42. DrrA adenyliert Tyr77 von Rab1, AnkX phosphocholiniert Serin 76 in Switch II von Rab1. Cdc42 wird in Switch I an Tyr32 und Thr35 von IbpA bzw. VopS adenyliert. Modifikationsstellen werden durch grüne Kugeln symbolisiert. Die Nukleotide GDP und GppNHp sind als in Stäbchendarstellung abgebildet. PDB IDs: 3nkx, 4-ITR-1.

1.7 Bedeutung von posttranslationalen Modifikationen

Posttranslationale Modifikationen erweitern die funktionale Diversität von Proteinen durch das kovalente Anbringen von funktionellen Gruppen. Erst mit der Entwicklung von hochauflösenden massenspektrometrischen Methoden konnte die Vielfältigkeit posttranslationaler Modifikationen erfasst werden. Sie regulieren die katalytische Aktivität von Enzymen, markieren Proteine für den Abbau und sind wichtig für deren Faltung und Assemblierung [65]. Im Folgenden sollen die für diese Arbeit relevanten posttranslationalen Modifikationen näher erläutert werden.

1.7.1 Adenylylierung

Die Adenylylierung wurde mit der Entdeckung des Enzyms Glutaminsynthetase-Adenylyltransferase (GS-ATase) aus *E. coli* im Jahr 1967 als posttranslationale Modifikation eingeführt. Die GS-ATase nutzt ATP mit Mg^{2+} als Kofaktor um die Glutaminsynthetase reversibel mit AMP zu modifizieren [66]. Hin- und Rückreaktion werden von dem gleichen Enzym, allerdings mit funktionell unterschiedlichen Domänen, ausgeführt [67].

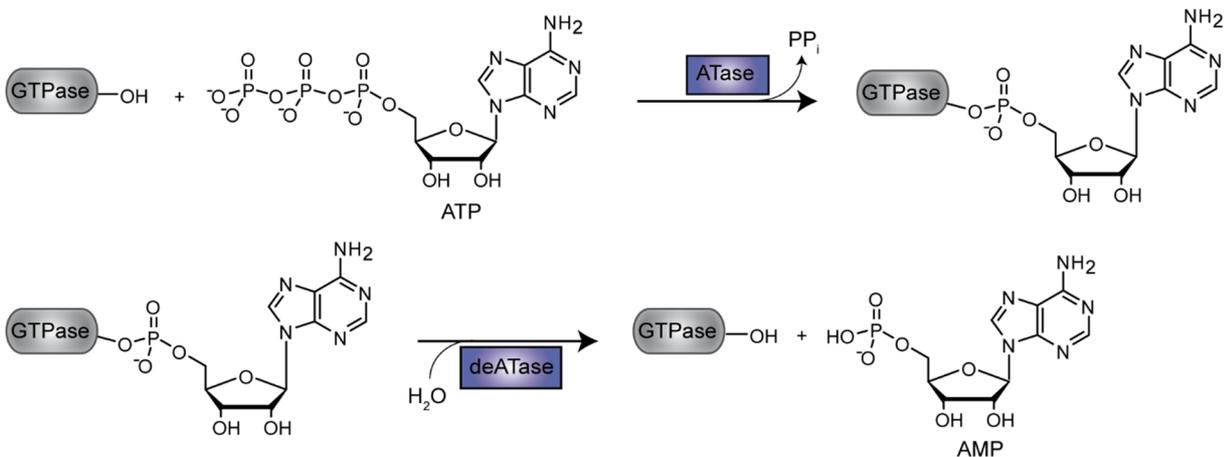


Abbildung 1-7: Enzymatische Adenylylierung und Deadenylylierung einer GTPase. Die ATase verwendet ATP, um ein AMP auf eine Seitenkette (Tyr, Thr) im Protein zu übertragen. Die Deadenylylierung erfolgt hydrolytisch durch ein deadenylylierendes Enzym (deATase).

Erst ca. 40 Jahre später wurde die Adenylylierung als Mechanismus zur Manipulation kleiner GTPasen bei der bakteriellen Infektion entdeckt [53, 60, 61]. Die in Abbildung 1-7 dargestellte Übertragung eines AMP von ATP auf eine Aminosäureseitenkette ist eine exergonische Reaktion, da zwei Anhydridbindungen von ATP in ein Phosphodiesterprodukt und Pyrophosphat umgewandelt werden. Im Falle von Rab1 kann diese Modifikation durch SidD hydrolytisch abgespalten werden [68]. In Abbildung 1-8 sind die Kristallstrukturen der zwei adenylylierten

GTPasen Rab1 und Cdc42 dargestellt. Adenylierende Enzyme werden in zwei Familien unterteilt, die sich strukturell und in ihrem enzymatischen Mechanismus unterscheiden: die DNA- β -Polymerase-ähnliche und die FIC Familie [69].

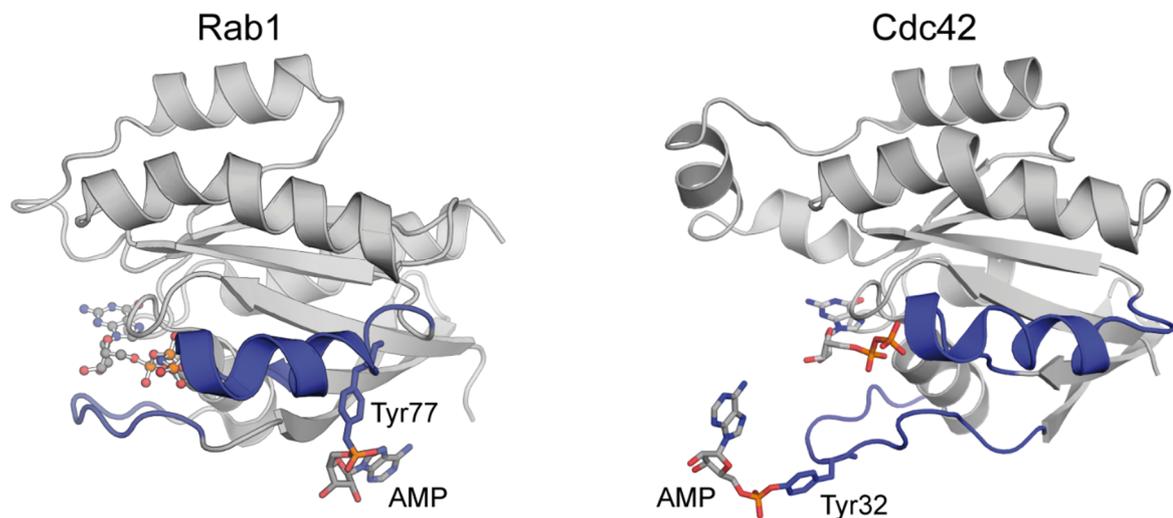


Abbildung 1-8: Kristallstrukturen von adenyliertem Rab1 (PDB ID 3nkv) und Cdc42 (PDB ID 4itr). Rab1 wird am Tyr77 in der Switch II Region, Cdc42 am Tyr32 in der Switch I-Region adenyliert. Die Nucleotide GDP und GppNHp sind in Stäbchendarstellung dargestellt.

Das strukturelle Motiv der DNA- β -Polymerase-ähnlichen Nucleotidyltransferasen, das in die Magnesiumbindung involviert ist, besteht aus einem dreisträngigen β -Faltblatt, wovon der erste Strang antiparallel zu den anderen beiden verläuft. Am Ende dieses Stranges befindet sich ein Glycin, welches den Loop zum nächsten Strang einleitet. Dieser besteht aus einem konservierten Motiv G-X12-[ED]-X-[ED], dessen Aspartate zusammen mit einem Aspartat und einem Glycin aus dem nächsten Strang zwei Magnesiumionen koordinieren [70]. Für ein Mitglied dieser Familie, DrrA aus *Legionella pneumophila*, wurde der katalytische Mechanismus kürzlich im Detail biophysikalisch charakterisiert. Das Aspartat 112 von DrrA wirkt dabei als generelle Base für die Deprotonierung von Tyr77 und ermöglicht so den nukleophilen Angriff auf das α -Phosphat von ATP [71]. Auch die GS-ATase und die Kanamycin Nucleotidyltransferase, welche die Nucleotidylierung von Aminoglykosidantibiotika katalysieren kann, gehören zu dieser Familie [72]. Enzyme der FIC Familie bestehen aus einem α -helikalen Kern und dem konservierten FIC Motiv HXFX(D/E)GNR. Das katalytische Histidin aktiviert Tyrosin, Threonin oder Serin für den nukleophilen Angriff, während ein Arginin und eine saure Seitenkette die negativen Ladungen des Phosphates stabilisieren. Die Orientierung des Nucleotids in der Bindungstasche gibt dabei vor, welche Gruppe übertragen wird [56]. Adenylierende Enzyme könne prinzipiell auch andere Nucleotide als Substrat verwenden (CTP, GTP, UTP) [73, 74], allerdings wird die höhere Konzentration von ATP in der Zelle die Adenylierung bevorzugen lassen. Zusätzlich zu bakteriellen FIC Enzymen ist ein eukaryotisches FIC-Protein namens

HYPE bekannt, das RhoGTPasen adenylylieren kann [63]. Kürzlich wurde gezeigt, dass HYPE auch das humane Chaperon BiP an Thr518 adenylyliert und so zu seiner kovalenten Inaktivierung beiträgt [75].

Abgrenzend zur stabilen posttranslationalen Adenylylierung existiert ein zweiter Mechanismus, der eine transiente Adenylylierung für den thermodynamischen Antrieb chemischer Reaktionen liefert [76]. Als Beispiel hierfür sei die Aktivierung von Aminosäuren durch tRNA Aminoacylsynthetasen genannt. Hierbei wird die freiwerdende Energie bei der Hydrolyse der α - β -Phosphoanhydrid Bindung von ATP indirekt genutzt, um eine andere Reaktion anzutreiben. Es wird zuerst ein gemischtes Anhydrid zwischen der Carboxylgruppe der Aminosäure und der Phosphorylgruppe von AMP gebildet. Im nächsten Schritt wird die Aminoacylgruppe auf ein tRNA Molekül übertragen, um die Aminoacyl-tRNA zu bilden [77].

1.7.2 Phosphocholinierung

Das *Legionella* Effektorprotein AnkX überträgt im Gegensatz zu anderen FIC-Proteinen kein Nucleosidmonophosphat (NMP) auf das Proteinsubstrat, sondern nutzt wie in Abbildung 1-9 zu sehen CDP-Cholin als Substrat um ein Phosphocholin auf Serin 76 von Rab1 zu übertragen. Durch einen nukleophilen Angriff der aktivierten Hydroxylgruppe auf das β -Phosphat der Phosphoanhydridbindung entstehen ein Phosphodiester sowie CMP [57, 58].

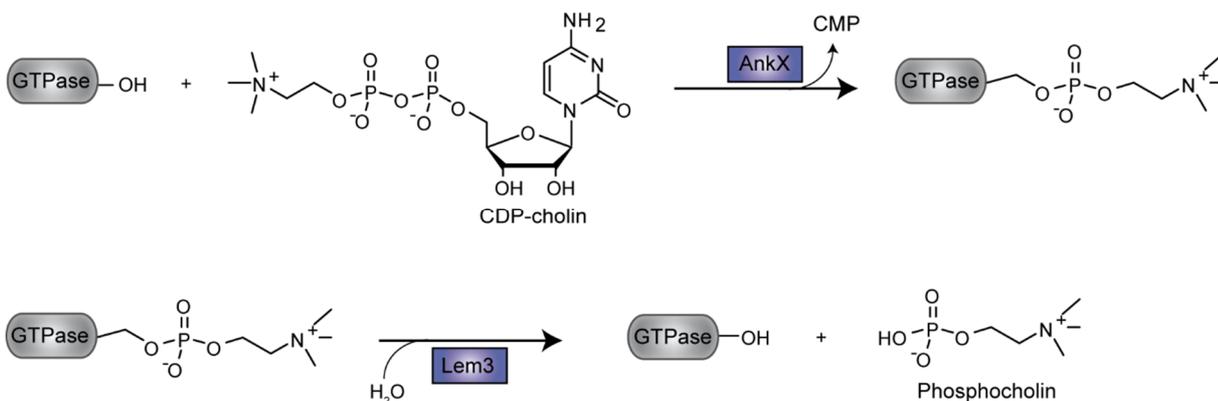


Abbildung 1-9: Reversible Phosphocholinierung von Rab1 durch AnkX und Lem3. AnkX überträgt Phosphocholin aus CDP-Cholin auf ein Serin in der Switch II-Region von Rab1. Lem3 kann die Phosphocholin-Gruppe reversibel abspalten.

Zusätzlich zur FIC-Domäne enthält AnkX auch mehrere Ankyrin-*Repeats*, die möglicherweise dazu beitragen, das Rab Protein in der richtigen Orientierung für die Katalyse zu binden [58, 78]. Die Reaktion wird durch die Aktivität von Lem3, das die Modifikation abspaltet, reguliert [58]. Die Phosphocholinierung verhindert die Interaktion mit GDI, so dass die phosphocholinierete GTPase an die Membran gebunden bleibt [57].

1.7.3 Prenylierung

Als Prenylierung bezeichnet man die Anbringung einer Isoprenoid Gruppe an C-terminale Cysteine. Rab, Rho und Ras GTPasen werden prenyliert, um ihre Bindung an Membranen zu bewerkstelligen. Bei RhoGTPasen involviert dies die Anbringung von Farnesyl- oder Geranylgeranylgruppen an das Cystein des CAAX-Motivs [79]. Die Enzyme, die die Prenylierung ausführen, heißen entsprechend ihrer Isoprenoide Farnesyltransferase bzw. Geranylgeranyltransferase [80, 81].

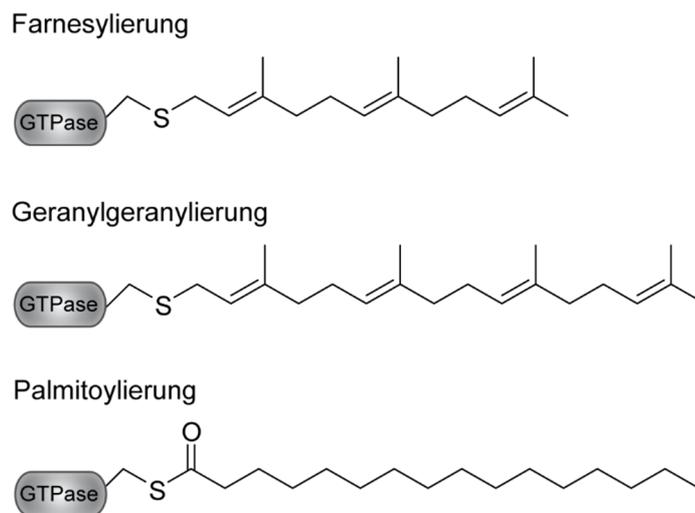


Abbildung 1-10: Prenylierung kleiner GTPasen. Kleine GTPasen werden durch die Anbringung von Farnesyl, Geranylgeranyl oder Palmitoyl lipidiert.

Einige RhoGTPasen können zusätzlich zur Prenylierung auch reversibel S-palmitoyliert werden [82]. Die Palmitoylierung erlaubt die dynamische Regulierung von Membranbindung und Signalweiterleitung [83]. In Abbildung 1-10 sind die verschiedenen Lipidierungsarten strukturell abgebildet.

Die Prenylierung von Rab-Proteinen unterscheidet sich signifikant zu der bei Rho-Proteinen. Die Spezifität wird in diesem Fall nicht durch ein konserviertes Sequenzmotiv bestimmt, sondern benötigt die Aktivität eines zusätzlichen Proteins, das *Rab Escort Protein* (REP). REP kann Komplexe mit Rab [84] und RabGGTase [85] (Rab Geranylgeranyltransferase) oder GGTase II bilden und Rab somit für die Prenylierung präsentieren. RabGTPasen werden meistens mit zwei Geranylgeranylgruppen modifiziert, wohingegen die Modifizierung von Rho GTPasen immer einer Monoprenylierung entspricht [86]. Der Prenylierung folgt bei vielen GTPasen die Carboxymethylierung, die vermutlich die elektrostatische Abstoßung durch negative Membranen reduziert und somit die Bindung stärkt [87]. Bei RhoGTPasen erfolgt dies durch Proteolyse der drei C-terminalen Aminosäureseitenketten und Carboxymethylierung des Cysteins [88]. Bei Rab-Proteinen wird eine Carboxymethylierung nur an geranylgeranylierten GTPasen, die auf die C-terminale Sequenz Cystein-X-Cystein enden durchgeführt [89].

1.7.4 Phosphorylierung

Die Phosphorylierung ist die am häufigsten für die Regulation von Signalweiterleitungsprozessen eingesetzte posttranslationale Modifikation. Kinasen katalysieren hierbei den Transfer des γ -Phosphates von ATP auf Serin-, Threonin- oder Tyrosin-Seitenketten von Proteinen [90]. Für die zeitliche Regulierung der Phosphorylierung sind Phosphatasen von großer Bedeutung. Durch Dephosphorylierung von Proteinseitenketten der Zielproteine können diese inaktiviert und nachfolgende Signalwege abgeschaltet werden [91]. Auch kleine GTPasen sind Ziele von Phosphorylierung. So wurde kürzlich gezeigt, dass Rab8 und Rab13 an Serin 111 phosphoryliert werden. Dies ist Folge der Aktivierung eines *PTEN-induced putative kinase 1* (PINK1) abhängigen Signalweges [92]. Ebenso neu ist die Erkenntnis, dass Rab1 an Thr72 durch die TGF- β aktivierte Kinase 1 (TAK 1) phosphoryliert wird, was die Interaktion mit GDI verhindert [93]. Auch die Phosphorylierung von RhoGTPasen hat vielfältige regulatorische Einflüsse. So können die Nukleotidbindung beeinflusst, die Membranextraktion eingeleitet, die Translokation in verschiedene Kompartimente induziert, sowie die GTPasen für die Degradation markiert werden [28].

1.7.5 Andere PTMs kleiner GTPasen

Kleine GTPasen werden auf vielfältige Weise von bakteriellen Effektoren und regulatorischen Enzymen posttranslational modifiziert. Diese Modifikationen sind mit den entsprechenden Effektoren und Organismen in Tabelle 1-2 aufgelistet. Die Diversität der Modifikation beinhaltet neben der Adenylierung, Phosphocholinierung, Prenylierung, sowie Phosphorylierung auch ADP-Ribosylierung, Glykosylierung, Proteolyse, Deamidierung, Ubiquitinierung, SUMOylierung, Serotonylierung, S-Nitrosylierung und N-Acetylierung. Viele der genannten PTMs werden von bakteriellen Toxinen im Infektionskontext eingeführt. Phosphorylierung, Serotonylierung, Ubiquitinierung, SUMOylierung, S-Nitrosylierung und N-Acetylierung wurden allerdings unabhängig von einer bakteriellen Infektion in der Zelle beschrieben. Auch die Adenylierung des Chaperons BiP wird von einem zellulären Enzym katalysiert (siehe Kapitel 1.7.1).

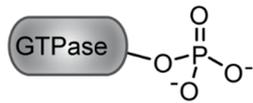
Tabelle 1-2: Posttranslationale Modifikationen kleiner GTPasen. PTMs mit beispielhaften Effektoren/Organismen. Die Auflistung ist nicht abschließend.

PTM	Bakterieller Effektor/ Organismus	Target-protein	Zellulärer Effekt	Quelle
ADP-Ribosylierung	C3-Toxin/ <i>Clostridium botulinum</i>	RhoGT-Pasen	Bindung von Rho an GDI; verminderte Aktivierung	Aktories, 1989 [94]
Mono-Glukosylierung (Glykosylierung)	TcdA, TcdB/ <i>Clostridium difficile</i>	RhoGT-Pasen	Inaktivierung	Just, 1995 [95]; Zeiser, 2013 [96]
GlcNAcylierung (Glykosylierung)	PaTox/ <i>Photorhabdus asymbiotica</i>	RhoG-TPasen	Inhibition der Effektorbindung	Jank, 2013 [97]
Proteolyse	YopT/ <i>Yersinia enterocolytica</i>	RhoG-TPasen	Deletion des Isoprenylankers, Freisetzung aus Membran	Shao, 2003 [98]
Deamidierung	CNF1-3/ <i>Escherichia coli</i>	RhoGT-Pasen	Aktivierung Rho GTPase	Schmidt, 2000 [99]
Ubiquitinierung	SdeA/ <i>Legionella pneumophila</i>	Rab1, Rab6, Rab30, Rab33b	GTP Hydrolyse verlangsamt	Qiu, 2016 [100]

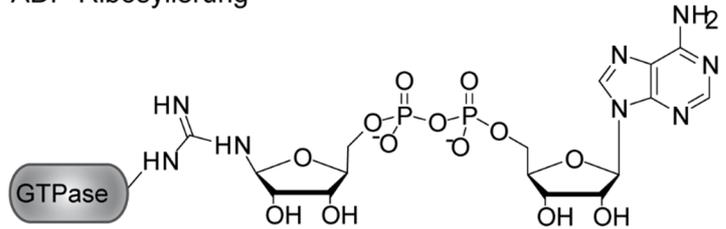
Pathogen-unabhängig					
PTM	Enzym	Target-protein	Zellulärer Effekt		Quelle
Serotonylierung	Transglutaminase	Rab3a, Rab27a	Konstitutive Aktivierung		Paulmann, 2009 [101]
S-Nitrosylierung	nicht enzymatisch	Ras	Stimulation des	Nukleotidaustauschs	Lander, 1995 [102]
N-Acetylierung	N-terminale Acetyltransferase Komplexe	ARFRP1	Erleichterung der	Erkennung von Membranrezeptor	Jackson, 2004 [103]
SUMOylierung	E3 Ligase PIAS3	Rac1	Zellmigration		Castillo-Lliva, 2010 [104]

Die posttranslationale Modifikation kleiner GTPasen ist also ein Regulationsmechanismus, der sowohl in menschlichen Zellen eingesetzt wird, als auch von Pathogenen in ihrem Infektionszyklus genutzt wird. In Abbildung 1-11 sind die in Tabelle 1-2 aufgeführten PTMs mit Strukturformeln dargestellt. Fast alle Modifikationen entsprechen einer kovalenten Addition einer funktionellen Gruppe. Bei der Proteolyse wird im Gegensatz dazu die Peptidbindung zwischen zwei Aminosäuren hydrolytisch gespalten und die Deamidierung ist eine hydrolytische Abspaltung von Amidstickstoff der Aminosäuren Asparagin oder Glutamin.

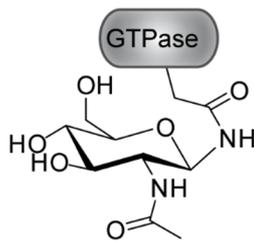
Phosphorylierung



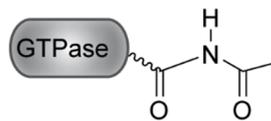
ADP-Ribosylierung



N-Glykosylierung



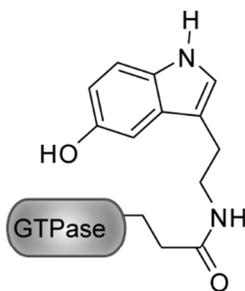
N-Acetylierung



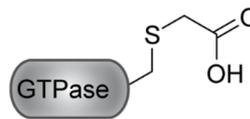
S-Nitrosylierung



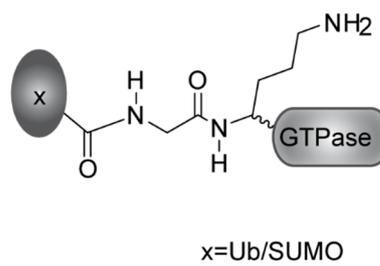
Seronylierung



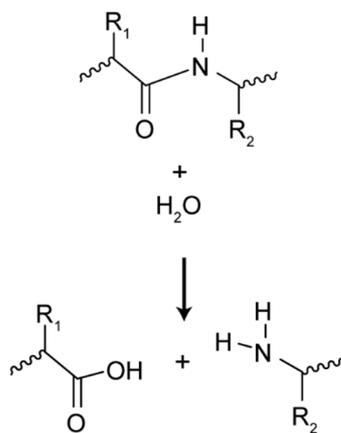
S-Carboxymethylierung



Ubiquitinierung/SUMOylierung



Proteolyse



Deamidierung

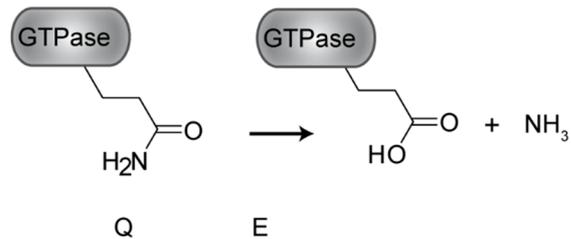


Abbildung 1-11: Strukturformeln posttranslationaler Modifikationen kleiner GTPasen. Kleine GTPasen werden sowohl durch bakterielle Enzyme als auch von zellulären regulatorischen Enzymen posttranslational modifiziert.

1.7.6 Methoden zur artifiziiellen Einföhrung posttranslationaler Modifikationen in Proteine

Um die Auswirkungen posttranslationaler Modifikationen auf Proteine *in vitro* zu untersuchen, müsslen PTMs ortsspezifisch und effizient angebracht werden. In den letzten Jahrzehnten wurden einige Methoden entwickelt, um Proteine *in vitro* und *in vivo* gezielt zu modifizieren [105].

1.7.6.1 Native chemische Ligation und *Expressed Protein Ligation*

Bei der nativen chemischen Ligation (NCL) wird eine Peptidbindung zwischen zwei synthetischen Peptiden eingeföhrt. Die gewünschten (modifizierten) Peptide werden dazu über Festphasensynthese mittels Benutzen einer Fmoc- oder Boc-Schutzgruppe synthetisiert. Die NCL ist allerdings in der Länge der synthetisierten Peptide beschränkt. Die in Abbildung 1-12 illustrierte *Expressed Protein Ligation* (EPL) kann diese Einschränkungen durch Nutzen mindestens eines rekombinant exprimierten Proteins/Peptids verringern [106]. Proteine werden hierbei als Fusionen mit sogenannten Inteinen exprimiert, durch deren Herausschneiden ein C-terminaler Thioester entsteht [107]. Die hier verwendeten mutierten Inteine können keine *Splicing*-Reaktion mehr ausführen, aber ein Thioester-Intermediat bilden [108]. Bei der Reaktion von Proteinthioester mit N-terminalem Cystein kommt es zur *trans*-Thioesterifizierung. Nachfolgend findet ein S-N-Acylshift statt und die Peptidbindung zwischen den zwei Peptiden/Proteinen wird ausgebildet [106]. Der Nachteil der EPL ist, dass ein Cystein an der Ligationstelle vorhanden sein muss bzw. am Ende der EPL im Ligationsprodukt verbleibt. Die zusätzliche Einföhrung eines Cysteins in ein Protein kann dabei Struktur und Funktion ungewünscht beeinflussen [109]. Auch die Ausbeute kann für manche Anwendungen nicht ausreichend sein.

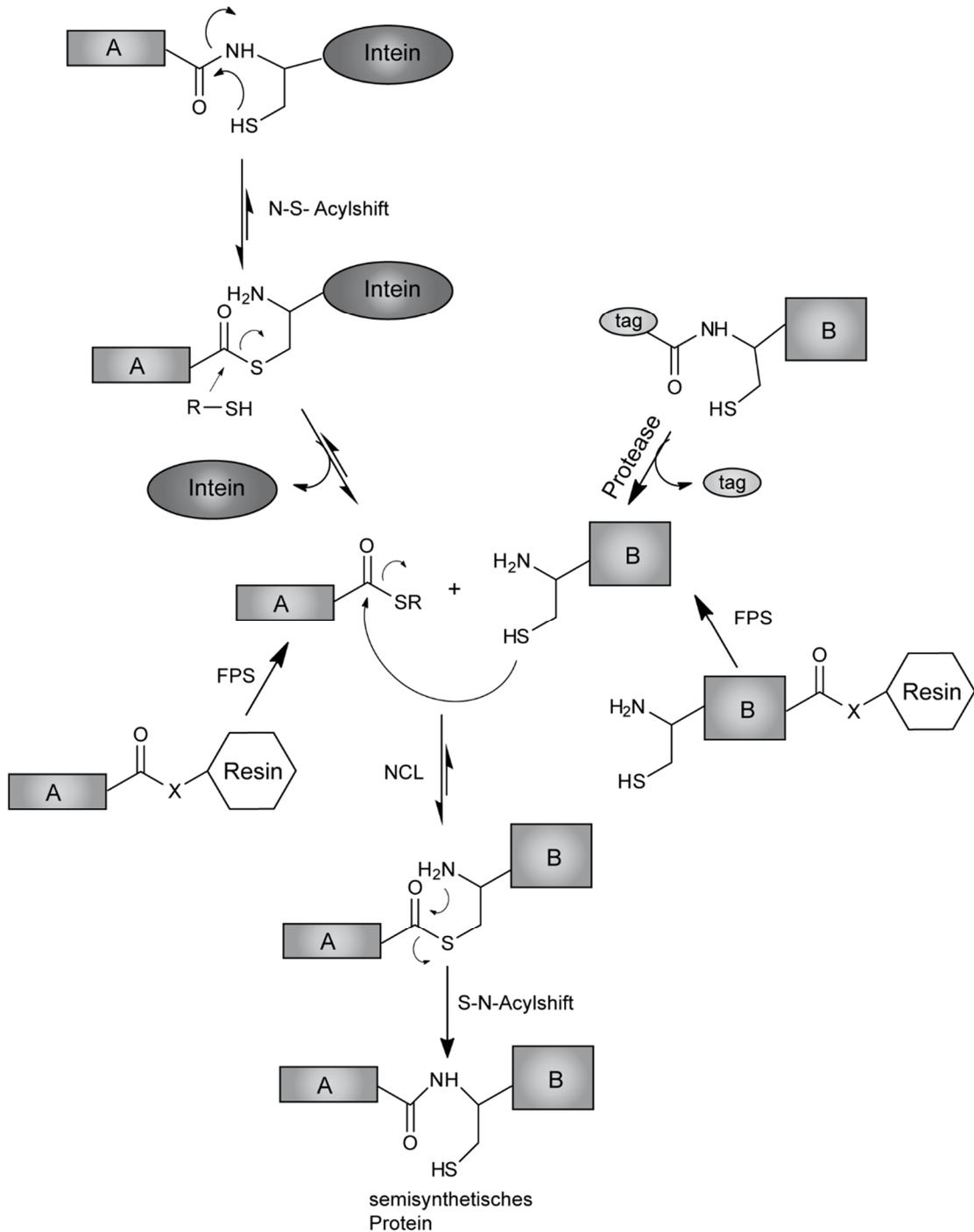


Abbildung 1-12: Schema der Expressed Protein Ligation. Ein Protein (A) wird als Fusion mit einem mutierten Intein exprimiert und kann nach Herausschneiden des Inteins als C-terminaler Thioester agieren. Proteine (B), die ein N-terminales Cystein enthalten, können rekombinant mit einem Tag hergestellt werden, der abgeschnitten werden kann. A+B können aber auch synthetisch über Festphasensynthese (FPS) hergestellt werden. Modifiziert nach [107].

1.7.6.2 Genetische Code Erweiterung

Ein alternativer Ansatz zum ortsspezifischen Einbau modifizierter Aminosäuren in Proteine *in vivo* und *in vitro* (*E. coli*, *S. cerevisiae*, Säugetierzellen, zellfreie Synthese) ist in Abbildung 1-13 dargestellt. Bei der sogenannten genetischen Code Erweiterung [110] wird das Amber-Codon (DNA: TAG, mRNA: UAG), eines der drei Stop-Codons, genutzt, um eine unnatürliche Aminosäure spezifisch in ein Protein einzubauen [111]. Stop-Codons führen normalerweise zum Abbruch der Translation bei der Proteinbiosynthese. Bei der Amber Codon Suppression Technologie werden tRNA/tRNA-Synthetase Paare aus Organismen, die das Amber Codon nicht als Stop-Codon verwenden, so evolviert, dass diese die unnatürliche Aminosäure akzeptieren. Die zum Amber-Codon komplementäre tRNA^{CUA} wird durch die optimierte Aminoacyl-tRNA-Synthetase aminoacyliert und ein Protein mit der inkorporierten unnatürlichen Aminosäure entsteht [112]. Die heute erfolgreich eingebrachten unnatürlichen Aminosäuren umfassen beispielsweise phosphoryliertes Serin [113] oder O-Methyl-L-Tyrosin [111], aber auch Aminosäuren, die eine spezifische Markierung oder Kopplung erlauben [114]. Probleme sind hierbei häufig niedrige Ausbeuten und notwendige Selektionsprozesse für die tRNA/Aminoacyl-tRNA-Synthetase Paare [115].

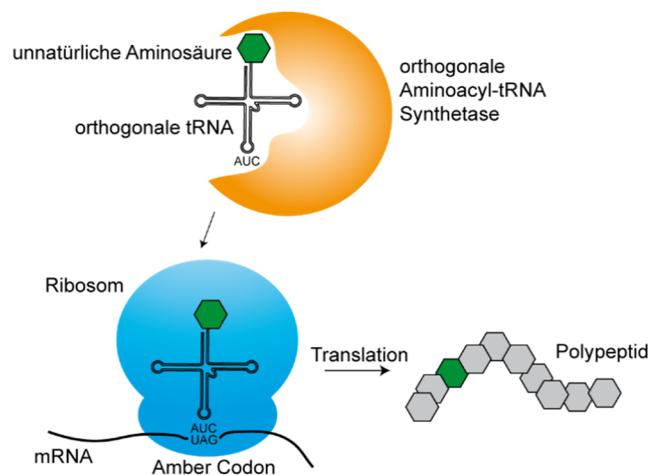


Abbildung 1-13: Amber Codon Suppression Technologie. Orthogonale tRNA/tRNA-Synthetase Paare ermöglichen den Einbau unnatürlicher Aminosäuren in Proteine. Das Amber Stop Codon wird hier funktionalisiert, um eine komplementäre tRNA, die eine unnatürliche Aminosäure trägt, zu binden. Die Aminosäure wird vom Ribosom in die Polypeptidkette eingebaut [112].

1.7.6.3 Enzymatische Anbringung von PTMs

Die enzymatische Anbringung von PTMs an Proteine ist effizient und in großem Maßstab möglich. Allerdings müssen die entsprechenden Enzyme bekannt und in ausreichender Qualität zu reinigen sein. Auch die Spezifität für bestimmte Modifikationsstellen im Protein muss gegeben sein. Gerade bei der Einführung von Phosphorylierungen durch Kinasen ist dies häufig

ein Problem, da diese meist mehr als eine Phosphorylierungsstelle pro Substratprotein modifizieren [116]. Um eine Modifikation spezifisch an einer bestimmten Aminosäure im Protein anzubringen, muss das Enzym eine absolute Spezifität für die Modifikationsstelle aufweisen. Diese kann durch die Erkennung einer spezifischen Sequenz im Protein oder spezifischer Tertiärstrukturelemente zustande kommen. Für die hochspezifische Adenylylierung und Phosphocholinierung ist diese Methode zur Einführung von PTMs optimal nutzbar.

1.8 Proteine als konformationelle Schalter

Proteine, die als konformationelle Schalter oder auch *Molecular switches* agieren, ändern bei Empfang eines spezifischen Signals ihre Konformation. Solche Signale können die Bindung eines Liganden, chemische Modifikation oder eine Veränderung in ihrer Umgebung sein. Die verschiedenen *Switching* Mechanismen können in vier Kategorien unterteilt werden: Beim *Rigid-Body Domain Movement* werden zwei oder mehr Domänen eines Proteins relativ gegeneinander verschoben, um eine offen-zu-geschlossen Bewegung zu ermöglichen. Ein Beispiel hierfür ist das bakterielle Aktin Homolog ParM, das bei Nukleotidbindung eine große Bewegung zwischen den zwei Domänen zeigt [117]. Auch eine limitierte strukturelle Umordnung kann zum Schalten zwischen zwei Zuständen führen. Ein Beispiel für dieses Prinzip ist die konformationelle Neuordnung von Calmodulin nach Calciumbindung [118]. Auch die konformationellen Veränderungen der GTPase Switch-Regionen fallen in diese Kategorie. Beim sogenannten *Global Fold Switching* können „metamorphe“ Proteine unterschiedliche gefaltete Konformationen für dieselbe Aminosäuresequenz einnehmen. Das Chloridionkanalprotein CLIC1 erfährt durch Änderung des Redoxpotentials eine Konformationsänderung vom monomeren zum nicht-kovalenten dimeren Zustand [119]. Ein universeller Mechanismus ist der *Folding-Unfolding-Switch*. Alle Proteine können in einem ungefalteten und einem gefalteten Zustand vorliegen. Die ungefaltete Form repräsentiert den inaktiven Zustand eines *Switches*, da die native Funktion des Proteins im denaturierten Zustand nicht erfüllt wird.

2 ZIELSETZUNG

Posttranslationale Modifikationen sind ein weitverbreiteter Mechanismus, um die funktionale Vielfalt von Proteinen zu erweitern und ihre Funktion zu modulieren. Kleine GTPasen der Rab und Rho Familie werden von bakteriellen Effektorproteinen posttranslational modifiziert. Die Pathogene modulieren so Prozesse in der Wirtszelle, um sich zu multiplizieren und die Infektion voranzutreiben [48, 120]. In dieser Arbeit liegt der Fokus auf den posttranslationalen Modifikationen, die von den Effektoren DrrA (Adenylylierung) und AnkX (Phosphocholinierung) aus *Legionella pneumophila* an Rab1 angebracht werden, sowie der Adenylylierung von Cdc42 durch die FIC Proteine VopS aus *Vibrio parahaemolyticus* und IbpA aus *Histophilus somni* [53, 57, 60, 74]. Besonders interessant ist hierbei, dass die PTMs alle in den für die Effektorbindung essentiellen Switch-Regionen erfolgen. Die Adenylylierung und Phosphocholinierung von Rab1b interferiert mit dessen Inaktivierung durch GAPs und verlängert somit den aktiven Zustand des Proteins [53, 57]. Der zugrundeliegende molekulare Mechanismus und die Auswirkungen der PTMs auf die Konformationen der Switch-Regionen wurden noch nicht untersucht. Kürzlich konnte in Zusammenarbeit mit der Gruppe um Prof. Dr. Martin Zacharias allerdings in einer Molekulardynamiksimulation gezeigt werden, dass die Adenylylierung die Konformation der Switch-Regionen bei Rab1 in einer aktiven Form zu halten scheint [121]. Die Adenylylierung von Cdc42 verhindert die Interaktion mit Effektorproteinen nachfolgender Signalwege. Interessanterweise findet die Adenylylierung von Cdc42 an Aminosäureseitenketten statt, die direkt in die Nukleotidbindung involviert sind [54, 56]. Um die molekularen Konsequenzen der PTMs auf die intrinsischen Eigenschaften der GTPasen und die Konformationen der Switch-Regionen zu analysieren, wurde in dieser Arbeit eine Kombination aus biochemischer Charakterisierung und NMR-basierter Strukturbilogie benutzt. Dazu sollten die GTPasen in unmarkierter und isotoopenmarkierter Form aufgereinigt, in vitro posttranslational modifiziert und in einen definierten Nukleotidzustand versetzt werden. Um das grundlegende Verständnis für die modifizierenden Enzyme zu erhöhen, sollten Substratspezifitäten und Eigenschaften der Enzyme analysiert werden. Im nächsten Schritt sollte der Einfluss der PTMs auf intrinsische Eigenschaften der GTPasen, wie die intrinsische Nukleotidhydrolyse, den intrinsischen Nukleotidaustausch, die Interaktion mit interagierenden Enzymen sowie auf die thermische Stabilität der GTPasen untersucht werden. Der Fokus der Arbeit sollte auf der Analyse der Konsequenzen der Modifikation auf die Konformation kleiner GTPasen liegen. Dies soll uns neue Einsichten in die molekularen Mechanismen der Regulation kleiner GTPasen über posttranslationale Modifikationen liefern.

3 ERGEBNISSE

3.1 Eigenschaften modifizierender Enzyme

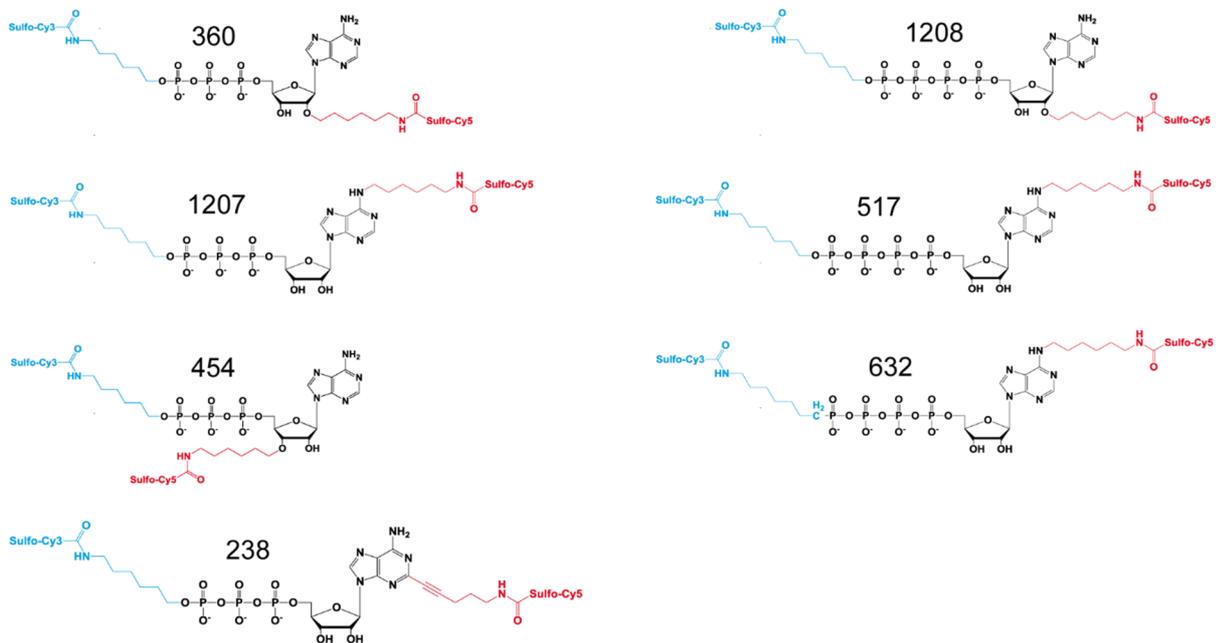
Im ersten Abschnitt des Ergebnisteils werden für diese Arbeit wichtige Enzymreaktionen im Detail analysiert. So werden Spezifitäten nukleotidylender Enzyme für artifizielle Nukleotide kinetisch untersucht. Außerdem werden essentielle Aminosäuren für bestimmte Enzymreaktionen auf Substratseite identifiziert und ein wichtiges Tool für die Analyse von Adenylylierungsreaktionen analysiert.

