

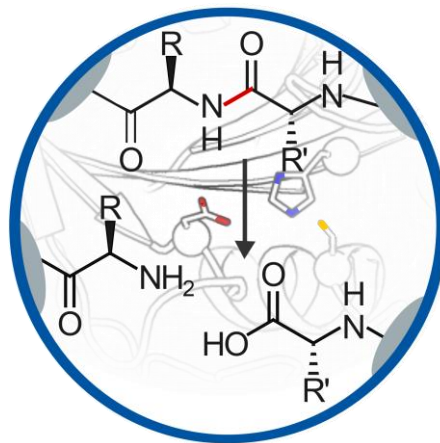


Fakultät für Chemie

Fachbereich für Proteinchemie

Dissertation

Biochemische und strukturelle Einsichten der proteolytischen
Modifikation kleiner GTPasen durch bakterielle Effektoren
aus *Salmonella enterica* und *Vibrio vulnificus*



Rudolf Wachtel



Fakultät für Chemie

Fachbereich Proteinchemie

Biochemische und strukturelle Einsichten der proteolytischen
Modifikation kleiner GTPasen durch bakterielle Effektoren
aus *Salmonella enterica* und *Vibrio vulnificus*

Rudolf Wachtel

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. Michael Groll

Prüfer der Dissertation:

1. Prof. Dr. Aymelt Itzen
2. Prof. Dr. Bernd Reif

Die Dissertation wurde am 12.04.2018 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Chemie am 16.05.2018 angenommen.

Im April 2018 vorgelegt von
Rudolf Wachtel
aus Kara-Balta
geboren am 04.10.1985

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von Januar 2013 bis Dezember 2017 an der Fakultät für Chemie der Technischen Universität München unter der Anleitung von Univ.-Prof. Dr. Aymelt Itzen durchgeführt.

Im Rahmen dieser Arbeit ist folgende Veröffentlichung erschienen:

Wachtel R., Bräuning B., Mader S.L., Ecker F., Kaila V.R.I., Groll M., Itzen A. The protease GtgE from *Salmonella* exclusively targets inactive Rab GTPases. *Nature Communications* 9:44 (2018). doi: 10.1038/s41467-017-02110-1

Ein weiteres Manuskript ist in Vorbereitung:

Wachtel R., Kordon J., Itzen A. (2018) The regioselective Ras and Rap1 specific protease from *Vibrio vulnificus* constitutes a new type of glutamate carboxyl-endopeptidases.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	II
Abkürzungen / Formelzeichen.....	VI
Abstract	1
Zusammenfassung	2
1. Einleitung	3
1.1. Kleine GTPasen als Molekulare Schalter der Zelle.....	3
1.1.1. Strukturelle Grundlagen und Regulation kleiner GTPasen	5
1.1.2. Die kleine GTPase Ras in der Zellteilung.....	7
1.1.3. RabGTPasen vermitteln den vesikulären Transport.....	9
1.1.4. Zelluläre Funktionen der Rab32 Unterfamilie	12
1.2. Regulation kleiner GTPasen durch posttranslationale Modifikationen.....	14
1.2.1. Physiologische posttranslationale Modifikationen bei Ras-und RabGTPasen	15
1.2.2. Kovalente Modifikationen als Manipulationsstrategie bakterieller Pathogene.	16
1.3. <i>Salmonella enterica</i> und <i>Vibrio vulnificus</i>: bedeutende Humanpathogene....	19
1.3.1. Die intrazelluläre Infektionsstrategie von <i>Salmonella Typhimurium</i>	19
1.3.2. Die Cysteinprotease GtgE aus <i>Salmonella enterica</i> Serovar Typhimurium	21
1.3.3. Das GTPase aktivierende Protein SopD2 aus <i>Salmonella enterica</i>	22
1.3.4. Die MARTX Toxin unterstützte Infektionsstrategie von <i>Vibrio vulnificus</i>	23
1.3.5. Der proteolytische Effektor DUF5 _{VV} /RRSP aus <i>Vibrio vulnificus</i>	25
1.4. Funktionen der Proteolyse in der Zelle	25
1.4.1. Mechanistische Unterschiede proteolytischer Enzyme	26
1.4.2. Proteolyse als posttranslationale Modifikation bakterieller Enzyme	28
1.4.3. Proteolyse als Manipulationsstrategie kleiner GTPasen	29
2. Zielsetzung.....	30
3. Ergebnisse	31
3.1. Biochemische Charakterisierung der Protease GtgE	31
3.1.1. Aktivitätsnachweis der proteolytischen Modifikation von Rab32	31
3.1.2. GtgE zeigt eine strikte Nukleotidspezifität gegenüber Rab-Substraten.....	33
3.1.3. Proteolytische Effizienz von GtgE	34

3.2. Strukturelle Charakterisierung des Rab32:GDP:GtgE_{C45A} Komplex	36
3.2.1. <i>In vitro</i> Komplexformierung und reduktive Alkylierung	36
3.2.2. Kristallisation eines nicht-kovalenten Rab:GtgE-Komplexes	39
3.2.3. Die Rab32:GDP:GtgE _{C45A} Komplexstruktur	40
3.2.4. Biochemische Validierung des Rab32:GDP:GtgE _{C45A} Komplex	44
3.2.5. Strukturelle Grundlagen der Nukleotidspezifität	47
3.2.6. Die Spezifität der Rab-Substrat Erkennung von GtgE	50
3.3. In vitro Prenylierung von GtgE durch humane Transferasen	53
3.4. Intrazelluläre GtgE-Lokalisation im humanen <i>Salmonella</i>-Infektionsmodell.	54
3.5. Charakterisierung der Protease DUF5_{VV}/RRSP	57
3.5.1. Aktivitätsnachweis und enzymatische Effizienz von RRSP	58
3.5.2. Endopeptidaseaktivität von RRSP an <i>switch I</i> -Peptidenfragmenten aus Ras	60
3.5.3. Bestimmung des katalytischen Mechanismus	61
3.5.4. Identifikation des Aktiven Zentrums	62
3.5.5. Evaluierung der identifizierten Kandidaten des aktiven Zentrums von RRSP	65
3.6. Auswirkungen der proteolytischen Modifikation kleiner GTPasen	68
3.6.1. Konsequenzen für die proteinchemischen Eigenschaften kleiner GTPasen ..	68
3.6.2. Konsequenzen der proteolytischen Spaltung für die Nukleotidaffinität	70
3.6.3. Auswirkungen auf die Interaktion mit Bindepartnern	71
4. Diskussion	73
4.1. Funktion von GtgE und SopD2 im Kontext der Salmonellose	73
4.2. Die molekulare Rab-Substraterkennung durch GtgE	76
4.3. Funktionelle Auswirkungen der Spaltung kleiner GTPasen	77
4.4. Katalytischer Mechanismus neuen Typs in DUF5_{VV}/RRSP	79
4.5. Die Enzymatik der Proteasen GtgE und RRSP	85
5. Ausblick	88
6. Material und Methoden	90
6.1. Material	90
6.1.1. Chemikalien	90
6.1.2. Enzyme, Reagenzien, Antibiotika und Standards	91

6.1.3.	Bakterien-, Hefestämme, Zelllinien und Plasmide.....	92
6.1.4.	Verbrauchsmaterialien, Instrumentation und Zubehör	94
6.1.5.	Häufig verwendete Lösungen und Wachstumsmedien	95
6.1.6.	Software	97
6.2.	Molekularbiologische Methoden	97
6.2.1.	Polymerasekettenreaktion.....	97
6.2.2.	DNA-Isolation aus <i>E. coli</i>	98
6.2.3.	DNA-Trennung und Reinigung	99
6.2.4.	DNA-Manipulationsstrategien.....	99
6.2.5.	Restriktionsverdau.....	100
6.2.6.	DNA-Ligationsstrategien	100
6.2.7.	Klonierungen	101
6.2.8.	Transformation chemisch-kompetenter <i>E. coli</i> Zellen	102
6.2.9.	Herstellung und Transformation elektro-kompetenter <i>Salmonella</i> -Zellen	102
6.2.10.	Transformation von Hefezellen.....	103
6.3.	Synthetische Methoden	103
6.3.1.	Peptidfestphasensynthese	103
6.4.	Proteinchemische Methoden.....	104
6.4.1.	Reinigung kleiner GTPasen: Rab32, Rab29, Rab38, Rab23 sowie Ras.....	105
6.4.2.	Reinigung von GtgE und SopD2 aus <i>Salmonella</i> sowie RRSP/DUF5 _{VV} aus <i>Vibrio</i>	106
6.4.3.	Reinigung des Rab32-Bindeproteins VARP-ANK1	106
6.4.4.	Präparative enzymatische Proteinprenylierung.....	107
6.4.5.	Präparativer Nukleotidaustausch kleiner GTPasen <i>in vitro</i>	107
6.4.6.	Fluoreszenzmarkierung von Proteinen.....	108
6.4.7.	Methylierung von primären Aminen in Proteinen	108
6.4.8.	Kovalente Carboxylgruppen-Markierung durch Epoxynitrophenoxypropan ..	109
6.4.9.	Methoden zum Pufferaustausch von Proteinlösungen	110
6.4.10.	Trypsin-Verdau von Proteinen für die Tandem-Massenspektrometrie	111

6.5. Analytische Methoden	112
6.5.1. Bestimmung der Proteinkonzentration	112
6.5.2. Analytische Hochleistungs-Umkehrphasenchromatographie	112
6.5.3. Flüssigchromatographie gekoppelte Massenspektrometrie	113
6.5.4. Analytische Größenausschlusschromatographie	113
6.5.5. Denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese	114
6.5.6. Zeitaufgelöster Gel-Shift-Aktivitätsnachweis	114
6.5.7. RRSP-Endopeptidase Aktivitätsnachweis	115
6.6. Biophysikalische Methoden	116
6.6.1. Fluoreszenzspektroskopie	116
6.6.2. Stopped-Flow Fluoreszenz Spektroskopie	116
6.6.3. Isothermale Titrationskalorimetrie	117
6.6.4. Analytische Ultrazentrifugation	118
6.6.5. Mikromaßstab Thermophorese	118
6.6.6. Zirkulardichroismus Spektroskopie.....	119
6.6.7. Differenzscan Fluorometrie	119
6.6.8. Fluoreszenzmikroskopie	120
6.7. Zellbiologische und Infektionsbiologische Methoden	121
6.7.1. Kultivierung und Handhabung von humanen Zelllinien	121
6.7.2. Salmonelleninfektionsexperimente mit Humanzellen	121
6.7.3. Yeast-Two-Hybrid Proteininteraktionsnachweis	121
6.7.4. Zytotoxizitätstest in Hefen	122
Literaturverzeichnis References	123
7. Anhang	134
7.1. Ergänzende Abbildungen und Tabellen	134
7.2. Tabellenverzeichnis.....	146
7.3. Abbildungsverzeichnis	147
Danksagung	150
Eidesstattliche Erklärung	151

Abkürzungen / Formelzeichen

Å	Angström
%	Prozent
(v/v)	Volumenprozent
(w/v)	Masseprozent
°C	Grad Celsius
ε	Extinktionskoeffizient
Ω	Ohm
A (mA)	Ampere (Milliampere)
aa	Aminosäuren (engl. <i>amino acids</i>)
ADP	Adenosindiphosphat
AMP	Adenosinmonophosphat
ATP	Adenosintriphosphat
aUZ	analytische Ultrazentrifugation
BME	β-Mercaptoethanol
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serum Albumin
bzw.	Beziehungsweise
c	Konzentration
ca.	circa
CD	Zirkulardichroismus
C-Terminus	Carboxyterminus
Da (kDa)	Dalton (Kilodalton)
ddH ₂ O	bidestilliertes Wasser
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSF	Differential Scanning Fluorometry
DUF	Proteindomäne unbekannter Funktion (engl. <i>Domain of unknown function</i>)
E	Extinktion
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ESI	Elektrospray-Ionisation
et al.	und andere (lat.: <i>et alii</i>)
etc.	und so weiter (lat.: <i>et cetera</i>)
FA	Ameisensäure (engl. <i>formic acid</i>)
FI	Fluoreszenzintensität
FL	Volllänge (engl. <i>full length</i>)
FRET	Förster Resonanzenergietransfer
g (mg, µg, ng)	Gramm (Milligramm, Mikrogramm, Nanogramm)
GAP	GTPase aktivierendes Protein
GDI	GDP Dissoziationsinhibitor
GDP	Guanosindiphosphat
GEF	Guaninnukleotidaustauschfaktor
GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i>
GMP	Guanosinmonophosphat
GppNHp	nicht hydrolysierbares GTP-Analog
gtg	Prophage <u>G</u> ifsy-2 (engl. <i>two</i>) <u>Gen</u>
GTP	Guanosintriphosphat

GTPase	Guanosintriphosphat hydrolase
h	Stunde (engl. hour)
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (engl. <i>high performance liquid chromatography</i>)
HPS	Hermansky-Publak Syndrom
IMAC	immobilized metal ion affinity chromatography
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
ITC	Isothermale Titrationskalorimetrie (engl. <i>isothermal titration calorimetry</i>)
k_{cat}/K_M	katalytische Effizienz
K_D	Dissoziationskonstante
K_M	Michaelis-Menten-Konstante
L (mL, μ L)	Liter (Milliliter, Mikroliter)
<i>L. pneumophila</i>	<i>Legionella pneumophila</i>
LB	<i>lysogeny broth</i>
LC	Flüssigchromatographie (engl. <i>liquid chromatography</i>)
m (cm, mm, μ m, nm)	Meter (Zentimeter, Millimeter, Mikrometer, Nanometer)
M (mM, μ M, nM)	Molar (Millimolar, Mikromolar, Nanomolar) mol/L
m/z	Masse/Ladung-Verhältnis
Mant	Methylantraniloyl
MARTX	<u>M</u> ultifunktionale <u>A</u> utoprozessive Wiederholungen (engl. <i>repeats</i>) in <u>T</u> oxinen
MBP	Maltose-bindendes Protein
MCS	multiple cloning site
min	Minute
MS	Massenspektrometrie
MS/MS	Tandem-Massenspektrometrie
MST	Mikro-Skala Thermophorese
MWCO	Molekularer Größenausschluss in kDa (engl. <i>molecular weight cut off</i>)
n	Anzahl
Ni-NTA	Nickel-Nitrilotriessigsäure
N-Terminus	Aminoterminus
OD600	Optische Dichte bei 600 nm
PCR	Polymerasekettenreaktion (engl. <i>polymerase chain reaction</i>)
PCV	Pathogen Containing Vacuole
PD	Parkinson (engl. <i>Parkinson's Disease</i>)
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
PTM	posttranslationale Modifikation
Rab	Ras-verwandt im Gehirn (engl. <i>Ras-related in brain</i>)
Ras	Ratten Sarkom Virus Oncogene Homolog
RNA	Ribonukleinsäure
RP	Umkehrphase (engl. <i>reversed phase</i>)
rpm	Umdrehungen pro Minute (engl. <i>revolutions per minute</i>)
RRSP	Ras/Rap1 Spezifische Protease (auch DUF5Vv)
s	Sekunde
S	Svedberg
S.	Seite
s.	siehe

<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ; Bäckerhefe
SCV	<i>Salmonella Containing Vacuole</i>
SD-Medium	Selektionsmangelmedium (engl. <i>selection dropout</i>)
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (engl. sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis)
SEC	Gelfiltrationschromatographie oder Größenausschlusschromatographie (engl. <i>size exclusion chromatography</i>)
SLIC	Sequenz und Ligations unabhängige Klonierung (engl. <i>sequence and ligation independent cloning</i>)
SOB	super optimal broth
SPI-1; -2	Salmonella-Pathogenitätsinsel 1; 2
T3SS	Typ 3-Sekretionssystem
TEV	Tobacco Etch Virus
TM	Schmelzpunkt
UV	Ultraviolett
V (kV)	Volt (Kilovolt)
<i>V. cholerae</i>	<i>Vibrio cholerae</i>
<i>V. vulnificus</i>	<i>Vibrio vulnificus</i>
Vis	Sichtbar (engl. <i>visible</i>)
WT	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel

Aminosäureabkürzungen

Alle proteinogenen Aminosäuren sind entsprechend den Empfehlungen der *International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC) und der *International Union of Biochemistry and Molecular Biology* (IUB) mit Drei- oder Ein-Buchstabencode abgekürzt.

Abstract

Biochemical and structural insights into the proteolytic modification of small GTPases by bacterial effectors from *Salmonella enterica* and *Vibrio vulnificus*

Small guanosine triphosphate-binding proteins (GTPases) play a crucial role as binary molecular *switches* in many cellular processes like cell division or membrane transport. Therefore, they are common targets of specialized bacterial enzymes that introduce covalent modifications aiming to manipulate intracellular regulation in favor of the pathogen. Regioselective proteolysis has only recently been identified as a modification in small GTPases. Its consequences as irreversible modification in the functioning of this central protein class are still poorly understood. The only two bacterial proteases described so far are GtgE from *Salmonella* Typhimurium as well as the *Vibrio vulnificus* cytotoxic Ras and Rap1 specific protease (RRSP), each of which targets a specific group of Rab or Ras GTPases in a functionally important regulatory switch region. Both enzymes have been characterized in this study by protein-biochemical, structural, and biophysical methods gaining a molecular understanding of the function and the underlying substrate selection mechanisms of these proteases. Furthermore, general functional consequences of switch I cleavage in small GTPases have been elucidated.

The cysteine protease GtgE modifies the Rab32 subfamily and shows a strict, previously unknown selectivity for inactive, GDP-bound GTPases. By establishing the complex structure between a catalytically inactive GtgE mutant and Rab32:GDP, the mode of substrate binding was revealed in molecular detail. It is constituted by three spike-like extensions of the protease together with the two switch regions of the GTPase. A combination of molecular dynamic simulations and mutational analysis identified F88 of the switch II from Rab32 as an important element of a multifactorial nucleotide selection mechanism. The proven dependence of GtgE on another *Salmonella* enzyme (SopD2) led to the formulation of a cooperative, sequential model of effective, irreversible Rab32 inactivation. From an enzymatic point of view, GtgE is an efficient enzyme ($k_{cat}/K_M = 5 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) that shows a high substrate affinity ($K_D = 0.1 \text{ }\mu\text{M}$). RRSP is a similarly efficient enzyme ($k_{cat}/K_M = 8 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$), however working in a reverse regime to GtgE with low K_M (90 μM) and high turnover rate ($k_{cat} = 66 \text{ s}^{-1}$). The previously unknown enzymatic mechanism of RRSP was uncovered in a combination of protein chemistry and mass spectrometry methods. Moreover, both amino acids of a catalytic dyad could be identified which is constituted by E3900 and E3930. Therefore, RRSP establishes a new family of bacterial glutamate carboxyl-endorpeptidases. Based on a RRSP structural homology model, the Ras substrate binding with defined binding pockets could be postulated.

This work provides the first comprehensive biochemical characterization of the two bacterial GTPase-modifying proteases, RRSP and GtgE providing molecular insights into selection mechanisms and reveals a novel type of catalytic center.

Zusammenfassung

Kleine Guanosinribosephosphat bindende Proteine (GTPasen) sind als binäre, molekulare Schaltermoleküle an vielen zellulären Prozessen, wie der Zellteilung oder dem Membrantransport, entscheidend beteiligt. Daher sind sie ein häufiges Ziel spezialisierter bakterieller Enzyme, die kovalente Modifikationen einführen, welche die intrazelluläre Regulation zu Gunsten des pathogenen Erregers manipulieren. Die regioselektive Proteolyse als Modifikation in kleinen GTPasen wurde erst in neuerer Zeit identifiziert und ist in seiner Konsequenz ein wenig verstandener, irreversibler Eingriff in die Funktionsweise dieser zentralen Proteinklasse. Die bislang beschriebenen bakteriellen Proteasen sind GtgE aus *Salmonella Typhimurium* sowie die zytotoxische *Ras und Rap1 spezifische Protease* (RRSP) aus *Vibrio vulnificus*. Diese modifizieren jeweils eine spezifische Gruppe von Rab- bzw. RasGTPasen in einer funktionell bedeutenden regulatorischen Schalterregion (*switch I*). Beide Enzyme wurden in dieser Arbeit mit proteinchemischen, strukturbioologischen und biophysikalischen Methoden charakterisiert, um ein molekulares Verständnis der Funktionsweise sowie der zugrundeliegenden Substratselektionsmechanismen der Proteasen zu gewinnen. Ebenso sollten allgemeingültige funktionelle Konsequenzen der *switch I*-Spaltung in kleinen GTPasen abgeleitet werden.

Die Cysteinprotease GtgE modifiziert die Rab32-Unterfamilie und zeigt eine strikte, bisher unbekannt Spezifität für inaktive, GDP-gebundenen GTPasen. Durch die Etablierung einer Komplexstruktur zwischen einer katalytisch inaktiven GtgE Mutante und Rab32:GDP konnte die Substratbindung im Detail aufgedeckt werden, die sich aus drei stachelähnlichen Fortsätzen der Protease sowie beiden *switch*-Regionen der GTPase formiert. Eine Kombination aus molekulardynamischen Simulationen und Mutationsanalysen identifizierte F88 des *switch II* aus Rab32 als wichtiges Element eines multifaktoriellen Nukleotidselektionsmechanismus. Die nachgewiesene Abhängigkeit GtgEs von einem weiteren Salmonellenenzym (SopD2) führte zur Formulierung eines kooperativen, sequenziellen Modells einer effektiven, irreversiblen Rab32-Inaktivierung. Aus enzymatischer Sicht ist GtgE ein effizientes Enzym ($k_{cat}/K_M = 5 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$), das eine hohe Substrataffinität aufweist ($K_D = 0,1 \text{ }\mu\text{M}$). Ein ähnlich effizientes Enzym ist RRSP ($k_{cat}/K_M = 8 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$), das ein gegenläufiges Arbeitsregime mit geringem K_M (90 μM) und hoher Umsatzrate ($k_{cat} = 66 \text{ s}^{-1}$) zeigt. Mit einer Kombination aus proteinchemischen und massenspektrometrischen Methoden konnte sowohl der bislang unbekannte enzymatische Mechanismus von RRSP aufgedeckt als auch die Aminosäuren des katalytischen Zentrums identifiziert werden. Hierbei wirkt RRSP über eine Dyade aus E3900 sowie E3930 und begründet damit eine bisher nicht beschriebene Familie von bakteriellen Glutamatproteasen. Anhand eines RRSP-Strukturhomologiemodells ließ sich dadurch die Ras-Substratbindung mit definierten Bindetaschen postulieren.

Diese Arbeit liefert die erste umfassende biochemische Charakterisierung der beiden bakteriellen GTPase-modifizierenden Proteasen RRSP und GtgE, gibt molekulare Einsichten in Selektionsmechanismen und deckt ein katalytisches Zentrum neuen Typs auf.

1. Einleitung

Ein Ziel der Grundlagenforschung in den Lebenswissenschaften ist es, die Funktionsweise und Regulationsprinzipien in eukaryotischen Zellen sowie ihre Pathologien auf molekularer Ebene aufzudecken, um Krankheiten heilen oder behandeln zu können. Ebenso groß ist das Interesse, die Wechselwirkung von pathogenen Erregern mit ihrem Wirt im molekularen Detail zu verstehen, um effektive Therapien zu entwickeln. Die Erkenntnisse aus dem Studium bakterieller Proteine bieten zugleich Einblicke in das Funktionieren eukaryotischer Zellen und sind deshalb in vielfältiger Weise im Fokus des Interesses.

1.1. Kleine GTPasen als Molekulare Schalter der Zelle

Eukaryotische Zellen zeichnen sich im Unterschied zu prokaryotischen Zellen durch ihre Kompartimentierung und die damit verbundene komplexe intrazelluläre Regulation aus. Neben dem namensgebenden Zellkern (griech.: *káryon*) sind weitere membranumhüllte Kompartimente und Organellen, wie Mitochondrien, das endoplasmatische Retikulum (ER), der Golgi-Apparat sowie Zelltyp spezifische Vakuolen und Vesikel charakteristische Merkmale höherer Zellen¹. Diese strukturelle Vielfalt ist Ausdruck der mannigfaltigen Aufgaben und Funktionen, die eine eukaryotische Zelle im Zellverbund eines Organismus erfüllen muss. Neben der Formierung spezifischer Gewebe (z.B. Muskeln, Epithelien oder Nervensystem) und der interzellulären Kommunikation (Signalübertragung durch Neurotransmitter; Hormone) ist das Immunsystem zur Abwehr von Pathogenen (sowohl das angeborene als auch adaptive) ein Wesensmerkmal höherer Tiere wie dem Menschen. Um einen Organismus aus einer Keimzelle entstehen zu lassen und seine Funktion aufrechtzuerhalten, bedarf es einer strikten Koordination und Kontrolle auf intrazellulärer und molekularer Ebene. Für diese Kontrollfunktion wurden in der Evolution unter anderem Guanosintriphosphat (GTP) bindende Proteine (auch GTP Hydrolasen, kleine GTPasen oder G-Proteine) selektiert^{2,3}. Sie können in zwei definierten, unterschiedlichen Zuständen vorliegen: im inaktiven, wenn sie Guanosindiphosphat (GDP) komplexieren sowie dem aktiven Zustand, wenn GTP gebunden ist. Da sie eine wenig ausgeprägte intrinsische GTP-Hydrolyseaktivität in biologischen Zeitskalen besitzen^{4,5}, sind sie auf regulierende Proteine angewiesen, um einen definierten Aktivitätszustand anzunehmen. Diese Eigenschaft macht G-Proteine zu idealen binären, biologischen Schaltermolekülen und zu zentralen Elementen intrazellulärer Signalnetzwerke. Abhängig von dem gebundenen G-Nukleotid (GDP/GTP) rekrutieren GTPasen spezifische Effektoren über Protein-Protein-Interaktionen, die ihrerseits als Vermittler in intrazellulären Signalnetzwerken wirken (s. Abschnitte 1.1.1.-1.1.4.). Die Überführung in den aktiven, GTP-gebundenen Zustand, wird von GEFs (Guanosinnukleotidaustauschfaktor; engl. *guanosine nucleotide exchange*

^a Mit Halbwertszeiten ($t_{1/2}$) der intrinsischen GDP-Hydrolyse von wenigen Minuten (z.B. Rac1, Rab5) bis zu mehrerer Stunden (z.B. Rab32)

factor) vermittelt. Diese aktivieren kleine GTPasen durch die Stimulierung der GDP-Freisetzung und erleichtern hierdurch den Austausch zum GTP. Im Gegensatz hierzu wird die Konversion zurück in den inaktiven, GDP-gebundenen Zustand durch GAPs (GTPase-aktivierende Proteine) katalysiert, indem diese die intrinsische GTP-Hydrolyse von G-Proteinen stimulieren^{6,7}.

Die Proteinklasse der kleinen GTPasen (auch Ras Superfamilie GTPasen) umfasst über 150 Mitglieder in humanen Zellen⁸. Diese werden abhängig von ihrer Sequenzähnlichkeit und ihrer zellulären Funktion in fünf Unterfamilien klassifiziert. Diese umfassen jeweils die Familien der Ras-, Rho-, Arf/Sar-, Ran und RabGTPasen⁹. Die Funktion der namensgebenden GTPase Ras (H-Ras; K-Ras; N-Ras und ihre Isoformen)^b liegt maßgeblich in der Kontrolle der Genexpression in der Wachstumshormon-vermittelten Zellteilung und erklärt damit seine Bedeutung als Onkogen (s. Abschnitt 1.1.2.)¹¹. Die Familie umfasst 30 weitere Vertreter, die u.a. in der Zell-Zell-Adhäsion (Rap1A,B)¹², der mTORC1 vermittelten Genexpressionskontrolle (Rheb)¹³ oder als Tumorsuppressor wirken (D-Ras)⁵. Die Familie der RhoGTPasen besteht aus ca. 20 Mitgliedern, die in der Reorganisation des Zytoskeletts (bspw. bei Aktinfilamenten: Rac1 und Cdc42) sowie der Zellzykluskontrolle beteiligt sind (Cdc42)¹⁴. Vertreter der Arf/Sar Familie sind u.a. an der Genese und dem Transport innerhalb von Cilien sowie der Vesikelabschnürung beteiligt^{9,15}. Ran organisiert den Kerntransport von Proteinen zwischen Zytosol und dem Nukleus, durch den Kernporen-Komplex und ist der einzige Vertreter dieser Familie¹⁶. Alle Membrantransportereignisse werden durch die RabGTPasen orchestriert, welche mit fast 70 Vertretern die größte aller Familien darstellen¹⁷.

Darüber hinaus gibt es noch die nahe verwandten G_{α} -GTPasen, die in Assoziation mit membranverankerten G_{β} sowie G_{γ} Untereinheiten an einem Transmembranrezeptor binden. Dieser Komplex stellt die funktionelle Einheit der G-Protein gekoppelten Rezeptoren dar (GPCRs; engl. *G-protein coupled receptors*). GPCRs nehmen wichtige Aufgaben bei der initialen Signalaufnahme extrazellulärer Stimuli sowie ihrer Weiterleitung wahr, werden aber auf andere Weise als die bisher beschriebenen GTPasen reguliert und sind daher für die weiteren Betrachtungen von nachrangiger Bedeutung¹⁸.

Durch die zentrale Stellung kleiner GTPasen in der Signalübertragung und Regulierung vielschichtiger zellulärer Prozesse, werden sie durch eine Reihe bakterieller Erreger manipuliert, die daraus einen Vorteil für ihre eigene Verbreitung ziehen. Sowohl intrazellulär replizierende Pathogene als auch solche, die nicht in das Zellinnere eindringen, haben Wege entwickelt, mit der Regulation kleiner GTPasen zu interferieren. Solche Manipulationen geschehen vielfach durch die Einführung bakterieller Proteine in die Wirtszelle, die ihrerseits als Bindepartner, Regulatoren oder modifizierende Enzyme wirken^{7,19,20}.

^b Auch als p21^{ras} Onkogen bekannt. Zur Unterscheidung wurden funktionell unterschiedliche Isoformen nach deren Entdeckern Harvey (Ha-Ras; H-Ras) und Kirsten (Ki-Ras; K-Ras) bzw. nach ihrer zelltypspezifischen Funktion in Neutrophilen Makrophagen (N-Ras) benannt¹⁰.

Im Folgenden werden die Struktur-, die Sequenzmerkmale sowie Regulationsmechanismen kleiner GTPasen im Allgemeinen und für Ras und die Rab Familie im Speziellen eingeführt. Hierbei liegt ein besonderes Augenmerk auf den Funktionen von Ras und der Rab32 Unterfamilie in zellulären Signalwegen. Ebenfalls werden posttranslationale Modifikationen (PTMs), die in der Regulation kleiner GTPasen eine wichtige Rolle einnehmen, betrachtet.

1.1.1. Strukturelle Grundlagen und Regulation kleiner GTPasen

Die kleinen GTPasen sind eine Gruppe globulärer Proteine mit einem Molekulargewicht von 20-40 kDa, die eine im Kern konservierte Faltung aufweisen, welche sich aus sechs zentralen β -Strängen (fünf davon als paralleles β -Faltblatt) und fünf ringsum angeordneten α -Helices zusammensetzt (s. Abbildung 1A). Sie weisen den phosphatbindenden P-Loop (auch Walker-Motif) als zentrales Strukturmerkmal auf²¹. Dieser koordiniert neben dem für die Nukleotidbindung essentiellen Magnesiumion, auch die α -, β - sowie γ -Phosphate der gebundenen Nukleotide. Über den als G1-Motiv bezeichneten P-Loop hinaus, gibt es noch vier weitere konservierte Sequenzmotive, die alle kleinen GTPasen gemeinsam haben (G2-G5). Die Nukleobasenspezifität wird durch das G4- (Konsensus Sequenz: NKxD) gemeinsam mit dem G5-Motiv (TSAK) vermittelt, indem sie die Guaninbindetasche formen. Während des GTPase Schaltzyklus ist im inaktiven Zustand GDP und im aktiven GTP in der Bindetasche koordiniert. Durch die Anwesenheit des GTP γ -Phosphats nehmen zuvor flexible Regionen durch eine konformationelle Änderung eine definierte, wenig flexible Struktur ein (s. Abbildung 1A, B). Diese regulatorischen Schalterregionen werden als *switch I* und *switch II* bezeichnet (engl. für Schalter) und sind entscheidend an der Bindung von Effektorproteinen beteiligt. Teile der Motive G2 (das konservierte Threonin im *switch I*-Loop) und G3 (Teil des *switch II*) koordinieren das γ -Phosphat über mehrere Wasserstoffbrückenbindungen. Diese werden sowohl über die Sekundäramine der Peptidbindungen (Thr/Ser in *switch I*, Gly aus dem Dx₂GQ-Motiv) als auch Alkoholgruppen von Seitenketten (Thr/Ser; Tyr in *switch I*) ausgebildet. Die beschriebenen konservierten Elemente tragen zu der hohen Affinität der Nukleotidbindung bei und begründen den konformationellen Schaltmechanismus auf molekularer Ebene²².

Durch vergleichende Studien der Primärstruktur von RabGTPasen wurden für diese Familie weitere Sequenzelemente definiert, über die sie sich anhand der Primärstruktur von anderen G-Proteinen unterscheiden lassen. Die Rab-Familie Motive (RabF1-RabF5)²³ sind um die Nukleotidbindetasche angeordnet und erlauben u.a. die Interaktion mit allgemeinen Interaktionspartnern wie dem Rab eskortierenden Protein (REP) oder dem GDP Dissoziationsinhibitor (GDI) (s. Abschnitt 1.1.3.). Zur weiteren Unterscheidung hat man Rab Unterfamilien-Motive (auch Subfamilien, RabSF1-RabSF4)²³ definiert, die auf der gesamten Rab-Oberfläche verteilt zu finden sind und eine differenziertere Klassifizierung in 10 Unterfamilien erlauben (s. Abbildung 1C). Für die vorliegende Arbeit sind die Motive der *switch*-Regionen (*switch I*: RabSF1, RabF1; *switch II*: RabF3, RabF4) sowie der *Interswitch*-Bereich bestehend

aus den antiparallelen β -Strängen $\beta 2$ und $\beta 3$ (RabF1, RabF2) hervorzuheben. Diese sind wesentlich involviert an Protein-Protein-Interaktionen mit intrazellulären Komponenten und stellen damit auch die Grundlage der spezifischen Erkennung durch bakterielle Enzyme, während der Infektion mit pathogenen Erregern dar. Wichtige Interaktionspartner sind GEFs und GAPs, die Aktivitätsregulatoren Ras-ähnlicher GTPasen.

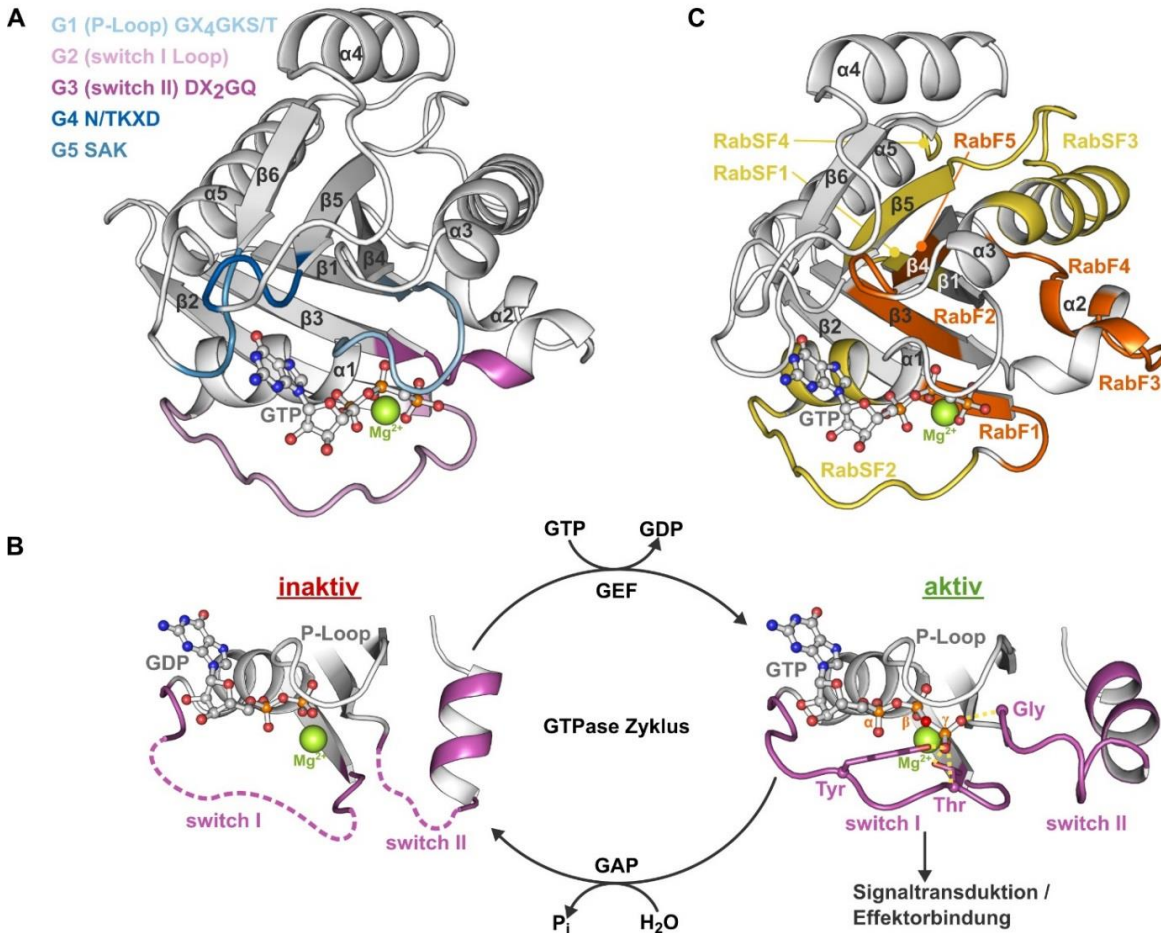


Abbildung 1. Strukturelemente und der Regulationszyklus kleiner GTPasen. **A** Die GTPase Struktur motive G1-G5 am Beispiel von Rab32 (PDB Zugangsnummer 4CYM). **B** Strukturelle Konsequenzen der Regulation kleiner GTPasen im Aktivitäts-Schaltzyklus am Beispiel von K-Ras (PDB Zugangsnummer 4LPK (GDP); 5VQ2 (GTP)). **C** Spezifische Sequenzmotive der Rab-Familie (RabF1-5, orange) und von Rab-Unterfamilien (RabSF1-4, gelb)²³ am Beispiel Rab32 (PDB Zugangsnummer 4CYM). Kugelstabmodell: GDP/GTP; grüne Kugel: Mg²⁺-Ion; magenta: *switch*-Regionen (inkl. G2- G3- Motiv). GAP: GTPase aktivierendes Protein; GEF: Guanosinnukleotid Austauschfaktor.

GEFs sind sowohl ihrer primären als auch tertiären Proteinstruktur nach eine heterogene Gruppe⁷. Viele charakterisierte GEF:GTPase Komplexe lassen allerdings einige mechanistische Gemeinsamkeiten erkennen, die für den Nukleotidaustausch von Bedeutung sind. Zunächst bildet sich ein schwachaffiner ternärer GTPase:GDP:GEFKomplex. Durch die Interaktion mit den nukleotidbindenden Motiven und Resten wie dem P-Loop (G1), dem konservierten Threonin in *switch I* (G2) und vor allem dem konservierten Asp in *switch II* (G3 Motiv DX₂GQE) wird zunächst die Affinität zum zentral koordinierten Magnesiumion herabgesetzt.

Durch weitere spezifische Interaktionen mit beiden *switch*-Regionen wird die Nukleotidbinde-tasche durch das GEF abgeschirmt und geweitet. In der Folge sinkt die Affinität zum gebun-denen Nukleotid und erleichtert dessen Dissoziation unter Ausbildung eines hochaffinen bi-nären GTPase:GEF-Komplexes. Durch die hohe intrazelluläre GTP Konzentration (ca. 1 mM) wird der binäre Proteinkomplex zugunsten eines GTP gebundenen G-Proteins aufgelöst. Die-ser Prozess läuft unabhängig von dem gebundenen Nukleotid ab und die Beladung der GTPase ist abhängig von dem intrazellulären GDP/GTP-Verhältnis⁶.

Nach der Interaktion mit Bindepartnern werden G-Proteine inaktiviert um den Zyklus zu voll-enden und die Aktivitätsdauer zu regulieren. Die dafür zuständigen GAP-Proteine sind deut-lich weniger heterogen in ihrer Sequenzvielfalt als auch der tertiären Proteinstruktur. Mecha-nistisch sind bisher zwei Hauptvarianten beschrieben, wie die GAP vermittelte GTPase-Akti-vität stimuliert ablaufen kann. Bei den GAPs mit einer konservierten TBC-Domäne^c kommen zwei Seitenketten (Arg und Asn) als ‚katalytische Finger‘ zum Einsatz. Das Arginin ragt dabei direkt in das aktive Zentrum des G-Proteins und komplexiert β - und γ -Phosphat. Das Aspa-ragin nimmt die Position des konservierten Glutamins aus *switch II* (DX₂GQE-Motiv; G3) ein und polarisiert ein Wassermolekül in *trans* für den Angriff auf das γ -Phosphat^{6,24}. Der zweite Mechanismus verwendet lediglich einen Arg-Finger der den Übergangszustand der Hydro-lyse an dem γ -Phosphat stabilisiert. Das Wasser wird hierbei durch das intrinsische *switch II* Glutamin in *cis* polarisiert^{25,26}.

1.1.2. Die kleine GTPase Ras in der Zellteilung

Ob sich eine Zelle teilt oder nicht, wird maßgeblich durch den Zellzyklus bestimmt. Die Zell-zykluskontrolle erfolgt durch eine Reihe von Proteinen, zu denen auch Rho- und RasGTPa-sen gehören^{27,28}. Im Weiteren wird lediglich auf die Rolle von Ras sowie dessen Regulation eingegangen. Die Funktionserfüllung von Ras hängt neben der Nukleotidbindung von seiner Membranlokalisation ab. Hierzu durchläuft es mehrere posttranslationale Modifikations-schritte am C-Terminus (s. Abschnitt 1.2.). Dazu gehören C-terminale Lipidierungen, die die Membrananheftung von Ras vermitteln. Die Steuerung der intrazellulären Ras-Lokalisation erfolgt dabei für die verschiedenen Isoformen auf unterschiedlichen Wegen. Häufig spielt die reversible Lipidierung mit einer Palmitoylgruppe eine zentrale Rolle bei Membranassozi-ations- und Dissoziationsprozessen²⁹. Die Steuerung der Nukleotidbeladung erfolgt durch ver-schiedene Gruppen von GEFs und GAPs²⁹. Ein detailliert untersuchter Signalweg der Ras-Aktivierung verläuft über eine Rezeptor-Tyrosinkinase stimulierte Rekrutierung des *Son of Sevenless* (SOS) GEFs. Hierbei wird über die Bindung eines extrazellulären Wachstumsfak-tors die Autophosphorylierung des Rezeptors stimuliert, was zur Rekrutierung von SOS an die Plasmamembran führt. Dort rekrutiert es seinerseits Ras durch den Nukleotidaustausch zu GTP an die Membran³⁰.

^c TBC gemeinsame Domäne in den Hefe GAPs Tre-2, Bub2 und Cdc16²⁴

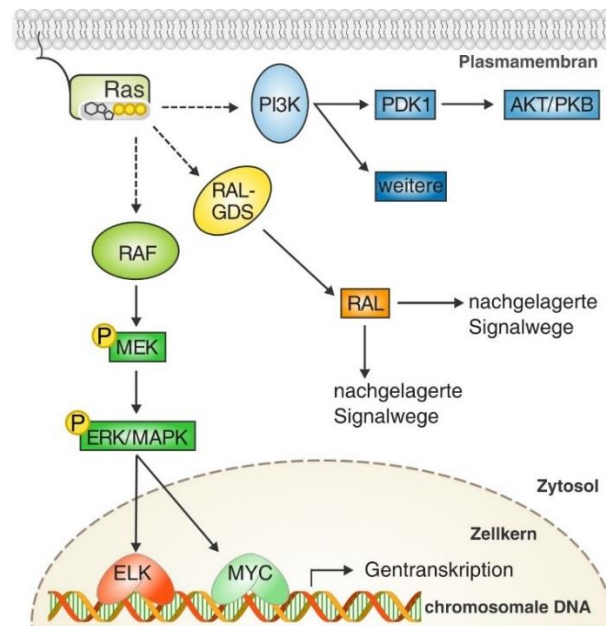


Abbildung 2. Schematische Auswahl von Ras-stimulierten Signalwegen. Das aktivierte, membranassoziierte Ras:GTP (hellgrünes Rechteck) dient als Aktivator von Kinasen (RAF; PI3K) oder als Bindeplattform zur Rekrutierung und Aktivierung weiterer Faktoren an die Membran (Ral-GDS). Die aktivierten Kinasen stehen meist am Beginn von Aktivierungskaskaden (Phosphorylierung/Aktivierung nachgeschalteter Kinasen; hier MEK/MAPK/ERK). Am Ende der signalverstärkenden Kette werden Transkriptionsregulatoren aktiviert, die ihrerseits die Gentranskription im Zellkern regulieren (hier ELK, MYC). Aktives Ras stimuliert auf diesem Weg u.a. die Zellteilung. P: Phosphorylierung.

Aktives Ras stimuliert eine Reihe von Signalwegen. Die drei bestuntersuchten sind der RAF-MEK-ERK/MAPK, der RAL sowie der Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K) Signalweg (s. Abbildung 2). Es wurden weitere Bindepartner von Ras identifiziert. Diese sind bisher weniger eindeutigen Signalwegen zugeordnet. Exemplarisch soll hier der MAPK-Signalweg eingeführt werden, der in verschiedenen Zelltypen mitverantwortlich für die Zellteilung ist³¹. Nach der Aktivierung von Ras, rekrutiert dieses die Serin/Threonin Kinase RAF (*Rapidly Accelerated Fibrosarcoma*) über eine Ras-bindende Domäne (RBD) und stimuliert dessen Kinase-Aktivität. Die nachfolgende Phosphorylierung der bispezifischen *MAPK/ERK-Kinase Tyrosin/Threonin* Kinase (MEK) führt zur Aktivierung der Mitogen Aktivierten Protein Kinase (MAPK)-Kaskade, an dessen Ende die Phosphorylierung von ERK (Extrazellulärsignal regulierte Kinase) steht. Phosphoryliertes ERK (pERK) wird in den Zellkern transportiert und phosphoryliert seinerseits Transkriptionsfaktoren wie ELK, MYC oder NF- κ B^d. Diese induzieren die Transkription wichtiger Faktoren der Zellzykluskontrolle, welche schließlich die Zellteilung einleiten. Dies verdeutlicht auch das Wirken von Ras als Proto-Onkogen. Eine zu hohe Ras-Aktivität trägt zur unregulierten Zellteilung und damit zur Krebsbildung bei. Gewebeabhängig wurden

^d Nuclear factor ' κ -light-chain-enhancer' of activated B-cells ist ein zentraler Transkriptionsfaktor der Immunantwort, der Zellproliferation sowie dem programmierten Zelltod³².

bspw. K-Ras Mutationen in rund 30%^e aller Tumore diagnostiziert^{34,35}. Die wichtigsten mutierten Codone sind nahezu ausschließlich auf Gly12, Gly13 und Gln61 begrenzt (bezogen auf K-Ras). Diese Codone befinden sich einerseits im nukleotidbindenden P-Loop (Gly12, Gly13 im G1-Motiv) und andererseits im *switch II* (katalytisches Gln im G3-Motiv). Als Konsequenz der Mutationen wird Ras durch verschiedene Mechanismen im aktiven Zustand gefangen. Einerseits weil es insensitive gegenüber der Deaktivierung durch GAPs wird, oder andererseits, weil einige Mutanten eine stark verringerte intrinsische GTP-Hydrolyse aufweisen (s. Abschnitt 1.1.1.). Weitere Fehlregulationen in dem Ras vermittelten RAF-MAPK-ERK Signalweg werden ebenfalls mit der Entwicklung von Tumoren in Verbindung gebracht^{35,36}.

1.1.3. RabGTPasen vermitteln den vesikulären Transport

Der Materialaustausch von Zellen mit ihrer Umgebung wird über Endozytose und Exozytose realisiert. Exozytische Prozesse sorgen beispielsweise für den Transport von Rezeptoren und andere Faktoren an die Zelloberfläche, ausgehend vom ER und weiter über den Golgi-Apparat. Durch endozytische Prozesse werden neben Nährstoffen auch membran-gebundene Rezeptoren sowie Viren und Bakterien internalisiert, die im lysosomalen Degradationsweg verdaut bzw. neutralisiert werden. Ebenso wie der Materialaustausch mit der Außenwelt, erfolgt auch der spezifische und ortsgerichtete Transport von Molekülen zwischen Kompartimenten innerhalb der Zelle, über Vesikel. Der Verlauf des Vesikeltransport ist zwar abhängig von den enthaltenden Molekülen (auch als Ladung oder Cargo bezeichnet), lässt sich aber in folgende, allgemeine Schritte aufgliedern³⁷:

1. Cargo abhängige Vesikelsabschnürung von der Donormembran (engl. *budding*)
2. Gerichteter Transport des Vesikels entlang von Filamenten zur Akzeptormembran
3. Akzeptormembranerkennung und Anbindung des Vesikels (engl. *tethering*)
4. Vesikelfusion mit der Akzeptormembran und Cargo-Freisetzung in die Membran oder das Lumen des aufnehmenden Kompartiments.

Für jeden dieser Teilschritte ist eine strikte räumliche und zeitliche Koordination nötig, um die Spezifität und letztlich die Membranidentität der Kompartimente selbst, zu gewährleisten bzw. aufrecht zu erhalten. RabGTPasen sind als Masterregulatoren des Vesikeltransports bekannt, da sie in allen Etappen von aktiv gesteuerten Membrantransportprozessen wichtige Aufgaben übernehmen^{38,39}. Hierzu werden sie, ähnlich zu den Vertretern der Ras-Familie, an ihrem C-Terminus lipidiert. Allerdings handelt es sich hierbei um die Anbringung zweier Geranylgeranylgruppen, die für die nötige, hohe Membranaffinität sorgen (s. Abschnitt 1.2.1.). Zu Beginn eines Zyklus werden sie aus dem Zytosol an die Membran des Abgebenden Kompartiments (Donormembran) über GEFs rekrutiert und dabei aktiviert⁴⁰. Sie zirkulieren dann

^e Bei Darm und Pankreaskrebs sind es nahe 60% in denen konstitutiv aktive Ras Mutanten gefunden werden^{11,33}.

ausgehend von der Donormembran mit den Vesikeln entlang des Zytoskeletts zum aufnehmenden Kompartiment (Akzeptormembran) (s. Abbildung 3, vergleiche Abschnitt 1.1.1.). An der Akzeptormembran kommt es häufig zur Inaktivierung durch GAPs. Der Rücktransport (*recycling*) erfolgt sequenziell über die Extraktion von Rabs durch GDI, gefolgt vom zytosolischen Transport des Rab:GDP:GDI-Komplex und schließt mit der erneuten GEF-vermittelten Rekrutierung an die Donormembran. Die Wechselwirkung mit GDI erfolgt ausschließlich im GDP-gebundenen, inaktiven Zustand. Die hohe Affinität von GDI zu inaktiven Rabs wird wesentlich durch die C-terminalen Geranylgeranylreste vermittelt (K_D 10^{-8} - 10^{-9} M⁻¹)^{41,42}. Die GDI-vermittelte Extraktion von prenylierten Rabs aus der Membran und deren Stabilisierung (und Solubilisierung) sorgt somit für einen Pool von GTPasen im Zytosol, der für eine erneute Rekrutierung an die Donormembran bereitsteht. GDI übernimmt damit auch die Funktion eines Rab-Chaperons⁷.

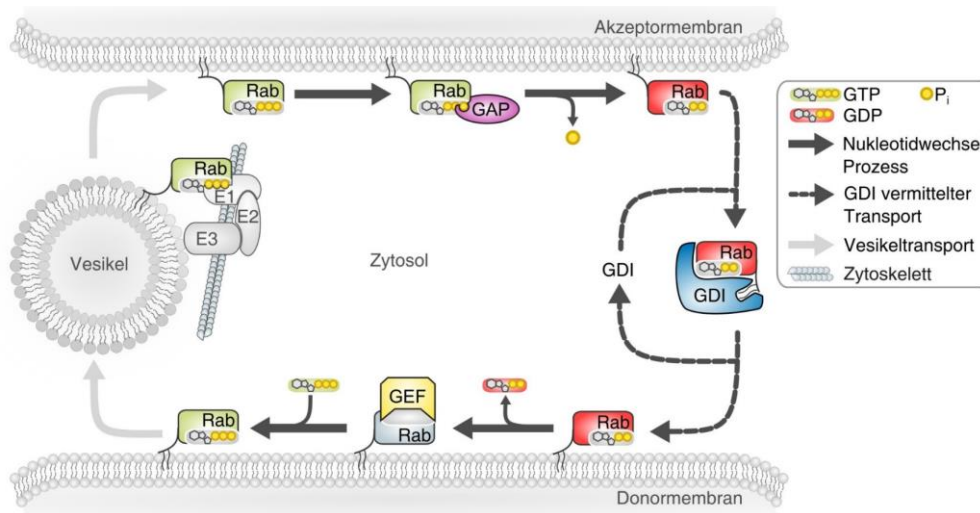


Abbildung 3. Der Lokalisations-Schalt-Zyklus von RabGTPasen im vesikulären Transport. Schematische Übersicht der örtlichen und zeitlichen Abfolge des Rab-vermittelten Vesikeltransports. Nach der GEF-vermittelten Rab-Aktivierung erfolgen die Vesikelabschnürung an der Donormembran sowie der Transport zur Akzeptormembran. Auf die Effektor-vermittelte Membranfusion folgt die GAP-vermittelte Rab-Inaktivierung an der Akzeptormembran. Inaktives Rab wird über die GDI-vermittelten Membran *recycling* für einen neuen Zyklus an der Donormembran bereitgestellt. Grünes/rotes Rechteck: aktives/inaktives Rab; GAP: GTPase aktivierendes Protein (lila); GEF: Guaninnukleotid austauschfaktor (gelb); E1-3: Effektorproteine (grau); GDI: GDP Dissoziationsinhibitor (blau).

Für den Vesikel-vermittelten Transport ist die Interaktion von aktiven RabGTPasen mit Effektoren entscheidend. Diese Interaktionen bestimmen die cargospezifische Vesikelformierung (u.a. über die Bindung von Rezeptor-assoziierten Adaptorproteinen, APs), den Filament-assoziierten Vesikeltransport (über die direkte oder indirekte Bindung von Motorproteinen), die Akzeptormembranerkennung (über das Binden von Tetheringfaktoren) und schließlich die über SNARE^f-Komplexe vermittelte Membranfusion³⁸.

^f Soluble NSF Attachment Protein Receptor

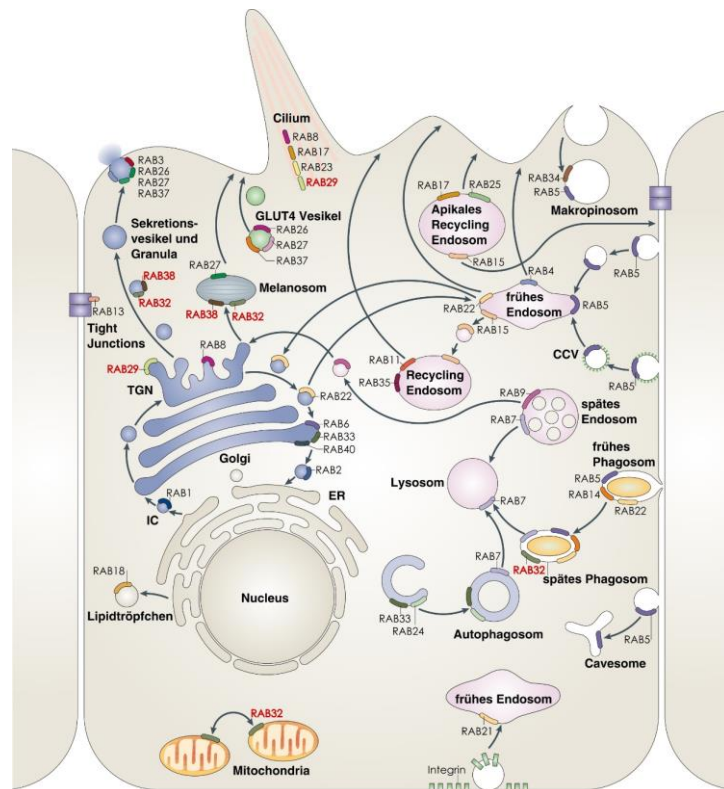


Abbildung 4. Übersicht der Funktionen und Lokalisation von RabGTPasen. Schematischer Querschnitt einer Epithelzelle mit zellulären Kompartimenten sowie vesikulären Transportwegen und einer Auswahl der beteiligten RabGTPasen. Die GTPasen der Rab32-Unterfamilie sind rot hervorgehoben (s. auch Abschnitt 1.1.4.)(modifiziert übernommen mit Erlaubnis von Springer Nature PG)³⁸.

Durch Interaktion mit verschiedenen Effektoren und Regulatoren können dieselben Rabs zelltypabhängig in unterschiedlichen Membrantransportprozessen beteiligt sein. Die Verkettung von Interaktionen, z.B. über Effektor-vermittelte GEF und GAP Rekrutierungen, führt zur Realisierung verschiedener Signalschaltungen. Auf diese Weise werden lokal begrenzte Rab-Domänen an Membranen ausgebildet, die in ihrer Komposition die Identität des Vesikels bzw. Kompartiments bestimmen⁴³. Die Funktionen einzelner RabGTPasen wurden in zahlreichen Studien untersucht und konnten in vielen Fällen bestimmten Membran-assoziierten Prozessen zugeordnet werden. Die Abbildung 4 illustriert dies schematisch, anhand einer Auswahl individueller Rab-Funktionen im zellulären Kontext.

Fehlfunktionen im Rab-vermittelten Vesikeltransport sind mit einer Vielzahl von Pathologien assoziiert (z.B. lysosomale Speicherkrankheiten, oder Parkinson)^{44–46}. Auch wurde vor kurzem mit Rab35 das erste Rab-Onkogen identifiziert⁴⁷.

1.1.4. Zelluläre Funktionen der Rab32 Unterfamilie

Die Rab32-Unterfamilie (Rab29, Rab32, Rab38) ist evolutionär nahe verwandt mit der Rab7-Familie (Rab7, Rab9) (s. Abbildung 5) und ebenfalls in endo-lysosomale Signalwege involviert³. Allerdings wurden auch weitergehende Funktionen der Rab32-Unterfamilie beschrieben, die wenig im Detail verstanden sind.

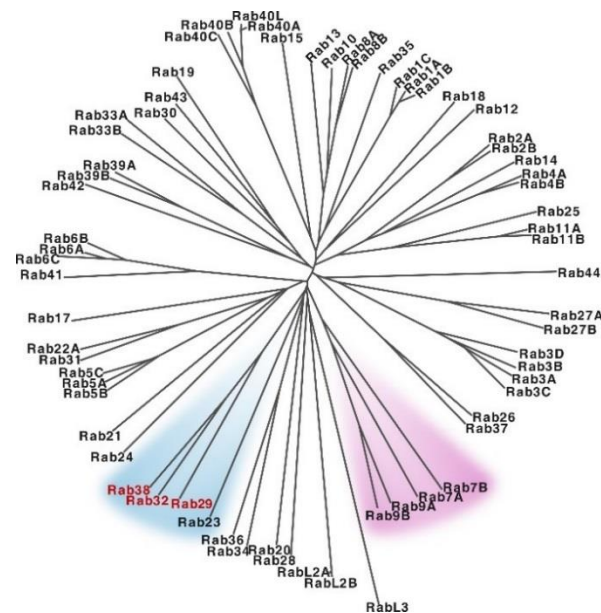


Abbildung 5. Phylogenetischer Baum humaner Rab und Rab-ähnlicher GTPasen. Die Rab32-Unterfamilie ist in Rot hervorgehoben. Gemeinsam mit dem am nächsten verwandten Rab23 ist die Rab32 Unterfamilie in hellblau und die Rab7 Unterfamilie in violett hinterlegt. Der Phylogenetische Baum im Newick-Format wurde mittels multiplem Sequenzvergleich in Clustal Omega⁴⁸ erstellt und grafisch mit der online Software Phylodendron (v0.8d) illustriert (<http://iubio.bio.indiana.edu/treeapp/>).

Rab32/38

Rab38 ist durch eine Rab32 Genverdoppelung entstanden und kommt lediglich in Pigmentzellen der Haut (Melanozyten) sowie in Blutplättchen (Thrombozyten) vor^{3,49}, wohingegen Rab32 in nahezu allen Gewebetypen exprimiert wird⁵⁰. Rab32 ist bisher in vielfältiger Weise mit der Genese von Lysosom verwandten Organellen (LROs⁹; z.B. Melanosomen) sowie dem endo-lysosomalen Vesikeltransport einschließlich der intrazellulären Pathogenabwehr in Verbindung gebracht worden^{51–53} (s. Abbildung 4). Bisherige Studien zu Rab32/38 haben ihre Funktion in Melanozyten, speziell ihre Rolle in dem Tyrosinase-Transportweg der Melanosomenreifung, untersucht^{54,55}. In diesem Zusammenhang wurde die Bindung von Rab32 und Rab38 an das Aktin-assoziierte Motorprotein Myosin Vc nachgewiesen⁵⁵. Weiterhin wurde gezeigt, dass Rab32 und Rab38 an der Reifung von Speicher-Granula in Thrombozyten beteiligt sind^{56,57}. Diese setzen aggregationsfördernde Faktoren in aktivierten Thrombozyten während der Blutgerinnung durch Exozytose frei.

⁹ Engl. *lysosome related organel*

An späten Endosomen (LE; engl. *late endosome*) bindet aktives Rab32 an eine Ankyrin Repeat (ANK1)-Domäne des Multidomänenproteins VARP (VPS9-Domänen Ankyrin Repeat Protein)⁵⁸. Diese Interaktion wurde durch den Heterokomplex aus beiden Proteinen strukturell im molekularen Detail aufgeklärt (PDB Zugangsnummer 4CYM). Die Interaktionsfläche von Rab32 erstreckt sich dabei vor allem über die *Interswitch*-Region (die Motive RabF1 und RabF2) sowie Teile des *switch II*. VARP interagiert seinerseits mit einer Vielzahl weiterer Proteine und spielt damit eine zentrale Rolle im retro-endosomalen Membrantransport⁵⁹. Es bindet u.a. an VAMP7 (endo-lysosomales R-SNARE^h)^{60,61} sowie VPS29 (Untereinheit des Retromer-Komplexes)⁵⁸. Die Funktion der Rab32-VARP Interaktion ist noch nicht vollständig geklärt. Rab32 ist in verschiedenen Zelltypen weiterhin mit der Reifung des Autophagosoms^{62,63} und der Regulation der Mitochondrienteilung in Verbindung gebracht worden^{64,65}. In Immunzellen ist Rab32 an der Lysosomenreifung und der Cathepsin D Rekrutierung beteiligt und spielt damit in der intrazellulären Pathogenabwehr (u.a. bei Salmonelleninfektionen) eine wichtige Rolle^{53,66}. Allerdings ist der Mechanismus, über den Rab32 die Fusion zwischen Phagosom und Lysosom zum Phagolysosom stimuliert, nicht genau bekannt⁶⁷.

Je ein Regulator zur Aktivierung und zur Deaktivierung wurden kürzlich in *in vivo* Studien identifiziert. Damit fungieren BLOC-3ⁱ als GEF⁶⁸ und RuTBC1^j als GAP⁶⁹ von Rab32 sowie Rab38. BLOC-3 wird über eine Interaktion von HPS4 mit dem endosomalen Rab9 an die LRO-Membran rekrutiert⁷⁰. Auch RuTBC1 wird von aktivem Rab9 über seine Rab-Effektor-Domäne an die Membran rekrutiert, wo es Rab32 deaktiviert⁷¹. Ob es sich hierbei um eine koordinierte Rab-Kaskade oder eine konkurrierende Situation zwischen beiden Regulatoren um die Bindung an Rab9 handelt ist nicht bekannt.

Die Fehlregulation des Rab32/38 vermittelten Membrantransports zeigt sich im klinischen Krankheitsbild des Hermansky-Publak-Syndroms (HPS). Ursächlich hierfür sind verschiedene Funktionsverlustmutationen, u.a. im Rab32 GEF BLOC-3 (HPS1/HPS4). In der Folge bilden Betroffene einen Albinismus aus, der auf eine gestörte Melanozytenreifung zurückzuführen ist. Weiterhin ist, durch Fehlfunktionen in der Thrombozytenreifung, die Blutgerinnung und damit die Wundheilung gehemmt^{72,73}. Ebenfalls sind Personen mit HPS überdurchschnittlich häufig von bakteriellen Infektionen betroffen, da das Immunsystem weniger leistungsfähig ist. Die Symptome von HPS decken sich mit den bisher beschriebenen molekularen Funktionen von Rab32/38. In Nervenzellstudien wurde auch von einer möglichen Verbindung zwischen Rab32 und Multipler Sklerose (MS) berichtet⁷⁴.

^h Löslicher NSF-anhängender Rezeptor (engl. *soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment receptor*).

ⁱ Biogenese von Lysosom-verwandten Organellen Komplex-3 (engl. *Biogenesis of lysosome-related organelles complex 3*) bestehend aus einem Heterodimer von HPS1 und HPS4.

^j Enthält die Tre2/Bub2/Cdc16-Domäne.

Rab29

Ein weiterer Vertreter der Unterfamilie ist Rab29 (auch Rab7L1), das in nahezu allen Geweben (v.a. in der Niere) exprimiert wird und mit verschiedenen Funktionen in der Zelle in Verbindung gebracht wird⁷⁵. Die meisten Erkenntnisse über die Funktion von Rab29 stammen aus Studien mit Nerven- oder Immunzellen.

In Immunzellen ist Rab29 an der Ciliogenese, dem Rezeptor-Rücktransport an der Immunsynapse von T-Zellen sowie der Organisation des Trans-Golgi Netzwerks (TGN) beteiligt⁷⁶⁻⁷⁸ (s. Abbildung 4). Neuere Untersuchungen zeigen eine weitere Funktion bei der Regulation der Kinase LRRK2^k in Neuronen auf. Das Multidomänenprotein LRRK2 phosphoryliert mehrere RabGTPasen, darunter Rab29 selbst⁷⁹. Phospho-Rab29 rekrutiert in diesem positiven Feedback-Mechanismus LRRK2 über dessen Ankyrin-Wiederholungsdomäne an den Golgi-Apparat und stimuliert gleichzeitig dessen Kinaseaktivität⁸⁰⁻⁸². LRRK2 ist ein wichtiger Faktor in der Regulation der Autophagie sowie des Retromer-vermittelten Rezeptortransports und interagiert in diesem Zusammenhang u.a. mit der E3 Ubiquitinligase Parkin. Diese ist für die Proteinqualitätskontrolle in der Mitochondrienmembran verantwortlich. Funktionsverlustmutationen in beiden Proteinen, sowohl in LRRK2 als auch in Parkin, sind mit der Ausbildung von Parkinson assoziiert^{83,84}. Weiterhin wurde die Fehlregulation von Rab29 durch Mutationen im RabGEF C9orf72 und der folgenden Störung des trans-Golgi Vesikeltransports beschrieben. Diese Fehlfunktion ist sowohl an der Ausbildung der Motoneuron-Krankheit amyotrophe Lateralsklerose (ALS), als auch an der Neurodegenerativen Pick-Krankheit oder Frontotemporale Demenz (FTD) beteiligt⁷⁸. Die physiologische Bedeutung von Rab29 als zentrale Schaltstelle im Kontext neurodegenerativer Erkrankungen ist daher Gegenstand aktueller Forschungen.

Studien im Kontext der Makrophageninfektion mit *S. Typhi* zeigten die Rekrutierung von Rab29 an die Salmonellen enthaltene Vakuole (SCV), welche dort möglicherweise auch am Vesikel-vermittelten Transportmechanismus des Typhus Toxins beteiligt ist⁸⁵.

1.2. Regulation kleiner GTPasen durch posttranslationale Modifikationen

Der Aktivitätszustand und die Lokalisation von G-Proteinen wird durch GAPs und GEFs bzw. GDI (und ähnliche Proteine) in der Zelle gesteuert. Neben dieser nicht-kovalenten Regulationsebene gibt es eine weitere Ebene, die über kovalente Modifikationen durch zelleigene oder bakterielle Enzyme eingeführt wird, mit dem Ziel einer Modulation bzw. Fehlleitung der Protein-Protein-Interaktionen kleiner GTPasen⁶⁷. Neben der Darstellung wesentlicher physiologischer PTMs wird nachfolgend besonders auf die kovalenten Modifikationen durch bakterielle Enzyme an kleinen GTPasen eingegangen.

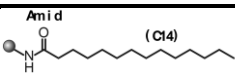
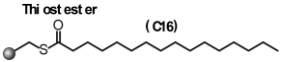
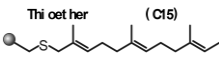
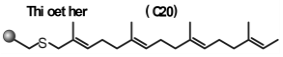
^k *Leucine-rich repeat* Kinase 2 (auch Dardarin) wird von dem PARK8 Gen codiert gehört zu der ROCO-Proteinfamilie. Das etwa 2500 Aminosäuren lange Protein besteht u.a. aus einer Leucin-reichen Wiederholungsdomäne, einer MAPK ähnlichen Kinase-Domäne, einer WD40- sowie je einer Ras- und einer weiteren GTPase-Domäne.

1.2.1. Physiologische posttranslationale Modifikationen bei Ras- und RabGTPasen

Zu den physiologische vorkommenden PTMs an Ras- und RabGTPasen zählen verschiedene Lipidierungen⁸⁶ (s. Tabelle 1), die Proteolyse, die Methylierung²⁹, die N^α-Acetylierung⁸⁷ und vielfach Phosphorylierungen^{79,88,89}.

Die verschiedenen Lipidierung an G-Proteinen vermitteln immer eine Membranaffinität und spielen daher in der Lokalisationsregulation eine wichtige Rolle (s. Tabelle 1). Die irreversible zweifache Geranylgeranylierung (GG) von RabGTPasen wird von der gleichnamigen Transferase (GGTase II) in Kooperation mit dem *Rab Escort Protein* (REP) über einen Thioether C-terminal eingeführt. Diese vermittelt die hohe Affinität zu GDI und ermöglicht damit auch die Membranextraktion⁹⁰. Ras wird im Gegensatz hierzu durch die Farnesyltransferase (FTase) mit einer Farnesylgruppe an dem C-terminalen CaaX-Motiv^l mono-prenyliert. Zur Herabsetzung der elektrostatischen Abstoßung von der Membran werden nachfolgend die drei endständigen Aminosäuren der CaaX-Box entfernt (Carboxypeptidase RCE1) und das endständige Carboxylat durch Methylierung (Isoprenylcystein Carboxylmethyltransferase (ICMT)) als Ester geschützt (ebenso bei Rabs)²⁹.

Tabelle 1. Lipidierungen als posttranslationale Modifikationen kleiner GTPasen. Aufgelistet sind neben den chemischen Lipidstrukturen und der Verknüpfung, die markierten GTPase Familien sowie die modifizierenden Enzyme und Konsensussequenzen in Zielproteinen⁹¹.

Lipidgruppe	Chemische Struktur	mod. GTPase (Quellen)	Enzym	Seq. Motiv
N-Myristoyl-		Arf ⁹² , RasGTPasen ²⁹	NMT	MGxxxS/T
S-Palmitoyl-		Ras ²⁹ , RhoGTPasen ⁹³	PATs	Nicht einheitlich
Farnesyl-		Ras ²⁹ , RhoGTPasen ⁹³	FTase	CaaX
Geranylgeranyl-		RhoGTPasen ²⁷ RabGTPasen ⁹⁰	GGTase I GGTase II (+REP)	CaaL CC, CxC, CC(x) _{n=1-3}

Die physiologische Regulation durch die proteolytische Spaltung anderer Regionen in kleinen GTPasen wurde bisher nicht beschrieben. Die reversible Lipidierung durch die Palmitoylacyltransferase (PAT) vermittelt bei Ras eine variierende Membranaffinität und steuert so u.a. die Lokalisation der GTPase. Phosphorylierungen werden von Kinasen durch die Übertragung des γ -Phosphates eines Adenosintriphosphats (ATP) auf ein Serin-, Threonin- oder Tyrosinalkohol unter Adenosindiphosphat (ADP)-Freisetzung eingeführt und von Phosphatase hydrolytisch entfernt. Auch Ras und RabGTPasen werden auf vielfältige Weise durch Phosphorylierungen reguliert. Beispielsweise setzt eine C-terminale Phosphatgruppe die

^l Konservierte Sequenz aus Cystein gefolgt von zwei aliphatischen (a) und einer beliebigen (X) Aminosäure.

Membranaffinität durch elektrostatische Abstoßung herab. Andere modifizierte Regionen führen zu einer verminderten Aktivierung durch GEFs. Weiterhin kann die Phosphorylierung auch die GDI-Wechselwirkung zu kleinen GTPasen verändern^{79,88,89}.

1.2.2. Kovalente Modifikationen als Manipulationsstrategie bakterieller Pathogene

Nichtphysiologische kovalente Modifikationen, die posttranslational an GTPasen eingeführt werden, wurden zuerst im Kontext bakterieller Toxine beschrieben⁹⁴. Dabei standen Glykosylierungen (v.a. ADP-Ribosylierung; Übertragung von Glukoseresten an alkoholische bzw. Aminogruppen) durch Clostridientoxine im Mittelpunkt vieler Studien. Vielfach wurden Ras und RhoGTPasen als zelluläre Ziele dieser Modifikationen identifiziert (s. Tabelle 2 und Abbildung 6). Später wurden zahlreiche weitere Modifikationen beschrieben (Adenylylierung, Phosphocholinierung, Desaminierung), die allerdings vielfach an kleinen GTPasen der Rab-Familie beobachtet wurden^{95–98}. Zuletzt wurden auch proteolytische Modifikation in regulatorischen Regionen sowie die E3-Ligase unabhängige Ubiquitylierung durch bakterielle Enzyme bekannt (s. Abschnitt 1.4.3.). Phosphorylierungen durch bakterielle Kinasen kommen hingegen, anders als bei der physiologischen Regulation kleiner GTPasen (s. oben), nur sehr selten vor⁹⁹. Orthogonale Modifikationsstrategien scheinen vorteilhaft für den Erreger zu sein, da Änderungen nicht ohne Weiteres von zelleigenen Enzymen rückgängig gemacht werden können. Die strukturelle Vielfalt der Modifikationen reicht von der Spaltung einzelner Bindungen oder dem Austausch funktioneller Gruppen (Proteolyse, Desaminierung), über das Einbringen kleiner Reste unterschiedlicher Ladung (Glukose, Phosphat, Phosphocholin), bis hin zur Einführung sterisch anspruchsvoller Gruppen (ADP-Ribose, AMP) sowie kleinen Proteinen (Ubiquitin) (s. Abbildung 6). Ebenfalls sind Beispiele bekannt, die auf die Membranaffinität kleiner GTPasen abzielen (N^ε-Lipidierung, Proteolyse). Die physiologischen Effekte decken eine große Spanne ab und reichen vom Zusammenbruch wichtiger Signalwege oder dem Kollaps des Zytoskeletts, die beide zum Zelltod führen, bis hin zu subtilen, zeitlich begrenzten Neujustierungen einzelner Signalwege^{94,100} (s. Tabelle 2). Einige Modifikationen sind reversibel und werden von anderen bakteriellen Effektoren wieder abgetrennt (Adenylylierung, Phosphocholinierung), andere sind irreversibel (Proteolyse, Desaminierung). Viele dieser Modifikationen sind in ihren molekularen Konsequenzen und den genauen Wirkmechanismen auf die Signalweiterleitung noch nicht im Detail verstanden. Trotzdem lassen sich aufgrund der Vielfalt der Modifikationen und deren unterschiedlicher Wirkmechanismen, grundsätzliche Prinzipien der Regulation kleiner GTPasen ableiten. Natürlich existieren darüber hinaus noch weitere bakterielle Enzyme, die andere Signalwege manipulieren (u.a. Dephosphorylierungen von Kinase-Kaskaden-Proteinen, Deubiquitylierungen)¹⁰¹ und vielfach nichtkovalent an kleinen GTPasen wirken (bakterielle GEF und GAP Regulatoren oder

Bindeproteine)^{7,67}. Der Fokus dieser Arbeit liegt jedoch auf der Proteinregulation durch kovalente Modifikationen, speziell der proteolytischen Spaltung der regulatorischen *switch*-Regionen von G-Proteinen.

Tabelle 2. Auflistung einer Auswahl posttranslationaler Modifikationen an kleinen GTPasen, eingeführt durch bakterielle Enzyme. Jeder Klasse von Modifikation sind Beispiele sowie die jeweiligen bakteriellen Enzyme samt Quellen zugeordnet. Die physiologischen bzw. molekularen Effekte werden ebenfalls aufgeführt. Die Liste an möglichen Modifikationen ist nicht abschließend.

Posttranslationale Modifikation	GTPase (mod. Position)	Bakterielles Enzym (Spezies), Quelle	Effekt
Adenylylierung	Rab1B (Y77)	DrrA (<i>Legionella pneumophila</i>) ^{102,103}	Arretiert Rab1 in eine aktive Konformation. Rekrutierung an die LCV ¹
	Cdc42 (Y32)	IbpA (<i>Histophilus somni</i>) ¹⁰⁴	Verringert intrinsische GTP-Hydrolyse
	Cdc42 (T35)	VopS (<i>Vibrio parahaemolyticus</i>) ¹⁰⁵	Hemmt die Interaktion mit Regulatoren
ADP-Ribosylierung	RhoA, B, C (N41)	Mono-ADP-ribosyltransferase C3 (<i>Clostridium botulinum</i>) ^{106,107}	Funktionelle Inaktivierung von RhoGTPasen
Desaminierung	RhoA (Q63E)	DN Toxin (<i>Bordetella bronchiseptica</i>) ⁹⁵	Induziert Aktin Stressfibrillen durch überaktive RhoGTPasen
	Gα _q (Q209E)	PM Toxin (<i>Pasteurella multocida</i>) ¹⁰⁸	Hemmt GTP-Hydrolyse heterotrimerer Gα und aktiviert das nachgeschaltete RhoA ¹¹⁰
	Gα _{i1} , Gα _{i3} (Q204E) und weitere Gα	PaTox (<i>Photothabdus asymbiotica</i>) ¹⁰⁹	Unterbrechung der Effektorinteraktion im MAPK/ERK Signalweg, Zelltod
O-Glykosylierung	Ras (T35)	Lethalotoxin (<i>Clostridium sordellii</i>) ¹¹¹	Unterbrechung der Effektorinteraktion im MAPK/ERK Signalweg, Zelltod
	RhoGTPasen (T37 oder T35)	TcdA/B Toxin (<i>Clostridium difficile</i>) ¹¹²	Störung der Aktin-Zytoskelettorganisation, Zelltod
	RhoGTPasen (Y34 oder Y32)	PaTox (<i>Photothabdus asymbiotica</i>) ¹⁰⁹	Übertragung einer NAc-Glukose-Gruppe. Effekt s.o.
Lipidierung	Rac1 (K184,185)	RID (<i>Vibrio vulnificus</i>) ¹¹³	Erhöhung der Membranaffinität, Zytoskelett Deformation, Zelltod
Phosphocholinierung	Rab1B (S76)	AnkX (<i>Legionella pneumophila</i>) ⁹⁶	Gehemmte Interaktion mit GDI
Phospho-Riboubiquitinylierung	Rab33B (S154)	SdeA (<i>Legionella pneumophila</i>) ^{114,115}	Verlangsamte GTP-Hydrolyse
Phosphorylierung	Gα _q (S47)	YpkA (<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>) ¹¹⁶	Verringert GTP-Bindung, inaktiviert GPCR-Signalwege
Proteolyse	Rab29(G41-V42)	GtgE (<i>Salmonella enterica</i>) ^{53,85}	Interferenz mit lysosomaler Degradation der SCV ²
	Rab32(G59-V60)		
	Rab38(G43-V44)		
	H-;K-;N-Ras; Rap1A,B (Y32-D33)	DUF5/RRSP (<i>Vibrio vulnificus</i>) ^{117,118}	Unterbrechung der Effektorinteraktion im MAPK/ERK Signalweg, Zelltod
RhoGTPasen (RhoA; Rac; Cdc42)	YopT (<i>Yersinia pestis</i>) ¹¹⁹	Abtrennung des Lipidankers, Membranlösung	

¹Legionellen enthaltende Vakuole. ²*Salmonella* enthaltende Vakuole

Bakterielle Erreger haben gelernt Proteine der Wirtszellen zu ihrem eigenen Vorteil zu manipulieren, wobei einige Effektoren selber durch wirtseigene Enzyme posttranslational modifiziert werden. Die Funktion einiger Effektoren ist abhängig von verschiedenen Lipidierungen, die die Lokalisation an die Membran vermitteln. Bakterielle Effektoren ahmen hierzu entsprechende Konsensussequenzen nach¹²⁰. Ein Beispiel hierfür ist der Salmonellen Effektor SifA, der C-terminal sowohl geranylgeranyliert als auch S-palmitoyliert wird. Lipidiertes SifA lokalisiert an die replikative SCV sowie Salmonellen induzierte Filamente (Sifs) und reguliert dort die Membranfusion^{121,122} (s. Folgeabschnitt 1.3., sowie Abbildung 7).

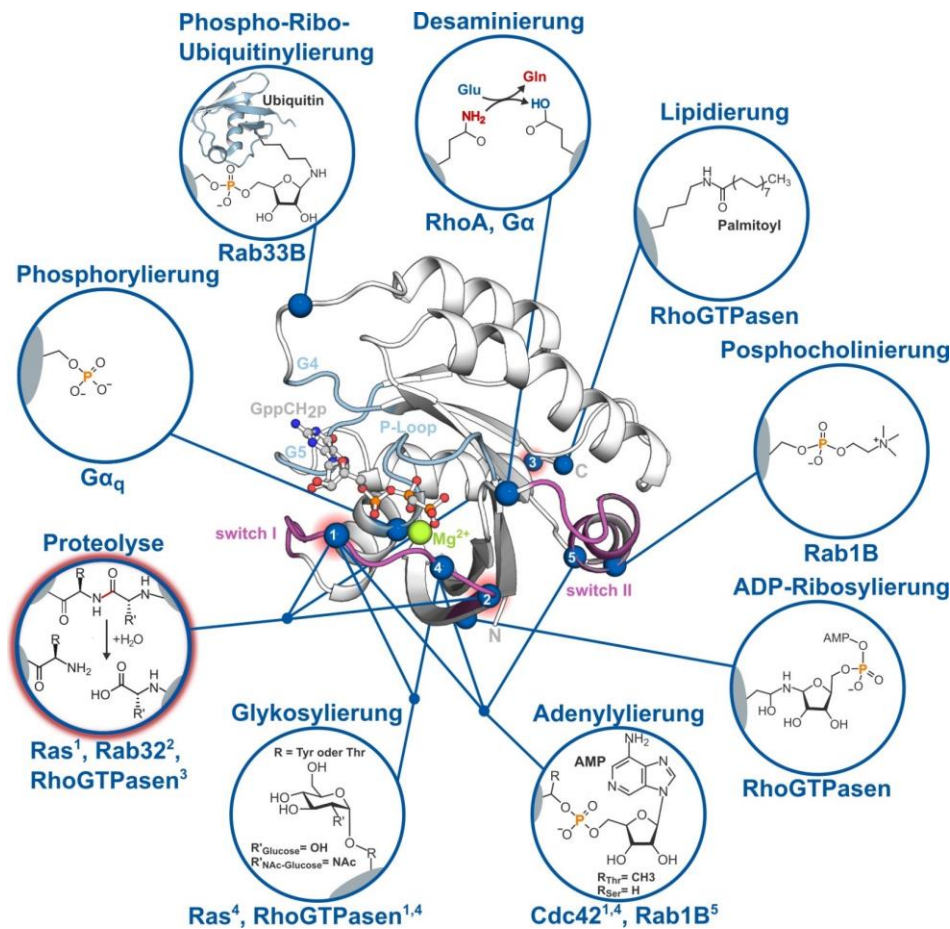


Abbildung 6. Strukturübersicht posttranslationaler Modifikationen an kleinen GTPasen, die durch bakterielle Enzyme eingeführt werden. Zentralabbildung: Strukturelle Bänderdarstellung einer idealtypischen kleinen GTPase im aktiven Zustand. Hervorgehoben sind die regulatorischen *switch*-Regionen (magenta) und der P-Loop mit den GTPase Motiven G4 (NKxD) und G5 (TSAK) (hellblau). Das Nucleotid GppCH₂p ist als Kugelstabmodell und das Mg²⁺-Ion als grüne Kugel dargestellt. Relative Positionen eingeführter PTMs sind als blaue Kugeln repräsentiert. Die satellitenhaften Teilabbildungen zeigen die Strukturen bzw. Reaktionen der PTMs sowie der modifizierten Aminosäurereste. Beispiele modifizierter GTPasen sind unter jeder Teilabbildung aufgeführt und für die eindeutige Positionszuordnung - wo nötig - mit einem Zahlenindex versehen der auf die nummerierten Kugelpositionen verweist. Auffällig ist die Häufung der Modifikationsstellen in den *switch*-Regionen sowie die Fokussierung auf bestimmte Positionen v.a. in *switch I*, nicht aber auf andere GTPase Motive. Die proteolytischen Modifikationen sind mit rotem Hintergrund und Phosphor-Atome in Gelb hervorgehoben. Für weitere Details und Quellenangaben siehe auch Tabelle 2. Die dargestellten Modifikationen sowie aufgeführte Beispiele sind nicht abschließend. Verwendete PDB Zugangsnummer 121P.

1.3. *Salmonella enterica* und *Vibrio vulnificus*: bedeutende Humanpathogene

Die Bakterien *Salmonella enterica* Subspezies (ssp.) *enterica* Serovar Typhimurium (hiernach *S. Typhimurium*) und *Vibrio vulnificus* (hiernach *V. vulnificus*) sind zwei bedeutende Humanpathogene, die beide überwiegend durch befallene Lebensmittel oder kontaminiertes Wasser aufgenommen werden. Die Zahl der weltweit jährlich infizierten Personen mit *Salmonella enterica* (nur invasive, nicht-typhoide Serovare) liegt im Bereich von 60-130 Mio. mit 40'000-300'000 Todesfällen und einer entsprechenden Lethalitätsrate zwischen 0,06-0,2%¹²³. Epidemiologische Daten von *V. vulnificus* Infektionen werden nur in den USA^m systematisch erhoben und sind im Zeitraum von 1992-2007 mit 459 Fällen im Vergleich zu *Salmonella* Infektionen nahezu bedeutungslos. Allerdings ist die Lethalitätsrate mit über 50% aller Infizierten eine der höchsten aller beschriebenen Humanpathogene^{124,125}. Damit ist die Biologie von *V. vulnificus* neben anderen Vibrionen, wie dem naheverwandten Choleraerreger *Vibrio cholerae* (nachfolgend *V. cholerae*), aus toxikologischer Perspektive ein relevantes Studienfeld. Im Folgenden werden beide Pathogene und ihre Infektionsstrategien dargestellt. Hierbei liegt der Fokus auf Manipulationsstrategien der Signalwege kleiner GTPasen und den proteolytischen Enzymen GtgE aus *Salmonella* und RRSP/DUF5_{VV} aus *Vibrio*.

1.3.1. Die intrazelluläre Infektionsstrategie von *Salmonella Typhimurium*

Salmonella enterica ist ein gramnegatives fakultativ intrazelluläres peritrich begeißeltes Enterobakterium, mit mehr als 2500 identifizierten Serotypen (auch Serovare) in sechs Subspezies, die sich vorwiegend in der Struktur der Kohlenhydrate, Lipopolysaccharide (LPS) und der Flagellenproteine an der Zelloberfläche¹²⁶ unterscheiden. *S. Typhimurium*, das sowohl Menschen als auch Tiere infiziert, ruft meist eine lokale Salmonellose hervor, indem es Epithel- und Makrophagenzellen des Gastrointestinaltrakts befällt, was zu Erbrechen, Entzündungen und Diarrhoe führt. Unbehandelt kann sich die Infektion in seltenen Fällen zu einer systemischen Sepsis ausweiten. Hierbei dringt *Salmonella* über die Invasion dendritischer Zellen und Makrophagen in weitere Gewebe ein (v.a. Leber und Milz; transportiert über das lymphatische System). Dies führt zu einer gravierenden Zytokin-vermittelten Entzündungsreaktion, die lebensbedrohlich werden kann^{127,128}. Ein anderer *Salmonella* Serovar ist *S. Typhi*, der Erreger des Typhus. Dieser ist strikt auf den Menschen als Wirt beschränkt und unterscheidet sich von nicht-typhoiden Serovaren, einerseits durch eine verringerte Genomgröße (einige bakterielle Effektoren und Virulenzfaktoren sind nur als Pseudogene vorhanden oder vollständig verloren gegangen)¹²⁹, andererseits durch die exklusive Expression des Typhus Toxinsⁿ A₂B₅¹³⁰. Obgleich nicht alle zellulären Zielproteine und Wirkmechanismen des Toxins aufgeklärt sind^{131,132}, unterstreicht die mit ihm verbundene hohe Lethalitätsrate von 10-15%

^m Von der Food and Drug Administration (FDA)

ⁿ Nicht in *S. Typhimurium* vorhanden.

bei typhoiden Fiebererkrankungen, mit weltweit jährlich etwa 200'000 Todesfällen, seine große klinische Bedeutung¹³³.

Alle intrazellulären Pathogene stehen vor den gleichen Herausforderungen bei der Kolonisierung ihres Wirts. Nach der Internalisierung sind die Aushebelung der Wirtsabwehrmechanismen, die Errichtung einer replikativen Nische innerhalb der Zelle, die Vermehrung und schließlich die Freisetzung zur weiteren Ausbreitung die zentralen Aspekte des Infektionszyklus^{134–136}. *Salmonella* ist ein äußerst trickreicher Vertreter intrazellulärer Pathogene. Nach der Passage des Magens erfolgt die Invasion von Epithelzellen oder Makrophagen im Intestinum. Das Eindringen in die Zelle, die Etablierung der *Salmonellen* enthaltenen Vakuole (SCV)^o sowie weitere Pathogen-Wirt-Wechselwirkungen erfolgen häufig über bakterielle Proteine (auch bakterielle Effektoren)¹³⁷. Diese werden über eine injektionsnadelähnliche Maschinerie, dem Typ-3 Sekretionssystem (T3SS), aus dem Bakterienlumen direkt in das Zytoplasma sekretiert^{138,139}. Man unterscheidet zwei Klassen von *Salmonellen*effektoren, die koordiniert zu verschiedenen Zeitpunkten über verschiedene T3S-Systeme in die Zelle gelangen. Die *Salmonella* Pathogenitätsinsel (SPI)-1 Effektoren initiieren die Zellinvasion sowie die Etablierung der SCV, wohingegen die SPI-2 Effektoren für die SCV Aufrechterhaltung, Reifung und die Ausbildung der replikativen SCV¹⁴⁰ mit den charakteristischen *Salmonellen*-induzierten Filamenten (SIFs)¹³⁷ verantwortlich sind (s. Abbildung 7). Die Aktin-vermittelte Invasion (sog. *membrane ruffling*) wird u.a. über die Aktivierung von RhoGTPasen durch das *Salmonella* GEF SopE sowie die Inaktivierung durch das *Salmonella* GAP SptP als Gegenspieler gesteuert^{141,142}. Ein weiterer SPI-I Effektor ist SopB, das als Phosphatase die Phosphoinositidzusammensetzung an der SCV manipuliert, was die Lokalisation vieler RabGTPasen verändert (u.a. Rab5) und damit die Fusion von Lysosomen mit der SCV hemmt¹⁴³. *Salmonella* hat also eine Reihe von Mechanismen gefunden, die Wirtszelle zu manipulieren und seinen intrazellulären Infektionszyklus zu vollenden. Dennoch sind viele Funktionen und Wirkmechanismen der mehr als 30 sekretierten Proteine nicht in allen Fällen im molekularen Detail verstanden¹⁴⁰. Ebenso ist das deutlich unterschiedliche Wirtsspektrum zwischen *S. Typhi* und *S. Typhimurium* und eine mögliche Verbindung zu der unterschiedlichen Ausstattung mit Effektoren in diesem Zusammenhang Gegenstand aktueller Diskussionen.

^o engl. *Salmonella containing vacuole*

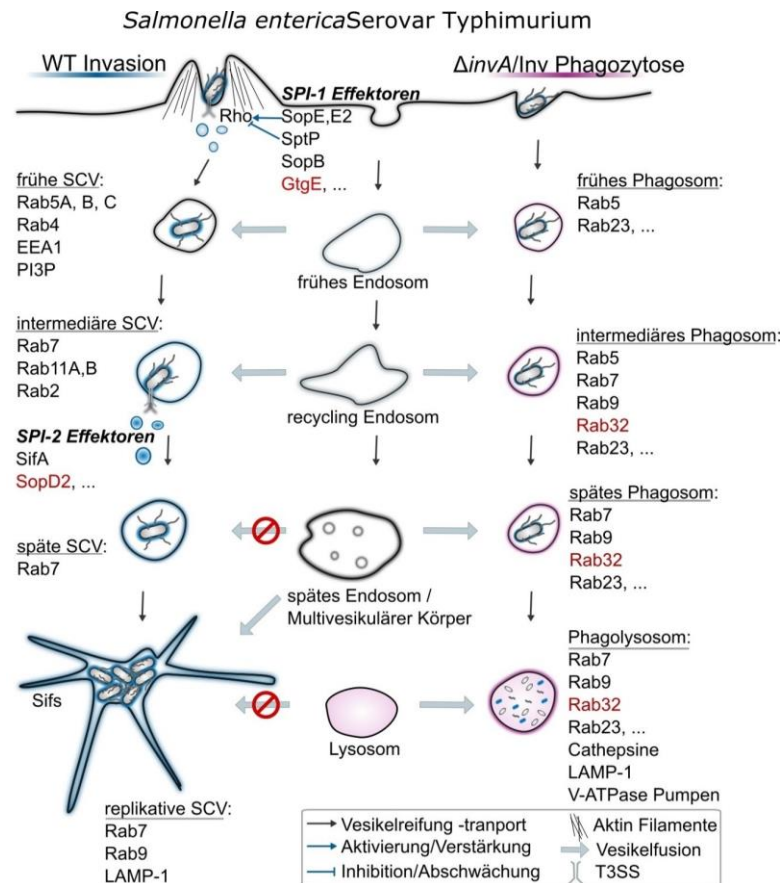


Abbildung 7. Intrazellulärer Infektionsverlauf von *Salmonella Typhimurium*. Vergleichend sind eine erfolgreiche Replikation eines wildtypischen Bakteriums (links; blau hinterlegt) sowie der phago-lysosomale Abbau eines T3SS-sekretionsdefizienten Stammes (links; magenta hinterlegt) abgebildet⁶⁷. Proteine, die an die jeweiligen Vakuolenmembranen rekrutiert werden, sind nicht abschließend aufgelistet. Die Membranfusion der späten bzw. replikativen *Salmonella* enthaltenden Vakuole (SCV) mit späten Endosomen bzw. Lysosomen wird durch *Salmonella* unterbunden. Links: aktive Invasion durch Makropinozytose und Einrichtung sowie Reifung der SCV durch die Sekretion von SPI-1 und -2 Effektoren. Rechts: passive *Salmonellen*aufnahme über Phagozytose und Reifung des Phagosoms bis zur Bakteriendegradation im Phagolysosom. Rot hervorgehoben sind die SPI-Effektoren GtgE und SopD2 sowie Rab32. LAMP-1: Lysosom-assoziiertes Membranprotein 1 (Lysosomenmarker); EEA1: *early endosome antigen 1* (Endosomenmarker).

1.3.2. Die Cysteinprotease GtgE aus *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium

Das für GtgE kodierende Gen ist Teil des Gifsy-2 Bakteriophagen^P und wurde bereits vor rund 15 Jahren gemeinsam mit weiteren Phagengenen als Virulenzfaktor identifiziert¹⁴⁴. Genetische Analysen zeigten, dass *S. Typhimurium*, die Gifsy-2 als Prophagen in ihrem Genom enthielten, höhere Überlebensraten und Infektiosität in Mäusen zeigten. Etwa 10 Jahre später wurde die zugrundeliegende enzymatische Aktivität von GtgE als Cysteinprotease aufgeklärt⁸⁵. GtgE wird zu den SPI-1 Effektoren gezählt und gelangt bereits während der Ausbildung der SCV über das T3SS in das Zytosol der Wirtszelle. Hier erkennt es hoch spezifisch die Rab32 Unterfamilie (Rab29, Rab32 und Rab38) unter den rund 70 möglichen RabGTPase-

^P *Salmonella* spezifischer Bakteriophage ähnlich dem Bakteriophagen λ.

Substraten⁵³. Die proteolytische Modifikation erfolgt im regulatorischen *switch I* Loop zwischen G59 und V60 (Nomenklatur nach Rab32; vergleiche Abbildung 6, s. Tabelle 2). Obgleich die molekularen Konsequenzen dieser Peptidspaltung unklar sind, scheint die allgemeine Wirkung eine Inaktivierung der betreffenden GTPasen zu sein. Die Gruppe um Spanò und Galán haben GtgE als Cysteinprotease identifiziert, die voraussichtlich über eine Triade wirkt, die sich aus einer um einen Aspartatrest erweiterten Cystein-Histidin Dyade zusammensetzt^{53,145}. Hierbei ist das C45 aller Wahrscheinlichkeit nach das Nukleophil, dessen Reaktivität durch die Polarisierung des Imidazolrings von H151 als generelle Base gesteigert wird. Das Imidazol scheint seinerseits durch die Säuregruppe des Asp169 stabilisiert zu werden. Diese Vermutungen basieren auf bisherigen Mutationsanalysen sowie ersten Strukturauflösungen der Protease^{145,146}. Die bisher bekannten Strukturen zeigen ein unvollständiges Bild der Katalyse, da keine alignierte Triade zu sehen ist. Ebenso sind mutmaßlich wichtige Loop-Regionen, die in der Substratbindung involviert sind, in der Elektronendichte nicht aufgelöst. Weiterhin ist bisher keine Enzym-Substrat-Struktur bekannt. Das Verständnis der molekularen Substraterkennung und weiterer Elemente des katalytischen Mechanismus (wie Protonenquelle des Acylkomplexes oder die Oxyanion stabilisierende Tasche) bleiben daher im Dunklen. Da GtgE von *S. Typhimurium*, nicht aber von dem nahe verwandten human-spezifischen Typhuserreger *S. Typhi* exprimiert wird, diskutiert man auch eine mögliche Rolle in der Wirtsspezifität¹⁴⁷. Bei Infektionsstudien in Mäusen wurde gezeigt, dass modifizierte *S. Typhi* Stämme, die GtgE sekretieren konnten, eine deutlich höhere Überlebensrate aufwiesen als wildtypische Bakterien⁵³. Für gewöhnlich wird Rab32 im lysosomalen Abbauweg an der degradierenden Vakuole angereichert (s. Abbildung 7). Dies geschieht in Gegenwart von GtgE aber nicht. Auch wird die Lokalisation von Rab29 manipuliert, indem es im Gegensatz zur Infektion mit *S. Typhi* nicht an die SCV rekrutiert wird⁸⁵.

1.3.3. Das GTPase aktivierende Protein SopD2 aus *Salmonella enterica*

Als SPI-2 Effektor Protein wird SopD2 vermutlich zu einem späteren Stadium der Salmonelleninfektion sekretiert als GtgE. Es ist bereits länger als Virulenzfaktor bekannt. Phänotypisch wurde es mit der Dynamik der SCV-Membran assoziiert^{148,149}. Trotzdem war bis vor kurzem die Funktion des Enzyms nicht bekannt. Es scheint auf mehreren Ebenen in den endosomalen Vesikeltransport einzugreifen. Neben einer Effektordomäne für Rab7 scheint es auch eine GAP Domäne zu enthalten¹⁵⁰. Die Rab7 Interaktion blockiert dessen Interaktion mit RILP und rekrutiert gleichzeitig die GAP Aktivität an die SCV. Neben weiteren RabGTPasen wurde Rab32 als SopD2-Substrat identifiziert^{151,152}. Die SopD2 Struktur zeigt keine der zwei GAP-typischen Faltungen, allerdings wurde der katalytische Arginin-Finger im C-Terminus identifiziert (R315)¹⁵¹ (s. Abschnitt 1.1.1.). Bisher sind keine strukturellen Erkenntnisse über die Rab32-SopD2 Interaktion bekannt. Für den nahe verwandten *Salmonella* SPI-1 Effektor

SopD wurde bisher keine intrazelluläre Aktivität nachgewiesen, obwohl es den gleichen konservierten Arginin-Finger aufweist (R312). Dass Rab32 ein gemeinsames Substrat von GtgE und SopD2 ist, macht das GAP für die vorliegende Arbeit zu einem relevanten Studienobjekt. Es ist bekannt, dass intrazelluläre Pathogene, wenn es dem eigenen Vorteil gereicht, eine Vielzahl von Enzymen für die posttranslationale Regulationsmanipulation einer einzigen GTPase einsetzen. Ein Extrembeispiel hierfür ist die Manipulation von Rab1B durch bis zu sechs Legionelleneffektoren¹⁰⁰ (s. Abschnitt 1.2.2.).

1.3.4. Die MARTX Toxin unterstützte Infektionsstrategie von *Vibrio vulnificus*

Vibrio vulnificus ist ein gramnegatives fakultativ anaerobes monotrich begeißeltes Bakterium, kommt vorwiegend im Meer- und Brackwasser vor und ist ein opportunistisches Humanpathogen. Bei der Infektion über kontaminierte Nahrung (v.a. ungekochte Meerestiere) erfolgt zunächst die Kolonisierung des Intestinaltrakts und nach wenigen Stunden das Eindringen in weitere Gewebe wie Leber und Milz. Häufig weiten sich *V. vulnificus* Infektionen unbehandelt zu einer systemischen Sepsis aus und bilden bei Wundinfektionen große nekrotische Gewebereiche, die operativ entfernt werden müssen^{124,153}. Im Unterschied zu *Salmonella* verbleibt *V. vulnificus* extrazellulär in der Mukosa des Intestinums und hat Wege gefunden, dem zellulären Immunsystem (u.a. Makrophagen) zu widerstehen und über sekretierte Toxine den Zelltod verschiedener Zellen einzuleiten. Dies erklärt auch die rapide, invasive Ausbreitung in verschiedenen Geweben. Einen wesentlichen Teil ihrer Virulenz erwerben Vibrionen (auch *Vibrio cholerae*) über die Infektion mit Bakteriophagen, auf denen zahlreiche Toxine kodiert sind^{154,155}. Einige *V. vulnificus* Stämme tragen die bisher größten beschriebenen Proteintoxine (3500-5300 aa). Diese gehören zu der Klasse der RTX (*repeats in toxin*) Toxine, zu denen auch das porenbildende α -Haemolysin aus *Staphylococcus* und *Escherichia* Spezies zählen. Sie werden über ein Typ1-Sekretionssystem (T1SS) in den extrazellulären Raum sekretiert und autonom über RTX-Wiederholungssequenzen in die Zytomembran eingefügt. Eine Besonderheit der RTX Toxine aus Vibrionen (und einigen anderen Spezies) ist, dass sie keine durchlässigen, membranperforierenden Poren ausbilden, sondern als reine Transportplattform für eine Vielzahl von Effektorproteinen dienen²⁰. Die bakteriellen Effektoren werden autokatalytisch durch eine konservierte Cysteinprotease Domäne (CPD) in der Zelle freigesetzt¹⁵⁶ (s. Abbildung 8A). Daher auch die abgrenzende Familienbezeichnung zu porenbildenden Toxinen: multifunktionelle autoprozessive RTX (MARTX) Toxine. Die mosaikartige Zusammensetzung der Effektoren variiert stark zwischen verschiedenen Spezies sowie unter *V. vulnificus* Stämmen. Das MARTX_{Vv} Toxin (des CMCP6 Stamms) besitzt beispielsweise 5 Effektoren, von denen jeder eine toxische Aktivität gegenüber humanen Zellen aufweist (s. Abbildung 8B). Die biochemische Aktivität und die Funktionen dieser Effektoren wurde in den letzten Jahren in Teilen aufgeklärt und umfasst die Mitochondrien-induzierte Apoptose (durch die MCF_{Vv}-Domäne), die Inhibition der Autophagie (durch die α/β -Hydrolase-

Domäne, ABH) sowie die Immunsuppression durch die Stimulation von Prohibitin1 (durch die RtxA1-D2-Domäne)¹⁵⁷ (s. Abbildung 8).

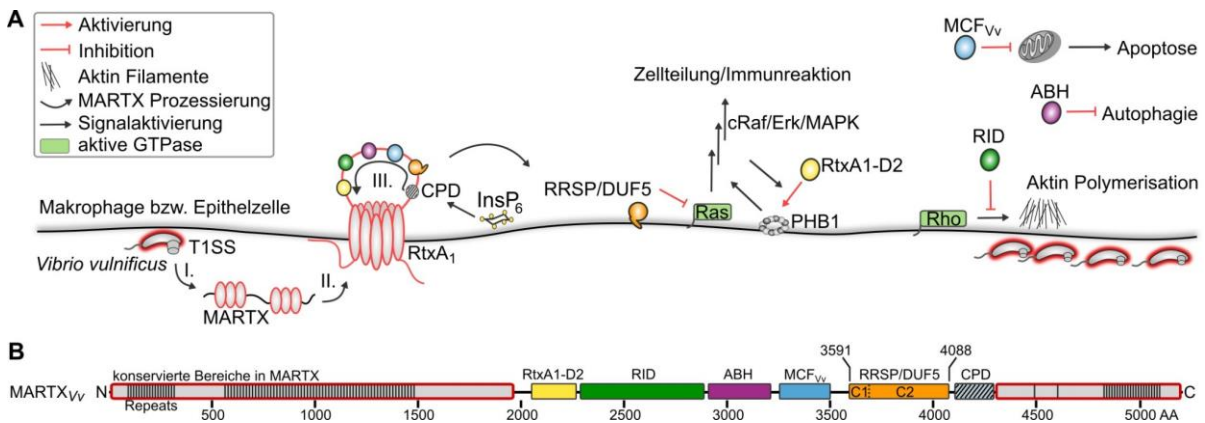


Abbildung 8. MARTX Toxin-geleiteter *Vibrio vulnificus* Infektionsverlauf. A Schematischer Ablauf der MARTX_{Vv} Prozessierung: (I.) Sekretion über ein T1SS (II.) Insertion in die Phospholipidmembran humaner Zellen (III.) InsP₆ vermittelte Aktivierung der CPD und auto-proteolytische Freisetzung bakterieller Effektoren. Die Effektoren RID und RRSP wirken toxisch durch Hemmung GTPase-vermittelter Signalwege^{113,118}. RtxA1-D2 aktiviert Phorbol-1 (PHB1) abhängig vom ERK-Signalweg¹⁵⁸. ABH wirkt als PtdIns3P-spezifische Phospholipase A1 und unterdrückt die Autophagie¹⁵⁹. MCF induziert Mitochondrien vermittelte Apoptose¹⁶⁰. **B** Domänenstruktur des MARTX Toxins aus *V. vulnificus* aa1-5206 des Biotyp 1 Stammes CMCP6. In MARTX konservierte Bereiche und Domänen sind grau hinterlegt. RTX-Wiederholungssequenzen (engl. *Repeats in Toxin*) sind durch vertikale Balken gekennzeichnet und definieren sich u.a über das zentrale Konsensusmotif Gx₇-GxxN aus¹⁵⁴. RID Rho *inactivation domain*; RRSP Ras/Rap1 *specific protease* mit Domänen C1, C2; CPD Cysteine Protease Domain; RtxA1-D2 Domäne (auch DUF1); MCF_{Vv} Makes Caterpillar Floppy ähnliche Domäne aus *V. vulnificus*; ABH α/β-Hydrolase; InsP₆ Inositol Hexakisphosphat; T1SS Typ-1 Sekretionssystem.

Ebenfalls werden Signalwege kleiner GTPasen durch zwei der Effektoren adressiert. Die Organisation der Aktinfilamente wird durch die Rho inhibierende Domäne (RID) gestört. Hierbei wird v.a. Rac1 C-terminal lipidisiert und vermag nicht mehr über GDI recycelt zu werden¹¹³. Ein weiterer Effektor ist die Ras/Rap1-spezifische Protease (auch DUF5_{Vv}), welche u.a. den MAPK/ERK-Signalweg durch die spezifische proteolytische Spaltung von Ras inhibiert¹¹⁸ (s. Abbildung 6 und Abbildung 8A).

1.3.5. Der proteolytische Effektor DUF5_{VV}/RRSP aus *Vibrio vulnificus*

Das *V. vulnificus* Enzym RRSP (auch DUF5_{VV}) ist als zytotoxischer Faktor und Teil eines MARTX_{VV} Toxintransporters identifiziert worden (3591-4088 aa Domäne)¹¹⁷ (s. Abschnitt 1.3.). Es wird nach der erfolgreichen Membraninsertion des Transporters autokatalytisch durch Proteolyse in das Lumen der Wirtszelle entlassen und wirkt dort als Ras und Rap1 spezifische Protease. Dabei spaltet es (ähnlich zu GtgE aus *Salmonella*) eine Peptidbindung in der regulatorischen *switch I* Loop-Region und unterbricht dadurch unter anderem den MAPK/ERK Signalweg¹¹⁸. Die Spaltung erfolgt zwischen Tyr32 und Asp33 (Indizierung nach K-Ras). Der molekulare Mechanismus der Signalunterbrechung in der cRaf-Interaktion ist nicht näher bekannt. RRSP lässt sich in zwei Domänen unterteilen. Eine strukturell umfassend untersuchte N-terminale Membranbindedomäne, bestehend aus einem 4-Helixbündel (C1, 3591-3669 aa), die als Anker in der Phospholipidmembran inseriert und vermutlich zur effektiven Substratumsetzung beiträgt^{117,161,162}. Daran schließt eine katalytische Einheit (C2, 3670-4088 aa) an, die sich in zwei zusammenhängende Domänen unterteilen lässt (C2A, 3669-3855 aa und C2B, 3856-4088 aa) und Träger der zytotoxischen Aktivität ist¹¹⁷. Strukturell ist die katalytische Domäne bisher nicht charakterisiert worden. Es wurde lediglich die Struktur des sequenzverwandten *Pasteurella multocida* Toxins beschrieben (PMT; PDB Zugangsnummer 2EBF). Von PMT ist allerdings keine Proteaseaktivität bekannt. Es wirkt stattdessen durch eine zusätzliche C-terminale Transaminase-Domäne (C3) hemmend auf die α -Untereinheit von GPCRs (s. Abschnitt 1.2.2.), die wiederum in RRSP nicht vorkommt^{108,163}. Trotz größerer Mutationsstudien konnten weder der enzymatische Mechanismus, noch das aktive Zentrum identifiziert werden¹¹⁷. Weiterhin steht eine umfassende biochemische Charakterisierung der Ras/Rap1-spezifischen Protease aus. Die proteolytische Aktivität von RRSP wurde auch in anderen homologen Toxindomänen aus dem biolumineszenten Enterobakterium *Photobacterium luminescens* und dem ebenfalls pathogenen gramnegativen Bakterium *Aeromonas hydrophila* nachgewiesen¹¹⁸. Damit ist die Aktivität von RRSP auch von Bedeutung im Kontext weiterer Infektionsmodelle.

1.4. Funktionen der Proteolyse in der Zelle

Die Halbwertszeit von Peptidbindungen (auch Amidbindung) beträgt bei 25°C unkatalysiert bei neutralem pH mehrere hundert Jahre¹⁶⁴. Und tatsächlich gibt es Proteine, die über Jahre im Körper ihre Aufgaben verrichten ohne ersetzt zu werden (z.B. bestimmte Kollagene der Haut)¹⁶⁵. In vielen Fällen muss die Funktion von Proteinen örtlich bzw. zeitlich, innerhalb oder außerhalb von Zellen beschränkt werden, da sie durch unspezifische Modifikationen Schaden nehmen und ihre Aufgaben nicht mehr verrichten können. Dies macht eine Regulation erforderlich, die letztlich über den proteolytischen Abbau gesteuert wird. Ohne einen solchen regulierenden Eingriff würde die Zelle durch die fortlaufend synthetisierten Proteine in kurzer Zeit funktionsunfähig werden. Der Ubiquitin-vermittelte proteasomale Abbauweg stellt hierbei

den zentraler Degradationsmechanismus der Zelle dar und ist somit der Gegenspieler der ribosomalen Proteinsynthese¹⁶⁶. Andere Proteasen sind deutlich spezifischer in ihrem Substratspektrum und führen lediglich einzelne Spaltungen durch. Damit nehmen sie vielfältige regulatorische Aufgaben wahr, wie beispielsweise im kontrollierten Zelltod (Caspasen)¹⁶⁷, im Immunsystem (NFκB Regulation)³² oder dem Verdauungssystem (Trypsin). Proteasen sind tatsächlich in nahezu alle Aspekte des Lebens involviert^{168,169}. Daher liegt der Fokus im Folgenden auf der Einführung der wesentlichen Proteaseklassen und ihrer katalytischen Mechanismen sowie ihrer Unterschiede.

1.4.1. Mechanistische Unterschiede proteolytischer Enzyme

Für die hydrolytische Spaltung einer Amidbindung hat die Natur durch konvergente Evolution eine Vielzahl katalytischer Peptidasen selektiert, die sich entsprechend ihres katalytischen Zentrums, der dreidimensionalen Struktur sowie ihres Mechanismus klassifizieren lassen¹⁷⁰. Man kann hiernach vier Hauptklassen definieren (Serin, Cystein, Metallo-, Aspartatproteasen), die nach jeweils zwei unterschiedlichen, allgemeinen Reaktionsstrategien arbeiten: entweder über ein Acyl-Enzym-Intermediat (Abbildung 9A), oder durch allgemeine Säure-Base Katalyse (Abbildung 9B). Die Aminosäuren N-terminal von der Spaltstelle werden dabei nach der Schechter-Berger-Nomenklatur aufsteigend zum Aminoterminus mit P1, P2, P3, ... bezeichnet¹⁷¹. Von der Spaltstelle entlang bis zum C-Terminus werden die Aminosäurepositionen entsprechend mit P1', P2', P3', ... indiziert⁹. Die Substratspezifität kommt durch die komplementären Bindetaschen im Enzym zustande, welche entsprechend mit ..., S2, S1, S1', S2',... bezeichnet werden. In der ersten Strategie agieren Serin- und Cysteinproteasen über einen Acyl-Enzym-Komplex Mechanismus¹⁷². Serinproteasen weisen dabei häufig eine kanonische Triade auf. Diese besteht aus: Serin als zentrales Nukleophil; Histidin als generelle Base sowie Aspartat als Stabilisator der Base. Die korrekte Ausrichtung der Triade im aktiven Zentrum ermöglicht die Deprotonierung der Alkoholgruppe des Serins und leitet die Spaltung des in der Bindetasche positionierten Peptidrückrats ein. Bei Cysteinproteasen fungiert ein deprotoniertes Thiol als Nukleophil, das durch ein Histidin als Base aktiviert wird. Häufig wird kein weiterer Säurerest wie in der Serin-Triade benötigt, da der pKs-Wert der Thiolgruppe des Cysteins von 8,3 viele Größenordnungen unter der alkoholischen Gruppe des Serins (pKs ≈ 15) liegt und das Thiol damit deutlich leichter bei physiologischem pH deprotoniert werden kann^{173,174}.

⁹ Dieselbe Nomenklatur wird auch auf Protease Inhibitoren angewendet.

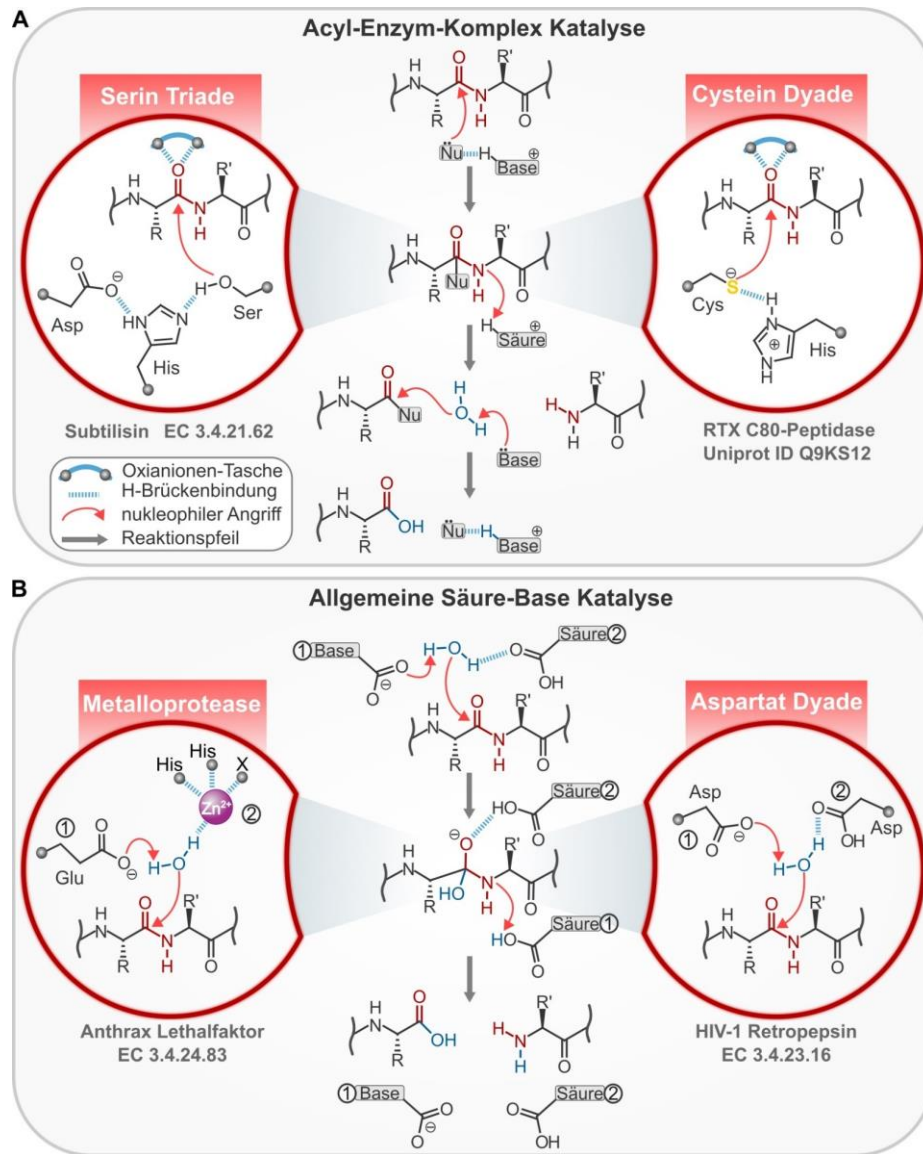


Abbildung 9. Hauptproteaseklassen und ihr katalytischer Mechanismus. **A** Reaktionsverlauf einer katalytischen Peptidspaltung über einen Acyl-Enzym Komplex. Der Carbonylkohlenstoff einer Spaltstelle (dunkelrot) wird durch das Nukleophil (Nu) des aktiven Zentrums unter Ausbildung eines tetraedrigen Übergangskomplexes angegriffen. Die Aminofunktion wird durch Protonabstraktion von einer Base zur Abgangsgruppe, sodass der Übergangszustand unter Ausbildung eines Acyl-Enzym-Komplexes und eines neuen Aminoterminus aufgelöst wird. Der Zyklus wird durch ein polarisiertes Wassermolekül, das den Acyl-Enzym-Komplex am Carbonylkohlenstoff angreift, beendet, wodurch das Nukleophil als Abgangsgruppe abgespalten wird und den neuen Carboxyterminus freisetzt. Das regenerierte Nukleophil steht nun für einen weiteren Spaltungszyklus zur Verfügung. Die seitlichen Teilabbildungen zeigen jeweils den ersten nukleophilen Angriff an der Spaltstelle von Serinproteasen (links, katalytische Triade: Ser-His-Asp) und Cysteinproteasen (rechts; katalytische Dyade: Cys-His) sowie die typische Aminosäureanordnung im aktiven Zentrum. Beispiele bakterieller Enzymvertreter der jeweiligen Klasse sind unterhalb aufgeführt (inkl. Enzym Klassifizierungsnummer; EC oder Uniprot ID). **B** Schematischer Reaktionsverlauf einer allgemeinen Säure-Base katalysierten Peptidspaltung. Im Unterschied zu dem unter A beschriebenen Mechanismus erfolgt bereits der erste nukleophile Angriff auf den Carbonylkohlenstoff durch ein Wassermolekül, das durch die beiden Säuregruppen im aktiven Zentrum ausgerichtet (Säure 2) und polarisiert wird (durch Protonabstraktion, Base 1). Dabei wird ein tetraedrisches Oxyanion ausgebildet, welches durch die Säure 2 stabilisiert wird. Der Übergangszustand wird durch die Abgabe des zuvor abstrahierten Protons an die Aminogruppe aufgelöst und die beiden neuen Termini werden freigesetzt. Die Säuregruppen stehen somit für den nächsten Spaltzyklus bereit. Die Teilabbildungen zeigen die Organisation des aktiven Zentrums in Metallo-Proteasen (links: Glu als Säure 1; Zn^{2+} Ion (lila Kugel) wird durch mehrere H-Brücken komplexiert und fungiert als Säure 2) und Aspartat Proteasen (rechts: katalytische Dyade zweier Aspartatreste). Die Abbildungslegende ist dieselbe wie in A.

Der erste nukleophile Angriff auf die Peptidbindung erfolgt am Carbonylkohlenstoff durch das Nukleophil im aktiven Zentrum (Serin bzw. Cystein). Der tetraedrische Übergangszustand wird durch das Protonieren des Amins aufgelöst, da dieses als Abgangsgruppe den neuen N-Terminus freisetzt. Es bleibt ein Ester- bzw. Thioesterintermediat zurück (Acyl-Enzym-Komplex). Dieser wird durch den nukleophilen Angriff eines Wassermoleküls durch Deacylierung aufgelöst (s. Abbildung 9A). Das zweite Reaktionsschema läuft nach einer allgemeinen Säure-Base-Katalyse ab und wird im Wesentlichen durch Aspartat- und Metalloproteasen implementiert (Abbildung 9B). Im Unterschied zum oben genannten Mechanismus geht die Protease zu keinem Zeitpunkt eine kovalente Verbindung mit dem Substrat ein. Das eigentliche Nukleophil ist ein Wassermolekül, das für die Katalyse durch die Säuregruppen ausgerichtet (Säure 2) und deprotoniert (Säure 1) wird. Das entstehende tetraedrische Oxyanionübergangszustand wird durch die Säure 2 stabilisiert. Die Säure 1 gibt das zuvor abstrahierte Proton an das Amin der Spaltstelle ab und induziert damit die Spaltung, bei der die beiden neuen Termini freigesetzt werden. Das aktive Zentrum steht hiernach für einen neuen Katalysezyklus bereit. Bei Aspartatproteasen konstituieren zwei Aspartatreste das katalytische Zentrum¹⁷⁵. Bei Metalloproteasen sind es zumeist ein Glutamat (Säure 1) und ein koordiniertes Zn^{2+} -Ion (Säure 2) (Abbildung 9B). Neben diesen idealtypischen Mechanismen und Katalyseanordnungen verwendet die Natur eine Vielzahl von Variationen¹⁷⁶. Beispielsweise wurden vor kurzem Glutamatproteasen als eigene Familie beschrieben, nachdem einige Vertreter lange Zeit fälschlicherweise als Aspartatproteasen klassifiziert wurden^{177,178}. Mechanistisch bilden hier ein Glutamat-(Säure 1) und ein Glutaminrest (Säure 2) die katalytische Dyade¹⁷⁹ (s. Abbildung 9B). Viele enzymatische Mechanismen von Proteasen sowie ihre Spezifität wurden mit Hilfe kovalenter und nicht-kovalenten Inhibitoren in Kombination mit Mutagenesestudien aufgeklärt^{169,180,181}. Häufig positionieren sich die Substratbindetaschen erst durch die Bindung des Substrates (Mechanismus der induzierten Anpassung; engl. *induced fit mechanisms*), sodass in der Kristallstruktur diese molekularen Details erst im Enzym-Inhibitor-Komplex (bzw. Enzym_(Mutante):Substrat-Komplex) sichtbar werden und Aufschluss über die Katalyseanordnung geben.

1.4.2. Proteolyse als posttranslationale Modifikation bakterieller Enzyme

Die Proteolyse wird nicht nur von zelleigenen Proteinen zur Steuerung von Signalwegen eingesetzt. Auch pathogene Bakterien nutzen diesen irreversiblen Eingriff, allerdings zum eigenen Vorteil. Beispielsweise unterbinden eine ganze Reihe bakterieller Botulinum und Tetanus Neurotoxine aus *Clostridium* Spezies die Vesikel vermittelte Freisetzung von Neurotransmittern in dem synaptischen Spalt durch die spezifische Spaltung verschiedener Proteine des exozytotischen SNARE Komplexes (VAMP, SNAP-25 sowie Syntaxin). Die Folgen sind schwere Lähmungserscheinung bis zum Aussetzen des vegetativen Nervensystems¹⁸².

Ebenfalls wirkt der Lethalfaktor des Anthrax Toxins aus *Bacillus anthracis* (dem Milzbranderreger) intrazellulär. Dieser stört die Freisetzung des proinflammatorischen Zytokins TNF α in Makrophagen und unterdrückt damit die Immunantwort. Hierbei spaltet es die MAPK Kinase und stört den MAPK/ERK-Signalweg¹⁸³. Derselbe Signalweg, der von RRSP auf der Ebene von Ras manipuliert wird und darüber hinaus zur Inhibition der Zellteilung und später zum Zelltod führt (s. oben). Beide Toxine sind Zink-Metalloproteasen und gehören zu den stärksten bekannten proteinbasierten Zellgiften. Weitere spezifisch wirkende Proteasen aus Pathogenen interferieren neben dem Ubiquitin-Signalwegen auch mit weiteren Aspekten der zellulären Immunantwort, ohne dabei den Zelltod auszulösen¹⁸⁴. Wieder andere Proteasen tragen auf weniger spezifische Weise zur allgemeinen Virulenz von Erregern bei. Als sekretierte Faktoren degradieren sie Proteine in der Umgebung des Bakteriums, um diese als Nährstoff zugänglich zu machen. Dabei interferieren sie unweigerlich mit zellulären Signalwegen außerhalb oder innerhalb der Zelle^{182,185}.

1.4.3. Proteolyse als Manipulationsstrategie kleiner GTPasen

Bisher sind in der Literatur lediglich drei Beispiele beschrieben, bei denen GTPasen direkt durch bakterielle Proteasen modifiziert werden. Die bekannten bakteriellen Effektoren spalten entweder nahe des prenylierten C-Terminus und bewirken die Freisetzung der GTPase von der Membran (YopT) oder in der *switch I*-Region und unterbrechen so die Signalweiterleitung (GtgE und RRSP). Die Cysteinprotease YopT aus *Yersinia pestis* modifiziert spezifisch Rho-GTPasen, um diese von der Membran freizusetzen. Biochemische sowie strukturelle Eigenschaften von YopT sind bereits charakterisiert oder von dem nahen Verwandten AvrPphB aus *Pseudomonas syringae* abgeleitet worden^{119,186–188}. Beide wirken über eine katalytische Triade (Cys-His-Asp) und weisen eine Papain-ähnliche Faltung auf. Die zweite Gruppe von Proteasen wurde erst kürzlich identifiziert. Interessanterweise schneiden sowohl RRSP als auch GtgE in benachbarten Sequenzabschnitten der *switch I*-Region. Da der *switch I* in zahlreichen Effektorinteraktionen eine wichtige Rolle spielt, ist es möglich, dass die Proteasen hier ein allgemeines Regulationsprinzip kleiner GTPasen anwenden, um bestimmte Effektorinteraktionen irreversibel zu unterbinden und ggf. auch die Degradation der GTPase einzuleiten. Humane Proteasen, die auf diese Weise regulatorisch eingreifen, sind bisher nicht beschrieben.

2. Zielsetzung

Die posttranslationale Modifikation kleiner GTPasen, die als zentrale regulatorische Elemente in der Zelle fungieren, ist von großer Bedeutung für ihre intrazelluläre Funktion. Diese Form der Aktivitätsmodulation von G-Proteinen wird nicht nur von der Zelle selbst, sondern auch von bakteriellen Enzymen in vielfältiger Weise genutzt bzw. ausgenutzt. Die Vielfalt der übertragenen Moleküle sowie eingeführten Modifikationen ist beträchtlich und die genauen Wirkmechanismen sowie die Konsequenzen für die modifizierten GTPasen werden bisher nur in wenigen Fällen im Detail verstanden. Die umfassende Charakterisierung der modifizierenden Enzyme sowie das Studium der Auswirkungen von PTMs kann einerseits Einsichten über die Infektionsstrategie pathogener Erreger liefern und hilft andererseits, die Funktions- und Regulationsprinzipien kleiner GTPasen besser zu verstehen.

Die Proteolyse als PTM an kleinen GTPasen durch bakterieller Enzyme wurde bisher anhand von drei Beispielen nachgewiesen. Zwei dieser Proteasen sind GtgE aus *S. Typhimurium* und RRSP aus *V. vulnificus*. Beide modifizieren ihre Substrate in der regulatorischen *switch I*-Region. Die Cysteinprotease GtgE prozessiert selektiv die Rab32-Unterfamilie, wohingegen RRSP auf Ras und Rap1 zielt. Die Konsequenzen dieser Modifikationen sind bisher überwiegend phänotypisch in Infektionsmodellen beschrieben worden. Bemerkenswert sind die hohe Substratspezifität beider Enzyme und die relative Nähe der Modifikationsstellen. Beide Enzyme unterscheiden sich grundlegend voneinander. Neben einem unterschiedlichen Translokationsmechanismus in die Wirtszelle, zeigen sie keinerlei Sequenzverwandtschaft und verwenden verschiedene katalytische Mechanismen für die Modifizierung^r. Bisher fehlen eine umfassende biochemische Charakterisierung beider Enzyme sowie die mechanistische Aufklärung und die Identifizierung des aktiven Zentrums von RRSP.

Ziel dieser Arbeit ist die umfassende biochemische Charakterisierung der proteolytischen Modifikation kleiner GTPasen durch GtgE und RRSP. Neben der Bestimmung enzymatischer Parameter, liegt ein besonderer Fokus auf der Aufklärung der hohen Substratspezifität und der molekularen Substraterkennung der Proteasen. Hierzu sollen Röntgenkristallstrukturanalysen und funktionellen Mutationsstudien eingesetzt werden. Ebenfalls soll der Enzymmechanismus von RRSP mit Hilfe von Inhibitionsstudien bestimmt werden. Nachfolgend steht die Identifizierung des aktiven Zentrums durch eine Kombination aus proteinchemischen sowie massenspektrometrischen Methoden. Abschließend sollen die Konsequenzen der proteolytischen Modifikation kleiner GTPasen über biophysikalische Methoden und Bindestudien mit Interaktionspartnern *in vitro* charakterisiert werden.

^r Cystein ist eine Cysteinprotease und RRSP besitzt kein Cystein in seiner Primärstruktur.

3. Ergebnisse

Gegenstand der durchgeführten Arbeit ist die Charakterisierung der Proteolyse kleiner GTPasen als posttranslationale Modifikation durch bakterielle Enzyme auf biochemischer, mechanistischer und struktureller Ebene. Hierzu wurde die Aktivität der Cysteinprotease GtgE sowie die Interaktion mit den bekannten Rab-Substraten biochemisch in Abschnitt 3.1. untersucht. Die Substraterkennung wird im Folgeabschnitt anhand einer Enzym-Substrat-Komplexstruktur von GtgE und Rab32 biochemisch und biophysikalisch evaluiert. In den Abschnitten 3.3. steht die Prenylierung der Protease im Vordergrund und wird im letzten Teilabschnitt mit ersten intrazellulären Lokalisationsstudien im Infektionsmodell mit Salmonellen abgeschlossen. Einen zweiten Schwerpunkt der Arbeit nimmt die biochemische Charakterisierung der Ras und Rap1 spezifischen Protease RRSP ein. In Abschnitt 3.5. steht neben der Bestimmung der katalytischen Effizienz die Aufklärung des enzymatischen Mechanismus sowie die Identifizierung des aktiven Zentrums im Vordergrund. Ebenfalls wird die Substratspaltung und -erkennung an Peptidmodellen massenspektrometrisch charakterisiert.

3.1. Biochemische Charakterisierung der Protease GtgE

3.1.1. Aktivitätsnachweis der proteolytischen Modifikation von Rab32

Die von Spanò und Galán beschriebene regioselektive proteolytische Aktivität von GtgE, die sich spezifisch gegen die Mitglieder der Rab32-Unterfamilie richtet⁵³, wurde zunächst qualitativ überprüft (s. Abbildung 10A-C). Darüber hinaus wurde das Substratspektrum von GtgE gegenüber weiteren kleinen GTPasen in einem *Screening*-Ansatz evaluiert. Die Proteine zu dieser Studie stammen aus Beständen der Arbeitsgruppe Goody (MPI Dortmund) und wurden ohne weitere Charakterisierung in eine Gel-Shift-Nachweisreaktion eingesetzt (s. Abbildung 46A). Der Nachweis erfolgt über die Trennung von gespaltenen und unmodifizierten Substraten nach ihrer Größe in einer denaturierenden SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (PAGE). Die Banden werden nach dem Trenngang mit Coomassie angefärbt. Die Ergebnisse bestätigen die Rab32-Unterfamilie als exklusive Substratgruppe von GtgE. Die hohe Substratspezifität ist dahingehend besonders, da die Aminosäuresequenz um die Spaltstelle herum im hoch konservierten *switch I*-Loop lokalisiert ist. Verglichen mit dem nächsten Sequenzverwandten Rab23, das kein GtgE Substrat ist, sind die Positionen P3-P3' strikt konserviert und auch darüber hinaus besteht in den umliegenden Regionen große Sequenzähnlichkeit (Abbildung 10B). Diese Analyse legt den Schluss nahe, dass die Substratspezifität nicht nur durch die unmittelbare Sequenzerkennung in der Nähe zur Spaltstelle determiniert wird, sondern weitere Sequenz oder Strukturelemente zur hohen Selektivität von GtgE beitragen.

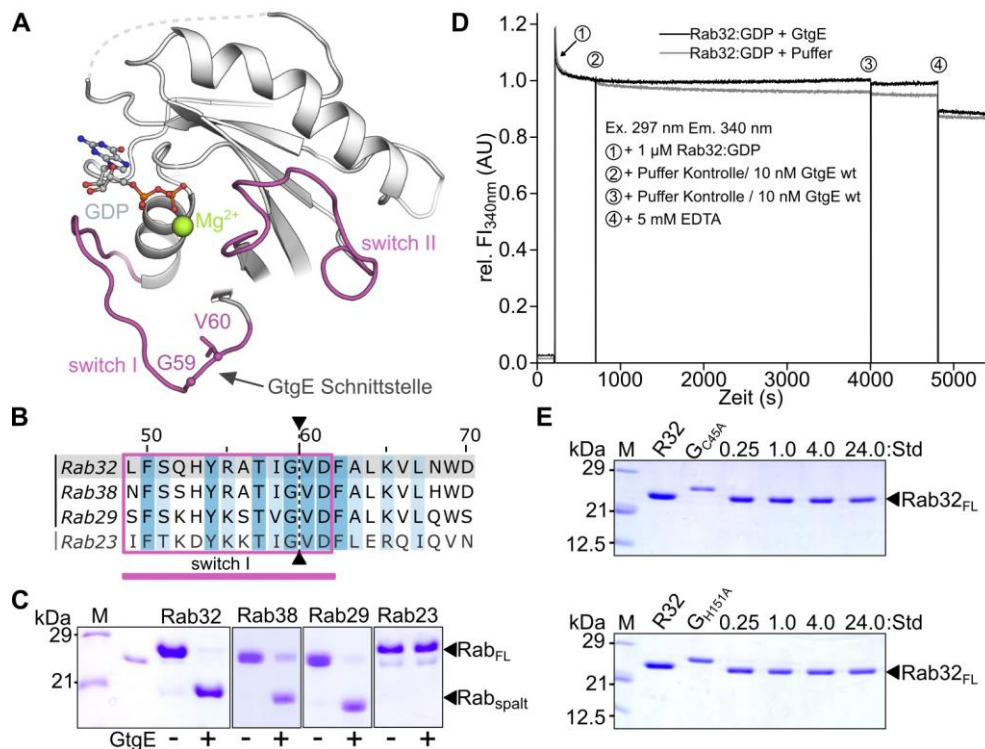


Abbildung 10. Aktivitätsnachweis von GtgE an GTPasen der Rab32-Unterfamilie. **A** Strukturübersicht der GtgE Spaltstelle am Beispiel von Rab32 (PDB Zugangsnummer 5OEC). Hervorgehoben: magenta, *switch*-regionen; Kugel- und Stabmodell, α sowie Seitenketten der Spaltstelle. **B** Lokaler Sequenzvergleich der Rab32-Unterfamilie sowie dem nächsten sequenzverwandten nicht-GtgE Substrat Rab23. Hervorgehoben: magenta *switch I*; GtgE-Schnittstelle (schwarze Pfeile und gestrichelte Linie); hellblau, streng konservierte Reste; himmelblau, chemisch ähnliche Reste. Sequenzindizierung ist von Rab32 (grau hinterlegt) übernommen. **C** Qualitativer GtgE Aktivitätsnachweis in einem Gel-Shift Experiment mit den RabGTPasen aus B. Für einen vollständigen Überblick aller getesteten Rab-Proteine siehe Abbildung 46A im Anhang. **D** Evaluierung eines Tryptophanfluoreszenz basierten Echtzeitnachweises der GtgE Aktivität mit Rab32:GDP als Substrat. **E** Kinetischer Gel-Shift Aktivitätstest der beiden GtgE Mutanten des aktiven Zentrums C45A (oben) und H151A (unten).