3.1.1 Spezifität von VopS, IbpA und DrrA für Nukleotidanaloga

3.1.1.1 Spezifität von VopS, IbpA und DrrA für FRET-Nukleotidanaloga

VopS, IbpA und DrrA sind drei adenylylierende Enzyme, die in unterschiedlichen Infektionskontexten auftreten. Die kinetische Charakterisierung enzymatischer Reaktionen wie der Adenylylierung erfordert zeitaufgelöste Analyseverfahren. Massenspektrometrische Verfahren sind oft in der Quantifizierung der Analyten limitiert und Methoden wie Western-Blotting oder ELISA benötigen aufwendig hergestellte Antikörper. Nukleotide die eine alternative Möglichkeit der direkten Verfolgung einer Modifikationsreaktion ermöglichen können sind deshalb von großem Interesse. In diesem Kapitel soll daher die Spezifität von VopS, IbpA und DrrA für verschiedene unnatürliche Nukleotide analysiert werden, die über ein fluoreszenzbasiertes Verfahren eine direkte Verfolgung der enzymatischen Reaktion erlauben könnten. Im ersten Teil wurden die in Abbildung 3-1 gezeigten FRET-Nukleotide (synthetisiert von Dr. Stefan Hacker/Prof. Dr. Andreas Marx, Universität Konstanz) verwendet. Diese zeichnen sich durch die zwei angebrachten Fluorophore aus, die Förster-Resonanzenergietransfer (FRET) eingehen können. Bei intaktem Nukleotid führt die Anregung des Fluoreszenzdonors zum Transfer der Energie auf den Fluoreszenzakzeptor, so dass die Fluoreszenzemission des Fluoreszenzakzeptors detektiert werden kann. Bei Spaltung der α - β -Anhydridbindung des Nukleotids findet kein FRET statt und die direkte Emission des Fluoreszenzakzeptors wird detektiert. FRET Nukleotide der Klasse I (siehe Abbildung 3-1) enthalten Cy3 als Fluoreszenzdonor und Cy5 als Fluoreszenzakzeptor. Nukleotide der Klasse II haben hingegen unterschiedliche Donoren und 4-Amino-6-methyl-7(8H)-pteridon-adenosin oder 2-aza-1-N⁶-etheno-adenosin als Akzeptoren.

I)



II)

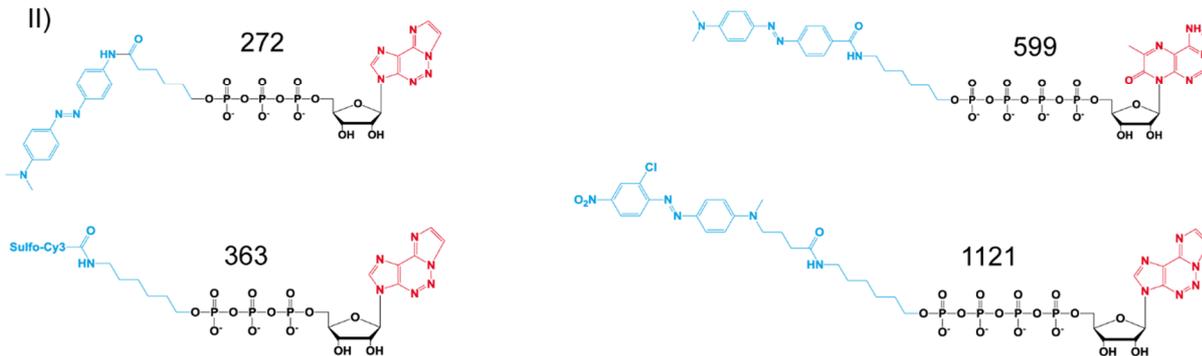


Abbildung 3-1: Strukturen der FRET Nucleotide: Fluoreszenzdonoren sind in blau, -akzeptoren in rot dargestellt. I) FRET Nucleotide der Klasse I II) FRET Nucleotide der Klasse II.

Um zu testen, welche der FRET Nucleotide der Klasse I von VopS, IbpA und DrrA für die Modifizierung von Cdc42 und Rab1 verwendet werden können, wurden Ansätze mit 50 μM GTPase, 10 μM Enzym und 5 μM Nucleotid bei 25 $^{\circ}\text{C}$ inkubiert.

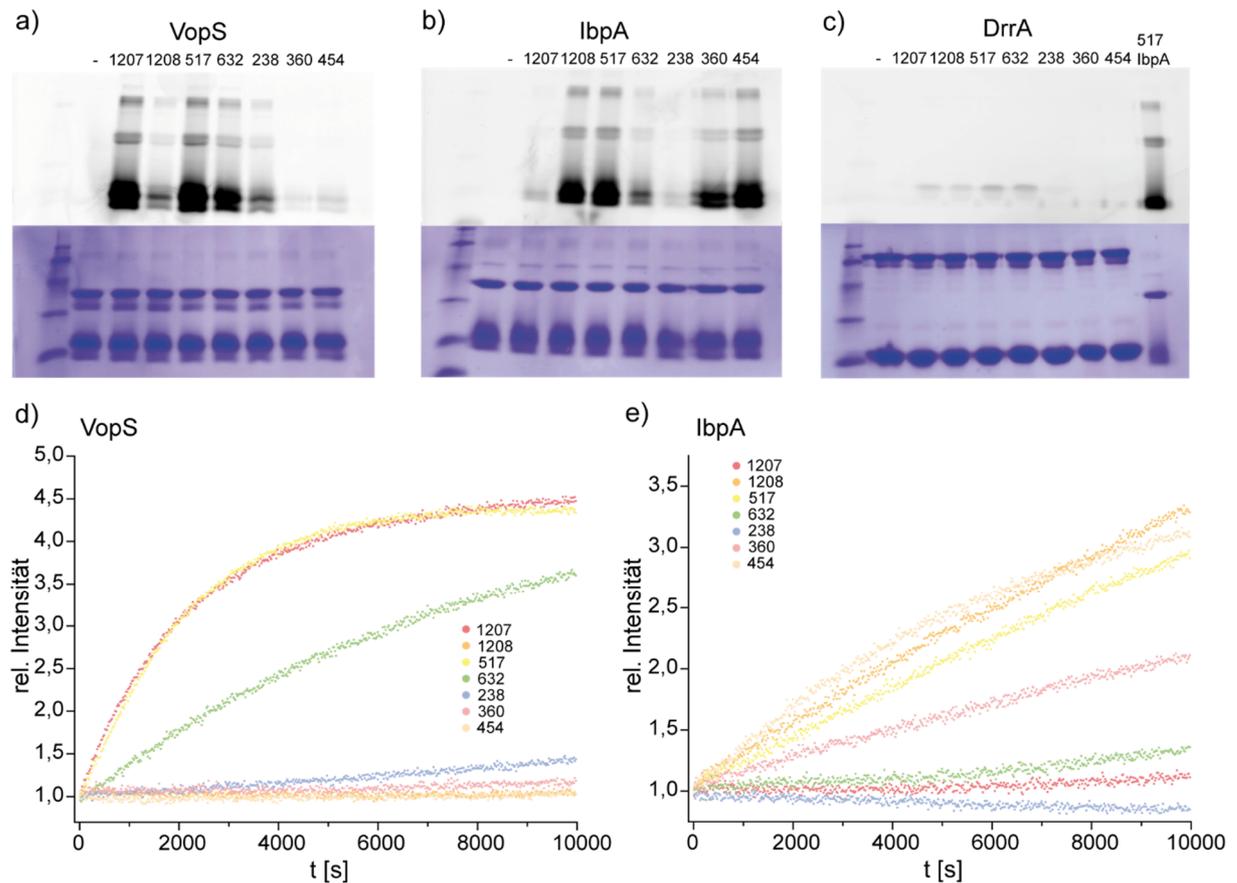


Abbildung 3-2: Modifizierung von Cdc42 und Rab1 mit FRET Nucleotiden durch VopS, IbpA und DrrA: a), b), c) 50 μM Substrat, 10 μM Enzym und 5 μM Nucleotid wurden bei 25 $^{\circ}\text{C}$ inkubiert und durch SDS-PAGE aufgetrennt (unten). Die in-Gel Fluoreszenz (oben) wurde in einem Typhoon Laserscanner visualisiert. d), e) Kinetik der Adenylylierung mit FRET Nucleotiden. Die Fluoreszenz wurde zeitabhängig in einem TECAN GENios verfolgt. Messpunkte der Hydrolysereaktion ohne Proteinsubstrat wurden subtrahiert.

Nach Auftrennen der Proteine über SDS-PAGE wurde die Fluoreszenz mit Hilfe eines Fluoreszenzscanners im Gel visualisiert. Die Kinetik der Nucleotidylisierung von Cdc42 wurde durch zeitabhängige Verfolgung der Fluoreszenzemission des Fluoreszenzdonors in einem TECAN GENios Plattenleser analysiert. Wie in Abbildung 3-2 a) und d) zu sehen, kann VopS mit größter Effizienz die Nucleotide 1207, 517 und 632 als Nucleotidsubstrate für die Nucleotidylisierung verwenden. Diese Nucleotide wurden alle an der N⁶-Position der Adenin-Base modifiziert. Bei den Nucleotiden 1208 und 238 findet eine sehr langsame Modifikation statt. Der Fluoreszenz-akzeptor wurde hier an der 2'OH Gruppe der Ribose bzw. an der C²-Position der Adenin-Base angebracht. Hauptsubstrate für IbpA sind die Nucleotide 1208, 517, 360 und 454. Nucleotid 632 wird mit sehr geringer Reaktionsgeschwindigkeit umgesetzt. IbpA kann also mit großer Effizienz Nucleotide verwenden, die am N⁶ der Adeninbase, an 2'OH oder 3'OH der Ribose modifiziert wurden. Sowohl Tri- als auch Tetraphosphatnucleotide können durch VopS und

IbpA verwendet werden. DrrA kann die Nukleotidanaloga, wie in Abbildung 3-2 c) zu sehen, nicht effizient verwenden. Bei FRET Nukleotiden der Klasse II (363, 1121, 272, 599) war der direkte Nachweis der Modifikation durch Detektion der Fluoreszenz im Gel nicht möglich.

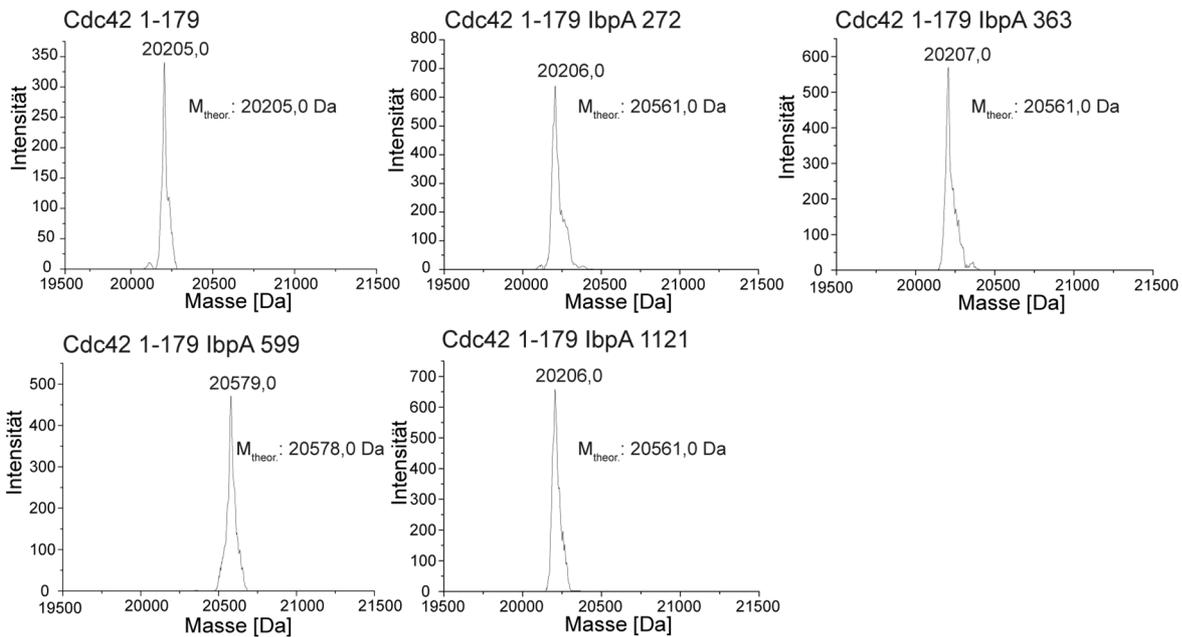


Abbildung 3-3: Massenspektrometrische Analyse der Modifizierung von Cdc42 mit FRET Nukleotiden II durch IbpA. 5 μM Cdc42 wurde über Nacht mit 0,4 μM IbpA und 10 μM Nukleotid inkubiert und über ESI-MS analysiert. $M_{\text{theor.}}$: berechnete Masse.

Die vollständige Modifikation von Cdc42 wurde deshalb über Massenspektrometrie nachgewiesen. Dazu wurde 5 μM Cdc42 mit 0,4 μM IbpA und 10 μM Nukleotid über Nacht inkubiert und über ESI-MS analysiert. Die Modifikation von Cdc42 durch IbpA erfolgt nur mit dem Tetraphosphatnukleotid 599 (siehe Abbildung 3-3). VopS verwendet, wie in Abbildung 3-4 zu sehen, die Nukleotide 363, 1121 und 272. DrrA kann keines der FRET Nukleotide II als Nukleotidsubstrat nutzen (siehe Anhang). Das Ausgangsnukleotid 2-aza-1- N^6 -etheno-ATP kann sowohl von VopS, IbpA als auch von DrrA als Substrat verwendet werden (Spektren siehe Anhang).

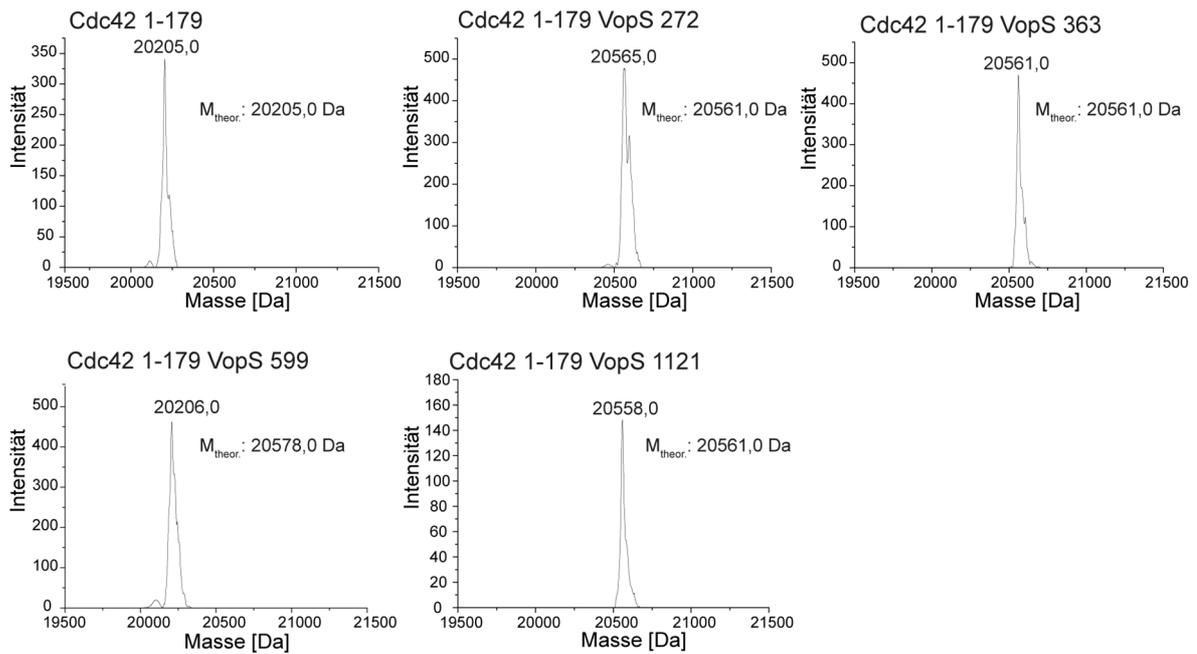


Abbildung 3-4: Massenspektrometrische Analyse der Modifikation von Cdc42 mit FRET Nukleotiden II durch VopS. 5 μM Cdc42 wurde über Nacht mit 0,4 μM VopS und 10 μM Nukleotid inkubiert und über ESI-MS analysiert. $M_{theor.}$: berechnete Masse.

Auch die Kinetik der Modifikationen mit FRET-Nukleotiden der Klasse II sollte analysiert werden. Hierzu wurde die Fluoreszenzänderung bei Spaltung der Nukleotide im Fluoreszenzspektrometer zeitabhängig verfolgt. 50 μM Cdc42 wurde mit 5 μM Nukleotid versetzt und die Reaktion durch Zugabe von 10 μM Enzym gestartet. Die Anregung der Fluoreszenz von 2-aza-1- N^6 -etheno-adenosin erfolgte bei 360 nm, die Emission wurde bei 500 nm detektiert. In Abbildung 3-5 ist die zeitabhängige Fluoreszenzänderung nach Zugabe von VopS (a) oder IbpA (b) abgebildet.

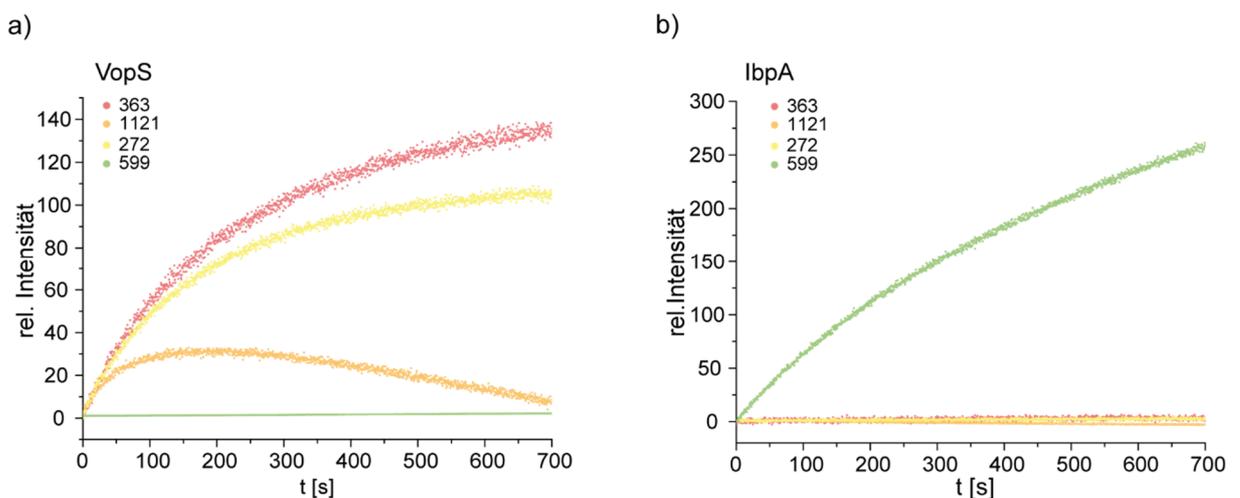


Abbildung 3-5: Modifizierung von Cdc42 mit FRET Nukleotiden Klasse II. Die Modifikation von 50 μM Cdc42 in Gegenwart von 10 μM Enzym und 5 μM Nukleotid wurde im Fluoreszenzspektrometer (Anregungswellenlänge 360 nm, Emissionswellenlänge 500 nm) zeitabhängig verfolgt. Messpunkte der Hydrolysereaktion ohne Proteinsubstrat wurden subtrahiert.

Die Nukleotide 363 und 272 können von VopS mit hoher Effizienz umgesetzt werden. Das Nukleotid 1121 wird durch VopS in Abwesenheit des Proteinsubstrats stark hydrolysiert (siehe Abbildung 7-4 im Anhang), was dazu führt, dass die Kurve nach ca. 200 s beginnt abzufallen. Die Hydrolyse ohne Proteinsubstrat überwiegt dann der mit Proteinsubstrat. Bei IbpA wird, wie schon aus der massenspektrometrischen Analyse zu vermuten, nur das Nukleotid 599 effektiv an Cdc42 angebracht. Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass sich die Spezifitäten von IbpA und VopS hinsichtlich unnatürlicher Nukleotide deutlich unterscheiden. IbpA kann zusätzlich zu Nukleotidmodifikationen am N⁶ des Adenosins auch Modifikationen an den OH-Gruppen der Ribose akzeptieren. Bei Nukleotiden mit einer 2-aza-1-N⁶-etheno-Adenosingruppe und zusätzlicher Anbringung eines Fluorophors am γ -Phosphat zeigt allerdings nur VopS eine Modifikationsreaktion.

3.1.1.2 Spezifität von VopS, IbpA und DrrA für Propargylnukleotidanaloga

Auch für die Detektion posttranslationaler Modifikationen in Zelllysaten oder anderen komplexen Proben werden Antikörper-basierte Methoden häufig verwendet. Da die Herstellung dieser Proteine aufwendig und kostenintensiv ist, sind alternative Detektionsmethoden von großem Interesse. Die sogenannten Propargylnukleotide (Dr. Pavel Kielkowski und Prof. Dr. Stephan A. Sieber, TUM) N⁶pATP und O³pATP können einen solchen alternativen Ansatz bieten. Diese Nukleotide wurden durch Anbringen einer Propargylgruppe an das N⁶ oder O³ der Adenosinbase zu Substraten für die Klick-Reaktion, gemacht und können somit eine alternative Detektionsmöglichkeit von posttranslationalen Modifikationen darstellen. Deshalb sollte hier getestet werden, ob auch diese Nukleotide von VopS, IbpA und DrrA als Substrate für die Modifikation von Cdc42 bzw. Rab1 verwendet werden können. Zu diesem Zweck wurde Cdc42 bzw. Rab1 mit dem entsprechenden Enzym und Nukleotid über Nacht inkubiert und der Reaktionsansatz anschließend über Massenspektrometrie analysiert.

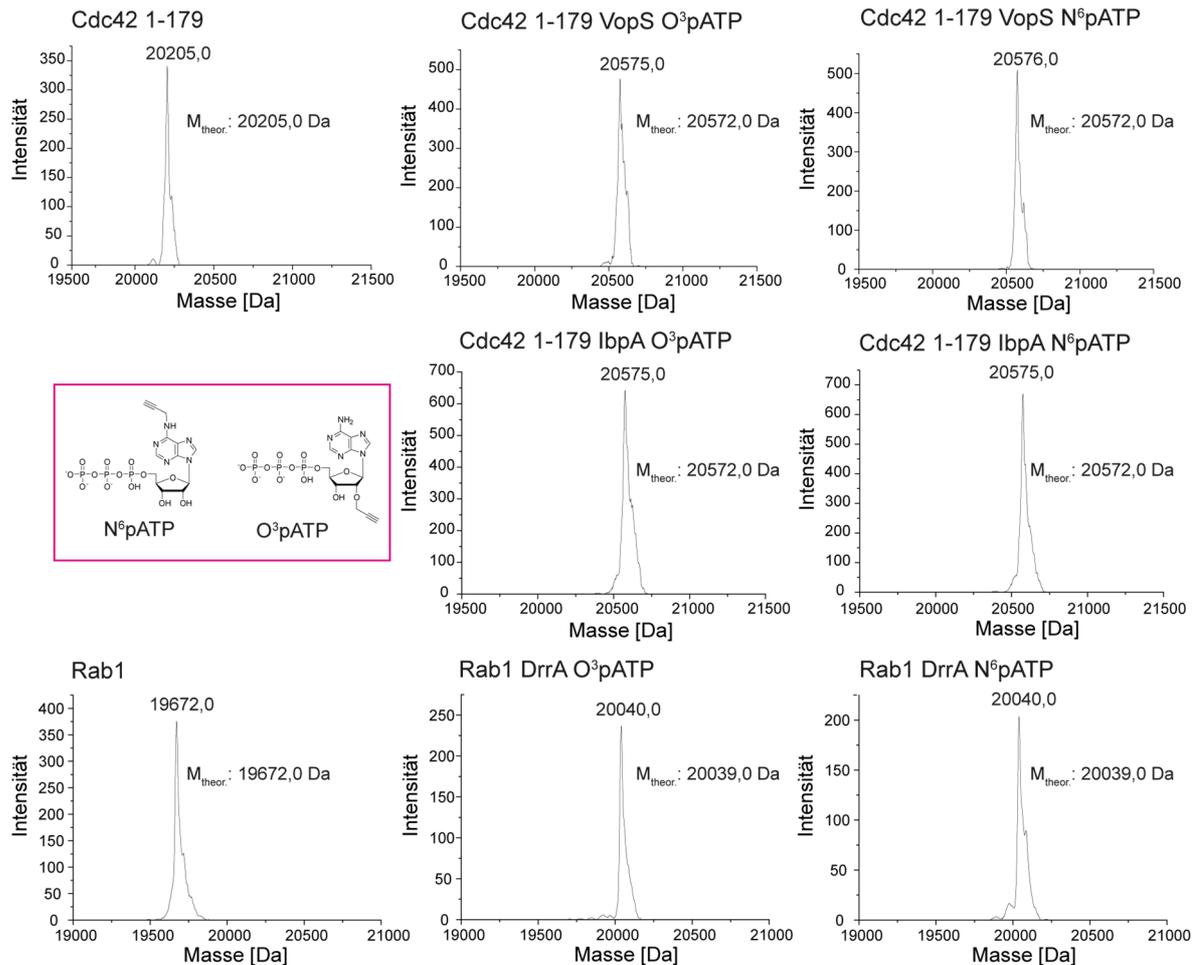


Abbildung 3-6: Massenspektrometrische Analyse der Reaktion von VopS, IbpA und DrrA mit Propargylnukleotiden. 5 μ M GTPase wurden mit 0,4 μ M Enzym und 10 μ M Nukleotid über Nacht inkubiert und über ESI-MS analysiert. M_{theor.}: berechnete Masse.

In diesem Kapitel werden die Ergebnisse der Untersuchungen der Spezifität von VopS, IbpA und DrrA für die Propargyl-Nukleotide dargestellt. Die Massenspektren in Abbildung 3-6 zeigen, dass alle verwendeten Enzyme die Propargylnukleotide als Substrate für die Modifikation von Cdc42 bzw. Rab1 verwenden können. Der Massenzuwachs von ca. 370 Da entspricht der Anbringung von O³pAMP bzw. N⁶pAMP. Um die Effektivität der Modifikationsreaktionen durch die einzelnen Enzyme zu analysieren, wurde die Kinetik der Reaktionen durch die Messung der intrinsischen Tryptophanfluoreszenz der GTPasen über die Zeit der enzymatischen Reaktion bestimmt. In Folge von Modifizierung/Demodifizierung oder Nukleotidaustausch kommt es zu einer Veränderung der intrinsischen Tryptophanfluoreszenz, die fluoreszenzspektrometrisch zeitabhängig verfolgt werden kann [57]. Die k_{cat}/K_M Werte wurden aus exponentiellen Anpassungen der Verlaufskurven, wie in Kapitel 5.2.4.8 beschrieben, ermittelt.

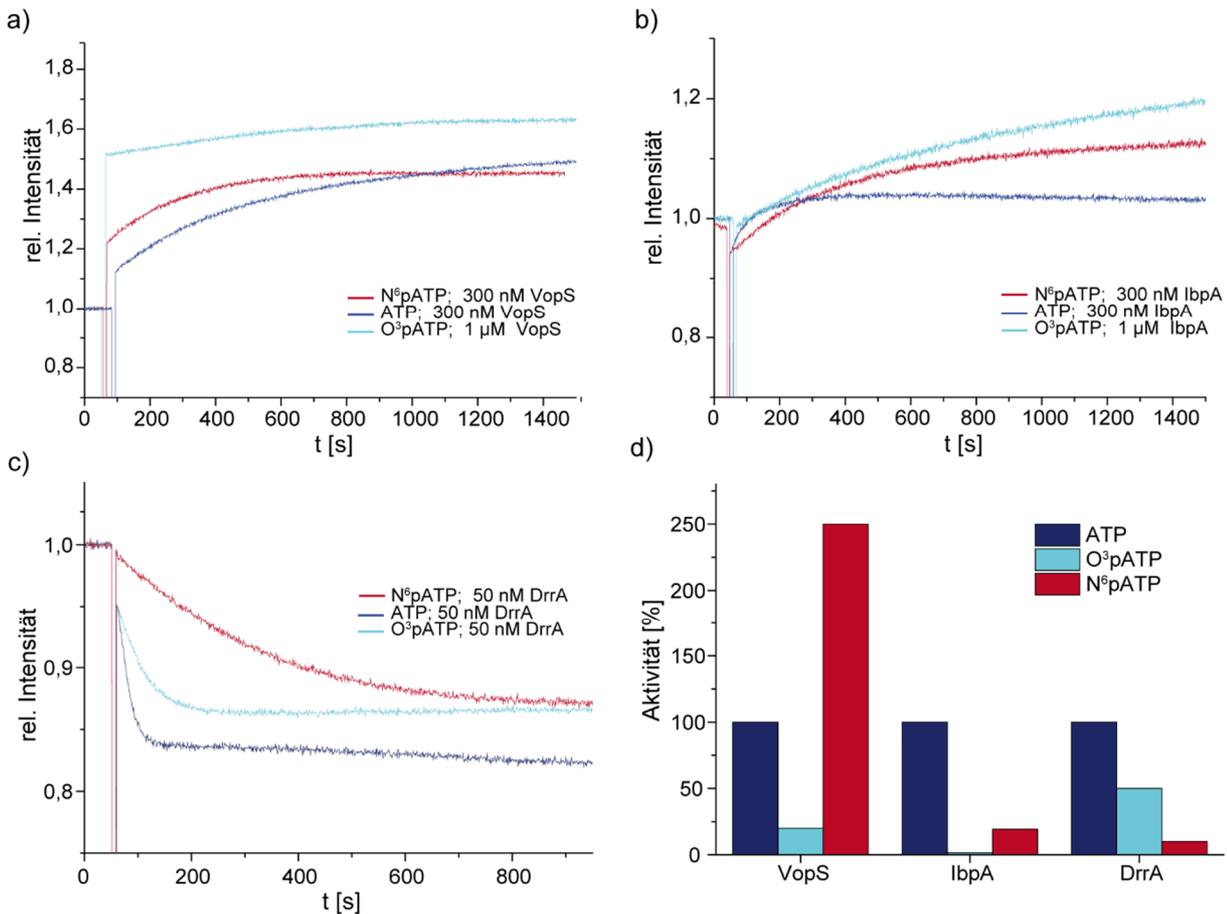


Abbildung 3-7: Kinetik der Modifizierung von Cdc42 und Rab1b mit Propargyl-Nukleotiden. Reaktionen wurden im Fluoreszenzspektrometer durch Messung der intrinsischen Tryptophanfluoreszenz zeitabhängig verfolgt. Die Anregung erfolgte bei 297 nm, die Detektion bei 340 nm. a)+b) Modifizierung von 5 μM Cdc42 mit Propargyl-Nukleotiden katalysiert durch VopS (a) und IbpA (b). Aufgrund der sehr langsamen Kinetik wurde für O³pATP 1 μM (1:5) Enzym eingesetzt. c) Modifizierung von 5 μM Rab1bQ67A durch 50 nM DrrA. d) Vergleich der Aktivitäten für Propargylnukleotide in %. Aktivitäten wurden über exponentielle Anpassung der Verlaufskurven ermittelt und relativ zu ATP (100 %) normiert.

In Abbildung 3-7 sind die Verläufe der Fluoreszenzänderung bei 340 nm abgebildet. Die Zugabe des Enzyms führt, vor allem bei a), zu einer sprunghaften Veränderung des Fluoreszenzsignals, die auf die Fluoreszenz der Tryptophane des Enzyms zurückzuführen ist. Es ist zu sehen, dass O³pATP sowohl von IbpA als auch von VopS mit der niedrigsten Reaktionsgeschwindigkeit umgesetzt wird. Für VopS wurde ein $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$ von $1,2 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ermittelt, was einem ca. 5-fach niedrigerem Wert als für ATP ($6 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) entspricht. Es ist allerdings zu beachten, dass hier die Änderung des Fluoreszenzsignals sehr gering ist, was die Qualität der exponentiellen Anpassung negativ beeinflusst. IbpA modifiziert Cdc42 mit O³pATP mit einem $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$ von $7,2 \cdot 10^2 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, was 1,6 % der Aktivität für ATP entspricht. Bei DrrA hingegen ist die Verwendung von O³pATP ($4 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) mit einer 50 % niedrigeren Reaktionsgeschwindigkeit als für ATP ($8 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) effektiver als für N⁶pATP.

Für die Umsetzung von N⁶pATP zeigt DrrA 10 % der Aktivität der Umsetzung von ATP ($8 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$). Die Modifizierung von Cdc42 mit N⁶pATP durch VopS ist deutlich schneller als mit ATP.

Das Enzym weist für N⁶pATP ($1,5 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) eine ca. 2,5-fach höhere Effizienz auf als für ATP, wohingegen IbpA N⁶pATP nur mit einem auf 20 % reduzierten $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$ Wert von $8,3 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ im Vergleich zu ATP ($4,3 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) umsetzt.

Für die FIC-Enzyme IbpA und VopS scheint die Modifikation am 2'OH der Ribose einen größeren Einfluss auf die Effizienz der Modifikationsreaktion zu haben als für DrrA. Dies legt die Vermutung nahe, dass die sterischen Bedingungen in den Nukleotidbindungstaschen sich signifikant unterscheiden. N⁶pATP kann erstaunlicherweise von VopS sehr viel besser umgesetzt werden als von IbpA und DrrA.

Trotz der hohen Konservierung der FIC-Domänenstruktur zeigen VopS und IbpA deutlich unterschiedliche bevorzugte Nukleotidsubstrate. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass auch Interaktionen mit Aminosäureresten außerhalb der konservierten Bereiche für die Nukleotiderkennung bzw. -umsetzung wichtig sind. Bei DrrA scheint vor allem die Nukleotidumsetzung bei Nukleotiden mit großen Modifikationen beeinträchtigt zu sein.

3.1.2 Einfluss von Switch II-Aminosäureaustauschen in Rab1 auf Enzymaktivitäten

Die molekularen Interaktionen zwischen Rab1 und interagierenden Enzymen sind für das Verständnis der Reaktionsmechanismen von großem Interesse. Viele Ansätze zur Kristallisation von Komplexen aus Rab1 und modifizierenden Enzymen blieben allerdings ohne Erfolg. Um den Einfluss individueller Aminosäuren von Rab1b auf die Aktivität interagierender Enzyme zu analysieren, sollten deshalb Aminosäureaustauschmutanten untersucht werden. Zu diesem Zweck wurden einzelne Aminosäuren eines Switch II-Peptids in Rab1 durch Alanin ersetzt. Die Kinetik der Enzymreaktionen konnte durch die Messung der intrinsischen Tryptophanfluoreszenz zeitabhängig verfolgt werden. Die $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$ -Werte wurden, wie in Kapitel 5.2.4.8 beschrieben, aus exponentiellen Anpassungen der Verlaufskurven (siehe Anhang) ermittelt.

Die größten Auswirkungen auf die DrrA GEF-Aktivität (siehe Abbildung 3-8) haben die Rab1 T74A und R79A Mutation mit ca. 15 % bzw. 25 % der Wildtypaktivität ($2,5 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$; alle Werte siehe Anhang). Für die Y77A und die I73A Mutanten weist das Enzym noch ca. 50 % Aktivität auf, die S75A, S76A und T72A Mutationen hingegen verringern die Aktivität nur um ca. 30 %.

Im Falle der DrrA Adenylylierungsaktivität haben die Mutanten I73A und R79A die größte Auswirkung. Sie verringern die Aktivität im Vergleich zum Wildtyp Rab1 ($7,93 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) auf ca. 20 bzw. 15 %. Auch die Y78A Mutation zeigt noch einen signifikanten Einfluss mit einer DrrA Restaktivität von ca. 40 %.

Im Vergleich von DrrA-GEF- und DrrA-Adenylylierungsaktivität zeigt sich, dass für die GEF-Aktivität der Rest T74 wichtig ist, während für die Adenylylierungsaktivität das benachbarte I73

größere Bedeutung zu haben scheint. Das Tyr78 scheint die GEF Aktivität eher negativ zu beeinflussen, während es für die Adenylylierung eine wichtige Aminosäure ist. Die drei Aminosäuren, die direkt N-terminal der Adenylylierungsstelle liegen scheinen für die Adenylylierung nicht essentiell zu sein. Der Effekt einer Doppel- oder Dreifachmutante müsste allerdings untersucht werden.

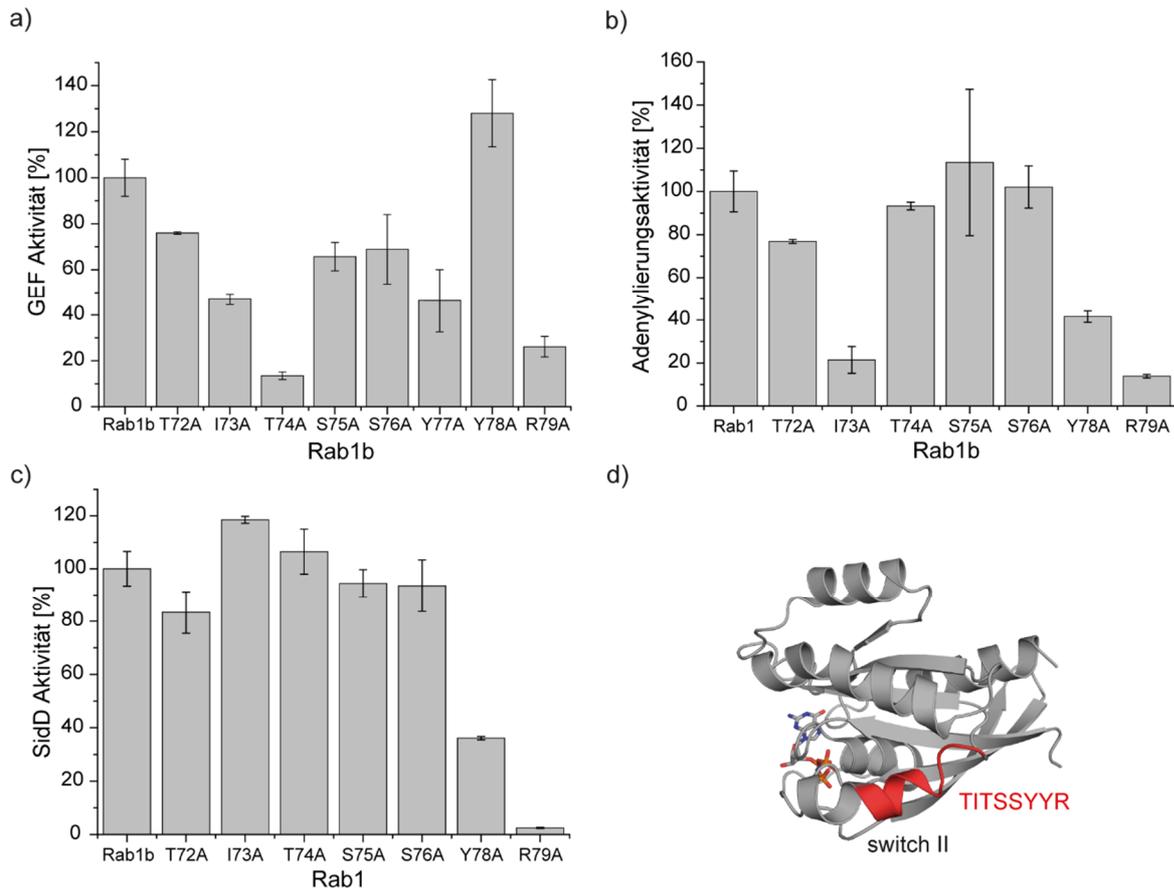


Abbildung 3-8: Einfluss von Switch II-Aminosäureaustauschen auf die Aktivität von (a) DrrA GEF Aktivität, (b) DrrA Adenylylierung und (c) Deadenylylierung. Enzymaktivitäten wurden aus exponentieller Anpassung der erhaltenen Fluoreszenzverlaufskurven errechnet. Fehlerbalken geben die Standardabweichung aus min. zwei unabhängigen Messungen an. d) Struktur von Rab1, ausgetauschte Switch II-Aminosäuren sind in rot dargestellt.

Für das demodifizierende Enzym SidD (k_{cat}/K_M für Rab1b $4,90 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) zeigen v.a. die Y78A und R79A Mutation Auswirkungen. Die Enzymaktivität wird für diese Mutanten um ca. 60 % und ca. 95 % im Vergleich zum Wildtyp verringert. Alle anderen Rab1 Mutanten führen nicht zu einer signifikant veränderten SidD-Aktivität. Es haben also vor allem die beiden Aminosäurereste Bedeutung, die direkt auf das adenylylierte Tyr77 folgen. Allerdings sollte beachtet werden, dass die Aktivität von SidD für Rab1b R79A immer noch $1,35 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ beträgt und die Deadenylylierung deshalb trotz der Mutationen effizient ist. Diese relativ große Toleranz gegenüber Aminosäureaustauschen weist eher auf eine Substraterkennung über die Tertiärstruktur des Proteins hin, als über die Peptidsequenz.

3.1.3 Demodifikation eines Rab1-Switch II-Peptides durch SidD

SidD demodifiziert Rab1-AMP im GDP- und GTP-Zustand mit nahezu gleicher Effektivität und katalytischer Effizienz [73]. Dies könnte darauf hinweisen, dass die Tertiärstruktur der GTPase für die SidD-Aktivität nicht von essentieller Bedeutung ist. Andererseits wurde in Kapitel 3.1.2 gezeigt, dass SidD nicht sensibel gegenüber Aminosäureaustauschen im N-terminalen Bereich des untersuchten Switch II-Bereichs zu sein scheint. Dies würde einer Substraterkennung auf Basis der Peptidsequenz widersprechen.

Um diese Fragestellung zu analysieren wurde ein synthetisches, adenyliertes Switch II-Peptid ($\text{TITY}_{\text{AMP}}\text{YRGAHG C}$) (Prof. Dr. Christian Hedberg, Universität Umeå) auf die Demodifikation mit SidD getestet. Die Demodifikation von $5 \mu\text{M}$ Rab1-AMP durch 50 nM SidD wurde durch Messen der intrinsischen Tryptophanfluoreszenz verfolgt. Die Kinetik der Demodifikation von $50 \mu\text{M}$ Peptid-AMP durch 500 nM SidD hingegen wurde über einen HPLC-basierten Assay analysiert. In Abbildung 3-9 ist der vergleichende Demodifikationsverlauf für Rab1-AMP und das AMP-Peptid durch SidD dargestellt.