Um die Proteolyse in Echtzeit zu untersuchen, wurde ein fluoreszenzbasierter Ansatz evaluiert, bei dem die intrinsische Tryptophanfluoreszenz von Rab32 als Signalgeber dient^{40,102}. Diese Anordnung lieferte keine kinetische Signaländerung nach GtgE-Zugabe und konnte daher nicht genutzt werden (s. Abbildung 10D). Ebenso hat die Strategie, eine Mant-Gruppe (N-Methylantraniloyl) als Fluoreszenzsonde in einem mit Mant-GDP-beladenen Rab32-Substrat zu nutzen, keine verwertbare Signaländerung ergeben (s. Abbildung 46B). Auch das FRET-Experiment mit dem Trp-Mant-Paar zeigte nicht die erhoffte Signaländerung, obwohl in allen Fällen die GtgE-vermittelte Rab-Spaltung in der Quarzküvette mittels SDS-PAGE nachgewiesen werden konnte. Für die weiteren quantitativen Studien wurde daher die densitometrische Auswertung von Gel-Shift-Analysen herangezogen.

Weiterhin wurden die beiden Reste des katalytischen Zentrums (C45; H151) zu Alaninen mutiert und die Mutanten auf ihre mögliche Restaktivität mit diesem Ansatz untersucht¹⁴⁵. Beide Mutanten zeigten auch im Verlauf von 24 Stunden keine nachweisbare proteolytische Aktivität und bestätigen damit noch einmal ihre essentielle Bedeutung in der katalysierten *switch I*-Spaltung (s. Abbildung 10E).

3.1.2. GtgE zeigt eine strikte Nukleotidspezifität gegenüber Rab-Substraten

Die quantitative Umsetzung von Rab-Substraten durch GtgE war zu Beginn nicht reproduzierbar. Während die Spaltung bei Rab29 bereits nach kurzen Inkubationszeiten vollständig abgeschlossen war, zeigten sowohl Rab32 als auch Rab38 Präparationen eine scheinbare Sättigung bei unterschiedlichen Mengen an Rab-Substrat (zwischen 20-50% ungespaltenes Rab). Von dieser Beobachtung wurde auch in der Literatur berichtet. Allerdings wurde sie dort nicht weiter untersucht¹⁴⁵. Dass die Aktivität der Protease im Reaktionsverlauf durch einen unbekanntem Faktor (u.U. eine Proteinverunreinigung) verringert wird, erschien möglich aber unwahrscheinlich. Eine weitere Hypothese war, dass zuerst eine nukleotidspezifischen Erkennung durch GtgE als notwendige Voraussetzung für die Rab-Spaltung erfolgt. Diese Annahme wurde mit präparativ beladenen Rab-Substraten in einem semi-quantitativen Gel-Shift Experiment überprüft (s. Abbildung 11A). Tatsächlich zeigt GtgE in diesen Versuchen eine strikte Nukleotidabhängigkeit in Form einer exklusiven Spaltaktivität gegenüber inaktiven GDP-beladenen RabGTPasen. Die RabGTPasen, die mit dem nicht-hydrolysierbaren GTP-Analog GppNHp beladen waren, wurden nicht mehr umgesetzt. Allerdings konnte eine zeitabhängige Umsetzung von GTP-beladenem Rab beobachtet werden. Zur weiteren Validierung der nukleotidabhängigen Substratrektion von GtgE wurde daher die Proteolyse von Rab32:GTP durch GtgE sowie die intrinsische GTP-Hydrolyse in einem parallelen Ansatz bestimmt (s. Abbildung 11B). Tatsächlich sind die bestimmten Umsatzraten der Proteolyse ($k_{obs,Hydr}$) und der Rab32:GTP Hydrolyse ($k_{obs,Prot}$) mit 6.5 und $6.7 \cdot 10^{-6} \text{ s}^{-1}$ nahezu identisch und festigen damit die bisherigen Ergebnisse. Die Selektion inaktiver RabGTPasen wirft weitere Fragen zum Wirkort und dem genauen mechanistischen Ablauf der Rab-Spaltung auf. Da inaktive RabGTPasen für gewöhnlich zytosolisch in einem hochaffinen Komplex mit GDI vorliegen, erscheint es unwahrscheinlich, dass GtgE seine Rab-Substrate effektiv aus dem Komplex lösen und proteolytisch umsetzen kann. In der Literatur wurde von den *Salmonella*-Effektor SopD2 berichtet, der u.a. eine GAP-Aktivität gegenüber Rab32 und anderen RabGTPasen trägt¹⁸⁹. Ob es sich bei SopD2 und GtgE um eine kooperative Zusammenarbeit zum Ziele einer effektiven Rab-Spaltung handelt, wurde in einem Gel-Shift basierten Ansatz getestet (s. Abbildung 11C, D). Hierbei wurde jeweils aktives (GTP beladenes) und inaktives (GDP beladenes) Rab32 in Anwesenheit oder Abwesenheit katalytischer Mengen SopD2 mit GtgE verdaut und der Reaktionsverlauf zeitpunktabhängig aufgenommen. Die Bestimmung der Umsatzraten zeigt, dass in Anwesenheit von SopD2 Rab32:GTP ebenso schnell umgesetzt wurde wie Rab32:GDP. In Abwesenheit von SopD2 hingegen wurde Rab32:GTP lediglich zu 50% nach 20 Stunden von GtgE umgesetzt. Diese Ergebnisse deuten auf einen sequenziellen, kooperativen Mechanismus zwischen SopD2 und GtgE bei der Rab-Inaktivierung hin.

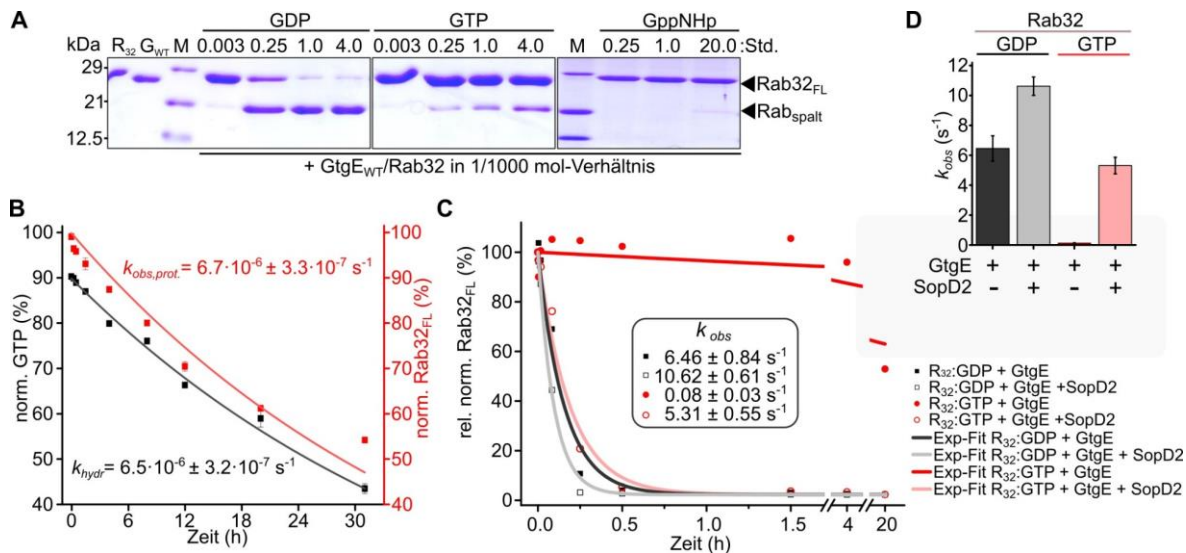


Abbildung 11. GtgE spaltet ausschließlich inaktive RabGTPasen. **A** Rab32 (R_{32} ; $8 \mu\text{M}$) wurde präparativ mit unterschiedlichen Nukleotiden beladen und mit GtgE (G_{WT} ; 8 nM) in einem Gel-Shift-Experiment versetzt. Lediglich die inaktive GDP-beladene GTPase wurde effizient durch GtgE gespalten. Das aktive GTP- bzw. GppNHp-beladene Rab32 wurde nur sehr viel langsamer bzw. gar nicht umgesetzt. **B** Validierung der Nukleotidabhängigkeit von GtgE durch den Vergleich zwischen der GtgE-vermittelten Proteinspaltungsrate ($k_{obs,Prot}$) mit der, der intrinsischen GTP-Hydrolyse von Rab32 ($k_{obs,Hydr}$). Die Bestimmung von $k_{obs,Prot}$ wurde durch die densitometrische Quantifizierung von unmodifizierten Rab32 Banden und Anpassung an eine einfache exponentielle Kurve ermittelt. Zur Bestimmung von $k_{obs,Hydr}$ wurden die Nukleotide zunächst in einem HPLC-Trenngang auf einer RP-Säule mit einem Phasenvermittler getrennt und bei 254 nm detektiert. Die relative GTP-Menge im Verhältnis zur detektierten Gesamtnukleotidmenge ist über die Zeit aufgetragen und die Umsatzrate wird wie zuvor beschrieben bestimmt. Die Rohdaten zum Experiment (Chromatogramme und Gel-Bild) sind im Anhang hinterlegt (Abbildung 47A, B) **C** Einfluss von SopD2 (80 nM) auf die GtgE (8 nM)-vermittelten Spaltungsraten von aktivem und inaktivem Rab32 ($8 \mu\text{M}$). Die Bestimmung von k_{obs} erfolgte nach densitometrischer Auswertung der Gel-Shift Experimente wie in B (für Gelbilder s. Abbildung 47C). **D** Ergebnisse der beobachteten Umsatzraten aus C, dargestellt als Balkendiagramm.

3.1.3. Proteolytische Effizienz von GtgE

Da GtgE ausschließlich inaktive Rab-Substrate umsetzt, wurde die katalytische Effizienz an vollständig GDP-beladenen Rab32 beispielhaft bestimmt, dem primären Zielsubstrat der Protease⁵³. Hierzu wurde eine zeitpunktabhängige Kinetik der Rab-Spaltung in einem Gel-Shift Experiment aufgenommen. Die densitometrische Auswertung ergab einen k_{obs} von $4.1 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ und eine katalytische Effizienz (k_{cat}/K_M) von $5.1 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (s. Abbildung 12A, B) für die Protease voller Länge. Um sich den Proteingrenzen eines Minimalkonstrukts mit voller Aktivität anzunähern, wurden Verkürzungsvarianten von GtgE hergestellt und vergleichend in Spaltungsreaktionen eingesetzt. Die gewählten Proteingrenzen waren einerseits geleitet durch Ergebnisse der Subtilisin-vermittelten limitierten Proteolyse von GtgE¹⁴⁵ sowie durch die bioinformatische Sequenzanalysen zu sekundären Strukturelementen (Algorithmen zur Strukturvorhersage: iTASSER, Phyre2). Dabei zeigt sich, dass bereits eine C-terminale Verkürzung um 14 Aminosäuren (GtgE 1-214, oder G_{1-214}) die katalytische Effizienz von GtgE nahezu halbiert. Eine zusätzliche Verkürzung des N-terminus um 21 Aminosäuren (G_{21-214}) re-

suliert in einer ca. 70%igen Reduktion der katalytischen Effizienz gemessen am Volllänge-enzym. Die weiteren N-terminalen Verkürzungen (G_{32-214} ; G_{43-214}) reduzierten die Aktivität noch einmal signifikant. Hierbei zeigte G_{32-214} eine Verringerung auf ca. 1,3% und G_{43-214} auf lediglich 0,3% relativ zur maximalen GtgE-Aktivität.

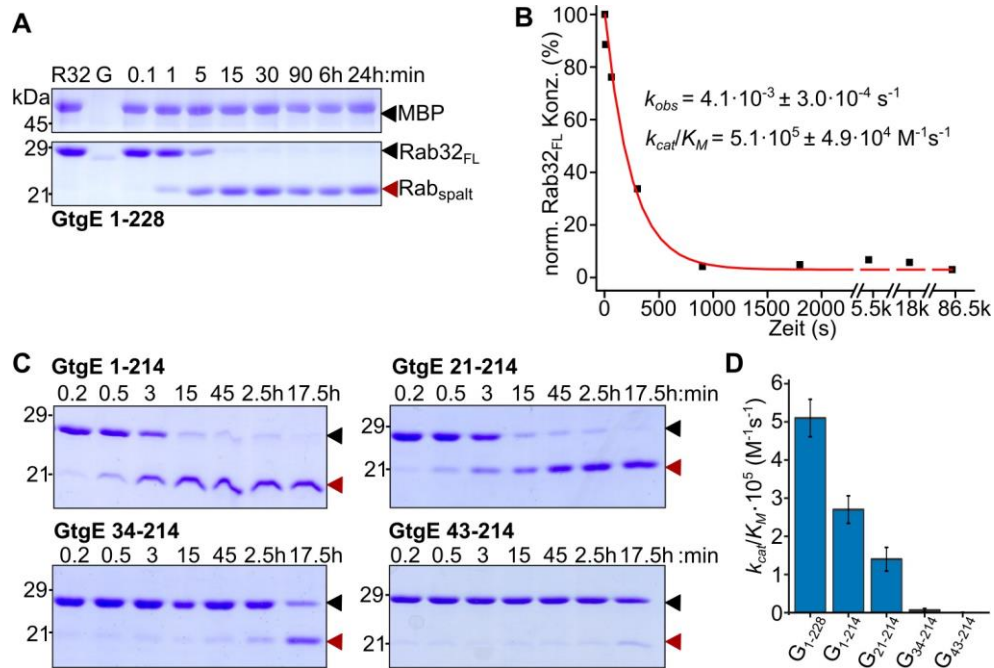


Abbildung 12. Proteolytische Effizienz der Protease GtgE an inaktiven RabGTPasen. **A** Zeitpunktkinetik der Rab32:GDP (R32; 8 μM) Spaltung in einem Gel-Shift Experiment mit substöchiometrischen Mengen GtgE (G; 8 nM). Das Maltose-bindende Protein (MBP) wurde als Ladekontrolle eingesetzt. **B** Densitometrische Auswertung der Banden von nicht-gespaltenem Rab32 (Rab32_{FL}) aus A. Zur Bestimmung der apparenten Umsatzrate (k_{obs}) wurden die Daten an das Modell eines exponentiellen Abfalls erster Ordnung angepasst. Die enzymatische Effizienz (k_{cat}/K_M) wurde durch das Teilen von k_{obs} durch die GtgE Enzymkonzentration berechnet. **C** Zur Eingrenzung des minimalen GtgE-Konstruktes mit voller enzymatischer Effizienz, wurden verschiedene verkürzte GtgE-Proteine mit Rab32:GDP relativ zu GtgE 1-228 (volllänge) mit demselben Ansatz wie in A untersucht. **D** Die katalytischen Effizienzen der verkürzten GtgE-Varianten aus C sind als Balkendiagramm im Verhältnis zum Vollängenprotein dargestellt (s. Tabelle 18).

Damit wird deutlich, dass bereits geringfügige Verkürzungen signifikante Reduktionen der GtgE-Enzymaktivität zur Folge haben. Die Abnahme der Aktivität durch die N-terminalen Verkürzungen, die an das katalytische C45_G (das tiefgestellte G bedeutet GtgE) heranrücken sind dabei nicht überraschend, da zu vermuten ist, dass diese Sequenzbereiche an der Organisation des katalytischen Zentrums mitwirken. Für weitere Studien (v.a. bei strukturellen Ansätzen) wurde neben GtgE₁₋₂₂₈ (Wildtyp) auch GtgE₂₁₋₂₁₄ eingesetzt, da diese Verkürzungen lediglich zu moderaten Aktivitätseinbußen führen. Dies lässt vermuten, dass alle zentralen Elemente der Rab-Bindung und Spaltung in dieser Verkürzungsvariante der Protease weiterhin vorhanden sind.

3.2. Strukturelle Charakterisierung des Rab32:GDP:GtgE_{C45A} Komplex

Für die strukturelle Aufklärung der molekularen Substraterkennung und des Nukleotidselektionsmechanismus konnte zunächst ein nicht-kovalenter Enzym-Substrat-Komplex isoliert werden. Die Komplexstruktur wurde nach vormaliger kovalenten Modifikationen mittels reduktiver Alkylierung aufgeklärt. Die biologische Relevanz des Strukturmodells wurde nachfolgend durch biochemische Aktivitätsbestimmungen sowie *in vivo* Bindestudien in der Hefe validiert. Die Komplexstruktur lieferte weiterhin Hinweise auf mögliche determinierende Elemente der Rab-Substratselektion sowie der Nukleotidspezifität, die ebenfalls durch Mutationsstudien untersucht wurden.

3.2.1. *In vitro* Komplexformierung und reduktive Alkylierung

Viele Proteasen lassen sich in einem Enzym-Substrat-Komplex isolieren, wenn das aktive Zentrum durch Mutationen eliminiert, oder durch ein Substratderivat, das nicht mehr umgesetzt werden kann inhibiert wird¹⁶⁹. Um diese Anordnung für GtgE und dessen Rab-Substrate zu testen, wurden die katalytisch inaktiven GtgE Mutanten (C45A_G; H151A_G) sowie C45S_G jeweils mit Rab32:GDP inkubiert und die Komplexformierung mittels analytischer SEC qualitativ überprüft. Dabei zeigt sich, dass lediglich GtgE_{C45A} und GtgE_{C45S} einen quantitativen, nicht kovalenten Heterokomplex mit inaktivem Rab32:GDP eingehen (Abbildung 13). Die Serin-Substitution, die auch bei der Strukturaufklärung von GtgE eingesetzt wurde¹⁴⁶, inaktiviert die Protease allerdings nicht vollständig. Es bedarf äquimolarer Mengen des Enzyms, um nach mehrstündiger Inkubation signifikante Mengen des Rab-Spaltproduktes zu erzeugen (Abbildung 13B). Die H151A_G-Mutante zeigt eine deutlich geringere Affinität gegenüber Rab32:GDP, was sich an einer minimalen Retentionsverschiebung im Vergleich zu den Einzelkomponenten erkennen lässt.

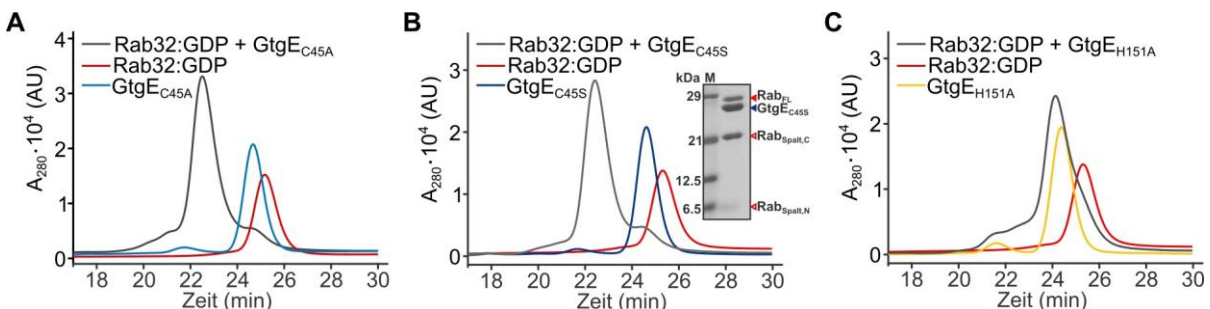


Abbildung 13. Heterokomplex-Formierung auf der analytischen Größenausschlusschromatographie zwischen GtgE-Mutanten und Rab32:GDP. **A** Quantitative Komplexformierung zwischen Rab32:GDP und GtgE_{C45A} (je 10 μ M). Als Kontrolle dienen die Einzelkomponenten, die ebenfalls in SEC-Puffer (ergänzt um 10 μ M GDP) analysiert wurden. Eine Retentionszeitabnahme für das Rab32:GtgE-Gemisch zeigt ein erhöhtes Molekulargewicht und damit eine erfolgreiche Komplexbildung an. **B** Gleiche Anordnung wie in A mit GtgE_{C45S}. **C** Gleiche Anordnung wie in A mit GtgE_{H151A}.

Die in verhältnismäßig geringkonzentriert eingesetzten Monomere (effektiv $\ll 10 \mu\text{M}$, aufgrund der Verdünnung) zeigen eine quantitative Komplexbildung auf und weisen damit bereits auf eine hohe Affinität zwischen GtgE und seinen Substraten hin.

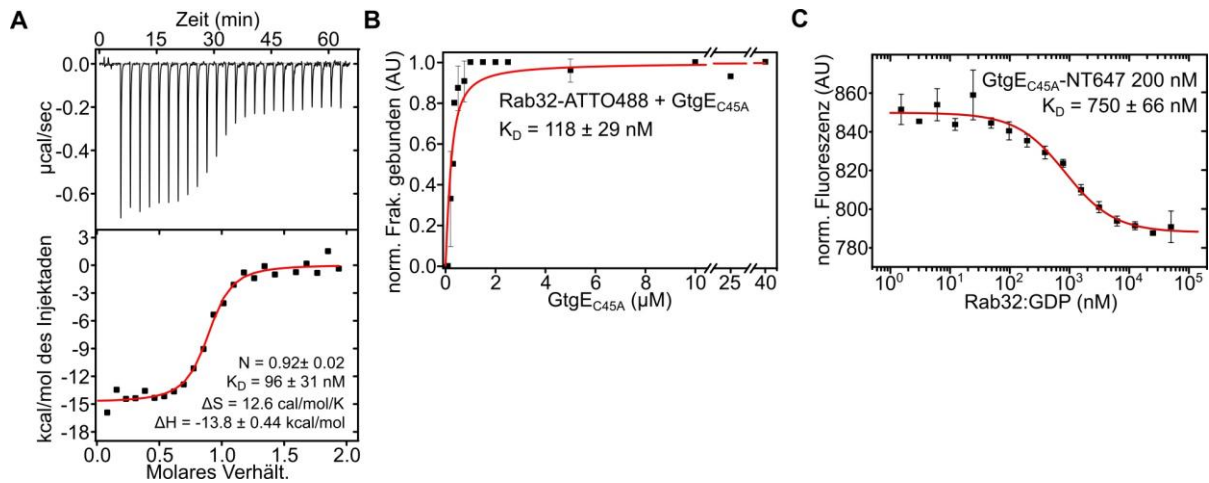


Abbildung 14. Die inaktive Mutante $\text{GtgE}_{\text{C45A}}$ hat eine hohe Affinität für Rab32:GDP . **A** Affinitätsbestimmung mittels isothermaler Titrationskalorimetrie (ITC). $\text{Rab32}_{\text{FL}}:\text{GDP}$ ($20 \mu\text{M}$, in der Zelle) wurde mit $200 \mu\text{M}$ $\text{GtgE}_{\text{C45A}}$ titriert. Die integrierten Hitzesignale wurden an ein Modell mit einer Bindungsstelle angepasst, das die Bindungsstöchiometrie (N), die Enthalpie (ΔH), die Entropie (ΔS) und die Dissoziationskonstante (K_D) liefert. Die Daten entsprechen dem Mittelwert von drei unabhängigen Replikaten. **B** Affinitätsbestimmung durch analytische Ultrazentrifugation (aUZ) von fluoreszenzmarkiertem $\text{Rab32}_{\text{FL}}:\text{GDP}$ (200 nM) in Abhängigkeit von der $\text{GtgE}_{\text{C45A}}$ Konzentration ($0\text{-}40 \mu\text{M}$). Der relative Anteil von gebundenem Rab32 wurde an eine hyperbolische Funktion angepasst, die den K_D liefert. Die Daten sind Mittelwerte aus zwei unabhängigen Replikaten. **C** Mikromaßstabs Thermophorese (MST). Messung zur Bestimmung der Bindungsaffinität von fluoreszenzmarkiertem $\text{GtgE}_{\text{C45A}}$ (100 nM) mit einer Titrationsreihe von $\text{Rab32}_{\text{FL}}:\text{GDP}$ ($0\text{-}40 \mu\text{M}$). Die Daten wurden an eine K_D -Fit-Funktion (NanoTemper), basierend auf dem Massenwirkungsgesetz angepasst, die den K_D liefert. Das Ergebnis stellt den Mittelwert aus drei unabhängigen Experimenten dar.

Zur Affinitätsbestimmung des Rab:GtgE -Komplexes wurden drei zueinander orthogonale Messprinzipien angewandt: die isothermale Titrationskalorimetrie (ITC), die analytische Ultrazentrifugation (aUZ) sowie die Mikromaßstabs Thermophorese (MST) (s. Abbildung 14). Die ITC-Experimente ergaben eine Dissoziationskonstante ($K_{D,\text{ITC}}$) von 96 nM und eine molare Stöchiometrie nahe einem 1:1 Heterokomplex, was sich mit den Ergebnissen der analytischen Größentrennung auf der SEC deckt. Die analytische UZ lieferte eine Dissoziationskonstante ($K_{D,\text{aUZ}}$) von 118 nM für den Komplex und ist damit in guter Übereinstimmung zum ITC-Ergebnis. Die MST-Daten liefern eine Affinität von etwa 750 nM ($K_{D,\text{MST}}$), was verglichen mit den beiden zuvor bestimmten Konstanten einer 6- bis 7-fach schwächeren Komplexbildung entsprechen würde. Ein wesentlicher Unterschied zwischen den Methoden ist der Signalgeber. Während die ITC ohne vormalige Einbringung einer Reportergruppe auskommt, nutzen beide Alternativen eine kovalent angebrachte fluoreszente Gruppe auf dem kleineren Bindepartner (in diesem Fall sind beide Proteine ähnlich groß). Die unterschiedlichen Farbstoffe und Markierungsstrategien könnten ein Grund für die abweichenden Ergebnisse zur Affinitätsbestimmung zwischen der MST und der aUZ sein. Die Affinität von $\text{GtgE}_{\text{C45A}}$ zu

Rab32:GDP ist mit ca. 100 nM (ITC, aUZ) sehr hoch, was durch die quantitative Komplexbildung bei bereits sehr geringen effektiven Konzentrationen während der analytischen SEC (ca. 1 μ M) unterstützt wird. Da für die spätere Proteinkristallisation auch alkylierte Proteine hergestellt wurden, sollte überprüft werden, inwieweit diese Modifikation mit der Komplexbildung interferiert. Hierzu wurde die Komplexbildung bei verschiedenen Modifikationsstrategien abermals auf der analytischen SEC verfolgt. Neben der reduktiven Alkylierung der individuellen Monomere GtgE_{C45A} und Rab32:GDP wurden beide Monomere als Alternative vor der Modifizierung zusammengegeben, um eine Komplexbildung vor der Lysin-Alkylierung zu erlauben. Für die nachfolgende Proteinkristallisation wurden die Experimente sowohl mit den beiden Vollängenproteinen (Rab32_{1-225(FL)}; GtgE_{1-228(FL)}) als auch mit den endständig gekürzten Varianten (Rab32_{18-201(Δ NAC)}; GtgE_{21-214(Δ NAC)}) durchgeführt (s. Abbildung 15). Die erfolgreiche Methylierung konnte qualitativ bereits an einer leichten Bandenverschiebung (Gel-Shift) in der SDS-PAGE bestätigt werden.

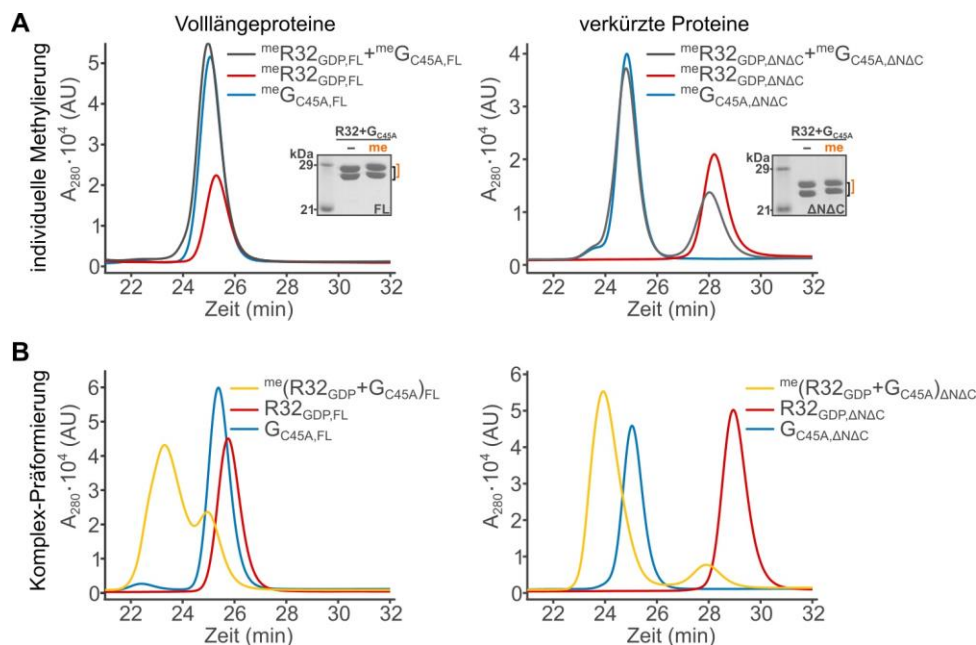


Abbildung 15. Formierung eines alkylierten Hetero-Komplexes aus GtgE und Rab32. A Proteine die erst methyliert und dann in einem 1:1-Gemisch auf der einer aSEC und einer Absorption von 280 nm untersucht wurden. Links: Volllängeprotein GtgE_{C45A,FL(1-228)} und Rab32:GDP_{FL(1-225)}. Einsatz: Coomassiefärbung eines SDS-PAGE Gels mit einem 1:1-Gemisch aus Rab32:GDP und GtgE_{C45A} (R32+G), unmodifiziert und methyliert (me; orange). Die Retentionsverschiebung ist anhand von Balken rechts angezeigt. Rechts: gleiche Anordnung wie links mit verkürzten Proteinen GtgE_{C45A, Δ NAC(14-214)} und Rab32:GDP _{Δ NAC(18-201)}. **B** Komplexbildung vor der reduktiven Alkylierung von lösemittelzugänglichen Lysinen. Anordnung wie in A. Methylierte Proteine sind durch das hochgestellte *me* indiziert. Die Massenspektren zur reduktiven Alkylierung der Volllängeproteine sind im Anhang dargestellt (s. Abbildung 48 und Abschnitt 6.4.7).

Die quantitative, massenspektrometrische Auswertung zeigte einen Unterschied in der Anzahl der modifizierten Positionen zwischen den individuell behandelten Proteinen und jenen, die in einem Komplex vorlagen. Die Alkylierung nach Komplexbildung führte zur Modifikation von lediglich 13 von 16 möglichen Lysinen in Rab32_{FL} (statt 14 beim Rab-Monomer) und 9

von 11 möglichen Lysinen in GtgE_{C45A, FL} (statt 11 beim GtgE-Monomer) (s. Abbildung 48). In der Evaluierung der Komplexbildung in beiden Ansätzen zeigte, dass die reduktive Alkylierung der Monomere, die Bindung effektiv unterbindet wohingegen die Modifikation eines bereits geformten Komplexes sich nicht negativ auf die Protein-Protein-Interaktion auswirkt (Abbildung 15). Zusammengenommen demonstrieren die Ergebnisse eine hochaffine Komplexbildung zwischen inaktivem Rab32:GDP und GtgE_{C45A}, bei der Lysine in den Bindungsgrenzflächen beider Proteine eine wichtige Rolle spielen.

3.2.2. Kristallisation eines nicht-kovalenten Rab:GtgE-Komplexes

Die Kristallisationsansätze wurden in einem Puffer-Screening im 96-Well Format durchgeführt. Dazu wurden 0,2 µL einer konzentrierten Heterokomplexlösung in einem 1:1-Gemisch mit den jeweiligen Pufferlösungen für die *Sitting-Drop*-Methode eingesetzt (PHOENIX-MR Pipettierroboter, Art Robbins Instruments, CA, USA). Die Ansätze wurden versiegelt und bei 21°C gelagert. Erste Kristalle waren nach wenigen Tagen sichtbar. Die erhaltenen Proteinkristalle waren trigonal bipyramidal und haben in der nicht-methylierten Form in Röntgenbeugungsexperimenten eine Auflösung von 6-9 Å geliefert. Durch die reduktive Alkylierung hat sich die Kristallform bei Proteinen voller Länge nicht geändert (s. Abbildung 16A). Allerdings wurden mehr Kristallisationsbedingungen mit den Alkylierten Proteinkomplexen gefunden und die Auflösung in Beugungsexperimenten konnte deutlich verbessert werden. Die Kristalle der Vollängenproteine haben kristallisiert in: 50 mM Imidazol pH 8; 20% PEG 6000 und beugten auf 2,9 Å. Die verkürzten Proteine lieferten stabförmige Kristalle in: 0,1 M Bis-Tris pH 5,5; 25% PEG 3350, die bis auf 2,3 Å beugten (s. Abbildung 16B). Die Kristalle wurden bis zur Messung in einem Kryoprotektionspuffer (Kristallisationspuffer mit 25% Ethylenglykol) in flüssigem Stickstoff gelagert. Die Arbeiten zur Proteinkristallisation wurden unter Anleitung von Bastian Bräuning durchgeführt.

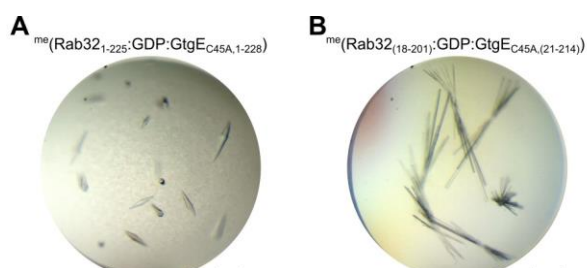


Abbildung 16. Proteinkristalle alkylierter Rab32:GtgE-Komplexe. **A** Trigonal bipyramidale Proteinkristall aus Vollängenproteinen in 0,05 M Imidazol pH 8; 20% PEG 6000. **B** Stabförmige bipyramidale Proteinkristall aus verkürzten Proteinen in 0,1 M Bis-Tris pH 5,5; 25% PEG 3350. Der horizontale Balken repräsentiert 0,1 mm.

3.2.3. Die Rab32:GDP:GtgE_{C45A} Komplexstruktur

Die Röntgenbeugungsexperimente wurde an der Synchrotron Beamline X06SA der Swiss Light Source (SLS, Paul Scherrer Institut, Villigen, Schweiz) von Bastian Bräuning (B.B.) und Michael Groll (M.G.) (Lehrstuhl für Biochemie der TUM) durchgeführt. Ebenso wurde die Datenprozessierung sowie die Erstellung der Strukturmodelle durch molekularen Ersatz von B.B. und M.G. realisiert¹⁹⁰. Als geeignete Suchmodelle der Einzelkomponenten des Komplexes dienten dabei die Strukturen von Rab32:GppCH₂p (PDB Zugangsnummer 4CYM)⁵⁸ sowie einer verkürzten GtgE-Variante (PDB Zugangsnummer 4MI7)¹⁴⁵. Die Elektronendichte war in beiden Strukturen, sowohl für das Paar aus Vollängenproteinen als auch für den verkürzten Rab32:GtgE-Komplex gut definiert. Die resultierenden Strukturmodelle wurden in der *Protein Data Bank* (PDB) unter folgenden Zugangsnummern hinterlegt: 5OEC (für Rab32_{FL}:GDP:GtgE_{FL}) und 5OED (für Rab32₁₈₋₂₀₁:GDP:GtgE₂₁₋₂₁₄). Die Struktur der verkürzten Proteine zeigt einen geringeren B-Faktor bei gleichzeitig höherer Auflösung. Da sich beide Modelle in keinen wesentlichen strukturellen Merkmalen unterscheiden, wird die Struktur der verkürzten Proteine in der Folge als Referenz beschrieben und als Rab32:GDP:GtgE_{C45A}-Komplex bezeichnet.

Der Komplex zeigt im Allgemeinen alle Merkmale der zuvor bestimmten, individuellen Untereinheiten von Rab32 und GtgE^{58,145,146}. Rab32 besteht aus einem zentralen β -Faltblatt, das sechs β -Stränge umfasst (β _{1R}- β _{6R}, wobei das tiefgestellte R, Rab32 indiziert) und fünf α -Helices (α _{1R}- α _{5R}) (Abbildung 17A, Abbildung 18A). Für die Helix α _{5R}, die für gewöhnlich in allen kleinen GTPasen vorhanden ist, wurde keine Elektronendichte beobachtet. GtgE besteht aus einem sechsgliedrigen, zentralen, antiparallelen β -Faltblatt, das senkrecht zur Spitze des β -Faltblatts von Rab32 angeordnet ist. Dieses GtgE- β -Faltblatt wird von fünf α -Helices umringt, von denen die zwei N-terminalen α -Helices und die drei C-terminalen Helices an gegenüberliegenden Enden positioniert sind (Abbildung 17C). Die Aminosäureregionen 23-44_G und 60-82_G (wobei das tiefgestellte G, GtgE indiziert) scheinen nur nach der Komplexbildung mit Rab32 innerhalb der aktiven Enzymstruktur korrekt gefaltet zu sein, da diese Loopbereiche im Vergleich zur GtgE Apo-Struktur signifikant unterschiedliche Positionen einnehmen (Abbildung 18C).

Im Komplex kann GtgE als Dreizack betrachtet werden, der mit drei spitzenähnlichen Fortsätzen in Rab32 hineinsticht (Abbildung 17B, Abbildung 18A). Diese Spitzen, von uns auch als Spikes bezeichnet, setzen sich vorwiegend aus prominenten Loop-Regionen zusammen, die aus dem beschriebenen Kern in Richtung Rab ragen. Der Spike 1 umfasst die Aminosäure-Region 38-45_G in Verbindung mit der Region 76-82_G. Spike 2 wird durch die β _{2G}- β _{3G}-Schleife konstituiert und dringt tief in den *switch-I-switch-II*-Spalt von Rab32 ein. Spike 1 und 2 bilden dabei enge Wechselwirkungen, ähnlich einem Schärenklammergriff, mit der *switch I*-Struktur aus, dem Ort der proteolytischen Spaltung. Spike 3 wird von der α _{4G}-Helix und einem C-terminalen Schleifenfortsatz ausgebildet. Der flache Spalt zwischen den Spitzen 2 und 3 wird von der *switch II*-Region ausgefüllt (Abbildung 17B).

Durch die GtgE-Bindung kommt es außerhalb der *switch*-Regionen nur zu geringfügigen strukturellen Änderungen an Rab32, im Vergleich zu Rab32:GppCH₂p (Abbildung 18B). Durch die nukleotidspezifische Bindung der Protease kommt es in beiden flexiblen *switch*-Regionen zu großen konformationellen Änderungen. Die *switch*-Konformationen ähneln dabei dem Bindezustand bei der Komplexierung durch den GDP-spezifischen Interaktionspartner GDI, sind mit diesem aber nicht identisch. Sowohl der Bindungsmodus als auch die Interaktionsfläche mit der jeweiligen GTPase unterscheiden sich deutlich zwischen der GDI- und GtgE-Bindung (s. Abbildung 19)^{41,42}. Der Spike 2 von GtgE wirkt wie ein Keil, der die *switch*-Regionen weiter auseinander treibt als im Rab:GDI-Komplex.

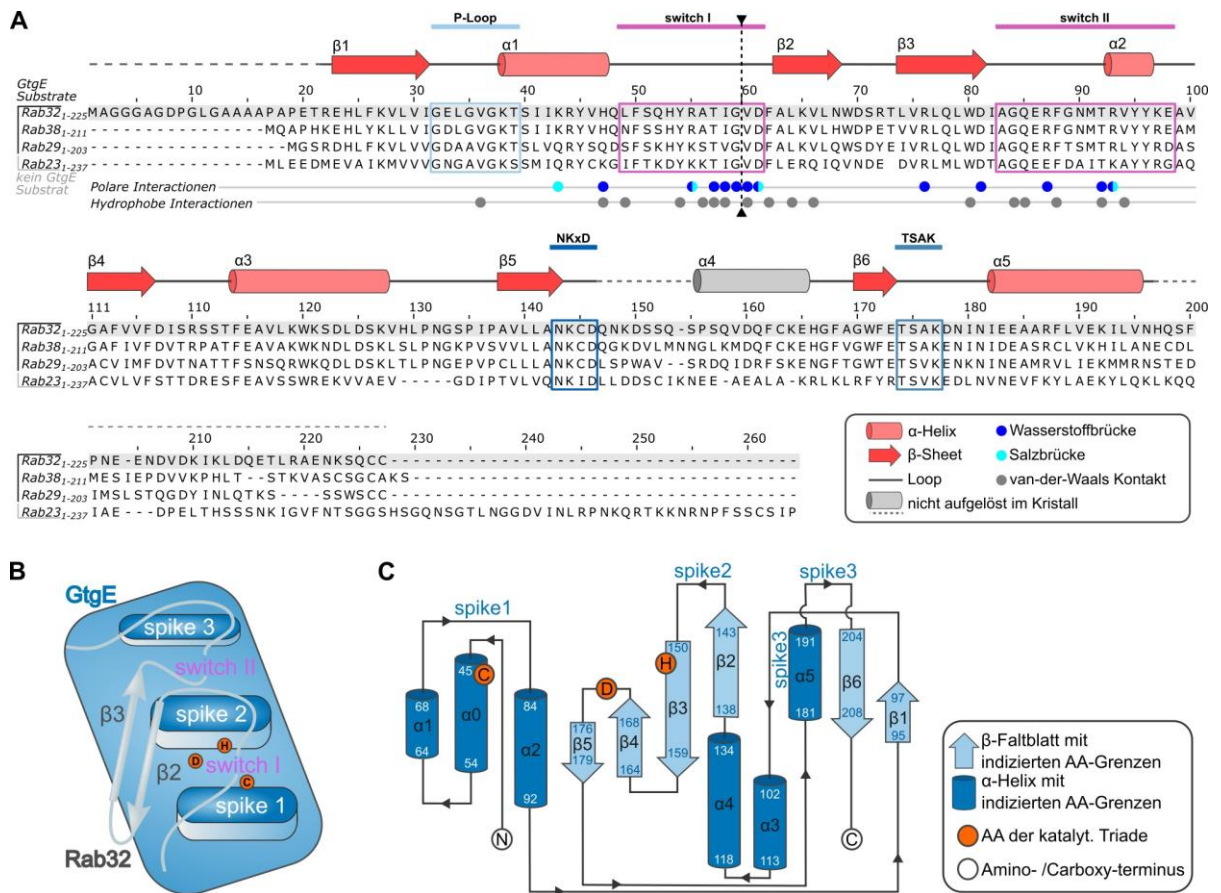


Abbildung 17. Sequenz-Struktur Übersicht der individuellen Proteine des Rab32:GtgE-Komplex. **A** Sequenz-Struktur Vergleich der GtgE-Substrate Rab32, Rab38 und Rab29 zum Nicht-Substrat Rab23. Sekundärstrukturmerkmale oberhalb der Sequenzen beziehen sich auf den Rab32:GDP:GtgE_{C45A}-Komplex. Blaue oder graue Punkte unter den Sequenzen zeigen polare und hydrophobe Wechselwirkungen von Rab32 mit GtgE an (s. Abbildung 18E). Blaue Boxen: GTPase Motive G1-G3. Magenta Boxen: *switch*-Regionen; schwarze Pfeile und gestrichelte Linie: GtgE-Schnittstelle. **B** Schematisches Modell der Rab32:GtgE-Bindungsschnittstelle einschließlich der Rab32-*switch*-Regionen und der benachbarten Sekundärstrukturelemente. Die Schalterbereiche sind in den Hohlräumen positioniert, die durch Spike 1/Spike 2 und Spike 2/Spike 3 von GtgE gebildet werden. **C** Das Topologiediagramm der GtgE-Faltung im Komplex mit Rab32:GDP einschließlich aller Aminosäuregrenzen der α-Helices und β-Faltblätter. Katalytische Reste: orange Kreise.

Auf der anderen Seite beeinflusst die Bindung von Rab32 an GtgE die Sekundärstrukturelemente der Protease nicht. Vielmehr werden Schleifen, die zuvor in der GtgE-Struktur nicht

aufgelöst waren, im Rab32:GtgE-Komplex geordnet und deren Elektronendichte sichtbar. Insbesondere wird der N-Terminus (23-45_G) einschließlich der Position des Cysteins im aktiven Zentrum (hier die C45A_G-Substitution) zusätzlich aufgelöst^{145,146}.

Die Interaktionsfläche umspannt eine mittlere Oberfläche von 1535 Å² und wurde mit dem Web-Service PISA (*Protein Interfaces, Surfaces and Assemblies*)¹⁹¹ bestimmt. Diese Flächen setzen sich hauptsächlich aus den *switch*- und *Interswitch*-Regionen (β_{2R} und β_{3R}) von Rab32 sowie den drei Spitzen des GtgE-Dreizacks zusammen (Abbildung 17). Die große Zahl hydrophober sowie polarer Wechselwirkungen trägt zu der vielschichtigen Interaktionsfläche bei und stellt damit die molekulare Grundlage für die beobachtete hohe Affinität zwischen GtgE_{C45A} und Rab32:GDP dar (s. Abbildung 18E). Insbesondere die Rab32-Reste, die an die Spaltstelle zwischen G59_R und V60_R angrenzen, gehen vielfältige Wechselwirkungen mit dem tiefen Hohlraum zwischen Spike 1 und Spike 2 von GtgE ein. Der *switch I*-Rest I58_R bildet das Zentrum eines hydrophoben Clusters und interagiert mit W46_G, L81_G, C86_G, I141_G, L150_G und I202_G, während D61_R aus der Protease-Erkennungssequenz eine spezifische Wechselwirkung mit der Guanidin-Gruppe von R142_G bildet. Drei weitere ionische Wechselwirkungen K43_R-E148_G, R55_R-D82_G und R93_R-D182_G tragen wahrscheinlich zur Bindung und Erhöhung der Spezifität bei. K43_R könnte hierbei eines der Lysine sein, die in methyliertem Zustand die Komplexbildung gestört haben (s. Abschnitt 3.2.2.).

Das interagierende polare Netzwerk innerhalb der katalytischen Triade C45_G, H151_G und D169_G wird im Rab32:GDP:GtgE_{C45A}-Komplex gebildet, sobald C45A_G zum Cystein-Nukleophil mit aktivem Zentrum konvertiert wird (s. Abbildung 18D)^{145,146}. Weiterhin kann die Oxyanion-stabilisierende Tasche eindeutig den NH-Gruppen der Peptidbindung von C45_G und N44_G sowie dem N^{ε2}-Amin der Q33_G-Seitenkette zugeordnet werden, während die Thiolgruppe von C149_G möglicherweise als Brønstedsäure wirkt, um eine geeignete N-terminale Abgangsgruppe an V60_R zu generieren (Abbildung 18F).

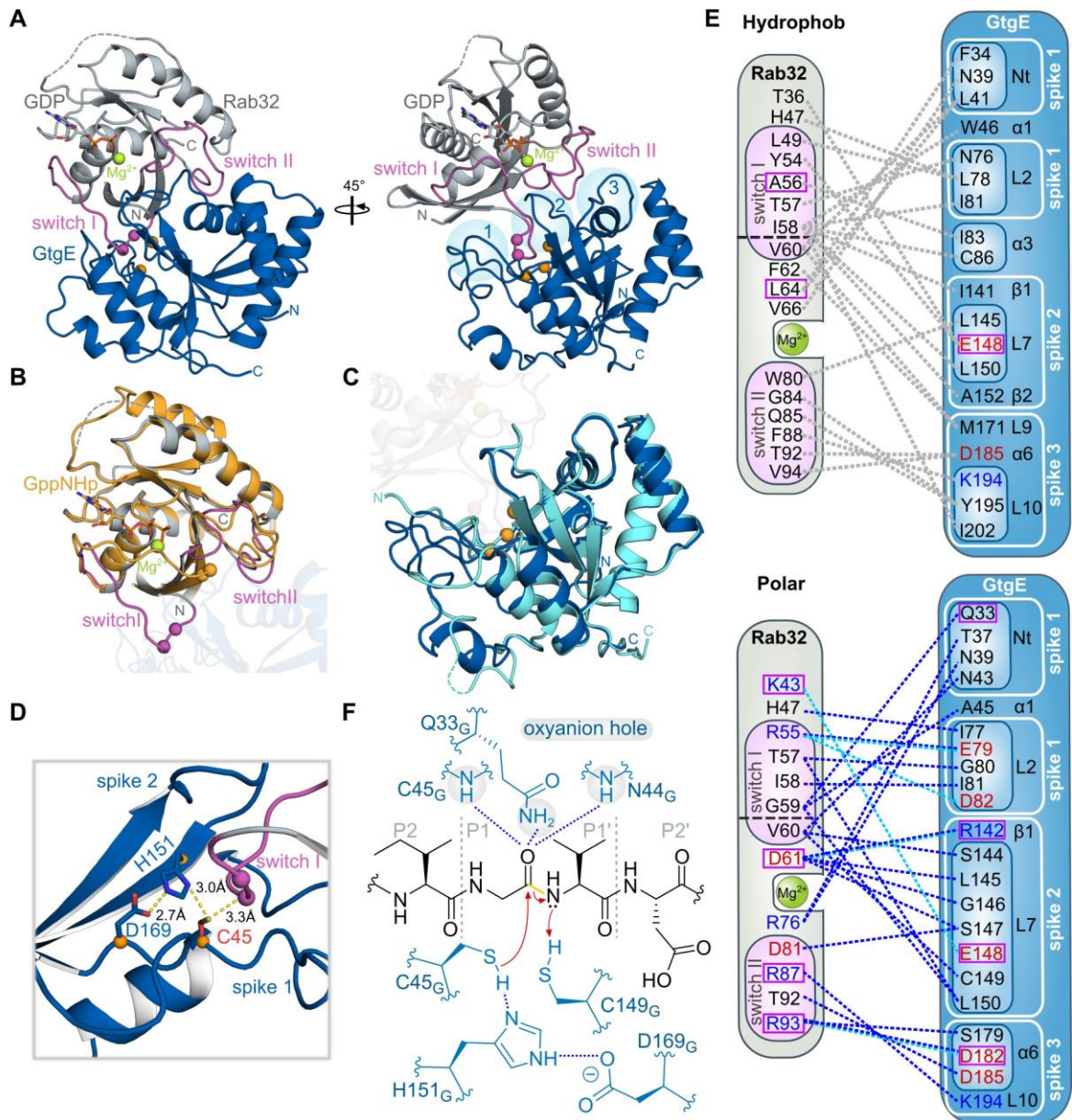


Abbildung 18. Die Rab32:GDP:GtgE_{C45A}-Komplexstruktur. **A** Bänderdarstellung des Rab32:GDP:GtgE_{C45A}-Komplexes. Stabmodell: GDP; magenta: *switch*-Regionen; magenta Kugeln: GtgE-Spaltstelle, grüne Kugel: Mg²⁺-Ion; orange Kugeln: katalytische Triade; hellblaue Kreise: Spike 1-3. **B** Strukturelle Überlagerung von Rab32:GppNHp:VARP (PDB Zugangsnummer 4CYM, gelb-orange)⁵⁸ und Rab32:GDP:GtgE_{C45A} (grau). Transparent: GtgE-Struktur. Weitere Kennzeichnung siehe A. **C** Strukturelle Überlagerung von GtgE (PDB Zugangsnummer 5KDG, hellblau)¹⁴⁶ und Rab32:GDP:GtgE_{C45A} (blau). Transparent: Rab32:GDP-Struktur. Weitere Kennzeichnung siehe A. **D** Modell der aktiven katalytischen Triade in GtgE mit dem gebundenen Rab32-Substrat. Die inaktive GtgE-Mutation C45A wurde *in silico* invertiert, was in einer korrekt ausgerichteten katalytischen Cystein-Triade (bestehend aus C45_G, H151_G und D169_G) resultierte. Magenta-Schleife: *switch I* von Rab32; orangefarbene Kugeln und Stäbe: α-Atome und Reste der katalytischen Triade; rote Stäbe: *in silico* positioniertes Cystein; gelbe gestrichelte Linien: Abstandsmessungen. **E** Schematische Darstellung aller hydrophoben (oben) und polaren Wechselwirkungen (unten) (s. Abbildung 17A und Tabelle 19). Saure und basische Aminosäuren sind rot bzw. blau eingefärbt. Interaktionen, die gestrichelt markiert sind: Wasserstoffbrücken (blau), Salzbrücken (hellblau), hydrophob (grau). L: Loop, α: α-Helix, β: β-Strand. Magenta-Box: Reste, die durch Ala-Substitution in einer GtgE-vermittelten Spaltungsreaktion getestet wurden (s. Abbildung 20C, D). **F** Schema des katalytischen Mechanismus von GtgE. Die Spaltung erfolgt im *switch I* zwischen G59_R (P1) und V60_R (P1') durch die katalytische Triade (C45_G, H151_G, D169_G). Q33_G, C45_G, N44_G: Oxyanion-Tasche (*hole*); Protonendonor: C149_G. Blau: GtgE-Aminosäuren, gelb: gespaltene Bindung, blaue gestrichelte Linien: polare Wechselwirkungen.

Zusammengefasst interagiert GtgE eng mit Rab32 über drei Bindungsplattformen, die als Spike 1-3 bezeichnet werden, die die *switch*-Regionen aufnehmen. Insbesondere zeigt die Struktur, dass die Spaltungsstelle von Rab32 in einen tiefen Hohlraum gezogen wird, der von den Spikes 1 und 2 gebildet wird.

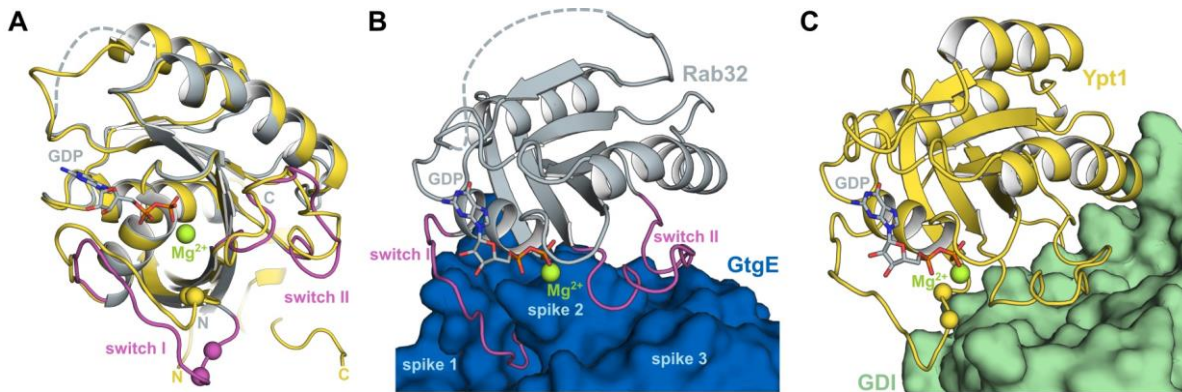


Abbildung 19. Vergleich der Bindung von GtgE und GDI an kleinen GTPasen. **A** Strukturelle Überlagerung von Rab32 aus dem Rab32:GDP:GtgE_{C45A}-Komplex (grau) und Ypt1 aus dem Hefe-Ypt1:GDP:GDI-Komplex (gelb, PDB Zugangsnummer: 1UKV)⁴¹. Die Schalterregionen weisen eine ähnliche, jedoch nicht identische Konformation auf. **B** Bindemodus von GtgE (blaue Oberfläche) an Rab32 (grau, Cartoon). Die Interaktion wird überwiegend durch die Spikes (1-3) mit den *switch*-Regionen (magenta Loops) vermittelt. **C** Bindemodus von GDI (grüne Oberfläche) an Ypt1 (gelb, als Cartoon). Die Interaktionen werden wesentlich durch den *switch II*, $\alpha 3$ (RabSF3-Motiv) und den prenylierten C-Terminus vermittelt. *Switch I* ist nur partiell involviert. Kugeln: α -Atome der GtgE-Spaltstelle mit den ebenfalls in Ypt1 angegebenen homologen Positionen; Stabmodell: GDP; grüne Kugel: Mg^{2+} -Ion. Im Verhältnis zu A sind B und C um 60° auf der X-Achse nach vorne gekippt.

3.2.4. Biochemische Validierung des Rab32:GDP:GtgE_{C45A} Komplex

Die Komplexstruktur weist die Rab *switch*-Regionen als zentrale Interaktionsflächen der Erkennung und Bindung durch GtgE aus. Zur Validierung dieser kristallographischen Beobachtung wurde ein Interaktionstest zwischen Rab32 und GtgE in einer Yeast-Two-Hybrid (Y2H, Hefe-Zwei-Hybrid)-Anordnung aufgestellt. Dabei fungieren RabGTPasen als Köder und die inaktive GtgE_{C45A} Mutante als Beute. Eine produktive Wechselwirkung wird über das Hefe-Wachstum auf Leu-Trp-His Mangelmedium (engl. *selection dropout*, SD) detektiert. Getestet wurden zuerst die Rab32-Unterfamilie sowie Rab23 als Negativkontrolle (s. Abbildung 20A). Die Interaktionsstärke korreliert direkt mit der Stärke des Wachstums und kann durch Zugabe von 3-Amino-1,2,4-triazol (3'-AT), einem Inhibitor der His-Synthese, qualitativ überprüft werden. Alle GtgE-Substrate zeigen mit der C45A-Mutante eine Interaktion, jedoch ist ausschließlich Rab32 als Signalgeber geeignet. Die Interaktion mit Rab38 scheint deutlich schwächer zu sein, da unter Anwesenheit geringer Mengen 3'-AT das Wachstum in der WT-Interaktion stark beeinträchtigt ist. Rab29 wiederum zeigt ein starkes selbstaktivierendes Wachstum (mit dem leeren Beutepiasmid pGAD-HA), das nur mit hohen Konzentrationen von 3'-AT unterdrückt werden kann (s. Abbildung 20A).

Als Nächstes wurde eine systematische Bibliothek von Rab32-Ala-Mutanten der *switch*-Regionen erzeugt und durch Y2H-basierte Interaktionsstudien untersucht, um die beobachtete Interaktionsfläche der Kristallstruktur zu verifizieren. In der *switch I*-Region zeigen die Aminosäuremutanten der Spaltregion T52_R (P3), I58_R (P2), G59_R (P1), D61_R (P2') und F62_R (P3') einen starken Wachstumsdefekt, was bestätigt, dass sie an der Bildung im Rab32:GDP:GtgE_{C45A}-Komplex beteiligt sind (Abbildung 20B, oben). Insbesondere zeigt die Substitution von I58_R, das weit verzweigte hydrophobe Wechselwirkungen in der Kristallstruktur eingeht, den stärksten Wachstumsdefekt. Dies unterstreicht die Bedeutung als zentrales Element von I58_R für die Komplexgrenzfläche. Interessanterweise sind die Positionen I58_R und D61_R, mit dem stärksten Wachstumsdefekt nahezu vollständig über alle RabGTPasen konserviert. Daher ist es unwahrscheinlich, dass diese zentralen Interaktionsstellen bei der Determinierung der GtgE-Substratspezifität beteiligt sind.

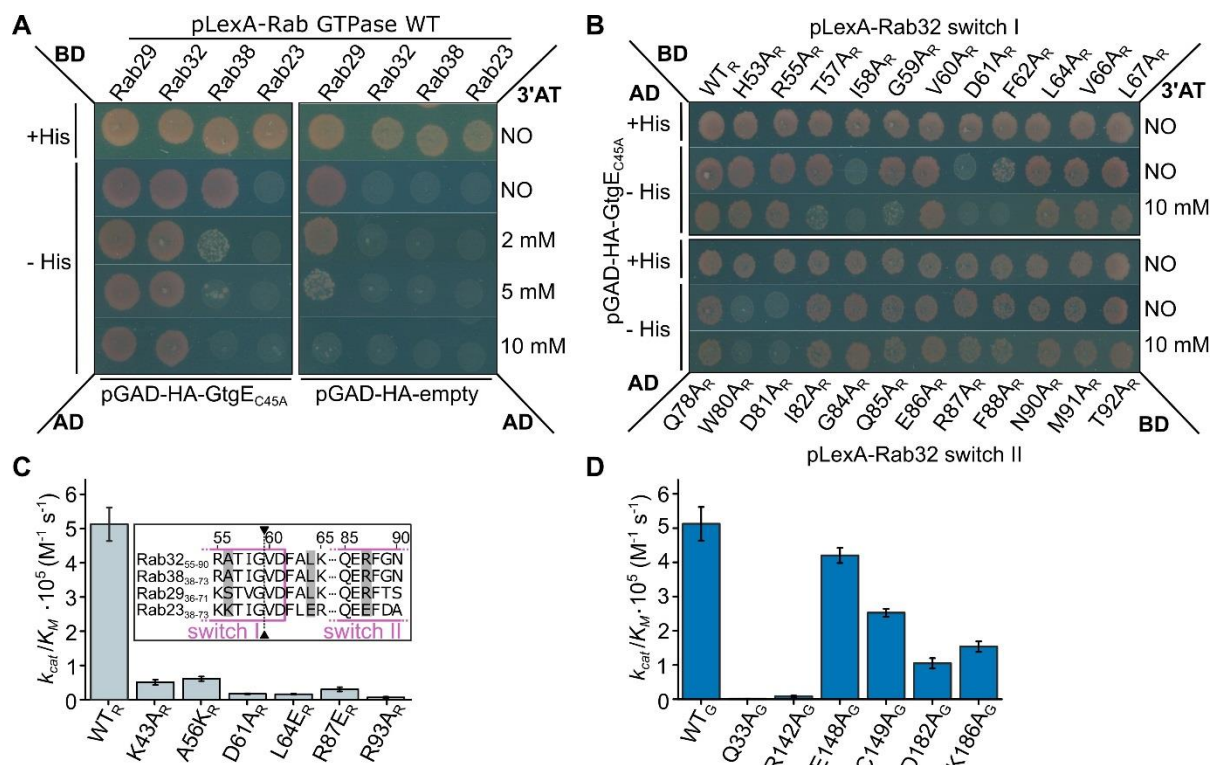


Abbildung 20. Analyse der Rab32:GtgE-Komplex-Schnittstellen und des katalytischen Mechanismus. **A** Y2H-Bindungsstudien mit GtgE_{C45A} (pGAD-HA; Beute) mit volllänge Rab29, 32, 38 oder Rab23 (pLexA; Köder) auf His-Mangelmedium. Zur Untersuchung der Interaktionsstärke wurde der Wachstumsinhibitor 3-Aminotriazol (3'-AT) von 0-10 mM zugesetzt. **B** Alanin-Mutations-Screening des Rab32-*switch I* (oben) und des *switch II* (unten) mit dem Y2H-Assay aus A. Die *switch I*-Reste an der GtgE-Schnittstelle zeigen einen signifikanten Wachstumsdefekt bei Zugabe von 3'-AT, was die Rab32:GDP:GtgE_{C45A}-Schnittstellen bestätigt. Auch die *switch II*-Reste W80_R und D81_R zeigen eine verminderte Komplexbildung. **C** Spaltungseffizienz von Struktur- und Sequenz-geleiteten Rab32-Mutanten (8 μM) durch GtgE (8 nM), erhalten aus einer densitometrischen Analyse SDS-PAGE-basierter Aktivitätstests (s. ergänzend Abbildung 49A, Abbildung 50A, Tabelle 18 sowie Abbildung 18E). Einschub: Teilsequenz-Alignment der Rab32-Unterfamilie und Rab23. Grau: mutierte Reste in Rab32 zur entsprechenden Rab23-Aminosäure; Pfeile: GtgE-Spaltungsstelle (s. Abbildung 17A). Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung der exponentiellen Anpassung. **D** Katalytische Effizienz von GtgE-Mutanten mit Rab32-Wildtyp. Identische Versuchsanordnung wie in C (s. ergänzend Abbildung 49B, Abbildung 50B und Tabelle 18 im Anhang).

Auf die gleiche Weise wurde eine Mutationsanalyse der *switch II*-Region durchgeführt (Abbildung 20B, unten). Keine der direkt an der Komplex-Interaktionsfläche beteiligten Mutanten wiesen einen Wachstumsdefekt auf, was darauf hindeutet, dass Mutationen im *switch II* aufgrund der hohen Komplexaffinität, offenbar toleriert werden können. Einzig die Mutanten W80_R und D81_A_R, in der *Interswitch*-Region lokalisiert, zeigen eine starke Wachstumshemmung. Die Seitenkette von W80_R ist ein Bestandteil der wichtigen hydrophoben Rab-Triade, die an der Bindung vieler Interaktionspartner beteiligt ist¹⁹². Der Wachstumsdefekt kann durch die Interaktion der W80_R-Indolseitenkette mit F62_R erklärt werden, da die *switch I* Seitenkette von F62_R auch an der GtgE-Bindung beteiligt ist (Abbildung 20B, oben).

Zusätzlich zu den Hefe-Interaktionsstudien wurde die Struktur-Aktivitäts-Beziehung anhand weiterer Mutanten in allen interagierenden Regionen mittels GtgE-vermittelter Rab32-Proteolyse untersucht. Dabei wurden stichprobenartig Positionen sowohl in Rab32 (*switch*-Regionen) als auch in GtgE (Spike-Regionen) getestet. Alle Mutationen in Rab32 wurden entweder basierend auf der Strukturanalyse des Rab32:GtgE-Komplexes (K43_A_R, D61_A_R, R93_A_R) oder durch den Sequenzvergleich zwischen Rab32 und dem Nicht-GtgE-Substrat Rab23 (A56_K_R, L64_E_R, R87_E_R) ausgewählt (s. Abbildung 20C, Abbildung 18E). Die getesteten Rab32-Mutanten zeigten mindestens eine 10-fach herabgesetzte Aktivität, was ihre Bedeutung für die Substraterkennung und Komplexbildung untermauert. Die Mutanten D61_A_R und L64_E_R zeigen eine 30-fache Aktivitätsabnahme gegenüber GtgE_{WT}, was die Bedeutung der Salzbrücke zwischen D61_R und R142_G abermals unterstreicht. Die L64_E_R-Mutation führt wohl zu sterischen Hinderungen mit den GtgE Resten F34_G und L41_G, was ebenfalls Einblicke in die Rab-Substrat-Restriktion gestattet, da diese Position nur schwach unter RabGTPasen konserviert ist. Die Mutanten K43_A_R und R93_A_R (die bereits bei den Methylierungsexperimenten als bedeutsam für die Komplexbildung identifiziert wurden) heben die Salzbrückenbildung mit E148_G bzw. D182_G auf und bestätigen damit die Relevanz der entsprechenden ionischen Wechselwirkung für die Komplexbildung. Darüber hinaus unterstreicht die Aktivitätsabnahme der R87_E_R-Mutante die Bedeutung des Arginin-Seitenkettenkontakts über eine H-Brücke zum K194_G des Spike 3 von GtgE. Die *switch I* Mutante A56_K_R verursacht vermutlich sterische Zusammenstöße mit den GtgE Seitenketten von L150_G und P143_G, die an der Basis des Spike 2-Loops sitzen (Abbildung 18E). Alle GtgE-Mutanten mit Ausnahme von E148_A_G weisen einen signifikanten Aktivitätsabfall auf (s. Abbildung 20D). In besonderem Maße verringert Q33_A_G die Aktivität um das 200-fache und stellt damit seine Bedeutung als Teil des Oxyanionlochs heraus. Die Bedeutung der D61_R-R142_G-Salzbrücke als zentraler Interaktionsstelle wird mit der R142_A_G-Mutation erneut bestätigt. Die C149_A_G-Mutante reduziert die Aktivität um die Hälfte. Die Lokalisation in der Nähe des aktiven Zentrums deutet auf eine mögliche Rolle als Protonendonator für den neu gebildeten N-Terminus während der Katalyse hin (Abbildung 18F). Die Salzbrücke zwischen D182_G und dem *switch II*-Rest R93_R zeigt bei der Komplexbildung einen größeren Einfluss als diejenige zwischen E148_G und K43_R. Der

Rest K186_G ist durch die Stabilisierung des Spike 3 indirekt an der Komplexinteraktionsfläche beteiligt. Hier bildet die Guanidin-Gruppe zwei intramolekulare, polare Kontakte mit Q178_G und E153_G in der Nähe der katalytischen Base H151_G aus, was K186_G als wichtiges organisierendes Element in der *switch III*/Spike 3-Schnittstelle identifiziert (s. ergänzend Abbildung 49, Abbildung 50 und Tabelle 18). Zusammenfassend bestätigen die Mutationsanalysen die Interaktionsflächen, wie sie in der Komplex-Kristallstruktur zwischen Rab32 und GtgE beobachtet wurden.