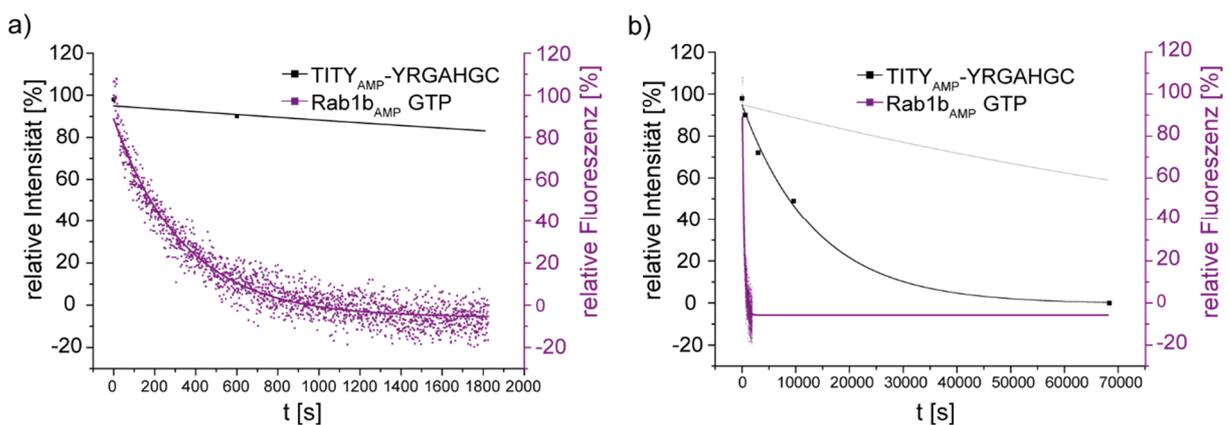


Abbildung 3-9: Vergleich der Demodifikation von Rab1-AMP und einem adenylierten Peptid durch SidD. Die Rab1 Demodifikation wurde durch Messen der intrinsischen Tryptophan-fluoreszenz verfolgt. Die Deadenylierung des Peptids wurde durch Detektion der Tyrosin Absorption in einem HPLC-basierten Assay analysiert. a) Zeitabhängige Deadenylierung von Rab1-AMP ($5 \mu\text{M}$) und Peptid-AMP ($50 \mu\text{M}$) mit 50 bzw. 500 nM SidD in einem Zeitfenster von 1800 s . b) Deadenylierung von Rab1-AMP und Peptid-AMP in einem Zeitfenster von 70000 s . Die Demodifizierung von $5 \mu\text{M}$ Peptid-AMP mit 50 nM SidD wurde zu Vergleichszwecken simuliert (grau, siehe 5.2.4.6). Alle Messkurven wurden mit Hilfe einer einfach exponentiellen Funktion angepasst. Modifiziert nach [121].

Die exponentielle Anpassung der Messkurven ergibt für die Demodifikation des Switch II-Peptids ($\text{TITY}_{\text{AMP}}\text{YRGAHG C}$) durch SidD einen $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$ von $150 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (vollständige Anpassung in Abbildung 3-9 b), im Vergleich dazu ist der errechnete $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$ für die Demodifikation von Rab1-AMP $5 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (vollständige Anpassung in Abbildung 3-9 a). Die Aktivität von SidD für das adenylierte Peptid ist also ca. 3300-fach geringer als für Rab1-AMP. Experimentell war es nicht möglich, die Demodifikation von $5 \mu\text{M}$ Peptid-AMP durch 50 nM SidD zu messen. Diese Reaktion wurde deshalb simuliert (b) graue Kurve) und zeigt, dass die Deadenylierung unter diesen Bedingungen noch langsamer ablaufen würde. Diese Ergebnisse weisen darauf hin,

dass SidD strukturelle Elemente von Rab1b erkennen muss, um eine im zellulären Kontext signifikante Aktivität zu erreichen. Nur die Erkennung des adenylierten Tyrosins und der umgebenden Aminosäurereste im Protein ist nicht ausreichend.

3.1.4 Charakterisierung des anti-Rab1-AMP-Antikörpers

Antikörper sind wichtige Werkzeuge zur Detektion posttranslationaler Modifikationen. Vor allem für den Nachweis von modifizierten Proteinen in Zelllysaten gibt es kaum Alternativen. Auch für die Etablierung von Pulldowns zur Isolierung von Proteinen mit PTMs und Interaktionspartnern sind hochspezifische Antikörper von enormer Wichtigkeit. Deshalb sollte die Verwendbarkeit eines anti-Rab1-AMP Antikörpers für die Detektion von adenyliertem Rab1 und mit AMP modifizierten Peptiden getestet werden. In diesem Kapitel werden die Ergebnisse der Analyse der Protein- und Peptidbindungseigenschaften des anti-Rab1-AMP Antikörpers dargestellt. Für diese Untersuchungen wurde der *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) eingesetzt. Hierbei kann ein immobilisiertes Antigen durch einen spezifischen Antikörper erkannt und durch einen zweiten, mit einem Detektionsenzym ausgestatteten Antikörper detektiert werden. Hier wurde ein Sekundärantikörper verwendet, der mit einer *Horse Radish Peroxidase* gekoppelt ist. Deren Umsetzung eines chromogenen Substrats (hier ABTS) führt zur Entstehung eines farbigen Endproduktes, das photometrisch (hier: 405 nm) nachgewiesen werden kann. Im ersten Charakterisierungsschritt wurde überprüft, ob die Konzentration an eingesetztem Protein bzw. Primärantikörper eine proportionale ELISA-Antwort hervorruft.

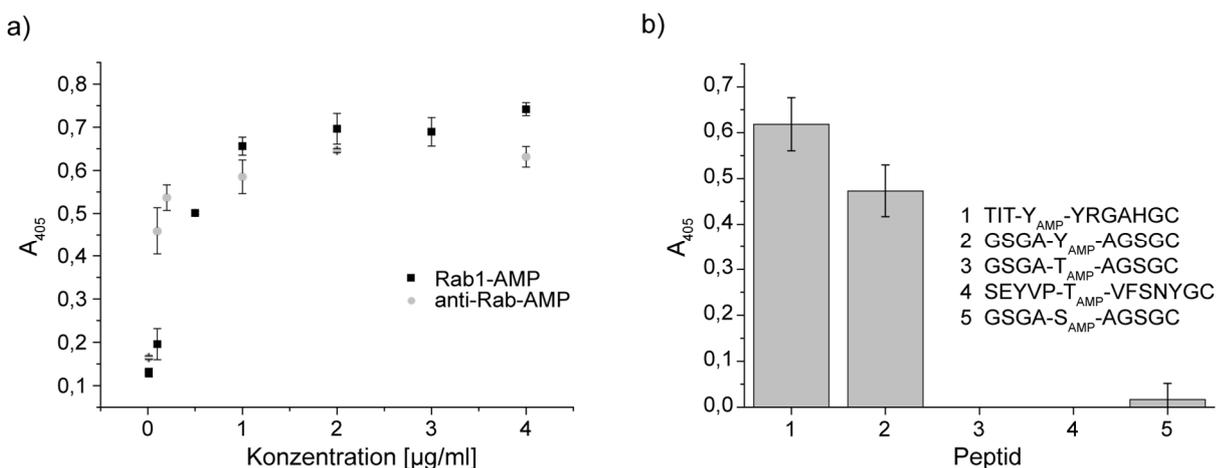


Abbildung 3-10: Der anti-Rab1-Antikörper kann zur Detektion von Rab-Tyr-AMP sowie Peptid-Tyr-AMP verwendet werden. a) Detektion des ELISA-Signals bei 405 nm in Abhängigkeit von der Rab1-AMP (schwarz) bzw. anti-Rab1-AMP-Antikörper (grau) Konzentration. Die Quantifizierung der ELISA Antwort erfolgte über die Umsetzung eines chromogenen Substrates durch die an den Sekundärantikörper gekoppelte *Horse Radish Peroxidase*. Die konstanten Parameter betragen 1 $\mu\text{g/ml}$ anti-Rab1-AMP Antikörper für die Variation von Rab1-AMP, 2 $\mu\text{g/ml}$ Rab1-AMP für die Variation des anti-Rab1-AMP Antikörpers und 100 ng/ml Sekundärantikörper. b) ELISA mit anti-Rab1-AMP-Antikörper gegen immobilisierte adenylierte Peptide. Alle Experimente wurden in Triplikaten ausgeführt. Fehlerbalken geben die Standardabweichung an.

Abbildung 3-10 a) zeigt, dass der Einsatz von 1 µg/ml anti-Rab1-AMP-Antikörper und 100 ng/ml Sekundärantikörper eine von der Proteinkonzentration (Rab1-AMP) abhängige Detektion der Absorption erlaubt. Eine Sättigung des ELISA-Signals tritt bei diesen Bedingungen ab einer Rab1-AMP Konzentration von ca. 2 µg/ml auf. Bei konstanter Proteinkonzentration von 2 µg/ml kann durch Variation der anti-Rab1-AMP-Antikörperkonzentration ein konzentrationsabhängiges Signal detektiert werden. Nach Erreichen einer Primärantikörperkonzentration von 2 µg/ml steigt das Signal nicht mehr an. Wie in Abbildung 3-10 b) dargestellt, zeigt der Antikörper auch Spezifität für zwei Tyrosin-AMP enthaltende Peptide. Das Peptid, das die Rab1 Switch II-Sequenz enthält (1), wird am besten erkannt. Auch das GSGA-Y_{AMP}-AGSGC Peptid (2) wird vom anti-Rab1-AMP-Antikörper gebunden. Peptide, die ein adenyliertes Threonin bzw. Serin enthalten, führen zu keinem signifikanten Signal. Der Antikörper kann somit genutzt werden, um Rab1-AMP und an Tyrosin adenylierte Peptide in Lösung nachzuweisen.

3.2 Einfluss von posttranslationalen Modifikationen auf intrinsische Eigenschaften kleiner GTPasen

Der Einfluss posttranslationaler Modifikationen auf biochemische und strukturelle Eigenschaften kleiner GTPasen wurde bisher nicht im Detail untersucht. Da Adenylylierung und Phosphocholinierung in den für die Effektorbindung essentiellen Switch-Regionen erfolgen, sind molekulare Konsequenzen der Modifikation jedoch von großem Interesse. Dieses Kapitel beginnt einführend mit der für alle folgenden Experimente erforderlichen Herstellung und Modifikation kleiner GTPasen. Im Verlauf wird schließlich der Einfluss der posttranslationalen Modifikationen auf intrinsische Nukleotidhydrolyse, Nukleotidaustausch, Enzymaktivitäten und die thermische Stabilität der GTPasen aufgezeigt.

3.2.1 Produktion und Modifikation von kleinen GTPasen

Grundlage für die Analyse biochemischer bzw. struktureller Auswirkungen von PTMs auf kleine GTPasen ist die Produktion unmarkierter bzw. isotope markierter Proteine in ausreichender Menge und Reinheit. Außerdem müssen die GTPasen in präparativem Maßstab *in vitro* posttranslational modifiziert, sowie in einen definierten Nukleotidzustand versetzt werden. Die Kenntnis von Enzymparametern ist hierbei essentiell.

3.2.1.1 Reinigung isotope markierter GTPasen

Im Rahmen dieser Arbeit sollen Konsequenzen von posttranslationalen Modifikationen auf die Konformation der kleinen GTPasen analysiert werden. Die NMR-Spektroskopie bietet hierfür optimale Bedingungen, da Proteine in Lösung strukturell charakterisiert werden können. Für diese Untersuchungen ist die Produktion isotope markierter GTPasen essentiell. Im Folgenden soll deshalb die Produktion und Reinigung von ^{15}N -Rab1b 3-174 Q67A exemplarisch aufgezeigt werden. Isotope markierte Proteine wurden in M9-Minimalmedium mit ^{15}N -Ammoniumchlorid bzw. ^{13}C -Glucose exprimiert. Die Reinigung His-getaggtter Proteine aus dem Lysat erfolgte über Nickelaffinitätschromatographie. Abbildung 3-11 a) zeigt die Analyse proteinhaltiger Fraktionen über SDS-PAGE. Selektierte Fraktionen wurden vereinigt und über Nacht dialysiert. Während der Dialyse wurde der His-MBP-Tag durch Aktivität der TEV Protease abgeschnitten. Zur Abtrennung des Tags wurde eine zweite Nickelaffinitätschromatographie durchgeführt (Abbildung 3-11b). Nach Konzentrierung der Proteinlösung wurde die finale Reinigung durch eine abschließende Größenausschlusschromatographie erreicht (c, d). Das Protein konnte, wie in Abbildung 3-11 c) dargestellt, in großer Reinheit erhalten werden. Die Ausbeute betrug bei dieser Reinigung 15 mg Protein pro Liter Kultur.

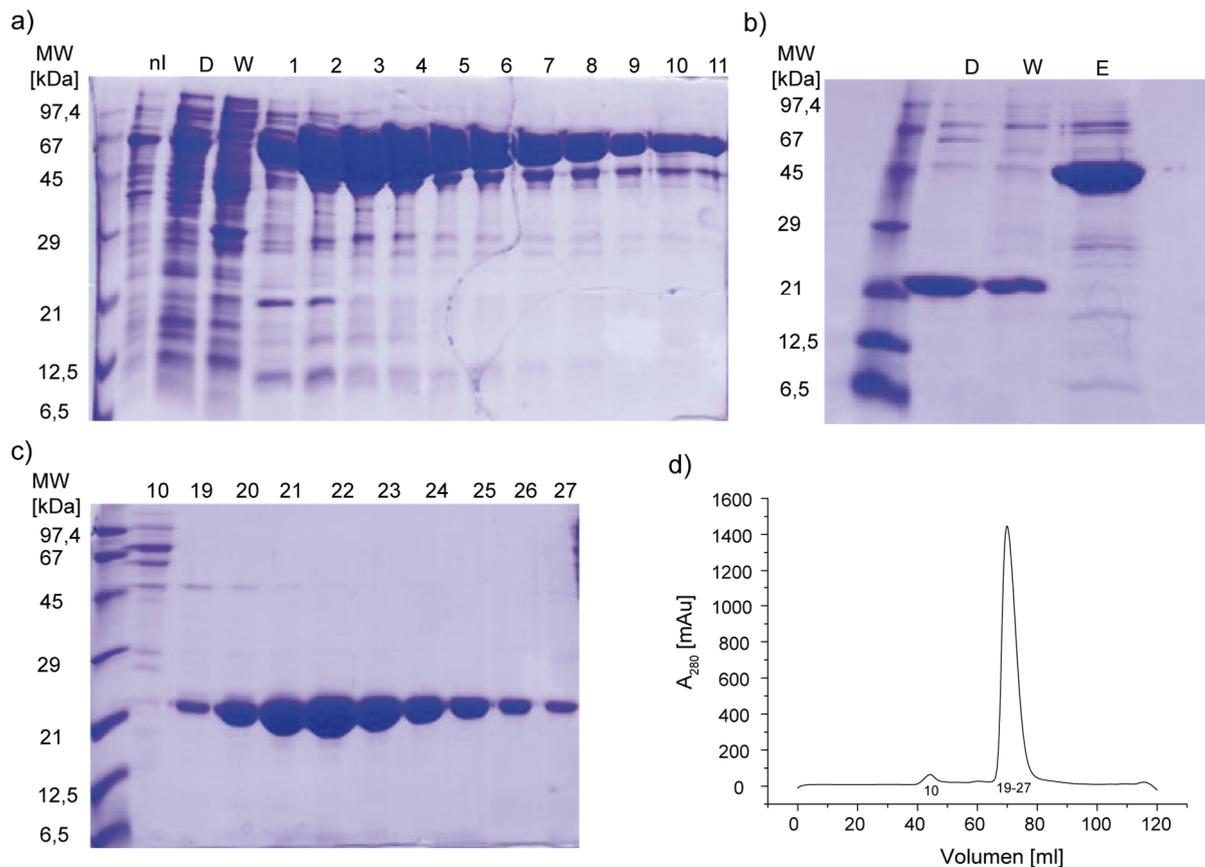


Abbildung 3-11: Reinigung von ¹⁵N Rab1b 3-174 Q67A. a) SDS-PAGE der Nickelaffinitäts-chromatographie. nl nach Induktion, D Durchlauf, W Waschschrift mit 25 mM Imidazol, Fraktionen 1-11: Elution mit 65 mM Imidazol b) SDS-PAGE der Nickelaffinitätschromatographie nach Dialyse und Abschneiden des His-MBP-Tags. Rab1b befindet sich in Durchlauf und Waschfraktion. c) SDS-PAGE der Gelfiltration. d) Chromatogramm der Gelfiltration. Die Absorption bei 280 nm in Abhängigkeit des Laufvolumens wurde aufgezeichnet.

Tabelle 3-1: Ausbeuten der Reinigung isotonenmarkierter Proteine.

Isotopenmarkiertes Protein	Proteinausbeute [mg] pro Liter Kultur
¹⁵ N Rab1b 3-174 Q67A	15
¹⁵ N Rab1b 3-174 Q67A F45A	5
¹³ C ¹⁵ N Rab1b 3-174 Q67A	1,8
² H ¹³ C ¹⁵ N Rab1b 3-174 Q67A	1,6
¹⁵ N Cdc42 1-179 Q61A	12
¹³ C ¹⁵ N Cdc42 1-179 Q61A	6

Die Ausbeuten verringerten sich durch die zusätzliche Substitution von Glucose durch ¹³C-Glucose deutlich (siehe Tabelle 3-1). Die Expression in Medium mit über 90 % D₂O für die Zuordnung von NMR-Spektren erforderte die vorherige Anpassung der Expressionszellen mit steigenden D₂O Konzentrationen im Medium. Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass

alle GTPasen in zufriedenstellender Reinheit und ausreichender Ausbeute gewonnen werden konnten.

3.2.1.2 Herstellung präparativ modifizierter GTPasen in definiertem Nukleotidzustand

Intrinsische Eigenschaften der GTPasen sollten abhängig vom Nukleotidzustand analysiert werden. Um dies zu gewährleisten mussten diese mit den spezifischen Nukleotiden einheitlich beladen werden. Dies erfolgte wie in Kapitel 5.2.2.1.11 beschrieben. Überprüft wurde der Nukleotidzustand über Umkehrphasen-Hochleistungsflüssigchromatographie auf einer C18 Säule.

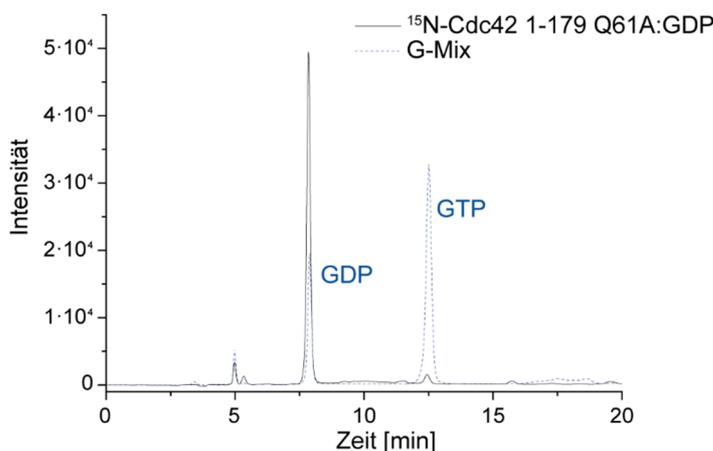


Abbildung 3-12: Analyse des Nukleotidzustands von ^{15}N -Cdc42 1-179 Q61A über Umkehrphasen- HPLC. Nukleotid enthaltende GTPasen wurden hitzedenaturiert und der Überstand auf einer C18 Säule analysiert. Die Trennung erfolgte mit einer Flussrate von 1 ml/min in 50 mM KPi , 10 mM TbaBr, 12 % Acetonitril. Als Standard dient eine Mischung aus GDP und GTP (blau gestrichelt).

In Abbildung 3-12 ist ein exemplarisches Chromatogramm eines HPLC-Laufs zur Analyse des Nukleotidzustands gezeigt. Als Standard dient eine Mischung aus GDP und GTP. Durch Integration der Fläche unter den Peaks können relative Verhältnisse der Nukleotide im Protein ermittelt werden. Für das hier gezeigte ^{15}N -Cdc42 1-79 Q61A:GDP wurde ein Nukleotidzustand von 98 % GDP ermittelt. In Tabelle 3-2 sind die Nukleotidzustände für isotopenmarkierte und unmarkierte Proteine aufgelistet.

Tabelle 3-2: Nukleotidzustände der Proteine für NMR-Messungen.

Protein	Nukleotidzustand
^{15}N Rab1b 3-174 Q67A-AMP GTP	97 % GTP
^{15}N Rab1b 3-174 Q67A GTP	96 % GTP
^{15}N Rab1b 3-174 Q67A GDP	95 % GDP
^{13}C ^{15}N Rab1b 3-174 Q67A GDP	98 % GDP
^{15}N Rab1b 3-174 F45A Q67A-AMP GTP	100 % GTP
^{15}N Rab1b 3-174 Q67A PC GTP	95 % GTP

^{15}N Rab1b 3-174 Q67A PC GDP	99 % GDP
^{15}N Rab1b 3-174 Q67A Y77E GDP	95 % GDP
^2H ^{13}C ^{15}N Rab1b 3-174 Q67A GDP	100 % GDP
^{15}N Rab1b 3-174 Q67A-AMP GDP	97 % GDP
^{15}N Cdc42 1-179 Q61A GTP	95 % GTP
^{15}N Cdc42 1-179 Q61A GDP	98 % GDP
^{15}N Cdc42 1-179 Q61A-Thr-AMP GDP	85 % GDP
^{15}N Cdc42 1-179 Q61A-Tyr-AMP GDP	87 % GDP
^{15}N Cdc42 1-179 GppNHp	95 % GDP
Rab1b 3-174 Q67A-AMP GTP	95 % GTP
Rab1b 3-174 Q67A-AMP GDP	98 % GDP
$^{13}\text{C}^{15}\text{N}$ Cdc42 1-179 Q61A Tyr-AMP GDP	89 % GDP
^{13}C ^{15}N Cdc42 1-179 Q61A GDP	89 % GDP

Bei den meisten Proteinen konnten Nukleotidanteile von über 95 % erreicht werden, bei einigen Ausnahmen stoppte der Austausch bei > 85 %. Generell konnten durch den Nukleotidaustausch sehr homogene Proteinproben hergestellt werden.

Um den Einfluss der PTMs auf Struktur und Funktion kleiner GTPasen zu analysieren, mussten diese einheitlich posttranslational modifiziert werden. Zur präparativen Modifizierung wurde die GTPase mit einem 5-fachen Überschuss Nukleotid (ATP oder CDP-Cholin) und 1:50 des modifizierenden Enzyms versetzt und für 2 h bei 25 °C inkubiert. Die Vollständigkeit der Modifikation wurde über ESI-MS überprüft.

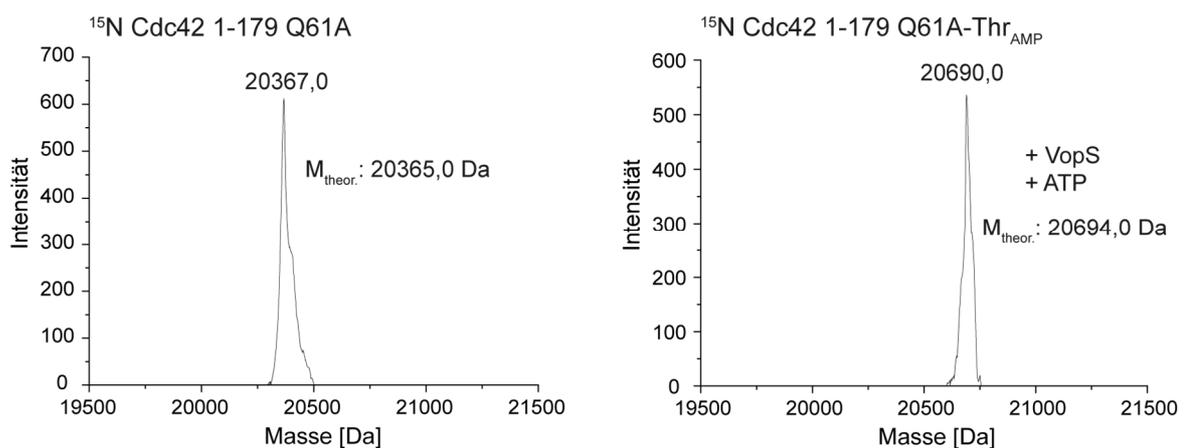


Abbildung 3-13: Massenspektren von unmodifiziertem (links) und modifiziertem (rechts) ^{15}N -Cdc42 1-179 Q61A. Für die Modifikation wurde Cdc42 mit einem 5-fachen Überschuss an ATP und 1:50 VopS versetzt und für 2 h bei 25 °C inkubiert. $M_{\text{theor.}}$: berechnete Masse.

Nachdem, wie in Abbildung 3-13 für ^{15}N Cdc42 1-179 Q61A zu sehen, die Adenylylierung abgeschlossen war, wurde die Probe über Gelfiltration gereinigt, um freies Nukleotid und Enzym

abzutrennen. Für alle verwendeten Proteine konnte eine vollständige Modifikation erreicht werden.

3.2.1.3 Charakterisierung von Enzymreaktionen

Um posttranslationale Modifikationen zeitlich reguliert an GTPasen anzubringen oder abzuspalten, müssen die kinetischen Parameter der Enzymreaktionen bekannt sein. Zur Charakterisierung dieser Eigenschaften wurden verschiedene Methoden eingesetzt. So wurde über die Messung der intrinsischen Tryptophanfluoreszenz für die Reaktion von Rab1 und DrrA ein k_{cat}/K_M von $9,0 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ermittelt (siehe Abbildung 3-14 a). Die Deadenylylierung von Rab1-AMP durch SidD wurde über einen Western-Blot sichtbar gemacht (Abbildung 3-14 b). Durch densitometrische Analyse der Banden konnten die Anteile von modifiziertem Rab1 im Verhältnis zu unmodifiziertem Rab1 ermittelt werden. Durch Anpassen der einzelnen Werte an eine exponentielle Funktion konnte ein k_{cat}/K_M von $6,8 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ kalkuliert werden. Die mit diesen Methoden ermittelten Enzymparameter sind verlässlich reproduzierbar.

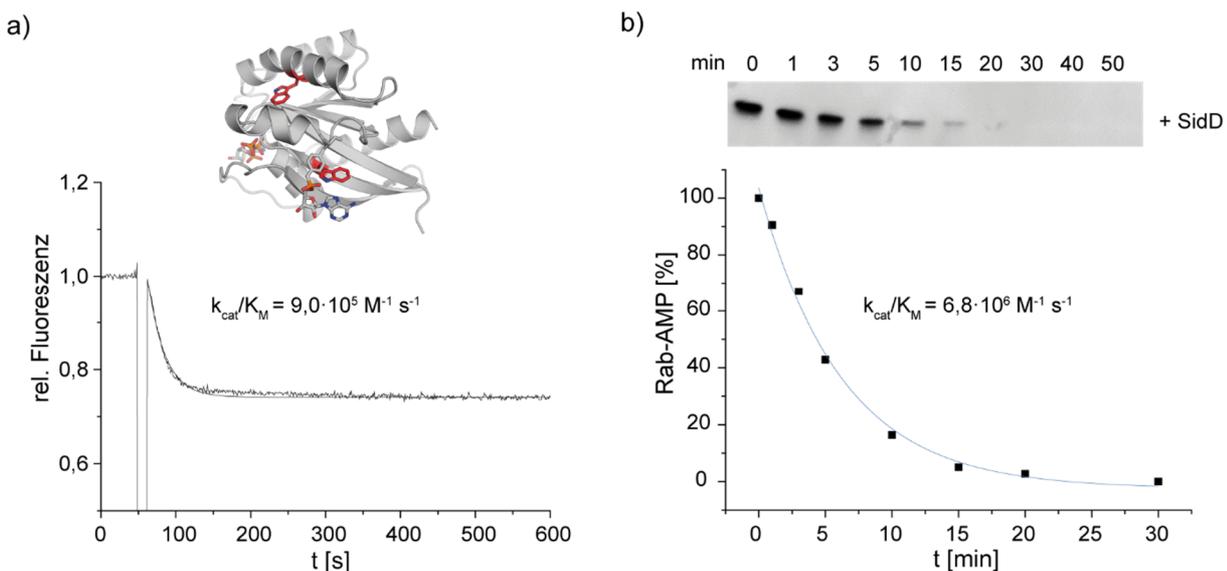


Abbildung 3-14: Bestimmung von Enzymparametern. a) Fluoreszenzspektrum der Adenylylierung von Rab1b Q67A durch DrrA. 1 μM Rab1b wurde durch 50 nM DrrA adenylyliert. Die Anregung der Tryptophanfluoreszenz erfolgte bei 297 nm, die Detektion bei 340 nm. In der Kristallstruktur sind die Tryptophane von Rab1 in rot markiert. b) Western Blot der Deadenylylierung von 5 μM AMP-Rab durch 0,4 nM SidD. Proben wurden zu definierten Zeitpunkten entnommen, denaturiert, über SDS-PAGE aufgetrennt und mit Hilfe des anti-Rab1-AMP-Antikörpers über einen Western-Blot analysiert. Verlaufskurven wurden mit einer exponentiellen Funktion angepasst.

Kleine GTPasen konnten in dieser Arbeit sowohl im unmarkierten als auch im isotopenmarkierten Zustand in großer Reinheit aus *E. coli* aufgereinigt werden. Durch Nutzung und Optimierung spezifischer Methoden konnten die Proteine in einen einheitlichen Nukleotidzustand versetzt werden, sowie vollständig posttranslational modifiziert werden. Enzymparameter für die Modifikation bzw. Demodifikation kleiner GTPasen, den Nukleotidaustausch bzw. die Nuk-

leotidhydrolyse konnten ermittelt werden. Diese Analysen bilden die Grundlage für die Untersuchung der Auswirkungen posttranslationaler Modifikationen auf intrinsische Eigenschaften der GTPasen, Wechselwirkungen mit Effektoren sowie strukturelle Konsequenzen.

3.2.2 Auswirkung von PTMs auf intrinsische Nukleotidhydrolyse- und Nukleotidaustauschraten

Die Adenylierung von Cdc42 erfolgt in der für die Nukleotidbindung essentiellen Switch I-Region. Tyr32 interagiert mit dem γ -Phosphat von GTP und Thr35 ist für die Koordination eines essentiellen Magnesiumions zuständig. Daher ist es von großem Interesse, die Auswirkungen der Adenylierung auf intrinsische Eigenschaften der kleinen GTPase zu untersuchen.

Intrinsische Hydrolyseraten von modifiziertem und unmodifiziertem Cdc42 wurden über HPLC bestimmt. Dazu wurden die Nukleotidzustände zu den angegebenen Zeitpunkten auf einer C18 Säule analysiert. In Abbildung 3-15 sind die mit Hilfe einer exponentiellen Funktion angepassten Kurven abgebildet. Die von kleinen GTPasen katalysierte Nukleotidhydrolyse ist generell sehr langsam und zeigt für das Wildtyp Cdc42 Protein eine Umsatzrate von $3,3 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$.

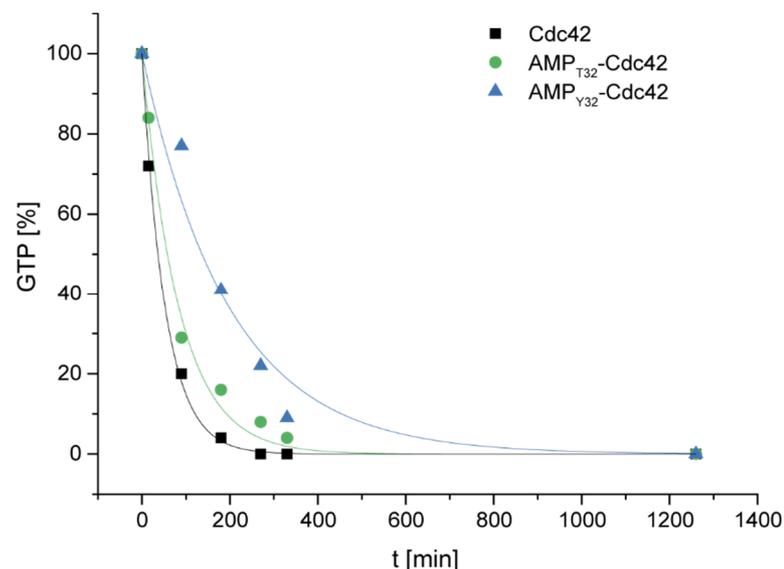


Abbildung 3-15: Intrinsische GTP-Hydrolyse von modifiziertem und unmodifiziertem Cdc42. Die Kurven zeigen die Abnahme der GTP Beladung über die Zeit. Nukleotidbindungszustände wurden zu den angegebenen Zeitpunkten auf einer C18 Säule über Umkehrphasen-HPLC analysiert. Intrinsische Hydrolyseraten wurden durch Anpassung mit einer exponentiellen Funktion bestimmt.

Für Cdc42-Thr-AMP und Cdc42-Tyr-AMP wurden Hydrolyseraten von $2,0 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ bzw. $8,3 \cdot 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ ermittelt. Diese sind also im Vergleich zum Wildtyp Protein um ca. 40 % (Thr-AMP) bzw. 75 % (Tyr-AMP) reduziert. Die Adenylierung scheint also den aktiven Zustand der GTPase zu verlängern. Da die GTP Hydrolyse allerdings auf einer so langsamen Zeitskala stattfindet und generell GAPs nötig sind, um das Protein effizient in den inaktiven Zustand zu überführen, kann man davon ausgehen, dass diese Effekte physiologisch nicht relevant sind.

Intrinsische Nukleotidaustauschraten lassen näherungsweise Aussagen zur Affinität der GTPase zum Nukleotid zu. Nach präparativer Beladung von Cdc42 mit mant-Nukleotid wurde der Austausch zu GDP/GTP im Fluoreszenzspektrometer zeitaufgelöst verfolgt. Durch Zugabe eines Überschusses an GDP wurde die Freisetzung von mantGDP eingeleitet. Die Abnahme der mant-Fluoreszenz kann bei 440 nm detektiert werden. Der Endpunkt der Reaktion wurde durch die vollständige Freisetzung von mantGDP durch die Zugabe von EDTA erreicht.

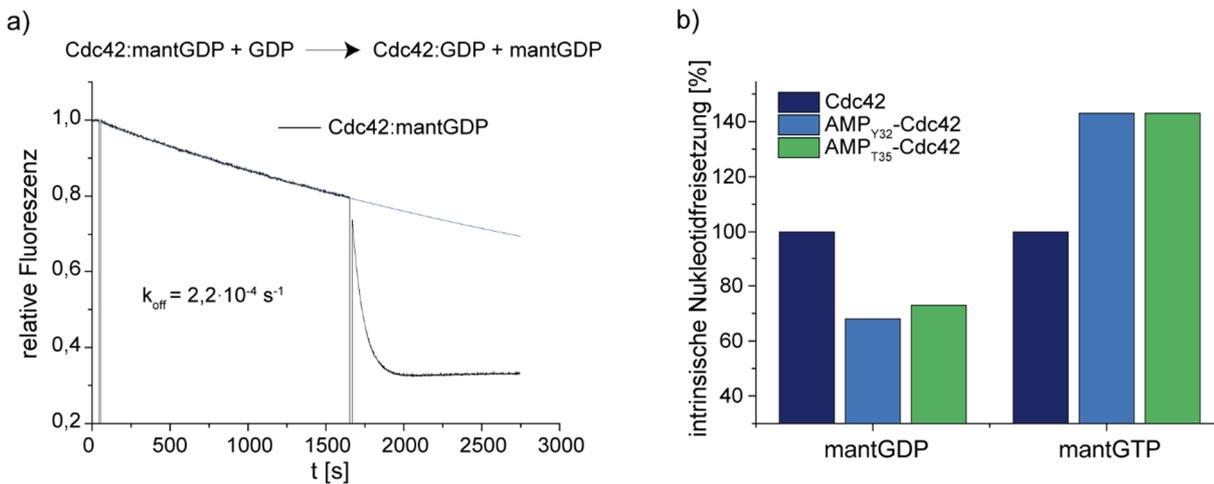


Abbildung 3-16: Auswirkung von posttranslationalen Modifikationen auf die intrinsische Nukleotidaustauschrate von Cdc42. a) Die Nukleotidaustauschrate wurde durch die Freisetzung von mantGDP aus dem Cdc42:mantGDP Komplex nach Zugabe eines Überschusses an GDP ermittelt. Der Endpunkt der Freisetzung wurde durch Zugabe von 10 mM EDTA erreicht. Die Anregung erfolgte bei 365 nm, die Detektion der mant-Fluoreszenz bei 440 nm. b) Vergleich der prozentualen Nukleotidfreisetzung von modifiziertem/unmodifiziertem Cdc42.

Mittels Anpassung an eine exponentielle Funktion konnten Raten für die Nukleotidfreisetzung bestimmt werden. Abbildung 3-16 a) zeigt den Verlauf einer solchen Freisetzungskinetik. Alle bestimmten Raten liegen zwischen $9,1 \cdot 10^{-5}$ und $2,2 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ (siehe Tabelle 3-3). Die Adenylierung an beiden Modifikationsstellen führt zu einer Veränderung der Nukleotidfreisetzungsrates. Aus Abbildung 3-16 b) wird ersichtlich, dass die Freisetzung von mantGDP in beiden Fällen um ca. 35 % verlangsamt wird, wohingegen die Freisetzung von mantGTP für die modifizierten Proteine um ca. 45 % schneller erfolgt.

Tabelle 3-3: Intrinsische Nukleotidaustauschraten von Cdc42.

Modifikation	$k_{\text{obs}} [\text{s}^{-1}]$	
	mantGDP	mantGTP
-	$2,2 \cdot 10^{-4} \pm 1,7 \cdot 10^{-5}$	$9,1 \cdot 10^{-5} \pm 5,3 \cdot 10^{-6}$
Tyr-AMP	$1,5 \cdot 10^{-4} \pm 7,4 \cdot 10^{-6}$	$1,3 \cdot 10^{-4} \pm 3,0 \cdot 10^{-7}$
Thr-AMP	$1,6 \cdot 10^{-4} \pm 1,6 \cdot 10^{-5}$	$1,3 \cdot 10^{-4} \pm 7,4 \cdot 10^{-6}$

Letzteres könnte eine Folge der Adenylylierung an den für die γ -Phosphatbindung bzw. Magnesiumkoordination wichtigen Resten Tyr32 und Thr35 sein. Die Modifikation könnte die Interaktionen mit dem Nukleotid schwächen. Da aber auch diese Effekte auf einer physiologisch relevanten Zeitskala sehr langsam sind, ist es fraglich, ob diese in zellulärem Kontext signifikant sind.

3.2.3 Auswirkung von PTMs auf die Interaktion mit Enzymen

Da posttranslationale Modifikationen die intrinsische Nukleotidhydrolyse und Nukleotidbindung von Cdc42 verändert, diese aber auf einer sehr langsamen Zeitskala ablaufen, ist es von großem Interesse, ob auch die Interaktion mit GEFs oder GAPs durch die Modifikation beeinflusst wird. Deshalb sollte im Folgenden untersucht werden, ob die Adenylylierung von Cdc42 die Aktivität des GEFs Dock9 beeinflusst. Dazu wurde die Aktivität von Dock9 für adenyliertes und unadenyliertes Cdc42 analysiert. Zu diesem Zweck wurde Cdc42 präparativ mit mantGDP beladen, welches durch Dock9 Aktivität zu GTP ausgetauscht wird. Die Freisetzung von mantGDP führt zur Abnahme der Fluoreszenz bei 440 nm.

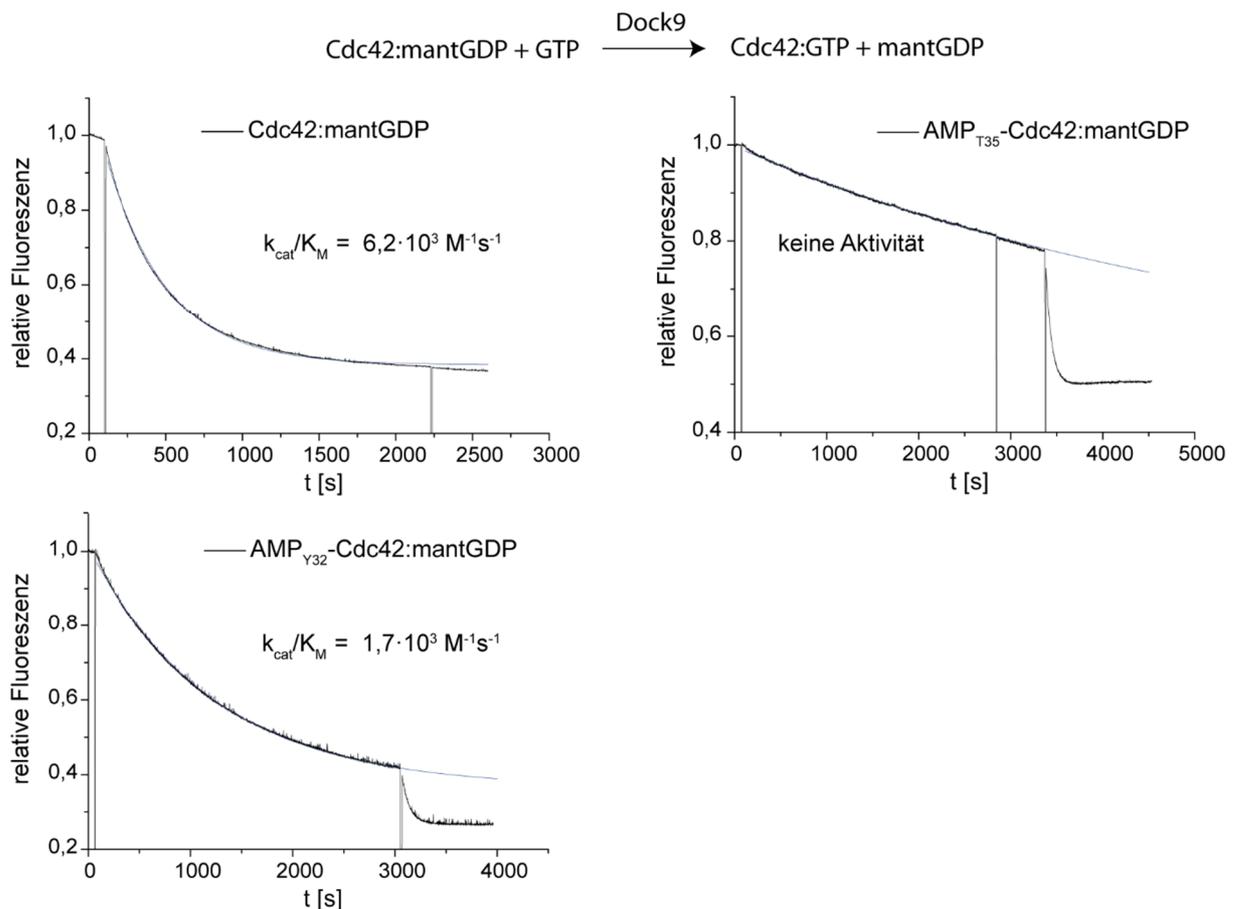


Abbildung 3-17: Dock9 katalysierter Nukleotidaustausch an modifiziertem/unmodifiziertem Cdc42. Die Reaktion wurde durch die Abnahme der Fluoreszenz bei Freisetzung von mantGDP verfolgt. Endpunkte der Freisetzung wurden durch Zugabe von 10 mM EDTA erhalten. Die Anregung erfolgte bei 365 nm, die Detektion der mant-Fluoreszenz bei 440 nm.

In Abbildung 3-17 ist der im Fluoreszenzspektrometer zeitabhängig verfolgte Austausch abgebildet. Für die Austauschreaktion am Wildtyp Cdc42 konnte hierbei ein k_{cat}/K_M von $6,2 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ bestimmt werden. Bei der Berechnung wurde die Ratenkonstante des intrinsischen Austausches subtrahiert. Für am Tyr32 modifiziertes Cdc42 zeigte sich ein erniedrigter k_{cat}/K_M von $1,7 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Dies entspricht etwa 30 % der Dock9 Aktivität für das unmodifizierte Cdc42. Der Nukleotidaustausch durch Dock9 scheint durch die Adenylylierung am Thr35 von Cdc42 komplett inhibiert zu werden. Nach Abzug der intrinsischen Austauschrate ist hier keine Austauschaktivität vorhanden. Dies könnte auf eine unterschiedliche Orientierung der Adenosin-Base in beiden Adenylylierungszuständen hinweisen, die im Falle von $\text{AMP}_{\text{T35}}\text{-Cdc42}$ zu einer sterischen Hinderung führt. Die Adenylylierung durch VopS scheint also im Falle einer *Vibrio parahaemolyticus* Infektion die Aktivierung von Cdc42 durch Dock9 zu verhindern.

3.2.4 Auswirkung von PTMs auf die thermische Stabilität

Durch die Modifikation der kleinen GTPasen wird eine zusätzliche Gruppe in das Protein eingebracht, die neue intramolekulare Interaktionen eingehen könnte. Aus diesem Grund sollten die Auswirkungen von Modifikationen und Nukleotidzustand auf die thermische Stabilität kleiner GTPasen zu untersucht werden.

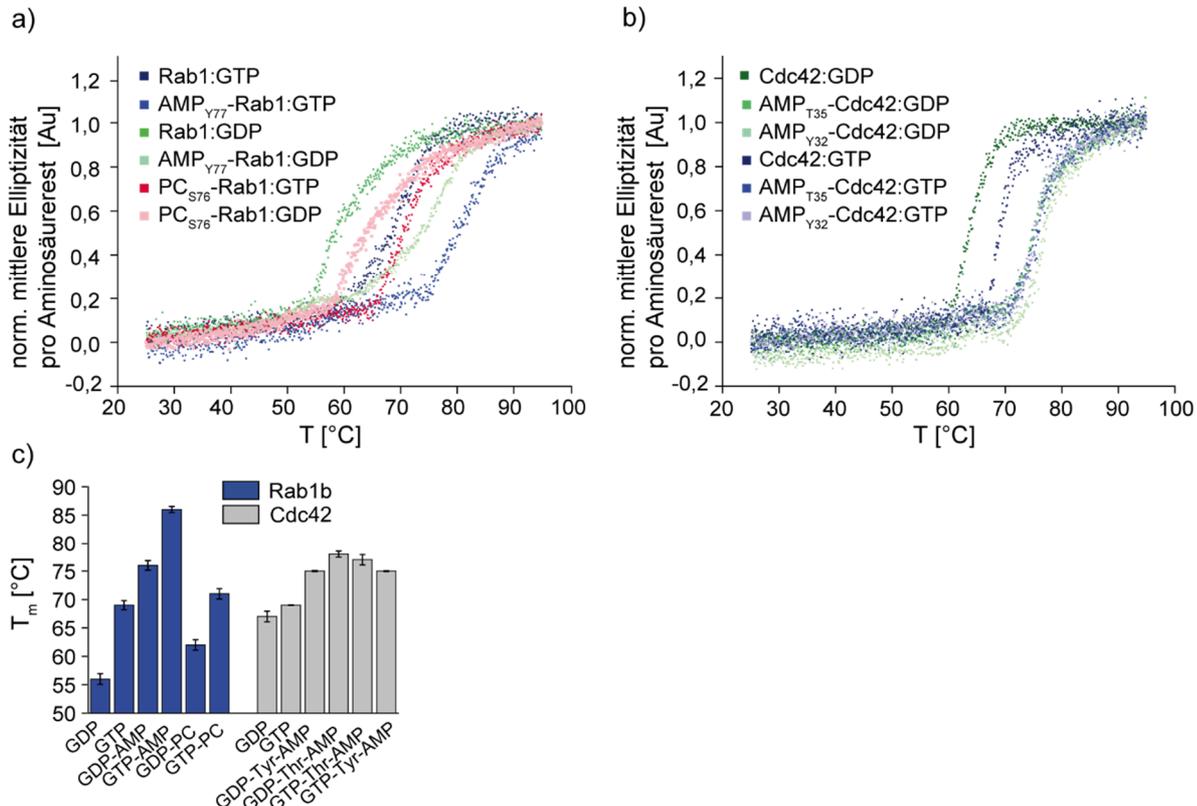


Abbildung 3-18: Thermische Denaturierung kleiner GTPasen abhängig von Nukleotidzustand und Modifikation. a)+b) Überlagerte CD Spektren der thermischen Denaturierung von Rab1 (a) bzw. Cdc42 (b). Der CD bei 222 nm wurde aufgezeichnet und in die normalisierte mittlere Elliptizität pro Aminosäurerest umgerechnet. c) Vergleich der ermittelten Schmelzpunkte. Fehlerbalken geben die Standardabweichung aus zwei unabhängigen Messungen an.

Hierzu wurden CD (engl. circular dichroism, Zirkulardichroismus) -spektrometrische Analysen durchgeführt. Die Schmelzpunkte der Proteine wurden durch Messen der Elliptizität während der temperaturabhängigen Denaturierung ermittelt. In Abbildung 3-18 a) und b) sind die Verläufe der normalisierten mittleren Elliptizität pro Aminosäurerest abhängig von der Temperatur dargestellt. Vor allem bei Rab1 wird die thermische Stabilität durch den Austausch von GDP zu GTP erheblich erhöht. So wird aus Abbildung 3-18 c) und Tabelle 3-4 ersichtlich, dass Rab1:GDP schon bei 56 °C denaturiert, wohingegen der Schmelzpunkt von Rab1:GTP bei 69 °C liegt. Auch die Adenylylierung von Rab1 und Cdc42 erhöht die thermische Stabilität signifikant. Die größte Differenz der Schmelzpunkte ist mit $\Delta T_m = 20$ °C zwischen Rab1:GDP und AMP-Rab1:GDP ($T_m = 76$ °C) zu beobachten. Für Cdc42 fällt der Effekt der Stabilisierung durch die Modifikation geringer aus. So beträgt die Differenz der Schmelzpunkte zwischen Cdc42:GDP und AMP_{Y32}-Cdc42:GDP nur 11 °C. Auch der Nukleotidzustand scheint bei Cdc42 deutlich weniger Einfluss auf die thermische Stabilität zu haben als bei Rab1. Unterschiede zwischen GDP- und GTP-Form des Proteins sind hier nicht in signifikanter Höhe zu beobachten. Die Phosphocholinierung von Rab1 führt zu einer geringen Erhöhung des Schmelzpunktes von 6 bzw. 2 °C (GDP bzw. GTP).

Tabelle 3-4: Schmelzpunkte kleiner GTPasen bestimmt über CD Spektroskopie.

Protein	Schmelzpunkt [°C]
Rab1:GDP	56 ± 0,9
Rab1:GTP	69 ± 0,8
AMP-Rab1:GDP	76 ± 0,9
AMP-Rab1:GTP	86 ± 0,5
PC-Rab1:GDP	62 ± 0,9
PC-Rab1:GTP	71 ± 0,9
Cdc42:GDP	67 ± 0,9
Cdc42:GTP	69 ± 0,1
AMP _{T35} -Cdc42:GDP	75 ± 0,1
AMP _{T35} -Cdc42:GTP	77 ± 0,9
AMP _{Y32} -Cdc42:GDP	78 ± 0,5
AMP _{Y32} -Cdc42:GTP	75 ± 0,1

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die posttranslationale Modifikation kleiner GTPasen die thermische Stabilität deutlich erhöht. Besonders ausgeprägt ist dieser Effekt bei der Adenylylierung von Rab1. Dies impliziert, dass die Modifikation zu einer veränderten globalen Stabilisierung von Strukturelementen führt.

3.3 Auswirkung von PTMs auf die Konformation kleiner GTPasen

Die thermische Stabilisierung kleiner GTPasen durch posttranslationale Modifikationen (Kapitel 3.2) deutet darauf hin, dass die Modifikation die Proteinkonformation beeinflusst. Um diese Hypothese zu untersuchen, wurde Kernspinresonanz-Spektroskopie (nuclear magnetic resonance spectroscopy, NMR) eingesetzt. In Kooperation mit Dr. Katja Barthelmes und Prof. Dr. Michael Sattler (Lehrstuhl für biomolekulare NMR Spektroskopie, TUM) wurden heteronukleare NMR-Spektren unmodifizierter bzw. präparativ modifizierter GTPasen in GDP- und GTP-Zuständen aufgenommen, durch Überlagerung verglichen und Unterschiede in den chemischen Verschiebungen (chemical shift perturbations, CSPs) quantifiziert. Für die Experimente wurde in allen Fällen mit den hydrolysedefizienten Rab1b Q67A bzw. Cdc42 Q61A Mutanten gearbeitet, um den Verbleib in einem Nukleotidzustand zu garantieren. Die Zuordnung von Signalen zu Aminosäureresten erfolgte mit dreifach markierten Proteinen.

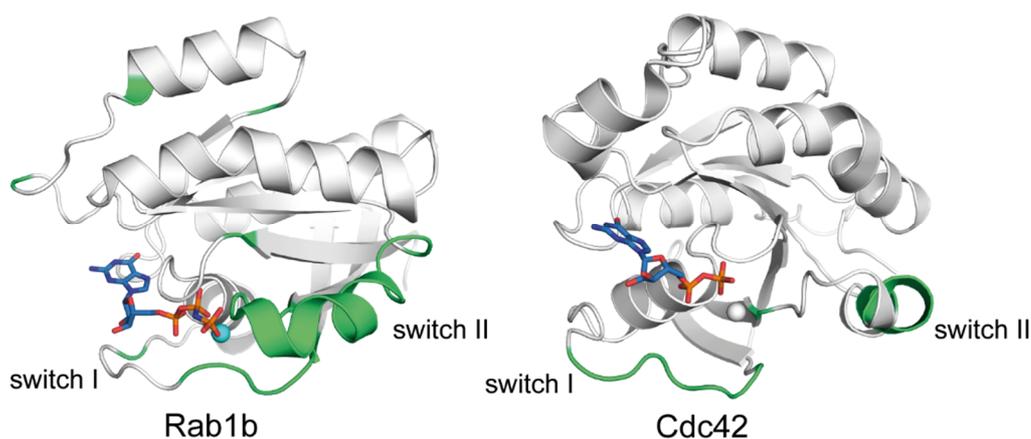


Abbildung 3-19: Zuordnung von Aminosäureresten. Nicht zugeordnete Aminosäurereste in Rab1 und Cdc42 sind in den Kristallstrukturen in grün markiert.

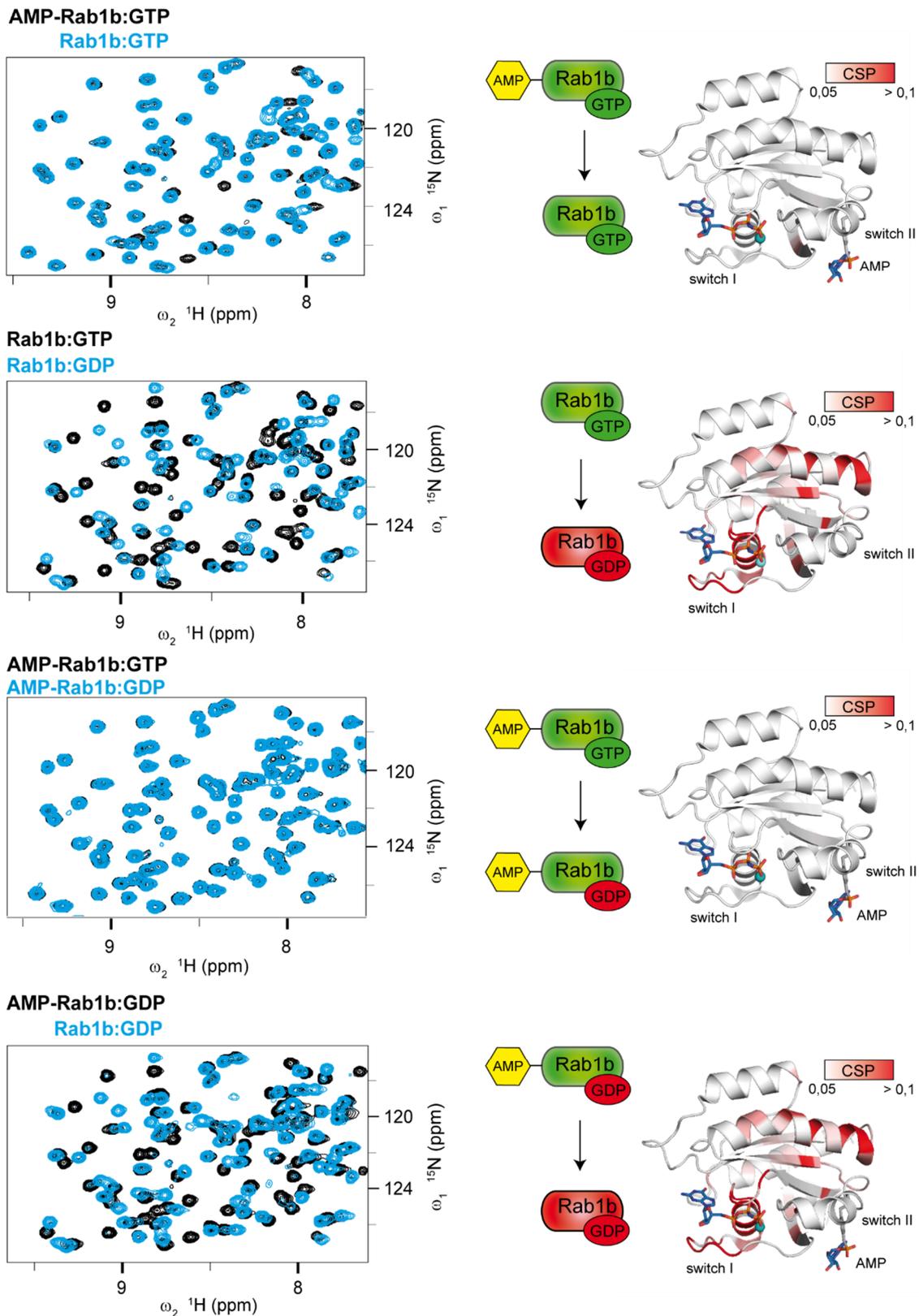
Einige Aminosäurereste von Switch II und Switch I konnten aufgrund der Linienverbreiterung der Signale nicht zugeordnet werden und fehlen in der CSP Analyse (siehe Abbildung 3-19). Dies ist eine Auswirkung der Dynamik der Switch-Regionen.

3.3.1 Adenylierung zwingt Rab1 in die aktive Konformation

Die thermische Stabilität von Rab1 wurde, wie in Kapitel 3.2.4 gezeigt, durch die Adenylierung signifikant erhöht. Dies könnte das Resultat einer konformationellen Veränderung sein. In diesem Kapitel sollte deshalb der Einfluss der Adenylierung von Rab1 auf die Struktur der GTPase analysiert werden. Dazu wurde Rab1 präparativ modifiziert, in unterschiedliche Nukleotidzustände versetzt und über NMR-Spektroskopie untersucht. Die Überlagerung der $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektren von Rab1:GTP und AMP-Rab1:GTP in Abbildung 3-20 in Kombination mit

den auf die Kristallstruktur geplotteten CSPs zeigt, dass es zwischen beiden Proteinen nur geringe Veränderungen gibt, die in der die Modifikation umgebenden Region auftreten. Die Modifikation scheint im GTP-gebundenen Zustand also zu keiner größeren konformationellen Änderung zu führen. Sowohl die adenylierte als auch die unadenylierte GTP-gebundene Form von Rab1b scheinen sich im aktiven Zustand zu befinden. Im Gegensatz hierzu sind im Vergleichsspektrum von Rab1:GDP zu Rab1:GTP deutliche Veränderungen zu erkennen. Auf die Struktur geplottet ergeben sich vor allem konformationelle Veränderungen im Bereich der Helices $\alpha 1$ und $\alpha 3$, dem zentralen β -Faltblatt sowie der Switch I- und Switch II-Regionen und deren Umgebungen. Dies ist ein zu erwartendes Ergebnis, da die Konformationen der Switch-Regionen sich im GDP- und GTP-Zustand unterscheiden. Dieses Schalten vom aktiven in den inaktiven Zustand kann als Referenz für den Übergang zwischen zwei konformationellen Zuständen betrachtet werden. Bei vergleichender Betrachtung der Spektren von AMP-Rab1:GTP und AMP-Rab1:GDP fällt auf, dass fast alle Signale identisch sind. Dies legt die Vermutung nahe, dass die Adenylierung verhindert, dass der GDP-gebundene Zustand in die inaktive Konformation wechselt und AMP-Rab1:GDP somit in die aktive Konformation gezwungen wird. Eine Bestätigung dieser Hypothese liefert auch der Vergleich der Spektren AMP-Rab1:GDP und Rab1:GDP. Hier ist, fast identisch mit dem Vergleich von Rab1:GDP zu Rab1:GTP, das Wechseln vom aktiven in den inaktiven Zustand deutlich zu erkennen. Von den Plots der CSPs auf die Kristallstruktur sind wieder hohe Werte in den Umgebungen der Switch-Regionen und Helices $\alpha 1$ und $\alpha 3$ abzulesen. Die Abspaltung des AMP Restes im GDP-Zustand führt also zur Inaktivierung der GTPase.

Die Adenylierung von Rab1 führt somit zur Stabilisierung im aktiven Zustand und liefert damit eine neue, zusätzliche Regulationsebene des Aktivitätszustandes kleiner GTPasen.



3.3.2 Die Stacking Interaktion mit F45 ist nicht für die Stabilisierung von Rab1 verantwortlich

Über die molekulare Grundlage der Stabilisierung von Rab1 durch Adenylylierung gibt es momentan keine gesicherten Erkenntnisse. In dieser Arbeit wurde eine Hypothese untersucht, nach der die *Stacking*-Interaktion zwischen dem Phenylalanin 45 von Rab1 und dem Adenosin-Ring von AMP zur aktiven Konformation führt, da diese intramolekulare Interaktion in Kristallstrukturanalysen beobachtet worden ist. Um diese Vermutung zu überprüfen, wurden NMR-Messungen mit einer Rab1 Mutante durchgeführt, bei der das Phenylalanin 45 zu Alanin mutiert wurde. Bei Überlagerung der $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektren von AMP-Rab1b F45A:GTP und AMP-Rab1bF45A:GDP in Abbildung 3-21 wird deutlich, dass auch hier beide Spektren identisch sind. Bei Abspaltung des AMPs im GDP-Zustand verschieben sich wiederum viele Signale, was für einen Wechsel des Aktivitätszustandes spricht.

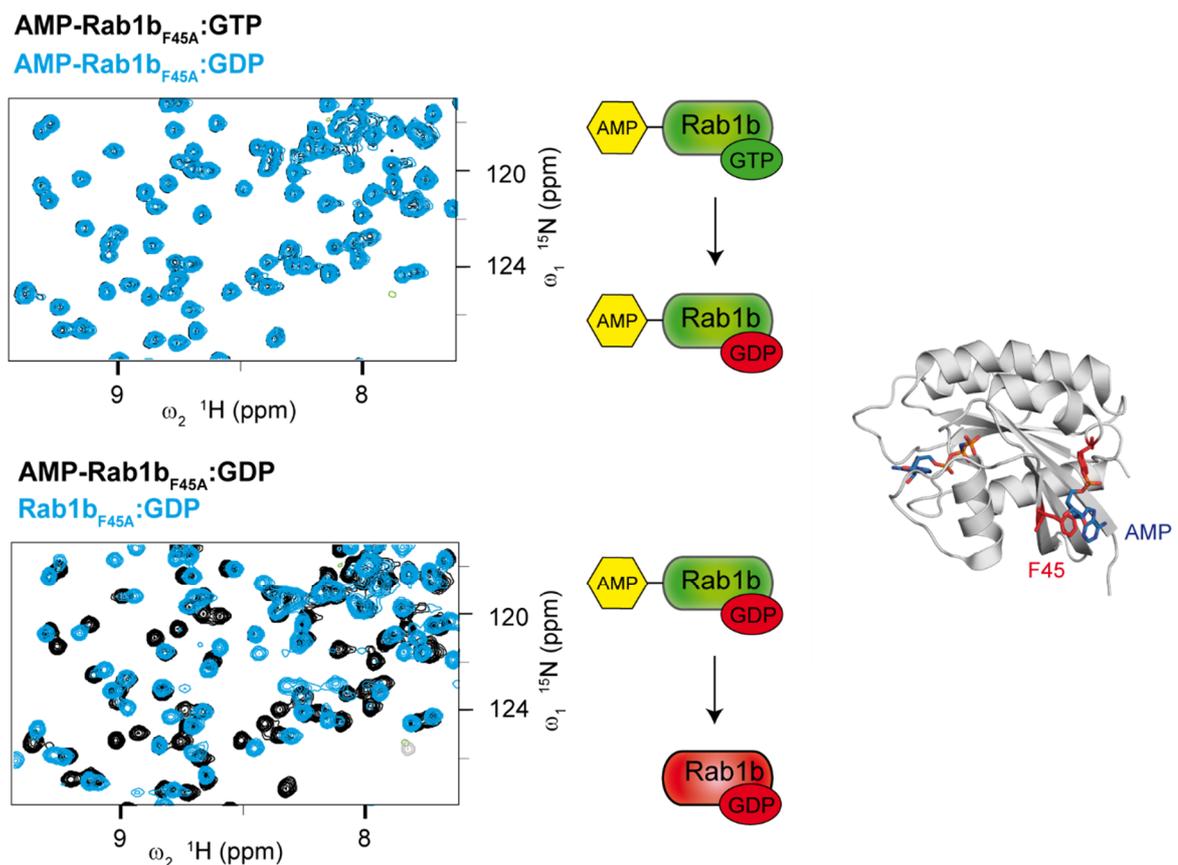


Abbildung 3-21: Konformationelle Effekte der Adenylylierung auf Rab1b F45A charakterisiert durch NMR-Spektroskopie. Überlagerungen der $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektren von modifiziertem/ unmodifiziertem Rab1b F45A GDP/GTP. Die Stacking Interaktion wurde in der Kristallstruktur von Rab1b-AMP dargestellt (rechts).

Es ergeben sich also für die Mutante keine Unterschiede zum Wildtyp Rab1b Protein in Abbildung 3-20. Dies zeigt, dass auch wenn keine Stacking Interaktion zwischen F45 und Adenosin

vorhanden ist, AMP-Rab1:GDP in die aktive Konformation gezwungen wird. Die *Stacking*-Interaktion ist also nicht die Grundlage für den beobachteten Stabilisierungseffekt.

3.3.3 Mutation von Tyrosin 77 zu Glutamat hat globale Auswirkungen auf die Rab1 Struktur

Auch die negative Ladung, die mit der Adenylylierung an Position 77 eingebracht wird, könnte zu einer Stabilisierung der Konformation führen. Eine Phosphorylierung an dieser Stelle könnte Auskunft über solch einen Effekt geben. Mit den uns verfügbaren Methoden war es allerdings nicht möglich, Rab1 an Tyr77 zu phosphorylieren bzw. artifiziell eine Phosphatgruppe einzubringen. Alternativ wurde daher in Rab1 eine Mutation von Tyr77 zu Glutamat eingeführt und das mutierte Protein über NMR-Spektroskopie untersucht. Der Aminosäureaustausch liefert ebenfalls eine negative Ladung an Position 77. Allerdings müssen auch die Auswirkungen des Aminosäureaustausches auf die Proteinkonformation berücksichtigt und analysiert werden.

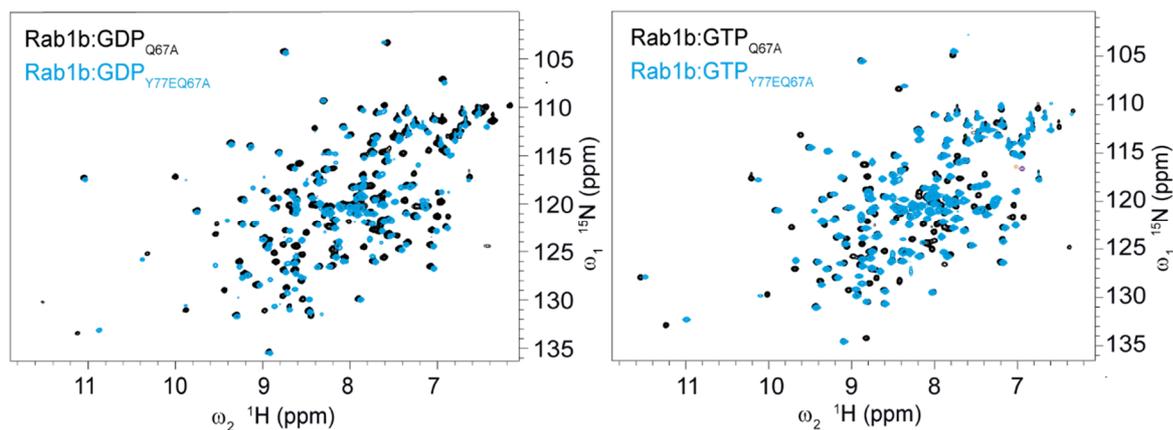


Abbildung 3-22: Die Mutation von Tyr77 zu Glutamat hat große Auswirkungen auf die Proteinstruktur von Rab1. ^1H - ^{15}N -HSQC NMR-Spektren von Rab1b Y77E GDP und GTP wurden mit Spektren von Rab1 GDP/GTP überlagert.

In Abbildung 3-22 sind in beiden Vergleichsspektren zwischen Rab1 und Rab1 Y77E chemische Verschiebungen zwischen den Peaks zu erkennen.

Gerade die großen Änderungen in den GTP-Spektren lassen darauf schließen, dass die Einführung der Mutation die Proteinkonformation signifikant verändert. Eine Analyse der Auswirkung der negativen Ladung ist somit nicht möglich, da die Effekte nicht voneinander unterscheidbar sind. Da der Aminosäureaustausch an der Position 77 einen so großen Einfluss auf die Konformation zu haben scheint, ist es von essentiellm Interesse, ob dieses veränderte Protein noch mit Effektorproteinen binden kann. Dies wird in folgendem Kapitel genauer untersucht.

3.3.3.1 Die Effektorbindung wird durch die Mutation von Y77 zu Glutamat nicht beeinträchtigt

Die Mutation von Y77 zu Glutamat führt zu signifikanten Veränderungen der Proteinkonformation. Deshalb ist es von großem Interesse, ob dieses mutierte Protein noch mit Effektorproteinen wechselwirken kann. Die Interaktion zwischen Rab Protein und Interaktionspartner wurde über analytische Gelfiltration getestet. Die Komplexbildung wurde sowohl mit dem Legionellen-GEF DrrA, als auch mit dem Legionelleneffektor LidA analysiert. Hierzu wurden 150 µg DrrA in Gegenwart von 10 mM EDTA für 2 h mit 100 µg Rab1 bzw. 200 µg LidA mit 75 µg Rab1 inkubiert und anschließend über eine Superdex 75 10/300 GL Säule (GE) an einer HPLC aufgetrennt.

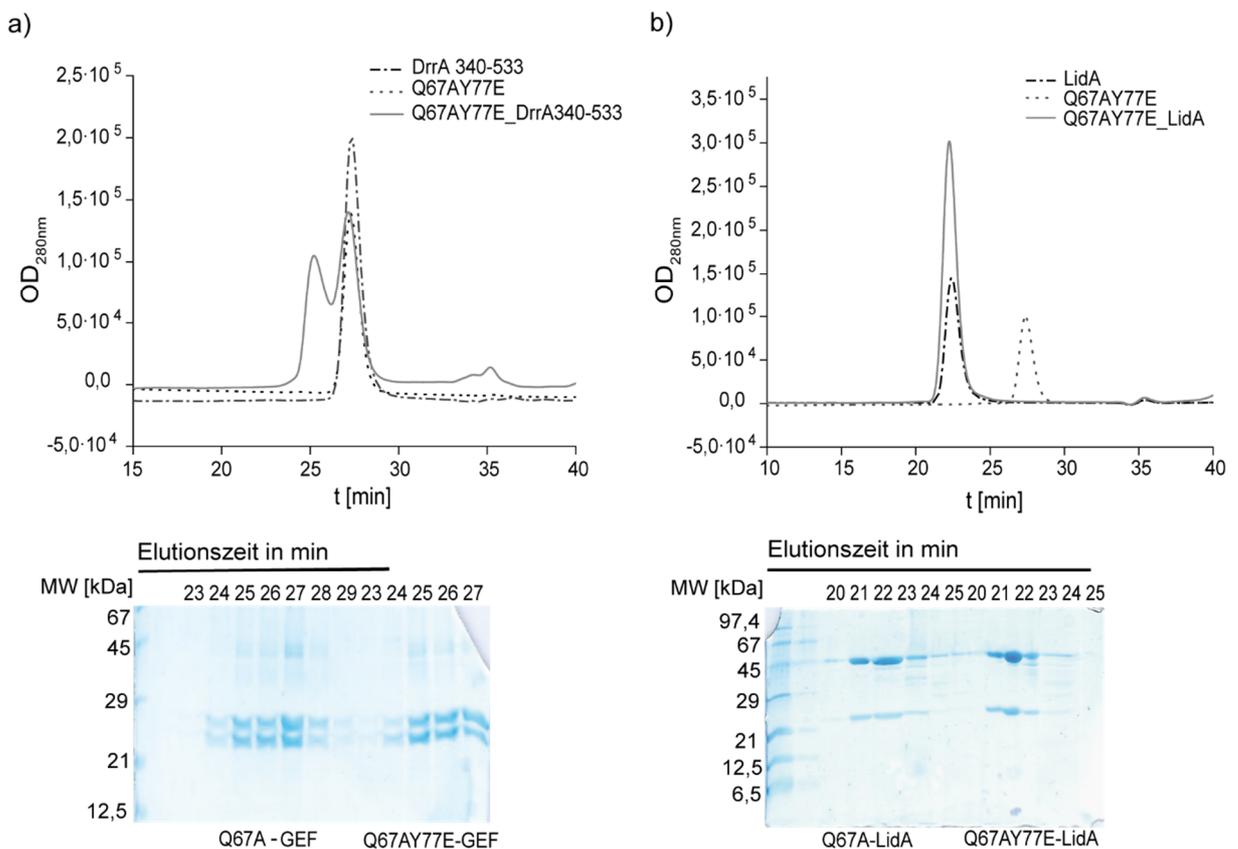


Abbildung 3-23: Komplexbildung von Rab1b Q67A Y77E mit DrrA 340-533 bzw. LidA. a) Interaktion von Rab1Q67A bzw. Q67AY77E mit DrrA GEF. b) Interaktion von Rab1Q67A bzw. Q67AY77E mit LidA. Gelfiltrationsläufe wurden auf einer Superdex 75 10/300 GL Säule mit einer Flussrate von 0,5 ml/min ausgeführt. Proteine in den Fraktionen wurden über SDS-PAGE mit Hilfe von kolloidaler Coomassiefärbung visualisiert.

Die Gelfiltrationsläufe zeigen, dass die Rab1b Tyr77 zu Glutamat Mutante ebenso wie Rab1b Komplexe mit DrrA-GEF (a) und LidA (b) bilden kann. Im Elutionsprofil der Komplexmischung (grau) in Abbildung 3-23 a) ist ein Peak bei einer Elutionszeit von ca. 25 Minuten zu sehen, dieser entspricht dem Komplex zwischen Rab1 und DrrA. Freies Rab1b und DrrA eluiert aufgrund des fast identischen Molekulargewichts gleichzeitig bei ca. 28 Minuten von der Säule.

Im zugehörigen SDS Gel sind die Banden für DrrA und Rab1 in den Fraktionen 24 bis 29 zu erkennen. Im Elutionsprofil der Komplexbildung (grau) von Rab1bQ67A bzw. Rab1bQ67AY77E mit LidA (b) liegt das Peakmaximum bei einer Elutionszeit von ca. 22 Minuten. In den Fraktionen von 20-24 Minuten sind die Proteine LidA bei ca. 45 kDa und Rab1b bei ca. 20 kDa im Gelbild zu erkennen. Freies LidA eluiert nur leicht zu höheren Elutionszeiten verschoben von der Säule (- - -), wohingegen Rab1b im Vergleichslauf bei ca. 28 Minuten von der Säule eluiert (· · ·). Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Mutation von Tyr77 zu Glutamat die Bindung von Rab1b an DrrA-GEF und LidA nicht beeinflusst.

3.3.4 Die Phosphocholinierung hat keinen Einfluss auf den Rab1 Aktivitätszustand

In Kapitel 3.3.1 wurde gezeigt, dass die Adenylylierung Rab1 in der aktiven Konformation stabilisiert. Deshalb ist es von Interesse, ob auch eine Phosphocholingruppe in der Switch II-Region zu einer Stabilisierung der GDP-gebundenen Rab1 Form führt. Die Phosphocholinierung erfolgt am dem Tyr77 benachbarten Aminosäurerest Ser76. Zur Analyse dieser Fragestellung wurde Rab1 präparativ phosphocholinieren und in unterschiedliche Nukleotidzustände versetzt. NMR-Experimente zeigen, dass die PCylierung von Rab1:GTP, wie auch schon für die Adenylylierung beobachtet, zur Verschiebung einzelner Signale (Abbildung 3-24) führt. Konformationelle Änderungen scheinen nicht die Folge der Modifikation zu sein. Beim Übergang von PC-Rab1:GTP zu PC-Rab1:GDP ist die Anzahl und Art der Verschiebung von Signalen ähnlich wie beim Übergang von Rab1:GTP zu Rab1:GDP. Es sind vor allem große Unterschiede der Signale in Helices $\alpha 1$ und $\alpha 3$, dem zentralen β -Faltblatt und der Switch I- und Switch II-Regionen zu beobachten. Es scheint also ebenso wie beim unmodifizierten Protein ein Schalten vom aktiven in den inaktiven Zustand stattzufinden. Bei Überlagerung der Spektren PC-Rab1:GDP mit Rab1:GDP sind nur sehr kleine Signalverschiebungen zu sehen. Dies erklärt sich daraus, dass sich beide Proteinzustände in der inaktiven Konformation befinden. Die Phosphocholinierung von Rab1 führt also zu keiner Veränderung des Aktivitätszustandes der kleinen GTPase. Der Übergang zwischen konformationellen Zuständen geht ebenso wie im unmodifizierten Protein vonstatten.

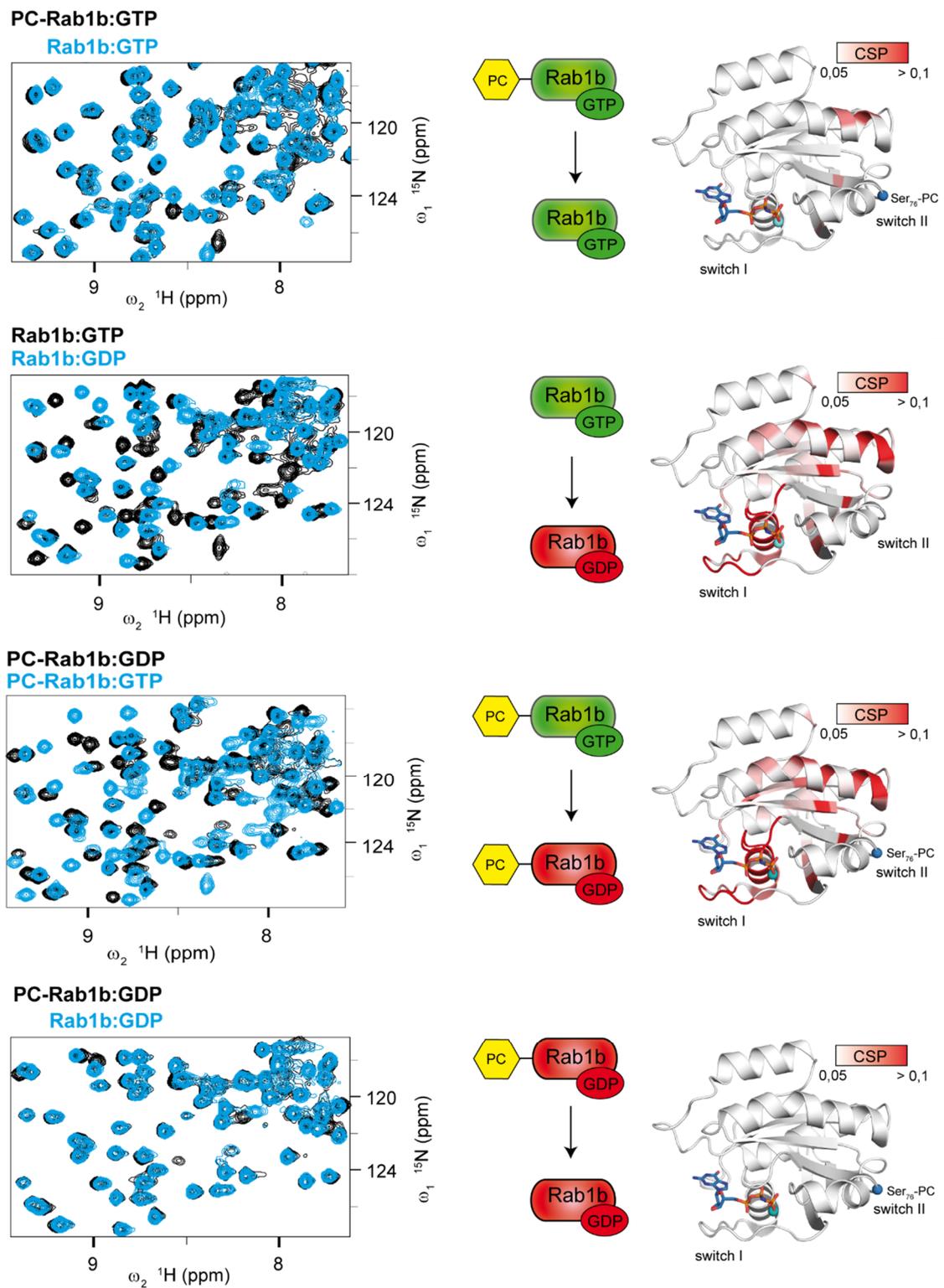


Abbildung 3-24: Konformationelle Effekte der Phosphocholinierung auf Rab1 charakterisiert durch NMR-Spektroskopie. Überlagerungen der $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektren von unmodifiziertem/ modifiziertem und GDP/GTP gebundenem Rab1. CSPs wurden auf die Kristallstruktur von Rab1-AMP (PDB:3nkv) geplottet. In der mittleren Spalte sind die Aktivitätszustände der GTPasen dargestellt (grün: aktiv; rot: inaktiv).

3.3.5 Adenylylierung von Cdc42 an Tyrosin 32 und Threonin 35 führt zu einer intermediären Konformation

Die Adenylylierung von Cdc42 durch VopS und IbpA findet im Unterschied zu Rab1b in der Switch I-Region statt. Die modifizierten Aminosäurereste Tyr32 und Thr35 sind in die Bindung mit dem Nukleotid involviert. So interagiert Tyr32 mit dem γ -Phosphat von GTP und Thr35 ist für die Koordination eines essentiellen Magnesiumions zuständig. Es ist deshalb von großem Interesse, auch den Einfluss der Adenylylierung von Cdc42 auf die Konformation der kleinen GTPase zu analysieren. Hierzu wurde Cdc42 durch VopS oder IbpA präparativ modifiziert, in unterschiedliche Nukleotidzustände versetzt und über NMR-Spektroskopie analysiert. Der Vergleich der Spektren von Cdc42:GTP mit AMP-Cdc42:GTP in Abbildung 3-25 zeigt einige deutliche Verschiebungen von Signalen. Das Ausmaß der Veränderungen erscheint ungefähr gleich mit dem Vergleich der Spektren beim Wechsel von Cdc42:GTP zu Cdc42:GDP. Es sind vor allem Verschiebungen der Resonanzen in Helix α_1 , α_3 , nahe der Nukleotidbindungsregion und in Switch II zu beobachten.

Der Unterschied zwischen den Spektren von adenylyliertem GDP- bzw. GTP-gebundenen Cdc42 ist ebenfalls deutlich. Adenylyliertes Cdc42 unterscheidet sich also konformationell sowohl im GDP- als auch im GTP-Zustand von unmodifiziertem Cdc42. Beim Übergang von AMP-Cdc42:GDP zu Cdc42:GDP zeigen sich geringere Verschiebungen im Spektrum als bei der Adenylylierung von Cdc42:GTP. Veränderungen sind hier vor allem in Helix α_1 und Switch II zu beobachten. Die AMP-gebundene Form von Cdc42 im GDP-Zustand ähnelt also eher der inaktiven Form als die adenylylierte GTP-gebundene Form dem aktiven Zustand. Da aber bei beiden Vergleichsspektren verschobene Resonanzen beobachtet werden können, kann keine klare Aussage über Aktivitätszustände der modifizierten Proteine getroffen werden. Aufgrund der Unterschiede zum unmodifizierten Protein kann davon ausgegangen werden, dass sich die adenylylierten Proteine in einer intermediären Konformation befinden.

Ob diese nun zu einer Aktivierung oder Deaktivierung der GTPase führt bleibt allerdings offen. Für am Threonin und am Tyrosin modifiziertes Cdc42 gelten, wie beim Vergleich von Abbildung 3-25 und Abbildung 3-26 ersichtlich, die gleichen Prinzipien.