3.2.5. Strukturelle Grundlagen der Nukleotidspezifität

Um die molekulare Grundlage der exklusiven Nukleotidspezifität von GtgE für inaktive Rabs aufzuklären, wurden zunächst ein Strukturvergleich des aktiven Rab32:GppCH₂p (PDB Zugangsnummer 4CYM) mit dem Rab32:GDP im Komplex mit GtgE vorgenommen. Dabei zeigten sich zwei mögliche Selektionszentren (im Weiteren auch als Hubs bezeichnet). Den ersten Hub repräsentiert E86_R, das im GtgE-Komplex durch die Neuordnung des *switch II* in die Nukleotidbindetasche ragt und mit dem γ -Phosphat einen sterischen sowie elektrostatischen Zusammenstoß verursachen würde (Abbildung 21A). Im Komplex der aktiven Konformation ragt E86_R in die entgegengesetzte Richtung, heraus aus *switch II*. Ein *switch I*-Rest konstituiert den zweiten potenziellen Hub. Die Alkoholgruppe von Y54_R formt in der aktiven Konformation einen Kontakt mit dem GTP γ -Phosphat und ist damit an der Ausrichtung des *switch I* beteiligt. In der GtgE-gebundenen Konformation ist die Phenolgruppe unter das gebundene Nukleotid rotiert und wird von polaren Wechselwirkungen zweier Serine (Peptidrückrat von S51_R bzw. Seitenkette von S40_R) koordiniert.

Um die Rolle des Hub 1 Glutamats zu untersuchen, wurde eine Substitution mit Alanin vorgenommen, die E86A_R Mutante präparativ jeweils mit GDP und GTP beladen und der Proteolyse durch GtgE ausgesetzt. Dabei zeigte sich, dass die Selektion zu Gunsten des GDP beladenen Rabs nach wie vor Bestand hat (Abbildung 21B). Dieselbe Strategie wurde auch für die Evaluierung des Hub 2 angewandt, wobei durch die Substitution von Y54_R jeweils gegen Ala und Phe die Rolle der Hydroxyl- und Phenylgruppe gesondert überprüft wurde. Für beide getesteten Mutanten (Y54A_R; Y54F_R) zeigte sich eine unveränderte Selektion zu Gunsten der inaktiven Rabs (Abbildung 21C sowie Abbildung 51A im Anhang). Damit scheidet auch Y54_R als Selektionsfaktor aus.

Zur Identifizierung weiterer möglicher Determinanten der Nukleotidspezifität wurden in Zusammenarbeit mit Sophie Mader und Prof. Ville Kaila (Arbeitsgruppe für Computergestützte Biokatalyse der TUM) ein *in silico* Ansatz mittels atomistischer molekulardynamischer (MD) Simulationen verfolgt. Dabei wurde der Rab32:GDP:GtgE_{C45A} Komplex als Startpunkt verwendet. Zunächst wurde das Nukleophil des aktiven Zentrums rekonstituiert (C45_G), um der realen Situation zu entsprechen. Weiterhin wurde das GDP gegen ein GTP ausgetauscht, um den schwachaffinen, hypothetischen Rab32:GTP:GtgE Komplex zu konstituieren. Die MD-

Simulation ahmt dabei die anfänglichen molekularen Schritte der Dissoziation zwischen GtgE und Rab32:GTP nach, und zielt darauf ab, Determinanten zu identifizieren, die am meisten zu diesem Prozess beitragen. Als Referenz diente die identische Simulation mit dem Rab32:GDP:GtgE Komplex. Die Komplexstrukturen wurden für die Dauer von 190 ns simuliert. Alle MD-Simulationen wurden von Sophie Mader sowie Prof. Ville Kaila konzipiert und implementiert. Die Evaluierung der Ergebnisse erfolgte in kollegialer Zusammenarbeit^{190s}. Die strukturelle Überlagerung der Endzustände beider MD-Simulationen zeigte die größten Unterschiede in der Schnittstelle zwischen *switch II* und Spike 3. Hier war es vor allem eine Triade aus F88_R, K194_G sowie E114_G die eine einsetzende Dissoziation durch eine erkennbare Zunahme der F88_R-K194_G-Distanz identifiziert. In diesem mutmaßlichen Hub 3 bildet E114_G einen elektrostatischen Anker für K194_G, der in gestreckter Ausrichtung als Kontraktstelle zum Phenylring von F88 in Rab32 dient. Zunächst wurde die Rolle von F88_R weiter untersucht, indem dieser Rest durch Glycin ersetzt (F88G_R) und die Auswirkungen in einer MD-Simulation beobachtet wurde. Interessanterweise zeigt sich bei der F88G_R Mutante ein ähnliches Verhalten zwischen dem GTP- und GDP-Zustand in der Simulation (s. Abbildung 52B). Um die Bedeutung von Hub 3 für die GtgE-Präferenz von GDP über GTP auch experimentell zu evaluieren, wurde die F88G_R-Mutante hergestellt und mit GDP oder GppNHp präparativ beladen. Zur schnelleren Überprüfung verschiedener Kombinationen von Rab- zu GtgE-Mutanten, wurden die GtgE-Hub 3 Mutanten (E114A_G, K194A_G, E114A_G/K194A_G) sowie WT_G rekombinant in *E. coli* exprimiert und direkt aus geklärten Lysaten in einem Proteolysenachweis mit inaktiven und aktivem Rab32 (jeweils WT_R und F88G_R) eingesetzt (s. Abbildung 21F sowie Abbildung 51B im Anhang). Die F88G_R-Mutation führt interessanterweise tatsächlich zu einem Verlust der exklusiven GDP-Präferenz von GtgE bei Rab32. Gleichzeitig macht die F88G-Mutation Rab32 im Allgemeinen zu einem schlechteren Substrat für GtgE. Die verringerte Umsatzrate von GtgE gegenüber F88G_R ist aufgrund von dessen Beteiligung an der Protein-Protein-Interaktionsfläche nicht überraschend. Allerdings wird die F88G_R-Mutante nun eindeutig sowohl im GDP- als auch im GTP-Zustand gespalten, auch wenn GDP scheinbar schneller prozessiert wird (s. Abbildung 21F).

Die Alaninsubstitutionen von GtgE E114_G und R194_G, die Teile des Spike 3 sind, zeigen entgegengesetzte Effekte und neutralisieren einander in der Doppelmutante, wenn sie mit Rab32 F88G_R inkubiert werden (s. Abbildung 51B). Der frei gewordene Raum sowie die konformationelle Flexibilität der F88G_R-Mutante könnten dazu beitragen, einen katalytisch kompetenten Rab32:GTP:GtgE-Komplex zu bilden. Die verringerte proteolytische Aktivität von E114A_G unterstreicht seine wichtige Rolle als elektrostatischer Anker für K194_G.

^s Die Verwendung und Darstellung der Ergebnisse der Resultate aus den MD-Simulationen erfolgt mit freundlicher Erlaubnis von Sophie Mader und Prof. Ville Kailla (TUM).

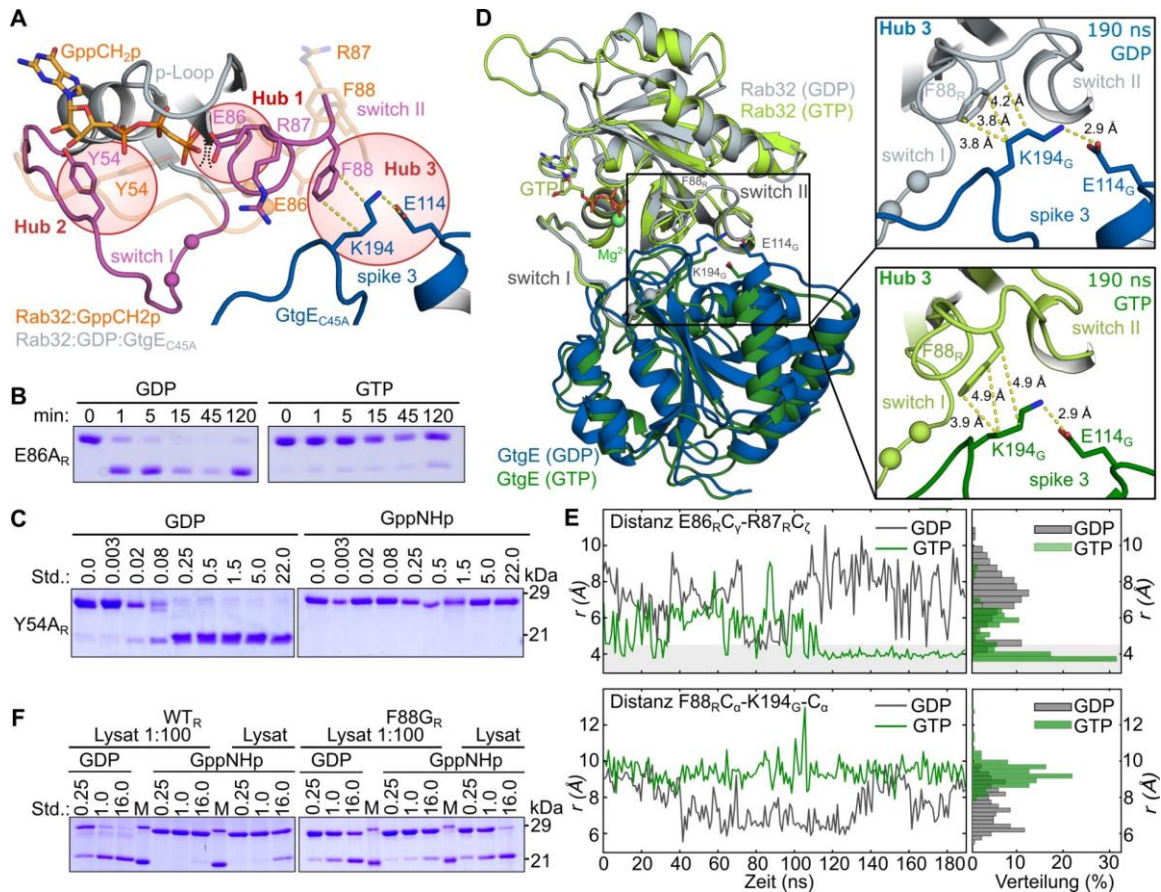


Abbildung 21. Die molekulare Grundlagen der GDP-Nukleotidspezifität von GtgE. **A** Potenzielle Selektions-Hubs, die an der GDP-Spezifität von GtgE beteiligt sind, werden anhand einer Rab32-Strukturüberlagerung des aktiven und inaktiven Zustands hervorgehoben. Grau: Rab32:GDP:GtgE_{C45A}; orange transparent: Rab32:GppCH₂p:VARP (PDB Zugangsnummer 4CYM); Stabmodelle: Hub 1 (E86_R), Hub 2 (Y54_R), Hub 3 (bestehend aus F88_R, E114_G und K194_G) und GppCH₂p; Kugeln: C α -Atome der Spaltstelle; Magenta: *switch*-Regionen in Rab32:GDP; schwarze und gelbe gestrichelte Linien: sterische Konflikte bzw. Wasserstoffbrücken/v. d. Walls-Kontakte. **B-C** Prozessierung der Mutanten des Hub 1 E86A_R (B) und des Hub 2 Y54A_R (C) durch GtgE in den jeweiligen GDP- und GTP-Bindezuständen, analysiert mittels Gel-Shift-Aktivitätsnachweise (s. ebenso Abbildung 51). **D** Hub 3 (F88_R; E114_G; K194_G) an der Schnittstelle des Rab:GtgE_{C45A} *switch III*/Spike 3. Strukturelle Überlagerung von MD-Simulationen (Laufzeit 190 ns) des Rab32:GtgE-Komplexes, der entweder an GDP (grau/blau) oder *in silico* an GTP (hell-/dunkelgrün) gebunden ist. Rechts: van-der-Waals-Kontakte von Hub 3, jeweils gelb gestrichelt für den GDP (oben) bzw. den GTP-Komplex (unten) (s. ergänzend Abbildung 52). **E** Ausgewählte Atompaarabstände in dem GDP-gebundenen und hypothetischen GTP-gebundenen Rab32:GtgE-Komplex über den Verlauf von 190 ns der MD-Simulationen (Felder links) und Histogramme der jeweiligen Abstandsverteilung (Felder rechts) mit einer Ionenpaar-Abstandsschwelle (<4.5 Å) in grau hinterlegt. Oben: E86_R und R87_R bilden ein stabiles Ionenpaar nach ca. 120 ns in dem hypothetischen GTP-gebundenen Komplex (in grün). Dieser wird initiiert durch eine elektrostatische Abstoßung mit dem γ -Phosphat des GTPs (s. Abbildung 52). Im Gegensatz dazu wird in der GDP-gebundenen Struktur (in schwarz) kein stabiles Ionenpaar zwischen E86_R und R87_R beobachtet. Unten: Abstände zwischen F88_R von Rab32 und K194_G GtgE aus MD-Simulationen der GDP- (schwarz) und GTP-gebundenen (grün) Rab32:GtgE-Komplexe. In der GDP-gebundenen Form bildet K194_G eine Wechselwirkung mit F88_R, während in dem GTP-gebundenen Komplex K194_G von F88_R dissoziiert, was die Dissoziation von GtgE von Rab32 auslösen kann. Die MD-Simulationen legen daher nahe, dass F88_R ein entscheidendes Element für die Bevorzugung von GtgE gegenüber Rab32 im GDP-Zustand sein könnte. **F** Mutationen im Rab32-Hub 3 ändern die Selektivität des GtgE-Nukleotidspezifität, die zur Spaltung von Rab32:GppNHp führt. Rab32 F88G, beladen mit GDP oder GppNHp, wurde mit gereinigtem *E. coli*-Lysat (oder 1:100 verdünntem Lysat), in dem GtgE_{WT} überexprimierte vorlag, behandelt und durch einen Gel-Shift-Nachweis analysiert.

Wenn sie nicht durch die Carboxylatfunktion von E114_G fixiert ist, kann die freigesetzte ϵ -Aminogruppe von K194_G andere intramolekulare Salzbrücken oder polare Kontakte eingehen, etwa mit dem benachbarten D193_G oder Y195_G. Dies könnte in der Konsequenz die Organisation der *switch III*/Spike 3 Schnittstelle stören. Umgekehrt scheint die Substitution von K194_G vorteilhaft für die Umsatzrate von F88_R zu sein. Dieser Umstand könnte damit verbunden sein, dass die Kontakte des fehlenden hydrophoben Phenylrings von F88_R an den aliphatischen Positionen der Lysin-Seitenkette durch das benachbarte Y195_G kompensiert werden und dabei wiederum mit der Organisation des Spike 3 interferieren. Wird K194_G nun aus dieser Anordnung entfernt, entfallen auch die unvorteilhaften Wechselwirkungen und die Rab32-Spaltung könnte somit schneller als zuvor ablaufen. Zusammenfassend basiert die nukleotidabhängige Substratpräferenz von GtgE gegenüber RabGTPasen auf einem multifaktoriellen Selektionsmechanismus, da keiner der getesteten Hubs die Nukleotidspezifität von GtgE vollständig egalalisieren konnte. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass F88_R eine wichtige Rolle sowohl in der *switch III*/Spike 3-Schnittstelle als auch dem Nukleotid-Selektionsmechanismus spielt.

3.2.6. Die Spezifität der Rab-Substrat Erkennung von GtgE

Neben der Nukleotidselektion für inaktive RabGTPasen ist der molekulare Erkennungsmechanismus von Rab-Substraten von Interesse. Die Selektion der Rab32-Unterfamilie aus der Rab-Familie mit ca. 70 GTPasen kann nicht anhand der Substratsequenz in der Spaltregion erklärt werden, da die *switch I*-Primärstruktur nahezu strikt über alle Rabs konserviert ist. Die Erkennung muss demnach auf weiteren Elementen außerhalb des *switch I* lokalisiert sein. Die Rab32:GDP:GtgE-Komplexstruktur dient hier als Grundlage, um Einblicke in die Rab-Selektivität zu gewinnen. Basierend auf dem Aminosäuresequenz-Alignment zwischen den GtgE-Substraten Rab32, 29, 38 und dem Nicht-GtgE-Substrat Rab23 wurden drei homologe Sequenzbereiche verschiedener Länge ausgewählt, die von Rab32 auf Rab23 übertragen wurden (s. Abbildung 22A, B). Der Proteolysetest mit den Rab23/32-Chimären (AB: H53_{R32}-L74_{R32}; AC: H53_{R32}-L74_{R32}; AD: H53_{R32}-G89_{R32}) ergab, dass erst der Austausch des Sequenzbereichs von H53_{R32}-G89_{R32} (AD-Bereich von *switch I* bis in *switch II* hinein) die Erkennung und Spaltung durch GtgE ermöglicht. Der homologe Austausch von H53_{R32}-L74_{R32} (AC) ist nicht hinreichend für die Prozessierung durch GtgE (s. Abbildung 22C). Eine Schlussfolgerung hieraus ist, dass der Bereich um den *switch II* herum an der Rab-Substraterkennung involviert sein muss. Für eine detailliertere Analyse der Selektionselemente wurden zunächst die Aminosäuren aus Chimäre III, die an der Protein-Protein-Grenzfläche beteiligt sind, identifiziert. Zur weiteren Eingrenzung wurden lediglich Seitenketten in Rab23 zu den Rab32 analogen Aminosäuren substituiert, die unterschiedliche chemische Eigenschaften aufweisen. Auf dieser Basis wurde eine vierfach Rab23-Mutante K40A, E48L, Q50V, E70R erzeugt und als mögliches GtgE-Substrat getestet (s. Abbildung 22B, D, E). Diese Rab23-

Mutante wurde nicht von GtgE gespalten, was auf einen multifaktoriellen Selektionsmechanismus hindeutet, der nicht auf die direkten Kontakte der Protein-Protein-Grenzfläche reduziert werden kann. Daher wurden alle weiteren chemisch verschiedenartigen Aminosäuren, die nicht direkt an der Rab-GtgE Interaktionsfläche beteiligt sind, in einer Strukturüberlagerung zwischen Rab32:GDP:GtgE, Rab32:GppCH₂p sowie Rab23:GDP vergleichend analysiert. Hierbei wurde I82_{R32} als möglicher Selektionsschalter identifiziert (s. Abbildung 23A, links). Diese Position wird in nahezu allen RabGTPasen exklusiv durch ein Threonin besetzt. Die Alkoholgruppe von T65_{R23} bildet eine Wasserstoffbrücke mit dem Carbonylsauerstoff der Peptidbindung zwischen β 1-Strang und dem P-Loop aus.

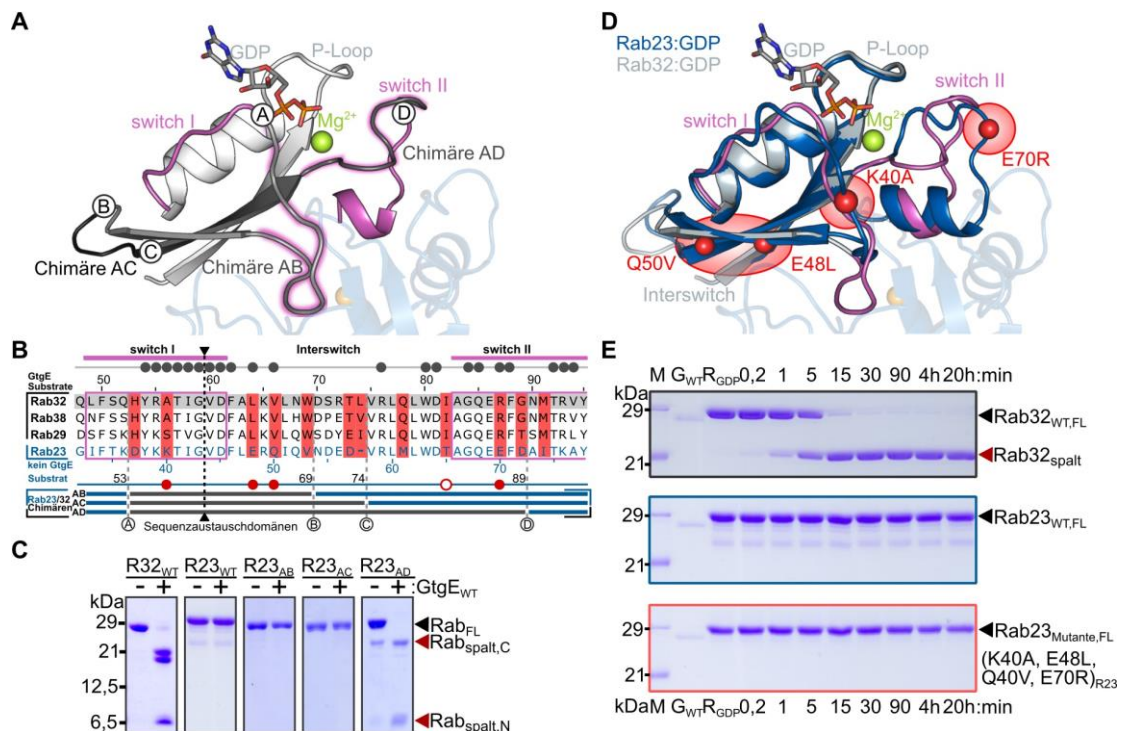


Abbildung 22. Einblicke in die molekulare Grundlage der Rab-Substratspezifität von GtgE.

A Strukturmodell der Sequenzaustauschdomänen in Rab32 zur Erzeugung von Rab23/32 Chimären. Hervorgehoben in grau-schwarztonen: Sequenzaustauschdomänen. Domänengrenzen sind mit A-D indiziert. Magenta: *switch*-Regionen; Stabmodell: GDP; grüne Kugel: Mg²⁺-Ion; blau transparent: Ausschnitt der GtgE Struktur. **B** Ausschnitt des Sequenzvergleichs zwischen den GtgE-Substraten Rab32, 38, 29 (schwarz) und dem Nicht-Substrat Rab23 (blau). Die Nummerierung der Aminosäuren entspricht Rab32 (grau hinterlegt) oder Rab23 entsprechend der Farbkodierung. Hervorgehoben mit magenta Boxen/Balken: *switch*-Regionen; dunkelgraue Perlenkette: Positionen direkter Wechselwirkungen mit GtgE; rot hinterlegte Positionen: Unterschiede der chemischen Eigenschaften konservierter/ähnlicher Reste zwischen GtgE-Substraten und Rab23. Graue, gestrichelte Linien und Buchstabenindex A-D: Grenzpunkte der Sequenzaustauschdomänen. Blaue/dunkelgraue Balken: Rab23/32 Chimären Entwürfe mit den jeweiligen ausgetauschten Sequenzabschnitten AB, AC und AD – siehe auch A. Blaue Kette mit roten Perlen: Rab23 mit vier mutierten Positionen zu den analogen Seitenketten aus Rab32 – siehe hierzu D. Roter Kreis: I82_{R32}; T65_{R23} als Teil des Selektionsmechanismus – s. Abbildung 23. Schwarze gestrichelte Linie und schwarze Dreiecke: proteolytische Schnittstelle in GtgE-Substraten. **C** GtgE-vermittelte Proteolyse der Rab23/32 Chimären in einem Gel-Shift Nachweis. R32: Rab32; R23: Rab23. Chimären-Austauschgrenzen sind tiefgestellt angezeigt – siehe auch A und B. **D** Strukturüberlagerung von Rab32:GDP:GtgE_{C45A} und Rab23:GDP. Rote Kugeln mit rotem Hintergrund: Mutationen in Rab23 zu den homologen Rab32 Resten. Weitere Legende wie in A. **E** Kinetische Gel-Shift Analyse der Rab23 Mutante K40A, E48L, Q50V, E70R (unten) im Vergleich zu Rab23_{WT} (mitte) und Rab32_{WT} (oben). G_{WT}: GtgE Wildtyp; R_{GDP}: GDP gebundenes Rab.

Diese Fixierung offenbart im Vergleich mit dem GtgE gebundenen Rab32 einen sterischen Zusammenstoß zwischen der T65_{R23}-Methylgruppe und dem konservierten Y95_{R32} aus *switch II*. Der Vergleich zwischen den Konformationen beider Aktivitätszustände von Rab32 mit ihren Bindepartnern suggeriert einen Schaltvorgang zwischen I82_{R32}, E86_{R32} und Y95_{R32} in *switch II*, der während der GtgE-Bindung abläuft (s. Abbildung 23A, rechts). In diesem Modell sind E86_{R32} und Y95_{R32} im aktiven Zustand durch eine polare Wechselwirkung zueinander ausgerichtet. In der GtgE-Komplexstruktur geht Y95_{R32} einen Polaren Kontakt mit einer Peptidbindung aus $\beta 3$ ein und fixiert damit *switch II* für die Bindung der Protease. Die nötige Rotationsbewegung beider Reste für eine produktive GtgE-Bindung erinnert an einen Zahnrad-Mechanismus in dem I82_{R32} das vermittelnde Zwischenglied darstellt. Die flexible, aliphatische Seitenkette moderiert durch eigene Rotationsbewegungen die Neuordnung des *switch II*.

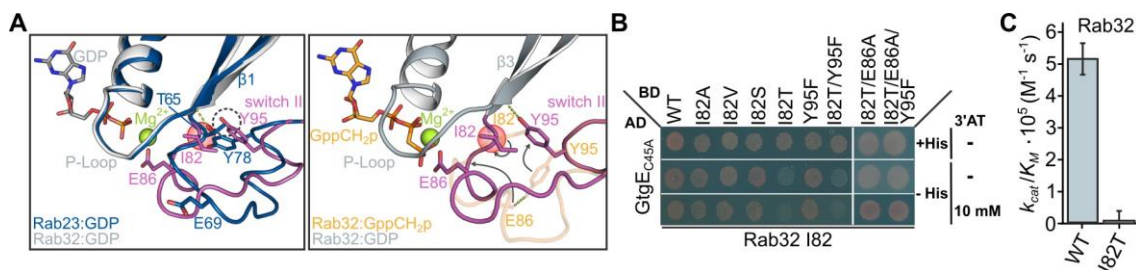


Abbildung 23. Die Bedeutung von I82 im *switch II* von Rab32 für die Interaktion mit GtgE. A Modell eines Zahnrad-Mechanismus der Triade I82, E86 und Y95 im *switch II* der GtgE-Substrate am Beispiel Rab32. **Links:** Lokale Strukturüberlagerung der Nukleotidbindetasche sowie dem *switch II* von GDP gebundenem Rab23 (blau) und Rab32 (weiß). Magenta: *switch II*; Stabmodelle: GDP und die homologen Positionen des Zahnradmechanismus (s. unten) in beiden GTPasen; grüne Kugel: Mg²⁺-Ion; Gelbe gestrichelte Linie: polare Wechselwirkung über eine Wasserstoffbrücke; schwarz gestrichelter Kreis: sterischer Konflikt; rot hinterlegt: I82_{R32}; T65_{R23} als zentraler Unterschied in der GtgE-Substraten zu Nicht-Substraten. **Rechts:** Lokale Strukturüberlagerung zwischen Rab32:GDP (grau) und Rab32:GppNHp (orange) in gleicher Anordnung wie links. Pfeile: globale Konformationsänderungen der Reste die als Stabmodell hervorgehoben sind. E86_{R32} und Y95_{R32} rotieren Zahnradartig im Inneren des *switch II* auseinander. Dabei fungiert I82_{R32} als flexibles, vermittelndes Element in der Mitte. **B** Sondierung der Funktion von I82_{R32} für die GtgE Bindung und Überprüfung des Modells aus A in einem Y2H-Bindungsassay. **C** Die Spaltungseffizienz von I82_{R32} (8 μ M) durch GtgE (8 nM) im Vergleich zum WT_{R32}. Die Werte wurden durch eine densitometrische Analyse eines SDS-PAGE-basierte Aktivitätstests erhalten (s. Abbildung 53A, B).

Der Austausch dieser Position durch das polare Threonin würde in diesem Getriebe wie ein Keil wirken. Die Funktion von I82_{R32} wurde zunächst durch die Permutation aufsteigender Seitenkettenlängen und Polarität (Ala, Val, Ser, Thr) in dem Y2H-basierten Bindungsassay zwischen Rab32 und GtgE_{C45A} überprüft (s. Abbildung 23B). Die Bindung wird durch die Threonin-, nicht aber durch die Serin-Substitution effektiv unterbunden, was das Zahnrad-Modell stützt. Hiernach wurden die beiden weiteren Schalterelemente zusätzlich substituiert (E86_{R32}, Y95_{R32}), jeweils als Doppelmutanten sowie die Dreifach-Mutante gemeinsam mit I82_{R32}. Die mutierten Köder wurden auf die Wiederherstellung der Bindung getestet. Tatsächlich rettet nur die Doppelmutante mit E86A_{R32} die Bindung. Der postulierte Schaltmechanismus weist Y95_{R32} als wichtiges Element aus, was experimentell nicht bestätigt werden

konnte. Die Dreifachmutante (I82T/E86A/Y95F_R) zeigt ebenfalls eine Wiederherstellung der Bindung, was an dem Einfluss der Glutamatsubstitution begründet werden kann.

Um den Einfluss der I82T_{R32} auch auf die Substrateigenschaften zu überprüfen wurde die Mutante in dem GtgE_{WT}-vermittelten Gel-Shift-Nachweis im zeitlichen Verlauf aufgenommen. Der k_{cat}/K_M von GtgE mit I82T_{R32} beträgt $7,3 \pm 3,5 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ und ist damit 70-fach reduziert verglichen mit dem Rab32_{WT} (s. Abbildung 23C, Abbildung 53A, B), was noch einmal die Bedeutung von I82_{R32} unterstreicht. Ob im Umkehrschluss die Position T65 in Rab23 das entscheidende Element der Negativselektion durch GtgE ist, wurde über die Proteolyse des inaktiven T65I_{R23} überprüft. Hierbei konnte keine Modifikation detektiert werden. Dies zeigt abermals, dass die Substratelektion durch GtgE multifaktorieller Natur ist (s. Abbildung 53C).

3.3. In vitro Prenylierung von GtgE durch humane Transferasen

Der C-Terminus der GtgE Sequenz enthält ein Cystein und besteht aus der Folge C₂₂₅TIL was ein CaaX-Motiv darstellt, das potenziell durch Prenyltransferasen erkannt und kovalent modifiziert werden kann. Die Vorhersage der bioinformatischen Analyse durch die Online-Software *Prenylation Prediction Suite* (PrePS)¹⁹³ ergab, dass das C-terminale Cys₂₂₅ sowohl durch die Farnesyltransferase (FTase) als auch die Geranylgeranyltransferase (GGTase I) modifiziert werden kann. Eine Modifizierung durch die Rab-spezifische GGTase II wurde durch den Algorithmus als unwahrscheinlich klassifiziert. Die Prenylierung wurde *in vitro* durch die Übernachtinkubation von GtgE mit substöchiometrischen Mengen FTase oder GGTase I und einem Überschuss des entsprechenden Isoprenylpyrophosphats inkubiert und massenspektrometrisch untersucht (s. Abbildung 24A). Tatsächlich wird GtgE sowohl von humaner FTase als auch der GGTase I quantitativ modifiziert. Die Modifikationsstelle konnte durch die Ala-Substitution von C225 bestätigt werden, da die Mutante unter denselben Bedingungen durch keine der Transferasen modifiziert werden konnte. Die Auswirkungen der Modifikation auf die Aktivität der Protease wurden mit präparativ gereinigten prenylierten Varianten von GtgE in einem qualitativen Gel-Shift-Ansatz überprüft. Dabei wurde deutlich, dass sich die Prenylierung selbst, oder das *in vitro* Prenylierungsverfahren negativ auf die proteolytische Aktivität von GtgE auswirken. Im Vergleich mit dem unmodifizierten GtgE-Wildtyp wurden nur minimale Mengen Rab32 umgesetzt. Eine weitergehende, vertiefte Analyse *in vitro* zu möglichen Konsequenzen der GtgE-Lipidierung wurde nicht durchgeführt.

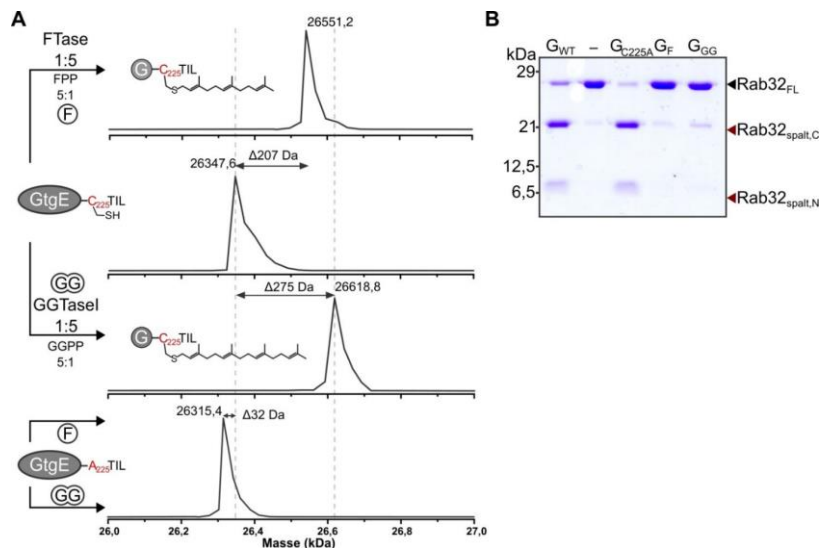


Abbildung 24. *In vitro* Lipidierung von GtgE durch humane Prenyltransferasen. A Massenspektrometrische Validierung der quantitativen Übertragung einer Farnesyl- (oben) bzw. einer Geranylgeranylgruppe (unten) über einen Thioether an Cys225 durch die entsprechenden Transferasen. Die Transferase wurde im 5-fachen molaren Überschuss und das Prenylpyrophosphat Co-Substrat im 5-fachen molaren Überschuss zugesetzt. **B** Qualitative Evaluierung der Proteaseaktivität an Rab32:GDP mit prenyliertem GtgE. Die Prenylierung wirkt sich negativ auf die Proteolyse aus. Unmodifiziertes GtgE (G_{WT}); farnesyliertes bzw. geranylgeranyiertes GtgE (G_F ; G_{GG}).

3.4. Intrazelluläre GtgE-Lokalisation im humanen *Salmonella*-Infektionsmodell

Die Lipidierung von GtgE legt den Schluss nahe, dass der Effektor in der Wirtszelle an eine Membran lokalisiert. Ob eine mögliche Membranbindung vorliegt und ob diese mit spezifischen Kompartimenten assoziiert, ist sollte im Salmonelleninfektionsmodell in einem Fluoreszenzmikroskopischen Ansatz überprüft werden. Hierzu wurde zunächst ein Salmonellenstamm erzeugt, bei dem das chromosomale *gtgE* deletiert wurde (*Salmonella* Typhimurium Δ *gtgE*, *S. Tm* Δ *gtgE* – erzeugt von Dr. Daniel Humphreys, Cambridge University). Damit wurden *gtgE* sowie veränderte Varianten als einzige Kopie molekularbiologisch über das pTrc99a DNA-Plasmide in den Deletionsstamm eingebracht. Da kein GtgE-spezifischer Antikörper zum direkten Nachweis zur Verfügung stand, wurden zwei indirekte Detektionsstrategien verfolgt. In einem Split-GFP Ansatz wurde zunächst das nicht-fluoreszente Fragment mGFP¹⁻¹⁰ (β -Strang 1-10) transient in Humanzellen exprimiert. Wenn ein Effektor-GFP Fusionskonstrukt mit dem fehlenden β -Strang (hier GtgE-GFP¹¹) in einem Infektionsexperiment in die Zelle sekretiert wird, kommt es zu einer autonomen GFP-Assemblierung und damit zur Rekonstituierung der Fluoreszenz¹⁹⁴ (s. Abbildung 25A). Diese indirekte Strategie wird nötig, da das T3SS die Sekretion eines Fusionsproteins aus einem bakteriellen Effektor mit dem stabilen GFP- β -Barrel nicht erlaubt¹⁹⁵. Ein weiterer indirekter Detektionsansatz erfolgte über einen anti-Myc-Antikörper, indem GtgE mit dem etablierten c-Myc-Peptid (EQKLISEEDL) als Epitop-Tag an Stelle des GFP¹¹ fusioniert wurde. Über eine sequenzielle Inkubation mit einem anti-Myc Antikörper und einem fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper sollte GtgE in der

Zelle detektiert werden. Die erste Strategie erlaubt es, die Lokalisation von GtgE in lebenden Zellen zu studieren, während im zweiten Ansatz die Zellen vor der Fluoreszenzfärbung fixiert werden müssen. Alle Infektionsstudien sowie die Mikroskopiearbeiten wurden an der Fakultät für Pathologie der Universität Cambridge (UK), im Laboratorium für Mikrobiologie und Parasitologie unter Anleitung von Dr. Daniel Humphreys durchgeführt. Zunächst wurde überprüft, ob die Sekretion von GtgE-Fusionsproteinen mit den beschriebenen Peptiden über das T3SS aus *Salmonella* möglich ist. Hierzu wurde beispielhaft die Expression sowie die Sekretionskompetenz von GtgE^{myc} *in vitro* überprüft (s. Abbildung 54). Es ist bekannt, dass der hier verwendete pTrc99a-Vektor eine basale Proteinexpression aufweist, die für eine erfolgreiche Effektorsekretion ausreicht. Gleichzeitig ist es über das Lac-Repressor-System (DE3) möglich, die Expression durch IPTG-Zugabe zu steigern. Die separate Analyse der Salmonellenzellen sowie des Überstands (2YT-Medium) zeigt, dass die Zugabe von IPTG die Überexpression von GtgE^{myc} induziert und dass dieses auch in das Medium sekretiert wird. In einem Infektionsexperiment von HeLa Zellen (transfiziert mit dsRed; mGFP¹⁻¹⁰) mit *S. Tm* Δ gtgE::gtgE^{GFP11} wurden Salmonellen internalisiert, allerdings konnte keine eindeutige Lokalisation von GtgE gezeigt werden.

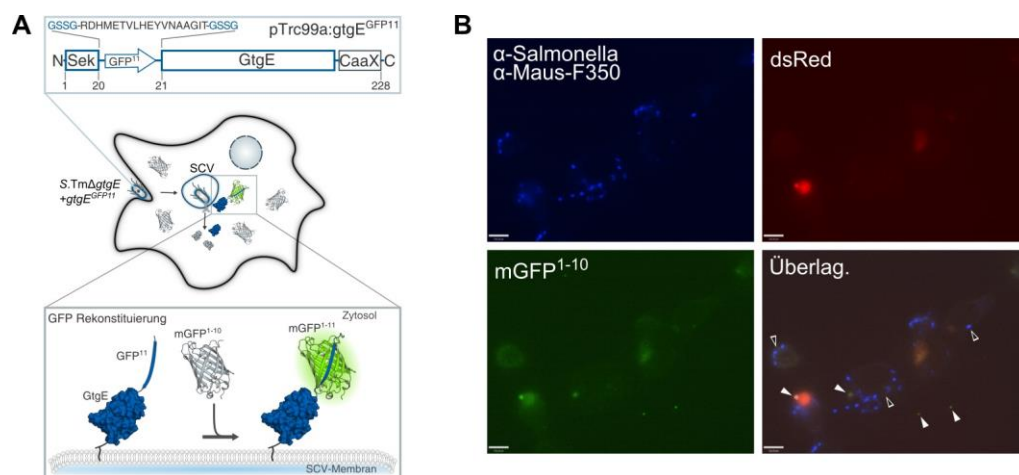


Abbildung 25. Evaluierung der intrazellulären GtgE-Lokalisation in einem Split-GFP-Fluoreszenz-Nachweis. **A** Konzept des Split-GFP Ansatzes. *S. Typhimurium* (*S.Tm*) Δ gtgE wird mit *gtgE*^{GFP11} komplementiert und in einer Infektionsanordnung von Humanzellen internalisiert, die das komplementäre GFP Fragment β 1-10 (mGFP¹⁻¹⁰) exprimieren. Ausschnitt oben: Genstruktur des konstruierten *gtgE*^{GFP11}: N-terminales Sekretionssignal (aa 1-20; Sek); durch einen GS₄-Linker flankiertes GFP β 11 (GFP¹¹, insertiert zwischen aa 20-21); GtgE aa 21-224; CaaX-Box (CTIL). Ausschnitt unten: sekretiertes und prenyliertes GtgE^{GFP11} assoziiert mit der SCV-Membran. Das zuvor nicht-fluoreszente mGFP1-10 kann mit dem fehlenden β 11 aus GtgE^{GFP11} ein fluoreszentes mGFP1-11 ausbilden. **B** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen mit Salmonellen infizierter HeLa Zellen. Die fixierten Zellen wurden mit anti-Salmonella-Antikörper und einem fluoreszenten Sekundärantikörper angefärbt (blauer Kanal). Die HeLa Zellen wurden zuvor mit dsRed (Kontrolle, roter Kanal) und mGFP1-10 transfiziert (grüner Kanal). Die Überlagerung der Kanäle zeigt nur vereinzelt Bereiche der Kolokalisation zwischen Salmonellen (blau) und einer rekonstituierten GFP-Fluoreszenz (grün) (Pfeile mit weißem Rahmen). Unspezifische GFP Signale (weiße Pfeile).

Nur vereinzelt wurde eine Kolokalisation des GFP-Signals mit der SCV beobachtet. Das Signal/Rausch-Verhältnis im GFP-Kanal war sehr gering, aufgrund von unspezifischen Hintergrundsignalen (s. Abbildung 25B).

In dem zweiten Ansatz wurden HT1080 Zellen (menschliche Fibrosarkom-Zelllinie) mit Fluoreszenz-gefärbten *S. Tm* Δ *gtgE::gtgE^{myc}* (Alex350) infiziert und das Myc-Peptid über eine zweistufige Antikörper-vermittelte Fluoreszenzfärbung sichtbar gemacht (s. Abbildung 26A). Die Negativkontrolle bei der *S. Tm* Δ *gtgE* in der Infektion verwendet wurde, zeigte bereits ein starkes, unspezifisches Hintergrundsignal vorwiegend im Zytosol der Fibroblasten, was auf eine geringe Selektivität des verwendeten Antikörpers hindeutet. Bei den weiteren Experimenten in Anwesenheit von *GtgE^{myc}* konnte ohne IPTG-Zugabe kein Unterschied zum Kontrollexperiment festgestellt werden. Bei IPTG-Zugabe heben sich prominente granuläre Strukturen um den Zellkern herum ab. Aufgrund des hohen Hintergrundsignals lassen sich hieraus allerdings keine weiteren Schlüsse ziehen. In einem parallelen Ansatz wurde auch eine mögliche Kolokalisation zwischen Rab32 und *GtgE* getestet. Hierbei wurde in der gleichen experimentellen Anordnung die HT1080 Zellen mit Emerald-Rab32 (eine GFP-Variante; emRab32 WT) vor der Infektion transfiziert. Dabei lokalisiert Rab32 sowohl an vesikulären Strukturen als auch im Zellkern (s. Abbildung 26B). Die Salmonelleninfektion zeigt abermals keine distinkte Kolokalisation aufgrund es Myc-Antikörper Hintergrundsignals. Um diese experimentelle Schwäche zu adressieren, wurden zusätzliche Lokalisationsstudien über die Co-Transfektion von fluoreszenzmarkiertem Rab32 und *GtgE* (ohne Salmonelleninfektion) durchgeführt (s. Abbildung 55).

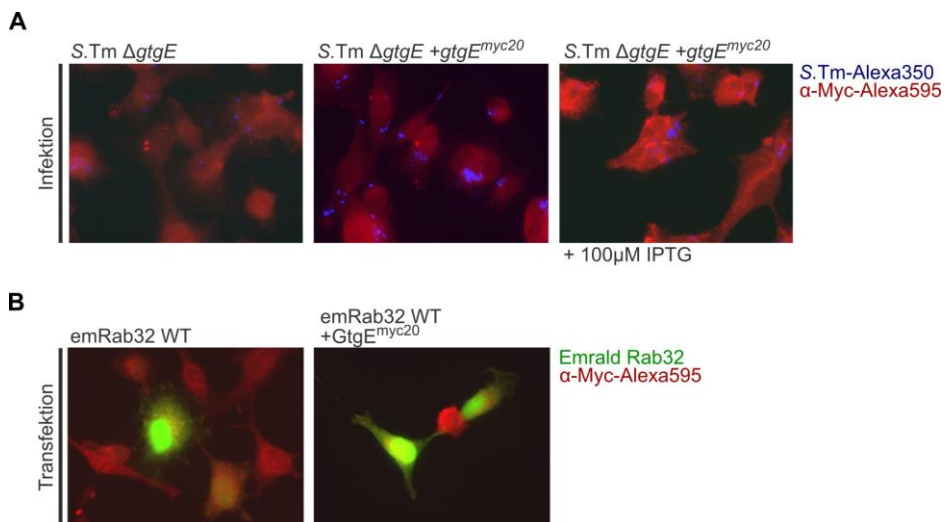


Abbildung 26. Nachweis der *GtgE*-Lokalisation über einen Antikörper basierten Myc-Epitoptag nachweis. **A** Nachweis im Salmonelleninfektionsmodell mit humanen Fibrosarkom-Zellen (HT1080). Überlagerungen von blau gefärbten Salmonellenzellen und der Rotfärbung durch den c-Myc Antikörperpaar mit und ohne IPTG induzierter *GtgE^{myc}*-Expression. **B** Transiente Expression von emRab32 und *GtgE^{myc}* in HT1080 Zellen ohne bakterielle Infektion.

Allerdings konnte auch in dieser Anordnung keine Erkenntnisse über die intrazelluläre Lokalisation von GtgE gewonnen werden. Zusammenfassend zeigt sich, dass die gewählten Ansätze aus verschiedenen Gründen keine ausreichende Sensitivität aufweisen. Eine wesentliche Schwäche des Split-GFP Experimente war, dass keine stabile Zelllinie, die mGFP¹⁻¹⁰ exprimierte, zur Verfügung stand. Der verwendete Myc-Antikörper lies in Kombination mit dem Sekundärantikörper keine aussagekräftige Interpretation der Ergebnisse zu. Daher bleibt die Frage nach der intrazellulären Lokalisation von GtgE während der Infektion vorerst unbeantwortet.

3.5. Charakterisierung der Protease DUF5_{vv}/RRSP

Die Charakterisierung der Protease RRSP teilt sich in zwei thematische Schwerpunkte. Zum einen wurde die katalytische Aktivität biochemisch quantifiziert und zum anderen standen die Bestimmung des katalytischen Mechanismus sowie die Identifizierung des aktiven Zentrums im Mittelpunkt. In allen Experimenten wurden die Isoformen H- oder K-Ras als Spaltsubstrat eingesetzt. Da bisher lediglich die Struktur der N-terminalen Membranankerdomäne (C1) der Protease charakterisiert vorlag, wurde hier als Surrogat für die vollständige RRSP-Struktur ein Homologiemodell mit der MODLLER Software¹⁹⁶ erstellt (s. Abbildung 27). Dieses Modell basiert auf der Struktur des *Pasteurella multocida* Toxins (PMT; PDB Zugangsnummer 2EBF), das als signifikantester Treffer einer Homologieanalyse mit der Onlinesoftware HHPred¹⁹⁷ identifiziert wurde. Da beide Proteine eine Sequenzähnlichkeit von 42% und eine Sequenzidentität von 25% aufweisen, wird die erzeugte RRSP-Struktur als geeignetes Arbeitsmodell betrachtet.

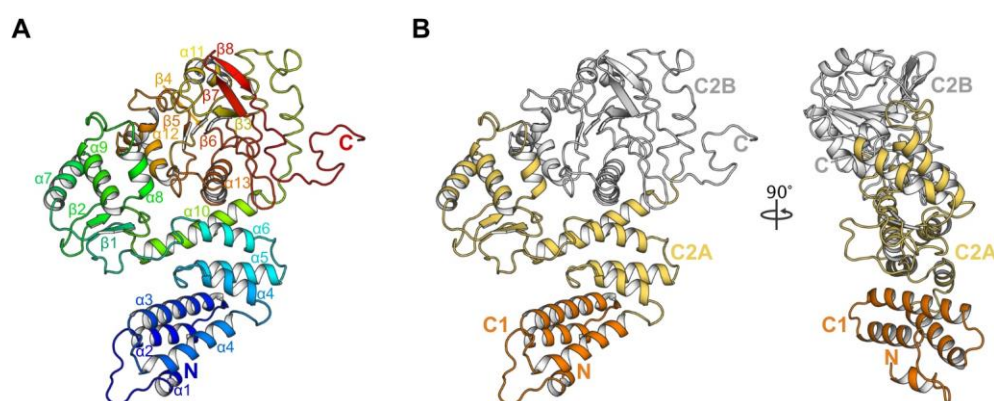


Abbildung 27. *In silico*-Strukturhomologiemodell von RRSP, basierend auf dem *Pasteurella multocida* Toxin (PMT; PDB Zugangsnummer 2EBF)¹⁹⁶. **A** Bänderdarstellung mit einer Regenbogenfärbung vom N-Terminus (blau) zum C-Terminus (rot). Sekundärstrukturelemente sind entsprechend der Farbkodierung indiziert. **B** Domänenstruktur von RRSP in der Frontal- (links) und der Seitenansicht (rechts). Orange: C1-Domäne; gelb/weiß: C2A/B-Domäne.

Das Modell weist eine wie erwartet zweigeteilte Domänenstruktur auf, bestehend aus der C1-Domäne einerseits und C2A/B-Domäne andererseits. Auffällig ist, dass es eine weitgehend planare Struktur aufweist, mit zwei distinkten Seiten, ähnlich einem Teller. Gleichzeitig sind nur schwach ausgeprägte Vertiefungen in der Topologie zu erkennen, die als mögliche Substratbindetaschen infrage kommen.

3.5.1. Aktivitätsnachweis und enzymatische Effizienz von RRSP

Neben dem SDS-PAGE basierten Gel-Shift-Nachweis wurde eine fluoreszenzspektroskopische Anordnung zur Verfolgung der RRSP-vermittelten Ras-Proteolyse in Echtzeit evaluiert. Da Ras natürlicherweise kein Tryptophan enthält, wurde ein Mant (N-Methylantraniloyl) markiertes GDP (mGDP) als Fluoreszenzsonde eingesetzt. Die Zugabe katalytischer Mengen RRSP_{WT} zu Ras:mGDP zeigte tatsächlich eine ungewöhnlich starke Signaländerung von bis zu 30% der Gesamtsignalamplitude (s. Abbildung 28A). Nach dem Ende des kinetischen Signalverlaufs, wies eine erneute RRSP-Zugabe keine weitere Signalabnahme auf und zeigt damit das Ende der Reaktion an. Als weitere Kontrolle diente die Zugabe von EDTA, das die Nukleotidbindung durch die Komplexbildung des Mg²⁺-Ions destabilisiert und damit einen weiteren, bekannten Signalabfall auf einen Basalwert von 40% der Signalamplitude bewirkt¹⁹⁸. Die molekulare Grundlage der Proteolyse-vermittelten Signaländerung könnte mit der lokalen Nähe der Mant-Gruppe zur gespalteten Peptidbindung zusammenhängen. Neben dem Y32_{Ras} an der Spaltstelle könnte auch der aromatische Ring des konservierten F28_{Ras} in *switch I* direkte Wechselwirkungen mit der Mant-Gruppe eingehen. Die Spaltung induziert eine größere konformationelle Freiheit in *switch I*, ändert damit die chemische Umgebung der Mant-Gruppe, was zu dem beobachteten Signalabfall führen kann. Eine experimentelle Analyse dieser Hypothesen wurde nicht weiterverfolgt.

Ob RRSP eine Präferenz für aktive oder inaktive Substrate aufweist, wurde durch Gel-Shift-vermittelte Spaltexperimente überprüft, bei denen Ras mit definierter Nukleotidbeladung eingesetzt wurde (GDP; GTP oder GppNHp)[†]. Bei den Spaltexperimenten mit RRSP_{WT} zeigten sich keine Unterschiede im zeitlichen Verlauf der Signaländerung, was nahelegt, dass keine Selektion zugunsten eines bestimmten Aktivitätszustandes stattfindet (s. Abbildung 28B). Wenn die Konformation des *switch I* unerheblich für die Umsatzrate ist, stellt sich die Frage, ob auch ein Peptidfragment aus *switch I* als Substrat akzeptiert wird. Dieser Aspekt wird im nachfolgenden Abschnitt 3.5.2. untersucht. Die quantitative Auswertung der RRSP-vermittelten Fluoreszenzsignaländerung ergab eine apparente Umsatzrate von $12,2 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ (k_{obs}) für die Spaltung von Ras:mGDP (0,5 μM) durch RRSP (0,8 nM) (s. Abbildung 28C).

[†] Ras war nach der Isolation aus *E. coli* quantitativ mit GDP beladen. Die in vitro Beladungseffizienz von GTP lag bei 80% und bei GppNHp bei etwa 70%.

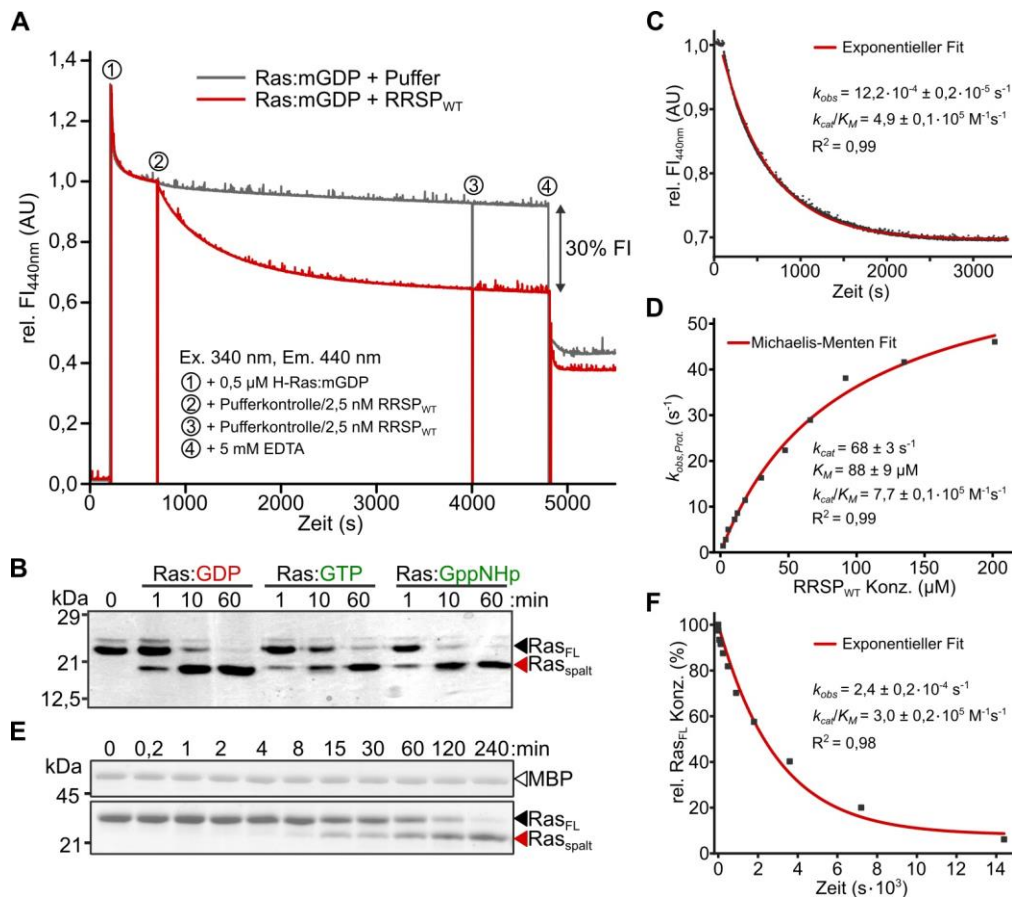


Abbildung 28. Charakterisierung der Enzymaktivität von RRSP. **A** Evaluierung eines fluoreszenz-basierten Proteolysenachweis in Echtzeit mit Mant-GDP beladenem Ras (Ras:mGDP) als Spaltsubstrat. **B** Evaluierung der Nukleotidselektion von RRSP bei inaktiven (GDP, rot) bzw. aktiven (GTP; GppNHp, grün) Ras-Substraten. **C** Quantifizierung der Spaltungsrate von Ras:mGDP (0,5 µM) durch RRSP_{WT} (2,5 nM, final) in derselben experimentellen Anordnung wie in A. Nach der Korrektur des Signals um die konstante Steigung aus der Pufferkontrolle wurde die Spaltungsrate (k_{obs}) durch Anpassung einer einfachexponentiellen Kurve ermittelt. Die katalytische Effizienz (k_{cat}/K_M) wurde durch die Division von k_{obs} durch die RRSP-Konzentration bestimmt. **D** Enzymcharakterisierung von RRSP nach Michaelis-Menten. Die Umsatzkurven der Modifikation von Ras:mGDP (0,1 µM) wurden mit der *Stopped-Flow*-Methode im zeitlichen Verlauf bei 435 nm aufgezeichnet. Die Umsatzraten (k_{obs}) wurden aus gemittelten Kurven von drei Experimenten wie in C berechnet und in Abhängigkeit von der RRSP_{WT}-Konzentration (2-200 µM) aufgetragen. Die Umsatzrate erster Ordnung (k_{cat}) sowie die Michaelis-Menten-Konstante (K_M) wurden durch Anpassung an die Michaelis-Menten-Gleichung ermittelt. Die katalytische Effizienz wurde als Verhältnis k_{cat}/K_M berechnet. **E** Zeitpunktkinetik der Ras:GDP-Spaltung (8 µM) in einem Gel-Shift-Experiment mit katalytischen Mengen RRSP_{WT} (0,8 nM). MBP wurde als Ladekontrolle eingesetzt. **F** Densitometrische Auswertung der normalisierten Bandenintensität von nicht-gespaltenem Ras (Ras_{FL}) aus E. Die Bestimmung von k_{obs} und k_{cat}/K_M erfolgte wie in C. R^2 : Bestimmtheitsmaß.

Der k_{cat}/K_M beträgt $4,9 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ und weist RRSP_{WT} damit als ein effizientes Enzym aus. Zur Bestimmung der maximalen Umsatzrate (k_{cat}) sowie der Substratkonzentration halbmaximaler Sättigung (K_M) wurden *single-turnover*-Experimente mit der *Stopped-Flow*-Methode durchgeführt, bei der Ras:mGDP (0,1 µM, final) mit einem Überschuss an RRSP (2-200 µM, final) eingesetzt wurde (s. Abbildung 28D). Die ermittelten k_{obs} -Werte wurden in Abhängigkeit von der Enzymkonzentration aufgetragen. Die experimentelle Anordnung folgt im Prinzip einer Enzymcharakterisierung nach Michaelis-Menten mit vertauschten Konzentrationsverhältnissen zwischen Substrat und Enzym. Die Anpassung an eine Michaelis-Menten-Kurve liefert

einen k_{cat} von $68 \pm 3 \text{ s}^{-1}$ und einen K_M von $88 \pm 9 \text{ }\mu\text{M}$. Setzt man die Substrataffinität (K_D) näherungsweise mit dem K_M gleich, zeichnet sich RRSP durch eine hohe, maximale Umsatzrate sowie eine unterdurchschnittliche Substrataffinität aus. Als komplementärer Aktivitätsnachweis wurde die katalytische Effizienz von RRSP parallel über die densitometrische Auswertung eines SDS-PAGE basierenden Gel-Shift-Experimentes mit Ras:GDP bestimmt (s. Abbildung 28E, F). Der k_{obs} lag bei $2,4 \pm 0,3 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ und k_{cat}/K_M wurde auf $3,0 \pm 0,2 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ bestimmt und liegt damit etwa 50% niedriger, verglichen mit der katalytischen Effizienz der zuvor in den fluoreszenzbasierten Methoden bestimmten Werte.

3.5.2. Endopeptidaseaktivität von RRSP an *switch I*-Peptidenfragmenten aus Ras

Da RRSP keinen Unterschied zwischen dem Aktivitätszustand seiner Substrate bei der Spaltung aufweist, spricht dies für eine Flexibilität bei der konformationellen Substratselektion.

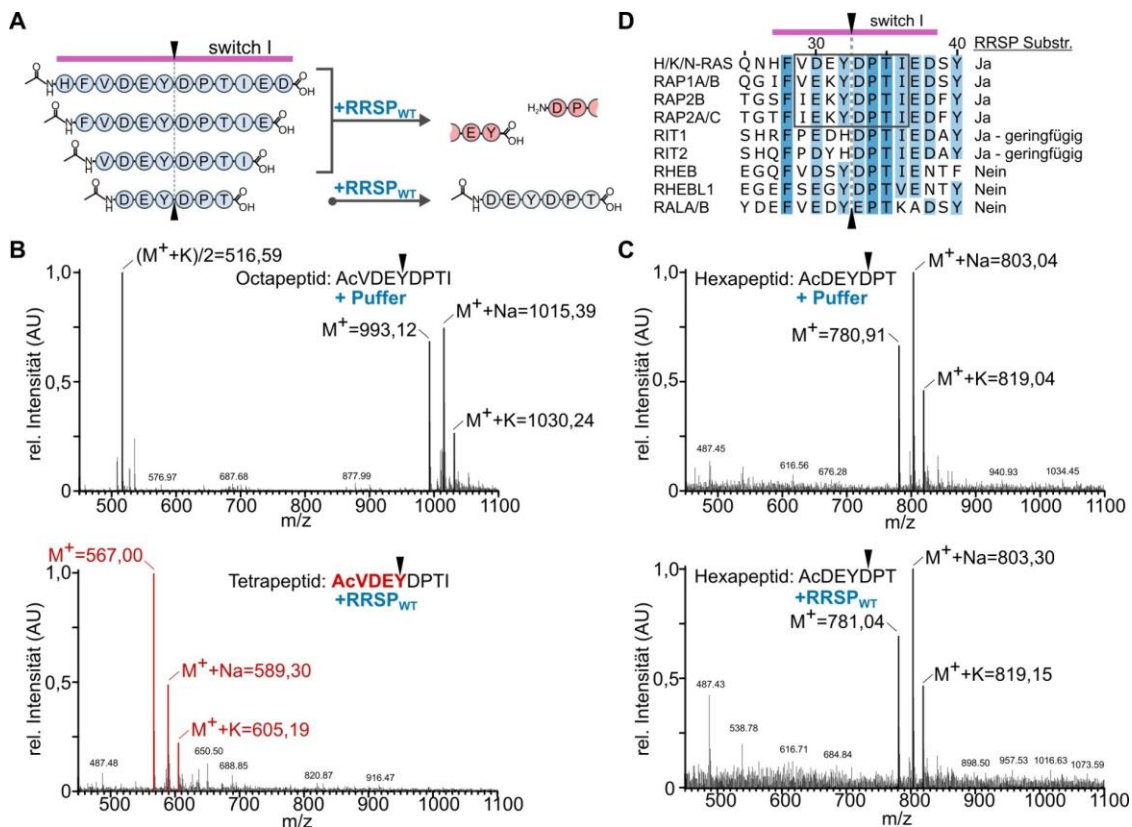


Abbildung 29. Endopeptidaseaktivität von RRSP. A Serie symmetrisch verkürzter *switch I*-Peptide aus Ras vom Dodeca- bis zum Hexapeptid in einem schematischen Reaktionsverlauf mit RRSP_{WT}. **B** Massenspektrometrischer Spaltungsnachweis des Octapeptids (AcVDEYDPTI) durch RRSP. **C** Keine Spaltung des Hexapeptids (AcDEYDPT) durch RRSP in der gleichen experimentellen Anordnung wie in B. **D** Sequenzvergleich der *switch I*-Region (magenta Balken) verschiedener Mitglieder der Ras-Familie, die von RRSP als Substrat erkannt werden und jenen, die keine Substrate darstellen. Hellblau: Sequenzidentität zwischen allen RasGTPasen; himmelblau: chemisch ähnliche Reste; schwarze Box: Identifizierte minimale Sequenz des Substratpeptides (P4-P4') in den bekannten Proteinsubstraten. Schwarze Pfeile und gestrichelte Linie indizieren die RRSP-Spaltstelle. Die Indexierung bezieht sich auf H/K/N-Ras.

Ob bereits Peptide durch RRSP gespalten werden, wurde über einen massenspektrometrischen Aktivitätsnachweis mit synthetischen Modellsubstraten überprüft. Zur Bestimmung des

kleinstmöglichen Peptidsubstrates, wurde eine Serie von vier symmetrisch verkürzten Modellpeptiden aus der *switch I*-Sequenz von Ras nach der Fmoc-Strategie synthetisiert, ausgehend vom Dodecapeptid bis zum Hexapeptid. Dabei wurde der N-Terminus mit einer Acetylgruppe geschützt, um die positive Ladung zu neutralisieren (s. Abbildung 29A). In einem qualitativen Aktivitätsnachweis mit RRSP (10 μ M, über Nacht) wurden die drei längsten Peptide (100 μ M) Dodeca- bis zum Octapeptid (AcVDEYDPTI-COO⁻) vollständig umgesetzt. Eine weitere Verkürzung zum Hexapeptid (AcDEYDPT-COO⁻) wird nicht toleriert und es findet keine Spaltung unter den gewählten Bedingungen mehr statt (s. Abbildung 29B, C). Der Sequenzvergleich zwischen RRSP-Substraten und Nicht-Substraten aus der Ras-Familie zeigen, dass die einzigen Unterschiede im Bereich P4-P1 zu finden sind (s. Abbildung 29D). In der molekularen Substraterkennung könnten die *switch I*-Positionen V29_{Ras}, E31_{Ras} sowie Y32_{Ras} eine wichtige Rolle einnehmen. Quantitative Umsatzraten der einzelnen Peptidsubstrate wurden nicht näher bestimmt. Erste Experimente hierzu zeigten allerdings bereits, dass die Peptide mit deutlich geringerer katalytischer Effizienz umgesetzt wurden als die Ras-Proteine. Diese Beobachtung weist auf weitere wichtige Faktoren in der Substraterkennung hin, die außerhalb des *switch I* liegen.

3.5.3. Bestimmung des katalytischen Mechanismus

Trotz umfangreicher Mutationsstudien durch Antic und Kollegen¹¹⁷ konnte bisher weder der katalytische Mechanismus noch das aktive Zentrum von RRSP bestimmt werden. Hier wurde daher zunächst über eine Inhibitionsstudie versucht, die Natur des Katalysemechanismus einzugrenzen.

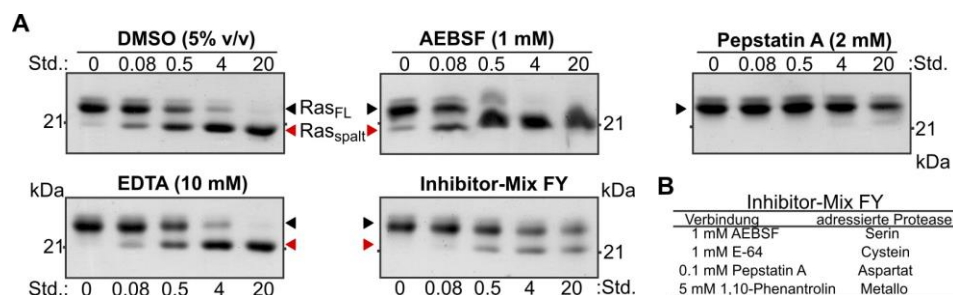


Abbildung 30. Inhibitionsstudien von RRSP zur Eingrenzung des enzymatischen Mechanismus. **A** Proteolytischer Aktivitätsnachweis mit Ras:GDP (8 μ M) durch RRSP (8 nM, final), dass mit den indizierten Substanzen (Konzentrationen, final) vor Reaktionsbeginn inkubiert wurde. **B** Zusammensetzung des Inhibitor-Mix FY (Roche) mit den jeweils adressierten Proteasentypen und den eingesetzten finalen Konzentrationen.