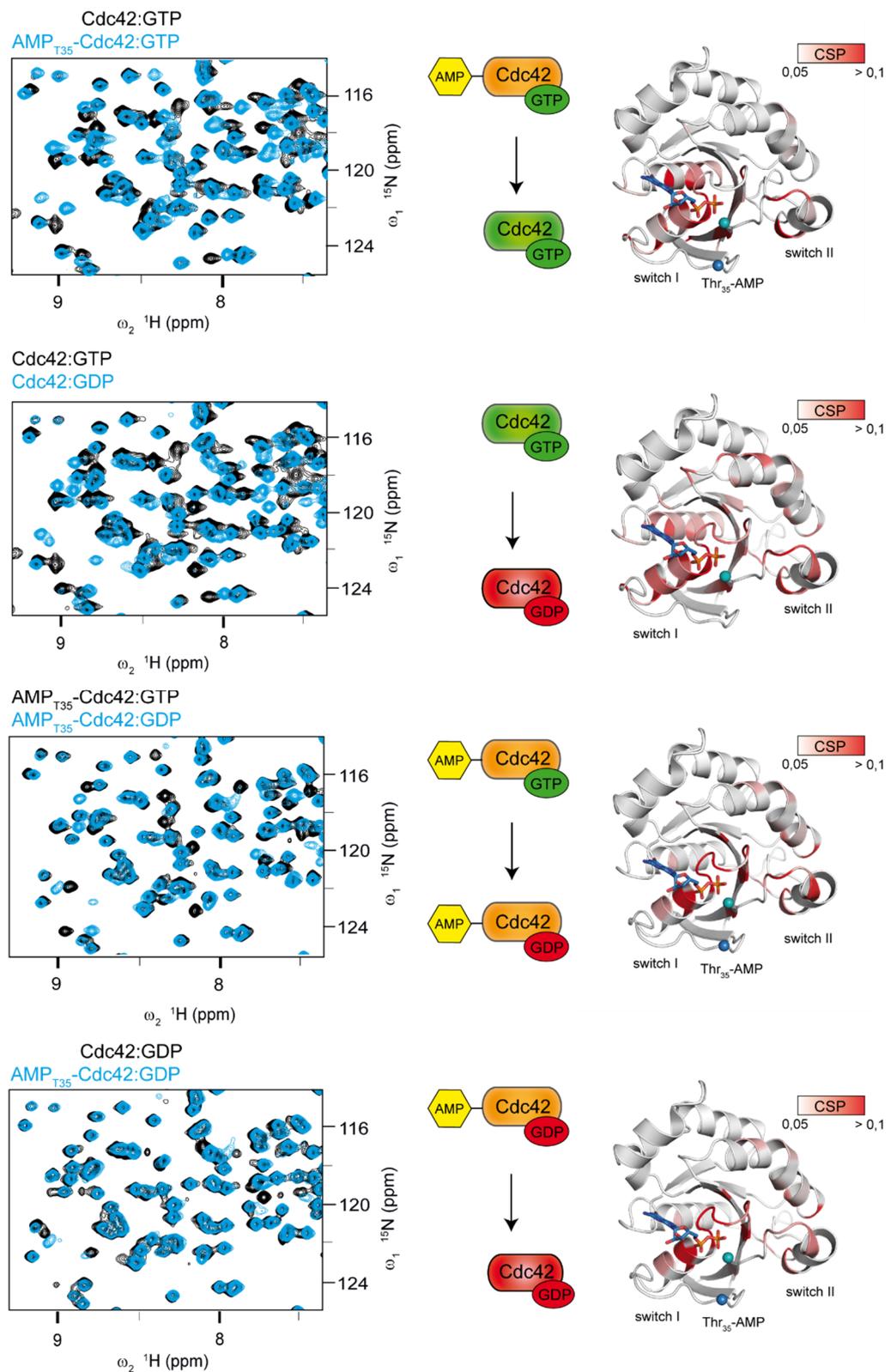


Abbildung 3-25: Konformationelle Effekte der Adenylylierung von Thr35 auf Cdc42 charakterisiert durch NMR-Spektroskopie. Überlagerungen der $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektren von unmodifiziertem/modifiziertem und GDP/GTP gebundenem Cdc42. CSPs wurden auf die Kristallstruktur von Cdc42 (PDB:1an0) geplottet. In der mittleren Spalte sind die Aktivitätszustände der GTPasen dargestellt (grün: aktiv; rot: inaktiv; orange: intermediäre Konformation).

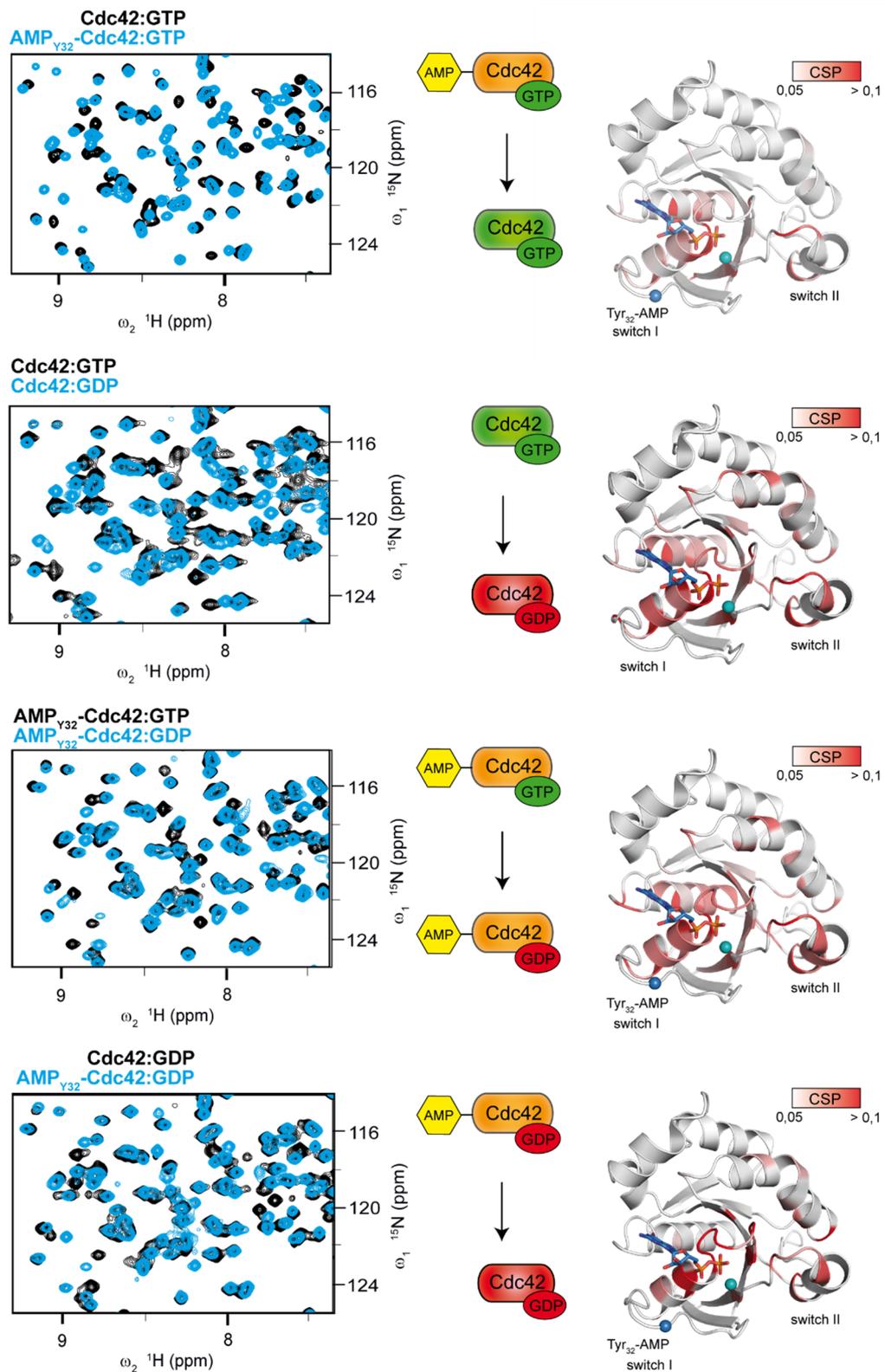


Abbildung 3-26: Konformationelle Effekte der Adenylylierung von Tyr32 auf Cdc42 charakterisiert durch NMR-Spektroskopie. Überlagerungen der ¹H¹⁵N-HSQC-Spektren von unmodifiziertem/modifiziertem und GDP/GTP gebundenem Cdc42. CSPs wurden auf die Kristallstruktur von Cdc42 (PDB:1an0) geplottet. In der mittleren Spalte sind die Aktivitätszustände der GTPasen dargestellt (grün: aktiv; rot: inaktiv; orange: intermediäre Konformation).

4 DISKUSSION UND AUSBLICK

In der abschließenden Diskussion werden die Ergebnisse dieser Arbeit in den Gesamtzusammenhang der relevanten Literatur eingeordnet. Dies soll dazu beitragen das Verständnis der Effekte posttranslationaler Modifikationen auf kleine GTPasen auf molekularer Ebene zu verbessern. Zunächst sollen die Substratspezifitäten adenylylierender Enzyme und die Enzymaktivitäten gegenüber veränderten GTPasen diskutiert werden. Außerdem werden die Auswirkungen von PTMs auf die intrinsischen Eigenschaften und die Konformation kleiner GTPasen im Kontext der Literatur bewertet. Die gewonnenen Erkenntnisse sollen genutzt werden, um ein Modell zur zellulären Auswirkung der Adenylylierung während der Legionelleninfektion zu entwerfen. Ein abschließender Ausblick soll Möglichkeiten für zukünftige Forschungsansätze im Bereich posttranslationaler Modifikationen kleiner GTPasen aufzeigen.

4.1 Substratspezifitäten adenylylierender Enzyme

Die adenylylierenden Enzyme VopS, IbpA und DrrA können zusätzlich zu ATP auch CTP, GTP, UTP und dTTP als Nukleotidsubstrate verwenden [73, 74]. Für DrrA wurde gezeigt, dass die Aktivität von CTP (60 %) über GTP (15 %) zu UTP (10 %) hin abnimmt [73]. Für IbpA und VopS wurden keine kinetischen Analysen durchgeführt. Die Enzyme können die natürlichen Nukleotide also alle verwenden, um kleine GTPasen zu modifizieren. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass auch Nukleotide mit einer Propargylgruppe am N⁶ des Adenosins oder am O² der Ribose noch Substrate für alle drei Enzyme sind. Diese scheint also noch zu keinen sterischen Einschränkungen in der Nukleotidbindungsregion zu führen. Die Verwendung von Nukleotiden mit größeren Modifikationen an den OH-Gruppen der Ribose und dem N⁶ der Adenin-Base (FRET Nukleotide) unterscheidet sich allerdings zwischen den drei analysierten Enzymen deutlich. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass IbpA im Gegensatz zu VopS, das nur Modifikationen am N⁶ der Adenin-Base akzeptiert, auch Nukleotidanaloga mit einer Modifikation an den Hydroxylgruppen der Ribose akzeptieren kann. Dies könnte darauf hinweisen, dass bei VopS Kontakte mit der Ribose des Nukleotids für die Bindung wichtig, für IbpA aber nicht essentiell sind. DrrA kann keines der FRET Nukleotide umsetzen.

Die einzige gelöste Kristallstruktur eines adenylylierenden Enzyms in Komplex mit seinem Adenylylierungssubstrat ist die von IbpA mit adenylyliertem Cdc42. In dieser, in Abbildung 4-1 abgebildeten, Struktur erfährt die Switch I-Region von Cdc42 Konformationsänderungen, die die Bindung an ein β -Hairpin nahe des FIC Motivs von IbpA ermöglichen. Die Switch I-Region wird durch diese Interaktion so stabilisiert, dass das Tyr32 direkt in die aktive Tasche des FIC Proteins ragt [61]. Das (A/G)NG Motiv bildet eine sogenannte Anionenhöhle das zur Interaktion mit den Phosphaten des Nukleotids beiträgt.

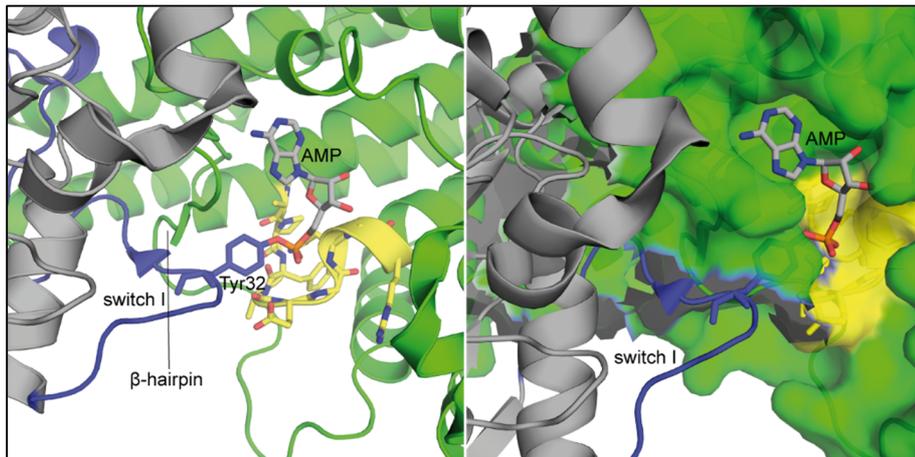


Abbildung 4-1: Ausschnitt der Komplexstruktur von IbpA H3717A (grün) mit adenylyliertem Cdc42 (grau) (PDB ID 4ITR). Die Switch-Regionen von Cdc42 sind in blau, das FIC Motiv in gelb dargestellt.

Außerdem sind eine hydrophobe Adenosinbindungstasche und das die Ribose koordinierende Arginin in die Bindung des Nukleotids involviert [122].

IbpA und VopS teilen mindestens zwei Eigenschaften bezüglich ihrer Substratbindung und Aktivität. Die zusätzliche Bindung von IbpA an die Switch II-Region von Cdc42 wird durch die sogenannte Armregion von IbpA vermittelt (Ile3535, Pro3536, Thr3539, Met3543, Phe3549, Ile3552, Leu3553, Gly3556, Ala3557 and Val3560). Auch die Kristallstruktur von VopS zeigt ein ähnliches Segment, weshalb vermutet wird, dass bei beiden Enzymen die Erkennung des GTPase-Substrats über die Switch II-Region mit der Armdomäne des Enzyms vermittelt wird [61]. Die Aktivität der meisten FIC Proteine wird außerdem durch ein inhibitorisches Glutamat in einer N- oder C-terminalen Helix reguliert. IbpA und VopS gehören zu einer Gruppe von FIC Proteinen, bei denen diese regulatorische Helix fehlt. Dies lässt vermuten, dass in beiden Fällen ein anderer Regulationsmechanismus vorliegt [123].

Die Diversität der Reaktionen die durch FIC Proteine katalysiert werden, ist auch dadurch groß, dass auch andere Orientierungen des Nukleotides in der Bindungstasche möglich sind [122]. So wird bei der Phosphocholinierung von Rab1 durch AnkX das CDP-Cholin Substrat in der Nukleotidbindungstasche so orientiert, dass Phosphocholin und nicht das Nukleotid-Phosphat übertragen wird [124]. Auch das FIC Protein Doc invertiert das Nukleotidsubstrat ATP, um eine Phosphorylierung anstatt einer Adenylylierung zu erreichen [125]. Diese größere Flexibilität könnte erklären, warum viele der Nukleotidanaloga (v.a. FRET Nukleotide) von VopS und IbpA umgesetzt werden können, DrrA diese aber nicht verwenden kann.

Für die DrrA-Adenylyltransferase gibt es keine Komplexstruktur mit Rab1 und ATP. Es wurde allerdings gezeigt, dass ATP nicht an DrrA allein, sondern an den Komplex aus Rab1 und DrrA

bindet [71]. Dies könnte die Spezifität für die Nukleotidbindung durch sterische Hinderung oder die fehlende Ausbildung zusätzlicher Kontakte bei artifiziellen Nukleotiden erhöhen.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die untersuchten FIC-Proteine ein größeres Nukleotidsubstratspektrum haben, als das zu den DNA- β -Polymerase-ähnliche Nukleotidyltransferasen gehörende DrrA. Allerdings unterscheiden sich interessanterweise auch die akzeptierten Nukleotidsubstrate von adenylylierenden FIC-Proteinen deutlich. Dies sollte bei der Planung von Experimenten mit artifiziellen Nukleotiden berücksichtigt werden. Die hier getesteten Nukleotide könnten einen ersten Anhaltspunkt für die generelle Nukleotid-Verwendbarkeit durch die adenylylierenden Enzyme geben.

4.2 Enzymaktivitäten

Rab1 interagiert mit einer Vielzahl von bakteriellen Proteinen. Das Verständnis dieser Interaktionen ist aufgrund fehlender Komplexstrukturen teilweise unvollständig. In dieser Arbeit sollte die Bindung der Effektoren mit Switch II von Rab1 genauer analysiert werden. Zu diesem Zweck wurde die Aktivität interagierender Enzyme für Rab1 Aminosäureaustauschmutanten untersucht. In diesem Kapitel sollen die hierdurch erhaltenen, neuen Erkenntnisse in die schon bekannte relevante Literatur eingeordnet werden.

Für die GEF-Domäne von DrrA zeigt sich eine signifikant verminderte Nukleotidaustauschaktivität für die Rab1 Mutanten T74A, R79A, sowie Y77A und I73A. Die Komplexstruktur von Rab1 und der DrrA GEF-Domäne wurde gelöst und zeigt, dass die erste Bindungsstelle die Switch II-Region und den p-loop umfasst. Direkte und wasservermittelte Kontakte bewerkstelligen die Bindung zu DrrA. Die zweite Bindungsstelle wird durch die Switch I-Schleife von Rab1 ausgebildet. Für R79 ist hier eine polare Bindung zu einem Aspartat bzw. Arginin von DrrA beschrieben. Y77 bildet eine hydrophobe Interaktion zu einem Tryptophanrest von DrrA aus [40]. Die verminderte Aktivität von DrrA zu den beiden Mutanten R79A und Y77A kommt also vermutlich durch die Störung dieser Interaktionen zu Stande. T74 und I73 bilden keine direkten Kontakte zu DrrA aus. Möglicherweise führen diese Mutationen zu kleinen konformationellen Veränderungen in der Switch II-Region, die zur verminderten Aktivität von DrrA für Rab1 führen.

Die DrrA-Adenylylierungsaktivität ist für die Rab1-Mutanten I73A, R79A, sowie Y78A signifikant reduziert. Da die Adenylylierung an Y77 stattfindet, ist es gut vorstellbar, dass nahe benachbarte Aminosäurereste wie Y78A und R79A für die Bindung wichtig sind. Die hochkonservierten Aminosäuren der Switch II-Region bei von DrrA adenylylierten RabGTPasen sind T74, Y77, Y78 und R79. Die anderen Aminosäurereste des Switch II-Peptids sind in Bezug auf die Adenylylierungsaktivität eher variabel. Das Isoleucin an Position 73 scheint auch durch

Valin oder Leucin ersetzbar zu sein [53]. Wie bereits erwähnt, gibt es keine Komplexstruktur für die DrrA-Adenylylierungsdomäne und Rab1, es wurde jedoch ein Modell vorgeschlagen, bei dem die Bindungsart für die GEF Domäne und die Adenylylierungsdomäne sich deutlich unterscheiden [73].

Die Deadenylylierung von Rab1-AMP während der Infektion mit *L. pneumophila* wird durch das Protein SidD katalysiert. Die SidD Deadenylylierungsaktivität wird durch die Mutation von Y78 und R79 von Rab1 signifikant reduziert. Diese folgen in der Aminosäuresequenz direkt auf das adenylylierte Y77. Die Kristallisation eines Komplexes von SidD mit Rab1 war bisher nicht erfolgreich, allerdings wurde eine Komplexstruktur über ein Docking-Experiment modelliert [126]. Hierbei ist R79 in Wasserstoffbrückenbindungen mit SidD Resten involviert. Auch Thr 72 und Ile 73, sowie Ser 75 und 76 in Switch II scheinen in dem Modell Interaktionen mit SidD auszubilden. Für die entsprechenden Rab1 Mutanten konnte allerdings kein signifikanter Effekt auf die SidD Aktivität gezeigt werden. Switch II-Aminosäuren, die N-terminal von Y77 liegen, scheinen also für die SidD-Aktivität nicht von essentieller Bedeutung zu sein. Dies würde einer Substraterkennung über die Peptidsequenz widersprechen. Die Deadenylylierung eines adenylylierten Switch II-Peptids (Kapitel 3.1.3) ist im Vergleich zur Demodifikation von Rab1-AMP sehr ineffizient. Nur die Erkennung der Aminosäuresequenz in Switch II scheint also für eine effektive Demodifikationsreaktion nicht ausreichend zu sein. Auch Kontakte außerhalb der Switch II-Region, wie sie auch im Dockingmodell vorgeschlagen werden, könnten für die effektive Deadenylylierung *in vivo* wichtig sein.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass einige Ergebnisse von Docking und Molekulardynamikstudien zu den Interaktionen zwischen Enzym und GTPase, sowie aus Sequenzvergleichen der GTPasen, in den Experimenten dieser Arbeit bestätigt und erweitert werden konnten. Um ein vollständiges Bild über die Bindung und den Mechanismus der Enzyme zu bekommen, ist es allerdings weiterhin erstrebenswert, die Kristallstrukturen der GTPase-Enzym-Komplexe zu lösen.

4.3 Auswirkungen von PTMs auf intrinsische Eigenschaften kleiner GTPasen

Die Adenylylierung und Phosphocholinierung kleiner GTPasen wurden erst in den letzten zehn Jahren entdeckt [53, 58, 60]. Ihre molekularen Konsequenzen sind deswegen relativ wenig untersucht. Da die Adenylylierung und Phosphocholinierung von Rab1 und Cdc42 in den für die Effektorbindung essentiellen Switch-Regionen erfolgen, sind ihre Konsequenzen jedoch von großer Bedeutung. Bei Cdc42 erfolgt die Adenylylierung in der Switch I-Region, die an der Bindung des Nukleotids beteiligt ist. Das von IbpA adenylylierte Tyr32 ist in die Bindung mit

dem γ -Phosphat von GTP involviert und Thr35 ist für die Koordination eines essentiellen Magnesiumions zuständig. Bei p21 (Ras) zeigt die Seitenkette von Thr35 in der GDP-gebundenen Konformation der GTPase vom Nukleotid weg, während es in der GTP-gebundenen Struktur direkt mit dem Magnesiumion und dem γ -Phosphat von GTP interagiert [127]. Thr35 ist somit für die hochaffine Bindung an das γ -Phosphat von GTP von Bedeutung, diese Interaktionen werden bei GTP Hydrolyse aufgelöst. Mg^{2+} bindet GTP über dessen β - und γ -Phosphat Sauerstoffatome, während GDP wesentlich schwächer gebunden wird [128]. Auch Tyr32 ist in der Kristallstruktur von Cdc42:GDP vom Nukleotid abgewandt und scheint keine Interaktionen einzugehen (PDB ID: 1AN0). Während der GTP Hydrolyse scheint das Magnesiumion die Switch I-Effektorschleife an Tyr32 zu stabilisieren, was das Mg^{2+} und das γ -Phosphat optimal für die Hydrolysereaktion positioniert [129]. Bei Ras wird eine Wasserstoffbrückenbindung zwischen Tyr32 und Tyr40 im Komplex mit GDP-PC aufgelöst, führt zu einem Herausschwingen der Tyr-Seitenkette und einer teilweisen Deckelung der Nukleotidbindungstasche. Das γ -Phosphat ist dabei durch eine kleine Öffnung zugänglich [9]. Diese Stabilisierung von spezifischen Zuständen könnte zu der hohen Affinität für das Nukleotid beitragen. Die Affinität von Ras für GDP beträgt ungefähr 10 pM [6].

In dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob die Adenylylierung in Switch I Einfluss auf die Nukleotidbindungseigenschaften wie die intrinsische Nukleotidhydrolyse und -austauschrate hat. Die intrinsische Hydrolyserate kleiner GTPasen ist generell sehr langsam (für Cdc42 $3,3 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$). Für die am Thr35 und Tyr32 adenylylierten Proteine konnte eine um 40 % bzw. 75 % verminderte Hydrolyserate ermittelt werden. Die Adenylylierung scheint also den aktiven Zustand der GTPase zu verlängern. Für die Modifikation von Rab1 an Ser76 und Tyr77 wurde in früheren Arbeiten kein Einfluss auf die intrinsische Nukleotidhydrolyserate und intrinsische Nukleotidaustauschraten festgestellt [57, 73]. Diese Modifikationen erfolgen allerdings auch in der Switch II-Region und die modifizierten Aminosäurereste sind nicht direkt in die Bindung mit dem Nukleotid involviert. Auch bei der hier analysierten intrinsischen Nukleotidaustauschrate von adenylyliertem Cdc42 zeigten sich Effekte. So wurde die Freisetzungsrates von mantGDP in beiden Fällen verlangsamt, während die Freisetzung von mantGTP schneller erfolgte. Die schnellere Freisetzung von mantGTP bei am Tyrosin adenylyliertem Cdc42 könnte durch die geschwächte Bindung an das γ -Phosphat von GTP erklärt werden. Da die Nukleotidhydrolyse und Freisetzung durch kleine GTPasen auf einer so langsamen Zeitskala abläuft, sind um einen physiologisch relevanten Effekt zu erreichen GEFs und GAPs notwendig [130, 131]. Deshalb sind die hier beobachteten Veränderungen der Nukleotidhydrolyse und Nukleotidbindungseigenschaften wahrscheinlich physiologisch nicht von Bedeutung. Ein größerer Effekt könnte also erreicht werden, wenn die Modifikation die Interaktion mit GEFs oder GAPs beeinträchtigt. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die Modifikation am Tyr32 von Cdc42 den

Nukleotidaustausch durch das GEF Dock9 verlangsamt und bei einer Modifikation am Thr35 kein Austausch mehr stattfindet. Die Komplexstruktur aus nukleotidfreiem Cdc42 und Dock9 wurde gelöst und ist in Abbildung 4-2 dargestellt. Wenn Cdc42 im Komplex mit Dock9 vorliegt, verändert sich der Switch I-Bereich konformationell so, dass die Nukleotidbindungsregion frei zugänglich wird. Thr35 ist darin in unmittelbarer Nähe zu einem Nukleotidsensor des GEFs, der zur Freisetzung von GDP beiträgt [130]. Die Adenylierung von Cdc42 an Thr35 könnte durch sterische Beeinträchtigung die Freisetzung von GDP während des Nukleotidaustauschs verhindern.

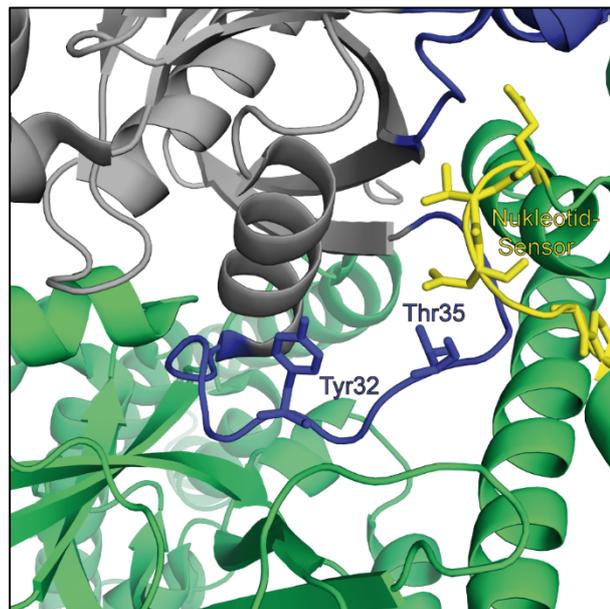


Abbildung 4-2: Komplexstruktur von Cdc42 mit Dock9. Die Switch-Regionen sind blau markiert. PDB ID 2WM9 [130]. Der Nukleotidsensor trägt zur Freisetzung von GDP bei.

Cdc42 würde somit im inaktiven Zustand verbleiben. Es wurde gezeigt, dass die Adenylierung durch VopS die Effektorbindung und Signalweiterleitung verhindert, somit die Aktinassemblierung unterbindet und zu Zellrundung führt [60]. Die beobachtete Inaktivierung der Rho-GTPasen könnte also auf die fehlende oder verringerte Nukleotidaustauschaktivität von GEFs zurückgehen.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Adenylierung von Cdc42 wahrscheinlich eher einen physiologisch relevanten Effekt auf die Effektorbindung als auf intrinsische Nukleotidbindungseigenschaften hat. Auch die Analyse der Interaktion von adenyliertem Cdc42 mit Cdc42GAP wäre zukünftig interessant. Das GAP bildet einen direkten Kontakt mit Tyr32, aber nicht mit Thr35 aus [132].

4.4 Auswirkungen von PTMs auf die Struktur kleiner GTPasen

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Adenylylierung von Rab1 und Cdc42 deren dreidimensionale Faltung signifikant stabilisiert. Dieses Erkenntnis weist darauf hin, dass die Adenylylierung die Konformation der kleinen GTPasen beeinflusst. Um dies zu analysieren, wurden im Rahmen dieser Arbeit NMR-basierte Experimente mit modifizierten/unmodifizierten GTPasen durchgeführt. Interessanterweise zeigte sich, dass die Adenylylierung von Rab1 die GTPase im GDP-Zustand in der aktiven Konformation stabilisiert. Erst nach Deadenylylierung durch SidD wird Rab1 wieder in den inaktiven Zustand überführt. Diese Ergebnisse decken sich mit der kürzlich, mit einem unserer Kooperationspartner, veröffentlichten molekulardynamischen Analyse dieser Fragestellung. Hier wird vermutet, dass elektrostatische Wechselwirkungen aufgrund der zusätzlichen, durch die Modifikation eingebrachten negativen Ladung in Switch II zu der Stabilisierung beitragen [121]. Die Stacking Interaktion zwischen Phe45 und der Adenosin Base, die als möglicher Stabilisierungsmechanismus in Betracht gezogen wurde, konnte in dieser Arbeit als Grundlage der Stabilisierung ausgeschlossen werden. In NMR-Experimenten konnte gezeigt werden, dass die Mutation des Phenylalanins zu Alanin nicht zur Verhinderung der Stabilisierung führt. Die Hypothese der Stabilisierung durch die negative Ladung am Tyrosin ist experimentell nicht einfach zu überprüfen. Wir testeten eine phosphomimetische Mutante, bei der eine negative Ladung an der Position 77 eingeführt wurde. Diese wurde aber durch die Mutation in ihrer Struktur beeinträchtigt. Deshalb konnten keine Rückschlüsse über eine Stabilisierung getroffen werden.

Für den Fall von Rab1 zeigt sich also, dass durch die Anbringung von PTMs eine neue, zusätzliche Regulation des Aktivitätszustandes kleiner GTPasen erfolgen kann. Wie in Abbildung 4-3 dargestellt, betrifft die Stabilisierung durch Adenylylierung nicht nur die Switch II, sondern auch die Switch I-Region und andere Regionen der GTPase.

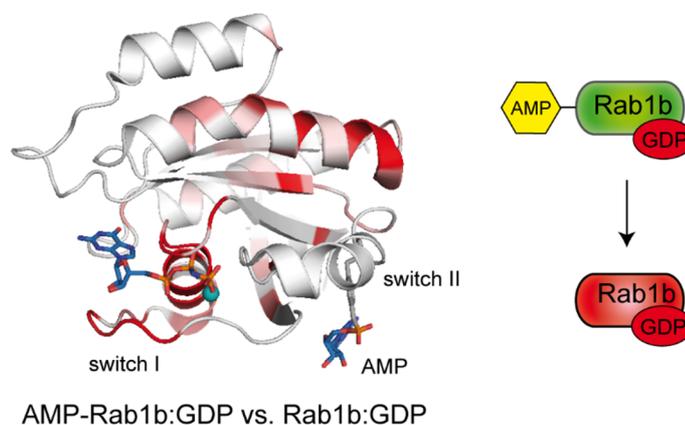


Abbildung 4-3: Unterschiede in den chemischen Verschiebungen zwischen AMP-Rab1b:GDP und Rab1b:GDP geploftet auf die Kristallstruktur. Die Adenylylierung von Rab1 in Switch II führt auch zu konformationellen Veränderungen in Switch I. Intensität der Rottöne steht für Höhe der CSPs.

Es wäre also möglich, dass auch die Bindung mit Effektoren, die nur an Switch I binden, durch die Modifikation gesteuert wird. In früheren Arbeiten wurde gezeigt, dass die Modifikation mit AMP eine Bindung zu dem Effektorprotein Mical1 verhindert, der Effektor LidA Rab1-AMP allerdings noch binden kann [53]. Die verhinderte Bindung von Mical1 ist vermutlich auf sterische Konflikte mit der AMP Gruppe zurückzuführen. Bei der Modifikation von Rab1-GTP mit AMP sind nur sehr kleine Veränderungen in der Überlagerung der NMR-Spektren zu sehen, diese gehen vermutlich allein auf die veränderte chemische Umgebung durch das AMP und nicht auf konformationelle Veränderungen zurück. Die Bindung von Mical wird also nicht durch veränderte Strukturen der Switch-Regionen verhindert.

Für Rab1 sind Effektoren, die nicht an Switch II binden, bislang nicht bekannt, es wurde allerdings eine simultane Interaktion für die GTPase Rab11 mit zwei Effektorproteinen beschrieben. In dieser, in Abbildung 4-4 dargestellten Komplexstruktur, macht Rab11 zu PI4KIII β einen einzigen Kontakt in Switch I und keinen in Switch II. Die Kinase bildet außerdem Kontakte zu GTP aus. Die Switch II-Region steht somit zur Bindung mit FIP3-RBD zur Verfügung und es kann ein ternärer Komplex gebildet werden [133].

Diese Art von Effektor könnte also auch mit der GTPase im adenylierten GDP-gebundenen Zustand interagieren. Dies würde zu einer Veränderung der Effektor-Interaktionsnetzwerke in der Zelle führen. Rab1 würde folglich bei einer Infektion mit *Legionella pneumophila* mit anderen Effektorproteinen interagieren als in der nicht infizierten Zelle.

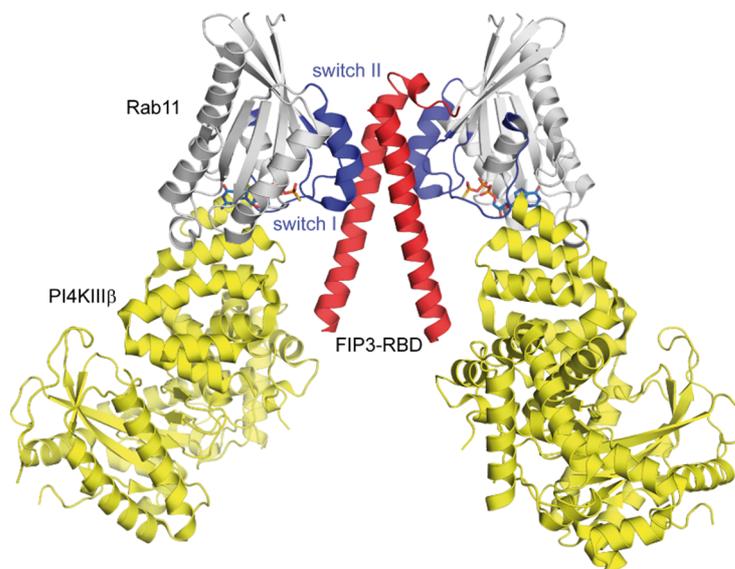


Abbildung 4-4: Kristallstruktur des ternären Komplexes aus Rab11, Pi4KIII β und FIP3-RBD. Pi4KIII β bildet einen Kontakt zu Switch I von Rab11 aus und lässt Switch II für die Bindung mit FIP3 verfügbar. Adaptiert nach [133]. PDB ID 4D0M.

Die Stabilisierung im aktiven Zustand wurde nicht für die Phosphocholinierung von Rab1 und für die Adenylylierung von Cdc42 beobachtet. Cdc42 scheint durch die Adenylylierung an

Tyr32 und Thr35 in eine intermediäre Konformation versetzt zu werden. Diese ist weder gleich dem GDP- noch dem GTP-Zustand. Adenyliertes Cdc42 interagiert *in vivo* nicht mehr mit Effektorproteinen [60, 63]. Dies scheint allerdings auf die fehlende Aktivierung zurückzuführen zu sein. *In vitro* wurde nicht getestet, ob adenyliertes Cdc42 mit PAK interagiert. Die Interaktion zwischen PAK und Cdc42 erfolgt über die Switch I und Switch II-Regionen [134]. Deshalb ist es gut möglich, dass auch im aktiven adenylierten Zustand keine Interaktion aufgrund sterischer Hinderung stattfindet. Um den Einfluss der Konformation der Switch-Regionen im adenylierten Zustand auf die Effektorbindung zu analysieren, müsste ein Effektor untersucht werden, der durch das adenylierte Tyrosin oder Threonin nicht sterisch in seiner Bindung inhibiert wird.

Die Studien von Geyer *et al.* [135] und Vetter *et al.* [136] untersuchen die Glukosylierung von Ras durch ein Toxin von *Clostridium sordellii* an Thr35 unter Zuhilfenahme von ^{31}P und ^1H NMR-Spektroskopie bzw. Röntgenkristallographie. Vetter *et al.* zeigen, dass die Anbringung der Glucose die Bildung der GTP-Konformation des Effektor-Loops aufgrund sterischer Einschränkungen verhindert und somit die Interaktion mit Ras Effektorproteinen inhibiert. In dieser ungeordneten, offenen Konformation ist Tyr32 vermutlich vom Nukleotid abgewandt und Thr35 nicht in die Koordination des Magnesiums involviert. Geyer *et al.* bestätigen dies und zeigen für die Glukosylierung des GDP-gebundenen Ras nur kleine Veränderungen in der chemischen Umgebung des aktiven Zentrums. Vergleichend mit der Adenylylierung von Cdc42 sind in beiden Fällen die Veränderungen bei Modifikation im GDP-Zustand relativ gering. Bei Cdc42 sind allerdings die Konformationen der GTPase im adenylierten GDP- und GTP-gebundenen Zustand unterschiedlich. Dies lässt wie bereits erwähnt auf mehrere intermediäre Konformationen schließen und nicht auf die Stabilisierung in einem Zustand. Auch widersprechen die funktionierende Nukleotidhydrolyse und der funktionierende Nukleotidaustausch bei Cdc42 einer, wie bei glukosyliertem Ras, offenen Konformation.

Als weiterer Effekt der Adenylylierung und Phosphocholinierung könnte auch die Blockierung von Phosphorylierungsstellen eine Rolle spielen. Da diese Modifikationen potentiell auf die gleichen Aminosäuren zielen wie die Phosphorylierung, könnten Phosphorylierungsereignisse inhibiert und somit Signalwege abgeschaltet werden. Für Rab1 und Cdc42 wird auf PhosphoSitePlus eine Phosphorylierung am Tyr77 bzw. Tyr32 beschrieben [137]. Kürzlich wurde gezeigt, dass membrangebundenes Rab1 im GDP-Zustand durch die humane TAK1 an Thr72 in Switch II phosphoryliert wird. Diese Phosphorylierung inhibiert die Interaktion mit GDI und ist essentiell für die Rab1 Funktion. TAK1 wird durch Pathogene während der Infektion aktiviert und ist in Signalwege zur Auslösung von Entzündungen involviert. Levin *et al.* untersuchten deshalb die Wechselwirkungen zwischen der Phosphorylierung von Rab1 durch TAK1 und der

Legionella Infektion. In AnkX/DrrA knockout HEK Zellen konnten erhöhte Levels an Phosphorylierung von Rab1 nachgewiesen werden. Sie schlagen deshalb vor, dass die Phosphorylierung von Rab1 durch TAK1 während der Infektion teilweise durch die von *L. pneumophila* Effektoren angebrachten Modifikationen auskompetitiert wird [93].

4.5 Modell zur zellulären Auswirkung der Adenylylierung

Das wichtigste Ergebnis dieser Arbeit ist, dass die Adenylylierung von Rab1 unabhängig vom Nukleotidzustand zur Stabilisierung in der aktiven Konformation führt. In Abbildung 4-5 soll nun ein abschließendes Modell für die zellulären Auswirkungen dieser Modifikation dargestellt werden.

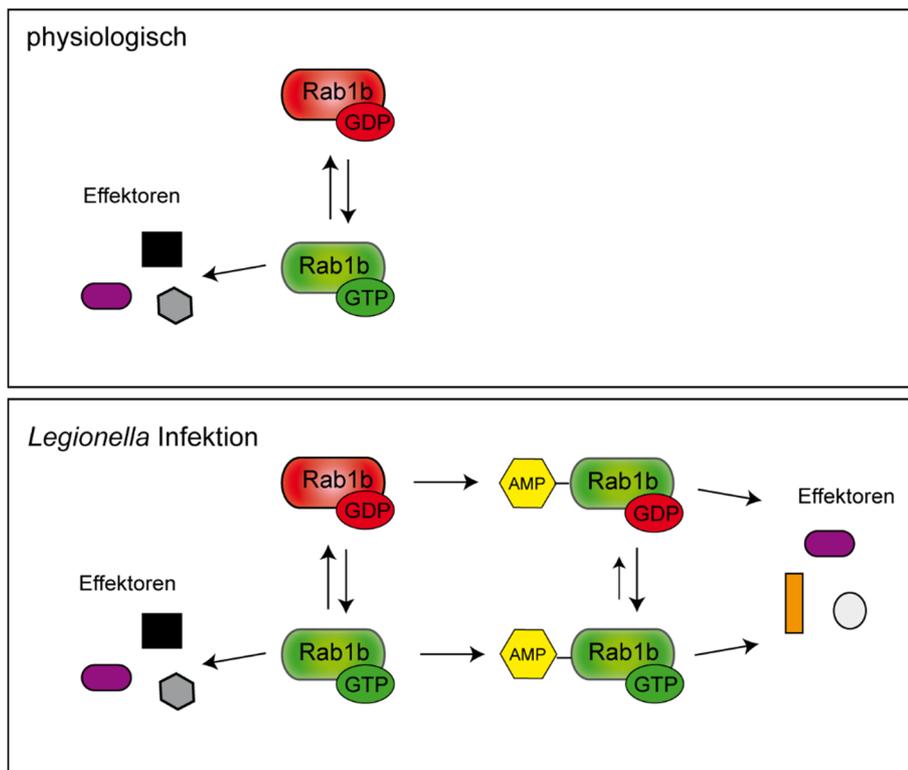


Abbildung 4-5: Modell zur zellulären Auswirkung der Adenylylierung während der Legionella Infektion im Vergleich zur nicht-infizierten Zelle. Adenylyliertes Rab1 interagiert mit anderen Effektorproteinen. Auch GDP-gebundenes adenylyliertes Rab1 ist aktiv und kann interagieren.

So interagiert Rab1 in der physiologischen Zelle mit zahlreichen Effektorproteinen um einen zellulären Effekt zu erreichen. In der mit *Legionella pneumophila* infizierten Zelle wird Rab1 zu bestimmten Zeitpunkten der Infektion adenylyliert. Der AMP-Rest in der Switch II-Region kann zu sterischen Hinderungen führen und die Interaktion mit manchen Effektoren verhindern. Allerdings sind die beiden Switch-Regionen nun sowohl im GDP- als auch im GTP-gebundenen Zustand in der aktiven Konformation. Für Effektorproteine, die durch die AMP Bindung nicht in ihrem Zugang zur GTPase beschränkt werden, weil ihre Interaktion nur wenige bzw. keine

Kontakte mit der Switch II-Region aufweist, wäre eine Interaktion möglich. Die Adenylylierung könnte also zu einem veränderten Effektorbindungsprofil von Rab1 führen und so zelluläre Funktionen verändern. Es wäre also von großem Interesse, weitere Einblicke in den Einfluss der Adenylylierung auf die Effektorbindung zu bekommen. Zukünftige Experimente könnten durch die Durchführung von Pulldowns mit menschlichem Zelllysate und modifizierten bzw. unmodifizierten GTPasen Rückschlüsse auf unterschiedliche Interaktionsprofile geben.

4.6 Ausblick

Die Regulation von kleinen GTPasen durch posttranslationale Modifikationen ist ein raffinierter Mechanismus. Die Adenylylierung und Phosphocholinierung erfolgt hochspezifisch an bestimmten Aminosäureresten der Proteine. Die hohe Spezifität kommt mit Ausnahme von AnkX durch die Erkennung komplexer Tertiärstrukturelemente zustande. Da das Produkt der exergonischen Modifikationsreaktion ein unter physiologischen Bedingungen stabiler Phosphodiester ist, ermöglichen demodifizierende Enzyme die genaue zeitliche Regulation [58, 68]. Die Bedeutung dieser und weiterer posttranslationaler Modifikationen auf zellulärer Ebene sowohl im Infektions- als auch im physiologischen Kontext ist deshalb von großem Interesse.

Die kürzlich erschienenen Publikationen zur Phosphorylierung von Rab1 [93], Rab8 und Rab13 [92] bieten eine neue Grundlage für die Erforschung der Auswirkungen der Phosphorylierung auf Funktion und Struktur kleiner GTPasen. Hierzu müssen allerdings Methoden für die präparative Phosphorylierung von GTPasen optimiert bzw. entwickelt werden. Die *Amber Codon Suppression* Technologie ist eine Möglichkeit, um eine stabil phosphorylierte Aminosäure spezifisch in ein Protein einzubringen.

Auch die Adenylylierung bietet zukünftig weitere Forschungsansätze. Es wird vermutet, dass signifikant mehr Adenylylierungssubstrate vorkommen als bis heute bekannt ist. Eine vor kurzem veröffentlichte Studie zeigt erstmals ein humanes FIC Protein, HYPE, das ein Chaperon adenylyliert und so inaktiviert [75]. Dies weist darauf hin, dass noch weitere humane adenylylierende Enzyme und Adenylylierungssubstrate in eukaryotischen Zellen vorkommen. Deren Detektion ist eine wichtige zukünftige Aufgabe in der Forschung über PTMs. Aber auch die Suche nach anderen Enzymen, die PTMs anbringen und deren Substraten ist von großer Bedeutung. Posttranslationale Modifikationen spielen neben der bakteriellen Infektion auch bei anderen humanen Krankheitsbildern wie Alzheimer oder Krebs eine bedeutende Rolle [138, 139].

Die Identifikation neuer Substrate erfolgt häufig über die spezifische Anreicherung modifizierter Proteine/Peptide über Antikörper oder Affinitätsmatrizes und anschließende massenspektro-

metrische Analyse. Vor allem die Identifizierung labiler Modifikationen wie der Phosphorylierung ist allerdings schwierig. Auch die substöchiometrische Modifikation von Proteinen kann die Identifikation des Targets erschweren [140]. Heute steht auch eine große Anzahl von Datenbanken und Software-Tools zur Verfügung, deren Präzision und Effektivität ständig verbessert wird, um die verlässliche Vorhersage von PTMs zu erreichen [141]. Der Identifikation neuer Modifizierungsenzyme bzw. -substrate kann dann die Forschung an *in vivo* Effekten folgen, die neue Einblicke in das Regulationsnetzwerk von PTMs geben kann. In dieser Arbeit wurde die Grundlage für die Erforschung weiterer Effekte posttranslationaler Modifikationen auf kleine GTPasen gelegt. Auf optimierte Methoden zur Herstellung, Modifikation und Analyse kleiner GTPasen kann zukünftig zurückgegriffen werden.

5 MATERIAL UND METHODEN

5.1 Materialien

5.1.1 Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien wurden von den Herstellern in größtmöglicher Reinheit bezogen.

Tabelle 5-1: Verwendete Chemikalien mit Herstellerangaben.

Chemikalie	Hersteller
Adenosin	Jena Bioscience, Jena, D
Adenosinmonophosphat (AMP)	Jena Bioscience, Jena, D
Adenosindiphosphat (ADP)	Jena Bioscience, Jena, D
Adenosintriphosphat (ATP)	Jena Bioscience, Jena, D
Acetonitril	VWR Prolabo Chemicals, Fontenay sous Bois, F
Acrylamid	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, D
Agarose	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, D
Ameisensäure	Fluka, Steinheim, D
2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-Sulfursäure (ABTS)	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
β -Mercaptoethanol	VWR Prolabo Chemicals, Fontenay sous Bois, F
Borsäure	Merck Millipore, Cork, IRL
Bromphenolblau	Alfa Aesar GmbH & Co KG, Karlsruhe, D
Calciumchlorid	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D
^{13}C -Glucose	Cambridge Isotope Laboratories, Inc., Tewksbury, MA, USA
Cobaltchlorid	Fluka, Sigma Aldrich, St. Louis, MI, USA
Coomassie® Brilliant Blau R-250	AppliChem, Darmstadt, D
Cytidin-5'-diphosphat-cholin	Enzo Life Sciences, Farmingdale, NY, USA
D-Biotin	Amresco, Solon, OH, USA
di-Natriumhydrogenphosphat	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Fluka, Sigma Aldrich, Steinheim, D
1,4- Dithioerythritol (DTE)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D

Eisen(III)-chlorid	VWR Prolabo Chemicals, Fontenay sous Bois, F
Essigsäure	VWR Prolabo Chemicals, Leuven, B
Ethanol, biology grade	VWR Prolabo Chemicals, Leuven, B
Ethanol, technisch	VWR Prolabo Chemicals, Fontenay sous Bois, F
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	AppliChem, Darmstadt, D
Glucose	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D
L-Gluthathion	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D
Glycerin	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D
Glycin	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D
Guanidiniumchlorid	VWR Prolabo Chemicals, Leuven, B
Guanosin-5'-diphosphat (GDP)	Carbosynth. Berkshire, UK
Guanosin-5'-triphosphat (GTP)	VWR Prolabo Chemicals, Leuven, B
2-(4-(2-Hydroxyethyl) -1-piperazinyl) - ethansulfonsäure (HEPES)-Natriumsalz	VWR Prolabo Chemicals, Fontenay sous Bois, F
Imidazol	Alfa Aesar GmbH & Co KG, Karlsruhe, D
Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG)	Carbosynth, Berkshire, UK
Isopropanol, biology grade	VWR Prolabo Chemicals, Leuven, B
Kaliumchlorid	VWR Prolabo Chemicals, Leuven, B
Kaliumdihydrogenphosphat	VWR Prolabo Chemicals, Leuven, B
LB-Medium	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D
Magnesiumchlorid	VWR Prolabo Chemicals, Leuven, B
Magnesiumsulfat	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D
Manganchlorid	Bernd Kraft GmbH, Duisburg, D
(2'-(or-3')-O-(N-Methylantraniloyl)-GDP (mant-GDP)	Jena Bioscience, Jena, D
mant-GTP	Jena Bioscience, Jena, D
Methanol	Fluka, Sigma Aldrich, St. Louis, MI, USA
¹⁵ N-Ammoniumchlorid	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Natriumazid	Alfa Aesar GmbH & Co KG, Karlsruhe, D
Natriumchlorid	VWR Prolabo Chemicals, Leuven, B
Natriumdihydrogenphosphat Monohydrat	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D
Natriumhydroxid	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D

Nicotinsäure	Alfa Aesar GmbH & Co KG, Karlsruhe, D
Nickelsulfat Hexahydrat	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Amresco, Solon, OH, USA
RotiBlock®	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D
Salzsäure	VWR Prolabo Chemicals, Fontenay sous Bois, F
Tetrabutylammoniumbromid (TbaBr)	Alfa Aesar GmbH & Co KG, Karlsruhe, D
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Amresco, Solon, OH, USA
Trifluoressigsäure (TFA)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D
Tween®-20	Fluka, Sigma Aldrich, St. Louis, MI, USA
Vitamin B12	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Xylencyanol	AppliChem, Darmstadt, D
Zinksulfat	VWR Prolabo Chemicals, Leuven, B

5.1.2 Verbrauchsmaterial

Tabelle 5-2: Verwendete Verbrauchsmaterialien mit Herstellerangaben.

Material	Hersteller
Amicon Filtereinheiten	Merck Millipore, Cork, IRL
Bottletop Filter	Berrytec, Grünwald, D
Dialyseschlauch	Serva Electrophoresis, Heidelberg, D
DNA Stain G	Serva Electrophoresis, Heidelberg, D
Kanülen	Braun, Melsungen, D
Konzentratoren Spin-X-UF 500	Corning, Lowell, MA, USA
Küvetten (UV-Vis)	Sarstedt, Nümbrecht, D
Mikrotiterplatten 96 well	Greiner BioOne, Kremsmünster, Ö
NAP-5, NAP-10 Säulen	GE Healthcare, München, D
Nitrocellulosemembran	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D
Nitrocellulose Filtermembran	Merck Millipore, Cork, IRL
Pasteurpipetten	Sarstedt, Nümbrecht, D
PD-10 Säulen	GE Healthcare, München, D
PCR Reaktionsgefäße	Sarstedt, Nümbrecht, D
Petrischalen	Sarstedt, Nümbrecht, D
Reaktionsgefäße (1,5 ml, 2 ml)	Ratiolab, Dreieich, D

Reaktionsgefäße braun (1,5 ml)	Sarstedt, Nümbrecht, D
Reaktionsgefäße (15 ml, 50 ml)	Sarstedt, Nümbrecht, D
Serologische Pipetten (5 ml, 10 ml, 25 ml, 50 ml)	Sarstedt, Nümbrecht, D
Pipettenspitzen (1-10 µl)	StarLab, Hamburg, D
Pipettenspitzen (10-100 µl)	Sarstedt, Nümbrecht, D
Pipettenspitzen (100-1000 µl)	Brand, Wertheim, D
Quartzglasküvetten (10 mm, 1 mm)	Hellma Analytics, Müllheim, D
Spritzenvorsatzfilter	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D
Spritzen	Braun, Melsungen, D
Whatman Papier	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D
ZipTips	Merck Millipore, Cork, IRL

5.1.3 Chromatographiesäulen

Tabelle 5-3: Verwendete Säulen mit Herstellerangaben.

Säule	Hersteller
Superdex 75 16/600	GE Healthcare, München, D
Superdex 200 16/600	GE Healthcare, München, D
Superdex 75 10/300 GL	GE Healthcare, München, D
Superdex 200 10/300 GL	GE Healthcare, München, D
HiTrap Chelating HP	GE Healthcare, München, D
MBPTrap HP	GE Healthcare, München, D
GSTrap 4B	GE Healthcare, München, D
ProntoSIL C18 AQ	Bischoff Chromatography, Leonberg, D
Aeris Widepore C4 2.1 50 mm	Phenomenex, Torrance, CA, USA
Aeris Widepore C4 3.6	Phenomenex, Torrance, CA, USA

5.1.4 Enzyme

Tabelle 5-4: Verwendete Enzyme mit Herstellerangaben.

Enzym	Hersteller
Q5® High fidelity polymerase	NEB, Ipswich, MA, USA
Inorganische Pyrophosphatase	NEB, Ipswich, MA, USA
Phosphodiesterase I (snake venom)	Affimetrix, Santa Clara, CA, USA
Quick Ligase	NEB, Ipswich, MA, USA
TEV Protease	AG Itzen
PreScission Protease	AG Itzen
DNase I	AppliChem, Darmstadt, D
Restriktionsenzyme	NEB, Ipswich, MA, USA

5.1.5 Antikörper

Tabelle 5-5: Verwendete Antikörper mit Herstellerangaben.

Antikörper	Organismus	Quelle
anti-Rab1-AMP	Hase	Biogenes, Dortmund, D
anti-Thr-AMP	Hase	Biogenes, Dortmund, D
anti-rabbit IgG HRP	Ziege	Sigma Aldrich, Steinheim, D

5.1.6 Kits

Tabelle 5-6: Verwendete Kits mit Herstellerangaben.

Kit	Hersteller
PureYield™ Plasmid Miniprep system	Promega, Mannheim, D
PureYield™ Plasmid Midiprep system	Promega, Mannheim, D
Wizard® SV Gel and PCR cleanup system	Promega, Mannheim, D
Monarch® DNA Gel extraction kit	NEB, Ipswich, MA, USA
Q5® site directed mutagenesis kit	NEB, Ipswich, MA, USA
Mix and Go <i>E. coli</i> Transformation Kit and Buffer Set	Zymo Research Corp, Irvine, CA, USA

5.1.7 Größenstandards

Tabelle 5-7: Verwendete Größenstandards mit Herstellerangaben.

Standard	Hersteller
Protein Test Mixture 6 for SDS-PAGE Color Prestained Protein Standard, broad range	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, D NEB, Ipswich, MA, USA
2-Log DNA Leiter	NEB, Ipswich, MA, USA
Gel Filtration Standard	Bio-Rad, München, D

5.1.8 Plasmide

Tabelle 5-8: Verwendete Plasmidkonstrukte.

Protein	Plasmidkonstrukt	Quelle
Rab1b 3-174	2142 pMAL Rab1b 3-174	[40]
DrrA 340-533	2144 pET19mod DrrA 340-533	[40]
DrrA 8-533	2592 pET19mod DrrA 8-533	[40]
Dock9 1605-2032	2766 pET19 Dock9 1605-2032	[40]
TBC1D20 1-362	2817 pET19mod TBC1D20 1-362	[53]
Cdc42 1-188	2907 pOPINM Cdc42 1-188	AG Goody
DrrA N451A R453A D480A S485A	2929 pET19mod DrrA N451A R453A D480A S485A	[53]
VopS 31-378	3182 pMAL VopS 31-378	AG Goody
Cdc42 1-179	3193 pGEX 4T1 Cdc42 1-179	AG Goody
IbpA 3482-3797	3277 pMAL IbpA 3482-3797	AG Goody
SidD 1-507	3410 pET19mod SidD 1-507	[73]
Rab1b 3-174 Q67A	3588 pMAL Rab1b 3-174 Q67A	diese Arbeit
Cdc42 1-188 Q61L	M0150 pOPINM Cdc42 1-188 Q61L	diese Arbeit

SidD 37-350	M0151 pET19mod SidD 37-350	diese Arbeit
Rab1b 3-174 V43A	M0266 pMAL Rab1b 3-174 V43A	diese Arbeit
Rab1b 3-174 F45A Q67A	M0312 pMAL Rab1b 3-174 F45A Q67A	diese Arbeit
Rab1b 3-174 Q67A Y77E	M0721 pMAL Rab1b 3-174 Q67A Y77E	diese Arbeit
Rab1b 3-174 Q67A+DrrA 8-533	M0814 pETDuet MBP-Rab1b 3-173 Q67A_DrrA 8-533	diese Arbeit
Cdc42 1-179 Q61L	M0890 pGEX 4T1 Cdc42 1-179 Q61L	diese Arbeit
Cdc42 1-179 Q61A	M0969 pGEX 4T1 Cdc42 1-179 Q61A	diese Arbeit
IbpA 3483-3793 H3717A	M1070 pET19 IbpA 3483-3793 H3717A	diese Arbeit
IbpA 3483-3793 H3717A	M1073 pMAL IbpA 3483-3793 H3717A	diese Arbeit

5.1.9 Oligonukleotide

Alle Oligonukleotide wurden von IDT (Integrated DNA Technologies, Leuven, B) oder Eurofins Genomics (Ebersberg, D) bezogen.

Tabelle 5-9: Verwendete Oligonukleotide.

Name	Sequenz 5' – 3'
Cdc42 Q61L fwd	GATACTGCAGGGCTGGAGGATTATGACAG
Cdc42 Q61L rev	CTGTCATAATCCTCCAGCCCTGCAGTATC
Rab1b Q67A fwd	GATCTGGGATACCGCTGGTGCAGAACGTTTCCGTACC
Rab1b Q67A rev	GGTACGGAAACGTTCTGCACCAGCGGTATCCCAGATC
SidD 37-350 fwd	GGAATTCCATATGCGTTTCGATTATTACACAAATCTGT
SidD 37-350 rev	CCGCTCGAGTTATGATAAAGCATGAATTCT
Rab1b V43A fwd	ATATCAGTACCATTGGCGCCGACTTCAAATCCGTAC
Rab1b V43A rev	GTACGGATTTTGAAGTCGGCGCCAATGGTACTGATAT
Rab7 A43V fwd	GTATAAAGCTACTATCGGCGTAGATTTCTGACTAAAGAAG
Rab7 A43V rev	CTTCTTTAGTCAGGAAATCTACGCCGATAGTAGCTTTATAC
Rab1b Y77E	TTTCCGTACCATTACCAGCTCCTATGAGCGTGGTGCTCATG
MBP_Rab1_EcoR1 fwd	AAAGAATTCATGAACACCATT CATCACCATCACCATCAC

Cdc42 Q61A fwd	TACTGCAGGGGCAGAGGATTATG
Cdc42 Q61A rev	TCAAAAAGTCCAAGAGTATATG
Cdc42_Nde1_fwd	GGAATTCCATATGCAGACAATTAAGTGTGTTGTTGTG
Cdc42 T17N fwd	TGTTGGTAAAAATTGTCTCCTGATATCCTACACAACAAAC
Cdc42 T17N rev	GCACCATCGCCCACAACA

5.1.10 Medien

Tabelle 5-10: Spurenelement-Mix (1000x).

Substanz	Konzentration
FeCl ₃ x 6 H ₂ O	50 mM
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	20 mM
MnCl ₂ x 4 H ₂ O	10 mM
ZnSO ₄ x 7 H ₂ O	10 mM
CoCl ₂ x 6 H ₂ O	2 mM
CuCl ₂ x 2 H ₂ O	2 mM
NiSO ₄ x 6 H ₂ O	2 mM
Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O	2 mM
Na ₂ Se ₂ O ₃	2 mM
H ₃ BO ₃	2 mM

Tabelle 5-11: Vitamin-Mix (1000x).

Substanz	Konzentration
Thiamin (Vitamin B1)	100 mM
Niacin (Vitamin B3)	100 mM
Biotin (Vitamin H)	100 mM
Cobalamin (Vitamin B12)	10 mM

Tabelle 5-12: Zusammensetzung M9 Medium.

Substanz	Konzentration
Na ₂ HPO ₄	42 mM
KH ₂ PO ₄	22 mM
NaCl	8,5 mM

CaCl ₂	0,1 mM
¹⁵ NH ₄ Cl	1 g/l
D-Glucose bzw. D-Glucose(U-13C6)	10 g/l bzw. 2 g/l
Spurenelement-Mix (1000x)	1x
Vitamin Mix (1000x)	1x
Antibiotika (1000x)	1x

Tabelle 5-13: Zusammensetzung SOC Medium.

Substanz	Konzentration
Hefeextrakt	5 g/l
Trypton	20 g/l
NaCl	5 M
KCl	3 M
MgCl ₂	1 M
MgSO ₄	1 M
Glucose	3,96 g/l

5.1.11 *E. coli* Stämme

Tabelle 5-14: *E. coli* Stämme.

<i>E. coli</i> Stamm	Genotyp	Hersteller
BL21 DE3	F- <i>ompT hsdSB</i> (rB- mB-) <i>gal dcm+</i> <i>Tetr gal λ</i> (DE3)	Novagen, Merck Bio-sciences Ltd, Nottingham, UK
BL21 DE3 RIL	B F- <i>ompT hsdS</i> (rB- mB-) <i>dcm+</i> <i>Tetr gal λ</i> (DE3) <i>endA Hte [argU ileY leuW (Camr)]</i>	Stratagene, Agilent Technologies, Waldbronn, D
Mach1	Δ <i>recA1398 endA1 tonA</i> Φ 80 Δ <i>lacM15 ΔlacX74 hsdR</i> (rK ⁻ mK ⁺)	Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, MA, USA

XL1-Blue	endA1 gyrA96(nal ^R) thi-1 recA1 relA1 lac glnV44 F'[::Tn10 proAB ⁺ lacI ^q Δ(lacZ)M15] hsdR17(r _K ⁻ m _K ⁺)	Stratagene, Agilent Technologies, Waldbronn, D
----------	---	---

5.1.12 Antibiotika

Tabelle 5-15: Antibiotika.

Antibiotikum	Endkonzentration	Hersteller
Ampicillin	126 µg/ml	Applichem, Darmstadt, D
Chloramphenicol	34 µg/ml	Applichem, Darmstadt, D
Kanamycin	50 µg/ml	Applichem, Darmstadt, D

5.1.13 Häufig verwendete Lösungen

Tabelle 5-16: Häufig verwendete Lösungen.

Lösung	Zusammensetzung
SDS-PAGE Probenpuffer (2x)	62,3 mM Tris-HCl pH 6,8 10 % (v/v) Glycerol 5 % (v/v) β-Mercaptoethanol 2 % (w/v) SDS 0,001 % (w/v) Bromphenolblau in ddH ₂ O
SDS-PAGE Laufpuffer (10x)	1,9 M Glycin 250 mM Tris Base 35 mM SDS in ddH ₂ O
SDS-PAGE Trenngel-Puffer (4x)	1,5 M Tris Base pH 6,8 14 mM SDS in ddH ₂ O

SDS-PAGE Sammelgel-Puffer (4x)	500 mM Tris Base pH 6,8 14 mM SDS in ddH ₂ O
SDS-PAGE Färbelösung	44 % (v/v) Ethanol 44 % (v/v) ddH ₂ O 12 % (v/v) Essigsäure 0,15 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue R-250
SDS-PAGE Entfärbelösung	10 % (v/v) Essigsäure in ddH ₂ O
TAE Puffer (50x)	1 M Tris pH 8,0 2 M Essigsäure 0,5 M EDTA
DNA-Ladepuffer (10x)	50 % (v/v) Glycerol 10 mM EDTA 0,2 % (w/v) Bromphenolblau 0,2 % (w/v) Xylencyanol in ddH ₂ O
PBS (20x)	2,74 M NaCl 53,7 mM KCl 202 mM Na ₂ HPO ₄ (2xH ₂ O) 35,2 mM KH ₂ PO ₄ in ddH ₂ O
TBS-T	150 mM NaCl 50 mM Tris Base pH 7,6 0,1 % Tween 20 in ddH ₂ O
Blotting-Puffer	48 mM Tris Base 39 mM Glycin

	1,3 mM SDS 20 % (v/v) Methanol in ddH ₂ O
ABTS Substratlösung	70 mM Zitrat-Phosphat-Puffer pH 4,2 1 mM ABTS

5.1.14 Geräte

Tabelle 5-17: Geräte mit Herstellerangaben.

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Analysenwaage	ACJ 120-4M	Kern, Balingen, D
Autoklav	Systec VE-65	Systec, Linden, D
CD-Spektrometer	Jasco-715	Jasco, Groß-Umstadt, D
Elektronische Pipettierhilfe	Eppendorf Easypet®	Eppendorf, Hamburg, D
ESI-Massenspektrometer	1) MS: LCQ-Fleet HPLC: Ultimate 3000 2) MS: 6130 Quadrupole LC-MS HPLC: Single Quad M	Thermo Scientific, München, D Dionex, Dreieich, D Agilent Technologies, Oberhaching, D
Feinwaage	EG 2200-2NM	Kern, Balingen, D
Fluoreszenzspektrometer	Fluoromax-3/4	Horiba Jobin Yvon, Fukuoka, J
FPLC	Äkta Prime Plus	GE, Freiburg, D
Gelelektrophoresekammer	Mini Protean™ Tetra System	BioRad, München, D
Heizblock	AccuBlock™ Digital Dry Bath	Labnet International Inc., Edison, USA
HPLC	Prominence System	Shimadzu, Tokio, J
Imager	Image Quant LAS 4000	GE, Freiburg, D
Inkubationsschüttler	Innova 44	New Brunswick, Eppendorf, Hamburg, D
Inkubator	B28	Binder, Tuttlingen, D
Laserscanner	Typhoon 9200	GE, Freiburg, D

Nanodrop	NanoDrop 2000 Spectrophotometer	Peqlab, Erlangen, D
NMR Spektrometer	Bruker Avance II/ III (600, 800 oder 900 MHz)	Bruker, Billerica, MA, USA
Orbitalschüttler	Shaker-Dos-10L	Neolab, Heidelberg, D
pH-Meter und Elektrode	pHenominal™ und pHenominal 111	VWR, Radnor, USA
Pipetten	Eppendorf Research® plus	Eppendorf, Hamburg, D
Plattenleser	Tecan GENios	Tecan Group Ltd., Männedorf, CH
Power Supply	PowerPac™ Basic EPS 601	BioRad, München, D
Semi-Dry-Blotter	V20-SDB	Scie-Plas, Holliston, MA, USA
Thermocycler	T100™ Thermo Cycler	BioRad, München, D
Thermomixer	Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg, D
Tischzentrifuge	5424, 5424R, 5810R	Eppendorf, Hamburg, D
Ultraschallgerät	Sonifier 250	Branson, Fürth, D
Ultratiefkühlgerät	U410 Freezer	New Brunswick, Eppendorf, Hamburg, D
UV-Vis-Spectrophotometer	Novaspec II	Pharmacia, Uppsala, S
Vakuumpumpe	Divac 2.4L	Leybold, Köln, D
Vortexer		Heidolph, Schwabach, D
Wasseraufbereitungssystem	TKA-GenPure 08.223	Thermo Scientific, Wilmington, MA, USA
Zellaufschlussmaschine	Constant Cell Disruption System	Constant Systems Limited, Northants, UK
Zellhomogenisator	Silent Crusher M	Heidolph, Schwabach, D
Zentrifuge	Avanti® J-26 XP, Rotor JA 25.50	Beckman Coulter, Brea, CA, USA
	Sigma 8K	Sigma Laborzentrifugen, Osterode am Harz, D

5.1.15 Software

Tabelle 5-18: Software.

Software	Hersteller
ChemBioDraw Ultra 14.0	Cambridgesoft, Perkin Elmer, Waltham, MA, USA
Origin Pro 9.1 G	OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA
PyMOL 1.7.0.1	Schrödinger LLC, New York, NY, USA
Xcalibur 2.1	Thermo Fisher Scientific, München, D
MagTran 1.02	MagTran, Amgen Inc., Thousand Oaks, CA, USA
Microsoft Office 2010/13/16	Microsoft, Redmond, WA, USA

5.2 Methoden

5.2.1 Molekularbiologische Methoden

5.2.1.1 Transformation chemisch kompetenter Zellen

Chemisch kompetente *E. coli* Zellen wurden mittels Hitzeschock mit Plasmid-DNA transformiert. Hierzu wurden 100 µl Zellen mit der DNA versetzt und 30 min auf Eis inkubiert. Es folgte ein Hitzeschritt bei 42 °C für 45 s und eine 2-minütige Inkubation auf Eis. Die Zellen wurden mit 900 µl SOC Medium versetzt und für 45 min bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Die Zellsuspension wurde pelletiert, auf entsprechende antibiotikahaltige LB-Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Alternativ wurde die Transformation mit Zellen durchgeführt, die über das „Mix and Go *E. coli* Transformation Kit“ kompetent gemacht wurden. Hierzu wurde die DNA-Zellen Mischung für 10 Minuten auf Eis inkubiert und dann im Falle von Ampicillin direkt auf Agarplatten ausplattiert, im Falle anderer Antibiotika nach Zugabe von SOC Medium und 30-minütiger Inkubation bei 37 °C ausplattiert.

5.2.1.2 Anzucht von *E. coli* Kulturen

E. coli Kulturen wurden in mit entsprechenden Antibiotika versetztem LB-Medium kultiviert. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C unter Schütteln.

5.2.1.3 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Plasmid DNA wurde mit Hilfe des PureYield™ Plasmid Miniprep oder Midiprep Kits aus *E. coli* Zellen isoliert.

5.2.1.4 Agarosegelelektrophorese

Die Trennung von DNA Fragmenten nach ihrer Größe erfolgte über Agarosegelelektrophorese. 5 %ige Agarosegele wurden mit 1 µl G-Stain versetzt und nach Aushärtung mit Ladepuffer versetzte DNA Proben in die Taschen geladen. Die Laufkammer wurde mit 1x TAE Puffer befüllt. Eine konstante Spannung von 100 V wurde zur Migration der DNA angelegt. DNA-Banden wurden mit Hilfe des 2-log DNA Standards einer Größe zugeordnet.

5.2.1.5 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion (engl. polymerase chain reaction, PCR) dient zur Amplifikation von DNA. Durch Zyklen von Denaturierung des DNA Stranges, Bindung der Primer und Verlängerung durch eine DNA Polymerase, werden Kopien des DNA Fragments erzeugt. Je nachdem, ob DNA vervielfältigt werden sollte oder die Insertion eines DNA-Fragments überprüft werden sollte, wurden präparative oder analytische Ansätze durchgeführt (siehe Tabelle 5-19). Alle PCR Reaktionen wurden in einem T100™ Thermocycler (BioRad) durchgeführt. Für die analytische PCR wurden bakterielle Einzelkolonien in 20 µl ddH₂O resuspendiert.

Tabelle 5-19: PCR Ansätze.

präparative PCR	analytische PCR
50 ng Plasmid	2 µl Bakteriensuspension
je 1 µM Oligonukleotide	je 1 µM Oligonukleotide
200 µM dNTPs	200 µM dNTPs
1x Q5 Reaktionspuffer	1x Q5 Reaktionspuffer
1 u Q5 Polymerase	0,125 u Q5 Polymerase
ddH ₂ O auf 50 µl	ddH ₂ O auf 12 µl
Reaktionsprogramm:	Reaktionsprogramm:
98 °C 30 s 98 °C 10 s 50-72 °C 20 s 72 °C 20-30 s/kb 72 °C 5 min	98 °C 5min 98 °C 10 s 55 °C 20 s 72 °C 1 min 72 °C 2 min
} 30x	} 25x

5.2.1.6 Mutagenese von Plasmid-DNA

Der Austausch von einzelnen Basen einer Plasmid-DNA erfolgte über ortsspezifische Mutagenese. Zum Design der Primer wurde das QuikChange Primer Design Programm von Agilent verwendet. Alternativ wurde die ortsspezifische Mutagenese mit dem „Q5 site directed mutagenesis kit“ nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

5.2.1.7 Restriktionsverdau

Um DNA Fragmente in Plasmide einzuführen, wurde ein enzymatischer Restriktionsverdau mit anschließender Ligation durchgeführt. Der präparative Restriktionsverdau von 1-5 µg DNA erfolgte im 50 µl Ansatz mit 20 u Restriktionsendonuklease und dem zugehörigen Puffer laut Herstellerangaben bei 37 °C für mindestens 2 h. Anschließend folgte eine Hitzeinaktivierung der Enzyme.

5.2.1.8 Dephosphorylierung von Vektor-DNA

Um eine Religation des Vektors nach dem Restriktionsverdau zu verhindern, wurde eine Dephosphorylierungsreaktion durchgeführt. Dazu wurde der geschnittene Vektor mit 5 u antarktischer Phosphatase (NEB) im zugehörigen Puffer bei 37 °C für 15-60 min inkubiert. Die Hitzeinaktivierung erfolgte bei 80 °C für 5 min.

5.2.1.9 Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen

Zur Aufreinigung des Restriktionsverdaus wurde eine Agarosegelelektrophorese durchgeführt, DNA Banden ausgeschnitten und mithilfe des „Wizard SV Gel and PCR Cleanup Systems“ (Promega) oder des „Monarch® DNA Gel extraction kit“ (NEB) aufgereinigt. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte über die Messung der Absorption bei 260 nm am Nanodrop.

5.2.1.10 Ligation von DNA Fragmenten

Die Ligation von DNA Fragmenten erfolgte mit Hilfe der Quick Ligase (NEB). Es wurde 100 ng Vektor mit Vektor zu Insert Verhältnissen von 1:2 bis 1:5 eingesetzt. Die Ligrationsreaktion erfolgte mit 1 µl Ligase bei 25 °C für 5 min in 1x Reaktionspuffer.

5.2.1.11 DNA Sequenzierung

Die Sequenzierung von DNA wurde über den GATC NightExpress Sequenzierungsservice durchgeführt. Dazu wurden 5 µl einer 5 pmol/µl Primerverdünnung mit 5 µl zu sequenzierender DNA vermischt.

5.2.2 Proteinchemische Methoden

5.2.2.1 Proteinproduktion und –reinigung

5.2.2.1.1 Produktion unmarkierter Proteine

E. coli Kulturen wurden bei 37 °C bis zu einer OD von 0,6–0,8 kultiviert. Nach Abkühlen der Zellen bei 4 °C wurde die Genexpression durch Zugabe von 0,5–1 mM IPTG induziert. Proteine wurden über Nacht bei 20–25 °C hergestellt.

5.2.2.1.2 Produktion ^{15}N bzw. $^{13}\text{C}^{15}\text{N}$ markierter GTPasen

Die Produktion von ^{15}N bzw. $^{13}\text{C}^{15}\text{N}$ markierten Proteinen erfolgte in M9-Minimalmedium, das mit 1 g/l ^{15}N -Ammoniumchlorid bzw. 1 g/l ^{15}N -Ammoniumchlorid und 2 g/l ^{13}C -Glucose versetzt wurde. Expressionskulturen wurden mit einer Start-OD von 0,1 aus einer LB-Vorkultur (für ^{15}N markierte Proteine) bzw. einer M9-Vorkultur (für $^{13}\text{C}^{15}\text{N}$ markierte Proteine) angeimpft. Die Kultivierung der Zellen erfolgte bis zu einer OD von 0,6–0,8 bei 37 °C. Anschließend wurden die Zellen 20 min bei 4 °C abgekühlt und die Expression durch Zugabe von 0,5 mM IPTG induziert. Die Produktion der Proteine erfolgte bei 25 °C über Nacht.

5.2.2.1.3 Produktion $^2\text{H}^{13}\text{C}^{15}\text{N}$ markierter Proteine in D_2O

Teilweise dreifach markierte Proteine wurden in M9-Medium, bei dem H_2O durch D_2O ersetzt wurde, produziert. Hierzu wurde die Transformation des Expressionskonstrukts in kompetente Zellen direkt auf 50 % D_2O enthaltende M9-Platten ausplattiert. Nach ausreichender Inkubation wurden zur Selektion mit drei Kolonien Flüssigkulturen in 50 % D_2O M9-Medium angeimpft. Die Kultur mit den besten Eigenschaften wurde in 70 % D_2O M9-Medium überimpft und bei 37 °C bis zum Erreichen der exponentiellen Phase kultiviert. Dann wurden 100 μl der Kultur pelletiert und auf eine 90 % D_2O M9-Platte ausplattiert. Drei einzelne Kolonien wurden dann in 90 % D_2O -M9-Flüssigmedium überführt und aus der Kultur mit den besten Eigenschaften wurde nochmals eine frische 90 % D_2O M9-Flüssigkultur hergestellt. Diese wurde bei 25 °C für drei Tage bis zu einer OD von ca. 3 kultiviert. Aus dieser Kultur wurde eine 100 ml Vorkultur mit einer Start-OD von 0,15 in D_2O -M9-Medium angeimpft, das zusätzlich 2 g/l ^{13}C -Glucose enthielt und über Nacht bei 37 °C bis zu einer OD von 1,5 inkubiert. Die Hauptkultur wurde in identischem Medium mit einer Start OD von 0,2 angeimpft und bis zum Erreichen einer OD von 0,6 bei 37 °C kultiviert. Die Expression wurde mit 0,5 mM IPTG induziert und erfolgte über Nacht bei 25 °C.

5.2.2.1.4 Zellernte

Die Ernte der Zellen erfolgte in einer Sigma 8K Zentrifuge bei 8000 rpm für 25 min. Das Zellpellet wurde mit 1x PBS gewaschen und direkt weiterverwendet oder bei -20 °C gelagert.

5.2.2.1.5 Zellaufschluss

Das Zellpellet wurde in Proteinpuffer mit einer Spatelspitze DNase 1 resuspendiert und die Zellen in einer Zellaufschlussmaschine bei 1,8 kbar aufgeschlossen. Nach Zugabe von 1 mM PMSF Proteaseinhibitor wurde das Zelllysate bei 20000 rpm für 45 min in einer Beckmann Zentrifuge geklärt. Der Überstand wurde auf die entsprechende Säule aufgetragen.

5.2.2.1.6 Reinigung von Proteinen

Proteine wurden je nach Affinitätstag mit den entsprechenden in Kapitel 5.2.3 beschriebenen chromatographischen Methoden aufgereinigt. Die pH-Werte der verwendeten Puffer richten sich nach dem isoelektrischen Punkt und können der Tabelle 5-20 entnommen werden. Proteinpuffer für die erste Säule setzten sich aus 50 mM HEPES oder TrisHCl; 500 mM NaCl; 2 mM DTE und für GTPasen zusätzlich 1 mM MgCl₂ und 10 µM GDP zusammen.

5.2.2.1.7 Proteolytischer Verdau des Affinitätstags

Alle gereinigten Proteine enthielten zur Abspaltung des Affinitätstags entweder eine *Tobacco Etch Virus* (TEV) – oder eine *PreScission*-Schnittstelle. Der Verdau mit der entsprechenden Protease erfolgte über Nacht bei 6 °C während der Dialyse.

5.2.2.1.8 Dialyse

Die Dialyse von Proteinlösungen erfolgte gegen mindestens 50 Volumen eines elutionsmittel-freien Dialysepuffers bei 6 °C über Nacht. Hierzu wurden Dialyseschläuche mit einer Ausschlussgrenze von 12-14 kDa (Serva) verwendet.

5.2.2.1.9 Konzentrierung von Proteinlösungen

Die Konzentrierung von Proteinlösungen erfolgte mit Hilfe von Amicon Ultra Zentrifugalfiltereinheiten (Merck Millipore) mit entsprechendem Ausschlussvolumen bei 4000 rpm in einer Eppendorf Zentrifuge mit Schwingrotor.

5.2.2.1.10 Lagerung von Proteinen

Proteine wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

5.2.2.1.11 Präparativer Nukleotidaustausch

Der Nukleotidaustausch kleiner GTPasen erfolgte durch die Inkubation mit 5–10 mM Ethylen-diamintetraessigsäure (EDTA) und 20-30x Nukleotid bzw. 5x mant-Nukleotid bei 25 °C in Austauschpuffer (20 mM HEPES pH 7,5; 50 mM NaCl; 2 mM DTE).

Für den Austausch zu GppNHp wurde das Protein 1:1 mit GppNHp versetzt und mit 5 Units alkalischer Phosphatase pro mg Rab Protein in Austauschpuffer (50 mM TrisHCl pH 8; 200 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 10 μM ZnCl_2) bei 25 °C inkubiert.

Überschüssiges Nukleotid wurde über eine PD10 Säule (GE) in 20 mM HEPES pH 7,5; 50 mM NaCl; 2 mM DTE; 1 mM MgCl_2 ; 10 μM Nukleotid abgetrennt. Der Nukleotidzustand wurde durch Umkehrphasen-HPLC Analyse verifiziert.

5.2.2.1.12 Präparative Modifikation

Für die präparative Modifikation von kleinen GTPasen wurden die Proteine mit einem 2,5-fachen molaren Überschuss an Nukleotid und dem respektiven adenylylierenden Enzym in einem 0,01 molaren Verhältnis versetzt und bei Raumtemperatur inkubiert. Die vollständige Modifikation wurde über massenspektrometrische Analyse überprüft. Das modifizierte Protein wurde über Größenausschlusschromatographie (20 mM HEPES pH 8,0; 50 mM NaCl; 2 mM DTE; 1 mM MgCl_2 ; 10 μM GDP) gereinigt.

5.2.3 Chromatographische Methoden

5.2.3.1 Metallaffinitätschromatographie

Die immobilisierte-Metallionen-Affinitätschromatographie (engl. immobilized metal affinity chromatography, IMAC) ermöglicht die Isolierung von Proteinen mit His-Tag aus Zelllysaten [142]. Bei der hier verwendeten Nickel-Affinitätschromatographie wechselwirken an einer Matrix immobilisierte Nickelionen mit dem Imidazolring der Histidine des His-Tags.

Für Proteine mit 6xHis-Tag wurde das geklärte Lysat mit einem Fluss von 3 ml/min auf eine HiTrap-Chelating-Säule (GE) geladen. Anschließend wurde mit 5 Säulenvolumen (SV) Reinigungspuffer und 5 SV Puffer mit 25 mM Imidazol gewaschen. Die Elution erfolgte in einem Gradienten von 25 bis 500 mM Imidazol in 100 ml. Es wurden 5 ml Fraktionen gesammelt und anschließend per SDS-PAGE analysiert. Die proteinenthaltenden Fraktionen wurden vereinigt und über Nacht folgte ein Proteaseverdau mit TEV- oder *PreScission*-Protease während der

Dialyse in imidazolfreiem Puffer. Es folgte ein erneuter Auftrag auf die HiTrap-Säule zur Entfernung von Tag und Protease, anschließende Aufkonzentrierung und Gelfiltration in Gelfiltrationspuffer.

5.2.3.2 Affinitätschromatographie MBP-tag

Das Maltose bindende Protein (MBP) als Tag für rekombinante Proteine erhöht die Löslichkeit und kann auch für die Isolierung von Proteinen aus Zelllysaten verwendet werden. Spezielle Dextrin-Sephadex Säulen ermöglichen die spezifische Bindung von MBP. Die Elution der gebundenen Proteine erfolgt mit Maltose.

5.2.3.3 Affinitätschromatographie GST-tag

Ein häufig verwendeter Affinitätstag zur Erhöhung der Löslichkeit ist der Glutathion-S-Transferase (GST)-tag. Proteine mit einem GST tag können über eine Matrix, an der Glutathion immobilisiert ist, aufgereinigt werden. Die Elution erfolgt durch Konkurrenz mit Glutathion im Puffer.

5.2.3.4 Größenausschlusschromatographie

Bei der Größenausschlusschromatographie (engl. size exclusion chromatography) erfolgt die Trennung von Molekülen nach Größe. Die Säulenmatrix besteht aus einem Gel poröser Partikel, in die kleinere Moleküle eindringen können, was deren Retention verzögert. Größere Moleküle bleiben ausgeschlossen und eluieren früher von der Säule. Die Größenausschlusschromatographie von Proteinen erfolgte über Superdex 16/600 75 oder 200 Säulen (GE Healthcare) mit einer Flussrate von 1,5 ml/min. In Tabelle 5-20 sind die auch für die Lagerung der gereinigten Proteine verwendeten Gelfiltrationspuffer beschrieben.

Tabelle 5-20: Proteinlagerpuffer.

Protein	Gelfiltrationspuffer
Rab1b, Rab8, Cdc42	20 mM HEPES pH 7,5, 50 mM NaCl, 2 mM DTE, 1 mM MgCl ₂ , 10 µM GDP
DrrA	20 mM HEPES pH 8,0, 50 mM NaCl, 2 mM DTE
SidD, AnkX	20 mM HEPES pH 7,5, 50 mM NaCl, 2 mM DTE, 1 mM MgCl ₂
TBC1D20	20 mM HEPES pH 8,0, 100 mM NaCl, 2 mM DTE
VopS, IbpA	20 mM HEPES pH 8,0, 100 mM NaCl, 2 mM DTE, 1 mM MgCl ₂

Dock9

20 mM TrisHCl pH 8,0, 50 mM NaCl, 2 mM DTE, 5 % Glycerin

5.2.4 Analytische und biophysikalische Methoden

5.2.4.1 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Zur analytischen Auftrennung von Proteinen nach ihrer Größe wurde die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese verwendet. Proteinproben wurden 1:1 mit Probenpuffer versetzt und für 5 min bei 95 °C aufgeköcht. Die Trennung erfolgte mit 12 oder 15 %igen Gelen bei 65 mA für ca. 45 min in SDS-Laufpuffer. Färbung der Gele erfolgte durch Aufkochen in Coomassie Brilliant Blau Färbelösung bzw. Entfärben in 10 % Essigsäure. Zur Größenabschätzung wurde die Protein Test Mixture 6 for SDS PAGE (Serva Electrophoresis) genutzt.