Eine Auswahl von generellen Proteaseinhibitoren mit je einem Vertreter für Serin- (AEBFSF), Cystein- (E-64), Metallo- (EDTA) oder Aspartatproteasen (Pepstatin A) bzw. einem Gemisch aus diesen wurde mit RRSP inkubiert und nachfolgend die Proteaseaktivität in einem Ras-Spaltungsexperiment im zeitlichen Verlauf verfolgt (s. Abbildung 30A). Dabei zeigt einzig

Pepstatin A eine nahezu vollständige Reduktion der Aktivität im Vergleich zur DMSO-Negativkontrolle. Der Inhibitor-Mix FY (Roche, Penzberg, D) weist ebenfalls eine signifikante Reduktion der Spaltungsrate auf. Pepstatin A ist in dem Gemisch zwar enthalten (0,1 mM), allerdings 20-fach geringer konzentriert eingesetzt als im Inhibitionsexperiment, in dem es als einziger Inhibitor eingesetzt wurde (2 mM) (s. Abbildung 30B). Dies erklärt auch geringere Inhibitionswirkung. Diese Ergebnisse legen nahe, dass RRSP eine Carboxyl-Endopeptidase ist, mit Aspartaten oder Glutamaten im aktiven Zentrum.

3.5.4. Identifikation des Aktiven Zentrums

Wenn es sich bei RRSP um eine Carboxyl-Endopeptidase handelt, kommen 70 Aminosäuren (39 Asp + 31 Glu) als Teil des aktiven Zentrums infrage. Eine umfassende Mutationsstudie in Kombination mit einem funktionellen Spaltungsnachweis wäre möglich, wurde hier allerdings aus Gründen des experimentellen Umfangs erst in einem zweiten Schritt verfolgt. Zuvor wurde ein Ansatz über eine kovalente Markierung des aktiven Zentrums und einer nachgelagerten MS²-Analyse gewählt, um die Zahl der möglichen Kandidaten für eine fokussierte Mutationsanalyse einzugrenzen (s. Abbildung 31). Da das Peptidanalogue Pepstatin A als allgemeiner, nicht-kovalenter Inhibitor von Aspartatproteasen fungiert, war diese Verbindung für eine solche Strategie ungeeignet. Daher wurden weitgehend unspezifische kovalente Inhibitoren wie EPNP (1,2-Epoxy-3-(nitrophenoxy)propan) und DAN (Diazoacetyl-DL-Norleucinmethylester) ausgewählt, weil diese zuvor bereits erfolgreich in Inhibitionsstudien u.a. mit der HIV-Protease oder Pepsin eingesetzt wurden und dort das aktive Zentrum quantitativ modifizierten^{199,200}. Die sauren Reaktionsbedingungen mit DAN enthielten auch Cu(I)⁺-Ionen, was bereits in niedrigkonzentriert (Konzentrationsbereich μM -nM) zu einer nahezu quantitativen Fällung von RRSP nach kurzer Inkubationszeit bei Raumtemperatur führte. Ebenfalls bewirkte ein pH < 6,0 das Präzipitieren von RRSP, was durch den kalkulierten pI_{RRSP} (5,4) erklärt werden kann. Daher wurde bei allen weiteren Analysen mit EPNP als Inhibitor gearbeitet, der bei der Additionsreaktion des Epoxids mit Säuregruppen einen Ester ausbildet. Zunächst wurden Reaktionsbedingungen optimiert, bei denen EPNP selektiv mit nukleophilen Säuregruppen reagieren sollte (s. Abbildung 31A). Der pK_s-Wert der Carboxylgruppe der Asp- und Glu-Seitenketten liegt bei 9,6. Entsprechend würde sich die Selektivität der Säuremarkierung mit sinkendem pH erhöhen, da die meisten Säuregruppen außerhalb des aktiven Zentrums protoniert vorliegen würden und ein nukleophiler Angriff am Epoxid damit weniger wahrscheinlich ist. Im Basischen würde die hydrolytische Verseifung der gewünschten Esterbindungen einsetzen. Aufgrund der pH-Sensitivität von RRSP wurde als Kompromiss ein pH von 6,5 - 7,0 eingestellt. Aufgrund der geringen Löslichkeit von EPNP in Wasser wurde eine verhältnismäßig hohe finale DMSO-Konzentration von 10% (v/v) eingesetzt, um die Verfügbarkeit des Inhibitors in Lösung zu erhöhen. Die massenspektrometrische Analyse des modifizierten RRS-

P_{FL} zeigt, dass eine Modifikation mit bis zu zwei EPNP Molekülen stattgefunden hat (s. Abbildung 32A). Gleichzeitig wurden etwa 30% aller RRSP-Moleküle nicht modifiziert. Bei einem molaren Überschuss des Inhibitors zwischen 130-260 Äquivalenten deutet dieses Ergebnis auf eine selektive Säuregruppenmarkierung an der Protease oder auf eine geringe EPNP-Reaktivität hin. Eine Aussage über die Regioselektivität der EPNP-Markierung lässt hieraus nicht ableiten.

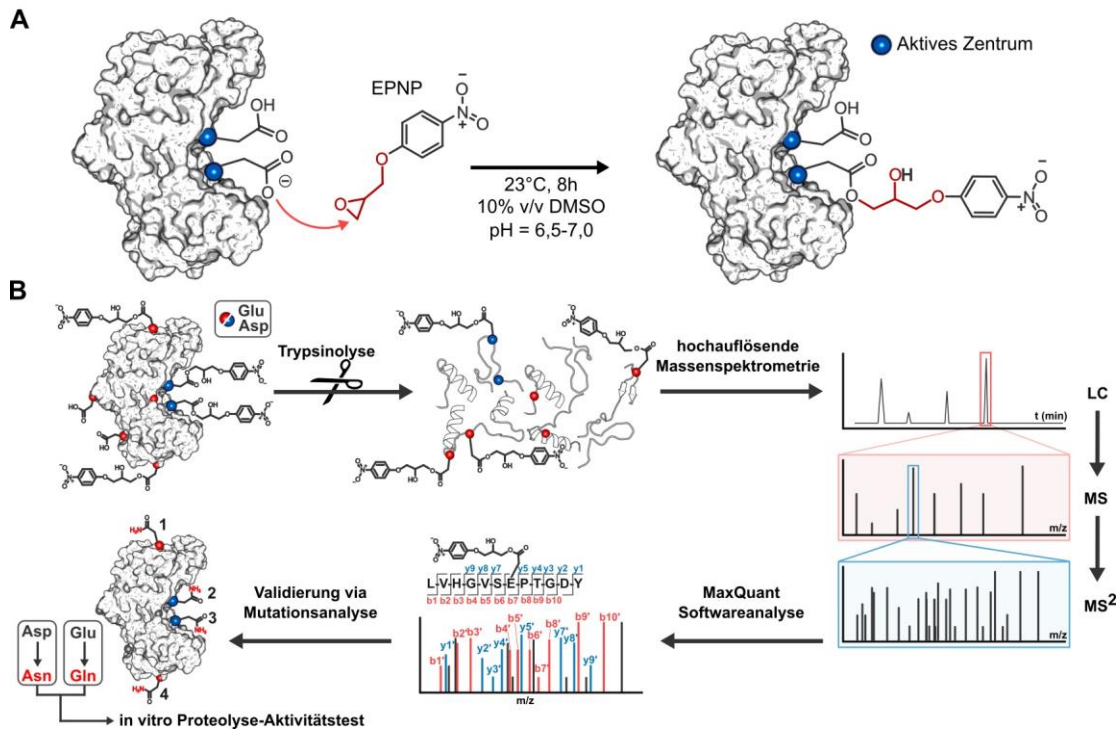


Abbildung 31. Kovalente Identifikationsstrategie der Carboxylgruppen im aktiven Zentrum von RRSP. A Schematisches Reaktionsschema der Epoxidringöffnung von EPNP im aktiven Zentrum des Enzyms. **B** Flussdiagramm zur Identifizierungsstrategie nukleophiler Carboxylgruppen über einen Tandem-Massenspektrometrie-Ansatz (MS^2). Mehrfach modifiziertes RRSP wird mit Trypsin verdaut und die Peptide über LC- MS^2 getrennt und analysiert. Die Ergebnisse werden mit der MaxQuant Software²⁰¹ ausgewertet und liefern eine Trefferliste potenzieller Säurereste (Asp/Glu). Individuelle Mutanten (D->N; E->Q) werden anschließend *in vitro* auf ihre proteolytische Aktivität in Ras-Spaltungsreaktionen evaluiert.

Für die Identifizierung der Markierungsstellen wurde zunächst ein Trypsinverdau von modifiziertem sowie unmodifiziertem RRSP durchgeführt und die erhaltenden Peptidgemische mit einem LC-gekoppeltem Tandem-MS analysiert. Die Experimente mit modifiziertem RRSP wurden als Triplikat durchgeführt und von Katja Bäuml (Lehrstuhl für Organische Chemie 2, TUM) in einem LC- MS^2 Instrument (LTQ Orbitrap XL, Thermo) analysiert. Die Auswertung erfolgte mit der MaxQuant Software²⁰¹. Dabei wurde EPNP jeweils als Modifikation für Asp und Glu definiert und eine separate Analyse für Asp-EPNP sowie Glu-EPNP, basierend auf der RRSP Vollständigensequenz durchgeführt. Oxidationen an Methionin wurden ebenfalls in die Analyse einbezogen. Die Sequenzabdeckung durch identifizierte Peptide betrug zufriedenstellende 95% der RRSP-Primärstruktur. Als Kandidaten des aktiven Zentrums wurden alle Modifikationsstellen in der C2A/C2B-Domäne identifiziert, die als Signifikanzniveau einen

P-Score von $\geq 67^u$ aufweisen und in allen Proben des Triplikates gefunden wurden. Die markierten Positionen der C1 Domäne wurden ausgeschlossen, da die Funktion des N-terminalen Helixbündels bereits als Membrananker beschrieben wurde^{117,161}. In der C2-Domäne wurden 12 Aminosäuren (5 Asp + 7 Glu) als potenzielle Elemente des aktiven Zentrums identifiziert (s. Abbildung 32B). Beispielhaft sind in Abbildung 32C die MS²-Spektren von zwei Peptiden mit den identifizierten Glutamaten E3900 sowie E3930 dargestellt. Diese liegen in relativer Nähe zueinander, in einer Vertiefung zwischen C2A und C2B des vorhergesagten RRSP-Strukturmodells und bilden damit eine mögliche katalytische Dyade (s. Abbildung 33A).

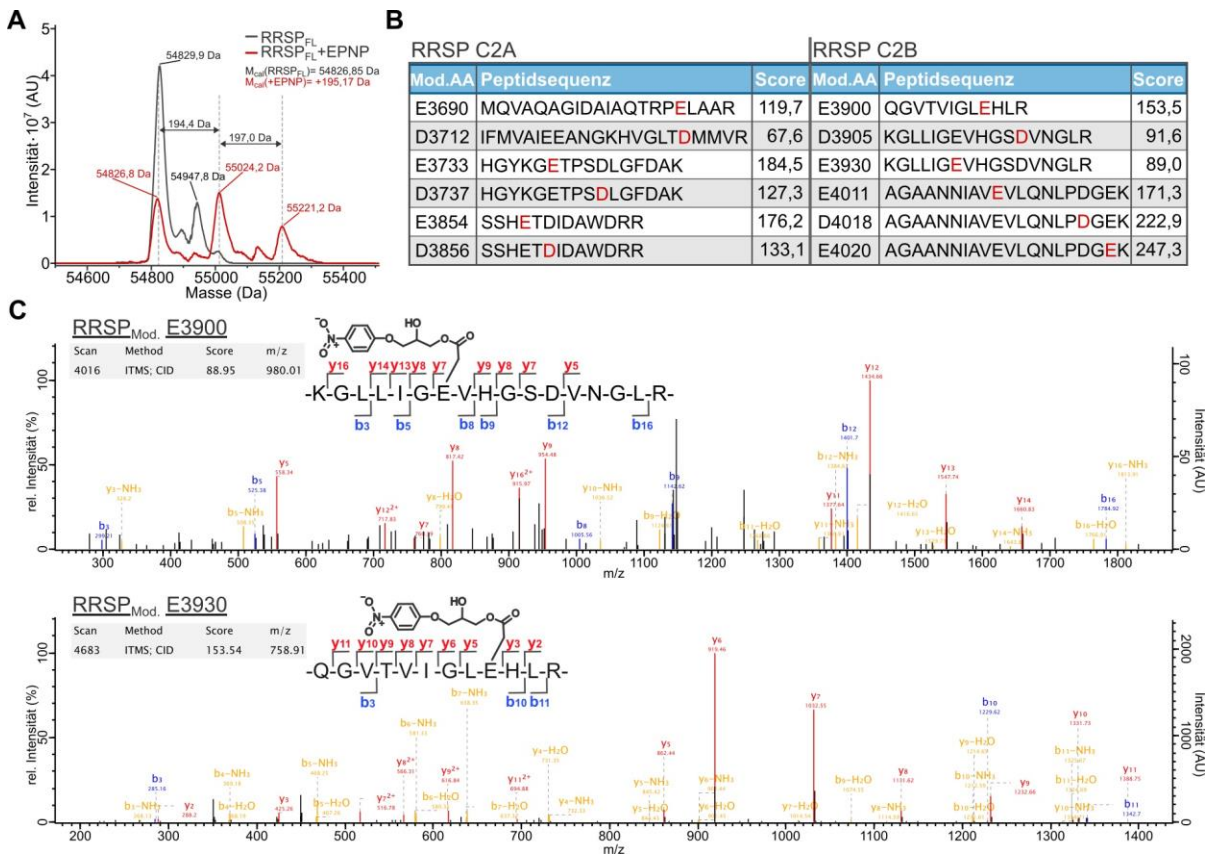


Abbildung 32. Massenspektrometrische Identifikation von nukleophilen Säuregruppen als Kandidaten des aktiven Zentrums von RRSP. **A** Überlagerung der Massenspektren von unmodifiziertem RRSP_{FL} (schwarz) und durch EPNP modifiziertem Enzym (rot). **B** Liste der identifizierten Aminosäuren als Kandidaten des aktiven Zentrums in den RRSP-Domänen C2A und C2B. Die Sequenz der detektierten Peptide ist mit dem jeweiligen P-Score^u angeführt und die modifizierte Position ist rot hervorgehoben. **C** Kollisions-induzierte Dissoziations-(CID) MS²-Spektren von zwei Peptiden mit identifizierten Glutamaten aus B: E3900 (oben) und E3930 (unten) aus der RRSP C2B-Domäne. Alle weiteren MS²-Spektren der identifizierten Reste aus B sind in Abbildung 56 bzw. in Abbildung 57 im Anhang aufgeführt. Rote Peaks: Fragmente der y-Ionenserie; blau Peaks: Fragmente der b-Ionenserie; gelbe Peaks: Fragmente beider Ionenserien, die einen Verlust von 17 Da (-NH₃) oder von 18 Da (-H₂O) des indizierten Ions aufweisen. ITMS: Massenspektrometrie mittels Ionenfallenanalysator (engl. *ion trap mass spectrometry*); m/z: Masse/Ladung Verhältnis.

^u Der P-Score (probability Score) ist ein Maß für die statistische Signifikanz eines Ereignisses, hier MS²-Peaks. Der P-Score ist definiert als $-10 \cdot \log_{10}(P)$, wobei P die absolute Wahrscheinlichkeit darstellt. Ein Signifikanzkriterium von 67 entspricht demnach einer Wahrscheinlichkeit von $p < 0,2 \cdot 10^{-6}$, dass ein Signal zufällig auftritt.

3.5.5. Evaluierung der identifizierten Kandidaten des aktiven Zentrums von RRSP

Die Evaluierung der massenspektrometrisch bestimmten Kandidaten erfolgte durch die Substitution von Aspartaten zu Asparaginen sowie von Glutamaten zu Glutaminen und der nachfolgenden Bestimmung der Spaltungseffizienz von Ras. Mit diesem minimalinvasiven Substitutionsansatz sollte die Anordnung im aktiven Zentrum nach Möglichkeit unverändert bleiben und lediglich das nukleophile Zentrum eliminiert werden (entspricht einer drastischen Verringerung des k_{cat}). Die entsprechenden Mutanten wurden rekombinant in *E. coli* als MBP-Fusionsprotein exprimiert und direkt aus dem geklärten Lysat in einen Spaltungstest mit Ras:GDP als Substrat eingesetzt (s. Abbildung 33B, C). Das Testverfahren ist nicht geeignet für Inkubationszeiten über Nacht, da unspezifische Proteaseaktivität das Ras_{FL} in Teilen oder vollständig degradiert. Der auswertbare, zeitliche Verlauf der Spaltungsreaktion weist lediglich bei den Mutanten E3900Q und E3930Q tatsächlich einen signifikanten Rückgang der Ras-Spaltungsrate (E3900Q) bzw. eine vollständige Inaktivierung (E3930Q) auf. Auch die Doppelmutante E3900Q/E3930Q_{RRSP} zeigt keine detektierbare Aktivität in der gewählten Versuchsanordnung. Keine der getesteten Asp-Seitenketten wich in seiner Spaltungsrate vom RRSP_{WT} ab (s. Abbildung 58).

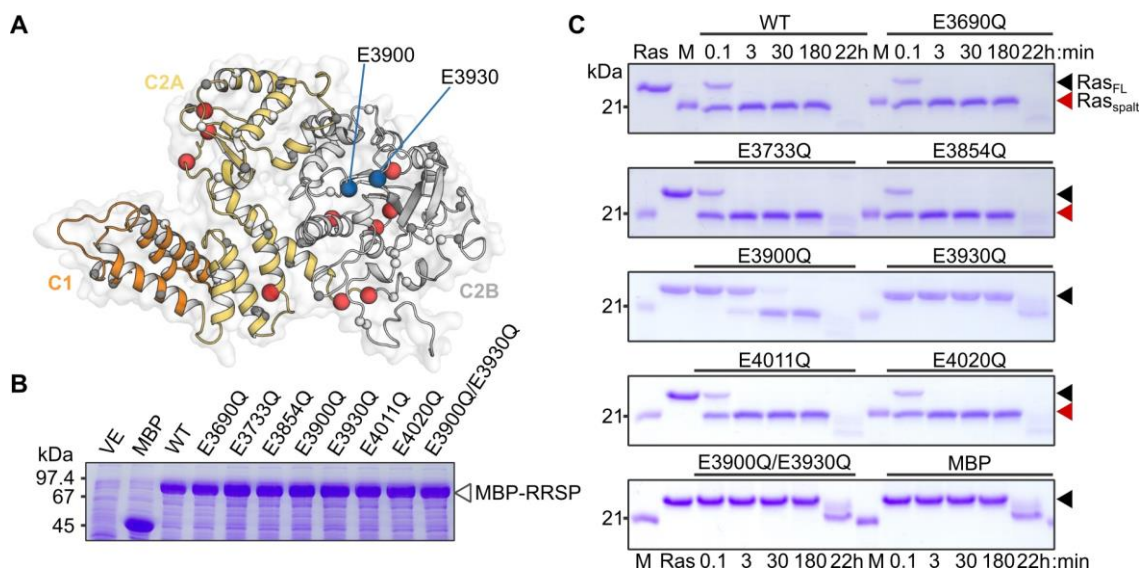


Abbildung 33. Evaluierung der identifizierten RRSP-Glutamat-Mutanten in einem Aktivitätsschnelltest. **A** Lokalisation der identifizierten Glu und Asp-Reste in dem Homologiestrukturmodell, hervorgehoben als rote Kugeln. Blaue Kugel: die Glutamate E3900 und E3930. Die Positionen aller weiteren Säurerestesind als kleine Kugeln hervorgehoben: Glu (grau); Asp (weiß). **B** Expressionsniveau der MBP-RRSP Fusionsproteine aus geklärten *E. coli*-Lysaten, die in Aktivitätsschnelltest eingesetzt wurden. VE: vor Expression. **C** Schnelltest der Proteolyseaktivität von RRSP Mutanten (s. B) an Ras:GDP in einem Gel-Shift-Nachweis. MBP diente als Negativkontrolle. Die Resultate der RRSP-Asp-Mutanten sind im Anhang dargestellt (s. Abbildung 58).

Die Ergebnisse dieses aktivitätsbasierten Schnellverfahrens bestätigen die MS²-Analysen, indem sie mit E3900 sowie E3930 zwei benachbarte Reste als mögliche Dyade der Carboxyl-Endopeptidase identifizieren. Zur weiteren Evaluierung wurden die Mutanten E3900_{RRSP} und

E3930_{RRSP} gereinigt und die katalytische Effizienz in einem Gel-basierten Ras-Spaltungsnachweis densitometrisch quantifiziert. Die Mutante E3900Q_{RRSP} sowie die Doppelmutante E3900Q/E3930Q_{RRSP} zeigten nach langer Inkubationszeit eine minimale Basalaktivität auf, die in der gewählten experimentellen Anordnung nicht quantifizierbar war (s. Abbildung 34A). Um die basale Restaktivität zu bestimmen, wurde die E3930A_{RRSP}-Mutante (4 μ M) halb-stöchiometrisch zum Substrat Ras:GDP (8 μ M) zugesetzt und der Reaktionsverlauf über die Zeit verfolgt (s. Abbildung 34B). Im Vergleich mit der zuvor bestimmten katalytischen Effizienz des RRSP-Wildtyps, reduziert die Substitution von E3900 die Effizienz um das 45-fache und die von E3930 um einen Faktor von ca. $29 \cdot 10^3$ (s. Abbildung 34C). Damit konnte das Glutamat-Paar E3900/E3930 als Dyade des aktiven Zentrums von RRSP eindeutig bestätigt werden.

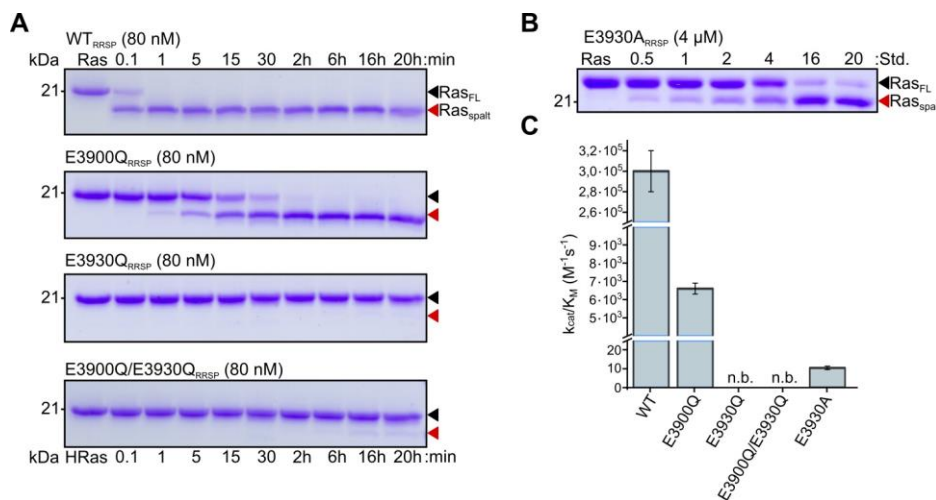


Abbildung 34. Quantifizierung der katalytischen Effizienz von RRSP-Mutanten des aktiven Zentrums. **A** Gel-basierte Ras-Spaltungskinetik von Ras:GDP (8 μ M) und RRSP-EQ-Mutanten (80 nM) im Vergleich zur Wildtyp-Aktivität. **B** Gleiche Anordnung wie in A zur Bestimmung der Basalaktivität von E3930A_{RRSP} (4 μ M). **C** Die katalytische Effizienz aller untersuchten RRSP-Mutanten im Vergleich zum Wildtyp als Balkendiagramm. Die densitometrische Effizienzbestimmung der Mutanten ist im Anhang dargestellt (s. Abbildung 59). n.b.: nicht bestimmt.

Zur weiteren Validierung der RRSP-Aktivität *in vivo* wurden verschiedene RRSP-Varianten in einem Hefetoxizitätstest untersucht¹¹⁷. Dabei wird RRSP über ein Plasmid in Hefezellen eingebracht, bei dem die Expression unter der Kontrolle des GAL1-Promotors steht, der seinerseits über Galaktose als Kohlenstoffquelle induziert wird. Die rekombinante RRSP-Expression führt zum Tod der Hefezellen, wobei inaktive Enzymvarianten ein Wachstumssignal zeigen. Basierend auf den Vorarbeiten von Antic und Kollegen¹¹⁷ und geleitet durch das *in silico*-RRSP-Strukturmodell (s. Abbildung 27) sollte zunächst ein Minimalkonstrukt identifiziert werden, dass vollständige Aktivität aufweist. Zunächst wurde der C-Terminus um 17 Aminosäuren gekürzt (RRSP _{Δ C}), da dieser als flexibler Loop im Modell vorhergesagt und damit als entbehrlich für die proteolytische Aktivität vermutet wurde. In einer weiteren Verkürzung wurde die N-terminale C1-Domäne entfernt (78 Aminosäuren; RRSP _{Δ N1 Δ C}), da diese bereits strukturell und biophysikalisch als membranverankerndes Helixbündel beschrieben wurden, das keinen entscheidenden Beitrag zur Proteaseaktivität leistet¹¹⁷. In einer weiteren N-terminalen

Verkürzung um 21 Aminosäuren wurden die α -Helices $\alpha 4$ und $\alpha 5$ entfernt (RRSP $_{\Delta N2\Delta C}$, s. Abbildung 27A). Ihre Lage als verbrückendes Element zwischen dem C1-Helixbündel und der globulären C2-Domäne ließ eine untergeordnete Rolle in der Substraterkennung bzw. der Katalyse vermuten. Tatsächlich zeigte unter allen Verkürzungen ausschließlich RRSP $_{\Delta N2\Delta C}$ eine Reduktion der Zytotoxizität (s. Abbildung 35A). Das Zellwachstum weist keinen Unterschied zur Vektor-Kontrolle ohne Protease auf. Damit zeigt sich, dass $\alpha 4$ und $\alpha 5$ wichtig für die RRSP-Aktivität sind und RRSP $_{\Delta N1\Delta C}$ (3669-4071 aa) das kleinstmögliche Enzym mit voller Toxizität darstellt. Ebenfalls wurde überprüft, ob das Anbringen einer N-terminalen Kernlokalisationssequenz (NLS) einen Einfluss auf die Toxizität aufweist^v. Hierbei wurde kein Unterschied zur Toxizität von RRSP $_{FL}$ festgestellt.

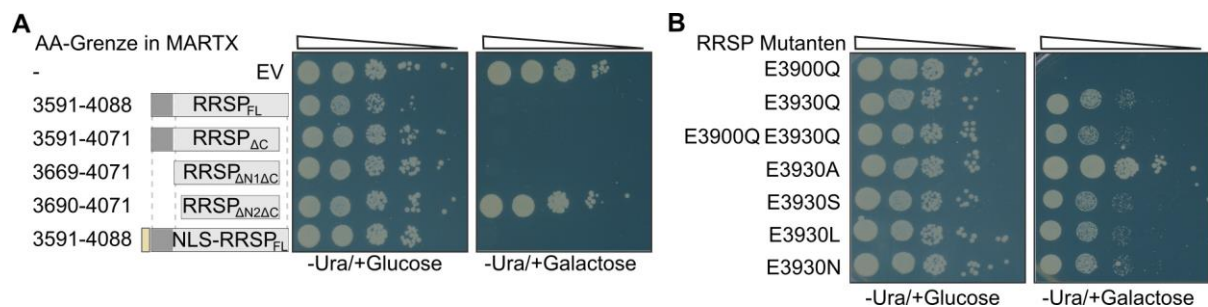


Abbildung 35. Hefe-Toxizitätstest von RRSP-Varianten. **A** Verkürzte RRSP $_{WT}$ -Konstrukte mit Indierten Aminosäuregrenzen. Links: Wachstumskontrolle. Rechts: Galaktose-induzierte RRSP-Expression. Dreieckiger Rahmen: serielle Verdünnungsreihe (10x); EV: Leervektor; NLS: Nukleare Leitsequenz. **B** RRSP-Mutanten des aktiven Zentrums in der gleichen experimentellen Anordnung wie in A.

Die Toxizität von RRSP mit substituierten Resten des katalytischen Zentrums wurde auf die gleiche Weise überprüft. Hierbei wurden neben den EQ-Mutanten (Glutamat zu Glutamin; einschließlich der Doppelmutante E3900/3930Q) eine Permutationsreihe der E3930 Seitenkette von kurzen zu längeren Resten mit steigender Polarität (Ala; Ser; Leu; Asn) analysiert. Dabei weist E3900Q $_{RRSP}$ eine Toxizität vergleichbar zum Wildtyp auf. Die beiden weiteren EQ-Mutanten hingegen zeigen eine stark verringerte Toxizität, auch wenn das Hefewachstum signifikant beeinträchtigt wird (s. Abbildung 35B). Die Permutationsreihe zeigt lediglich bei E3930A $_{RRSP}$ ein Zellwachstum vergleichbar zur Wachstumskontrolle oder dem Leervektor auf. Dies lässt vermuten, dass E3930A $_{RRSP}$ die geringste Spaltungsrate von allen überprüften Mutanten aufweist. Alle weiteren Substitutionen weisen einen Phänotyp vergleichbar zu den EQ-Mutanten auf. Die zuvor bestimmte Ras:GDP-Substrataffinität von RRSP $_{WT}$ liegt bei ca. 90 μ M und ist damit für die Isolation eines nichtkovalenten Enzym-Substrat-Komplexes nicht geeignet. Die Affinität zum Substrat kann sich durch Substitutionen im katalytischen Zentrum

^v Mit einer NLS ausgestattet, wäre RRSP in einem funktionellen Y2H-Interaktionsexperiment als Störgröße einsetzbar, bei dem der Einfluss der Proteolyse auf verschiedene Ras-Interaktionspartner *in vivo* studiert werden könnte, da die Protein-Protein-Bindung im Zellkern stattfindet.

ändern. Ob sich die Affinität der E3930_{RRSP}-Mutanten für Ras:GDP erhöht, wurde mittels analytischer Größenausschlusschromatographie untersucht. Hierzu wurden je 100 µM beider Proteine bei 15°C inkubiert und anschließend 50 µL injiziert.

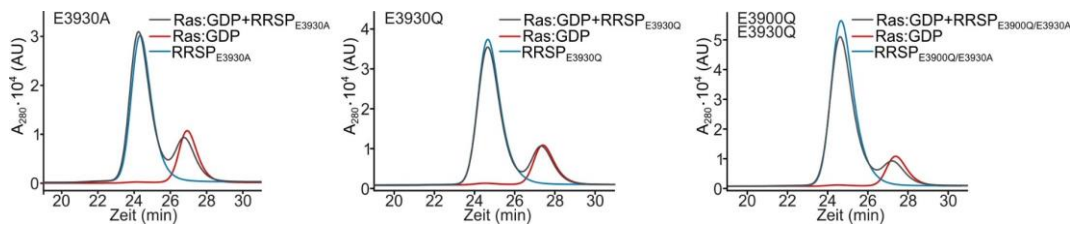


Abbildung 36. Evaluierung der Komplexbildung zwischen Ras:GDP (100 µM) und RRSP E3930-Mutanten (100 µM) über eine analytische Größenausschlusschromatographie. Als Signal wurde die Absorption bei 280 nm detektiert. Nach einstündiger Inkubation bei 15°C in SEC-Puffer (ergänzt um 10 µM GDP) wurden 50 µL des Proteingemisches injiziert.

Bei einer signifikanten mutationsvermittelten Affinitätserhöhung, sollte eine Komplexbildung in Form einer Retentionsverschiebung beider Signale zu kürzeren Zeiten detektiert werden. Keine der getesteten Mutanten zeigte allerdings eine solche Verschiebung (s. Abbildung 36). Damit ist es mit der beschriebenen Strategie unwahrscheinlich, einen nicht-kovalenten Komplex zwischen Ras und RRSP für die strukturelle Charakterisierung der Protein-Protein-Interaktionsfläche zu isolieren.

3.6. Auswirkungen der proteolytischen Modifikation kleiner GTPasen

Die proteinbiochemischen Konsequenzen der proteolytischen Spaltung in der *switch I*-Region kleiner GTPasen wurden im Folgenden näher untersucht. Dabei standen drei Aspekte im Vordergrund. Zum einen wurden die Auswirkungen auf die Stabilität sowie Integrität nach der Spaltung analysiert, zum anderen die Konsequenzen auf die Nukleotidaffinität betrachtet. Abschließend wurden die Auswirkungen auf die Effektorbindung am Beispiel der Rab32:GppNHp Interaktion mit VARP-ANKRD1 qualitativ überprüft.

3.6.1. Konsequenzen für die proteinchemischen Eigenschaften kleiner GTPasen

Weder Rab32, noch Ras bildeten Präzipitate nach quantitativer, proteolytischer Spaltung. Die proteolytische Modifikation scheint die Stabilität der GTPasen nur in geringem Maße zu beeinflussen. Dies legt die Vermutung nahe, dass beide GTPasen möglicherweise weiterhin als globuläre und funktionelle Proteine vorliegen. Diese Hypothese wurde zunächst durch die vergleichende Analyse der GDP-gebundenen GTPasen in der unmodifizierten und der gespaltenen Form mittels Größenausschlusschromatographie überprüft. Dabei konnte kein Unterschied im Retentionsverhalten zwischen den unmodifizierten und den gespaltenen GTPasen festgestellt werden (s. Abbildung 37A, B). Die modifizierten GTPasen verhalten sich dem-

nach weiterhin wie monodisperse, globuläre Proteine. Der Einfluss der Spaltung auf die Proteinstabilität wurde durch die Bestimmung der Schmelztemperatur (T_m) mit zwei komplementären thermischen Entfaltungsexperimenten analysiert. Zum einen wurde durch die *Differential Scanning Fluorimetry* (DSF, auch *Thermal shift assay*) der Schmelzpunkt ($T_{m,DSF}$) über ein Fluoreszenzsignal indirekt bestimmt. Zum anderen wurde die Änderung der Elliptizität als Maß für die Entfaltung als direkter Signalgeber in der Zirkulardichroismus (CD)-Spektroskopie genutzt ($T_{m,CD}$; s. Abbildung 37C-F). In allen Analysen zeigen die modifizierten GTPasen einen reduzierten T_m . Sowohl Ras als auch Rab32 weisen durch die Spaltung einen $\Delta T_{m,DSF}$ ca. 5°C auf, was einer signifikant verringerten Stabilität entspricht (s. Abbildung 37C, D). Beim Vergleich zwischen den Bestimmungsmethoden zeigt die CD-Spektroskopie eine größere Schmelzpunktdifferenz ($\Delta T_{m,CD}$) für beide GTPasen zwischen 8 und 9°C. Diese Differenz basiert im Wesentlichen auf den ermittelten Schmelztemperaturen der gespaltenen GTPasen, die bei der CD-Analyse um 3-6°C geringer ausfällt als bei den DSF Experimenten.

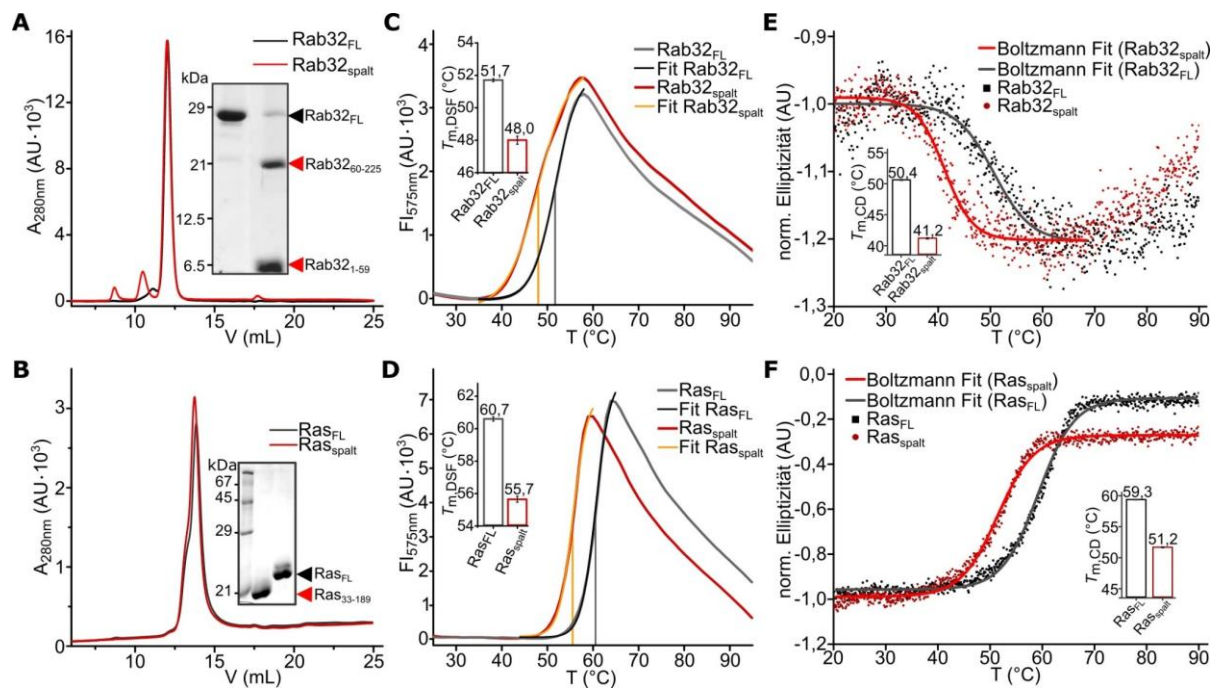


Abbildung 37. Proteinbiochemische Konsequenzen der *switch I*-Spaltung von Ras und Rab32.

A Analytische Gelfiltration von unmodifiziertem Rab32 (schwarz, Rab32_{FL}) sowie gespaltenem Rab32 (rot, Rab32_{spalt}). Einsatz: Coomassie gefärbte SDS-PAGE von Rab32_{FL} und Rab32_{spalt}. **B** Selbe experimentelle Anordnung für Ras_{FL} und Ras_{spalt}, zur Bestimmung der Dispersität wie in A. **C** Thermische Entfaltungskurven von Rab32_{FL} und Rab32_{spalt} in einem Differential Scanning Fluorimetry (DSF) Experiment. Die jeweiligen Schmelzpunkte ($T_{m,DSF}$) wurden über die Anpassung einer Boltzmann-Funktion ermittelt und stellen den Mittelwert aus drei unabhängigen Experimenten dar. **D** Selbe experimentelle Anordnung bei Ras_{FL} und Ras_{spalt}, zur Bestimmung von $T_{m,DSF}$ wie in C. **E** Bestimmung thermischer Entfaltungskurven von Rab32_{FL} und Rab32_{spalt} über Zirkulardichroismus (CD)-Spektroskopie. Die jeweiligen Schmelzpunkte ($T_{m,CD}$) wurden über die Anpassung einer Boltzmann Funktion ermittelt und stellen den Mittelwert aus zwei unabhängigen Experimenten dar. **F** Selbe experimentelle Anordnung bei Ras_{FL} und Ras_{spalt}, zur Bestimmung von $T_{m,CD}$ wie in E.

Der T_m unmodifizierter GTPasen liefert übereinstimmende Ergebnisse für das jeweilige Protein. Der verwendete Fluoreszenzfarbstoff (Sypro Orange, Sigma) ist möglicherweise weniger

sensitiv als die CD-Analyse in Bezug auf die Proteolyse-vermittelten Unterschiede und damit weniger aussagekräftig. Eine Schmelzpunktverschiebung um 8-9°C stellt eine deutliche Destabilisierung der GTPasen dar. Gleichzeitig scheint die Verringerung der thermischen Stabilität keinen entscheidenden Einfluss auf die Proteinintegrität zu besitzen.

3.6.2. Konsequenzen der proteolytischen Spaltung für die Nukleotidaffinität

Die Bindung von G-Nukleotiden ist ein wesentliches Merkmal von GTPasen, wobei die Affinität sowohl für GTP als auch GDP im subnanomolaren Bereich liegt²². Die proteolytische Spaltung in der *switch I*-Region könnte sich auch auf die Affinität des gebundenen Nukleotids auswirken. Um erste Einblicke in mögliche Änderungen der Nukleotidaffinität zu erhalten, wurden Mant-Fluoreszenz basierte Nukleotidaustauschreaktionen *in vitro* beobachtet. Hierzu wurde die jeweilige GTPase mit Mant-GDP beladen und der Austausch durch einen hohen GDP-Überschuss in der Quarzküvette gestartet (s. Abbildung 38A-B, D-E). Als Kontrolle diente ein Experiment ohne weitere Nukleotidzugabe. Als Korrektur wurde die Rate der Signalreduktion aus der Kontrolle von der Rate der Austauschexperimente abgezogen und die erhaltene Kurve an eine einfachexponentielle Funktion angepasst (s. Abbildung 38C, F).

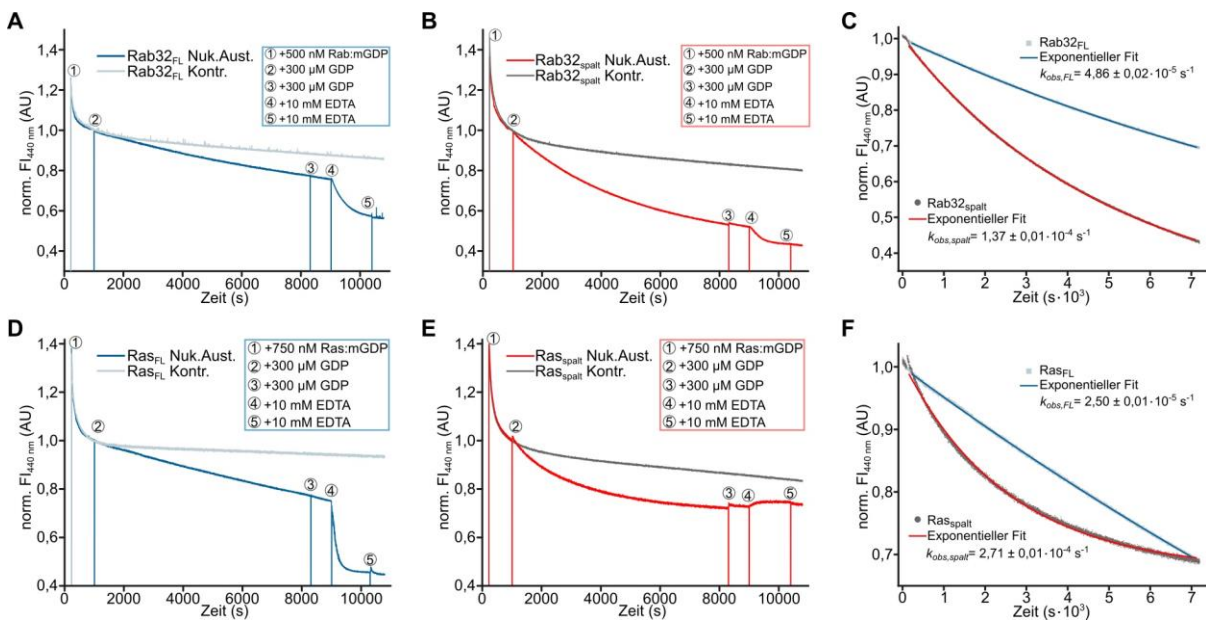


Abbildung 38. GDP-Dissoziationsgeschwindigkeit bei unmodifizierten und gespaltenen kleinen GTPasen. **A** Fluoreszenzbasierte Nukleotidaustauschreaktion von unmodifiziertem Rab32_{FL}:mGDP durch Zugabe von hohem GDP-Überschuss. **B** Nukleotidaustausch von gespaltenem Rab32_{spalt}:mGDP wie in A. **C** Bestimmung der Nukleotid-Dissoziationsraten (k_{off}) von gespaltenem ($k_{obs,spalt}$, rot) und unmodifiziertem Rab32 ($k_{obs,FL}$, blau). Die Kurven wurden vor der Anpassung an eine einfachexponentielle Kurve um die basale Signalabnahmerate der Kontrolllexperimente aus A bzw. B korrigiert. **D-E** Gleiche experimentelle Anordnung wie in A für unmodifiziertes bzw. gespaltenes Ras. **F** Bestimmung von k_{off} für unmodifiziertes bzw. gespaltenes Ras wie unter C beschrieben. Die Korrektur der Signalabfallraten erfolgt mit den bestimmten Raten aus D bzw. E.

Die erhaltenen Dissoziationsraten (k_{off}) zeigen einen 35-fach schnelleren GDP-Austausch für das gespaltenes Rab32 sowie eine 9-fach beschleunigte Rate des gespaltenen Ras, jeweils

im Vergleich zu den unmodifizierten Proteinen. Der etwa 4-fach größere Beschleunigungseffekt bei Rab32 verglichen mit der Differenz der Austauschrate in Ras setzt sich einerseits aus einem 2-fach langsameren Signalabfall für das unmodifizierte Rab32 und zum anderen durch eine doppelt so schnelle Nukleotidfreisetzung von gespaltenem Rab32 zusammen. Diese Ergebnisse deuten in beiden GTPasen auf eine signifikante Spaltungs-vermittelte Verminderung der Nukleotidaffinität hin, wobei der Effekt bei Rab32 deutlich ausgeprägter ist. Abschließend lassen sich diese Ergebnisse erst mit Kenntnis der Nukleotid-Assoziationsraten (k_{on}) beurteilen, da auch eine erhöhte Nukleotidfluktuation bei gleichbleibender Affinität möglich erscheint.

3.6.3. Auswirkungen auf die Interaktion mit Bindepartnern

Als ein erstes Beispiel funktioneller Konsequenzen der proteolytischen Modifikation kleiner GTPasen auf die Protein-Protein-Interaktion mit Effektoren wurde die Wechselwirkung zwischen Rab32:GppNHp und der Ankyrinwiederholungsdomäne 1 von VARP (VARP-ANK1) untersucht. Der berichtete K_D dieser Interaktion beträgt 2 μ M und der Komplex konnte bereits mittels SEC nachgewiesen werden⁵⁸. Zunächst wurde Rab32:GDP durch GtgE gespalten und nachfolgend über einen Nukleotidaustausch mit GppNHp beladen. Als Referenz diente das unmodifizierte Rab32:GppNHp.

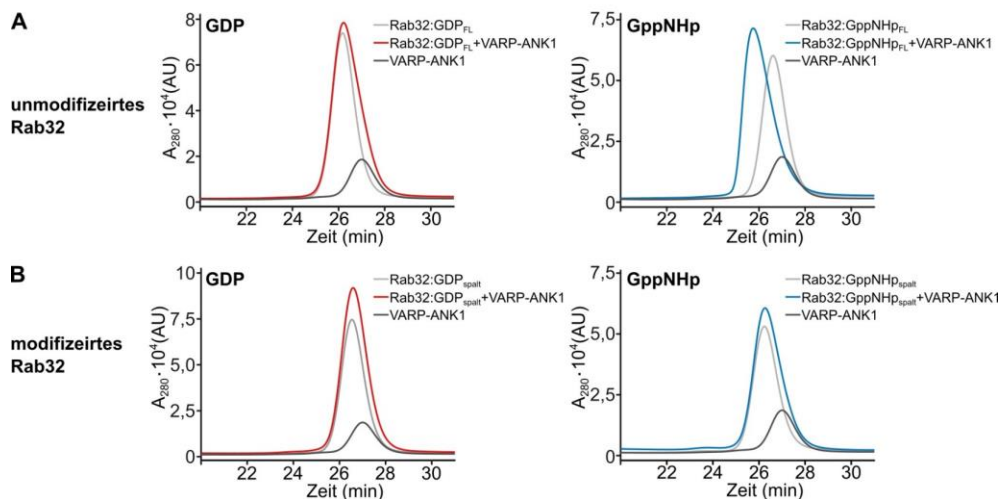


Abbildung 39. Komplexbildung zwischen Rab32 und der VARP-ANK1 Domäne mittels analytischer Gelfiltration. **A** Unmodifiziertes Rab32 (Rab32_{FL}, 50 μ M) wurde präparativ mit GDP (98%) oder GppNHp (90%) beladen und für die Komplexbildung mit je 50 μ M VARP-ANK1 1 h bei 15°C equilibriert. Nachfolgend wurden 50 μ L auf einer Superdex75 10/30 chromatographisch getrennt. Als Referenz dienen die Einzelläufe der Monomere. **B** Komplexbildung zwischen gespaltenem Rab32 und VARP-ANK1 wie in A beschrieben. Die geringere VARP-ANK1 Signalamplitude im Vergleich zu Rab32 liegt an den ungleichen Extinktionskoeffizienten bei 280 nm.

Beide Proben wurden jeweils mit äquimolaren Mengen VARP-ANK1 versetzt (je 50 μ M) und die Komplexbildung mittels analytischer Größenaufschlusschromatographie untersucht (s. Abbildung 39). Im Vergleich zu den Einzelkomponenten zeigt das unmodifizierte

Rab32:GppNHp eine deutliche Änderung der Retentionszeit im Komplex mit VARP-ANK1. Der Ansatz mit gespaltenem Rab32:GppNHp lieferte keine veränderte Retentionszeit bei der Inkubation mit VARP-ANK1. Diese Ergebnisse legen nahe, dass die Affinität zwischen aktivem Rab32 und der Ankyrin Wiederholungsdomäne von VARP durch die proteolytische Modifikation deutlich verringert wird. Keine Änderungen wurden bei den als Negativkontrolle durchgeführten Experimente mit inaktivem Rab32:GDP (jeweils in beiden Modifikationszuständen) zusammen mit VARP-ANK1. Hierbei wurde in keinem Fall eine Komplexbildung erwartet (s. Abbildung 39).

4. Diskussion

Die Ergebnisse dieser Arbeit werden nachfolgend in den Kontext der Literatur eingeordnet und diskutiert. Die Funktion von GtgE und dessen Präferenz für inaktive Rab-Substrate werden im Zusammenhang der Salmonelleninfektion ebenso betrachtet wie molekulare Aspekte der Rab-Erkennung. Weitergehend werden die funktionellen Konsequenzen der proteolytischen Modifikation kleiner GTPasen diskutiert. Nach der Klassifizierung von RRSP als Glutamatprotease neuen Typs und der Postulierung eines Katalysemechanismus für die RASpaltung, erfolgt abschließend eine enzymatische Einordnung der beiden untersuchten Proteasen.

4.1. Funktion von GtgE und SopD2 im Kontext der Salmonellose

Während der Invasion von *S. Typhimurium* in die Wirtszelle, wird GtgE gemeinsam mit weiteren SPI-1 Effektoren bereits vor der Etablierung einer Pathogen enthaltenden Vakuole (PCV) sekretiert. Die Beobachtung, dass die Protease in *in vitro* Experimenten an ihrem C-Terminus (C225) durch humane Prenyltransferasen lipidiert wird, legt den Schluss nahe, dass GtgE membranassoziiert in der Wirtszelle vorliegt (s. Abschnitt 3.3.). Die gleiche Modifikationsstrategie wird von dem SPI-2-Salmonelleneffektor SifA für die Membranassoziation an die SCV genutzt. Für eine höhere Membranaffinität wird SifA darüber hinaus in humanen Zellen C-terminal S-palmitoyliert¹²¹. Eine ähnliche Konstellation im Fall von GtgE ist aufgrund fehlender Cysteine (neben dem C225 des CaaX-Motivs) in der Primärstruktur beider Termini nicht wahrscheinlich. Ob die Farnesylierung oder die Geranylgeranylierung physiologisch bedeutender ist, kann hierbei nicht bewertet werden, da ausschließlich Experimente *in vitro* durchgeführt wurden. Ebenfalls offen bleibt die Frage, ob GtgE über einen gerichteten Mechanismus an ein spezifisches Kompartiment lokalisiert (an dem auch Rab32 gebunden ist) oder ob es unspezifisch mit einer Vielzahl von Membranen assoziiert und auf diesem Wege seine Substrate erreicht. Die verfolgten Strategien zum Lokalisationsnachweis waren im Salmonelleninfektionsmodell nicht ausreichend sensitiv in Bezug auf die Visualisierung von GtgE (s. Abschnitt 3.4.). Entscheidend für weitere Infektionsstudien wäre daher, die Etablierung von ausreichend sensitiven sowie selektiven GtgE-Nachweisverfahren, beispielsweise mit einem repetitiven FLAG-Peptid (3-fache Sequenzwiederholung), als Alternative zum Myc-Epitop-tag.

Die beobachtete, strikte selektive Erkennung von inaktiven RabGTPasen durch GtgE ist in zweifacher Hinsicht ungewöhnlich. Zum einen zeigen bakterielle Effektoren meist keine oder nur eine sehr eingeschränkte Abhängigkeit vom Nukleotidbeladungszustand ihrer GTPase-Substrate^{96,97,202}. Zum anderen selektieren bakterielle Proteine, von denen eine Präferenz bekannt ist, tendenziell aktive GTPasen¹⁰². Ein bakterieller Effektor, der ausschließlich auf inaktive RabGTPasen zielt und diese kovalent modifiziert, ist bisher nicht beschrieben. Die

einzigsten humanen Proteine, die ausschließlich mit GDP-beladenen RabGTPasen interagieren, sind das *Rab escort protein* (REP) sowie GDI (s. Abschnitt 1.1.3.). Die beiden strukturverwandten Regulationsfaktoren binden inaktive prenylierte Rabs mit nanomolarer Affinität und sind an deren Prenylierung (REP) bzw. dem Membranzyklus (GDI) beteiligt^{41,203}. Obwohl beide Komplexe von Rab-Proteinen mit GDI bzw. REP strukturell umfassend untersucht wurden, konnte die molekulare Basis der nukleotidvermittelten Selektion nicht abschließend geklärt werden und scheint auf einer Kombination von mehreren molekularen Erkennungsschritten zu basieren^{42,204,205}. Der molekulare Selektionsmechanismus durch GtgE ist ebenfalls multifaktorieller Natur. Die durchgeführten strukturellen und molekulardynamischen Analysen identifizierten die F88_R-Position in der regulatorischen *switch II*-Region als wichtiges Element der Diskriminierung, was im Rahmen dieser Arbeit mit Experimenten *in vitro* bestätigt werden konnte (s. Abbildung 21). Allerdings müssen neben der F88_R-Seitenkette weitere Faktoren involviert sein, da durch die Entfernung des Phenylrings die Diskriminierung zwar aufgebrochen, aber nicht vollständig aufgelöst wird.

Die Sekretion von SopD2 als weiteren Salmonelleneffektor, der u.a. eine GAP-Aktivität gegenüber Rab32 zeigt, stellt die Frage nach dem Nutzen für das Bakterium: Was ist der Vorteil daran, eine Rab-Protease für inaktive Rab-Proteine zu wählen, die abhängig von einem anderen Protein ist? Effektiver wäre die Selektion einer Protease, die unabhängig vom Nukleotidbeladungszustand seine Rab-Substrate modifizieren würde, wie bspw. RRSP im Fall von Ras (s. Abbildung 28), zumal inaktive Rabs mehrheitlich im Zytosol als Komplex mit GDI vorliegen. Bedenkt man eine mögliche Membranassoziiierung von GtgE, erscheint es unwahrscheinlich, dass GtgE unter diesen Umständen überhaupt in Kontakt mit seinen Substraten kommt. Da sowohl die Protease als auch GDI um eine ähnliche Bindestelle an Rab konkurrieren (s. Abbildung 19), wird die relativ hohe Substrataffinität von GtgE ($K_D(\text{Rab32:GDP:GtgE}_{C45A}) = 0,1 \mu\text{M}$) nicht ausreichen, um prenyliertes Rab kompetitiv aus der Bindung mit GDI zu lösen ($K_D(\text{Rab:GDP:GDI}) = 4\text{-}10 \text{ nM}$). Andererseits liegen membran-gebundene RabGTPasen nach der Rekrutierung durch GEFs im aktiven, GTP-gebundenen Zustand vor und stellen damit ebenfalls keine Substrate für GtgE dar. Die Rolle von SopD2 könnte vor allem sein, das Problem der Substratzugänglichkeit für GtgE zu lösen. Daher wäre folgender Ablauf an der Membran denkbar: Nach der BLOC-3-GEF-vermittelten Aktivierung und Membranrekrutierung von Rab32 aus dem zytosolischen GDI-Komplex, wird das Rab-Protein durch eine schnelle Abfolge enzymatischer Reaktionen inaktiviert (s. Abbildung 40). Dabei überführt SopD2 die RabGTPase durch Abspaltung des γ -Phosphates in einen inaktiven, membrangebundenen Zustand. Schließlich ist Rab32:GDP für GtgE als Substrat zugänglich und wird effizient an der Membran proteolytisch gespalten. Diese Kooperation zweier Effektoren scheint der womöglich effizienteste Weg zu einer quantitativen Rab32-Proteolyse - und damit einer irreversiblen Inaktivierung der GTPase für das Bakterium - zu sein. Dieses koordinierte Vorgehen lässt einige Spekulationen über die zugrundeliegende Invasionsstrategie von Salmonella zu. Zunächst erscheint es nicht sehr effizient, eine Protease

(SPI-1 Effektor) zu einem frühen Zeitpunkt der Invasion zu sekretieren, wenn der benötigte Kooperationspartner SopD2 (SPI-2 Effektor) zu einem deutlich späteren Zeitpunkt in die Zelle gelangt. Bis zur Einführung des *Salmonella*-GAP hätte GtgE aus den oben genannten Gründen keine funktionelle Rolle in der Zelle. Die Spaltung von inaktivem Rab32, das bspw. durch das humane GAP RuTBC1 generiert würde, spielt wahrscheinlich keine entscheidende Rolle, da sowohl BLOC-3 als auch RuTBC1 um die Bindung an aktives Rab9 konkurrieren. Solange BLOC-3 aktiv ist kann Rab32 demnach nicht durch RuTBC1 inaktiviert werden^{69,70}. In dieser Situation würde GtgE zunächst durch die Prenylierungsmaschinerie der Zelle modifiziert und an seine Zielmembran binden (möglicherweise direkt an der SCV). Erst in einem späteren Stadium wird durch das eingeführte SopD2 der Startschuss für eine effiziente, irreversible Rab32-Inaktivierung gegeben, um bestimmte Membranfusionen oder Protein-Protein-Interaktionen (z.B. im endo-lysosomalen Abbauweg) zu unterbinden. Diese Reihenfolge stellt sicher, dass sich Rab32:GDP nicht an der Membran bilden kann, bevor genügend (membran-gebundenes) GtgE vorhanden ist. Dadurch kann inaktives Rab32 sofort umgesetzt werden, bevor es von GDI abgeschirmt werden kann. Mögliche Ziele der Rab32-Modifikation sind vor allem die bisher beschriebenen Wechselwirkungen mit VARP oder Myosin Vc^{55,58}. Da SopD2 nicht nur als promiskuitives GAP weitere RabGTPasen inaktiviert, sondern auch an weiteren zellulären Prozessen involviert ist, muss die GtgE-Aktivität als Teil eines koordinierten SopD2-vermittelten Etappenwechsels im Salmonelleninfektionszyklus begriffen werden^{148-150,152}.

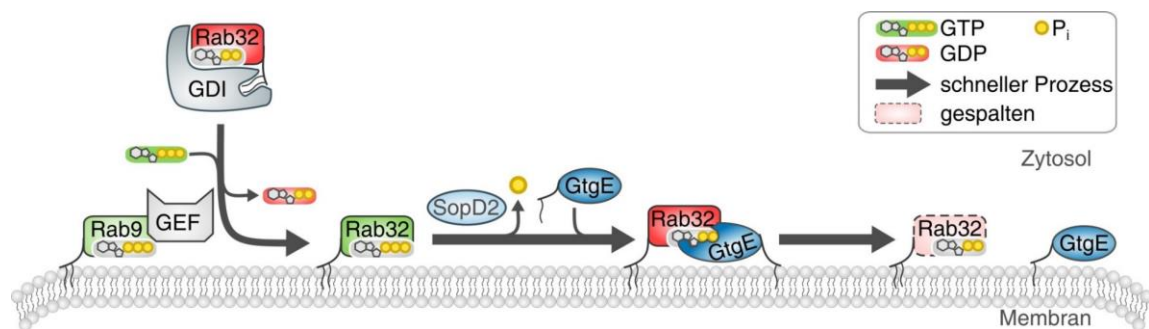


Abbildung 40. Mechanistisches Modell der sequenziellen Rab32-Inaktivierung durch die *Salmonella*-Effektoren SopD2 und GtgE an der Membran. Dabei ist die GtgE-vermittelte Rab32 Spaltung abhängig von der SopD2 GAP-Aktivität und ermöglicht in kooperativer Weise die effiziente Modifizierung im *switch 1*. Zunächst erfolgt die Rekrutierung von aktivem Rab32 über das entsprechende GEF (BLOC-3; welches durch aktives Rab9 rekrutiert wird) an die Membran. Danach wird das GTP-beladene Rab32 schnell durch SopD2 in den inaktiven GDP-Zustand überführt. Schließlich wird Rab32:GDP schnell durch GtgE gespalten. GEF: Guanin-Nukleotid-Austauschfaktor; GDI: GDP-Dissoziationsinhibitor.

Die humanspezifischen Salmonellenstämme *S. Typhi* oder *S. Paratyphi* tragen im Gegensatz zu *S. Typhimurium* zwar kein GtgE-kodierendes Gen, allerdings sekretieren alle Serovaren SopD2. Daher ist anzunehmen, dass SopD2 weitere wichtige Funktionen in typhoidalen Serovaren spielt. Da die molekulare Grundlage unterschiedlicher Wirtsspektren zwischen den genannten Serovaren nach wie vor ungeklärt ist, wird vermutet, dass Unterschiede in der

Komposition sekretierter Effektoren eine entscheidende Rolle bei der Kolonisierung der Wirtszelle spielen. In diesem Zusammenhang wurde auch GtgE als möglicher Faktor diskutiert^{206,207}.

4.2. Die molekulare Rab-Substraterkennung durch GtgE

Neben Faktoren der spezifischen Diskriminierung des Rab-Aktivitätszustandes ist auch die molekulare Selektion der Rab32-Unterfamilie von Interesse. Der strukturell über den Rab:GtgE-Komplex aufgeklärte Bindemechanismus von GtgE über drei Stachel-ähnliche Fortsätze (auch Spikes) als zentrale Interaktionsplattformen konnte biochemisch bestätigt werden (s. Abbildung 18, 20). Allerdings lässt diese kristallographische Momentaufnahme keine unmittelbaren Rückschlüsse auf die Signifikanz der einzelnen Interaktion für die Rab32-Spezifität zu. Die Hefe-basierten Interaktionsstudien mit Ala-Mutanten der *switch*-Region identifizierten lediglich solche Positionen als wichtig für die Bindung, die in nahezu allen Rab-GTPasen streng konserviert sind. Dies zeigt lediglich die hohe Spezifität von GtgE für Rab-Proteine im Allgemeinen (s. Abbildung 20). Die Analysen mit Rab23/32-Chimären grenzen den für die Rab32-Spezifität entscheidenden Bereich auf den Sequenzabschnitt zwischen den *switch*-Regionen einschließlich dem *Interswitch* ein. Gleichzeitig wird deutlich, dass ein wichtiges Element der Selektion zwischen V75-G89_{R32} (β 3 sowie Teile des *switch II*) lokalisiert ist (s. Abbildung 22). Eine fokussierte Mutationsanalyse, bei der mit GtgE interagierende nicht-konservierte Reste aus Rab32, an den homologen Positionen in Rab23 eingeführt wurden, zeigt, dass nicht nur die direkten Kontakte zwischen Rab32 und GtgE, sondern auch Rab32-spezifische, intramolekulare Interaktionen wesentlich für die Diskriminierung sind. In diesem Zusammenhang führt die Analyse der I82_{R32}-Position (nahezu exklusiv in der Rab32-Unterfamilie vorhanden) zu einem postulierten getriebeartigen Zahnradmechanismus zwischen drei Resten im *switch II* von Rab32 (s. Abbildung 23). Diese Anordnung, bestehend aus E86_{R32}, I82_{R32} sowie Y95_{R32}, scheint entscheidend an der Neuordnung des *switch II* für eine produktive Bindung an GtgE beteiligt zu sein. Allerdings ließ sich dieses Ergebnis nicht auf die Situation in Rab23 übertragen, da die T65I_{R23}-Mutante nicht durch GtgE umgesetzt werden konnte (s. Abbildung 53). Eine kombinierte Mutationsstrategie aus den bisherigen Erkenntnissen über die Bedeutung von inter- und intramolekularen Interaktionen von Rab32 könnte die Frage nach der Substratspezifität von GtgE für die Rab32-Unterfamilie abschließend klären. Ein vergleichbarer Selektionsmechanismus ist in der Literatur bisher auf molekularer Ebene nicht beschrieben.

4.3. Funktionelle Auswirkungen der Spaltung kleiner GTPasen

Als Auswirkung der *switch I*-Spaltung in kleinen GTPasen wurde eine signifikante Reduktion der thermischen Stabilität um 4-9°C beobachtet (s. Abbildung 37). Allerdings liegen sowohl Ras als auch Rab32 nach der Modifikation durch RRSP bzw. GtgE als monomere, globuläre Proteine vor, die möglicherweise weiterhin in der Lage sind, produktive Protein-Protein-Interaktionen auszubilden. Im Fall von Rab32 und Rab29 ist bekannt, dass sie während der Infektion mit *S. Typhimurium* nicht an der SCV akkumuliert, sondern über einen offensichtlich effizienten Mechanismus von der Membran entfernt werden^{53,85}. Hierbei kommen zwei Wege in Frage: Der eine führt über eine GDI-vermittelte Membranextraktion wie bei unmodifizierten Rabs und der andere über den Ubiquitin-vermittelten proteasomalen Abbau. Eine Komplexbildung mit GDI scheint möglich, da der *switch I*-Loop keine entscheidenden Wechselwirkungen in der Interaktionsgrenzfläche beider Proteine ausbildet (s. Abbildung 19). Für den Abbauweg spricht, dass die GTPase zwei neue Termini aufweist, die sie als beschädigtes Protein in der zellulären Qualitätskontrolle kennzeichnen. Möglicherweise laufen beide Prozesse parallel zueinander ab. Dass Rab32 aus einem hypothetischen GDI-Komplex (Rab32_{spalt}:GDP:GDI) durch ein GEF (z.B. BLOC-3) an die Membran rekrutiert und dabei aktiviert werden könnte, erscheint dagegen unwahrscheinlich. Auch wenn bisher keine Komplexstruktur aus BLOC-3 mit einem Rab beschreiben wurde, erlaubt eine entsprechende Struktur des homologen Heterodimers aus Hefe (Mon1/Ccz1) mit dem Rab7 Hefehomolog Ypt7 Einsichten in die Anordnung der BLOC-3-Bindung an Rab²⁰⁸.

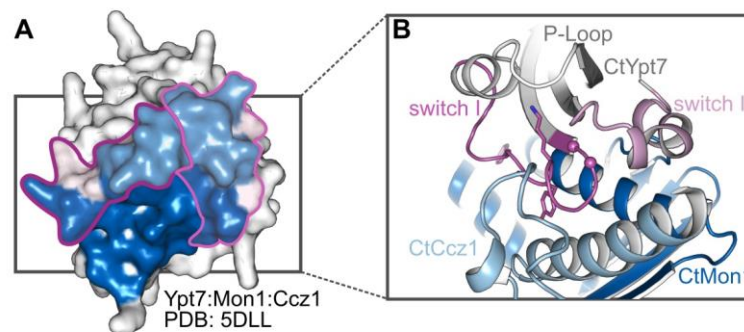


Abbildung 41. Struktur von Ypt7 im Komplex mit dem Heterodimer Mon1/Ccz1 aus *Chaetomium thermophilum* (Ct)²⁰⁸. **A** Die projizierten Interaktionsgrenzflächen von Mon1/Ccz1 (blau/hellblau) auf der Ypt7-Oberfläche (PDB Zugangsnummer 5LDD). Hervorgehoben sind die Konturen der Schaltregionen auf der Oberfläche (*switch I*, magenta; *switch II*, rosa). **B** Ausschnitt des Interaktionsbereichs zwischen CtYpt7 und den einzelnen Proteinen des GEFs als Bänderdarstellung. Färbung entspricht der Legende aus A. Magenta Kugeln: homologe Positionen der GtgE-Spaltstelle in Rab32. Stabmodell: signifikante, konservierte Reste aus dem *switch I*, die an dem GEF-vermittelten Nukleotidaustauschmechanismus entscheidend beteiligt sind. Die Struktur dient als Homologiemodell zur BLOC-3-vermittelten Rab32-Aktivierung, da ein ähnlicher Bindungsmodus vermutet wird.