5.2.4.2 Bestimmung von Proteinkonzentrationen

Proteinkonzentrationen wurden über die Absorption bei 280 nm am Nanodrop bestimmt. Die Aminosäuren Tryptophan, Tyrosin und Cystein zeigen hier eine Absorption. Die Berechnung der Proteinkonzentration erfolgte durch Angabe des Extinktionskoeffizienten und des Molekulargewichts über das Lambert-Beersche Gesetz nach folgender Formel:

$$A = \lg \left(\frac{I_0}{I} \right) = \varepsilon \cdot c \cdot d$$

- A Absorption der Lösung
- I_0 Intensität des eingestrahnten Lichtes
- I Intensität des abgeschwächten Lichtes
- ε Extinktionskoeffizient ($M^{-1}cm^{-1}$)
- c Proteinkonzentration (M)
- d Schichtdicke (cm)

5.2.4.3 Hochleistungsflüssigchromatographie

Die Hochleistungsflüssigchromatographie (engl. high performance liquid chromatography, HPLC) dient zur Trennung und Quantifizierung von Bestandteilen einer Mischung. Hierbei wird ein, im Vergleich zur herkömmlichen Chromatographie, hoher Druck angelegt und somit die Geschwindigkeit und Auflösung der Trennung erheblich erhöht. Bei der hier verwendeten Umkehrphasen-HPLC (engl. reversed phase HPLC) wird eine Säule durch die Anbringung von

Kohlenstoff-Ketten an das Silicamaterial unpolar gemacht, wohingegen das Lösungsmittel polar ist (z.B. durch einen Anteil an Acetonitril). Die Trennung erfolgt über die aufgrund unterschiedlicher Polarität verschieden starke Bindung an die Säulenfunktionalitäten. Für die Trennung von Nukleotiden wurde eine C18 ProntoSIL Säule (Bischoff Chromatographie) verwendet. Der Laufpuffer bestand aus 50 mM Kaliumphosphat pH 6,6; 10 mM Tetrabutylammonium-bromid und 12 % Acetonitril. Alle HPLC Analysen wurden mit einem Shimadzu HPLC System bei einer Flussrate von 1 ml/min durchgeführt. Proteinlösungen wurden auf 25-50 μ M verdünnt, 5 min bei 95 °C aufgeköcht und abzentrifugiert. Der Überstand wurde auf die Säule aufgetragen. Als Standard für die Retentionszeiten diente eine Mischung aus 50 μ M Guanosin, GMP, GDP und GTP bzw. GppNHp. Die Detektion erfolgte durch Messung der Absorption bei 254 nm.

Die Trennung von Peptiden erfolgte über eine Aeris C4 widepore column (Phenomenex) über einen binären Gradienten von 5 bis 25 % Acetonitril aus den Stammlösungen 100 % H₂O mit 0,01 % Trifluoressigsäure (TFA) und 100 % Acetonitril mit 0,01 % TFA. Peptide wurden durch Messung der Absorption bei 274 nm detektiert.

5.2.4.4 Bestimmung intrinsischer Hydrolyseraten

Zur Bestimmung intrinsischer Hydrolyseraten wurden GTPasen mit GTP beladen und bei 25 °C in Gelfiltrationspuffer inkubiert. Zu bestimmten Zeitpunkten wurden Proben entnommen, die Proteine denaturiert und der Nukleotidzustand im Überstand über Umkehrphasen-HPLC (C18) bestimmt.

5.2.4.5 GAP-Testverfahren

Die Bestimmung GAP katalysierter Hydrolyseraten erfolgte entweder über die Messung der Änderung der intrinsischen Tryptophanfluoreszenz (siehe Kapitel 5.2.4.8) oder über Bestimmung des Nukleotidzustands über Umkehrphasen-HPLC zu bestimmten Zeitpunkten. Hierzu wurde die GTPase mit dem entsprechenden GAP bei 25 °C inkubiert, zu bestimmten Zeitpunkten Proben entnommen, Proteine denaturiert und der Überstand auf einer C18 Säule analysiert.

5.2.4.6 Deadenylylierung von AMP-Peptid

Die Deadenylylierung des Peptids TITY_{AMP}-YRGAHGC durch SidD wurde zeitabhängig mit Hilfe von HPLC mit einer Aeris C4 widepore (Phenomenex) Säule analysiert. Dazu wurde 50 μ M Peptid mit 0,5 μ M SidD bei 25 °C inkubiert und zu bestimmten Zeitpunkten Proben entnommen, die auf der C4 Säule analysiert wurden. Die Verlaufskurve einer Reaktion mit 5 μ M

Peptid-AMP durch 50 nM SidD wurde in Origin durch Einsetzen einer 10x niedrigeren Ratenkonstante simuliert.

5.2.4.7 Zirculardichroismus (CD)-Spektroskopie

Die CD Spektroskopie findet Einsatz bei der Sekundärstrukturanalyse und Stabilitätsuntersuchung von Proteinen. Sie beruht auf der unterschiedlichen Absorption von links oder rechts polarisiertem Licht bei Durchgang durch optisch aktive Moleküle.

Dabei unterscheidet man zwischen Nah-UV (250-350 nm) und Fern-UV (170-250 nm). CD Messungen im Fern-UV Bereich liefern Informationen über die Sekundärstruktur von Proteinen. Das typische CD Spektrum einer α -Helix weist zwei Minima bei 208 und 220 nm auf. Ein β -Faltblatt zeigt nur ein Minimum bei 217 nm.

Die Messung von CD Spektren erfolgte im Jasco J715 CD Spektrometer (Jasco, Groß-Umstadt) gekoppelt mit einem Peltier PTC 343 Temperature Controller in 2 mM HEPES pH 7,5; 20 mM NaCl; 1 mM MgCl₂; 0,2 mM DTE. Die Aufnahme von Wellenlängen-Scans erfolgte mit 50 nm/min (10 Akkumulationen) bei 25 °C. Temperaturübergänge wurden durch konstante Erhöhung der Temperatur um 30 °C pro Stunde analysiert. Proteinkonzentrationen betragen 0,2-0,3 mg/ml.

Die molare Elliptizität pro Aminosäurerest wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\Theta_{MRW} = \frac{\Theta \cdot N_{AA} \cdot 100}{M_W \cdot c \cdot d}$$

N_{AA} Anzahl der Aminosäuren im Protein

M_W Molekulargewicht des Proteins (Da)

c Proteinkonzentration (mg/ml)

d Schichtdicke der Küvette (cm)

5.2.4.8 Fluoreszenzspektroskopie

Mithilfe der Fluoreszenzspektroskopie lassen sich Fluoreszenzänderungen über einen bestimmten Zeitverlauf nachverfolgen. In dieser Arbeit wurde sie verwendet, um die Tryptophanfluoreszenz kleiner GTPasen während des Nukleotidaustauschs und der Adenylylierung spektroskopisch zu verfolgen. Die Fluoreszenz der Tryptophane ändert sich bei Anbringung einer Modifikation oder Austausch des gebundenen Nukleotids. Die Fluoreszenz der intrinsischen

Tryptophane wurde bei 297 nm angeregt und die Emission bei 340 nm verfolgt. Alternativ zur Messung der intrinsischen Tryptophanfluoreszenz wurden GTPasen mit mant-GDP oder mant-GTP beladen und Freisetzung der mant-Nukleotide (Anregungswellenlänge 365 nm) bei 440 nm detektiert. Alle Messungen erfolgten in Fluoreszenzspektrometern der Firma Horiba Jobin Yvon (Fluoromax 3 und 4) bei 25 °C in 20 mM HEPES, pH 7,5; 50 mM NaCl; 5 mM MgCl₂; 10 µM Nukleotid und 2 mM DTE.

Die Bestimmung von katalytischen Effizienzen (k_{cat}/K_M) aus den Fluoreszenzverlaufskurven erfolgte auf Grundlage der Michaelis Menten Kinetik nach:

$$v = \frac{v_{max} \cdot S_0}{S_0 + K_M}$$

v initiale Reaktionsgeschwindigkeit ($\mu\text{M s}^{-1}$)

v_{max} maximale Reaktionsgeschwindigkeit ($\mu\text{M s}^{-1}$)

E_0 Enzymkonzentration (μM)

S_0 initiale Substratkonzentration (M)

$S(t)$ Substratkonzentration zum Zeitpunkt t

k_{cat} Wechselzahl, turnover number (s^{-1})

K_M Michaelis Menten Konstante (M)

Daraus folgt, wenn $K_M \gg S_0$

$$v = v_{max} \cdot \frac{S_0}{K_M}$$

$$S(t) = S_0 \cdot e^{-\frac{v_{max} \cdot t}{K_M}}$$

$$v_{max} = E_0 \cdot k_{cat}$$

Und somit für das Fluoreszenzsignal $F(t)$:

$$F(t) = F_A \cdot e^{\frac{k_{cat}}{K_M} \cdot E_0 \cdot t}$$

Wobei die Anfangsfluoreszenz F_A proportional zur vorliegenden Substratkonzentration ist. Die erhaltenen Messkurven wurden somit einfach exponentiell gefittet und aus der erhaltenen Geschwindigkeitskonstante konnte durch dividieren mit der Enzymkonzentration k_{cat}/K_M berechnet werden.

5.2.4.9 Bestimmung intrinsischer Nukleotidaustauschraten

Zur Bestimmung intrinsischer Nukleotidaustauschraten wurden kleine GTPasen präparativ mit mant-GDP oder mant-GTP beladen. Im Fluoreszenzspektrometer wurde durch die Zugabe von 100x GDP oder GTP das mant-Nukleotid gegen GDP oder GTP ausgetauscht und die Abnahme der mant-Fluoreszenz bei 440 nm detektiert.

5.2.4.10 Kernspinresonanz (NMR)- Spektroskopie

Alle Spektren wurden von Dr. Katja Barthelmes (Lehrstuhl für Biomolekulare NMR-Spektroskopie) aufgenommen und prozessiert. $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -HSQC NMR-Spektren wurden bei 25 °C in 20 mM HEPES, pH 7,5, 50 mM NaCl, 1 mM MgCl_2 , 2 mM DTE, 10 μM GDP/GTP, 100 μM DSS an einem Bruker Avance III 600 MHz Spektrometer mit einer 5 mm TCR CryoProbe aufgezeichnet. Es wurde ein Z-Gradient mit 2048x256 Datenpunkten in t_2 und t_1 mit 4 Scans aufgenommen.

Für die Zuordnung der *Backbone* Amidprotonen von unmodifiziertem, modifiziertem und nukleotidgebundenem Rab1b und Cdc42 wurden 3D-HNCACB, HNCO, HNCA, HNC(CA)CO und HN(CO)CA Experimente an einem Bruker AV II 600, 800 oder 900 MHz Spektrometer aufgezeichnet. Die Zuordnung wurde mit zusätzlichen 1H-1N-NOESY Spektren, die mit einer 5 mm TCI/TXI CryoProbe mittels eines Z-Gradienten mit einer Mischungszeit von 120 ms aufgezeichnet wurden, komplementiert.

5.2.4.11 Analytische Gelfiltration

Die analytische Gelfiltration ermöglicht die Bestimmung von Oligomerisierungszuständen und des Komplexbildungsverhaltens von Proteinen. Zur Untersuchung der Komplexbildung zwischen Rab1 und Effektorproteinen wurde eine Superdex 75 10/300 GL Säule an einem HPLC System benutzt. Die Interaktionspartner wurden im spezifizierten Verhältnis für 2 h bei RT inkubiert. Die Trennung erfolgte bei einer konstanten Flussrate von 0,5 ml/min in Gelfiltrationspuffer. Die Detektion erfolgte durch Messung der Absorption bei 280 nm. Erhaltene Fraktionen wurden über SDS-PAGE analysiert.

5.2.4.12 Massenspektrometrie

Die Massenspektrometrie (MS) wird angewendet, um die exakte Masse von Molekülen zu bestimmen. In dieser Arbeit wurde *Electrospray-Ionisation* (ESI)-MS verwendet. Hierbei wird ein Analyt durch Anlegen einer Spannung zu einem Aerosol verdampft. Bei der Ionisation entstehen mehrfach geladene Ionen, die anschließend im Massendetektor analysiert werden. Zur Aufbereitung der Proben wurden entweder C4-Zip-tips (Millipore) oder C4 Säulen (Aeris 3.6 widepore, Phenomenex) verwendet. Bei Nutzen von ZipTips wurde das Säulenmaterial mit 50 % Acetonitril äquilibriert und mit 0,1 %iger Ameisensäure gewaschen. Dann wurden 10 µl der Proteinlösung auf das Säulenmaterial geladen, wieder gewaschen und mit 50 % Acetonitril eluiert. Die Probenauftragung und Entsalzung auf einer Säule erfolgte über HPLC. Hierzu wurde ein Gradient von 5–40 % Acetonitril (0,1 % Formiat) mit einer Flussrate von 0,3 ml/min angelegt. Das Protein wurde dann mit einem Massenspektrometer (LCQ Fleet, Thermo Scientific oder 6130 Quadrupol LC-MS, Agilent Technologies) analysiert. Die Auswertung von Ionenspektren erfolgte über Xcalibur® (Thermo Scientific) oder OpenLab (Agilent Technologies) und MagTran [143].

5.2.4.13 Western Blot

Der Western Blot ist ein antikörperbasiertes Nachweisverfahren für Proteine. Die durch SDS-PAGE getrennten Proteine wurden hierzu auf eine Nitrozellulose Membran (Roth) übertragen. Dies erfolgte mit Hilfe eines Transferpuffers in einer Dry Blotting Apparatur bei 320 mA für 2 h. Anschließend wurden freie Bindungsstellen auf der Membran mit Rotiblock® (Roth) für 30 min blockiert, dann der primäre Antikörper zugegeben und für die spezifizierte Zeit inkubiert. Es folgten drei Waschschrte mit TBS-T, Zugabe des sekundären Antikörpers, weitere drei Waschschrte und anschließend die Detektion über die Nachweisreaktion des Sekundärantikörpers. In diesem Fall wurde die Reaktion der Horse Radish Peroxidase des Sekundärantikörpers zur Detektion genutzt. Hierfür wurde der Western Blot mit Western Bright ECL Spray (Advansta) inkubiert und die Chemolumineszenz mit einem Image Quant LAS4000 (GE) detektiert. Die densitometrische Auswertung der Banden erfolgte mit ImageJ [144].

5.2.4.14 Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Der ELISA ist eine oberflächenbasierte Methode zum Nachweis von Antigenen oder Antikörpern in einer Lösung. In der hier verwendeten Konfiguration werden Proteine oder Peptide an eine Polystyrol-Oberfläche immobilisiert und durch eine Antikörperreaktion nachgewiesen. Hierfür wurden Proteine bzw. Peptide in 10 mM PBS pH 7,2 in die Vertiefungen einer 96 well

Platte gegeben und für die angegebene Zeit inkubiert. Anschließend wurden freie Bindungsstellen mit 0,5 % Milchpulver für 2 h bei Raumtemperatur blockiert. Dann wurde der Primärantikörper in der angegebenen Konzentration zugegeben und für eine definierte Zeit bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgten fünf Waschschrte mit 10 mM PBS pH 7,2 + 0,01 % Tween-20 und die Zugabe des Sekundärantikörpers in entsprechender Verdünnung. Dann folgten erneut fünf Waschschrte und die Detektion. Im Falle des hier verwendeten *anti-rabbit-HRP* (*Horse radish peroxidase*) Konjugates erfolgte diese durch Zugabe von 100 µl mit 0,3 % H₂O₂ versetzter ABTS Lösung pro Vertiefung. Die Messung der Absorption erfolgte bei 405 nm in einem TECAN Plattenleser.

5.2.4.15 Adenylierung mit fluoreszenten Nukleotidanaloga

5.2.4.15.1 Modifikation von GTPasen durch FRET Nukleotide detektiert durch in-Gel-Fluoreszenz

Um zu testen, welche FRET Nukleotide von modifizierenden Enzymen an GTPasen angebracht werden können, wurden 50 µM GTPase, 10 µM Enzym und 5 µM Nukleotid bei 25 °C inkubiert. Die Proteine wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und die in-Gel Fluoreszenz durch Scannen der Akzeptor-Fluoreszenz der FRET Nucleotide (Cy5: Excitation 650 nm; Emission 670 nm) in einem Typhoon Laser Scanner visualisiert.

5.2.4.15.2 Analyse von Modifikationskinetiken

Für Nukleotide des Typs I wurde die Messung der Reaktionskinetiken in einem Tecan GENios Plattenleser durchgeführt. Die Donorfluoreszenz (Cy3: Exzitation 535nm; Emission 595 nm) nach Spaltung der FRET Nukleotide wurde über die Zeit beobachtet. Dazu wurden 50 µM GTPase und 5 µM Nukleotid in einer schwarzen 96 well Platte mit transparentem Boden gemixt. Die Reaktionen wurden durch Zugabe von 10 µM Enzym gestartet. Zusätzlich wurde auch die Hydrolyse von 5 µM Nukleotid durch 10 µM Enzym gemessen. Als Kontrolle dienten Messungen ohne Enzym und GTPase.

Für Nukleotide des Typs II (272, 363, 599, 1121) wurden die Reaktionskinetiken im Fluoromax-4 gemessen. Die Anregung erfolgte bei 360 nm, die Emission bei 500 nm (für 599: Excitation: 330 nm, Emission: 430 nm).

6 LITERATURVERZEICHNIS

1. Asrat, S., de Jesus, D. A., Hempstead, A. D., Ramabhadran, V. & Isberg, R. R. (2014) Bacterial pathogen manipulation of host membrane trafficking, *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. **30**, 79-109.
2. Cherfils, J. & Zeghouf, M. (2013) Regulation of Small GTPases by GEFs, GAPs, and GDIs, *Physiological Reviews*. **93**, 269-309.
3. Chien, Y. H., Lai, M., Shih, T. Y., Verma, I. M., Scolnick, E. M., Royburman, P. & Davidson, N. (1979) Heteroduplex Analysis of the Sequence Relationships between the Genomes of Kirsten and Harvey Sarcoma-Viruses, Their Respective Parental Murine Leukemia Viruses, and the Rat Endogenous 30s-Rna, *Journal of Virology*. **31**, 752-760.
4. Takai, Y., Sasaki, T. & Matozaki, T. (2001) Small GTP-binding proteins, *Physiological Reviews*. **81**, 153-208.
5. Hall, A. (1990) The Cellular Functions of Small GTP-Binding Proteins, *Science*. **249**, 635-640.
6. Wittinghofer, A. & Vetter, I. R. (2011) Structure-Function Relationships of the G Domain, a Canonical Switch Motif, *Annual Review of Biochemistry*. **80**, 943-971.
7. Bourne, H. R., Sanders, D. A. & McCormick, F. (1991) The GTPase Superfamily - Conserved Structure and Molecular Mechanism, *Nature*. **349**, 117-127.
8. Sprang, S. R. (1997) G protein mechanisms: Insights from structural analysis, *Annual Review of Biochemistry*. **66**, 639-678.
9. Milburn, M. V., Tong, L., Devos, A. M., Brünger, A., Yamaizumi, Z., Nishimura, S. & Kim, S. H. (1990) Molecular Switch for Signal Transduction - Structural Differences between Active and Inactive Forms of Protooncogenic Ras Proteins, *Science*. **247**, 939-945.
10. Feltham, J. L., Dotsch, V., Raza, S., Manor, D., Cerione, R. A., Sutcliffe, M. J., Wagner, G. & Oswald, R. E. (1997) Definition of the switch surface in the solution structure of Cdc42Hs, *Biochemistry*. **36**, 8755-8766.
11. Prive, G. G., Milburn, M. V., Tong, L., de Vos, A. M., Yamaizumi, Z., Nishimura, S. & Kim, S. H. (1992) X-ray crystal structures of transforming p21 ras mutants suggest a transition-state stabilization mechanism for GTP hydrolysis, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **89**, 3649-3653.
12. Boguski, M. S. & McCormick, F. (1993) Proteins regulating Ras and its relatives, *Nature*. **366**, 643-654.
13. Touchot, N., Chardin, P. & Tavitian, A. (1987) Four additional members of the ras gene superfamily isolated by an oligonucleotide strategy: molecular cloning of YPT-related cDNAs from a rat brain library, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **84**, 8210-8214.
14. Stenmark, H. (2009) Rab GTPases as coordinators of vesicle traffic, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. **10**, 513-525.
15. Hutagalung, A. H. & Novick, P. J. (2011) Role of Rab GTPases in membrane traffic and cell physiology, *Physiological Reviews*. **91**, 119-149.
16. Moyer, B. D., Allan, B. B. & Balch, W. E. (2001) Rab1 interaction with a GM130 effector complex regulates COPII vesicle cis-Golgi tethering, *Traffic*. **2**, 268-276.
17. Beard, M., Satoh, A., Shorter, J. & Warren, G. (2005) A cryptic Rab1-binding site in the p115 tethering protein, *The Journal of Biological Chemistry*. **280**, 25840-25848.

18. Fischer, J., Weide, T. & Barnekow, A. (2005) The MICAL proteins and rab1: a possible link to the cytoskeleton?, *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **328**, 415-423.
19. Ostermeier, C. & Brunger, A. T. (1999) Structural basis of Rab effector specificity: Crystal structure of the small G protein Rab3A complexed with the effector domain of Rabphilin-3A, *Cell*. **96**, 363-374.
20. Zhu, G. Y., Zhai, P., Liu, J., Terzyan, S., Li, G. P. & Zhang, X. J. C. (2004) Structural basis of Rab5-Rabaptin5 interaction in endocytosis, *Nature Structural & Molecular Biology*. **11**, 975-983.
21. Merithew, E., Hatherly, S., Dumas, J. J., Lawe, D. C., Heller-Harrison, R. & Lambright, D. G. (2001) Structural plasticity of an invariant hydrophobic triad in the switch regions of Rab GTPases is a determinant of effector recognition, *Journal of Biological Chemistry*. **276**, 13982-13988.
22. Rojas, A. M., Fuentes, G., Rausell, A. & Valencia, A. (2012) The Ras protein superfamily: Evolutionary tree and role of conserved amino acids , *Journal of Cell Biology*. **196**, 189-201.
23. Sit, S. T. & Manser, E. (2011) Rho GTPases and their role in organizing the actin cytoskeleton, *Journal of Cell Science*. **124**, 679-683.
24. Hanna, S. & El-Sibai, M. (2013) Signaling networks of Rho GTPases in cell motility, *Cellular Signalling*. **25**, 1955-1961.
25. Mott, H. R. & Owen, D. (2015) Structures of Ras superfamily effector complexes: What have we learnt in two decades?, *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*. **50**, 85-133.
26. Roberts, P. J., Mitin, N., Keller, P. J., Chenette, E. J., Madigan, J. P., Currin, R. O., Cox, A. D., Wilson, O., Kirschmeier, P. & Der, C. J. (2008) Rho family GTPase modification and dependence on CAAX motif-signaled posttranslational modification, *Journal of Biological Chemistry*. **283**, 25150-25163.
27. DerMardirossian, C. & Bokoch, G. M. (2005) GDIs: central regulatory molecules in Rho GTPase activation, *Trends in Cell Biology*. **15**, 356-363.
28. Hodge, R. G. & Ridley, A. J. (2016) Regulating Rho GTPases and their regulators, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. **17**, 496-510.
29. Erickson, J. W., Zhang, C. J., Kahn, R. A., Evans, T. & Cerione, R. A. (1996) Mammalian Cdc42 is a brefeldin A-sensitive component of the Golgi apparatus, *Journal of Biological Chemistry*. **271**, 26850-26854.
30. Wu, W. J., Erickson, J. W., Lin, R. & Cerione, R. A. (2000) The gamma-subunit of the coatamer complex binds Cdc42 to mediate transformation, *Nature*. **405**, 800-804.
31. Wu, W. J., Tu, S. & Cerione, R. A. (2003) Activated Cdc42 sequesters c-Cbl and prevents EGF receptor degradation, *Cell*. **114**, 715-725.
32. Diekmann, D., Nobes, C. D., Burbelo, P. D., Abo, A. & Hall, A. (1995) Rac GTPase Interacts with GAPs and Target Proteins through Multiple Effector Sites, *EMBO Journal*. **14**, 5297-5305.
33. Freeman, J. L., Abo, A. & Lambeth, J. D. (1996) Rac "insert region" is a novel effector region that is implicated in the activation of NADPH oxidase, but not PAK65 , *Journal of Biological Chemistry*. **271**, 19794-19801.
34. Burbelo, P. D., Drechsel, D. & Hall, A. (1995) A Conserved Binding Motif Defines Numerous Candidate Target Proteins for Both Cdc42 and Rac GTPases, *Journal of Biological Chemistry*. **270**, 29071-29074.

35. Manser, E., Leung, T., Salihuddin, H., Tan, L. & Lim, L. (1993) A Nonreceptor Tyrosine Kinase That Inhibits the GTPase Activity of P21(Cdc42), *Nature*. **363**, 364-367.
36. Mott, H. R., Owen, D., Nietlispach, D., Lowe, P. N., Manser, E., Lim, L. & Laue, E. D. (1999) Structure of the small G protein Cdc42 bound to the GTPase-binding domain of ACK, *Nature*. **399**, 384-388.
37. Tu, H. & Wigler, M. (1999) Genetic evidence for Pak1 autoinhibition and its release by Cdc42, *Molecular and Cellular Biology*. **19**, 602-611.
38. Klebe, C., Prinz, H., Wittinghofer, A. & Goody, R. S. (1995) The Kinetic Mechanism of Ran - Nucleotide Exchange Catalyzed by Rcc1, *Biochemistry*. **34**, 12543-12552.
39. Lenzen, C., Cool, R. H., Prinz, H., Kuhlmann, J. & Wittinghofer, A. (1998) Kinetic analysis by fluorescence of the interaction between Ras and the catalytic domain of the guanine nucleotide exchange factor Cdc25(Mm), *Biochemistry*. **37**, 7420-7430.
40. Schoebel, S., Oesterlin, L. K., Blankenfeldt, W., Goody, R. S. & Itzen, A. (2009) RabGDI Displacement by DrrA from Legionella Is a Consequence of Its Guanine Nucleotide Exchange Activity, *Molecular Cell*. **36**, 1060-1072.
41. Blümer, J., Rey, J., Dehmelt, L., Mazel, T., Wu, Y. W., Bastiaens, P., Goody, R. S. & Itzen, A. (2013) RabGEFs are a major determinant for specific Rab membrane targeting, *Journal of Cell Biology*. **200**, 287-300.
42. Rittinger, K., Walker, P. A., Eccleston, J. F., Smerdon, S. J. & Gamblin, S. J. (1997) Structure at 1.65 angstrom of RhoA and its GTPase-activating protein in complex with a transition-state analogue, *Nature*. **389**, 758-762.
43. Scheffzek, K., Ahmadian, M. R., Kabsch, W., Wiesmuller, L., Lautwein, A., Schmitz, F. & Wittinghofer, A. (1997) The Ras-RasGAP complex: Structural basis for GTPase activation and its loss in oncogenic Ras mutants, *Science*. **277**, 333-338.
44. Pan, X. J., Eathiraj, S., Munson, M. & Lambright, D. G. (2006) TBC-domain GAPs for Rab GTPases accelerate GTP hydrolysis by a dual-finger mechanism, *Nature*. **442**, 303-306.
45. Wu, Y. W., Oesterlin, L. K., Tan, K. T., Waldmann, H., Alexandrov, K. & Goody, R. S. (2010) Membrane targeting mechanism of Rab GTPases elucidated by semisynthetic protein probes, *Nature Chemical Biology*. **6**, 534-540.
46. Ignatev, A., Kravchenko, S., Rak, A., Goody, R. S. & Pylypenko, O. (2008) A structural model of the GDP dissociation inhibitor rab membrane extraction mechanism, *Journal of Biological Chemistry*. **283**, 18377-18384.
47. Aktories, K. (2011) Bacterial protein toxins that modify host regulatory GTPases, *Nature Reviews Microbiology*. **9**, 487-498.
48. Stein, M. P., Müller, M. P. & Wandinger-Ness, A. (2012) Bacterial Pathogens Commandeer Rab GTPases to Establish Intracellular Niches, *Traffic*. **13**, 1565-1588.
49. Kagan, J. C., Stein, M. P., Pypaert, M. & Roy, C. R. (2004) Legionella subvert the functions of Rab1 and Sec22b to create a replicative organelle, *Journal of Experimental Medicine*. **199**, 1201-1211.
50. Machner, M. P. & Chen, Y. (2011) Catch and release: Rab1 exploitation by Legionella pneumophila, *Cellular Logistics*. **1**, 133-138.
51. Murata, T., Delprato, A., Ingmundson, A., Toomre, D. K., Lambright, D. G. & Roy, C. R. (2006) The Legionella pneumophila effector protein DrrA is a Rab1 guanine nucleotide-exchange factor, *Nature Cell Biology*. **8**, 971-977.
52. Zhu, Y., Hu, L., Zhou, Y., Yao, Q., Liu, L. & Shao, F. (2010) Structural mechanism of host Rab1 activation by the bifunctional Legionella type IV effector SidM/DrrA, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **107**, 4699-4704.

53. Müller, M. P., Peters, H., Blümer, J., Blankenfeldt, W., Goody, R. S. & Itzen, A. (2010) The Legionella Effector Protein DrrA AMPylates the Membrane Traffic Regulator Rab1b, *Science*. **329**, 946-949.
54. Goody, R. S., Müller, M. P., Schoebel, S., Oesterlin, L. K., Blümer, J., Peters, H., Blankenfeldt, W. & Itzen, A. (2011) The versatile Legionella effector protein DrrA, *Communicative & Integrative Biology*. **4**, 72-74.
55. Neunuebel, M. R., Chen, Y., Gaspar, A. H., Backlund, P. S., Jr., Yergey, A. & Machner, M. P. (2011) De-AMPylation of the small GTPase Rab1 by the pathogen Legionella pneumophila, *Science*. **333**, 453-456.
56. Roy, C. R. & Cherfils, J. (2015) Structure and function of Fic proteins, *Nature Reviews Microbiology*. **13**, 631-640.
57. Goody, P. R., Heller, K., Oesterlin, L. K., Müller, M. P., Itzen, A. & Goody, R. S. (2012) Reversible phosphocholination of Rab proteins by Legionella pneumophila effector proteins, *The EMBO Journal*. **31**, 1774-1784.
58. Tan, Y. H., Arnold, R. J. & Luo, Z. Q. (2011) Legionella pneumophila regulates the small GTPase Rab1 activity by reversible phosphorylcholine, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **108**, 21212-21217.
59. Michard, C. & Doublet, P. (2015) Post-translational modifications are key players of the Legionella pneumophila infection strategy, *Frontiers in Microbiology*. **6**:87.
60. Yarbrough, M. L., Li, Y., Kinch, L. N., Grishin, N. V., Ball, H. L. & Orth, K. (2009) AMPylation of Rho GTPases by Vibrio VopS Disrupts Effector Binding and Downstream Signaling, *Science*. **323**, 269-272.
61. Xiao, J., Worby, C. A., Mattoo, S., Sankaran, B. & Dixon, J. E. (2010) Structural basis of Fic-mediated adenylylation, *Nature Structural & Molecular Biology*. **17**, 1004-1010.
62. O'Toole, D. & Sondgeroth, K. S. (2016) Histophilosis as a Natural Disease, *Current Topics in Microbiology and Immunology*. **396**, 15-48.
63. Worby, C. A., Mattoo, S., Kruger, R. P., Corbeil, L. B., Koller, A., Mendez, J. C., Zekarias, B., Lazar, C. & Dixon, J. E. (2009) The Fic Domain: Regulation of Cell Signaling by Adenylylation, *Molecular Cell*. **34**, 93-103.
64. Luong, P., Kinch, L. N., Brautigam, C. A., Grishin, N. V., Tomchick, D. R. & Orth, K. (2010) Kinetic and Structural Insights into the Mechanism of AMPylation by VopS Fic Domain, *Journal of Biological Chemistry*. **285**, 20155-20163.
65. Ryslava, H., Doubnerova, V., Kavan, D. & Vanek, O. (2013) Effect of posttranslational modifications on enzyme function and assembly, *Journal of Proteomics*. **92**, 80-109.
66. Shapiro, B. M., Kingdon, H. S. & Stadtman, E. R. (1967) Regulation of Glutamine Synthetase, VII. Adenylyl Glutamine Synthetase - a New Form of Enzyme with Altered Regulatory and Kinetic Properties, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **58**, 642-649.
67. Shapiro, B. M. & Stadtman, E. R. (1968) Glutamine Synthetase Deadenylylating Enzyme, *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **30**, 32-37.
68. Tan, Y. & Luo, Z. Q. (2011) Legionella pneumophila SidD is a deAMPyase that modifies Rab1, *Nature*. **475**, 506-509.
69. Hedberg, C. & Itzen, A. (2015) Molecular perspectives on protein adenylylation, *ACS Chemical Biology*. **10**, 12-21.
70. Xu, Y. B., Zhang, R. G., Joachimiak, A., Carr, P. D., Huber, T., Vasudevan, S. G. & Ollis, D. L. (2004) Structure of the N-terminal domain of Escherichia coli glutamine synthetase adenylyltransferase, *Structure*. **12**, 861-869.

71. Gavriljuk, K., Schartner, J., Itzen, A., Goody, R. S., Gerwert, K. & Kotting, C. (2014) Reaction Mechanism of Adenylyltransferase DrrA from *Legionella pneumophila* Elucidated by Time-Resolved Fourier Transform Infrared Spectroscopy, *Journal of the American Chemical Society*. **136**, 9338-9345.
72. Pedersen, L. C., Benning, M. M. & Holden, H. M. (1995) Structural investigation of the antibiotic and ATP-binding sites in kanamycin nucleotidyltransferase, *Biochemistry*. **34**, 13305-13311.
73. Müller, M. P., Shkumatov, A. V., Oesterlin, L. K., Schoebel, S., Goody, P. R., Goody, R. S. & Itzen, A. (2012) Characterization of enzymes from *Legionella pneumophila* involved in reversible adenylylation of Rab1 protein, *The Journal of Biological Chemistry*. **287**, 35036-35046.
74. Mattoo, S., Durrant, E., Chen, M. J., Xiao, J. Y., Lazar, C. S., Manning, G., Dixon, J. E. & Worby, C. A. (2011) Comparative Analysis of Histophilus somni Immunoglobulin-binding Protein A (IbpA) with Other Fic Domain-containing Enzymes Reveals Differences in Substrate and Nucleotide Specificities, *Journal of Biological Chemistry*. **286**, 32834-32842.
75. Preissler, S., Rato, C., Chen, R., Antrobus, R., Ding, S., Fearnley, I. M. & Ron, D. (2015) AMPylation matches BiP activity to client protein load in the endoplasmic reticulum, *Elife*. **4**: e12621.
76. Schmelz, S. & Naismith, J. H. (2009) Adenylate-forming enzymes, *Current Opinion in Structural Biology*. **19**, 666-671.
77. Berg, J. M., Tymoczko, J. L., Stryer, L. & Stryer, L. (2002) *Biochemistry*, 5th edition, W.H. Freeman, New York. 29.2.
78. Gavriljuk, K., Schartner, J., Seidel, H., Dickhut, C., Zahedi, R. P., Hedberg, C., Kotting, C. & Gerwert, K. (2016) Unraveling the Phosphocholination Mechanism of the *Legionella pneumophila* Enzyme AnkX, *Biochemistry*. **55**, 4375-4385.
79. Katayama, M., Kawata, M., Yoshida, Y., Horiuchi, H., Yamamoto, T., Matsuura, Y. & Takai, Y. (1991) The Posttranslationally Modified C-Terminal Structure of Bovine Aortic Smooth-Muscle RhoA P21, *Journal of Biological Chemistry*. **266**, 12639-12645.
80. Reiss, Y., Goldstein, J. L., Seabra, M. C., Casey, P. J. & Brown, M. S. (1990) Inhibition of Purified P21ras Farnesyl - Protein Transferase by Cys-Aax Tetrapeptides, *Cell*. **62**, 81-88.
81. Seabra, M. C., Reiss, Y., Casey, P. J., Brown, M. S. & Goldstein, J. L. (1991) Protein Farnesyltransferase and Geranylgeranyltransferase Share a Common Alpha-Subunit, *Cell*. **65**, 429-434.
82. Wang, D. A. & Sebt, S. M. (2005) Palmitoylated cysteine 192 is required for RhoB tumor-suppressive and apoptotic activities, *Journal of Biological Chemistry*. **280**, 19243-19249.
83. Linder, M. E. & Deschenes, R. J. (2007) Palmitoylation: policing protein stability and traffic, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. **8**, 74-84.
84. Rak, A., Pylypenko, O., Niculae, A., Pyatkov, K., Goody, R. S. & Alexandrov, K. (2004) Structure of the Rab7 : REP-1 complex: Insights into the mechanism of rab prenylation and choroideremia disease, *Cell*. **117**, 749-760.
85. Pylypenko, O., Rak, A., Reents, R., Niculae, A., Sidorovitch, V., Vioaca, M. D., Bessolitsyna, E., Thoma, N. H., Waldmann, H., Schlichting, I., Goody, R. S. & Alexandrov, K. (2003) Structure of Rab Escort Protein-1 in complex with Rab Geranylgeranyltransferase, *Molecular Cell*. **11**, 483-494.
86. Gomes, A. Q., Ali, B. R., Ramalho, J. S., Godfrey, R. F., Barral, D. C., Hume, A. N. & Seabra, M. C. (2003) Membrane targeting of Rab GTPases is influenced by the prenylation motif, *Molecular Biology of the Cell*. **14**, 1882-1899.

87. Shahinian, S. & Silviu, J. R. (1995) Doubly-Lipid-Modified Protein-Sequence Motifs Exhibit Long-Lived Anchorage to Lipid Bilayer-Membranes, *Biochemistry*. **34**, 3813-3822.
88. Clarke, S. (1992) Protein Isoprenylation and Methylation at Carboxyl-Terminal Cysteine Residues, *Annual Review of Biochemistry*. **61**, 355-386.
89. Smeland, T. E., Seabra, M. C., Goldstein, J. L. & Brown, M. S. (1994) Geranylgeranylated Rab proteins terminating in Cys-Ala-Cys, but not Cys-Cys, are carboxyl-methylated by bovine brain membranes in vitro, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **91**, 10712-10716.
90. Ubersax, J. A. & Ferrell, J. E. (2007) Mechanisms of specificity in protein phosphorylation, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. **8**, 530-541.
91. Johnson, L. N. (2009) The regulation of protein phosphorylation, *Biochemical Society Transactions*. **37**, 627-641.
92. Lai, Y. C., Kondapalli, C., Lehneck, R., Procter, J. B., Dill, B. D., Woodroof, H. I., Gourlay, R., Pegg, M., Macartney, T. J., Corti, O., Corvol, J. C., Campbell, D. G., Itzen, A., Trost, M. & Muqit, M. M. K. (2015) Phosphoproteomic screening identifies Rab GTPases as novel downstream targets of PINK1, *EMBO Journal*. **34**, 2840-2861.
93. Levin, R. S., Hertz, N. T., Burlingame, A. L., Shokat, K. M. & Mukherjee, S. (2016) Innate immunity kinase TAK1 phosphorylates Rab1 on a hotspot for posttranslational modifications by host and pathogen, *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **113**, E4776-E4783.
94. Aktories, K., Braun, U., Rosener, S., Just, I. & Hall, A. (1989) The rho gene product expressed in E. coli is a substrate of botulinum ADP-ribosyltransferase C3, *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **158**, 209-213.
95. Just, I., Wilm, M., Selzer, J., Rex, G., Voneichelstreiber, C., Mann, M. & Aktories, K. (1995) The Enterotoxin from Clostridium-Difficile (Toxa) Monoglucosylates the Rho-Proteins, *Journal of Biological Chemistry*. **270**, 13932-13936.
96. Zeiser, J., Gerhard, R., Just, I. & Pich, A. (2013) Substrate Specificity of Clostridial Glucosylating Toxins and Their Function on Colonocytes Analyzed by Proteomics Techniques, *Journal of Proteome Research*. **12**, 1604-1618.
97. Jank, T., Bogdanovic, X., Wirth, C., Haaf, E., Spoerner, M., Bohmer, K. E., Steinemann, M., Orth, J. H. C., Kalbitzer, H. R., Warscheid, B., Hunte, C. & Aktories, K. (2013) A bacterial toxin catalyzing tyrosine glycosylation of Rho and deamidation of G(q) and G(i) proteins, *Nature Structural & Molecular Biology*. **20**, 1273-1280.
98. Shao, F., Vacratsis, P. O., Bao, Z. Q., Bowers, K. E., Fierke, C. A. & Dixon, J. E. (2003) Biochemical characterization of the Yersinia YopT protease: Cleavage site and recognition elements in Rho GTPases, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **100**, 904-909.
99. Schmidt, G. & Aktories, K. (2000) Rho GTPase-activating toxins: Cytotoxic necrotizing factors and dermonecrotic toxin, *Methods in Enzymology*. **325**, 125-136.
100. Qiu, J. Z., Sheedlo, M. J., Yu, K. W., Tan, Y. H., Nakayasu, E. S., Das, C., Liu, X. Y. & Luo, Z. Q. (2016) Ubiquitination independent of E1 and E2 enzymes by bacterial effectors, *Nature*. **533**, 120-124.
101. Paulmann, N., Grohmann, M., Voigt, J. P., Bert, B., Vowinkel, J., Bader, M., Skelin, M., Jevsek, M., Fink, H., Rupnik, M. & Walther, D. J. (2009) Intracellular Serotonin Modulates Insulin Secretion from Pancreatic beta-Cells by Protein Serotonylation, *PLOS Biology*. **7**(10):e1000229.
102. Lander, H. M., Ogiste, J. S., Pearce, S. F. A., Levi, R. & Novogrodsky, A. (1995) Nitric Oxide-Stimulated Guanine-Nucleotide Exchange on P21(Ras), *Journal of Biological Chemistry*. **270**, 7017-7020.