Hierbei wird deutlich, dass der *switch I* wesentlich an dem Nukleotidaustauschmechanismus über drei konservierte Reste beteiligt ist (s. Abbildung 41). Da diese in der Nähe zur Spaltstelle in Rab32 lokalisiert sind und als essenzielle Ankerpunkte für BLOC-3 dienen, würde die

Modifikation von *switch I* zu einer gravierenden Destabilisierung der Interaktion zwischen Rab und GEF führen²⁰⁸. Eine experimentelle Überprüfung dieser Hypothesen ist bisher durch die präparative Zugänglichkeit zu funktionellem BLOC-3 begrenzt. Es ist lediglich in Insektenzellen gelungen, funktionelles BLOC-3 rekombinant herzustellen⁷⁰. Selbst wenn eine solche hypothetische GTP-Beladung von gespaltenem Rab32 stattfinden würde, könnte die Interaktion zu Rab-Bindepartnern gestört bleiben. Qualitativ konnte dies bereits für die VARP-Interaktion gezeigt werden. Die Modifikation von Rab32 vermindert die Affinität zur VARP-Ankyrin-Wiederholungsdomäne (VARP-ANK1) signifikant⁵⁸ (s. Abbildung 39). Betrachtet man die Kontaktfläche von VARP-ANK1 auf Rab32 genauer, stellt man fest, dass die Spaltstelle in Mitten vieler zentraler Aminosäurekontakte beider Bindepartner lokalisiert ist (s. Abbildung 42A)⁵⁸. Es ist anzunehmen, dass die Spaltung in *switch I* nicht nur zu einer größeren Flexibilität der Loop-Region führt, sondern auch eine Destabilisierung des angrenzenden antiparallelen β -Faltblatts, also des *Interswitches* ($\beta 2$ - $\beta 3$) zur Folge hat.

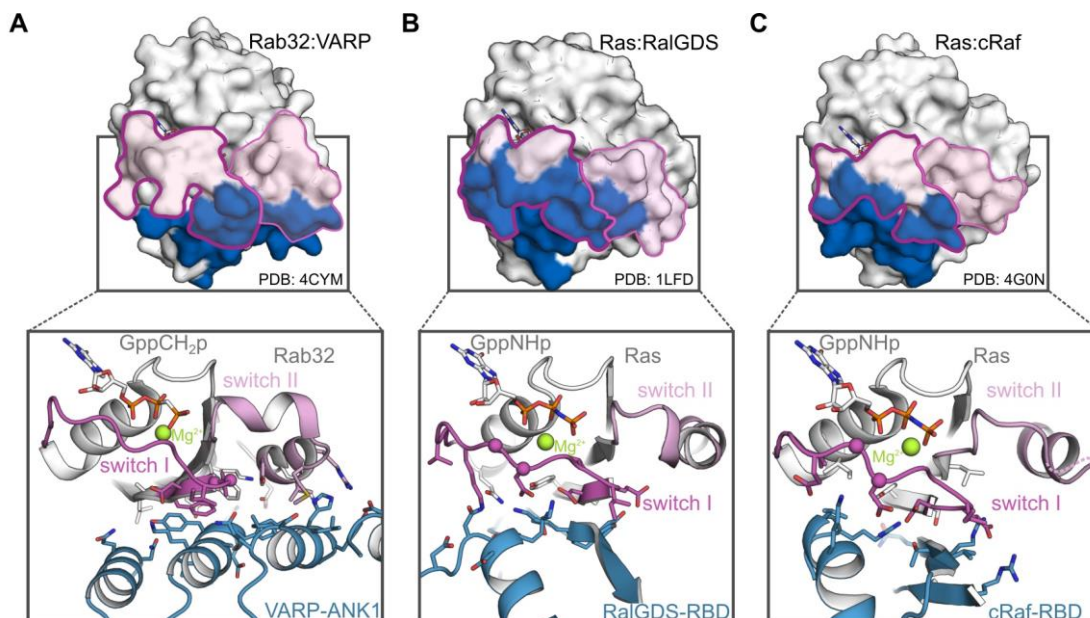


Abbildung 42. Strukturelle Aspekte der Interaktionen von Rab32 und Ras mit nachgeschalteten Effektoren. Dargestellt sind die projizierten Interaktionsgrenzflächen auf der GTPase-Oberfläche (blau). Hervorgehoben sind die Konturen der Schaltregionen auf der Oberfläche (*switch I*, magenta; *switch II*, rosa). Unterhalb ist ein Ausschnitt der jeweiligen Interaktionsregion mit einer Auswahl interagierender Aminosäuren beider Proteine sowie des Nukleotids als Stabmodell dargestellt. Farblich sind die *switch*-Regionen wie oben hervorgehoben. Farbige Kugeln: C α -Atome der jeweiligen Proteaseschnittstelle (magenta); Mg²⁺-Ion (grün). **A** Interaktion zwischen Rab32:GppCH₂p und VARP-ANK1 (PDB Zugangsnummer 4CYM). **B** Interaktion zwischen Ras:GppNHp und der Ras Bindedomäne aus RalGDS (RalGDS-RBD) (PDB Zugangsnummer 1LFD). **C** Interaktion zwischen Ras:GppNHp und der Ras-Bindedomäne der Kinase cRaf (cRaf-RBD) (PDB Zugangsnummer 4G0N).

Ebenfalls ist nicht ausgeschlossen, dass sich die Destabilisierung bis in den *switch II* fort-pflanzt. Diese Annahmen bieten eine molekulare Erklärung der beobachteten Affinitätsreduktion zwischen Rab32 und VARP-ANK1. Überträgt man diese Hypothesen auf die Interaktionen zwischen Ras und seinen detailliert untersuchten Interaktionsdomänen aus cRaf und RalGDS, so zeigt sich für beide Protein-Protein-Interaktionen ein ähnliches Bild wie für

Rab32:VARP-ANK1 (s. Abbildung 42B, C). Dass die Ras-Spaltung mit der Ras:cRaf-vermittelten Signalweitergabe interferiert, wurde bereits gezeigt¹¹⁸. Die RRSP-Spaltstelle liegt abermals inmitten der Interaktionsfläche. Auffällig ist dabei die relative Lage im Vergleich zwischen der Rab32- und Ras-Spaltstelle. Auch wenn sie lediglich fünf Aminosäuren entfernt liegen, scheinen die Spaltpositionen für beide GTPasen individuell selektioniert worden zu sein, um die Interaktionen zu den jeweiligen Bindepartnern durch eine Verringerung der Affinität irreversibel zu destabilisieren.

4.4. Katalytischer Mechanismus neuen Typs in DUF5_{vv}/RRSP

Die Mutation von E3930 zu Alanin reduziert die katalytische Effizienz von RRSP bei der Modifikation von Ras um einen Faktor von ca 29000 (entspricht 0,03‰ der RRSP-Wilddtypaktivität). Eine Substitution von E3900 gegen Glutamin bewirkt hingegen eine vergleichsweise geringe Reduktion der Effizienz um das 45-fache (entspricht 22‰ der Wilddtypaktivität) (s. Abbildung 34). Dies macht deutlich, dass RRSP höchstwahrscheinlich über eine katalytische Dyade aus E3900 und E3930 wirkt und stellt die Frage nach weiteren Enzymen mit einem vergleichbaren aktiven Zentrum, deren Struktur bereits bekannt ist. In der MEROPS Datenbank für Proteolytische Enzyme²⁰⁹ sind in der Klasse der Glutamatproteasen bisher zwei Familien beschrieben (G1, G2^w). In beiden Gruppen ist mindestens ein Glutamat im aktiven Zentrum vorhanden und entscheidend an der Katalyse beteiligt. Die katalytische Dyade setzt sich dabei aus dem Glutamat sowie einem Glutamin (G1) bzw. einem Aspartat (G2) zusammen. Für beide Familien sind beispielgebende Referenzstrukturen beschrieben (s. Abbildung 43). Eine Familie mit einer reinen Glutamat-Dyade ist bisher nicht bekannt. Die Ecolisin-Familie (G1) wurde durch die unspezifische Scytilidocarboxyl Peptidase B (SCP-B) aus dem Schlauchpilz *Scytilidium lignicolum* definiert^{210,211} (s. Tabelle 3). Diese Proteasen wurden lange Zeit - fälschlicherweise - als Aspartatproteasen klassifiziert, da sie ebenfalls ihr Aktivitätsoptimum bei niedrigem pH aufweisen und Carboxylreste für die Reaktion essenziell sind. Als charakteristisches Merkmal dieser Enzyme wurde frühzeitig die Resistenz gegenüber der Pepstatin-vermittelten Inhibition erkannt, was sie von reinen Aspartatproteasen wie bspw. Pepsin unterschied¹⁷⁷. Interessanterweise wird SCP-B vollständig durch EPNP inhibiert¹⁷⁹. Es wurde auch von ersten Beispielen bakterieller Glutaminproteasen, wie die PepG1 Peptidase aus thermoacidophilen *Alicyclobacillus*-Stämmen, berichtet¹⁷⁸. Der bisher einzige Vertreter der G2-Familie ist das autoprozessive *Pre-neck appendage protein* aus dem *Bacillus*-Bakteriophagen ϕ 29 (auch als Genprodukt 12 (gp12) bezeichnet)²¹². In der Phagenreifung spaltet dieses nach erfolgreicher Ausbildung eines Homotrimers einen C-terminalen Fortsatz (Domäne D4) bei neutralem pH und entlässt den N-terminalen Teil (D1-D3) als funktionellen

^w Kurzbezeichnung der Protease-Familie nach der MEROPS-Nomenklatur.

Stachel für die Assemblierung mit der Basalplatte (s. Abbildung 43C). Neben der unterschiedlichen Natur der Dyade und den verschiedenartigen Funktionen der Proteasen aus den genannten Organismen, unterscheiden sich die Strukturen der jeweiligen Familienvertreter grundlegend von dem RRSP-*in silico*-Modell. Während RRSP als nahezu vollständig α -helicales Protein vorhergesagt wird, bestehen die beiden anderen Beispiele fast ausschließlich aus β -Faltblättern. Gp12 spaltet hochspezifisch das angrenzende Homomer durch eine auf beide Peptidketten aufgeteilte Dyade, während SCP-B mit geringer Spezifität, als Monomer aus zwei Überlagerten antiparallelen β -Faltblättern agiert.

Diese Vergleiche zeigen, dass sich RRSP in vielfältiger Weise von den bisherigen beschriebenen Glutamatproteasen unterscheidet und keiner der beiden Familien zugeordnet werden kann. Daher wird vorgeschlagen, RRSP als Referenzenzym einer neuen Familie zu definieren: der Familie der spezifischen Glutamat-Carboxylendopeptidasen (Clan CC/Familie G3).

Der Charakter der Katalyse von RRSP ähnelt in gewisser Weise verschiedenen Aspartatproteasen, da es einerseits ebenfalls (in Teilen) durch Pepstatin A inhibiert werden kann und andererseits auch aus dieser Klasse spezifisch wirkende, bakterielle Proteasen beschrieben wurden. Eine kürzlich aufgeklärte beispielhafte Struktur einer solchen Protease, ist die der intramembrane Lipoprotein-Signalpeptidase II (LspA) aus *Pseudomonas aeruginosa*²¹³, welche an der Reifung von Lipoproteinen durch die posttranslationale Spaltung einer Peptidsignalsequenz in der inneren Membran gramnegativer Bakterien beteiligt ist (s. Abbildung 43D). Beide Klassen unterscheiden sich u.a. in der Kettenlänge der Seitengruppen. Die Glutamatreste weisen eine größere Flexibilität im Vergleich zu den Aspartatresten auf. Daher könnte spekuliert werden, dass die beiden Carboxylgruppen des Glutamats durch ein Netzwerk von polaren (u.U. auch hydrophobe) Wechselwirkungen im aktiven Zentrum von RRSP für eine effiziente Ras-Spaltung ausgerichtet und stabilisiert werden. Im Fall von RRSP könnte die evolutionäre Selektion zu längeren Seitenketten auf die konformationelle Heterogenität der GTPase-Substrate zurückgeführt werden, da beide Aktivitätszustände im Fall von Ras mit ähnlicher Effizienz umgesetzt werden.

Das dermonekrotische Toxin aus *Pasteruella multocida* (DNT oder PMT), auf dessen Struktur das RRSP-Homologiemodell basiert, trägt eine katalytische Triade, ähnlich einer Cysteinprotease (Cys-His-Asp) in seiner C-terminalen Domäne (C3)¹⁶³. Allerdings beruht die toxische Wirkung dieser Anordnung nicht auf einer proteolytischen Spaltung, sondern auf der spezifischen Desaminierung von $G\alpha$ -Untereinheiten, also G-Protein-gekoppelter Rezeptoren¹⁰⁸ (s. Tabelle 2). Eine entsprechende C3-Domäne findet sich in RRSP nicht. Es bleibt unklar, welche funktionelle Rolle die C2-Domäne in PMT spielt, da in diesem Teil bisher keine enzymatische Aktivität identifiziert werden konnte. Für weiterführende Einsichten wurde ein Vergleich der Domänenarchitektur sowie der Primärstruktur zwischen PMT und RRSP aus *Vibrio vulnificus* (Vv) und weiteren verwandten Effektor-domänen aus MARTX-Toxinen anderer Organismen bemüht (s. Abbildung 44A, B). In der Sequenzregion der katalytischen

Glutamatreste wird deutlich, dass die Sequenzen der einzelnen RRSPs große Ähnlichkeit aufweisen, während beträchtliche Unterschiede zur PMT-Sequenz deutlich werden. Interessanterweise zeigen sich in den homologen Positionen von E3900 und E3930 aus RRSP_{VV}, in fast allen verglichenen Spezies konservierte Aminosäuren mit Carboxylgruppen. PMT weist an diesen Positionen je ein Asparagin (statt E3900) und Serin (statt E3930) auf. Da diese nicht in einer Serinprotease-artigen Anordnung positioniert sind, ist davon auszugehen, dass diese Positionen keine proteolytische Aktivität aufweisen. Hervorzuheben ist die Protease aus *Photorhabdus asymbiotica* (RRSP_{Pa}), für die proteolytische Aktivität an Ras *in vitro* nachgewiesen wurde¹¹⁸, obwohl lediglich (das katalytisch bedeutendere) E3930 konserviert ist. Die E3900_{VV}-Position wird hier durch ein Threonin eingenommen, von dem kein entscheidender Beitrag zur Katalyse zu erwarten ist, wenn man die Toxizität der E3900Q_{VV}-Mutante berücksichtigt (s. Abbildung 35B). Ob RRSP_{Pa} damit eine Glutamatprotease darstellt, die mit lediglich einem Carboxylrest im aktiven Zentrum funktionsfähig ist, oder ob andere Reste die Funktion von E3900_{VV} komplementieren können, bleibt unklar. Eine entsprechende E3900T_{VV} Mutante könnte hier weiteren Aufschluss geben. Ebenfalls von Interesse ist das Beispiel des RRSP-Effektors aus *Photorhabdus luminescens* (RRSP_{Pl}), in dem beide Glutamate durch Aspartatreste substituiert sind. Ebenfalls könnte eine entsprechende Doppelmutante (E3900D/E3930D_{VV}) hier weitere Einsichten in die katalytischen Unterschiede und Varianten dieser homologen Effektoren liefern, da bisher keine Aktivität von RRSP_{Pl} an einem GTPase-Substrat beschrieben wurde. Neben PMT weist lediglich der Effektor aus dem MARTX-Toxin des entfernten Verwandten *Xenorhabdus nematophila* (Xn) keinen Säurerest in der E3930_{VV}-Position auf (hier ein Glycin). Ob das zu E3900_{VV} homologe Aspartat aus *X. nematophila* eine proteolytische Ras-Spaltung katalysieren kann, bleibt fraglich. Diese Vergleiche weisen unterstützend darauf hin, dass das identifizierte katalytische Zentrum aus RRSP_{VV} auch in nahe verwandten Effektoren anderer Spezies aus zwei Glutamaten (mit Variationen in E3900_{VV}) konstituiert wird.

Die Evaluierung weiterer konservierter Positionen in der Region des aktiven Zentrums geben Aufschluss über mögliche Elemente der Substraterkennung. Betrachtet man die Lage der streng konservierten Reste sowie die Aminosäuren mit chemisch ähnlichen Eigenschaften in relativer Nähe zu den katalytischen Glutamaten in dem RRSP_{VV}-Modell, lässt sich eine mögliche Substratbindetasche näher eingrenzen (s. Abbildung 44B, C). Die Mehrheit der konservierten Aminosäuren gruppiert sich tatsächlich um die katalytische Dyade. Dabei fällt auf, dass E3930 über potenzielle Wasserstoffbrückenbindungen zu den Resten H4030 und Y4000 koordiniert wird, wobei nur das Tyrosin streng konserviert ist. Potenzielle Koordinationspartner für E3900 wurden nicht registriert.

Die nachgewiesene Spaltaktivität an Peptidsubstraten (s. Abschnitt 3.5.2.) legt nahe, die Substratbindung der *switch I*-Peptidstruktur im Kontext der möglichen Bindetaschen (S3-S3') zu evaluieren. Das Hexapeptid -DEYDPT- wurde als Modells substrat gewählt.

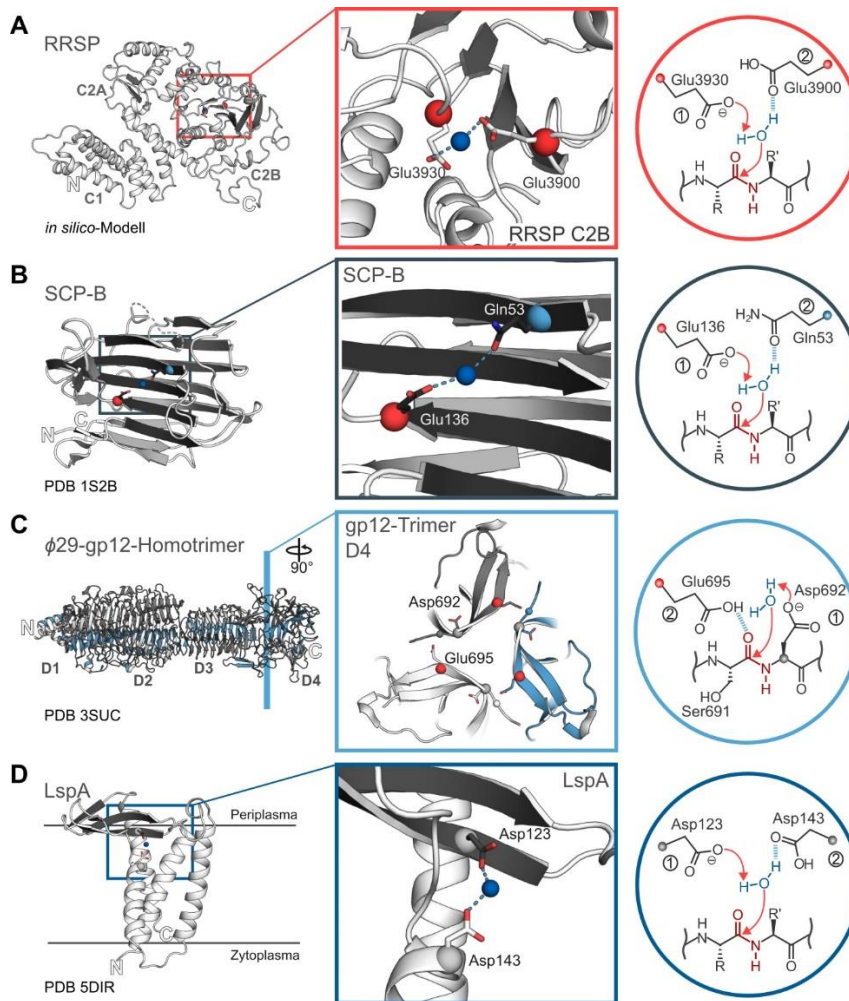


Abbildung 43. Auswahl katalytischer Zentren von Carboxyl-Endopeptidasen im Vergleich. Linke Spalte: Übersicht des jeweiligen Enzyms in der Bänderdarstellung mit PDB Zugangsnummern. Weiß: α -Helices und Loops; Grautöne: β -Faltblätter. Mittlere Spalte: Vergrößerung des aktiven Zentrums mit den an der Katalyse beteiligten Resten als Stabmodell. Farbige Kugeln: Glu-C α (rot); Gln-C α (hellblau); Asp-C α (grau); modelliertes Wasser-Nukleophil (blau). Rechte Spalte: Formelles Schema der jeweiligen Katalyseanordnung. Weinrot: zu spaltende Peptidbindung. **A.** RRSP *in silico*-Modell mit einem bisher nicht beschriebenen katalytischen Zentrum bestehend aus einer Glutamat-Dyade. **B.** Scytalidocarboxyl Peptidase B (SCP-B) aus *Scytalidium lignicolum* mit einer Glu/Gln-Dyade²¹⁰. **C.** Homotrimer aus dem Genprodukt 12 des Bacillus Bakteriophagen ϕ 29 mit einer autokatalytischen Glu/Asp-Dyade²¹². **D.** Lipoprotein-Signalpeptidase II (LspA) aus *Pseudomonas aeruginosa* mit einer Asp-Dyade²¹³.

Trotz stellenweiser Inkonsistenzen des postulierten Substratbindemodells kann es als Arbeitsmodell dienen und helfen, Hypothesen für weitere biochemische Untersuchungen zu entwickeln, bis proteinkristallografische oder andere Strukturanalysen ein detailliertes molekulares Modell der Interaktion zwischen Ras und RRSP liefern. *In silico* wurden hieran geringfügige manuelle Anpassungen der Seitenkettenkonformation vorgenommen, wenn diese zu attraktiven Interaktionen mit RRSP-Seitenketten führten (PyMOL Software). Hierbei wurde ein Interaktionsradius zwischen 2,6-3,6 Å als Abstandsbereich attraktiver Wechselwirkungen angenommen (s. Abbildung 44C-E).

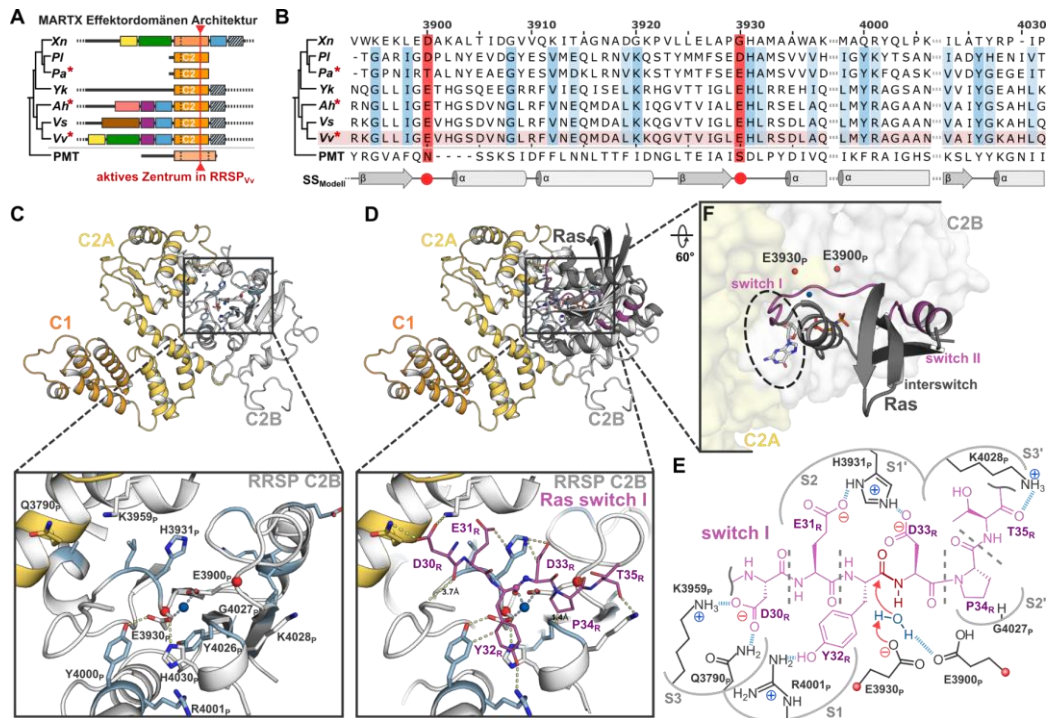


Abbildung 44. Postulierte Substratbindung und Katalysemechanismus der proteolytischen Spaltung von Ras durch die Carboxyl-Endopeptidase RRSP. **A** Die Effektor-domänenarchitektur von RRSP enthaltenden MARTX Toxinen aus verschiedenen Spezies: *Xenorhabdus nematophila* (Xn); *Photorhabdus luminescens* (Pl); *Photorhabdus asymbiotica* (Pa); *Yersinia kristensii* (Yk); *Aeromonas hydrophila* (Ah); *Vibrio splendidus* (Vs); *Vibrio vulnificus* (Vv); *Pasteurella multocida* Toxin (PMT). Die sequenzbasierte Verwandtschaft der Proteine ist links durch einen phylogenetischen Baum dargestellt. Die RRSP-Domäne ist in orange hinterlegt und der Bereich der identifizierten Reste des aktiven Zentrums ist durch einen roten Balken und Dreiecke hervorgehoben. Durch ein rotes Sternchen gekennzeichnete sind Toxine, deren proteolytische Aktivität an Ras experimentell *in vitro* bestätigt wurde¹¹⁸. **B** Sequenzvergleich der Toxine aus A im Bereich der identifizierten katalytischen Glutamate (E3900; E3930, rot hinterlegt, rote Kreise) sowie zwei weitere konservierte Regionen der Substratbindung (abgestuft in blau hinterlegt). Die aa-Indizierung referenziert auf MARTX_{VV} (rosa hinterlegt). Die vorhergesagten Sekundärstrukturen (SS_{Modell}) der aa-Sequenz sind unterhalb des Sequenzvergleichs dargestellt. **C** *In silico* RRSP-Strukturhomologiemodell mit den Aminosäuren der Region des aktiven Zentrums hervorgehoben als Stabdarstellung. Unten: Vergrößerung der *switch I*-Peptidbindetasche zwischen der C2A und C2B Domäne ohne gebundenes Substrat. Konservierte Reste aus dem Sequenzvergleich unter B sind hellblau hervorgehoben. Das tiefgestellte P der Aminosäureindizierung steht für Protease. Die C α -Atome der katalytischen Glutamate sind als rote Kugeln dargestellt. Blaue Kugel: koordiniertes Wasser-Nukleophil. **D** Postulierte Ras-Bindung (dunkelgrau) an das RRSP-Strukturmodell aus C. Magenta: *switch*-Regionen. Unten: Vergrößerungsausschnitt der Substratbindetasche wie in C, mit dem ausgerichteten *switch I* Hexapeptid (P3-P3', magenta Stabmodell). Interaktionen zwischen 2,6-3,6 Å gelb gestrichelt angezeigt. Abweichende Distanzen sind angegeben. **E** Vergrößerung der Ras-Bindung (*switch*-Regionen und *Interswitch*) aus D an der RRSP-Oberfläche. Gestricheltes Oval: Region sterischer Zusammenstöße zwischen Ras und dem RRSP-Modell. Weitere Legende siehe C und D. **F** Postuliertes formelles Schema des katalytischen Mechanismus sowie der Substratbindung in RRSP. Magenta: *switch I* Peptid; schwarz/grau RRSP-Reste der Substratbindetaschen S3-S3'.

Tatsächlich lassen sich auf diesem Wege für alle Reste des Hexapeptidsubstrates mögliche polare Wechselwirkungen identifizieren. Zwei prominente Reste in diesem Zusammenhang sind H3931 und R4001. Während das Arginin durch den Kontakt zum Y32_{Ras} ein Kandidat für die S1-Bindetasche ist, bildet das Histidin in direkter Nachbarschaft zum katalytischen E3930 zwei polare Kontakte zu den Säureresten von P2 (E31_{Ras}) und P1' (D33_{Ras}) aus. Damit konstituiert H3931 potenziell gleichzeitig zwei Substratbindetaschen (S2; S1') und wäre

demnach ein wichtiges Element der Substratbindung. Bei Mutationsstudien wurde H3931A im Hefetoxizitätsnachweis bereits evaluiert, dabei allerdings nicht als signifikante Position erkannt¹¹⁷. Die geringe Sensitivität der experimentellen Anordnung in Hefe scheint daher wenig geeignet für eine entsprechende Evaluierung, wie im Fall der E3900Q-Mutante ebenfalls deutlich wird (s. Abbildung 35B). Die weitere Charakterisierung potenziell bedeutender Reste sollte daher in *in vitro*-Nachweisverfahren erfolgen. Die Konstellation des Ras-Peptids in Kontakt mit den gegenüberliegenden Positionen H3931 und R4001 erinnert an eine Streckbank, bei der das Y32_{Ras} den Kopf und die beiden benachbarten Säurereste die Gliedmaßen eines Gefolterten repräsentieren.

In diesem Modell wird P34_{Ras} (P2') in einer Tasche beherbergt, die durch das konservierte G4027 aufgetan wird. Auch die beiden weiteren Substratpositionen D30_{Ras} sowie T35_{Ras} (P3 bzw. P3') werden von RRSP-Resten kontaktiert. Allerdings handelt es sich hierbei um nicht-konservierte Aminosäuren. Die Evaluierung von Struktur-Funktions-Beziehungen der hier postulierten Substratbindung muss in weiterführenden Studien über Mutationsanalysen erfolgen. Erste Einsichten zur Bedeutung der P2-P1' Positionen in Peptidsubstraten wurden durch Ala-Substitutionsanalysen des Ras-*switch I*-Peptides durch Jonathan Kordon²¹⁴ (Fachbereich für Proteinchemie, Prof. Itzen TUM^x) sowie Biancucci und Kollegen²¹⁵ geliefert. Hierbei führte die Ala-Substitution jeder einzelnen Aminosäure bereits zu einem nahezu vollständigen Rückgang der Umsatzraten verglichen mit dem WT-Peptid. Die Übertragung der Peptidsubstratbindung an RRSP auf das vollständige Ras, deckt eine Region sterischer Konflikte im Bereich der Ras-Nukleotidbindung auf. Speziell sind es die GTPase-Motive G4 sowie G5, die mit beiden Teilen der RRSP-C2-Domäne kollidieren (s. Abbildung 44F). Sowohl die *switch I*- als auch die *switch II*-Region fügen sich passgenau an das RRSP-Modell an und zeigen keine vergleichbaren Konflikte.

^x Die Experimente von JK wurden unter Anleitung des Autors im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt.

4.5. Die Enzymatik der Proteasen GtgE und RRSP

Die untersuchten Proteasen GtgE sowie RRSP erkennen spezifisch sehr ähnliche GTPasen in der Zelle weisen aber in allen weiteren Aspekten ihrer Biologie große Unterschiede auf. Während GtgE mit einer Cystein-Triade agiert, scheint RRSP über eine Glutamat-Dyade im aktiven Zentrum zu verfügen. Die Charakterisierung der enzymatischen Eigenschaften zeigte zunächst eine sehr ähnliche proteolytische Effizienz beider Proteasen, mit einem k_{cat}/K_M im Bereich von $5\text{-}8 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. Beides sind demnach effiziente Enzyme bei der spezifischen Spaltung kleiner GTPasen.

Die Bestimmung eines echten K_M und k_{cat} für GtgE anhand einer Michaelis-Menten-Kinetik über einen Gel-Shift-basierten Aktivitätsnachweis stellte sich als schwierig heraus. Die hohe Substrataffinität mit einem $K_{D,Rab:GtgE}$ von ca. $0,1 \mu\text{M}$ erfordert Rab-Konzentrationen im nanomolaren Bereich, wobei die densitometrische Nachweismethode an ihre Detektionsgrenzen stößt. Um die kinetischen Enzymparameter trotzdem näherungsweise zu bestimmen, trifft man die Annahme, dass die ermittelte Dissoziationskonstante ($K_{D,Rab:GtgE}$) etwa der Michaelis-Konstante entspricht. Damit erreicht GtgE eine maximale Umsatzrate ($k_{cat,GtgE}$) von etwa $0,05 \text{ s}^{-1}$ (s. Abbildung 12A, B und Abbildung 14). Der Vergleich von k_{cat} und K_M beider Proteasen deckt auf, dass sie in unterschiedlichen Regimen arbeiten: während GtgE mit einem niedrigen K_M im Bereich von näherungsweise $0,1 \mu\text{M}$ bereits bei geringen Substratkonzentrationen maximale Sättigung erreicht, weist RRSP einen K_M von ca. $88 \mu\text{M}$ auf und erreicht damit seine maximale Sättigung (v_{max}), also etwa bei 900-mal höheren Substratkonzentrationen als GtgE (s. Tabelle 3). Allerdings weist RRSP mit einem k_{cat} von 68 s^{-1} eine etwa 1300-fach höhere maximale Umsatzrate im Vergleich zu GtgE auf und kompensiert auf diese Weise die niedrige Substrataffinität. Diese unterschiedlichen Arbeitsregime reflektieren möglicherweise den Umstand, dass GtgE eine Diskriminierung beim Aktivitätszustand seiner GTPase-Substrate vornimmt und RRSP dies nicht tut. Die Selektion zu hohen Substrataffinitäten bei GtgE könnte der Konkurrenzsituation mit GDI geschuldet sein, da GtgE mit GDI in direktem Wettbewerb um die Bindung an membranassoziiertes Rab:GDP steht. Die relativen Konzentrationen der Proteasen zu den GTPase-Substraten in der Zelle sind aufgrund der Membranbindung beider Enzyme wahrscheinlich relativ hoch, was ein weiteres Merkmal einer effektiven Peptidspaltung darstellt.

Die Umsatzrate von Proteasen wird unter anderem durch die Polarisierbarkeit des Nukleophils im aktiven Zentrum bestimmt. Bei Serin- und Cysteinproteasen (aber auch bei vielen anderen Enzymen) befindet sich das katalytische Nukleophil häufig am N-Terminus einer α -Helix, das durch seinen Helixdipol den pKs-Wert von Alkohol- bzw. Thiolnukleophilen herabsetzt, wodurch diese leichter polarisiert werden können^{216,217}. In der GtgE-Struktur übernimmt diese Funktion die Thiolgruppe in C45 an der Spitze der ‚katalytischen‘ Helix $\alpha 1$ (aa 45-54) (s. Abbildung 17, 18). Dies ähnelt der katalytischen Anordnung, wie sie in der Cystein-

Protease Papain (MEROPS ID: C01.001) zu finden ist, obwohl beide Proteasen in der Gesamtbetrachtung eine unterschiedliche Faltung aufweisen^{146,218}. Der Helixdipol steigert somit den nukleophilen Charakter der katalytischen Thiolgruppe und erhöht damit die enzymatische Leistungsfähigkeit von GtgE.

Eine vergleichende Betrachtung der katalytischen Effizienz von RRSP im Hinblick auf Peptid- und Proteinsubstrate lag nicht im Fokus dieser Arbeit, wäre aber in Bezug auf die Signifikanz einzelner Ras-Positionen innerhalb sowie außerhalb der Substratbindetasche aufschlussreich.

Tabelle 3. Vergleich enzymatischer Parameter von Proteasen ausgewählter Pathogene*. Die Auflistung ist zweigeteilt in Enzyme mit allgemeiner Säure-Base-Katalyse (Carboxyl-, Metalloproteasen; blau/weiß) sowie Cysteinproteasen, die einen Acyl-Enzym-Komplex eingehen (grün/weiß). Diese Auflistung ist nicht abschließend. n.b.: nicht bestimmt; d.A.: diese Arbeit.

Protease (Organismus)	Kat. Typ** /Clan/Familie/	k_{cat} (s ⁻¹)	K_M (μM)	K_D (μM)	k_{cat}/K_M (M ⁻¹ s ⁻¹)	Quelle
RRSP (<i>V. vulnificus</i>)	Glutamat /- / - /	68,0	88,0	n.b.	$7,7 \cdot 10^5$	d.A.
SCP-B (<i>S. lignicolum</i>)	Glutamat /GA/G1/	0,03-200	0,1-4,6	n.b.	$0,02-36,3 \cdot 10^6$	211‡
Anthrax Lethalfaktor (<i>B. anthracis</i>)	Metallo /MA/M34/	0,52	2,3	n.b.	$2,3 \cdot 10^5$	219
Neurotoxin A (<i>C. botulinum</i>)	Metallo /MA/M27/	220,8	7,0	n.b.	$3,2 \cdot 10^7$	220
Plasminogenaktivator Pla (<i>Y. pestis</i>)	Aspartat /AF/A26/	0,0035	0,15	n.b.	$2,3 \cdot 10^4$	221
Retropepsin (HI Virus-1)	Aspartat /AA/A2/	0,26	33	n.b.	$7,9 \cdot 10^3$	222‡
GtgE (s. Typhimurium)	Cystein /CA/C102/	0,05	n.b.	0,1 [#]	$5 \cdot 10^5$	d.A.
Staphylopain (s. <i>aureus</i>)	Cystein /CA/C47/	0,01-0,89	6-612	n.b.	$0,01-12,8 \cdot 10^4$	223‡
Cruzipain (<i>T. cruzi</i>)	Cystein /CA/C1/	0,5-15,2	2,1-13,2	n.b.	$0,43-29,8 \cdot 10^5$	185‡
Nla peptidase (TVM Virus)	Cystein /PA/C4/	0,092	82	n.b.	$1,1 \cdot 10^3$	224‡

*Recherche erfolgte über die Enzymdatenbank BRANDA (brenda-enzymes.org), alle Daten beziehen sich auf die Wildtyp-Enzyme; **Klassifizierung nach der MEROPS Datenbank; ‡ Charakterisierung erfolgte anhand verschiedener (chromogener) Peptidsubstrate. #Bestimmung anhand der GtgE Mutante C45A.

Ein weiterführender Vergleich mit Proteasen aus anderen Pathogenen (Bakterien, Viren, Protozoen), die als Virulenzfaktoren oder Toxine auftreten, hilft die ermittelten enzymatischen Parameter in einem breiteren Kontext einzuordnen (s. Tabelle 3). Die Auswahl der Proteasen wurde u.a. anhand der medizinischen Relevanz der Pathogene, der Natur des katalytischen Zentrums sowie der Signifikanz der Protease in Wirt-Pathogen-Interaktionen getroffen. Sie wurde begrenzt durch die Verfügbarkeit quantitativer Daten, weswegen z.B. die Rho-spezifische Protease YopT aus *Yersinia* (s. Abschnitt 1.4.3.) nicht aufgeführt ist. Eine Schwierigkeit beim Vergleich der quantitativen Daten liegt in der Heterogenität der verwendeten Substrate in den einzelnen Studien. Besonders bei weniger spezifischen Proteasen werden zur Charakterisierung der Substratspezifität eine Vielzahl von Peptiden herangezogen, um einen enzymespezifischen Aktivitätsbereich abzubilden. Zur Vereinfachung wird im Folgenden mit den

Mittelwerten der jeweiligen Daten argumentiert. Der Vergleich der katalytischen Effizienzen von RRSP mit Proteasen, die eine ähnliche Katalyse betreiben, zeigt eine durchschnittliche Effizienz von RRSP. Bis auf RRSP und das unterdurchschnittlich effiziente Retropepsin aus dem HI Virus scheinen alle anderen Proteasen dabei in einem Regime mit moderatem bis geringem K_M (0,15-7 μM) zu funktionieren. Bei den k_{cat} -Werten bilden sich zwei Gruppen heraus, wobei einige Enzyme hohe Umsatzraten aufweisen (RRSP; SCP-B; Neurotoxin A) und alle anderen Proteasen eine mindestens 100-fach geringere maximale Umsatzrate zeigen. Im direkten Vergleich zur einzigen quantitativ beschriebenen Glutamatprotease SCP-B aus *Scytalidium lignicolum* zeigt RRSP eine vergleichbare enzymatische Effizienz, wobei SCP-B einen deutlich geringeren K_M aufweist (s. Tabelle 3).

Der Vergleich von GtgE mit anderen Cysteinproteasen aus Pathogenen zeigt eine geringere Varianz in den katalytischen Effizienzen als bei den Carboxyl- und Metalloproteasen (k_{cat}/K_M 10^3 - 10^5 $\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$). GtgE ist am oberen Ende dieser Skala einzuordnen, weil es im Vergleich zu allen anderen Enzymen einen außerordentlich geringen K_M (bzw. K_D) aufweist.

Zusammenfassend zeigt sich, dass beide untersuchte Proteasen effiziente Enzyme sind die sich entweder durch einen besonders geringen (GtgE) oder hohen (RRSP) K_M auszeichnen. Beide zeigen eine vergleichbare Effizienz zu anderen Proteasen aus Pathogenen mit ähnlichen katalytischen Zentren.

5. Ausblick

Die proteolytische Modifikation kleiner GTPasen ist eine PTM, die von nur wenigen Enzymen aus Pathogenen bekannt ist. Die Auswirkungen der Proteolyse wurden bisher nicht oder nur unzureichend beschrieben. Erste biochemische sowie biophysikalische Analysen aus dieser Arbeit weisen die ortsgerichtete, proteolytische Spaltung als ein effektives Mittel der Inaktivierung und Destabilisierung kleiner GTPasen aus. Um ein umfassendes Verständnis über die Auswirkungen der Modifikation zu gewinnen sollten in weiteren Studien die funktionellen Auswirkungen der Proteolyse auf Protein-Protein-Interaktionen zwischen GTPasen und verschiedenen Effektoren oder Regulatoren quantitativ vergleichend untersucht werden. Konkret würde sich hier Ras mit RRSP als Model-System anbieten, da sowohl Regulatoren (GEF: u.a. z.B. SOS, GAP: z.B. RasGAP) als auch Effektoren von Ras (Ras-Bindedomänen verschiedener Proteine) über rekombinante Expression dargestellt werden können und in der Literatur vielfach beschrieben sind. Im Ras-RRSP-Modell ließen sich über den hier etablierten Fluoreszenz-basierten Proteolysenachweis verschiedene weitere Parameter quantifizieren. Beispielsweise wären der Einfluss der Spaltung auf die Reaktionsgeschwindigkeiten der GEF- bzw. GAP-vermittelten Ras-Aktivierung bzw. Inaktivierung von Interesse. Neben qualitativen Bindestudien (z.B. über aSEC oder Y2H) wären auch vergleichende Strukturanalysen über NMR-Titrationsexperimente wünschenswert, um auch lokal auftretende strukturelle Änderungen zu erfassen und zu quantifizieren, da kleine GTPasen für NMR-Methoden ideal geeignet sind. Es wäre in diesem Zusammenhang sinnvoll ähnliche Studien auch für das Rab32-GtgE-Modell durchzuführen. Abschließende Analysen im Rab-GtgE-Modell könnten an der etablierten Komplexstruktur, den vorgelegten Mutationsanalysen sowie entwickelten Hypothesen anknüpfen und sich den offenen Fragen nach den entscheidenden molekularen Determinanten der Rab- und Nukleotidspezifität von GtgE widmen. Die vergleichende proteolytischen Effizienz beider Proteasen für alle bisher beschriebenen Substrate könnte Aufschluss über eine mögliche Proteinsubstratpräferenz geben.

In weiteren Experimenten zu RRSP muss das identifizierte aktive Zentrum der Glutamats-Dyade ebenfalls in humanen Zellexperimenten evaluiert werden. Die postulierte Substratbindung sollte sowohl durch aktivitätsbasierte Mutationsanalysen an Ras als auch RRSP evaluiert und mit der proteinkristallographischen Analyse eines Enzym-Substrat-Komplexes aufgeklärt werden. Letzteres bedingt eine Vielzahl von Teilschritten: zunächst muss eine vollständig inaktive RRSP-Mutante etabliert werden, um die Ras:RRSP Interaktionen in der Substratbindetasche auch mit ungespaltenem Ras studieren können. Um einen Enzym-Substrat-Komplex zu generieren, muss das Problem der geringen Affinität zwischen Ras und RRSP ($\sim 90 \mu\text{M}$) überwunden oder umgangen werden. Hierzu bietet sich eine ortsspezifische kovalente Verbrückungsstrategie an, um den schwachaffinen Ras:RRSP_{Mutant}-Komplex in möglichst nativer Konformation zu stabilisieren. Eine Möglichkeit, einen solchen Komplex zu generieren, wäre zunächst die Einführung einer unnatürlichen, thiolreaktiven Aminosäure in Ras

durch genetische *Code*-Erweiterung über die Methode der Amber Codon-Unterdrückung²²⁵. Eine solche Ras-Sonde (Ras mit inkorporierter unnatürlicher Aminosäure; Ras-UAA) könnte mit der Thiolgruppe aus Cystein eine spezifische, Kontakt-vermittelte Reaktion eingehen (das sog. *proximity-enabled protein crosslinking*)²²⁶. Eine erfolgversprechende Methode wurde kürzlich beschrieben, bei der ein schwachaffiner Protein-Komplex durch die Einführung einer Bromoalkyl-enthaltenden unnatürlichen Aminosäure in Rab1 stabilisiert werden konnten²²⁷. Ein Vorteil dieser Strategie im Fall von RRSP ist, dass es keine natürlichen Cysteine in seiner Primärstruktur aufweist und damit jedes eingeführte Cystein einzigartig ist. Die Positionspaare möglicher Quervernetzungen können über das beschriebene Ras:RRSP-Bindemodell ausgewählt werden (s. Abbildung 43). In einem zu etablierenden Lysat-basierten Schnelltest könnten rekombinante Ras-Sonden mit RRSP-Cystein-Mutanten (RRSP_{C1,...,Cn}) kombinatorisch auf die Bildung eines ternären Ras-uAA:RRSP_{Cx}-Komplexes evaluiert werden.

Die kristallographische Strukturanalyse des gewonnenen Komplexes könnte zunächst ein detailliertes Bild der Ras:RRSP-Interaktionen auf molekularer Ebene liefern und ggf. das hier entwickelte Ras-Bindemodell korrigieren oder vervollständigen. Die gewonnenen Einsichten würden helfen, die hohen Umsatzraten von RRSP und die geringe Affinität sowie die Substraterkennung im Detail zu verstehen.

Über den Rahmen der Grundlagenforschung hinaus hat RRSP durch seine hohe Potenz als spezifisches Zellgift eine gewisse Signifikanz als potenzielles Krebstherapeutikum²²⁸. Die Erkenntnisse aus der Strukturanalyse könnten helfen RRSP als Therapie Kandidaten zu etablieren. Ein molekulares Verständnis der Substraterkennung könnte es ermöglichen, die Substratspezifität von RRSP über eine Strategie der gerichteten Evolution²²⁹ selektiv auf eine andere kleine GTPase zu richten. Dies würde die Zahl der therapeutischen Anwendungsmöglichkeiten drastisch erhöhen, indem man RRSP als Stammhalter neuartiger, spezifischer Proteasen etabliert, die selektiv gegen verschiedene GTPasen gerichtet werden könnten. Solche molekularen Werkzeuge hätten sowohl in der Grundlagenforschung als auch in der klinischen Anwendung ein großes Potenzial um zukünftig die Funktionen und Regulationsprinzipien kleiner GTPasen besser zu verstehen und neuartige Therapieansätze zu entwickeln.

6. Material und Methoden

6.1. Material

Die verwendeten Materialien wurden aus folgenden Quellen, geordnet in alphabetischer Folge, bezogen:

Tabelle 4: Register aller kommerziellen Quellen verwendeter Materialien: Chemikalien und Reagenzien (■), Verbrauchsmitteln (■) sowie Instrumentenhersteller und Softwareanbieter (■).

Kommerzielle Quellen verwendeter Materialien*		
<i>Agilent</i> , Waldbronn, D ■	<i>Fluka, Sigma Aldrich</i> , Steinheim, D ■	<i>New Brunswick</i> Eppendorf, Hamburg, D ■
<i>Alfa Aesar</i> , Karlsruhe, D ■	<i>GE Healthcare</i> , Freiburg, D ■	<i>New England Biolabs (NEB)</i> , Ipswich, MA, US ■■
<i>AppliChem</i> , Darmstadt, D ■	<i>Heidolph</i> , Schwabach, D ■	<i>Pharmacia</i> , Uppsala, S ■
<i>Atto-tec</i> , Siegen, D ■	<i>Hellma</i> , Müllheim, D ■	<i>Phenomenex</i> , Aschaffenburg, D ■
<i>Beckman Coulter</i> , Brea, CA, USA ■	<i>Heraeus</i> , Hanau, D ■	<i>Promega</i> , Mannheim, D ■
<i>Berrytec</i> , Grünwald, D ■	<i>Horiba Jobin Yvon</i> , Fukuoka, J ■	<i>Roche</i> , Penzberg, D ■
<i>Binder</i> , Tuttlingen, D ■	<i>Integrated DNA Technologies, IDT</i> , Leuven, B ■	<i>Sarstedt</i> , Nümbrecht, D ■
<i>BioRad</i> , München, D ■	<i>Jasco</i> , Easton, MD, USA ■	<i>Serva</i> , Heidelberg, D ■
<i>Bischoff Chromatographie</i> , Leonberg, D ■	<i>Jena Bioscience</i> , Jena, D ■	<i>Shimadzu</i> , Tokio, J ■
<i>Brand</i> , Wertheim, D ■■	<i>Kern</i> , Balingen, D ■	<i>Sigma Aldrich</i> , St. Louis, MI, US ■■
<i>Branson</i> , Fürth, D ■	<i>Labnet international</i> , Edison, NJ, USA ■	<i>Sigma</i> Laborzentrifugen, Osterode am Harz, D ■
<i>Braun</i> , Melsungen, D ■	<i>Leica</i> , Wetzlar, D ■	<i>StarLab</i> , Hamburg, D ■
<i>Carbosynth Ltd.</i> , Berkshire, UK ■	<i>Leybold</i> , Köln, D ■	<i>Systec</i> , Linden, D ■
<i>Carl Roth GmbH</i> , Karlsruhe, D ■	<i>Lonza AG</i> , Basel, CH ■	<i>Thermo Scientific</i> , Wilmington, USA ■■
<i>Constant systems</i> , Low March, UK ■	<i>Malvern Instruments</i> , Malvern, UK ■	<i>VWR Amresco</i> , Solon, Ohio, US ■
<i>Corning</i> , Lowell, MA, USA ■	<i>Merck Millipore</i> , Cork, IRL ■	<i>VWR Prolabo Chemicals</i> , Leuven, B ■
<i>Eppendorf</i> , Hamburg, D ■	<i>NanoTemper</i> , München, D ■■	<i>VWR</i> , Radnor, PA, USA ■
<i>Fisher Scientific</i> , Carlsbad, CA, US ■		

* Im Weiteren werden als Abkürzungen lediglich die in kursiv gestellten Firmenbezeichnungen verwendet.

6.1.1. Chemikalien

Der Reinheitsgrad aller eingesetzten Chemikalien betrug mindestens 99 % (reinst. (*lat.: purissimum*) oder zur Analyse geeignet (*lat.: pro analysis; p.a.*)), soweit nicht anders angegeben. Für die Herstellung von Pufferlösungen sowie Nährmedien wurde doppelt-destilliertes Wasser ($_{\text{dd}}\text{H}_2\text{O}$) verwendet. Im Folgenden werden häufig verwendete Chemikalien aufgeführt. Pufferlösungen für die chromatographische Anwendungen wurden filtriert (40 μm Ausschluss) und entgast.

Tabelle 5: Aufführung häufig verwendeter Chemikalien mit Herstellerangaben.

Chemikalien	Hersteller	Chemikalien	Hersteller
Acetonitril	Fisher Scientific	HEPES Natriumsalz	Carl Roth
Agarose für die Molekularbiologie	Serva	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG)	Carbosynth
Ameisensäure	Fluka	Isopropanol, biology grade	VWR Prolabo
Ammoniumpersulfat (APS)	VWR Amresco	Magnesiumchlorid	VWR Prolabo
β -Mercaptoethanol (BME)	VWR Prolabo	mant-GDP	Jena Bioscience
Bromphenolblau	Alfa Aesar	mant-GTP	Jena Bioscience
Coomassie® Brilliant Blau R-250	AppliChem	Methanol	Fluka
di-Natriumhydrogenphosphat	Carl Roth	Natriumazid	Alfa Aesar
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Fluka	Natriumchlorid	VWR Prolabo
1,4-Dithiothreitol (DTT)	Carl Roth	Natriumdihydrogenphosphat	Carl Roth
Essigsäure	VWR Prolabo	Natriumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth
Ethanol, biology grade	VWR Prolabo	Natriumhydroxid	Carl Roth
Ethanol, technisch	TUM Versor-	Nickelsulfat Hexahydrat	Carl Roth
EDTA Natriumsalz	AppliChem	Phenylmethylsulfonylfluorid	VWR Amresco
D-Glukose	Carl Roth	Salzsäure	VWR Prolabo
L-Gluthathion (GSH)	Carl Roth	TBA Br	Alfa Aesar
Glycerin	Carl Roth	TEMED	VWR Amresco
Glycin	Carl Roth	Trifluoressigsäure (TFA)	Carl Roth
Guanidiniumhydrochlorid	VWR Prolabo	TRIS-HCl	Carl Roth
Guanosin-5'-[(β , γ)-imido]-Triphosphat (GppNHp)	Jena	Xylencyanol	AppliChem
Guanosin-5'-Diphosphat (GDP)	Carbosynth		
Guanosin-5'-triphosphat (GTP)	Carbosynth		

6.1.2. Enzyme, Reagenzien, Antibiotika und Standards

Alle Enzyme wurden bei -20°C gelagert und in den vom Hersteller bereitgestellten Puffer sowie der empfohlenen Konzentration eingesetzt.

Tabelle 6: Aufführung der verwendeten Enzyme, Reagenzien, Antibiotika sowie Referenz- und Größenstandards mit Herstellerangaben.

Enzyme	Reagenzien		
Alkalische Phosphatase	NEB	Gelstar-DNA Färbelösung	Lonza
DNase I (lyophilisiert)	AppliChem	SYPRO®-Orange Protein stain	Sigma
Lysozym (lyophilisiert)	Roth	1,2-epoxy-3-(p-nitrophenoxy)propane (EPNP)	Sigma
PreScission Protease	AG Itzen	Dimethylamineborane Komplex (ABC; 97%)	Sigma
Q5®-DNA Polymerase	NEB	Formaldehyd-Lösung (37% aq.)	Sigma
Quick Ligase	NEB	ATTO488-Maleimid	Atto-tec
Restriktionsenzyme	NEB	Farnesylpyrophosphat (FPP)	Sigma
T4-DNA Polymerase	NEB	Geranylgeranylpyrophosphat (GGPP)	Sigma
OneTaq DNA Polymerase	NEB	Bradford-Lösung (amresco)	VWR
TEV Protease	AG Itzen	Pepstatin A	Roche
Trypsin (MS grade)	Sigma	DNA-Färbelösung (Stain G)	Serva
Farnesyl Transferase (α/β)	AG Itzen	E-64 (Protease Inhibitor)	Sigma
Geranylgeranyl Transferase	AG Itzen		

Antibiotika (finale Konzentration)		Referenzstandard	
Ampicillin 126 µg/ml	AppliChem	Protein Test Mixture 6 (SDS-PAGE)	SERVA
Chloramphenicol* 34 µg/ml	AppliChem	1kb-DNA Leiter	NEB
Kanamycin 50 µg/ml	AppliChem	Gelfiltrationsstandard (#1511901)	BioRad
		HPLC G-Nukleotid Standard (je 50 µM GMP, GDP, GTP o. GppNHp)	AG Itzen

* Stocklösung in Ethanol

6.1.3. Bakterien-, Hefestämme, Zelllinien und Plasmide

Alle verwendeten Zellen wurden entsprechend den Herstellerangaben oder den Empfehlungen der ATCC (American Type Culture Collection) kultiviert. Lediglich nicht genetisch veränderte Zellen wurden für die Langzeitlagerung präpariert. Bakterielle Kryo-Stocklösungen wurden mit 30% (v/v) Glycerin in LB-Medium mittels flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert. Übernachtkulturen der Hefestämme wurden für die Langzeitlagerung mit 50% Glycerin (v/v) in YAPD-Medium langsam auf -80°C eingefroren und gelagert. Bakterien und Hefestämme wurden auf geeignete Nährboden ausgestrichen und bei 37°C bzw. bei 30°C kultiviert bevor Experimente ausgehend von einer Einzelkolonie gestartet wurden. Menschliche Zelllinien wurden in DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) mit 10% FCS (Fetales Kälberserum; engl. *fetal calf serum*) in flüssigem Stickstoff schockgefroren und gelagert. Für die Anzucht wurde ein Aliquot in 50 mL DMEM (+10 % FCS) angeimpft und mit 5% CO₂ bei 37°C kultiviert.

Tabelle 7: Auflistung aller verwendeten Bakterien-, Hefestämme sowie Zelllinien und ihre Quellen.

Bakterienstamm	Genotyp	Quelle
<i>E. coli</i> BL21 (DE3) RIL	B F ⁻ <i>ompT hsdS</i> (rB ⁻ mB ⁻) <i>dcm</i> ⁺ Tetr <i>gal</i> λ(DE3) <i>endA Hte</i> [<i>argU ileY leuW</i> (Cam ^R)]	Stratagene, Agilent Technologies, Waldbronn, D
<i>E. coli</i> Rosetta2 (DE3)	F- <i>ompT hsdSB</i> (r _B - m _B -) <i>gal dcm</i> (DE3) pRARE2 (Cam ^R)	Novagen [®] , Merck KGaA, Darmstadt, D
<i>E. coli</i> Mach1	Δ <i>recA1398 endA1 tonA</i> Φ80Δ <i>lacM15 ΔlacX74 hsdR</i> (r _K -m _K +)	Invitrogen [®] , Thermo Fisher Scientific, MA, USA
<i>E. coli</i> XL1 blue	<i>endA1 gyrA96(nalR) thi-1 recA1 relA1 lac glnV44 F'</i> [::Tn10 proAB ⁺ lacIq Δ(<i>lacZ</i>)M15] <i>hsdR17</i> (r _K - m _K +)	Stratagene, Agilent Technologies, Waldbronn, D
<i>Salmonella</i> ssp. Typhimurium strain SL1344 Δ <i>gtgE</i>	Basiert auf dem Referenzstamm mit der <i>Taxonomy ID</i> : 216597 Δ <i>gtgE</i>	Dr. Daniel Humphreys, University of Sheffield, Sheffield, UK, vormals Cambridge University
Hefestamm	Genotyp	Quelle ¹
Δ <i>Gal</i> L40	<i>MATa ade2Δ0 his3Δ0 leu2Δ0 trp1Δ0 LYS::lexA-HIS3 URA3::lexA-LacZ</i>	ATCC [®] MYA-3332 [™]
Y187	<i>MATa, ura3-52, his3-200, ade2-101, trp1-901, leu2-3, 112, gal4Δ, met-, gal80Δ, MEL1, URA3::GAL1_{UAS} -GAL1_{TATA}-lacZ</i>	Clontech Laboratories Inc., Mountain View, CA, USA
BY4741	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0</i>	ATCC [®] 4040002 [™]

Humane Zelllinie	Phenotyp	Quelle ¹
<i>HeLa</i>	Adherent Humanes Cervixepithelcarcinom	ATCC® CCL-2™
<i>NIH3T3</i>	Adherent, embryonale mäuse Fibroblasten	ATCC® CRL-1658™

1. ATCC: American Type Culture Collection

Nachfolgend sind die verwendeten Plasmide mit darin kodierten wildtypischen Proteinen gelistet und sofern nicht anders indiziert wurden diese im Rahmen der vorliegenden Arbeit erzeugt.

Tabelle 8: Liste der verwendeten DNA-Plasmide mit den darin kodierten wildtypischen Proteinen und den Referenzen zur NCBI Datenbank.

Plasmide für die Expression in		Kodierendes Protein	NCBI Ref
<i>S. cerevisiae</i> (Plasmid ID)	<i>E. coli</i> (Plasmid ID)		
	pMAL:: <i>malE</i> (2930) ¹	<i>synthetisches</i> Maltosebindendes Protein (MBP)	NP_418458.1
pLexA:: <i>rab29</i> (M464)	pMAL:: <i>rab29</i> (M169)	<i>human</i> Rab29 (auch Rab7L1)	NP_001129134.1
pLexA:: <i>rab32</i> (M545)	pMAL:: <i>rab32</i> (M176)	<i>human</i> Rab32	NP_006825.1
pLexA:: <i>rab38</i> (M466)	pMAL:: <i>rab38</i> (M170)	<i>human</i> Rab38	NP_071732.1
pLexA:: <i>rab23</i> (M458)	pMAL:: <i>rab23</i> (M979)	<i>human</i> Rab23	NP_001265595.1
	pMAL:: <i>Hras</i> (M359) ²	<i>human</i> HRas;	NP_001123914.1
	pMAL:: <i>Kras</i> (M361) ²	<i>human</i> KRas	NP_004976.2
	pMAL:: <i>ANKRD27</i> (M1844)	<i>human</i> VARP ₄₅₁₋₆₄₀	NP_115515.2
pGAD-HA:: <i>gtgE</i> (M701)	pMAL:: <i>gtgE</i> (M133)	<i>Salmonella</i> ssp. Typhimurium GtgE	CBW17091.1
pGAD-HA:: <i>gtgE</i> _{C45A} (M697)	pTrc:: <i>gtgE</i> (Expression in <i>Salmonella</i>) (M829)		
	pMAL:: <i>sopD2</i> (M941) ³	<i>Salmonella</i> ssp. Typhimurium SopD2	NP_459947.1
p416-GAL1::RRSP (M1340)	pMAL:: <i>rtxA</i> ₁₃₅₉₁₋₄₀₈₈ (M1248) ⁴	<i>Vibrio vulnificus</i> DUF5 _{Vv} /RRSP ⁴	WP_011081430.1 NC_005140.1

(1) MPI Dortmund, Labor für Physiologische Biochemie, Prof. Goody, diente auch als Ausgangspunkt für alle aufgeführten pMAL-Plasmide (2) Christina Dormeier, TUM Labor für Proteinchemie Prof. Itzen; (3) Maria Rosenegger, TUM Labor für Proteinchemie Prof. Itzen; (4) Fragment des MARTX Proteins 3596-4088 aa (RtxA Gen).

6.1.4. Verbrauchsmaterialien, Instrumentation und Zubehör

Häufig verwendete Verbrauchsmittel sind nachfolgend aufgeführt.

Tabelle 9: Liste der verwendeten Verbrauchsmittel sowie die Herstellerangaben.

Verbrauchsmittel	Hersteller	Verbrauchsmittel	Hersteller
Bottle-Top-Filter (steril, 45µm)	Berrytec	Reaktionsgefäße (PE; 1,5 mL, braun) Reaktionsgefäße (PE; 1,5 mL, LoBind)	Eppendorf Eppendorf
Dialyseschlauch (MWCO 12-14K)	Serva	Reaktionsgefäße (PE; 15 mL, 50 mL)	Sarstedt
Dialyse Kit Pur-A-Lyzer™ (50-800 µL, 6-8 kDa MWCO)	Sigma	Serologische Pipetten (PS; 5 mL, 10 mL, 25 mL, 50 mL)	Sarstedt
Konzentratoren Spin-X UF 500	Corning	Pipettenspitzen (1-10 µL) Pipettenspitzen (10-100 µL)	StarLab, Sarstedt
Küvetten (UV-Vis)	Sarstedt	Pipettenspitzen (100-1000 µL)	Brand
Membranfilter (20-45µM)	Merck	Spritzenvorsatzfilter (20 µM + 45 µM)	Carl Roth
Pasteurpipetten (Glas)	Brand	Spritzen & Kanülen (Inject) 1-20 mL	Braun
PCR-Reaktionsgefäße (0,2 mL)	Sarstedt	Zellkulturflaschen (steril)	Sarstedt
Petrischalen (Rund u. Quadratisch)	Sarstedt	ZipTips C18	Merck
Reaktionsgefäße (1,5 mL; 2,0 mL)	Roth		

Im Folgenden werden alle verwendeten Instrumente aufgeführt. Die verwendeten Glasinstrumente wie Schraubglasflaschen, Erlenmeyerkolben und Bechergläser wurden aus verschiedenen Quellen bezogen und waren alle aus Borosilikatglas gefertigt.

Tabelle 10: Liste der verwendeten Instrumente und Chromatographiezubehör, einschließlich der Typen und Herstellerangaben.

Instrument	Typenbezeichnung	Hersteller
Agarose Gelelektrophoresekammer	Mini-Sub® Cell GT	Biorad
Analysenwaage	ACJ 120-4M	Kern
Autoklav	Systec VE-65	Systec
CD-Spektrometer	J-715	Jasco
CO ₂ -Inkubator	HERACELL 150i	Thermo
Elektronische Pipettierhilfe	Eppendorf Easypet®	Eppendorf
Labledrucker	GK420t	Zebra Technologies
LC-ESI-Massenspektrometer	MS: Heated-ESI-LCQ Fleet HPLC: Ultimate 3000 -Pumpe, -Autosampler, -Säulenkompartiment, Ultimate RS Variable Wavelength Detector	Thermo, Dionex
Feinwaage	EG 2200-2NM	Kern
Multikanal-Fluoreszenzmikroskop	BX51	Olympus
Fluoreszenzspektrometer	Fluoromax-3/-4	Horiba
FPLC	ÄktaPrime Plus	GE Healthcare
Gefrierschrank (-80°C)	U410 Freezer	New Brunswick
Heizblock	AccuBlock™ Digital Dry Bath	Labnet
HPLC-System	Kommunikationseinheit: CBM 20A Pumpe: LC-20AD Autosampler: SIL-20AV	Shimadzu

	UV-Detektor: SPD-20AV Fraktionierer: FRC-10A	
Inkubationsschüttler	Innova 44	New Brunswick
Lichtmikroskop	Leica DM IL	Leica
Orbitalschüttler	OmniMax 1000	Heidolph
PAGE-Gelelektrophoresekammer	Mini Protean™ Tetra System	BioRad
pH-Meter und Elektrode	pHenomenal™ und pHenomenal 111	VWR
Pipetten	Eppendorf Research plus®	Eppendorf
Scanner	HP Scanjet G4050	Hewlett-Packard
Sterilbank	HERAsafe	Thermo
Stromversorgung	PowerPac™ Basic, EPS 601	BioRad, Pharmacia
Thermo-Cycler	T100™ Thermal Cycler	BioRad
Thermomixer	Thermomixer comfort	Eppendorf
Tischzentrifuge	5424, 5424R, 5810R	Eppendorf
Transilluminator	Weißlicht: FL-3 LED, Blaulicht: BlueLight Table	Rex Leuchtplatten, Serva
Ultraschallgerät	Sonifier 250	Branson
Umlufttrockenschrank	FD 240	Binder
UV-Vis Spektralphotometer	NanoDrop2000 Spectrophotometer, Novaspec II	Thermo, Pharmacia
Vakuumpumpe	Divac 2.4L	Leybold
Vortex	Reax Top	Heidolph
Wasseraufbereitungssystem	TKA-GenPure 08.223	Thermo
Zellaufschlussmaschine	Constant Cell Disruption Systems	Constant systems
Zentrifuge	Avanti® J-26 XP, Rotor JA 25.50, Sigma 8K, Rotor,	Beckmann, Sigma,
Chromatographiezubehör	Typenbezeichnung	Hersteller
Ni-IMAC-Kartuschensäule	HiTrap 5 mL; 1mL	GE Healthcare
Maltose-Kartuschensäule	MBP Trap HP, 5 mL	GE Healthcare
Entsalzungskartuschensäule	HiPrep desalting 5 mL	GE Healthcare
Gelfiltrationssäulen	preparativ: Superdex 75 o. 200, 16/60 analytisch: Superdex 75, 10/30	GE Healthcare GE Healthcare
Umkehrphasen Chromatographie- säulen*	ProntoSIL C18 5µm 250x4.6, 120Å, AQ Jupiter, C4 5µm 150x2mm, 300Å	Bischoff Phenomenex

* inkl. Vorsäulen und entsprechender Halterung.

6.1.5. Häufig verwendete Lösungen und Wachstumsmedien

Alle Bestandteile von Nährmedien wurden durch Autoklavieren oder Filtration (20 µm Porenausschluss) sterilisiert. Selektivmedien wurden über die Zugabe von Antibiotika (für Bakterien) oder Aminosäuren bzw. Nukleobasen (für Hefen) hergestellt.

Tabelle 11: Zusammensetzung von Stocklösungen und Feststoffgemischen für die Herstellung von Hefeselektionsmedien (SD-Medien).

Aminosäure aa-5 mix Pulver (–ade –trp –his –leu –ura)	100x Stocklösungen für SD-Medien (autoklaviert, RT-Lagerung)
2 g je proteinogener L-Aminosäure (Roth) außer: Trp; His; Leu	4,2 g/L Uracil (Sigma) (filtriert)
2 g myo-Inositol (meso-Inosit; Sigma)	1,0 g/L Adeninhemisulfat (Sigma)
0.2 g para-Aminobenzoesäure (Sigma)	2,4 g/L L-Histidin (Roth)
- <i>all Bestandteile fein gemörsert und lichtgeschützt gelagert bei Raumtemperatur.</i>	4,8 g/L L-Tryptophan (Roth) (filtriert; 4°C)
	7,2 g/L L-Leucin (Roth)

Tabelle 12: Zusammensetzung häufig verwendeter Lösungen und Wachstumsmedien.

Lösungen für die SDS-PAGE	Sonstige Lösungen
Acrylamid Acrylamide/Bis Lösung, 37.5:1 (30% w/v); 2,6% Crosslinker (Serva)	DNA-Ladepuffer (10x) 50% (v/v) Glycerin 10 mM EDTA 0,2% (w/v) Bromphenolblau 0,2% (w/v) Xylencyanol
Polymerisationsstarter Ammoniumpersulfat Lösung in d_4H_2O (APS 10%; w/v; 200x); Tetramethylethylendiamin (TEMED; VWR; 2000x)	NE-Puffer (10x) 500 mM Tris HCl, pH 8 2 M $(NH_4)_2SO_4$ 100 μ M $ZnCl_2$
SDS-PAGE Sammelgelpuffer (4x) 0,5 M Tris-HCl, pH 6,8 0,4% (w/v) SDS	'One-Step'-Hefetransformationspuffer 0.2 M Lithium Acetat 40% PEG 4000 (alternative PEG 3350) 100 mM DTT
SDS-PAGE Trenngelpuffer (4x) 1,5 M Tris-HCl, pH 8,8 0,4% (w/v) SDS	PBS (20x) 2,74 M NaCl 53,7 mM KCl 202 mM Na_2HPO_4 (2x H_2O) 35,2 mM KH_2PO_4
SDS-PAGE Probenpuffer (2x) 0,1 M Tris-HCl, pH 6,8 4% (w/v) SDS 20% (w/v) Glycerin 10% (v/v) β -Mercaptoethanol 0,002% (w/v) Bromphenolblau	TAE-Puffer (50x) 1 M Tris-HCl pH 8,0 2 M Essigsäure 0,5 M EDTA
SDS-PAGE Laufpuffer (10x) 0,25 M Tris-HCl 2 M Glycin 1% (w/v) SDS	Zuckerstocklösungen Glukose 50% bzw. 20% (v/v) autoklaviert Galaktose 40% steril filtriert Raffinose 40% steril filtriert
SDS-PAGE Färbelösung 12% (v/v) Essigsäure 44% (v/v) Ethanol 0,15% (w/v) Coomassie Brilliant Blue R-250	
SDS-PAGE Entfärbelösung 12% (v/v) Essigsäure	
Wachstumsmedien	
LB-Medium (Carl Roth) Hefeextrakt 5 g/L Trypton 10 g/L NaCl 5 M Agar (Serva) 20 g/L (optional)	YAPD-Medium Hefeextrakt 10 g/L Pepton (Serva) 20 g/L Glukose 20 g/L (aus Stocklös.) Adenin Sulfat 1 g/L Select Agar (Sigma) 20 g/L (optional)
SOB-Medium Hefeextrakt 5 g/L (Carl Roth) Trypton 20 g/L (Serva) NaCl 5 M	Selection Dropout (SD-)Medium aa-5 Pulver-Mix 1 g/L Aminosäure Stocklösung je 10 mL/L

KCl	3 M	Nukleobasen Stocklösung	je 10 mL/L
MgCl ₂	1 M	Glukose (20% Stocklösung)	20 g/L
SOC-Medium		Select Agar (Sigma)	20 g/L (optional)
SOB-Medium			
Glukose	3,96 g/L (20% Stock)		

6.1.6. Software

Für die Textproduktion wurde Word2013 (Microsoft Corporation, USA) und für die Verwaltung der Literaturverweise Citavi5 (Swiss Academic Software GmbH, CH) verwendet. Datenanalysen und die graphische Darstellung der Ergebnisse wurden sowohl mit Excel2013 (Microsoft Corporation, USA) als auch OriginPro 2017G (OriginLab Corporation, USA) durchgeführt. Massenspektrometrische Rohdaten wurden mit dem *Magic Transformation* Algorithmus (MagTran v.1.02)²³⁰ analysiert. Repräsentationen von Proteinstrukturen wurden mit PyMOL (PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.8 Schrödinger, LLC) und chemischen Strukturen mit ChemDraw (PerkinElmer Corporation, USA) erstellt. Die Illustration und Bearbeitung von Grafiken erfolgte mit den frei verfügbaren Programmen GIMP v. 2.8 (*GNU Image Manipulation Program*) und InkScape v.0.92. Spezielle Software wird mit den eingesetzten Instrumenten/Methoden beschrieben.

6.2. Molekularbiologische Methoden

6.2.1. Polymerasekettenreaktion

Bei der Polymerase Kettenreaktion (engl. *polymerase chain reaction*, PCR) werden Fragmente ausgehend von einer DNA-Vorlage - dem Templat - enzymatisch *in vitro* vervielfältigt. Die Reaktion durchläuft temperaturgesteuerte Zyklen des Aufschmelzens von doppelsträngiger DNA, über die Anlagerung von Oligonukleotiden (engl. primer), hin zur Erstellung des Gegenstrangs durch eine hitzestabile DNA-Polymerase (Elongation) mittels Deoxyribonukleotiden (dNTPs). Die PCR wurde sowohl präparativ, für die molekularbiologische Erstellung von rekombinanten Plasmiden als auch analytisch, für deren Überprüfung eingesetzt. Alle Reaktionen wurden mit einem T100™ Thermocycler (BioRad) in 200µL-PCR-Reaktionsgefäßen durchgeführt. Bei analytischen Ansätzen wurden bakterielle Einzelkolonien in 20 µL PBS für den Einsatz als Templat resuspendiert. Typische PCR Ansätze sowie die durchlaufenen Temperaturzyklen sind in der folgenden Abbildung zusammengefasst.

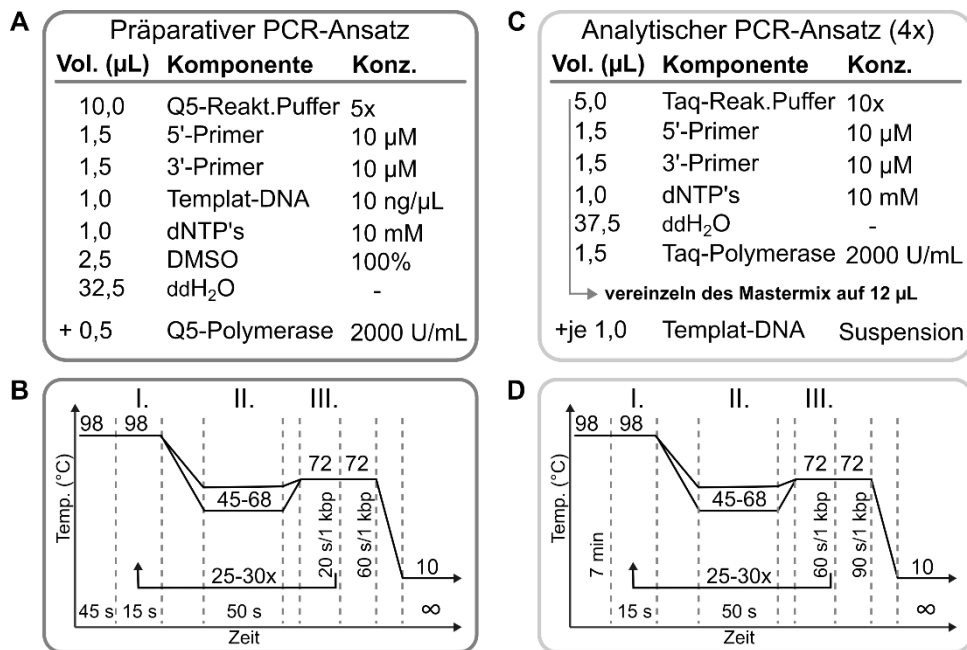


Abbildung 45: Verwendete PCR-Reaktionsansätze und Temperaturzyklusprogramme. A Präparative PCR-Zusammensetzung. **B** Flusschema verwendeter Temperaturzyklen präparativer PCRs. I. DNA-Denaturierung II. Primer-Anlagerung III. DNA-Elongation. **C** Analytische PCR-Zusammensetzung. **D** Flusschema verwendeter Temperaturzyklen analytischer PCRs. I-III. siehe B.

Das Entwerfen der Primer erfolgte manuell unter Berücksichtigung der Schmelztemperatur (48-70°C), des GC-Gehalts (45-57%) und des Kodongebrauchs (engl. *codon usage*) im *E. coli* K12 Stamm bzw. in *S. cerevisiae*. Für die Überprüfung und Optimierung der Primersequenzen auf mögliche unerwünschte Hairpin- oder Heterodimer-Strukturen sowie weiterer Parameter, wurde das Oligo-Analyzer Web-Programm der Firma IDT (Integrated DNA Technologies, Leuven, B) verwendet (eu.idtdna.com/calc/analyzer). Alle Oligonukleotide wurden von der Firma IDT oder Sigma Aldrich (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D) als Feststoff bezogen und als 100 µM Stocks in nukleasefreiem Wasser angesetzt.

6.2.2. DNA-Isolation aus *E. coli*

Für molekular- und zellbiologische Experimente oder Techniken werden häufig hochreine sowie hoch konzentrierte DNA-Präparationen benötigt. Diese werden zunächst über die Kultivierung von *E. coli*-Zellen die mit der gewünschten DNA transformiert wurden vervielfältigt. Anschließend wurde die DNA aus 4 mL *E. coli*-Übernachtskulturen (XL1 blue oder Mach1) mit dem Pure Yield™ Plasmid Miniprep System (Promega) nach Herstellerangaben isoliert und mit 30 µL ddH₂O in sterile 1,5 mL-Reaktionsgefäße eluiert. Die Konzentration wurde lichtspektroskopisch bestimmt (NanoDrop 2000, Thermo Scientific, USA) und die DNA wurde bei -20°C gelagert. Sie Sequenzidentität wurde mittels Sanger-Sequenzierung festgestellt, die auf AB1-Sequenzierautomaten (Applied Biosystems; Thermo) der Firma GATC-Biotech GmbH (Köln, D) durchgeführt wurde. Hierzu wurden 5 µL eines 5 µM Sequenzierungsprimers mit 5 µL einer 80-100 ng/µL des gewählten Plasmids in einem 1,5 mL-Reaktionsgefäß gemischt und versandt.

6.2.3. DNA-Trennung und Reinigung

Das effektive Trennen von Nukleinsäuren von anderen biologischen Makromolekülen kann durch eine Agarose-Gelelektrophorese realisiert werden. Dabei macht man sich die starke negative Ladung der Nukleinsäuren zu Nutze, da diese deutlich schneller als etwa Proteine in einer geeigneten Gel-Matrix zur Anode wandern. Weil sich die Ladung proportionale zur Länge eines Oligonukleotids verhält, wird eine Auflösung von Nukleinsäuren nach ihrem molekularen Gewicht möglich. Typischerweise wurden 1%ige (w/v) Agarosegele mit TAE Puffer hergestellt und bei 100 V für 30-60 min in TAE-Puffer gefüllten Elektrophoresekammern entwickelt. Das Anfärben der DNA erfolgte mit Stain G (Serva), welches 1:50000 verdünnt bei der Gelherstellung eingesetzt wurde. Die Visualisierung erfolgte auf einem Transluminator, bestückt mit einer Lichtquelle im blauen oder UV-Spektrum. Als Größenstandard diente die *1kb-Ladder* (NEB). Zur weiteren DNA-Reinigung aus dem Agarosegelen oder aus flüssigen Reaktionsansätzen wurde das kommerziell verfügbare Monarch Gelsextraktions-Kit (NEB) nach Herstellerangaben verwendet und die DNA wurde in 10-20 μL ddH_2O eluiert.

6.2.4. DNA-Manipulationsstrategien

Das Einbringen von Mutationen, Deletionen, Insertionen oder eines DNA-Sequenzaustausches in Plasmiden erfolgte über die Überhang-Verlängerungs-PCR-Strategie (engl. *overlap extension PCR*). Hierbei werden die gewünschten Manipulationen im PCR-Primer kodiert. Zusätzlich enthält der Primer einen komplementären Überhang zu einer ortsspezifischen Zielsequenz. Durch die geschickte Kombination verschiedener überlappender PCR-Produkte als Template für weitere PCRs können die beschriebenen Änderungen realisiert werden und über diverse Ligationstechniken in Vektoren eingebracht werden (s. Abschnitt 6.2.6.). Stellvertretend für alle denkbaren Manipulationsarten wird im Folgenden die Einbringung von Punktmutationen beschrieben. Hierzu wurden zwei komplementäre Mutageneseprimer konzipiert, die eine Schmelztemperatur von 55-68°C, einen GC-Gehalt von 45-55% enthielten und sowohl in 5'- als auch 3'-Richtung mindestens acht komplementäre Basen zur wild typ Sequenz aufwiesen. Zusätzlich wurden flankierende Primer benötigt, die sowohl Anfang als auch Ende der zu vervielfältigenden Sequenz definierten und einen entsprechenden Überhang von mindestens 16 bp zum Zielvektor enthielten. Durch zwei separate PCRs (s. Abschnitt 6.2.1.) werden je ein 5'-Fragment als auch ein 3'-Fragment erzeugt, die in der Mutageneseprimersequenz überlappen. Nach einer analytischen Überprüfung in einer Agarosegelelektrophorese wurden je 0,5 μL jedes Fragments als geteilte Vorlage in eine folgende PCR eingesetzt, die lediglich die flankierenden Primer enthielt. Das resultierende Vereinigungs-PCR-Produkt erwarteter Länge wurde über eine Agarosegelelektrophorese getrennt und anschließend gereinigt. Die Ligation mit Vektoren erfolgte häufig nach der SLIC-Methode (s. Abschnitt 6.2.6.). Ein Vorteil dieser Methode bei Punktmutationen im Vergleich zu anderen

Verfahren ist der Zugang zu qualitativen analytischen DNA-Sequenzvalidierungsmethoden wie der PCR oder einem Kontrollverdau. Dies reduziert die Zahl der Sequenzierung falsch-positive Kolone erheblich²³¹.

6.2.5. Restriktionsverdau

Bei dem Restriktionsverdau einer dsDNA wird mittels Nukleasen der Doppelstrang sequenzabhängig hydrolytisch gespalten. Häufig sind die Erkennungssequenzen palindromisch und ortsspezifisch in vielen Vektoren eingesetzt. Dies erlaubt den ortsgerechten Einbau von genetischen Funktionselementen. Eine Ausnahme stellt DpnI dar, da es ausschließlich DNA-Stränge mit modifiziertem N⁶-Methyladenin spaltet. Es wird daher für den selektiven Verdau von Templat-DNA nach der PCR verwendet. Alle Restriktionsenzyme wurden von NEB bezogen und nach Herstellerangaben eingesetzt. Typischerweise wurden 2-4 µg Vektor-DNA und 1-2 µg PCR-Produkt in 20 µL-Ansätzen bei 37°C für 2-3 h in CutSmart-Puffer (NEB) verdaut. Vor der Analyse mittels Agarose-Gelelektrophorese wurden die Restriktionsenzyme hitzeinaktiviert bei 80°C für 20 min. DNA-Fragmente korrekter Länge wurden ausgeschnitten und gereinigt. Der Verdau von analytischen mengen Plasmid-DNA (100-200 ng) wurde für die Überprüfung von Klonierungen verwendet.

6.2.6. DNA-Ligationsstrategien

Für die ortsgerechte kovalente Verbrückung von DNA-Fragmenten gibt es neben der beschriebenen PCR basierten Zusammenfügung (s. Abschnitt 6.2.4.) weitere enzymkatalysierte Strategien zum Einführen spezifischer Sequenzen. In dieser Arbeit wurden die folgenden Strategien gleichwertig je nach Aufgabenstellung angewandt: klassische Verknüpfung von komplementären Restriktionsschnittstellen durch DNA-Ligase, das schnittstellen- und ligationsunabhängige Klonieren (engl. *site and ligation independent cloning* - SLIC) sowie die Zusammensetzung nach der Gibson-Methode (*Gibson-Assembly*)²³², welche eine Kombination beider Methoden darstellt.

Ligation: Für Ligationsreaktionen wurde die Quick Ligase (NEB) nach den Angaben des Herstellers verwendet. Hierzu wurden typischerweise 100 ng Vektor mit einem 2- bis 4-fachen molaren Überschuss eines entsprechenden PCR-Produkts in einer 10 µL Reaktion eingesetzt.

SLIC: Für eine erfolgreiche Zusammenfügung zweier oder mehr DNA-Fragmente ist ein Überhang an beiden Enden der beteiligten Fragmente erforderlich von 15-20 bp. Über eine strangspezifische 5'-Exonucleaseaktivität werden an den komplementären Sequenzen überlappende Einzelstränge erzeugt (sogenannte klebrige Enden; engl. *sticky ends*) die zwar paaren, aber *in vitro* nicht kovalent verknüpft werden. Dies geschieht erst in der *E. coli*-Zelle nach der Transformation mit Ligasen *in vivo*. Nach dem Mischen von 100 ng linearisiertem Vektor mit einem 2-fachen molaren Überschuss an gereinigtem PCR-Produkt wird mit NEB2.1-Puffer

versetzt (NEB) und die Reaktion wird auf 10 μL mit $\text{d}_2\text{H}_2\text{O}$ aufgefüllt. Die Zugabe von 0,2 μL T4-DNA-Polymerase (NEB) bei 25°C startet die Reaktion. In Abwesenheit von dNTPs wirkt nur die Exonukleaseaktivität der Polymerase. Nach 90 s auf Raumtemperatur wurde die Reaktion weitere 10 min auf Eis inkubiert.

Gibson-Assembly: Bei dieser Strategie werden ebenfalls komplementäre Überhänge zwischen den zu verbindenden Fragmenten benötigt. Eine Mischung aus Taq-Ligase, 5'-Exonuklease und der Q5-Polymerase (alle NEB) mit den DNA-Fragmenten in einer Eintopfreaktion in Anwesenheit von Deoxynukleotiden inkubiert. Hierbei sind alle Enzyme mit ihren teils gegensätzlichen Aktivitäten gleichzeitig aktiv und erzeugen nicht nur die einsträngigen Überhänge, sondern ligieren diese kovalent und erhöhen dadurch die Effektivität der Bakterienzelltransformation. Der *Gibson-Assembly-Mix* wurde im Arbeitskreis hergestellt und in 15 μL Aliquots bei -20°C gelagert. Dieser setzt sich für einen 1,2 mL-Ansatz wie folgt zusammen:

Tabelle 1: Zusammensetzung des *Gibson-Assembly-Mastermix*. Alle Lösungen wurden als Aliquots bei -20°C gelagert.

5x ISO Puffer		Gibson-Assembly-Mastermix
3 mL Tris-HCl pH 7.5 (1 M)	60 μL dGTP (100 mM)	320 μL 5X ISO Puffer
150 μL MgCl_2 (2 M)	60 μL dATP (100 mM)	0,64 μL T5 exonuclease (10 U/ μl)
300 μL DTT (1 M)	60 μL dTTP (100 mM)	20,0 μL Q5 Polymerase (2 U/ μl)
1,5 g PEG-8000	60 μL dCTP (100 mM)	160 μL Taq Ligase (40 U/ μl)
300 μL NAD^+ (100 mM)	$\text{d}_2\text{H}_2\text{O}$ auffüllen bis 6 mL	$\text{d}_2\text{H}_2\text{O}$ auffüllen bis 1,2 mL

Ein 15 μL -Aliquot wurde typischerweise mit 20-200 ng DNA, in äquimolarem Verhältnis von Vektor zu Insert gemischt und auf 20 μL mit $\text{d}_2\text{H}_2\text{O}$ aufgefüllt. Das Reaktionsgemisch wurde zwischen 30-60 min bei 50°C inkubiert.

Nach jeder Strategie folgte zur weiteren Analyse und Vervielfältigung, die Einbringung der behandelten DNA durch die Transformation chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen und die Isolation aus einer entsprechenden Bakterienkultur.

6.2.7. Klonierungen

Alle Klonierungen wurden mit den oben dargelegten Methoden durchgeführt. Alle GTPasen wurden aus bereits vorhandenen Plasmiden des MPI Dortmund in einen modifizierten pMAL-c2X Vektor eingebracht. Dieser enthält einem N-terminalen His₆-MBP-Anker verbunden durch eine TEV-Schnittstelle mit dem interessierenden Protein (POI engl. *protein of interest*). Die kodierenden Gene für GtgE und SopD2 wurden zum einen aus genomischer DNA von *Salmonella* ssp. Typhimurium SL1344 (Plasmid ID M934) amplifiziert und in den pTrc99a bzw. in den pMAL Vektor (Plasmid ID 2930) über die Schnittstellen NdeI und XhoI ligiert. Die Gene für GtgE und DUF5Vv/RRSP wurden ebenso als Codon-optimierte synthetische Genfragmente für die Expression in *E. coli* bezogen (Integrated DNA Technologies (IDT), Leuven, B; Geneart/Thermo, Regensburg, D; s. Tabelle 13) und in den pMAL Vektor integriert. Je

nach Fragestellung wurden davon ausgehend Plasmide für Experimente in Hefe generiert (s. Abschnitt 6.7.3. sowie 6.7.4.).

Tabelle 13. Codon-optimierte DNA-Sequenzen synthetischer Gene der Proteasen GtgE und RRSP/DUF5Vv. Die Optimierung erfolgt auf die Codon-Verwendung in *E. coli* K12. Aminosäuren des katalytischen Zentrums sind rot hervorgehoben. Zur besseren Unterscheidung ist die C1-Domäne aus RRSP dunkelgrau und die C2A-Domäne hellgrau hervorgehoben. Rot: Codone der katalytischen Reste

Synthetische GtgE DNA-Sequenz
ATGCTGCGCCATATTGAGAATAGCCTGGGTAGCGTTTATCGTAGCAATACCGCAACACCGCAGGGTCAGATTATTCAT CATCGTAATTTTCAGAGCCAGTTTGATACCACCGGTAATACCCTGTATAATAACTGTTGGGTTTGTAGCCTGAACGTGA TTAAGAAGCCGTGATGGTAATAACTATAGCGCACTGGAAGATATTACCAGCGATAATCAGGCCCTTAACAATATTCTGGA AGGCATCGACATTATCGAATGCGAAAATCTGCTGAAAGAAATGAACGTGCAGAAAATTCGGAAAGCAGCCTGTTTAC CAACATTAAGAAGCACTGCAAGCCGAAGTGTTAATAGCACCGTTGAAGATGATTTTCGAGAGCTTTATTAGCTATGAG CTGCAAAATCATGGTCCGCTGATGCTGATTTCGTCGAGCCTGGGTTTCAGAATGTCTGCATGCCGAATGATTGTTGGT TATGATAGCGAGGTTAAAAAAGTCTGATCTACGATAGCATGAATACCAGTCCGGAATGGCAGAGCAATATTGATGTTT ATGATAAATGACGCTGGCGTTCAACGATAAATACAAAATGAAGATTGCAGCATCTGCGGTCTGTATTATGATGGTGT TTATGAACCGAAACCGCTGCATAGCAGCAGCTGGAAGATTGGTGTACCATTCTGTAA
Synthetische RRSP/DUF5 DNA-Sequenz (Effektordomäne 3596-4088 aa aus RtxA _{Vv})
CAGGAAGTAAAGAACGCGCCAAGGTTTTTCGCAAAACCGATCGGTGCCAGCTACCAGGGTATTCTGGATCAGCTGGA TCTGGTGCATCAGGCCAAAGGCCGTGACCAGATCGCCGCCAGCTTCGAGCTGAATAAGAAAATTAATGACTATATTGC AGAACACCCGACAAGTGGTTCGTAATCAGGCCCTGACCCAGCTGAAAGAGCAGGTGACAAGCGCCCTGTTTATCGGCA AAATGCAGGTGGCCAGGCCGGCATTGACGCAATCGCACAGACACGTCCGGAAGTGGCAGCAGCAGTATCTTTATGGTG GCCATCGAAGAAGCTAATGGTAAGCATGTGGCCTGACCGATATGATGGTGCGTTGGGCCAATGAAGATCCTTACCTG GCACCGAAACATGGCTATAAAGGCGAAACCCGAGTGACCTGGGCTTCGACGCAAAGTATCATGTGGATCTGGGCGA ACATTACGCCGACTTTAAGCAGTGGCTGGAAACAGTCAGAGTAACGGCCTGTTAAGTAAGGCAACCTTAGACGAGAG CACCAAGACCGTTACCTGGGTTACAGCTATCAGGAATTACAAGATTTAACCGGCGCCGAGAGCGTGCAGATGGCCTT CTACTTCTGAAAGAGGCAGCTAAAAAGCAGACCCGATCAGCGGTGACAGCGCCGAGATGATTCTGCTGAAAAAGTT TGCAGACCAAAGCTATCTGAGTCAGCTGGACAGCGATCGCATGGACCAAATCGAGGGTATCTACCGTAGCAGCCATGA AACCGACATTGACGCATGGGATCGCCGTTATAGTGGCACCGGTTATGACGAGCTGACCAATAAGCTGGCCAGCGCA CCGGCGTTGATGAGCAGCTGGCCGTTCTGTTAGACGACCGCAAAAGGCCCTGCTGATTGGCGAAGTTCATGGCAGCGAT GTGAACGGTCTGCGCTTTGTTAACGAACAGATGGATGCCCTGAAGAAACAGGGCGTTACCGTATCGGCTTGAACAC CTGCGCAGCATCTGGCACAGCCGCTGATTGATCGCTACTTAGCAACCGGCGTTATGAGCAGCGAACTGAGCGCCAT GCTGAAGACCAAGCACCTGGACGTGACACTGTTGAAAATGCACGCGCCAACGGTATGCGTATCGTGGCCTTAGACG CCAATAGTAGCGCCCGCCGAATGTGCAGGGCACTGAGCACGGCCTGATGTATCGTGCAGGCGCCGCAACAATAT CGCCGTTGAAGTGTACAAAACCTGCCGGATGGCGAAAAATTCGTGGCCATCTATGGCAAGGCCATTTACAAAGCCA TAAAGGCATCGAGGTTTTGTGCCGGGCATACCCATCGTCTGGACTTACCTGCCCTGAAGGTGAGCGATAGCAACC AGTTCACAGTGAACAGGACGATGTGAGCCTGCGCGTGGTTTTATGACGACGTGGCCAATAAACCGAAAATTACCTTTA AAGGCAGTCTG

6.2.8. Transformation chemisch-kompetenter *E. coli* Zellen

Die Kompetenz eines Mikroorganismus beschreibt seine Befähigung zur Aufnahme von Fremd-DNA. Die Kompetenzmachung der *E. coli*-Stämme erfolgte über die Hanahan-Methode²³³. Typischerweise wurden 50-100 µL Zellen mit 0,2-1,0 µg Plasmid-DNA versetzt, 10 min auf Eis gekühlt und nach einem Hitzeschock für 1 min bei 42°C noch einmal 5 min auf Eis gehalten. Nach der Zugabe von 0,9 mL SOC-Medium wurden die Kultur bei 37°C für 45 min schüttelnd inkubiert. Das Plattieren folgte nach Zentrifugation (2 min, 2000 rpm) und Resuspension in ca. 100 µL des Überstands auf geeignetem Selektionsagar. Einzelkolonien waren nach der Inkubation bei 37°C über Nacht sichtbar.

6.2.9. Herstellung und Transformation elektro-kompetenter *Salmonella*-Zellen

Bei der Elektroporation wird die Kompetenz im Gegensatz zur chemischen Kompetenzmachung der DNA-Transfer in die Zelle durch ein kurz anhaltendes Gleichstrom-Hochspannungsfeld realisiert bei dem die stark geladene DNA die Zellwand ruckartig überwindet und in der Zelle verbleibt. Für die Herstellung der kompetenten Zellen wurde eine 200 mL *Salmonella*-Kultur in SOB-Medium, startend von einer Übernackkultur, auf eine OD₆₀₀ von 0,4 bei

37°C kultiviert und auf Eis zwei Mal mit je 200 mL eiskaltem, sterilem $\text{d}_2\text{H}_2\text{O}$ gewaschen. Die Ernteschritte wurden für 5 min mit 5000 rpm bei 4°C durchgeführt und der Überstand direkt verworfen. Danach wurden die Zellen in 100 mL sterilem Wasser versetzt mit 10% Glycerin (v/v) gewaschen, schließlich in 10 mL gleicher Lösung resuspendiert, als 100 μL Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert. Für die Transformation wurden 100 μL Zellsuspension auf Eis mit 0,1-0,5 μg Plasmid-DNA in einer sterilen Elektroporationskuvette (VWR) versetzt und nach 5 min auf Eis, für 1 s einem 12,5 kV/cm (25 μFD ; 200 Ω) Gleichstromfeld ausgesetzt (Gene Pulser™; BioRad). Die Zellen wurden darauffolgend für 30 min mit 1 mL SOC-Medium bei 37°C und 200 rpm kultiviert. Anschließend wurde die Suspension auf Selektionsagar plattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

6.2.10. Transformation von Hefezellen

Wie bei Bakterien ist die molekularbiologische Manipulation von Hefen als Modelorganismus die Grundlage für viele experimentelle Strategien, wie dem *in vivo* Protein-Protein-Interaktionsnachweis im sogenannten Hefe-Zwei-Hybrid (engl. *yeast two hybrid*, Y2H; s. Abschnitt 6.7.3.) oder Zelltoxizitätstests (s. Abschnitt 6.7.4.). Grundlage hierfür ist ebenfalls das Einbringen von DNA-Plasmide. Die Selektion erfolgt bei Hefen nicht über eine Antibiotikaresistenz, sondern über eine eingebrachte Auxotrophie um auf einem entsprechenden Mangelmedium wachsen zu können. Stammabhängig können mehrere Auxotrophien genutzt werden um eine Vielzahl von Plasmiden gleichzeitig einzubringen. Hierzu wurden frische Hefe-Einzelkolonien in 20 mL YAPD-Medium bei 30°C über Nacht und bei 200 rpm zu einer dichten, gelblich trüben Kultur inkubiert. Pro Transformation wurden 700 μL Kultur bei Raumtemperatur mit 2000 rpm für 2 min geerntet und der Überstand verworfen. Die Zellen wurden in 100 μL *One-Step-Buffer*²³⁴ resuspendiert und mit 1-2 μg Plasmid-DNA versetzt. Nach 15 min Inkubation bei Raumtemperatur folgte ein Hitzeshock für 30 min bei 45°C ohne die Reaktion zu schütteln. Die Zellen wurden danach direkt auf SD-Selektionsagar plattiert und für drei Tage bei 30°C inkubiert.

6.3. Synthetische Methoden

6.3.1. Peptidfestphasensynthese

Für die Untersuchung der Endopeptidaseaktivität bakterieller Proteasen wurden Peptide mit Sequenzen entlang der jeweiligen Spaltstelle mit der Fmoc-Schutzgruppen-Strategie (Fluorenylmethyloxycarbonyl) an der Festphase synthetisiert (engl: *Solid phase peptide synthesis*; SPPS). Die Vorgehensweise entspricht weitgehend der Methodik nach Barlos, Bollhagen und ihren Kollegen^{235,236}. In Kürze: Als Festphase diente 2-Chlorotriylchlorid-Harz (Novabiochem®, Merck) oder mit der ersten Aminosäure gekoppelte Harze (Sigma). Zur manuellen

Kopplung der ersten Aminosäure an das Harz wurde nach dem Quellen in DCM (1 h) mit einem 2-fachen molaren Aminosäureüberschuss in 5 mL DMC und 0,1 mL DIPEA (N, N-Diisopropylethylamin, Alfa Aesar) erst für 4 h gekoppelt, mit DCM gewaschen und anschließend weitere 30 min mit einer DCM/Methanol/DIPEA-Lösung (17:2:1 v/v) geschüttelt. Nach dem sequenziellen Waschen mit DCM-DMF-DCM je 3-mal und der Trocknung über Nacht in einem Exsikkator, wurde die Kopplungseffizienz gravimetrisch bestimmt. Alle Aminosäurebausteine waren N-terminal mit Fmoc- und die Seitenketten mit tert-Butyl-Gruppen (Fmoc-aa-(OtBu): Ser; Thr; Asp; Glu; Gyros Protein Technologies Inc., Tucson, AZ, USA) geschützt. Typischerweise wurden Reaktionsansätze von 0,07-0,2 mmol je Peptid gewählt und die Kopplungen automatisch an einem Syntheseroboter (PS3; Gyros Protein Technologies; AG Groll, TUM) oder manuell in einer 5-mL-Spritze durchgeführt. Dazu wurde das Harz 1-2 h in DCM (Dichlormethan; Fischer Scientific) gequell und 3-mal mit DMF (Dimethylformamid, Sigma) gewaschen. Nach der Fmoc-Entschützung (20% Piperidin in DMF; 5 min schütteln) und dem Waschen (3-mal DMF) erfolgte die Kopplung mit 2-fachem molaren Überschuss des Aminosäurebausteins mit entsprechender Menge HCTU als Aktivator (2-(6-Chlor-1H-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethylaminium-hexafluorophosphat, Alfa Aesar). Die Reaktion wurde in DMF für 45 min geschüttelt. Nach Koppelung der letzten Aminosäure wurde N-terminal mit einer Acetylgruppe geschützt (5 mM Acetanhydrid in DMF; 1 h; rotierend). Für die Spaltung vom Harz wurde zunächst 5-mal mit DCM gewaschen und nachfolgend für 1 h mit HFIP (Hexafluoroisopropanol, Sigma)/DCM (1:4 v/v) rotiert. Nach der Filtration der Suspension über Glaswolle, wurde das Filtrat über Vakuum vollständig eingeeengt und die orthogonalen Schutzgruppen über eine Lösung aus 95% Trifluoressigsäure (TFS, Sigma), 5% H₂O und 5% Triisopropylsilan (TIS, Sigma) abgespalten (3 mL; 1 h, rotieren). Nach dem Einengen auf ca. 500 µL, wurde die Mischung tropfenweise in kalten Diethylether (-20°C, optional -80°C) gegeben und das Präzipitat in der Kälte zentrifugiert (10 min; 4000 rpm). Nach Lufttrocknung wurde der weiße Feststoff in 50%-Acetonitril/Wasser (1:1; ACN:H₂O) gelöst, in Stickstoff gefroren und lyophilisiert. Für weiterführende Experimente wurden die Peptide in 50 mM HEPES (pH 8,5) mit 10 mg/mL gelöst. Die Identität aller Syntheseprodukte wurden mittels Massenspektrometrie validiert (s. Abschnitte 6.5.3. und 6.5.7.)

6.4. Proteinchemische Methoden

Die präparative Herstellung der Proteine für die nachfolgenden *in vitro* Studien erfolgte rekombinant in *E. coli* Stämmen, die das Gen für die T7 RNA Polymerase tragen (λ DE3 Lysogen; aus dem Bakteriophagen λ). Dessen Genexpression steht unter der Kontrolle des *lac*-Operons, insbesondere des *lac*-Repressor und des *lacUV5* Promotors. Dieser unterdrückt die Proteinproduktion, bis durch die Zugabe des Induktors Isopropylthiogalaktopyranosid (IPTG) der Repressor inhibiert wird und die Transkription der RNA erfolgen kann²³¹.

Alle Proteine bis auf die Rab-Interaktionspartner wurden in BL21(DE3)-RIL hergestellt. Rab-GTPasen und VARP-ANKRD1 wurden in Rosetta2 Zellen bei 15°C über Nacht exprimiert. Eine LB^{Amp,Cam}-Vorkultur wurde von einer Platte frisch transformierter Zellen angeimpft. Nach einer mehrstündigen Inkubation (2-5h, 37°C, 200 rpm) wurde die Hauptkultur mit 2-5% (v/v) mit gleichen Bedingungen inokuliert (OD_{600nm} ca. 0.05-0.1) und bis zu einer OD_{600nm} von 0.4-0.6 kultiviert. Nach einem kurzen Abkühlen bei 4°C für 30 min, wurde die Expression mit 0.3-0.5 mM IPTG (final) gestartet und für 16-20 h weiter inkubiert (20°C, 200 rpm). Nach der Zellernte (30 min, 5000 rpm, RT, Sigma K10) wurde das Pellet mit Phosphat gepufferter Saline (1x PBS) resuspendiert. Nach erneuter Ernte (10 min, 7000 rpm, 4°C, Sigma K16) wurde das Pellet in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -20°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

Im Allgemeinen folgte die Proteinreinigung dem nachfolgend beschriebenen Ablauf. Spezifische Details, wie Pufferzusammensetzungen, Abweichungen und weitere Reinigungsschritte werden in den anschließenden Abschnitten 6.4.1. bis 6.4.3. aufgeführt. Sofern nicht anders beschrieben, wurden die Proben bei allen Arbeitsschritten auf Eis oder bei 4°C gehalten.

Die Pellets wurden mit 10 mL Puffer A je Gramm Feuchtpellet resuspendiert (Ultratorax, Heidolph) und bei 2.0 kBar mit einer Passage mechanisch aufgeschlossen (Fluidizer, Constant Systems). Das Zelllysate wurde geklärt mittels Zentrifugation bei 20000 rpm (Rotor JA 25.50, Avanti, Beckman) für 30 min. Der Überstand wurde direkt auf eine mit Puffer A equilibrierte immobilisierte Metall-Affinitätschromatographie (Ni²⁺-Ionen-IMAC) Säule geleitet. Dem Waschschrift von mindestens sechs Säulenvolumen (engl. *column volumes*, CV) mit Puffer A folgte ein 6-8 CV Waschschrift bei 5-8% Puffer B und eine Elutionsgradient bis 50% Puffer B über 12 CV. Die Elutionsfraktionen wurden mittels SDS-PAGE analysiert (s. Abschnitt 6.5.5.) und möglichst homogen erscheinende Fraktionen wurden nach dem Vereinigen mit katalytischen Mengen TEV-Protease (engl. *Tobacco Etch Virus*) versetzt (Quelle AG Itzen). Die Proteinlösung wurde über Nacht gegen Dialysepuffer bei 4°C equilibriert (Dialyseschlauch 12 kDa MWCO, Serva). Zum Entfernen von TEV-Protease sowie dem abgetrennten His₆-MBP-Tag wurde die Proteinlösung ein weiteres Mal über eine Ni²⁺-IMAC geleitet und das interessierende Protein im Durchfluss bzw. in der 5% Puffer B Elutionsfraktion weiterverwendet. Typischerweise wurden die Proteine nach dem letzten Reinigungsschritt auf 1 mL mittels Zentrifugationskonzentrator (Amicon, Millipore, 4000 rpm) in einer Tischzentrifuge (5810 R; Eppendorf) eingeeengt. Die Identität aller Proteine wurde in einem LC-ESI-MS (s. Abschnitt 6.5.3.) verifiziert, die Proben in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

6.4.1. Reinigung kleiner GTPasen: Rab32, Rab29, Rab38, Rab23 sowie Ras

Dem Zellaufschluss folgend, wurde 1 mM Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF; final) zugesetzt. Wenn nach den Reinigungsschritten mit der Ni²⁺-IMAC noch signifikante Mengen an

MBP-Verunreinigung vorlag, wurde die Probe über eine Maltose-Affinitätschromatographie-säule geleitet (MBP-Trap HP, GE Healthcare) und MBP mit 10 mM Maltose im Dialysepuffer eluiert. Nachfolgend wurden alle kleinen G-Proteine mittels Zentrifugationskonzentrator (Amicon, 10 kDa MWCO, Millipore) auf ca. 1,5 mL eingengt. Falls ein GDP- bzw. GTP-Nukleotidaustausch nötig war, wurde dieser vor der Gelfiltrationschromatographie vorgenommen (s. Abschnitt 6.4.5.). Der präparative Austausch zu GDP war lediglich bei Rab23, Rab32 und Rab38 nötig. Es folgte eine chromatographische Trennung mittels Gelfiltration (Superdex 75, 16/60; GE Healthcare; 1,5 mL/min) in SEC-Puffer. Die monodispersen Fraktionen hoher Reinheit wurden für alle weiteren Analysen verwendet.

Tabelle 14: Pufferzusammensetzungen für die Proteinreinigung kleiner GTPasen.

Puffer A	Puffer B	Dialysepuffer	SEC-Puffer
50 mM HEPES pH 7,5	Puffer A	20 mM HEPES pH 7,5	25 mM HEPES pH 7,5
500 mM NaCl	+ 500 mM Imidazol	30 mM NaCl	50 mM NaCl
1 mM MgCl ₂		10 µM GDP	1 mM MgCl ₂
10 µM GDP		2 mM BME	10 µM GDP
2 mM BME			1 mM DTE

Als interner Standard für kinetische Experimente wurde MBP gereinigt. Hierzu wurden die Puffer und das Verfahren analog zur GTPase Reinigung verwendet. Lediglich der TEV-Verdau sowie die zweite Passage der Ni²⁺-IMAC wurde ausgelassen.

6.4.2. Reinigung von GtgE und SopD2 aus *Salmonella* sowie RRSP/DUF5_{vv} aus *Vibrio*

Für die Reinigung aller bakteriellen Effektoren wurde wie unter 6.4. beschrieben vorgegangen und folgende Puffer verwendet.

Tabelle 15: Pufferzusammensetzungen für die Proteinreinigung bakterieller Effektoren

Puffer A	Puffer B	Dialysepuffer
50 mM HEPES pH 7,5	Puffer A	20 mM HEPES pH 7,5
500 mM NaCl	+ 500 mM Imidazol	30 mM NaCl
2 mM BME		2 mM BME

6.4.3. Reinigung des Rab32-Bindeproteins VARP-ANK1

Die Reinigung von VARP-ANK1 erfolgte analog zu den kleinen GTPasen. Nach dem Zellaufschluss wurden 5% Glycerin (v/v) sowie 1 mM AEBSF (4-(2-Aminoethyl)benzylsulfonylfluorid, final) als Proteaseinhibitor zugesetzt.

Tabelle 16: Pufferzusammensetzungen für die Proteinreinigung der Rab32-Effektordomäne von VARP.

Puffer A	Puffer B	Dialysepuffer	SEC-Puffer
50 mM HEPES pH 7,4	Puffer A	20 mM HEPES pH 7,5	25 mM HEPES pH 7,5
500 mM NaCl	+ 500 mM Imidazol	50 mM NaCl	50 mM NaCl
5 mM MgCl ₂		5 mM MgCl ₂	5 mM MgCl ₂
2 mM BME		2 mM BME	1 mM DTE

6.4.4. Präparative enzymatische Proteinprenylierung

Die kovalente Anbringung von langkettigen aliphatischen Ketten ermöglicht die Lokalisation an einer Phospholipidmembran. Eine häufige Lipidmodifikation an Proteinen ist die Prenylierung über einen Thioether mit Farnesyl- oder Geranylgeranylgruppen (s. Abschnitt 1.2.1.). Für die enzymatische Prenylierung *in vitro* wurden die Zielproteine an einem CaaX-Motiv modifiziert. Hierzu wurden im analytischen Maßstab je 10 μM Rab32-CVIM mit einem 5-fachen molaren Überschuss Farnesylpyrophosphat (FPP; Sigma) und einem 100-fachen Unterschuss humaner Farnesyltransferase (FTase; Quelle AG Itzen) in SEC Puffer mit 0,5 mM ZnCl_2 für 20 h bei 20°C inkubiert. Im präparativen Maßstab wurden 100 μM Rab32-CVIM mit einem 1,5-fachen molaren Überschuss FPP und einem 200-fachen Unterschuss FTase gearbeitet. Die Farnesylierung von GtgE (10 μM) wurde analog zu Rab32-CVIM durchgeführt. Für die Geranylgeranylierung von GtgE (10 μM) wurde ein 5-facher molarer Überschuss von Geranylgeranylpyrophosphat (GGPP; Sigma) und ein 100-facher Unterschuss humaner Geranylgeranyltransferase (GGTase; Quelle AG Itzen) in SEC Puffer mit 0,5 mM ZnCl_2 eingesetzt. Die Inkubationsbedingungen wurden wie oben beschrieben gewählt. Die Vollständigkeit der Reaktion wurde mittels LC-MS überprüft.

6.4.5. Präparativer Nukleotidaustausch kleiner GTPasen *in vitro*

Die präparative Überführung von kleinen GTPasen in einem definierten Nukleotidbinde-, und damit Aktivitätszustand ist eine wichtige Voraussetzung für Studien der Funktionsweise kleiner G-Proteine. Neben den natürlichen Nukleotiden GDP und GTP können GTPasen *in vitro* auch mit funktionellen Derivaten, wie GppNHp (Guanosin-5'-(β,γ -imido)triphosphat) oder Mant-G-Nukleotiden (2'/3'-O-(N-Methyl-anthraniloyl)) beladen werden. Der tatsächlich erreichte Beladungszustand wurde relativ zur Gesamtnukleotidmenge über die Ionenpaarungs-RP-HPLC bestimmt (s. Abschnitt 6.5.2.).

Austausch zu GDP/GTP: Die Proteinlösung wurde mit einem 50-fach molarem Überschuss Nukleotid und 5-10 mM EDTA (final, mindestens 5-fachem Überschuss gegenüber MgCl_2) versetzt und bei 15°C über Nacht oder bei 25°C für 4 h inkubiert. Die Abtrennung erfolgt entweder mittel Gelfiltrationschromatographie oder eine Entsalzungssäule (s. Abschnitt 6.4.9.)

Austausch zu GppNHp: Die Proteinlösung wurde mit einer äquimolaren Menge GppNHp in einfach konzentriertem Nukleotidaustausch Puffer (NE-Puffer) versetzt. Zum Abbau von natürlichen Nukleotiden wurde alkalische Phosphatase (NEB; 5 U/mg GTPase) zugesetzt und für eine Stunde bei RT inkubiert. Präzipitate wurden durch Zentrifugation abgetrennt und das lösliche Protein mittels NAP Säulen in 1 μM GppNHp haltigen SEC-Puffer überführt.

Austausch zu Mant-GDP/Mant-GTP: Die Proteinlösung wurde mit 5-fachem molarem Überschuss mGDP/mGTP und 5-10 mM EDTA (final) versetzt und für 2 h bei RT im Dunkeln inkubiert. Präzipitate wurden durch Zentrifugation abgetrennt und das lösliche Protein mittels NAP Säulen in 1 μM mGDP/mGTP haltigen Puffer überführt.

6.4.6. Fluoreszenzmarkierung von Proteinen

Die kovalente Markierung von Proteinen mit Fluorophoren ist nötig für den Einsatz bei einer Reihe von Analysemethoden. Hier wurden Fluorophore für die anschließende Bestimmung von Bindeaffinitäten zu Protein-Bindepartnern eingeführt. Für die Mikro-Thermophorese (s. Abschnitt 6.6.5.) wurde GtgE_{C45A} mit NT647 kovalent markiert. Hierzu wurde GtgE_{C45A} in Markierungspuffer (20 mM HEPES pH 7,5; 50 mM NaCl; 1 mM MgCl₂; 0,5 mM Tris(2-carboxyethyl)phosphin (TCEP)) überführt. Hiernach wurden die primären Lysin-Amingruppen mit NT-647-NHS (N-Hydroxysuccinimid) aus dem entsprechenden *Labeling-Kit* (Nanotemper) nach Herstellerangaben markiert und aufgearbeitet. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 10 mM Tris HCl pH 7,5 gestoppt und das Protein über eine in Markierungspuffer equilibrierte NAP5-Säule (GE Healthcare) von unerwünschten Molekülen getrennt. Rab32 wurde für die Studien mit der analytischen Ultrazentrifuge mit Atto488 markiert. Hierzu wurde Rab32:GDP in Markierungspuffer überführt der mit 10 µM GDP versetzt war. Hiernach wurden die freien Thiole mit 1,1-fachen molaren Überschuss Atto488-Maleimid (ATTO TEC) bei 4°C über Nacht, im Dunkeln markiert und die Reaktion mit der Zugabe von 0,5 mM DTT (final) gestoppt. Die Aufarbeitung wurde analog zu GtgE_{C45A} durchgeführt. Die Markierungseffizienz (engl. *degree of labeling*; DOL) wurde nach der Folgenden Formel bestimmt:

$$\text{DOL} = \frac{A_{\text{max}} \cdot \epsilon_{\text{prot}}}{(A_{280} - A_{\text{max}} \cdot \text{CF}_{280}) \cdot \epsilon_{\text{max}}}$$

Wobei A_{max} die die maximale Absorption und ϵ_{max} den Extinktionskoeffizienten im Absorptionsmaximum darstellt. A_{280} : Proteinabsorption bei 280 nm; ϵ_{max} : Extinktionskoeffizienten bei 280 nm. CF_{280} : Korrekturfaktor der spezifischen Farbstoffabsorption bei 280 nm.

6.4.7. Methylierung von primären Amininen in Proteinen

Die reduktive Alkylierung von primären Amininen an Lysinen und dem N-Terminus erhöht die Hydrophobizität eines Proteins. Aus Sicht der Proteinkristallographie bringt dieser Umstand einige Vorteile mit sich. Durch die hydrophobisierte Oberfläche erhöht sich die Wahrscheinlichkeit für die Ausbildung von Kristallkontakten. Gleichzeitig verringert sich der Wassergehalt des Kristalls, was sich positiv auf die Röntgenbeugungseigenschaften, also die Datenqualität auswirken kann. Die reduktive Alkylierung des Rab32:GDP:GtgE_{C45A}-Komplexes wurde sowohl präparativ als auch analytisch bei 4°C durchgeführt in Anlehnung an die Methodik von Walter und Kollegen²³⁷. Die analytischen Experimente dienten der Methodenentwicklung.

Präparativ: Zunächst wurden 2 mg/mL Heterokomplex aus einem äquimolaren Gemisch von Rab32:GDP und GtgE_{C45A} (oder deren verkürzten Varianten Rab32₂₀₋₂₀₁ und GtgE_{C45A;18-214}) in SEC-Puffer, versetzt mit 10 µM GDP formiert. Nach einer Inkubation von 30 min wurde

20 μL einer frischen 1 M Dimethylaminoboran-Komplex-Lösung in Reaktionspuffer (ABC-Lösung; Sigma Aldrich) je Milliliter Proteinlösung zugesetzt. Ebenfalls wurde 40 μL einer frischen 1 M Formaldehydlösung in Reaktionspuffer (aus einer 37%igen-Stocklösung; Sigma Aldrich) je Milliliter Proteinlösung eingesetzt. Die Reaktionsmischung wurde bei leichter Rotation in der Kälte inkubiert. Nach 2 h erfolgte dieselbe Zugabe von ABC- und Formaldehyd-Lösung mit einer weiteren Inkubation. Nach weiteren 2 h wurde ein weiteres Mal ABC-Lösung zugesetzt und die Reaktion über Nacht rotiert. Präzipitat wurde durch Zentrifugation (10 min, 15 krpm, 4°C) abgetrennt, der Überstand nach dem Größenausschluss auf einer Superdex75 (16/60; GE Healthcare) chromatographisch getrennt und die Fraktionen über SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) analysiert. Die Komplex-enhaltenden Fraktionen wurden mittels Zentrifugationskonzentratoren (Amicon 50 MWCO; Millipore) auf eine finale Konzentration von 10 mg/mL (bezogen auf den Hetero-Komplex) eingestellt und direkt in Kristallisationsansätze eingesetzt (s. Abschnitt 3.2.2.).

Analytisch: Bei analytischen Ansätzen wurde abweichend zum oben beschriebenen Vorgehen mit 1 mg/mL gesamt Proteinkonzentration (Heterokomplex, ca. 25 μM) oder je 0,5 mg/mL der Monomere (ca. 25 μM) in 50 μL gearbeitet. Das übrige Vorgehen für die reduktive Alkylierung wurde im kleineren Maßstab übernommen. Ohne weitere Aufarbeitung wurden separat alkylierte Monomere, ein Gemisch aus beiden oder einem formiertem Komplex, dem die Alkylierung nachgestellt war, auf einer analytischen Größenausschlusschromatographie analysiert (s. Abschnitt 6.5.4.). Ebenfalls wurden diese Proben separat entsalzt und an einem LC-gekoppelten ESI-Massenspektrometer analysiert (s. Abschnitt 6.5.3.).

6.4.8. Kovalente Carboxylgruppen-Markierung durch Epoxynitrophenoxypropan

Die spezifische kovalente Markierung von Carboxylgruppen in aktiven Zentren von Enzymen ist herausfordernd. Weniger spezifische Reagenzien haben den Nachteil falsch-positive Positionen zu markieren, sind allerdings kommerziell verfügbar, was auf viele spezifische Inhibitoren häufig nicht zutrifft, da diese von Forschungsgruppen für spezifische Fragestellungen entwickelt werden.

Die kovalente Modifizierung des sauren aktiven Zentrums von RRSP ist eine Voraussetzung für die Identifizierung der beteiligten Reste durch eine Tandem-Massenspektrometrie-basierte Strategie. Für die Modifizierung wurde das unspezifische Reagenz 1,2-Epoxy-3-(p-Nitrophenoxypropan) (EPNP) gewählt und sowohl im analytischen als auch im präparativen Maßstab bei Reaktionen mit RRSP eingesetzt. Die analytischen Experimente dienten der Optimierung und Methodenentwicklung, während der präparative Ansatz auf eine nachgeschaltete, MS-basierte Identifizierung zielte.

Analytisch: DUF5-haltige Proteinlösung 0,5 mg/mL (ca. 10 μ M) wurde mit EPNP 5-10 mM (final 500-1000fache molarer Überschuss) bei 25°C inkubiert. Die Aufarbeitung für die hochauflösende Massenspektrometrie ESI-FT (Thermo) erfolgte mittels Mini-Entsalzungssäulen (C4-Zip Tips, Millipore).

Präparativ: Es wurden je 200 μ g DUF5 (\approx 3,6 nmol) in 90 μ L Reaktionspuffer (50 mM HEPES; pH 7,0; 100 mM NaCl; 0,5 mM DTT) eingesetzt, mit 10 μ L einer 10-fach EPNP-Stocklösung (50 mM oder 100 mM in DMSO) durchmischt und bei Raumtemperatur für 4-8 h inkubiert. Die Reaktion wurde gestoppt durch die chromatographische Trennung des Proteins von Pufferbestandteilen an einer NAP-5 Entsalzungssäule (GE Healthcare), die zuvor mit HEPES-Puffer (50 mM; pH 7,4) equilibriert wurde. Die aufgefangenen Fraktionen wurden qualitativ auf ihren Proteingehalt mittels Bradford-Reagenz getestet. Hierzu wurden 50 μ L Bradford-Reagenz mit 2 μ L aus der Fraktion gemischt und über die relative Blaufärbung ausgewertet. Lediglich solche Fraktionen mit dem größten Proteingehalt wurden für die Tandem-MS-Analyse mit einem vollständigen Trypsin-Verdau aufbereitet (s. Abschnitte 6.4.10. und 6.5.3.).

6.4.9. Methoden zum Pufferaustausch von Proteinlösungen

Ein vollständiger Austausch von Puffersubstanzen oder die Abtrennung unerwünschter Moleküle ist bei vielen Anwendungen und Präparationen ein wichtiger Teil der Probenbehandlung. Alle kommerziellen Lösungen wurden entsprechend den Herstellerangaben verwendet.

Dialyse: dabei wurde die Proteinlösung abhängig von dem Volumen in Dialyseschläuche (>1 mL; Serva, MWCO 12 kDa) oder Dialysekammern (<1 mL; Pur-A-Lyzer Dialysis Kit, Sigma, MWCO 6-8 kDa) gefüllt und in einem rotierenden Reservoir (1-5 L) in der Kälte (4°C) über Nacht bis zur Einstellung des Gleichgewichts inkubiert.

Gelfiltration: auch die Gelfiltration wurde in verschiedenen Maßstäben eingesetzt. Vorab äquilibrierte Säulen wurden mit der Probe versetzt, welche bereits bei minimaler chromatographischer Trennung in den gewünschten Puffer überführt werden. Abhängig von der Aufgabenstellung und dem Volumen wurden folgende Säulen verwendet: Superdex 75 oder 200; NAP5 oder PD10; HiPrep 26/100 sowie HiTrap Desalting Entsalzungskartuschensäulen (alle GE Healthcare).

C4-ZipTips: Das Entsalzen als Probenvorbereitung bei direkter Injektion in die Massenspektrometrie wurden mittels C4-ZipTip-Pipettenspitzen durchgeführt. Alle Pipettierschritte wurden mit 10 μ L Hubvolumen durchgeführt. Die Matrix wurde 1-mal mit 50% ACN in d_4 H₂O gewaschen, 2-mal mit 0,1% Ameisensäure-haltigem Wasser equilibriert und anschließend mit 2-5-maligem Auf- und Abpipettieren einer Proteinlösung (0.1-0.2 mg/mL) geladen. Zum Entsalzen wurde abermals 2-mal mit 0,1% Ameisensäure gewaschen und anschließend mit 50% ACN eluiert.

6.4.10. Trypsin-Verdau von Proteinen für die Tandem-Massenspektrometrie

Zur Bestimmung der Sequenzidentität oder der kovalenten Modifikation von Peptidfragmenten aus Proteingemischen eignet sich die Tandem-Massenspektrometrie. Hierzu werden die Proteine zuerst proteolytisch vollständig verdaut, sodass Peptidlängen von 4-15 Aminosäuren generiert werden. Diese werden nachfolgend chromatographisch getrennt und in einem Tandem-MS Experiment analysiert (s. Abschnitt 6.5.3.). In dem nachfolgenden Verfahren wurde ausschließlich Chemikalien mit MS-Reinheitsgraden sowie Keratin-freien, nicht haftenden Plastikinstrumenten (Pipettenspitzen und LoBind Reaktionsgefäße, Eppendorf) verwendet. Alle Lösungen wurden frisch angesetzt:

Als Startmaterial dienten 50 µg mit EPNP-modifiziertes und unmodifiziertes DUF5 (Negativkontrolle) in 150 µL Wasser. Die Proteinfällung nach Wessel-Flügge²³⁸ wurde mit der sequenziellen Zugabe von Methanol (600 µL) Chloroform (225 µL) und Wasser (450 µL) durchgeführt. Zwischen den Zugaben wurden die Proben gewirbelt und zentrifugiert (RT, 10 s; 13 krpm). Nach der Inkubation im Ultraschallbad (7 min) wurden die Proben abermals kurz zentrifugiert. Es bilden sich drei Phasen aus (Präzipitat in der Interphase). Nur die obere, organische Phase wird verworfen und danach abermals Methanol (450 µL) zu der verbliebenen Probe zugesetzt, gewirbelt und für 20 min bei 13 krpm zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und verworfen. Das Pellet wurde an der Luft getrocknet – nicht zur Vollständigkeit. Für den nachfolgenden Trypsinverdau wurde das Pellet in einer 7 M Harnstoff/2 M Thioharnstoff-Lösung (200 µL; in 20 mM HEPES; pH 7,0) vollständig gelöst. Als Vorverdau wurde LysC zugesetzt (1:200 m/m; 0,5 µg/µL Stocklösung, Thermo) und 4 h bei 450 rpm (RT, Lichtgeschützt) inkubiert. Die Probe wurde 1:4 (v/v) mit Wasser verdünnt, Trypsin zugesetzt (1:200 m/m; 0,5 µg/µL Stocklösung, Sigma) und über Nacht bei 37°C und 450 rpm inkubiert. Der Verdau wurde im Säuren (pH ≤3) durch Zugabe von 0,5% TFA (v/v final) gestoppt und Präzipitate mittels Zentrifugation entfernt. Die Entsalzung der Proben erfolgte mit SepPak[®] C18 Säulen (50 mg Säulenmaterial; Waters Inc.) an einem Vakuumstand. Die Säulchen wurden mit folgender Sequenz bei anliegendem Unterdruck equilibriert, wobei am Ende aller Schritte eine ca. 1 mm Flüssigkeitssäule verblieb: 1 mL ACN; 0,5 µL Elutionspuffer (80% ACN, 0,5% FA); 2x je 0,5 mL 0,1% TFA. Hiernach erfolgten der Probenauftrag und das sequenzielle Waschen mit 1 mL 0,1% TFA und 0,5 mL 0,5% FA. Für die Elution der Peptide wurden 250 µL Elutionspuffer zugesetzt und bei Normaldruck in ein neues Reaktionsgefäß abgelassen. Nach einer weiteren Zugabe (250 µL Elutionspuffer) wurde die Säule mittels Vakuum bis zur Trockenheit eluiert. Das Eluat (ca. 1,2 mL) wurde in Flüssigstickstoff schockgefroren und anschließend über Nacht gefriergetrocknet (Alpha 1-2 LDplus Lyophilisator, Christ, D).

6.5. Analytische Methoden

6.5.1. Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Konzentration von Proteinen, die Tryptophane (Trp - und zu kleinerem Anteil auch Tyrosin und Phenylalanin) enthalten, kann spektralphotometrisch durch die Absorptionseigenschaften der Lösung bei 280 nm bestimmt werden. Hierzu muss der molare Extinktionskoeffizient (ϵ in $M^{-1} \text{ cm}^{-1}$) und die Molmasse bekannt sein. Beide Parameter wurden für alle Proteine mit dem Web-Tool Protparam berechnet (web.expasy.org/protparam/). Über das Lambert-Beer'sche Gesetz lässt sich die Konzentration (c in M) wie folgt bestimmen:

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

wobei: A (Absorption der Lösung), I_0 (Intensität des eingestrahlten Lichts), I (Intensität des austretenden Lichts) und d (Schichtdicke, cm) ist. Die Gewichtskonzentrationen (mg/mL) wurden durch das Teilen der molaren Konzentration durch die Molmasse erhalten. Die Konzentrationsbestimmung wurden an einem Spektralphotometer (Nanodrop2000, Thermo) durchgeführt.

Die Konzentrationsbestimmung für RasGTPasen erfolgt mit der Bradford-Methode²³⁹, da kein Tryptophan in der Ras-Primärstruktur enthalten ist. Dabei wird eine verdünnte Proteinlösung (typisch 1:100 in Wasser) mit 900 μL Bradford-Reagenz (VWR Prolabo) versetzt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Absorption bei 595 nm liefert, mit einer zuvor aufgenommenen Eichgerade (BSA Verdünnungsreihe) die Konzentration.

6.5.2. Analytische Hochleistungs-Umkehrphasenchromatographie

Die Hochleistungs-Flüssigchromatographie (engl. *High Performance Liquid Chromatography* – HPLC) ist die Standardtechnik für anspruchsvolle Trennungen chemisch ähnlicher Stoffgemische. Dabei wird die Analyseprobe in einem chromatographischen Trenngang mit organischem Lösemittelanteil in der mobilen Phase (sog. Umkehrphase; engl. *reversed phase* – RP) und einer hydrophobisierten stationären Phase separiert. Die Trennung von Peptiden und Proteinen erfolgte in einem angesäuertem Acetonitril (ACN)-Wasser-Gradienten (je 0.1% FA oder TFA) 5-50% ACN in 5-15 min auf einer Jupiter C4 oder Jupiter C18 (beide Phenomenex) getrennt und bei 280 nm detektiert (Agilent HPLC System). Nukleotide wurden in einer mit einem isokratischen Puffer unter Ionenpaarungsbedingungen (50 mM $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ pH 6,6; 10 mM Tetrabutylammonium Tribromid (TBA Br); 12% ACN) auf einer ProntoSIL C18 RP-Säule (Bischoff Chromatography) bei 1 mL/min in 20 min getrennt und bei 254 nm detektiert (Shimadzu HPLC System).

6.5.3. Flüssigchromatographie gekoppelte Massenspektrometrie

Die moderne Massenspektrometrie ist eine der wichtigsten Techniken für die Analyse von biologischen Molekülen. Viele massenspektrometrische Anwendungen werden mit einer vorgeschalteten RP-HPLC, für die erforderlich chromatographische Trennung des Analyten gekoppelt (s. Abschnitt 6.5.2.). Diese Retention ist nötig um die Auflösung und das spezifische Signal-Rausch-Verhältnis (engl. *signal to noise ratio* – S/N) zu verbessern. Alle massenspektrometrische Analyse teilen sich in drei Teilschritte: Ionisation der Analyten, Auftrennen der Analyten nach ihrem Masse-Ladungs-Verhältnis (m/z) und dem Detektieren der Analyten. Die Rohdaten werden im Nachgang mit geeigneter Software ausgewertet. Für die Ionisation von Proteinen ist die Elektronensprayionisation (ESI) als schonende Ionisationsmethode sehr verbreitet und wurde in allen nachfolgenden Anwendungen verwendet. Für die Tandem-MS (MS^2)-Experimente kam zusätzlich ein Modul für die Kollisions-induzierte Dissoziation zum Einsatz (CID; engl. *collision-induced dissociation*). Für die Analyse von Proteinen wurden je nach Analyt 2-10 pmol pro Messung injiziert.

Die Analyse von Proteinen und Peptiden erfolgte routinemäßig über Loop-Injektionen an einem LCQ-Fleet (Ionenfalle; Thermo) und für hochauflösende Analysen an einer LCQ FT (Ionenfalle; Thermo) Massenspektrometer jeweils gekoppelt an ein UltiMate 3000 nano HPLC-System (Dionex, Thermo).

Für die Analyse von Trypsin-generierten Peptidgemischen wurde eine chromatographische Trennung auf einer Acclaim C18 PepMap RSLC (75 μ m ID x 15 cm; Thermo) Säule mit folgendem Gradienten vorgenommen: (Puffer A: 95% H₂O, 5% DMSO, 0,1% FA. Puffer B: 95% ACN, 5% DMSO, 0,1% FA. Fluss 200 nL/min, Gradient: 4 to 35% Puffer B in 112 min, dann auf 80% Puffer B in 4 min und für 4 min auf 80% Puffer B halten, dann auf 4% Puffer B in 2 min auf 4% Puffer B für weitere 20 min halten. Für die Messung wurden die getrennten Peptide *in-line* in ein LTQ Orbitrap XL-Massenspektrometer geleitet (Ionenfalle; Thermo).

Für die Auswertung der Analyseergebnisse wurden folgende Programme verwendet: Xcalibur (v3.1; Thermo Scientific) für die Extraktion der Rohdaten; MagTran (v1.02)²³⁰ für die Dekonvolution der m/z -Spektren; MaxQuant (v1.5.2.4)²⁰¹ für die Evaluierung der MS^2 -Spektren.

6.5.4. Analytische Größenausschlusschromatographie

Das Trennprinzip der Größenausschlusschromatographie (auch Gelfiltration; engl. *size exclusion chromatography* – SEC) basiert auf der Interaktion von Proteinen mit porösen, quervernetzten Agarosepartikel. Die Retention hängt von dem hydrodynamischen Radius der Moleküle sowie der Porengrößenverteilung ab. Kleine Moleküle werden stärker zurückgehalten als große. Die stärkere Wechselwirkung mit der Matrixoberfläche resultiert aus der Diffusion in zugängliche Poren. Diese Analyse eignet sich daher für die Polydispersionsbestimmung einer Probe oder die Komplexbildung von Proteinen und kann zu diesem Zweck auch präparativ eingesetzt werden. Für die Komplexbildung von Rab32-Varianten mit GtgE_{C45A}

wurde je 10 μM Rab:GDP (einschließlich Mutanten und anderer Nukleotidbeladung) mit 10 μM GtgE_{C45A} (einschließlich weiterer Mutanten) in 70 μL eingesetzt (finale Konzentrationen) und für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Das Gemisch (50 μL) wurde anschließend auf einer Superdex 75 (10/30; GE Healthcare) in SEC-Puffer mit entsprechendem Nukleotid versetzt bei 0,5 mL/min in 1 h getrennt (Detektion 280 nm) und bei Bedarf fraktioniert (Shimadzu HPLC System). Die chromatographische Trennung des Heterokomplexes wurde auch im präparativen Maßstab durchgeführt (s. Abschnitt 6.4.7.). Für die analytische Komplexbildung von Rab32:GppNHp mit der VARP-Ankyrin-Wiederholungsdomäne (ANK1) des wurden beide Proteine mit je 50 μM (final) eingesetzt und wie oben beschrieben behandelt.

6.5.5. Denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese

Die Trennung eines Proteingemisches nach der molekularen Masse der enthaltenen Spezies wird in der Biochemie routinemäßig über die denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) erreicht. Dabei wird das Proteingemisch unter reduzierenden Bedingungen in Anwesenheit von Natriumdodecylsulfat (engl. *sodium dodecyl sulfate* – SDS) bei erhöhter Temperatur entfaltet. Die Anlagerung der negativen Dodecylationen an die Proteine führt netto zu negativ geladenen Molekülen, die dann durch ein elektrisches Spannungsfeld in einer Polyacrylamid Gelmatrix zur Anode wandern. In dieser Arbeit wurden 15%-SDS-PAGE-Gele nach Laemmli²⁴⁰ mit einem Trenn- und Sammelgel verwendet. Die Proteinlösung (typisch 10 μL) wurden 1:1 mit 2x-SDS-Probenpuffer gemischt und 5 min bei 95°C inkubiert um eine vollständige Entfaltung zu gewährleisten. Bei Probenvolumen größer 20 μL , wurde das Gemisch im offenen Reaktionsgefäß in der Hitze entsprechend eingeengt. Damit keine Probenbestandteile an der Gefäßwand verbleiben wurden die Proben kurz gewirbelt und zentrifugiert. Als Größenstandard wurde der Protein Testmix 6 (Serva) nach Herstellerangaben verwendet. Die Gele wurden in SDS-Laufpuffer bei konstantem Stromfluss von 50 mA pro Gel für 45-60 min entwickelt. Das Färben der Proteinbanden erfolgte mittels erwärmter Coomassie-Brilliant Blau R-250 Lösung und Schüttelinkubation für 10-60 min mit anschließendem Entfärben in 10%iger Essigsäure. Dies wurde mehrfach wiederholt bis der Hintergrund vollständig entfärbt war, um den Kontrast für die Digitalisierung und Auswertung zu verbessern. Die Gele wurden mit einer Auflösung von 600 dpi (engl. *dots per inch*) gescannt und bei Bedarf densitometrisch ausgewertet (s. nachfolgender Abschnitt).