103. Jackson, C. L. (2004) N-terminal acetylation targets GTPases to membranes, *Nature Cell Biology*. **6**, 379-380.
104. Castillo-Lluva, S., Tatham, M. H., Jones, R. C., Jaffray, E. G., Edmondson, R. D., Hay, R. T. & Malliri, A. (2010) SUMOylation of the GTPase Rac1 is required for optimal cell migration, *Nature Cell Biology*. **12**, 1078-1085.
105. Spicer, C. D. & Davis, B. G. (2014) Selective chemical protein modification, *Nature Communications*. **5**, 4740.
106. Chatterjee, C. & Muir, T. W. (2010) Chemical approaches for studying histone modifications, *The Journal of Biological Chemistry*. **285**, 11045-11050.
107. Muralidharan, V. & Muir, T. W. (2006) Protein ligation: an enabling technology for the biophysical analysis of proteins, *Nature Methods*. **3**, 429-438.
108. Muir, T. W., Sondhi, D. & Cole, P. A. (1998) Expressed protein ligation: a general method for protein engineering, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **95**, 6705-6710.
109. David, R., Richter, M. P. & Beck-Sickinger, A. G. (2004) Expressed protein ligation. Method and applications, *European Journal of Biochemistry*. **271**, 663-677.
110. Noren, C. J., Anthony-Cahill, S. J., Griffith, M. C. & Schultz, P. G. (1989) A general method for site-specific incorporation of unnatural amino acids into proteins, *Science*. **244**, 182-188.
111. Wang, L., Brock, A., Herberich, B. & Schultz, P. G. (2001) Expanding the genetic code of *Escherichia coli*, *Science*. **292**, 498-500.
112. Wals, K. & Ovaa, H. (2014) Unnatural amino acid incorporation in *E. coli*: current and future applications in the design of therapeutic proteins, *Frontiers in Chemistry*. **2**, 15.
113. Pirman, N. L., Barber, K. W., Aerni, H. R., Ma, N. J., Haimovich, A. D., Rogulina, S., Isaacs, F. J. & Rinehart, J. (2015) A flexible codon in genomically recoded *Escherichia coli* permits programmable protein phosphorylation, *Nature Communications*. **6**, 8130.
114. Lang, K. & Chin, J. W. (2014) Cellular incorporation of unnatural amino acids and bioorthogonal labeling of proteins, *Chemical Reviews*. **114**, 4764-4806.
115. Wang, L., Xie, J. & Schultz, P. G. (2006) Expanding the genetic code, *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*. **35**, 225-249.
116. Kreegipuu, A., Blom, N., Brunak, S. & Jarv, J. (1998) Statistical analysis of protein kinase specificity determinants, *FEBS letters*. **430**, 45-50.
117. van den Ent, F., Moller-Jensen, J., Amos, L. A., Gerdes, K. & Lowe, J. (2002) F-actin-like filaments formed by plasmid segregation protein ParM, *EMBO Journal*. **21**, 6935-6943.
118. Shen, X. C., Valencia, C. A., Szostak, J. W., Dong, B. & Liu, R. H. (2005) Scanning the human proteome for calmodulin-binding proteins, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **102**, 5969-5974.
119. Littler, D. R., Harrop, S. J., Fairlie, W. D., Brown, L. J., Pankhurst, G. J., Pankhurst, S., DeMaere, M. Z., Campbell, T. J., Bauskin, A. R., Tonini, R., Mazzanti, M., Breit, S. N. & Curmi, P. M. G. (2004) The intracellular chloride ion channel protein CLIC1 undergoes a redox-controlled structural transition, *Journal of Biological Chemistry*. **279**, 9298-9305.
120. Woolery, A. R., Yu, X. B., LaBaer, J. & Orth, K. (2014) AMPylation of Rho GTPases Subverts Multiple Host Signaling Processes, *Journal of Biological Chemistry*. **289**, 32977-32988.

121. Luitz, M. P., Bomblies, R., Ramcke, E., Itzen, A. & Zacharias, M. (2016) Adenylylation of Tyr77 stabilizes Rab1b GTPase in an active state: A molecular dynamics simulation analysis, *Scientific Reports*. **6**, 19896.
122. Garcia-Pino, A., Zenkin, N. & Loris, R. (2014) The many faces of Fic: structural and functional aspects of Fic enzymes, *Trends in Biochemical Sciences*. **39**, 121-129.
123. Khater, S. & Mohanty, D. (2015) Deciphering the Molecular Basis of Functional Divergence in AMPylating Enzymes by Molecular Dynamics Simulations and Structure Guided Phylogeny, *Biochemistry*. **54**, 5209-5224.
124. Campanacci, V., Mukherjee, S., Roy, C. R. & Cherfils, J. (2013) Structure of the Legionella effector AnkX reveals the mechanism of phosphocholine transfer by the FIC domain, *EMBO Journal*. **32**, 1469-1477.
125. Castro-Roa, D., Garcia-Pino, A., De Gieter, S., van Nuland, N. A., Loris, R. & Zenkin, N. (2013) The Fic protein Doc uses an inverted substrate to phosphorylate and inactivate EF-Tu, *Nature Chemical Biology*. **9**, 811-817.
126. Chen, Y., Tascon, I., Neunuebel, M. R., Pallara, C., Brady, J., Kinch, L. N., Fernandez-Recio, J., Rojas, A. L., Machner, M. P. & Hierro, A. (2013) Structural Basis for Rab1 De-AMPylation by the Legionella pneumophila Effector SidD, *PLOS Pathogens*. **9**(5): e1003382
127. Bourne, H. R., Sanders, D. A. & McCormick, F. (1991) The GTPase superfamily: conserved structure and molecular mechanism, *Nature*. **349**, 117-127.
128. Sprang, S. R. & Coleman, D. E. (1998) Invasion of the nucleotide snatchers: structural insights into the mechanism of G protein GEFs, *Cell*. **95**, 155-158.
129. Zhang, B. L., Zhang, Y. Q., Wang, Z. X. & Zheng, Y. (2000) The role of Mg²⁺ cofactor in the guanine nucleotide exchange and GTP hydrolysis reactions of Rho family GTP-binding proteins, *Journal of Biological Chemistry*. **275**, 25299-25307.
130. Yang, J., Zhang, Z. G., Roe, S. M., Marshall, C. J. & Barford, D. (2009) Activation of Rho GTPases by DOCK Exchange Factors Is Mediated by a Nucleotide Sensor, *Science*. **325**, 1398-1402.
131. Smith, G. R., Givan, S. A., Cullen, P. & Sprague, G. F., Jr. (2002) GTPase-activating proteins for Cdc42, *Eukaryotic Cell*. **1**, 469-480.
132. Nassar, N., Hoffman, G. R., Manor, D., Clardy, J. C. & Cerione, R. A. (1998) Structures of Cdc42 bound to the active and catalytically compromised forms of Cdc42GAP, *Nature Structural Biology*. **5**, 1047-1052.
133. Burke, J. E., Inglis, A. J., Perisic, O., Masson, G. R., McLaughlin, S. H., Rutaganira, F., Shokat, K. M. & Williams, R. L. (2014) Structures of PI4KIIIbeta complexes show simultaneous recruitment of Rab11 and its effectors, *Science*. **344**, 1035-8.
134. Morreale, A., Venkatesan, M., Mott, H. R., Owen, D., Nietlispach, D., Lowe, P. N. & Laue, E. D. (2000) Structure of Cdc42 bound to the GTPase binding domain of PAK, *Nature Structural Biology*. **7**, 384-388.
135. Geyer, M., Wilde, C., Selzer, J., Aktories, K. & Kalbitzer, H. R. (2003) Glucosylation of Ras by Clostridium sordellii lethal toxin: consequences for effector loop conformations observed by NMR spectroscopy, *Biochemistry*. **42**, 11951-11959.
136. Vetter, I. R., Hofmann, F., Wohlgemuth, S., Herrmann, C. & Just, I. (2000) Structural consequences of mono-glucosylation of Ha-Ras by Clostridium sordellii lethal toxin, *Journal of Molecular Biology*. **301**, 1091-1095.
137. Hornbeck, P. V., Zhang, B., Murray, B., Kornhauser, J. M., Latham, V. & Skrzypek, E. (2015) PhosphoSitePlus, 2014: mutations, PTMs and recalibrations, *Nucleic Acids Res*. **43**, D512-520.

138. Gioeli, D. & Paschal, B. M. (2012) Post-translational modification of the androgen receptor, *Molecular and Cellular Endocrinology*. **352**, 70-78.
139. Martin, L., Latypova, X. & Terro, F. (2011) Post-translational modifications of tau protein: implications for Alzheimer's disease, *Neurochemistry International*. **58**, 458-471.
140. Farley, A. R. & Link, A. J. (2009) Identification and quantification of protein posttranslational modifications, *Methods in Enzymology*. **463**, 725-763.
141. Kamath, K. S., Vasavada, M. S. & Srivastava, S. (2011) Proteomic databases and tools to decipher post-translational modifications, *Journal of Proteomics*. **75**, 127-144.
142. Porath, J., Carlsson, J., Olsson, I. & Belfrage, G. (1975) Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation, *Nature*. **258**, 598-599.
143. Zhang, Z. Q. & Marshall, A. G. (1998) A universal algorithm for fast and automated charge state deconvolution of electrospray mass-to-charge ratio spectra, *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*. **9**, 225-233.
144. Schneider, C. A., Rasband, W. S. & Eliceiri, K. W. (2012) NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis, *Nature Methods*. **9**, 671-675.

7 ANHANG

7.1 Massenspektren

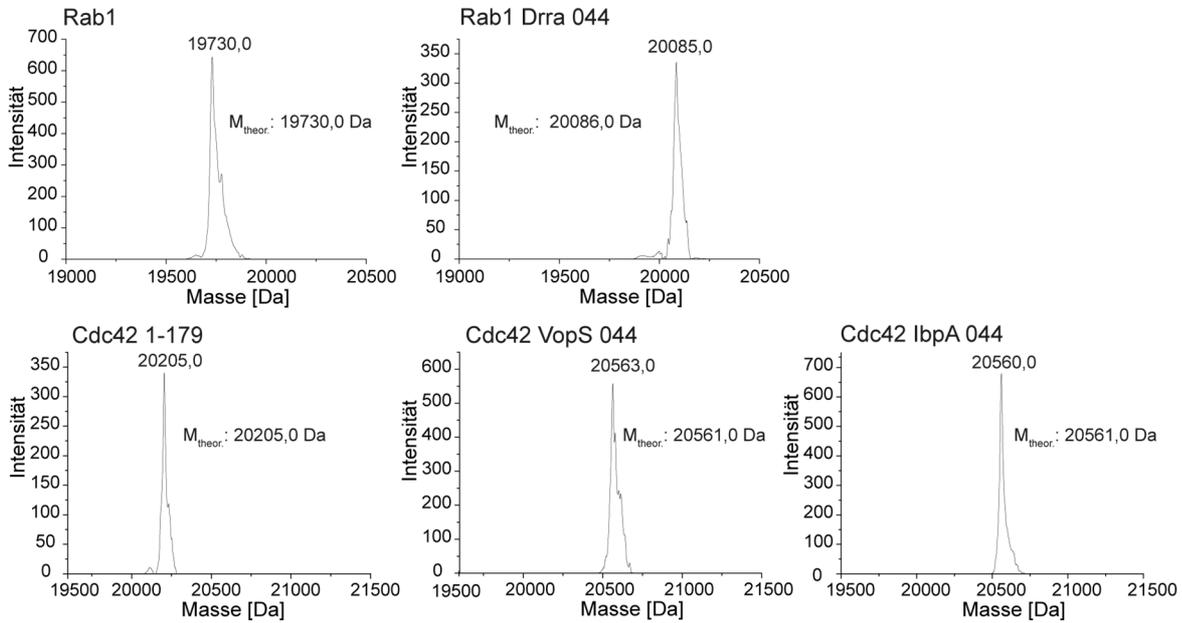


Abbildung 7-1: Massenspektren der Modifikation von Rab1 bzw. Cdc42 mit aza-etheno-Adenosin (044). 044 kann von allen getesteten Enzymen als Nukleotidsubstrat verwendet werden. $M_{\text{theor.}}$: berechnete Masse.

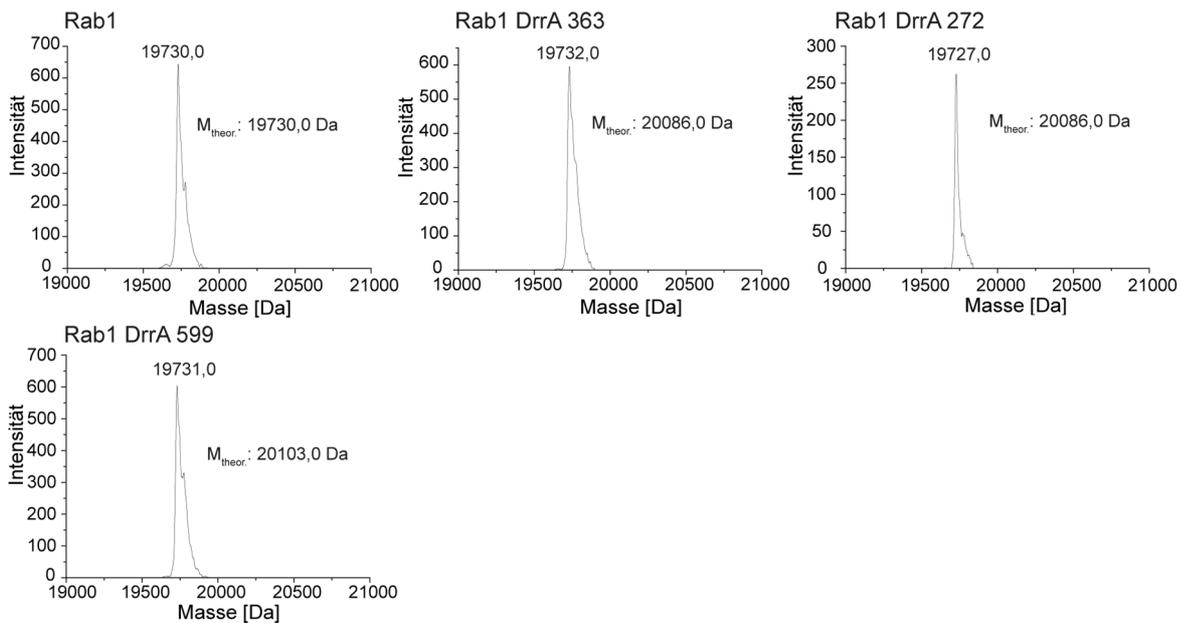


Abbildung 7-2: Massenspektren der Modifikation von Rab1 mit FRET Nukleotiden. DrrA kann Rab1 mit FRET II Nukleotiden nicht modifizieren. $M_{\text{theor.}}$: berechnete Masse.

7.2 Biochemische Daten

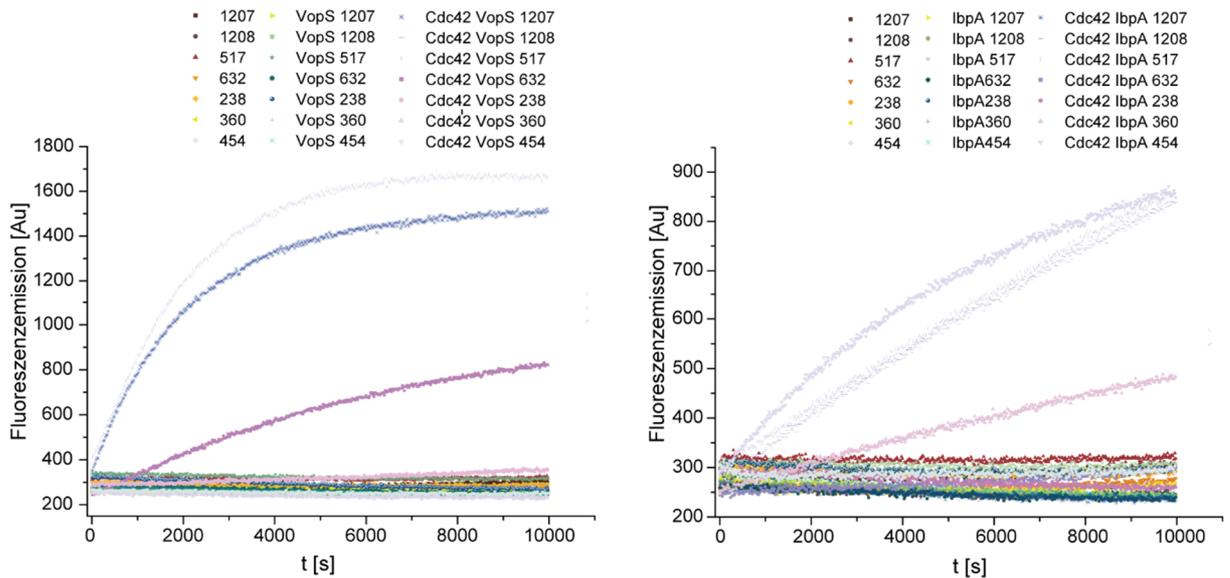


Abbildung 7-3: Rohdaten der Kinetik mit FRET Nukleotiden I. Kinetik der Adenylylierung mit FRET Nukleotiden. Die Fluoreszenz wurde zeitabhängig in einem TECAN GENios verfolgt.

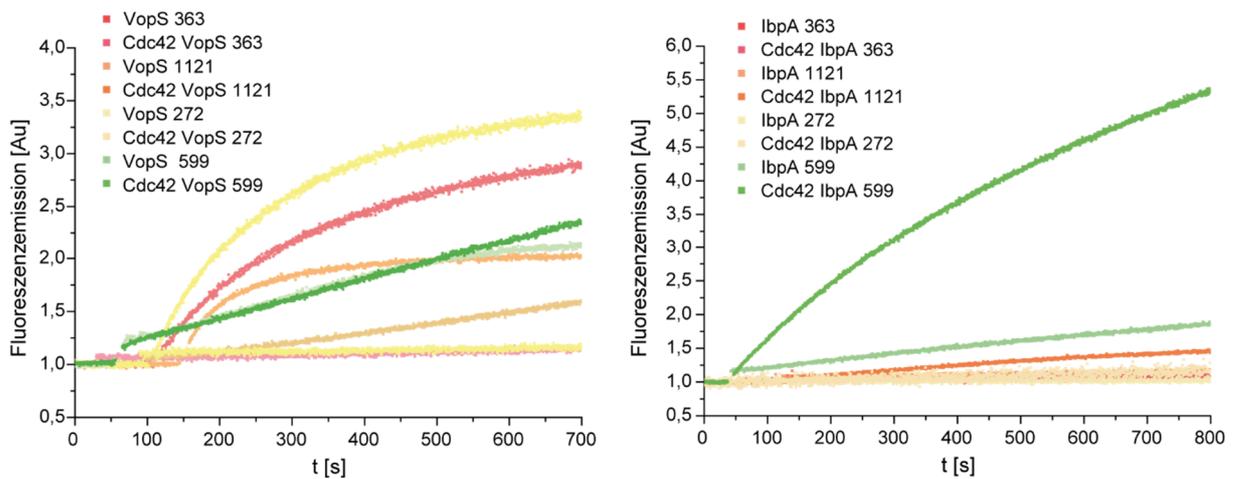
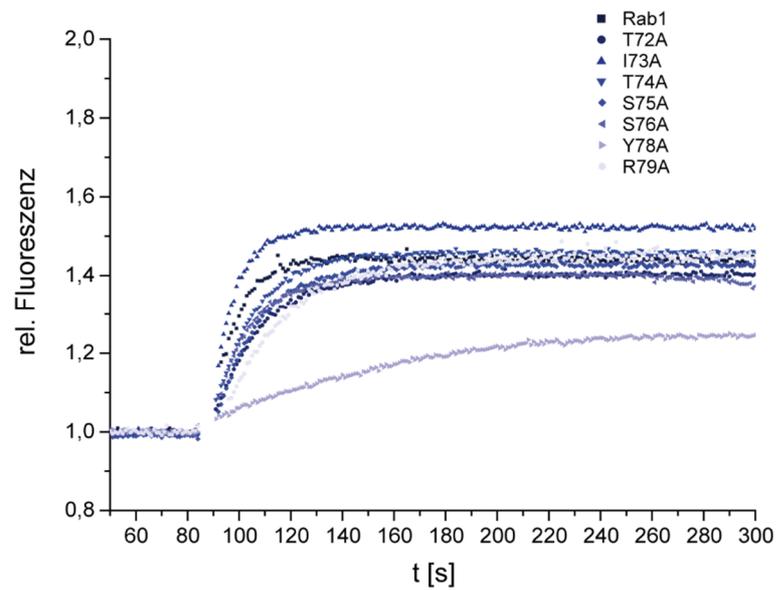
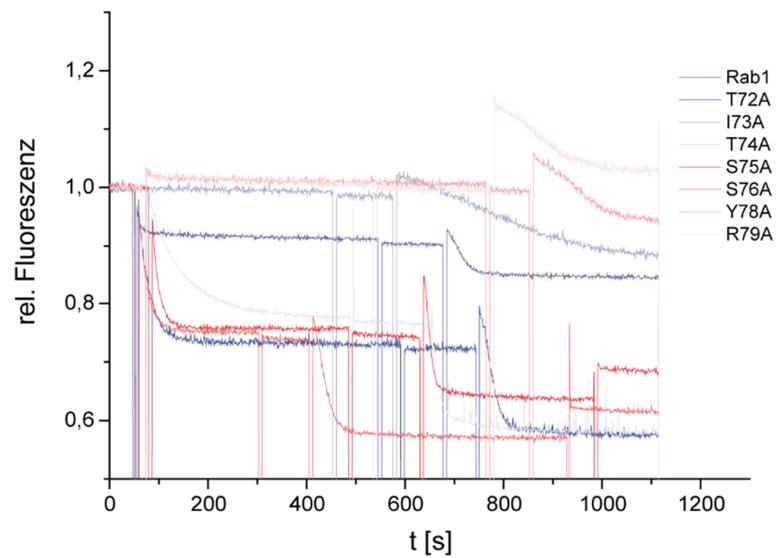


Abbildung 7-4: Rohdaten der Kinetik mit FRET Nukleotiden II. Die Modifikation von Cdc42 wurde im Fluoreszenzspektrometer (Anregungswellenlänge 360 nm, Emissionswellenlänge 500 nm) zeitabhängig verfolgt.



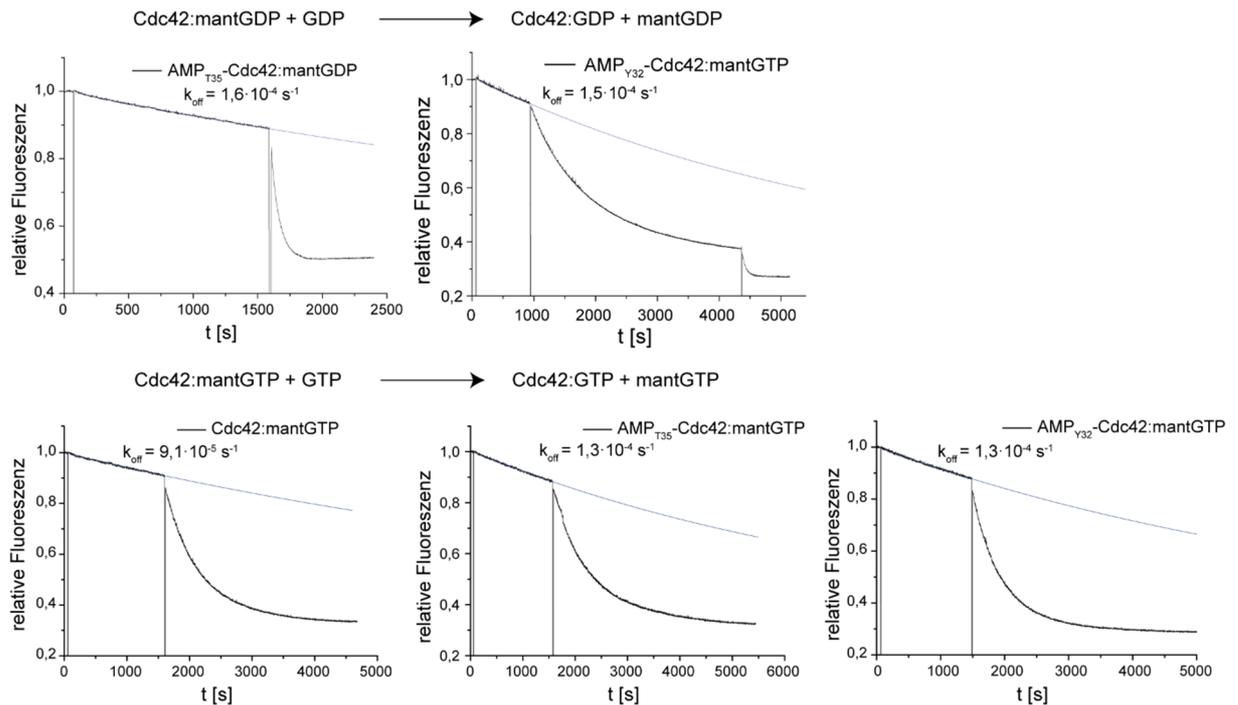


Abbildung 7-7: Intrinsischer Nucleotidaustausch Cdc42. Die Nucleotidaustauschrate wurde durch die Freisetzung von mantGDP bzw. mantGTP aus dem Cdc42:mantGDP/GTP Komplex nach Zugabe eines Überschusses an GDP/GTP ermittelt. Der Endpunkt der Freisetzung wurde durch Zugabe von 10 mM EDTA erreicht.

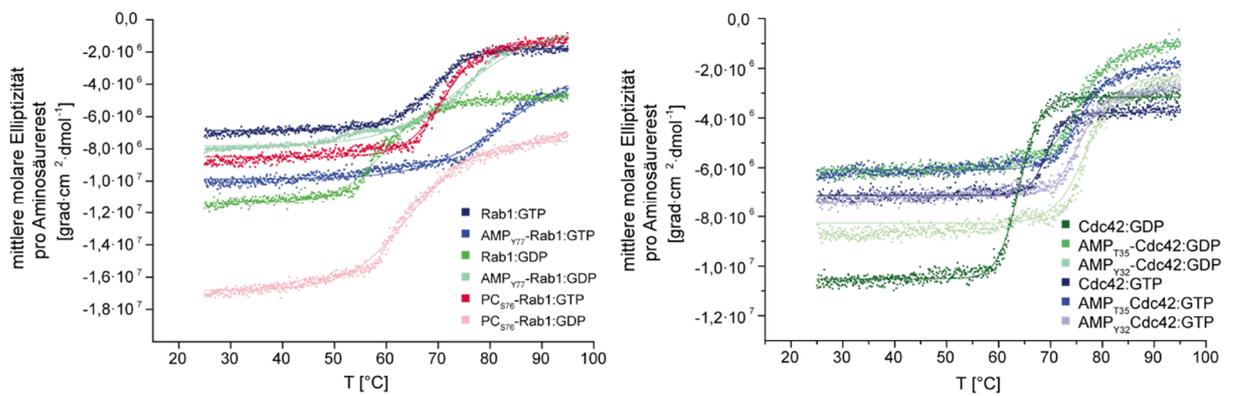


Abbildung 7-8: Thermische Denaturierung kleiner GTPasen abhängig von Nucleotidzustand und Modifikation. Überlagerte CD Spektren der thermischen Denaturierung von Rab1 bzw Cdc42. Der CD bei 222 nm wurde aufgezeichnet und in die mittlere Elliptizität pro Aminosäurerest umgerechnet.

Tabellen mit kinetischen Parametern für Rab-Mutanten

GEF

Rab1b Mutante	$k_{cat}/K_M [M^{-1}s^{-1}]$
-	$2,53 \cdot 10^6 \pm 1,08 \cdot 10^6$
T72A	$1,92 \cdot 10^6 \pm 0,03 \cdot 10^6$
T74A	$3,40 \cdot 10^5 \pm 0,85 \cdot 10^5$
S75A	$1,66 \cdot 10^6 \pm 0,31 \cdot 10^6$
S76A	$1,74 \cdot 10^6 \pm 0,77 \cdot 10^6$
Y77A	$1,17 \cdot 10^6 \pm 0,69 \cdot 10^6$
R79A	$6,60 \cdot 10^5 \pm 2,26 \cdot 10^5$

GEF mantGDP-GTP

Rab1b Mutante	$k_{cat}/K_M [M^{-1}s^{-1}]$
-	$5,8 \cdot 10^5 \pm 0,28 \cdot 10^5$
I73A	$2,7 \cdot 10^5 \pm 0,14 \cdot 10^5$
Y78A	$7,4 \cdot 10^5 \pm 0,85 \cdot 10^5$

DrrA Adenylylierung

Rab1b Mutante	$k_{cat}/K_M [M^{-1}s^{-1}]$
-	$7,93 \cdot 10^5 \pm 1,50 \cdot 10^5$
T72A	$6,10 \cdot 10^5 \pm 0,14 \cdot 10^5$
I73A	$1,70 \cdot 10^5 \pm 0,99 \cdot 10^5$
T74A	$7,40 \cdot 10^5 \pm 0,28 \cdot 10^5$
S75A	$9,00 \cdot 10^5 \pm 5,37 \cdot 10^5$
S76A	$8,10 \cdot 10^5 \pm 1,56 \cdot 10^5$
Y78A	$3,30 \cdot 10^5 \pm 0,42 \cdot 10^5$
R79A	$1,10 \cdot 10^5 \pm 0,14 \cdot 10^5$

SidD

Rab Mutante	$k_{cat}/K_M [M^{-1}s^{-1}]$
-	$4,90 \cdot 10^6 \pm 0,70 \cdot 10^6$
T72A	$4,50 \cdot 10^6 \pm 0,85 \cdot 10^6$
I73A	$6,40 \cdot 10^6 \pm 0,14 \cdot 10^6$
T74A	$5,75 \cdot 10^6 \pm 0,90 \cdot 10^6$
S75A	$5,10 \cdot 10^6 \pm 0,57 \cdot 10^6$
S76A	$5,05 \cdot 10^6 \pm 1,06 \cdot 10^6$
Y78A	$1,95 \cdot 10^6 \pm 0,07 \cdot 10^6$
R79A	$1,35 \cdot 10^5 \pm 0,21 \cdot 10^5$

7.3 NMR

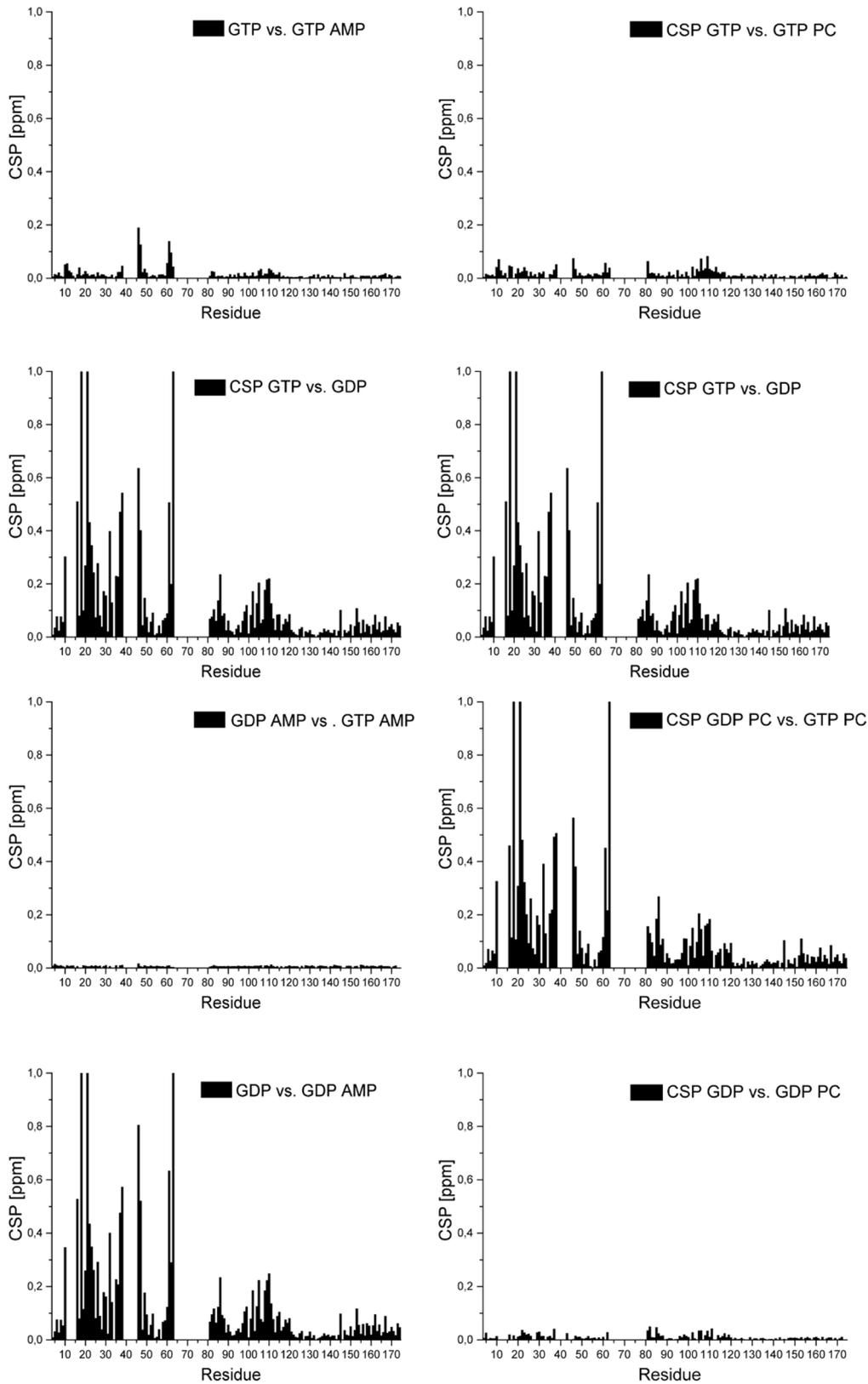


Abbildung 7-9: *Chemical shift perturbations* Rab1b HSQCs. Chemische Verschiebungen der Signale einzelner Aminosäurereste der NMR-Spektren in ppm.

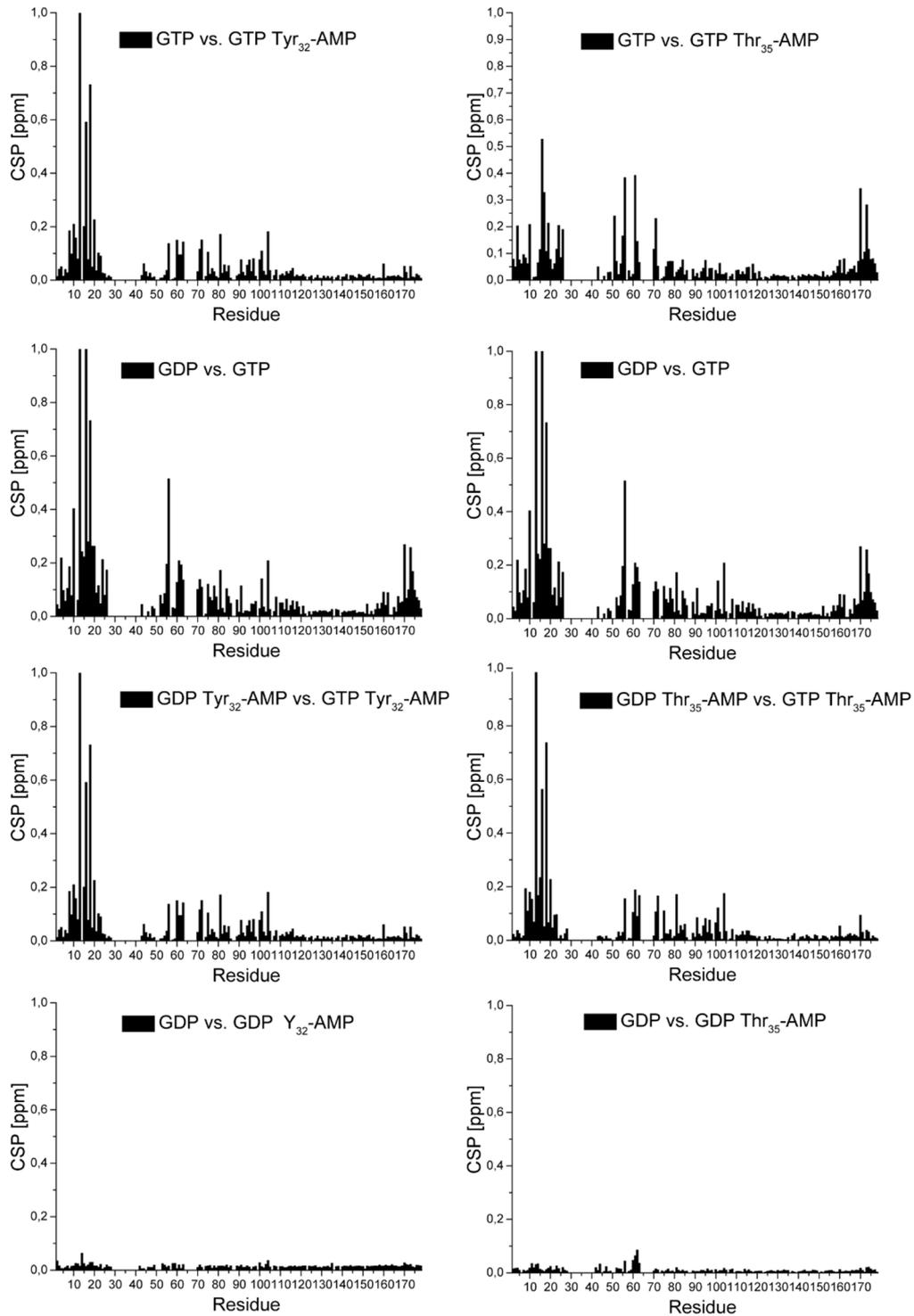


Abbildung 7-10: *Chemical shift perturbations* Cdc42 HSQC. Chemische Verschiebungen der Signale einzelner Aminosäurereste der NMR-Spektren in ppm.

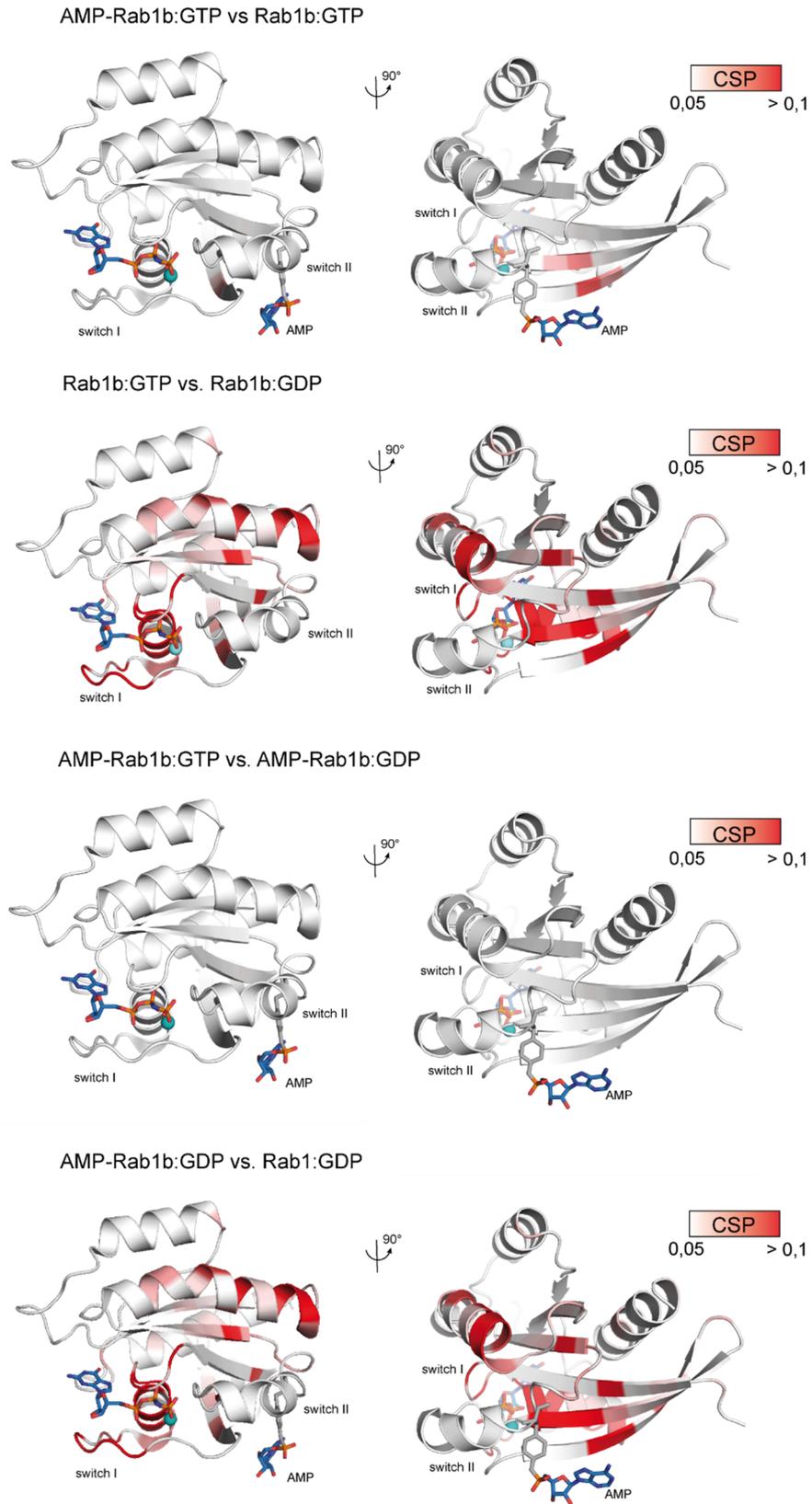


Abbildung 7-11: CSPs Rab1-AMP geplottet auf die Kristallstruktur in zwei verschiedenen Ansichten.

DANKSAGUNG

Bei den folgenden Personen möchte ich mich herzlich bedanken:

Prof. Dr. Aymelt Itzen für das interessante Projekt und die hervorragende Betreuung während der gesamten Doktorarbeit.

Prof. Dr. Michael Sattler und Dr. Katja Barthelmes für die erfolgreiche Kooperation, die intensive Planung und Durchführung der NMR Messungen zur Analyse der konformationellen Veränderungen kleiner GTPasen durch posttranslationale Modifikationen und die großzügige Bereitstellung der Daten. Außerdem danke ich Prof. Dr. Michael Sattler für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Prof. Dr. Martin Zacharias, Rainer Bomblies und Manuel Luitz für die erfolgreiche Kooperation im Rahmen der Computergestützten Analyse der Konformationsänderungen kleiner GTPasen.

Prof. Dr. Andreas Marx und Dr. Stefan Hacker für die großzügige Bereitstellung der fluoreszenten Nukleotidanaloga.

Prof. Dr. Stephan Sieber und Dr. Pavel Kielkowski für die großzügige Bereitstellung der Propargyl-Nukleotidanaloga.

Der gesamten AG Proteinchemie für die tolle Arbeitsatmosphäre und die hilfreichen Diskussionen im Laboralltag.

Meiner Familie für ihre kontinuierliche Unterstützung.

EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle wörtlichen oder inhaltlichen Zitate sind als solche gekennzeichnet und im Literaturverzeichnis aufgeführt. Diese Arbeit wurde noch keiner Prüfungskommission zur Begutachtung vorgelegt.

München, den

Evelyn Ramcke