6.5.6. Zeitaufgelöster Gel-Shift-Aktivitätsnachweis

Die Enzymaktivitätsbestimmung von Proteasen lässt sich zuverlässig durch das zeitabhängige Unterbrechen der Proteolyse und einer nachfolgenden Größentrennung der Substrate und Produkte mittels SDS-PAGE (s. vorgegangener Abschnitt) durchführen. So wurde die

Aktivitätsbestimmung beider Proteasen mit ihren jeweiligen GTPase-Substraten realisiert. Typischerweise wurde 8 μM GTPase-Substrat in SEC-Puffer versetzt mit 1-10 μM des entsprechenden G-Nukleotiden (GDP/GTP/GppNHp) vorgelegt und die Reaktion mit 0,8-8 nM (final) Protease (GtgE-1:1000 oder RRSP-1:10000 mol/mol) bei 25°C gestartet. Für die Quantifizierung wurden das MBP als interner Standard eingesetzt (1 μg pro Gel-Tasche). Zu verschiedenen Zeitpunkten (10 s-24 h) wurde die Reaktion durch die Zugabe von vorgewärmten 2x-SDS-Probenpuffer (je 10 μL) gestoppt. Nach der Trennung über die SDS-PAGE, wurden die Banden mit der frei verfügbaren Software ImageStudio Lite (LI-COR Inc., USA) analysiert. Das Verhältnis der integrierten Grauwerte (interessierende Bande/MBP-Bande) wurde zeitabhängig aufgetragen und zur Bestimmung der beobachteten Umsatzrate (k_{-1} , k_{obs}) über folgenden exponentiellen Zusammenhang angepasst:

$$I(Rab_{FL}) = I(Rab_{FL,0}) + A \cdot e^{-k_{-1}t}$$

$I(Rab_{FL})$: normierte Intensität der volllänge Rab-Bande; $I(Rab_{FL,0})$: normierte Intensität der volllänge Rab-Bande im Gleichgewicht; A: Fluoreszenzsignalamplitude; t: Zeit in Sekunden.

Zur Bestimmung der katalytischen Enzymeffizienz (k_{cat}/K_M) wurde die beobachtete Umsatzrate durch die Enzymkonzentration der eingesetzten Protease ($[E_0]$) geteilt:

$$k_{obs} = -\frac{k_{cat}}{K_M} \cdot [E_0]$$

Für eine schnelle Aktivitätsüberprüfung von Proteasen (sowie Mutanten), ohne vormalige Reinigung, wurde das beschriebene Vorgehen wie folgt angepasst: Die jeweilige Protease wurde rekombinant in BL21 RIL Zellen und 50 mL LB Medium exprimiert (s. Abschnitt 6.4.2). Davon wurden 5 OD Einheiten geerntet, in 0,5 mL SEC-Puffer ohne Nukleotide resuspendiert und die Zellen mittels Ultraschall (Digital Sonifier® SLPe, Branson Ultrasonics) auf Eis lysiert. Das geklärte Lysat wurde auf die Expressionsmengen mittels SDD-PAGE überprüft und 2 μg Lysat (oder eine 1:100 Verdünnung des Lysats) pro 10 μL Reaktionsansatz in den beschriebenen Test eingesetzt.

6.5.7. RRSP-Endopeptidase Aktivitätsnachweis

Die synthetisierten Ras-switch I-Peptidsubstrate (s. Abschnitt 6.3.1.) wurden in 50 mM HEPES pH 8,0 gelöst mit 10 mg/mL. Der qualitative Peptidase-Aktivitätsnachweise wurde mit je 100 μM Peptid und 10 μM RRSP_{WT} in 25 μL -Ansätzen bei 25°C über Nacht durchgeführt. Die Reaktion wurde durch Hitzeinaktivierung von RRSP (2 min, 95°C) angehalten und das Präzipitat über Zentrifugation entfernt (5 min, 13000 rpm). Der Überstand würde nach dem Entsalzen über LC-MS analysiert (s. Abschnitt 6.5.3.).

6.6. Biophysikalische Methoden

6.6.1. Fluoreszenzspektroskopie

Die Fluoreszenzspektroskopie wurde bereits in vielfältiger Weise bei Untersuchungen der biochemischen Eigenschaften kleiner GTPasen eingesetzt^{40,102}. Die beobachteten Signaländerungen basieren entweder auf intrinsischen Veränderungen der chemischen Umgebung der Indol-Gruppe eines Tryptophans, oder eines artifiziell eingebrachten Chromophors, wie bei Mant-Nukleotiden. Ebenfalls wurden bereits FRET-(Förster Resonanz Energie Transfer)-Anordnungen erfolgreich zur Detektion des Nukleotidbeladung kleiner GTPasen *in vivo* eingesetzt²⁴¹. Die Detektion der Proteolyse in der *switch I*-Region wurde typischerweise in einer 1 mL Quarzküvette in einem Fluoreszenzspektroskop (FluoroMax®-4, Horiba Ltd., Japan) in filtriertem und entgasten Nachweispuffer (20 mM HEPES, pH 7,5; 50 mM NaCl; 1 mM MgCl₂; 1 mM DTT) bei 25°C durchgeführt. Entsprechende Nukleotide wurden kurz vor der Messung zugesetzt (10 µM GDP/GTP; 1 µM GppNHP; 10 nM Mant-GDP; final). Als Substrat wurde 0,5 µM einer kleinen GTPase (beladen mit GDP oder Mant-GDP) eingesetzt und die Reaktion mit Zugabe von 0,5-5 nM (final) einer Protease gestartet. Die zeitabhängige Detektion der Tryptophanfluoreszenz wurde bei 297 nm (Ex; Bandpassfilter ±1 nm) angeregt und die Emission bei 340 nm (Em; Bandpassfilter ±5 nm) aufgezeichnet. Für die Mant-Fluoreszenz-Detektion wurden folgende Einstellungen gewählt: Ex (340 nm); Em (440 nm), und für die FRET Experimente entsprechend: Ex (297 nm); Em (440 nm) mit denselben Bandpassfiltern. Die apparente Umsatzrate (k_{obs}) wurde durch Kurvenanpassung an eine Exponentialfunktion erster Ordnung bestimmt:

$$F = F_0 + A \cdot e^{-k_{obs}t}$$

F: Fluoreszenzsignal; F₀: Fluoreszenzsignal im Gleichgewicht; A: Fluoreszenzsignalamplitude; t: Zeit in Sekunden.

Die enzymatische Effizienz (k_{cat}/K_M) wurde durch die Division von k_{obs} durch die Proteasekonzentration ($[E_0]$) wie in Abschnitt 6.5.6. bestimmt.

6.6.2. Stopped-Flow Fluoreszenz Spektroskopie

Schnelle Reaktionen, die im Millisekunden bis Sekunden Bereich ablaufen, lassen sich mit der *Stopped-Flow*-Methode (engl. für unterbrochener Fluss) beobachten, wenn es mit einem geeigneten Detektionssystem gekoppelt ist. Die zeitabhängige Fluoreszenzsignaländerungen von Mant-Nukleotid-beladenen Ras wurde an einem SX20 *Stopped-Flow*-Spektrometer (Applied Photophysics, Leatherhead, UK) aufgezeichnet. Die Anregungswellenlänge wurde auf 365 nm mit Schlitzbreiten von je 1,5 mm für Ein- und Ausgang des Monochromators eingestellt und die Emission wurde über einen optischen 420 nm-Ausschlussfilter detektiert. Alle Messungen wurden bei 25°C durchgeführt. In einem 1:1-Mischungsverhältnis wurde

Ras:mGDP mit 0,1 μM (final) mit steigenden Konzentrationen RRSP_{WT} (2-200 μM , final) titriert. Jede Messung wurde in einer Reihe von fünf Hüben wiederholt und der Reaktionsverlauf über 5 sek aufgezeichnet. Zur Bestimmung der jeweiligen Reaktionsrate für jede eingesetzte RRSP-Konzentration wurden gemittelte Kurven aus drei Experimenten verwendet und an eine einfachexponentielle Funktion wie in Abschnitt 6.6.1. beschrieben angepasst. Zur Bestimmung der Wechselzahl (k_{cat}) sowie K_M wurden die erhaltenen Reaktionsraten in Abhängigkeit von der RRSP-Konzentration an ein Michaelis-Menten-Model angepasst:

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

v : initiale Reaktionsgeschwindigkeit ($\mu\text{M s}^{-1}$); v_{max} : maximale Reaktionsgeschwindigkeit ($\mu\text{M s}^{-1}$); S_0 : initiale Substratkonzentration (μM); K_M : Michaelis-Menten-Konstante (μM)

Unter der Annahme, dass die der K_M viel als die Substratkonzentration ist ($K_M \gg S_0$) lässt sich darauf die Abhängigkeit der Wechselzahl von der maximalen Reaktionsgeschwindigkeit herleiten:

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

$$\frac{dS}{dt} = S_0 \cdot e^{-\frac{v_{max} \cdot t}{K_M}}$$

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

E_0 : Enzymkonzentration (μM); k_{cat} : Wechselzahl (engl. *turnover number*, s^{-1}); dS/dt : Substratkonzentration zum Zeitpunkt; t : Zeit (s)

6.6.3. Isothermale Titrationskalorimetrie

Die Kalorimetrie wird vielfach für die Affinitätsbestimmung zwischen Molekülen (auch biologische Makromoleküle) sowie zur Bestimmung anderer thermodynamischer Parameter (Enthalpie- (ΔH), Entropieänderung (ΔS)), oder der Bindestöchiometrie verwendet. Zur Bestimmung der Dissoziationskonstante (K_D) zwischen GtgE_{C45A} und Rab32:GDP wurde das Kalorimeter ITC200 (MicroCal) verwendet. Die Proben wurden mittels Dialyse in SEC-Puffer mit 10 μM GDP überführt (4°C, über Nacht) und die Messungen bei einer Messzelltemperatur von 37°C durchgeführt. Rab32 wurde in der Messzelle mit 20 μM vorgelegt (250 μL) und der Injektor mit 40 μL GtgE_{C45A} (200 μM) geladen. Das Injektionsvolumen betrug 1,5 μL (25 Injektionen) bei einer Referenzzellspannung von 8 $\mu\text{cal/sec}$ und einer Rotationsgeschwindigkeit von 700 rpm. Die Bindeisothermen wurden bis zur Sättigung aufgenommen und mit dem

Analyseprogramm PEAQ-ITC Analysis (Malvern) ausgewertet. Die Daten wurden entsprechend einem ‚*One-site-binding*‘-Modell angepasst und lieferte u.a. die Dissoziationskonstante und die Stöchiometrie der Bindung.

6.6.4. Analytische Ultrazentrifugation

Die analytische Ultrazentrifugation (aUZ) zeigt die Größenverteilung einer polydispersen Proteinprobe auf und kann durch Titrationsexperimente auch für die Bestimmung der Dissoziationskonstante (K_D) genutzt werden. Hierbei wird ein fluoreszent markiertes Protein mit einem unmarkierten Bindepartner in eine optisch zugängliche Zentrifugationsmesskammer pipettiert und die Fluoreszenzintensität (Sedimentationsverhalten) über die Dauer eines Zentrifugationslaufs detektiert. Die aUZ-Experimente wurden in einem Beckman ProteomeLab XL-A analytischen Ultrazentrifuge (Beckman Coulter) durchgeführt. Eine konstante Konzentration von Rab32:GDP-Atto488 (200 nM) wurde mit einer aufsteigenden GtgE_{C45A}-Konzentrationen titriert (10 nM – 45 µM, final) und für 2 h bei RT equilibriert. Die Daten wurden mit dem frei verfügbaren Analyseprogramm SedFit²⁴² ausgewertet. Die Sedimentationskoeffizienten und die Molmassen der einzelnen Spezies wurden über die Lamm-Gleichung²⁴³ erhalten. Die relative Fraktion des markierten Rabs, das an GtgE gebunden ist, wurde in Abhängigkeit von der GtgE-Konzentration aufgetragen. Daten wurden mit einer hyperbolen Gleichung angepasst und lieferte so den K_D . Die Zentrifugationsläufe wurden von Christine John (Lehrstuhl Biotechnologie, Prof. Buchner, TUM) durchgeführt. Die Probenvorbereitung und die Datenanalyse erfolgten durch den Autor.

6.6.5. Mikromaßstab Thermophorese

Die durch einen Temperaturgradienten induzierte Molekülwanderung wird als Thermophorese bezeichnet. Dieser Effekt hängt von der Ladung, dem Hydrodynamischen Radius und dem Molekulargewicht des jeweiligen Moleküls ab²⁴⁴. Unter anderem lässt sich dieser Effekt im Mikromaßstab (MST) für die Affinitätsbestimmungen von Protein-Protein-Interaktionen (PPIs) nutzen. Hierbei wird eines der Proteine kovalent mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert und der Bindepartner vom molaren Unterschuss bis in einen Überschuss (höher als der vermutete K_D) titriert. Die Gleichgewichtsmessungen für jedes Titrationsverhältnis wird in einer Glaskapillare durchgeführt. Die MST-Messungen zwischen GtgE_{C45A} und Rab32:GDP wurden an einem Monolith NT.115 Instrument (Nanotemper) durchgeführt. Hierzu wurde GtgE_{C45A} mit dem NT-647-Farbstoff (NT-647 *Labeling-Kit*; Nanotemper) nach Herstellerangaben markiert und mit 100 nM (final) eingesetzt. Dazu wurde eine Rab32:GDP Verdünnungsreihe von 50 µM bis 1,5 nM gegeben (1:1 v/v) und für 30 min in 15 µL bei Raumtemperatur inkubiert. Es wurden Premium-Kapillare (Nanotemper) verwendet. Alle Proteine wurden in GDP haltigem SEC Puffer verdünnt. Die Fluoreszenzlaserstärke lag bei 20% und die des Infrarotlasers bei 40%. Zur Bestimmung der Dissoziationskonstante wurde die normalisierte

Fluoreszenzsignaländerung nach dem MST-Sprung über die Rab32-Konzentration aufgetragen und an die K_D -Fit-Funktion, die auf dem Massenwirkungsgesetz basiert, in dem Softwarepaket des Herstellers angepasst.

6.6.6. Zirkulardichroismus Spektroskopie

Chirale Moleküle absorbieren rechts- und links-polarisiertes Licht unterschiedlich stark. Diese Eigenschaft macht man sich in der Zirkulardichroismus (CD)-Spektroskopie für die Charakterisierung von Protein zu Nutze²⁴⁵. Im Spektralbereich von 180-250 nm (Fern-UV) detektiert man spezifische Minima von Sekundärstrukturelementen (α -Helix: 208 nm und 220 nm; β -Faltblatt: 217 nm). Die proteinspezifische Schmelztemperatur lässt sich durch eine zeitaufgelöste, hitzeinduzierte Entfaltungskurve bestimmen. Dazu wird zuerst das Differenzspektrum von gefaltetem zu ungefalteten Protein gebildet und die Wellenlänge bei der größten Intensitätsänderung für die Aufnahme der Entfaltungsübergangs verwendet. Die Messung von CD-Spektren erfolgte an einem Jasco J715 CD Spektrometer (Jasco) gekoppelt an ein Peltier PTC 343 Temperaturregler in einer Quarzküvette mit 0,1 cm Schichtdicke (Helma). Als Puffer wurde 2 mM HEPES pH 7,5; 10 mM NaCl; 1 mM $MgCl_2$; 0,2 mM BME verwendet. Wellenlängen-Scans erfolgten mit 30 nm/min (8 Akkumulationen) bei 25°C oder 95°C. Temperaturübergänge wurden durch konstante Erhöhung der Temperatur um 20°C pro Stunde detektiert. Die eingesetzte Proteinkonzentration lag zwischen 0,1-0,3 mg/mL. Die molare Elliptizität pro Aminosäurerest (Θ_{MRW}) wurde wie folgt berechnet:

$$\theta_{MRW} = \frac{\theta \cdot N_{AA} \cdot 100}{MW \cdot c \cdot d}$$

Dabei ist: N_{aa} (Anzahl der Aminosäuren im Protein), MW (Molekulargewicht des Proteins in Da), c (Proteinkonzentration in mg/mL) und d (Schichtdicke der Küvette in cm).

6.6.7. Differenzscan Fluorometrie

Zur Bestimmung der Entfaltungstemperatur (auch Schmelztemperatur, T_m) von Proteinen eignet sich neben der Zirkulardichroismus-Spektroskopie (s. Abschnitt 6.6.6.) die Differenzscan Fluorometrie (DSF). Dabei wird eine proteinhaltige Lösung sukzessive in Anwesenheit eines lipophilen Fluorophors erwärmt. Mit der einsetzenden Entfaltung lagert sich der Farbstoff an die nun exponierten hydrophoben Bereiche an und die detektierte Fluoreszenzintensität nimmt zu. Dieser Ansatz wurde auch parallelisiert im 96well-Format als Screening zur Verbesserung der Pufferzusammensetzung, im Sinne der Proteinstabilisierung durchgeführt²⁴⁶. Hierzu wurden 2 μ g Protein (20 μ L) üblicher Weise in SEC Puffer (oder Puffer Screening) mit einer 5-fachen Lösung Sypro Orange® (Sigma; 5000facher Stock) versetzt und in einem Real-Time-PCR-Cycler (Mx3005P, Agilent) von 25-95°C in 1°-Schritten erwärmt. Die Fluoreszenz wurde bei 465 nm angeregt und die Emission bei 590 nm aufgezeichnet. Die Analyse wurde in Excel durchgeführt bei der die zweite Ableitung der Rohdaten in Abhängigkeit von

der Temperatur aufgetragen. Der Schnittpunkt mit der X-Achse entspricht dem Wendepunkt des Intensitätsverlaufs und damit dem T_m .

6.6.8. Fluoreszenzmikroskopie

Für die Mikroskopie wurden ausschließlich fixierte Zellen auf Deckgläschen-Präparaten verwendet (s. Abschnitt 6.7.2.). Zunächst erfolgte die Permeabilisierung der Zellmembran durch die Behandlung mit Triton X-100 (0,1% in PBS v/v, 10 min; RT). Anschließend wurden die Proben mit BSA geblockt um unspezifische Hintergrundfärbungen zu minimieren (*Blocking-Lösung*: 3% BSA w/v in PBS mit 0,1% Triton X-100 v/v; 30 min; RT). Die Primärantikörper wurden mit einer Verdünnung von 1:200 in die *Blocking-Lösung* eingesetzt und für 1 h bei RT inkubiert. Für die Immunofluoreszenzfärbung wurde hiernach die konjugierten Sekundärantikörper 1:500 in der *Blocking-Lösung* verdünnt eingesetzt und für 1 h bei RT inkubiert. Zwischen den Inkubationen mit Antikörper-Lösung wurde die Probe je drei Mal vorsichtig mit *Blocking-Lösung* gewaschen. Optional erfolgte eine Gegenfärbung der Zellkerne mit DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole, Thermo). Hierzu wurde eine 14,3 mM DAPI-Stocklösung in Wasser angesetzt (5 mg/mL) und in zwei Schritten auf 300 nM in PBS (1x) verdünnt (DAPI-Färbelösung). Nach dreimaligem Waschen mit PBS (1x) wurden die Zellen mit der DAPI-Färbelösung überschichtet und 1-5 min inkubiert und abermals mit PBS gewaschen. Für die Langzeithaltbarmachung der Proben wurden die Deckgläschen mit den gefärbten Zellen mit 30 μ L einer PVA-DABCO®-Lösung (Sigma; pH 8,7), luftblasenfrei mit der Oberseite kurz nach dem Abstreifen von überschüssigem Puffer und kurzer Lufttrocknung (wenige Minuten) auf einem Objektträger versiegelt. Nach 2 h RT-Inkubation sind die Träger bereit für die Mikroskopie. Hierzu wurden an einem Multikanal-Fluoreszenzmikroskop (BX51, Olympus) sowohl mit Hellfeld (DIC) als auch in den drei Anregungskanälen, blau (460-490 nm), grün (510-550 nm) und rot (532-587 nm) Bilder über eine verbundene Digitalkamera (Nikon Coolpix 5.1 Megapixel) in verschiedenen Vergrößerungen aufgenommen. Diesen wurden je nach Fragestellung als Überlagerung genutzt.

Die verwendeten Primärantikörper im Einzelnen: Kanninchen (Rabbit) α -c-Myc Antikörper (GenScript A00172) α -Rab32 Antikörper (abcam, ab213537); α -Salmonella Antikörper (abcam, ab35156, aus Rabbit)

Die verwendeten Sekundärantikörper im Einzelnen: α -Rabbit IgG konjugiert mit Alexa Fluor® 350 (Thermo A10039); α -Rabbit IgG konjugiert mit Alexa Fluor® 488 (abcam, ab150081); α -Rabbit IgG konjugiert mit Alexa Fluor® 647 (abcam, ab150075).

6.7. Zellbiologische und Infektionsbiologische Methoden

6.7.1. Kultivierung und Handhabung von humanen Zelllinien

Alle Humanzelllinien wurden routinemäßig in Standard-Zellkulturflaschen (Sarstedt) mit 25 mL DMEM Vollmedium (Dulbecco) ergänzt um 10% (v/v) fetalem Kälberserum (FCS), 2 mM L-Glutamin, 200 µg/ml Streptomycin und 100 U/mL Penicillin (37°C, 5% CO₂) kultiviert. Konfluente Kulturen wurden mechanisch von der Oberfläche entfernt und für die weiteren Experimente geerntet (1000 rpm, 2 min). Vorbereitend für die später durchgeführten Infektionsexperimente mit *Salmonella* sowie die Mikroskopiearbeiten (s. Abschnitte 6.6.8. und 6.7.2.) wurden alle weiteren Schritte in 24-Well Platten (TC-PlateF, Sarstedt) mit 0,5 mL Flüssigkeitsvolumen durchgeführt. Zunächst wurde ein steriles Runddeckgläschen als Substrat für die Zellen am Boden eines Wells positioniert. Nach der Zellzahlbestimmung wurden ca. $1-2,5 \cdot 10^5$ Zellen mit 0,5-3 µg Plasmid-DNA versetzt und mittels Elektroporation in dem Neon[®]-System (Invitrogen) nach Herstellerangaben in einem 100 µL-NeonTip-Aufsatz transfiziert. Die Zellen wurden nachfolgend für 18 h kultiviert (37°C, 5% CO₂).

6.7.2. Salmonelleninfektionsexperimente mit Humanzellen

Für die Infektionsstudien mit dem rekombinanten *Salmonella* Typhimurium Δ gtgE Stamm (*S. Tm* Δ gtgE, s. Abschnitt 6.2.9.) wurden transformierte *S. Tm* Δ gtgE aus einer Übernachtskultur in 5 mL 2YT-Medium angeimpft und auf eine OD von 1,6-2,0 kultiviert. Danach werden 4 OD-Einheiten geerntet (2000 rpm, 3 min, RT) und zwei Mal mit PBS (1x) gewaschen. Die Zellen wurden entweder mittels Fluoreszenzfarbstoff gefärbt (1 µL Alexa350-NHS (Thermo, 50 mM Stocklösung in DMSO) für 10 min bei RT im Dunkeln) oder direkt eingesetzt. Für die Salmonelleninfektion von Humanzellen wurde eine Infektiosität von 100 eingestellt (Verhältnis von Bakterien zu Humanzellen). Die rekombinanten Humanzellen wurden zuvor über Transfektion erzeugt (s. Abschnitt 6.7.1.). Nach dem Abzug des Mediums aus den 24-Well Platten werden die Salmonellenzellen direkt in PBS zu den adhärennten Humanzellen gegeben (250 µL). Nach 10 min wurde die Infektion durch Zugabe von Gentamycin (10 µg/mL, final) sowie 0,5 mL DMEM (10% FCS) und für 2 h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert um extrazelluläre Bakterien zu töten. Vor der weiteren Präparation für die Mikroskopie (s. Abschnitt 6.6.8.) wurden die Zellen mit Paraformaldehydlösung fixiert (4% v/v, final; 10 min; RT) und zwei Mal vor sowie zwei Mal nach der Fixierung mit PBS (1x) gewaschen.

6.7.3. Yeast-Two-Hybrid Proteininteraktionsnachweis

Das Hefe-2-Hybrid (engl. *yeast two hybrid*; Y2H) ist eine sensitive Methode zum Überprüfen einer Protein-Protein-Interaktion *in vivo*. Dabei wird ein potentieller Bindepartner rekombinant an eine DNA-Bindeprotein (Köder; engl. *bait*) sowie der mögliche Interaktionspartner an eine

Polymerase-Aktivierungsdomäne (Beute; engl. *prey*) fusioniert. Werden beide Fusionskonstrukte in derselben Hefezelle exprimiert und findet im Zellkern eine Interaktion statt, so wird die Expression eines Reportergens initiiert und die Interaktion kann detektiert werden. Beim Ausbleiben einer Interaktion unterbleibt das Signal entsprechend. Die Y2H-Experimente basieren auf dem DupLEX-A™-System (OriGene Technologies, Inc MD, USA) sowie dem Matchmaker™ Gold-System (Clontech Laboratories Inc.; CA, USA). Hierbei wurden die pLexA-GTPase Konstrukte (*bait*) mit dem MAT-a Hefestamm Y187 transformiert und auf Tryptophan-Mangelmedium plattiert (engl. *selection dropout* – Trp; SD-W) (s. Abschnitt 6.2.10.). Der MAT- α Stamm L40 Δ Gal4 wurde mit pGAD-HA GtgE Konstrukten (*prey*) transformiert, auf Leucin-Mangelmedium (SD-L) plattiert und 3-4 Tage bei 30°C inkubiert. Für das Mating von a- und α -Stamm wurden Einzelkolonien in entsprechendem SD-Flüssigmedium für 2 Tage schüttelnd (180 rpm; 30°C) kultiviert. Hieraus wurden je 50 μ L zu 100 μ L YAPD Medium gegeben (96well-Platte, Sarstedt) und für 22-24 h bei 180 rpm inkubiert. Nach der Resuspension wurden je 5 μ L auf SD-LW Agar (Mating-Kontrolle), sowie SD-LWH Agar (Interaktionstest) getropft und 3-4 Tage bei 30°C kultiviert. Bei Bedarf wurde dem SD-Agar 3'-Aminotriazol (3'-AT, Sigma) zugesetzt (0-10 mM final), ein Inhibitor der Histidin Biosynthese, der schwache Interaktionen bzw. falsch-positives Hefewachstum unterbindet. Dies erlaubt bei einer Titrationsreihe die Abschätzung der Interaktionsstärke.

6.7.4. Zytotoxizitätstest in Hefen

Die Toxizität eines Proteins lässt sich durch die rekombinante Überexpression in Zellen, wie beispielsweise Hefezellen als Modelorganismus testen. Hierzu wurden die interessierenden Proteine in den p416-GAL1 Hefevektor eingebracht (ATCC 87332™). Die Expression wird erst gestartet, sobald Galaktose als primäre Kohlenstoffquelle dient. Der GAL1 Promotor wird in Anwesenheit von Glukose gehemmt, sodass die Hefen kultiviert werden können bevor die potenziell toxischen Proteine translatiert werden. Der Hefestamm BY4741 (ATCC® 404002™) wurde mit den Expressionsvektoren transformiert wie bereits beschrieben (s. Abschnitt 6.2.10.) und auf Selektionsmedium ohne Uracil (SD -Ura) kultiviert. Eine Einzelkolonie wurde in 1 mL sterilem Wasser suspendiert und die OD_{600nm} auf 0,5 eingestellt. Aus einer 5-stufigen seriellen Verdünnungsreihe (1:10) wurden je 5 μ L auf SD -Ura mit 2% Glukose (w/v; Wachstumskontrolle) oder 2% Galaktose und 1% Rafinose (w/v; Toxizitätstest) getropft. Die Platten wurden 3-4 Tage bei 30°C inkubiert und anschließend gescannt (modifiziert nach Antic et al.¹¹⁷).

7. Literaturverzeichnis

1. Berg, J. M., Tymoczko, J. L. & Stryer, L. *Biochemie*. 7th ed. (Springer Spektrum, Berlin u.a., (2014).
2. Jékely, G. Small GTPases and the evolution of the eukaryotic cell. *BioEssays: news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* **25**, 1129–1138 (2003).
3. Pereira-Leal, J. B. & Seabra, M. C. Evolution of the Rab family of small GTP-binding proteins. *Journal of molecular biology* **313**, 889–901 (2001).
4. Self, A. J. & Hall, A. in *Rho family*, edited by W. E. Balch (Acad. Press, San Diego, 1995), pp. 67–76.
5. Colicelli, J. Human RAS superfamily proteins and related GTPases. *Science's STKE: signal transduction knowledge environment* **2004**, RE13 (2004).
6. Barr, F. & Lambright, D. G. Rab GEFs and GAPs. *Current opinion in cell biology* **22**, 461–470 (2010).
7. Cherfils, J. & Zeghouf, M. Regulation of small GTPases by GEFs, GAPs, and GDIs. *Physiological reviews* **93**, 269–309 (2013).
8. Wennerberg, K., Rossman, K. L. & Der, C. J. The Ras superfamily at a glance. *Journal of cell science* **118**, 843–846 (2005).
9. Takai, Y., Sasaki, T. & Matozaki, T. Small GTP-binding proteins. *Physiological reviews* **81**, 153–208 (2001).
10. Cox, A. D. & Der, C. J. Ras history. The saga continues. *Small GTPases* **1**, 2–27 (2010).
11. Pylayeva-Gupta, Y., Grabocka, E. & Bar-Sagi, D. RAS oncogenes. Weaving a tumorigenic web. *Nature reviews. Cancer* **11**, 761–774 (2011).
12. Pannekoek, W.-J., Linnemann, J. R., Brouwer, P. M., Bos, J. L. & Rehmann, H. Rap1 and Rap2 antagonistically control endothelial barrier resistance. *PloS one* **8**, e57903 (2013).
13. Heard, J. J., Fong, V., Bathaie, S. Z. & Tamanoi, F. Recent progress in the study of the Rheb family GTPases. *Cellular signalling* **26**, 1950–1957 (2014).
14. Etienne-Manneville, S. & Hall, A. Rho GTPases in cell biology. *Nature* **420**, 629–635 (2002).
15. Sung, C.-H. & Leroux, M. R. The roles of evolutionarily conserved functional modules in cilia-related trafficking. *Nature cell biology* **15**, 1387–1397 (2013).
16. Boor, S. de *et al.* Small GTP-binding protein Ran is regulated by posttranslational lysine acetylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **112**, E3679-88 (2015).
17. Hutagalung, A. H. & Novick, P. J. Role of Rab GTPases in membrane traffic and cell physiology. *Physiological reviews* **91**, 119–149 (2011).
18. Strader, C. D., Fong, T. M., Tota, M. R., Underwood, D. & Dixon, R. A. Structure and function of G protein-coupled receptors. *Annual review of biochemistry* **63**, 101–132 (1994).
19. Cui, J. & Shao, F. Biochemistry and cell signaling taught by bacterial effectors. *Trends in biochemical sciences* **36**, 532–540 (2011).
20. Gavin, H. E. & Satchell, K. J. F. MARTX toxins as effector delivery platforms. *Pathogens and disease* **73**, ftv092 (2015).
21. Saraste, M., Sibbald, P. R. & Wittinghofer, A. The P-loop — a common motif in ATP- and GTP-binding proteins. *Trends in biochemical sciences* **15**, 430–434 (1990).
22. Wittinghofer, A. & Vetter, I. R. Structure-function relationships of the G domain, a canonical switch motif. *Annual review of biochemistry* **80**, 943–971 (2011).
23. Pereira-Leal, J. B. & Seabra, M. C. The mammalian Rab family of small GTPases. Definition of family and subfamily sequence motifs suggests a mechanism for functional specificity in the Ras superfamily. *Journal of molecular biology* **301**, 1077–1087 (2000).
24. Pan, X., Eathiraj, S., Munson, M. & Lambright, D. G. TBC-domain GAPs for Rab GTPases accelerate GTP hydrolysis by a dual-finger mechanism. *Nature* **442**, 303–306 (2006).
25. Rittinger, K., Walker, P. A., Eccleston, J. F., Smerdon, S. J. & Gamblin, S. J. Structure at 1.65 Å of RhoA and its GTPase-activating protein in complex with a transition-state analogue. *Nature* **389**, 758–762 (1997).
26. Scheffzek, K. The Ras-RasGAP Complex. Structural Basis for GTPase Activation and Its Loss in Oncogenic Ras Mutants. *Science* **277**, 333–338 (1997).

27. Pruitt, K. & Der, C. J. Ras and Rho regulation of the cell cycle and oncogenesis. *Cancer Letters* **171**, 1–10 (2001).
28. Lamarche, N. *et al.* Rac and Cdc42 Induce Actin Polymerization and G1 Cell Cycle Progression Independently of p65PAK and the JNK/SAPK MAP Kinase Cascade. *Cell* **87**, 519–529 (1996).
29. Ahearn, I. M., Haigis, K., Bar-Sagi, D. & Philips, M. R. Regulating the regulator. Post-translational modification of RAS. *Nature reviews. Molecular cell biology* **13**, 39–51 (2011).
30. Margolis, B. & Skolnik, E. Y. Activation of Ras by receptor tyrosine kinases. *Journal of the American Society of Nephrology: JASN* **5**, 1288–1299 (1994).
31. Terrell, E. M. & Morrison, D. K. Ras-Mediated Activation of the Raf Family Kinases. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* (2018).
32. Baeuerle, P. A. & Henkel, T. Function and activation of NF-kappa B in the immune system. *Annual review of immunology* **12**, 141–179 (1994).
33. Mueller, S. *et al.* Evolutionary routes and KRAS dosage define pancreatic cancer phenotypes. *Nature* **554**, 62–68 (2018).
34. Rowinsky, E. K., Windle, J. J. & Hoff, D. D. von. Ras protein farnesyltransferase. A strategic target for anticancer therapeutic development. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology* **17**, 3631–3652 (1999).
35. Prior, I. A., Lewis, P. D. & Mattos, C. A comprehensive survey of Ras mutations in cancer. *Cancer research* **72**, 2457–2467 (2012).
36. Ostrem, J. M., Peters, U., Sos, M. L., Wells, J. A. & Shokat, K. M. K-Ras(G12C) inhibitors allosterically control GTP affinity and effector interactions. *Nature* **503**, 548–551 (2013).
37. Wu, L.-G., Hamid, E., Shin, W. & Chiang, H.-C. Exocytosis and endocytosis. Modes, functions, and coupling mechanisms. *Annual review of physiology* **76**, 301–331 (2014).
38. Stenmark, H. Rab GTPases as coordinators of vesicle traffic. *Nature reviews. Molecular cell biology* **10**, 513–525 (2009).
39. Park, H. H. Structural basis of membrane trafficking by Rab family small G protein. *International journal of molecular sciences* **14**, 8912–8923 (2013).
40. Blümer, J. *et al.* RabGEFs are a major determinant for specific Rab membrane targeting. *The Journal of cell biology* **200**, 287–300 (2013).
41. Rak, A. *et al.* Structure of Rab GDP-dissociation inhibitor in complex with prenylated YPT1 GTPase. *Science (New York, N.Y.)* **302**, 646–650 (2003).
42. Pylypenko, O. *et al.* Structure of doubly prenylated Ypt1:GDI complex and the mechanism of GDI-mediated Rab recycling. *The EMBO journal* **25**, 13–23 (2006).
43. Zerial, M. & McBride, H. Rab proteins as membrane organizers. *Nature reviews. Molecular cell biology* **2**, 107–117 (2001).
44. Settembre, C., Fraldi, A., Medina, D. L. & Ballabio, A. Signals from the lysosome. A control centre for cellular clearance and energy metabolism. *Nature reviews. Molecular cell biology* **14**, 283–296 (2013).
45. Gao, Y. *et al.* The emerging role of Rab GTPases in the pathogenesis of Parkinson's disease. *Movement disorders: official journal of the Movement Disorder Society* (2018).
46. Seabra, M. C., Mules, E. H. & Hume, A. N. Rab GTPases, intracellular traffic and disease. *Trends in Molecular Medicine* **8**, 23–30 (2002).
47. Wheeler, D. B., Zoncu, R., Root, D. E., Sabatini, D. M. & Sawyers, C. L. Identification of an oncogenic RAB protein. *Science (New York, N.Y.)* **350**, 211–217 (2015).
48. Sievers, F. & Higgins, D. G. Clustal Omega, accurate alignment of very large numbers of sequences. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* **1079**, 105–116 (2014).
49. Osanai, K. *et al.* Expression and characterization of Rab38, a new member of the Rab small G protein family. *Biological chemistry* **386**, 143–153 (2005).
50. Cohen-Solal, K. A. *et al.* Identification and characterization of mouse Rab32 by mRNA and protein expression analysis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics* **1651**, 68–75 (2003).
51. Wasmeier, C. *et al.* Rab38 and Rab32 control post-Golgi trafficking of melanogenic enzymes. *The Journal of cell biology* **175**, 271–281 (2006).

52. Bultema, J. J. & Di Pietro, S. M. Cell type-specific Rab32 and Rab38 cooperate with the ubiquitous lysosome biogenesis machinery to synthesize specialized lysosome-related organelles. *Small GTPases* **4**, 16–21 (2013).
53. Spanò, S. & Galán, J. E. A Rab32-dependent pathway contributes to *Salmonella typhi* host restriction. *Science (New York, N.Y.)* **338**, 960–963 (2012).
54. Bultema, J. J., Ambrosio, A. L., Burek, C. L. & Di Pietro, S. M. BLOC-2, AP-3, and AP-1 proteins function in concert with Rab38 and Rab32 proteins to mediate protein trafficking to lysosome-related organelles. *The Journal of biological chemistry* **287**, 19550–19563 (2012).
55. Bultema, J. J. *et al.* Myosin vc interacts with Rab32 and Rab38 proteins and works in the biogenesis and secretion of melanosomes. *The Journal of biological chemistry* **289**, 33513–33528 (2014).
56. Ambrosio, A. L., Boyle, J. A. & Di Pietro, S. M. Mechanism of platelet dense granule biogenesis. Study of cargo transport and function of Rab32 and Rab38 in a model system. *Blood* **120**, 4072–4081 (2012).
57. Bao, X., Faris, A. E., Jang, E. K. & Haslam, R. J. Molecular cloning, bacterial expression and properties of Rab31 and Rab32. *European Journal of Biochemistry* **269**, 259–271 (2002).
58. Hesketh, G. G. *et al.* VARP is recruited on to endosomes by direct interaction with retromer, where together they function in export to the cell surface. *Developmental cell* **29**, 591–606 (2014).
59. Fukuda, M. Multiple Roles of VARP in Endosomal Trafficking. Rabs, Retromer Components and R-SNARE VAMP7 Meet on VARP. *Traffic (Copenhagen, Denmark)* **17**, 709–719 (2016).
60. Schäfer, I. B. *et al.* The binding of Varp to VAMP7 traps VAMP7 in a closed, fusogenically inactive conformation. *Nature structural & molecular biology* **19**, 1300–1309 (2012).
61. Chaineau, M., Danglot, L. & Galli, T. Multiple roles of the vesicular-SNARE TI-VAMP in post-Golgi and endosomal trafficking. *FEBS letters* **583**, 3817–3826 (2009).
62. Hirota, Y. & Tanaka, Y. A small GTPase, human Rab32, is required for the formation of autophagic vacuoles under basal conditions. *Cellular and molecular life sciences: CMLS* **66**, 2913–2932 (2009).
63. Amaya, C., Fader, C. M. & Colombo, M. I. Autophagy and proteins involved in vesicular trafficking. *FEBS letters* **589**, 3343–3353 (2015).
64. Alto, N. M., Soderling, J. & Scott, J. D. Rab32 is an A-kinase anchoring protein and participates in mitochondrial dynamics. *The Journal of cell biology* **158**, 659–668 (2002).
65. Bui, M. *et al.* Rab32 modulates apoptosis onset and mitochondria-associated membrane (MAM) properties. *The Journal of biological chemistry* **285**, 31590–31602 (2010).
66. Li, Y. *et al.* Analysis of the Rab GTPase Interactome in Dendritic Cells Reveals Anti-microbial Functions of the Rab32 Complex in Bacterial Containment. *Immunity* **44**, 422–437 (2016).
67. Stein, M.-P., Müller, M. P. & Wandinger-Ness, A. Bacterial pathogens commandeer Rab GTPases to establish intracellular niches. *Traffic (Copenhagen, Denmark)* **13**, 1565–1588 (2012).
68. Gerondopoulos, A., Langemeyer, L., Liang, J.-R., Linford, A. & Barr, F. A. BLOC-3 mutated in Hermansky-Pudlak syndrome is a Rab32/38 guanine nucleotide exchange factor. *Current biology: CB* **22**, 2135–2139 (2012).
69. Nottingham, R. M., Ganley, I. G., Barr, F. A., Lambright, D. G. & Pfeffer, S. R. RUTBC1 protein, a Rab9A effector that activates GTP hydrolysis by Rab32 and Rab33B proteins. *The Journal of biological chemistry* **286**, 33213–33222 (2011).
70. Kloer, D. P. *et al.* Assembly of the biogenesis of lysosome-related organelles complex-3 (BLOC-3) and its interaction with Rab9. *The Journal of biological chemistry* **285**, 7794–7804 (2010).
71. Marubashi, S., Shimada, H., Fukuda, M. & Ohbayashi, N. RUTBC1 Functions as a GTPase-activating Protein for Rab32/38 and Regulates Melanogenic Enzyme Trafficking in Melanocytes. *The Journal of biological chemistry* **291**, 1427–1440 (2016).
72. Bonifacino, J. S. Insights into the biogenesis of lysosome-related organelles from the study of the Hermansky-Pudlak syndrome. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1038**, 103–114 (2004).
73. Wei, A.-H. & Li, W. Hermansky-Pudlak syndrome. Pigmentary and non-pigmentary defects and their pathogenesis. *Pigment cell & melanoma research* **26**, 176–192 (2013).
74. Haile, Y. *et al.* Rab32 connects ER stress to mitochondrial defects in multiple sclerosis. *Journal of neuroinflammation* **14**, 19 (2017).

75. Maßmann, S., Schürmann, A. & Joost, H.-G. Cloning of two splicing variants of the novel Ras-related GTPase Rab29 which is predominately expressed in kidney. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression* **1352**, 48–55 (1997).
76. Onnis, A. *et al.* The small GTPase Rab29 is a common regulator of immune synapse assembly and ciliogenesis. *Cell death and differentiation* **22**, 1687–1699 (2015).
77. Wang, S. *et al.* A role of Rab29 in the integrity of the trans-Golgi network and retrograde trafficking of mannose-6-phosphate receptor. *PLoS one* **9**, e96242 (2014).
78. Aoki, Y. *et al.* C9orf72 and RAB7L1 regulate vesicle trafficking in amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia. *Brain: a journal of neurology* **140**, 887–897 (2017).
79. Steger, M. *et al.* Systematic proteomic analysis of LRRK2-mediated Rab GTPase phosphorylation establishes a connection to ciliogenesis. *eLife* **6** (2017).
80. Fujimoto, T. *et al.* Parkinson's disease-associated mutant LRRK2 phosphorylates Rab7L1 and modifies trans-Golgi morphology. *Biochemical and biophysical research communications* (2017).
81. MacLeod, D. A. *et al.* RAB7L1 interacts with LRRK2 to modify intraneuronal protein sorting and Parkinson's disease risk. *Neuron* **77**, 425–439 (2013).
82. Purlyte, E. *et al.* Rab29 activation of the Parkinson's disease-associated LRRK2 kinase. *The EMBO journal* (2017).
83. Zimprich, A. *et al.* Mutations in LRRK2 cause autosomal-dominant parkinsonism with pleomorphic pathology. *Neuron* **44**, 601–607 (2004).
84. Lücking, C. B. *et al.* Association between early-onset Parkinson's disease and mutations in the parkin gene. *The New England journal of medicine* **342**, 1560–1567 (2000).
85. Spanò, S., Liu, X. & Galán, J. E. Proteolytic targeting of Rab29 by an effector protein distinguishes the intracellular compartments of human-adapted and broad-host Salmonella. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108**, 18418–18423 (2011).
86. Chamberlain, L. H. & Shipston, M. J. The physiology of protein S-acylation. *Physiological reviews* **95**, 341–376 (2015).
87. Behnia, R., Panic, B., Whyte, J. R. C. & Munro, S. Targeting of the Arf-like GTPase Arl3p to the Golgi requires N-terminal acetylation and the membrane protein Sys1p. *Nature cell biology* **6**, 405–413 (2004).
88. Levin, R. S., Hertz, N. T., Burlingame, A. L., Shokat, K. M. & Mukherjee, S. Innate immunity kinase TAK1 phosphorylates Rab1 on a hotspot for posttranslational modifications by host and pathogen. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **113**, E4776–83 (2016).
89. Lai, Y.-C. *et al.* Phosphoproteomic screening identifies Rab GTPases as novel downstream targets of PINK1. *The EMBO journal* **34**, 2840–2861 (2015).
90. Alexandrov, K. *et al.* Characterization of the ternary complex between Rab7, REP-1 and Rab geranylgeranyl transferase. *Eur J Biochem* **265**, 160–170 (1999).
91. Resh, M. D. Trafficking and signaling by fatty-acylated and prenylated proteins. *Nature chemical biology* **2**, 584–590 (2006).
92. Goldberg, J. Structural Basis for Activation of ARF GTPase. *Cell* **95**, 237–248 (1998).
93. Roberts, P. J. *et al.* Rho Family GTPase modification and dependence on CAAX motif-signaled posttranslational modification. *The Journal of biological chemistry* **283**, 25150–25163 (2008).
94. Aktories, K. Bacterial protein toxins that modify host regulatory GTPases. *Nature reviews. Microbiology* **9**, 487–498 (2011).
95. Horiguchi, Y. *et al.* Bordetella bronchiseptica dermonecrotizing toxin induces reorganization of actin stress fibers through deamidation of Gln-63 of the GTP-binding protein Rho. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **94**, 11623–11626 (1997).
96. Mukherjee, S. *et al.* Modulation of Rab GTPase function by a protein phosphocholine transferase. *Nature* **477**, 103–106 (2011).
97. Ribet, D. & Cossart, P. Pathogen-mediated posttranslational modifications. A re-emerging field. *Cell* **143**, 694–702 (2010).
98. Hedberg, C. & Itzen, A. Molecular perspectives on protein adenylylation. *ACS chemical biology* **10**, 12–21 (2015).
99. Canova, M. J. & Molle, V. Bacterial serine/threonine protein kinases in host-pathogen interactions. *The Journal of biological chemistry* **289**, 9473–9479 (2014).

100. Isberg, R. R., O'Connor, T. J. & Heidtman, M. The Legionella pneumophila replication vacuole. Making a cosy niche inside host cells. *Nature reviews. Microbiology* **7**, 13–24 (2009).
101. Stebbins, C. E. & Galán, J. E. Structural mimicry in bacterial virulence. *Nature* **412**, 701–705 (2001).
102. Müller, M. P. *et al.* The Legionella effector protein DrrA AMPylates the membrane traffic regulator Rab1b. *Science (New York, N.Y.)* **329**, 946–949 (2010).
103. Ingmundson, A., Delprato, A., Lambright, D. G. & Roy, C. R. Legionella pneumophila proteins that regulate Rab1 membrane cycling. *Nature* **450**, 365–369 (2007).
104. Mattoo, S. *et al.* Comparative analysis of Histophilus somni immunoglobulin-binding protein A (IbpA) with other fic domain-containing enzymes reveals differences in substrate and nucleotide specificities. *The Journal of biological chemistry* **286**, 32834–32842 (2011).
105. Luong, P. *et al.* Kinetic and structural insights into the mechanism of AMPylation by VopS Fic domain. *The Journal of biological chemistry* **285**, 20155–20163 (2010).
106. Aktories, K., ROSENER, S., BLASCHKE, U. & CHHATWAL, G. S. Botulinum ADP-ribosyltransferase C3. Purification of the enzyme and characterization of the ADP-ribosylation reaction in platelet membranes. *Eur J Biochem* **172**, 445–450 (1988).
107. Genth, H., Schmidt, M., Gerhard, R., Aktories, K. & Just, I. Activation of phospholipase D1 by ADP-ribosylated RhoA. *Biochemical and biophysical research communications* **302**, 127–132 (2003).
108. Orth, J. H. C. *et al.* Substrate specificity of Pasteurella multocida toxin for α subunits of heterotrimeric G proteins. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **27**, 832–842 (2013).
109. Jank, T. *et al.* A bacterial toxin catalyzing tyrosine glycosylation of Rho and deamidation of Gq and Gi proteins. *Nature structural & molecular biology* **20**, 1273–1280 (2013).
110. Li, X. *et al.* Gai1 and Gai3 regulate macrophage polarization by forming a complex containing CD14 and Gab1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **112**, 4731–4736 (2015).
111. Eichel-Streiber, C. von, BOQUET, P., SAUERBORN, M. & THELESTAM, M. Large clostridial cytotoxins — a family of glycosyltransferases modifying small GTP-binding proteins. *Trends in microbiology* **4**, 375–382 (1996).
112. Just, I. *et al.* The enterotoxin from Clostridium difficile (ToxA) monoglucosylates the Rho proteins. *The Journal of biological chemistry* **270**, 13932–13936 (1995).
113. Zhou, Y. *et al.* N ϵ -Fatty acylation of Rho GTPases by a MARTX toxin effector. *Science (New York, N.Y.)* **358**, 528–531 (2017).
114. Qiu, J. *et al.* Ubiquitination independent of E1 and E2 enzymes by bacterial effectors. *Nature* **533**, 120–124 (2016).
115. Bhogaraju, S. *et al.* Phosphoribosylation of Ubiquitin Promotes Serine Ubiquitination and Impairs Conventional Ubiquitination. *Cell* **167**, 1636–1649.e13 (2016).
116. Navarro, L. *et al.* Identification of a molecular target for the Yersinia protein kinase A. *Molecular cell* **26**, 465–477 (2007).
117. Antic, I., Biancucci, M. & Satchell, K. J. F. Cytotoxicity of the Vibrio vulnificus MARTX toxin effector DUF5 is linked to the C2A subdomain. *Proteins* **82**, 2643–2656 (2014).
118. Antic, I., Biancucci, M., Zhu, Y., Gius, D. R. & Satchell, K. J. F. Site-specific processing of Ras and Rap1 Switch I by a MARTX toxin effector domain. *Nature communications* **6**, 7396 (2015).
119. Shao, F. *et al.* Biochemical characterization of the Yersinia YopT protease. Cleavage site and recognition elements in Rho GTPases. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **100**, 904–909 (2003).
120. Al-Quadan, T., Price, C. T., London, N., Schueler-Furman, O. & AbuKwaik, Y. Anchoring of bacterial effectors to host membranes through host-mediated lipidation by prenylation. A common paradigm. *Trends in microbiology* **19**, 573–579 (2011).
121. Reinicke, A. T. *et al.* A Salmonella typhimurium effector protein SifA is modified by host cell prenylation and S-acylation machinery. *The Journal of biological chemistry* **280**, 14620–14627 (2005).
122. Hicks, S. W. & Galán, J. E. Exploitation of eukaryotic subcellular targeting mechanisms by bacterial effectors. *Nature reviews. Microbiology* **11**, 316–326 (2013).

123. Majowicz, S. E. *et al.* The global burden of nontyphoidal *Salmonella* gastroenteritis. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America* **50**, 882–889 (2010).
124. Jones, M. K. & Oliver, J. D. *Vibrio vulnificus*. Disease and pathogenesis. *Infection and immunity* **77**, 1723–1733 (2009).
125. Oliver, J. D. Wound infections caused by *Vibrio vulnificus* and other marine bacteria. *Epidemiol. Infect.* **133**, 383–391 (1999).
126. Coburn, B., Grassl, G. A. & Finlay, B. B. *Salmonella*, the host and disease. A brief review. *Immunology and cell biology* **85**, 112–118 (2007).
127. Eckmann, L. & Kagnoff, M. F. Cytokines in host defense against *Salmonella*. *Microbes and infection* **3**, 1191–1200 (2001).
128. Mastroeni, P. & Grant, A. J. Spread of *Salmonella enterica* in the body during systemic infection. Unravelling host and pathogen determinants. *Expert reviews in molecular medicine* **13**, e12 (2011).
129. Sabbagh, S. C., Forest, C. G., Lepage, C., Leclerc, J.-M. & Daigle, F. So similar, yet so different. Uncovering distinctive features in the genomes of *Salmonella enterica* serovars Typhimurium and Typhi. *FEMS microbiology letters* **305**, 1–13 (2010).
130. Spanò, S., Ugalde, J. E. & Galán, J. E. Delivery of a *Salmonella* Typhi exotoxin from a host intracellular compartment. *Cell host & microbe* **3**, 30–38 (2008).
131. Song, J., Gao, X. & Galán, J. E. Structure and function of the *Salmonella* Typhi chimaeric A(2)B(5) typhoid toxin. *Nature* **499**, 350–354 (2013).
132. Chang, S.-J., Song, J. & Galán, J. E. Receptor-Mediated Sorting of Typhoid Toxin during Its Export from *Salmonella* Typhi-Infected Cells. *Cell host & microbe* **20**, 682–689 (2016).
133. Crump, J. A., Luby, S. P. & Mintz, E. D. The global burden of typhoid fever. *Bulletin of the World Health Organization* **82**, 346–353 (2004).
134. Brumell, J. H. & Scidmore, M. A. Manipulation of rab GTPase function by intracellular bacterial pathogens. *Microbiology and molecular biology reviews: MMBR* **71**, 636–652 (2007).
135. Hybiske, K. & Stephens, R. S. Exit strategies of intracellular pathogens. *Nature reviews. Microbiology* **6**, 99–110 (2008).
136. López de Armentia, M. M., Amaya, C. & Colombo, M. I. Rab GTPases and the Autophagy Pathway. Bacterial Targets for a Suitable Biogenesis and Trafficking of Their Own Vacuoles. *Cells* **5** (2016).
137. Bakowski, M. A., Braun, V. & Brumell, J. H. *Salmonella*-containing vacuoles. Directing traffic and nesting to grow. *Traffic (Copenhagen, Denmark)* **9**, 2022–2031 (2008).
138. Galán, J. E. in *The Activities of Bacterial Pathogens In Vivo*, edited by H. Smith, C. J. Dorman, G. Dougan, D. W. Holden & P. Williams (IMPERIAL COLLEGE PRESS 2001), pp. 53–86.
139. Akeda, Y. & Galán, J. E. Chaperone release and unfolding of substrates in type III secretion. *Nature* **437**, 911–915 (2005).
140. LaRock, D. L., Chaudhary, A. & Miller, S. I. *Salmonellae* interactions with host processes. *Nature reviews. Microbiology* **13**, 191–205 (2015).
141. Humphreys, D., Davidson, A., Hume, P. J. & Koronakis, V. *Salmonella* virulence effector SopE and Host GEF ARNO cooperate to recruit and activate WAVE to trigger bacterial invasion. *Cell host & microbe* **11**, 129–139 (2012).
142. Humphreys, D., Hume, P. J. & Koronakis, V. The *Salmonella* effector SptP dephosphorylates host AAA+ ATPase VCP to promote development of its intracellular replicative niche. *Cell host & microbe* **5**, 225–233 (2009).
143. Bakowski, M. A. *et al.* The phosphoinositide phosphatase SopB manipulates membrane surface charge and trafficking of the *Salmonella*-containing vacuole. *Cell host & microbe* **7**, 453–462 (2010).
144. Ho, T. D. *et al.* Identification of GtgE, a Novel Virulence Factor Encoded on the Gifsy-2 Bacteriophage of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium. *Journal of Bacteriology* **184**, 5234–5239 (2002).
145. Kohler, A. C., Spanò, S., Galán, J. E. & Stebbins, C. E. Structural and enzymatic characterization of a host-specificity determinant from *Salmonella*. *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography* **70**, 384–391 (2014).

146. Xu, C., Kozlov, G., Wong, K., Gehring, K. & Cygler, M. Crystal Structure of the Salmonella Typhimurium Effector GtgE. *PLoS one* **11**, e0166643 (2016).
147. Spanò, S. & Galán, J. E. A Rab32-dependent pathway contributes to Salmonella typhi host restriction. *Science (New York, N.Y.)* **338**, 960–963 (2012).
148. Schroeder, N. *et al.* The virulence protein SopD2 regulates membrane dynamics of Salmonella-containing vacuoles. *PLoS pathogens* **6**, e1001002 (2010).
149. Brumell, J. H. *et al.* SopD2 is a novel type III secreted effector of Salmonella typhimurium that targets late endocytic compartments upon delivery into host cells. *Traffic (Copenhagen, Denmark)* **4**, 36–48 (2003).
150. D'Costa, V. M. *et al.* Salmonella Disrupts Host Endocytic Trafficking by SopD2-Mediated Inhibition of Rab7. *Cell reports* **12**, 1508–1518 (2015).
151. Spanò, S., Gao, X., Hannemann, S., Lara-Tejero, M. & Galán, J. E. A Bacterial Pathogen Targets a Host Rab-Family GTPase Defense Pathway with a GAP. *Cell host & microbe* **19**, 216–226 (2016).
152. Teo, W. X. *et al.* Salmonella effector SopD2 interferes with Rab34 function. *Cell biology international* **41**, 433–446 (2017).
153. Horseman, M. A. & Surani, S. A comprehensive review of Vibrio vulnificus. An important cause of severe sepsis and skin and soft-tissue infection. *International journal of infectious diseases: IJID: official publication of the International Society for Infectious Diseases* **15**, e157-66 (2011).
154. Satchell, K. J. F. MARTX, multifunctional autoprocessing repeats-in-toxin toxins. *Infection and immunity* **75**, 5079–5084 (2007).
155. Gavin, H. E., Beubier, N. T. & Satchell, K. J. F. The Effector Domain Region of the Vibrio vulnificus MARTX Toxin Confers Biphasic Epithelial Barrier Disruption and Is Essential for Systemic Spread from the Intestine. *PLoS pathogens* **13**, e1006119 (2017).
156. Prochazkova, K. *et al.* Structural and molecular mechanism for autoprocessing of MARTX toxin of Vibrio cholerae at multiple sites. *The Journal of biological chemistry* **284**, 26557–26568 (2009).
157. Woida, P. J. & Satchell, K. J. F. Coordinated delivery and function of bacterial MARTX toxin effectors. *Molecular microbiology* (2017).
158. Kim, B. A., Lim, J. Y., Rhee, J. H. & Kim, Y. R. Characterization of Prohibitin 1 as a Host Partner of Vibrio vulnificus RtxA1 Toxin. *The Journal of infectious diseases* **213**, 131–138 (2016).
159. Agarwal, S. *et al.* Autophagy and endosomal trafficking inhibition by Vibrio cholerae MARTX toxin phosphatidylinositol-3-phosphate-specific phospholipase A1 activity. *Nature communications* **6**, 8745 (2015).
160. Agarwal, S., Zhu, Y., Gius, D. R. & Satchell, K. J. F. The Makes Caterpillars Floppy (MCF)-Like Domain of Vibrio vulnificus Induces Mitochondrion-Mediated Apoptosis. *Infection and immunity* **83**, 4392–4403 (2015).
161. Minasov, G. *et al.* 1.55 Angstrom Crystal Structure of the Four Helical Bundle Membrane Localization Domain (4HBM) of the Vibrio vulnificus MARTX Effector Domain DUF5 (2012).
162. Hisao, G. S., Brothers, M. C., Ho, M., Wilson, B. A. & Rienstra, C. M. The membrane localization domains of two distinct bacterial toxins form a 4-helix-bundle in solution. *Protein science: a publication of the Protein Society* **26**, 497–504 (2017).
163. Kitadokoro, K. *et al.* Crystal structures reveal a thiol protease-like catalytic triad in the C-terminal region of Pasteurella multocida toxin. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **104**, 5139–5144 (2007).
164. Radzicka, A. & Wolfenden, R. Rates of Uncatalyzed Peptide Bond Hydrolysis in Neutral Solution and the Transition State Affinities of Proteases. *Journal of the American Chemical Society* **118**, 6105–6109 (1996).
165. Verzijl, N. *et al.* Effect of collagen turnover on the accumulation of advanced glycation end products. *The Journal of biological chemistry* **275**, 39027–39031 (2000).
166. Glickman, M. H. & Ciechanover, A. The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway. Destruction for the sake of construction. *Physiological reviews* **82**, 373–428 (2002).
167. Salvesen, G. S. & Dixit, V. M. Caspases. Intracellular Signaling by Proteolysis. *Cell* **91**, 443–446 (1997).
168. Neurath, H. & Walsh, K. A. Role of proteolytic enzymes in biological regulation (a review). *Proceedings of the National Academy of Sciences* **73**, 3825–3832 (1976).

169. Turk, B. Targeting proteases. Successes, failures and future prospects. *Nature reviews. Drug discovery* **5**, 785–799 (2006).
170. Rawlings, N. D. & Barrett, A. J. Evolutionary families of peptidases. *The Biochemical journal* **290** (Pt 1), 205–218 (1993).
171. Schechter, I. & Berger, A. On the size of the active site in proteases. I. Papain. *Biochemical and biophysical research communications* **27**, 157–162 (1967).
172. Hedstrom, L. Serine Protease Mechanism and Specificity. *Chemical Review* **102**, 4501–4524 (2002).
173. Gutteridge, A. & Thornton, J. M. Understanding nature's catalytic toolkit. *Trends in biochemical sciences* **30**, 622–629 (2005).
174. Harris, T. K. & Turner, G. J. Structural basis of perturbed pKa values of catalytic groups in enzyme active sites. *IUBMB life* **53**, 85–98 (2002).
175. Tang, J. & Wong, R. N. Evolution in the structure and function of aspartic proteases. *Journal of cellular biochemistry* **33**, 53–63 (1987).
176. Ekici, O. D., Paetzel, M. & Dalbey, R. E. Unconventional serine proteases. Variations on the catalytic Ser/His/Asp triad configuration. *Protein science: a publication of the Protein Society* **17**, 2023–2037 (2008).
177. Morihara, K., Tsuzuki, H., Murao, S. & Oda, K. Pepstatin-insensitive acid proteases from *Scytalidium lignicolum*. Kinetic study with synthetic peptides. *Journal of biochemistry* **85**, 661–668 (1979).
178. Jensen, K., Østergaard, P. R., Wilting, R. & Lassen, S. F. Identification and characterization of a bacterial glutamic peptidase. *BMC biochemistry* **11**, 47 (2010).
179. Oda, K. New families of carboxyl peptidases. Serine-carboxyl peptidases and glutamic peptidases. *Journal of biochemistry* **151**, 13–25 (2012).
180. Pillai, B. *et al.* Crystal structure of scytalidoglutamic peptidase with its first potent inhibitor provides insights into substrate specificity and catalysis. *Journal of molecular biology* **365**, 343–361 (2007).
181. Flexner, C. HIV-protease inhibitors. *The New England journal of medicine* **338**, 1281–1292 (1998).
182. Lebrun, I., Marques-Porto, R., Pereira, A. & Perpetuo, E. Bacterial Toxins. An Overview on Bacterial Proteases and their Action as Virulence Factors. *MRMC* **9**, 820–828 (2009).
183. Baldari, C. T., Tonello, F., Paccani, S. R. & Montecucco, C. Anthrax toxins. A paradigm of bacterial immune suppression. *Trends in immunology* **27**, 434–440 (2006).
184. Potempa, J. & Pike, R. N. Corruption of innate immunity by bacterial proteases. *Journal of innate immunity* **1**, 70–87 (2009).
185. dos Reis, F. C. G. *et al.* The substrate specificity of cruzipain 2, a cysteine protease isoform from *Trypanosoma cruzi*. *FEMS microbiology letters* **259**, 215–220 (2006).
186. Sorg, I., Goehring, U. M., Aktories, K. & Schmidt, G. Recombinant *Yersinia* YopT leads to uncoupling of RhoA-effector interaction. *Infection and immunity* **69**, 7535–7543 (2001).
187. Shao, F., Merritt, P. M., Bao, Z., Innes, R. W. & Dixon, J. E. A *Yersinia* Effector and a *Pseudomonas* Avirulence Protein Define a Family of Cysteine Proteases Functioning in Bacterial Pathogenesis. *Cell* **109**, 575–588 (2002).
188. Zhu, M., Shao, F., Innes, R. W., Dixon, J. E. & Xu, Z. The crystal structure of *Pseudomonas* avirulence protein AvrPphB. A papain-like fold with a distinct substrate-binding site. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **101**, 302–307 (2004).
189. Spanò, S., Gao, X., Hannemann, S., Lara-Tejero, M. & Galán, J. E. A Bacterial Pathogen Targets a Host Rab-Family GTPase Defense Pathway with a GAP. *Cell host & microbe* **19**, 216–226 (2016).
190. Wachtel, R. *et al.* The protease GtgE from *Salmonella* exclusively targets inactive Rab GTPases. *Nature communications* **9**, 44 (2018).
191. Krissinel, E. & Henrick, K. Inference of macromolecular assemblies from crystalline state. *Journal of molecular biology* **372**, 774–797 (2007).
192. Merithew, E. *et al.* Structural plasticity of an invariant hydrophobic triad in the switch regions of Rab GTPases is a determinant of effector recognition. *The Journal of biological chemistry* **276**, 13982–13988 (2001).

193. Maurer-Stroh, S. & Eisenhaber, F. Refinement and prediction of protein prenylation motifs. *Genome biology* **6**, R55 (2005).
194. Cabantous, S., Terwilliger, T. C. & Waldo, G. S. Protein tagging and detection with engineered self-assembling fragments of green fluorescent protein. *Nature biotechnology* **23**, 102–107 (2005).
195. van Engelenburg, S. B. & Palmer, A. E. Imaging type-III secretion reveals dynamics and spatial segregation of Salmonella effectors. *Nature methods* **7**, 325–330 (2010).
196. Fiser, A. & Šali, A. in *Macromolecular crystallography*, edited by C. W. Carter & R. M. Sweet (Elsevier Academic, Amsterdam, Boston, 2003), pp. 461–491.
197. Söding, J., Biegert, A. & Lupas, A. N. The HHpred interactive server for protein homology detection and structure prediction. *Nucleic acids research* **33**, W244–8 (2005).
198. Moore, K. J., Webb, M. R. & Eccleston, J. F. Mechanism of GTP hydrolysis by p21N-ras catalyzed by GAP. Studies with a fluorescent GTP analogue. *Biochemistry* **32**, 7451–7459 (1993).
199. Yu, Z. *et al.* Irreversible Inhibition of the HIV-1 Protease. Targeting Alkylating Agents to the Catalytic Aspartate Groups. *Journal of the American Chemical Society* **118**, 5846–5856 (1996).
200. Rajagopalan, T. G., Stein, W. H. & Moore, S. The inactivation of pepsin by diazoacetylornithine methyl ester. *The Journal of biological chemistry* **241**, 4295–4297 (1966).
201. Cox, J. & Mann, M. MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification. *Nature biotechnology* **26**, 1367–1372 (2008).
202. Schoebel, S., Cichy, A. L., Goody, R. S. & Itzen, A. Protein LidA from Legionella is a Rab GTPase supereffector. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108**, 17945–17950 (2011).
203. Wu, Y.-W., Tan, K.-T., Waldmann, H., Goody, R. S. & Alexandrov, K. Interaction analysis of prenylated Rab GTPase with Rab escort protein and GDP dissociation inhibitor explains the need for both regulators. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **104**, 12294–12299 (2007).
204. Pylypenko, O. *et al.* Structure of Rab escort protein-1 in complex with Rab geranylgeranyltransferase. *Molecular cell* **11**, 483–494 (2003).
205. Ignatev, A., Kravchenko, S., Rak, A., Goody, R. S. & Pylypenko, O. A structural model of the GDP dissociation inhibitor rab membrane extraction mechanism. *The Journal of biological chemistry* **283**, 18377–18384 (2008).
206. Spanò, S. Mechanisms of Salmonella Typhi Host Restriction. *Advances in experimental medicine and biology* **915**, 283–294 (2016).
207. Spanò, S. Host restriction in Salmonella. Insights from Rab GTPases. *Cellular microbiology* **16**, 1321–1328 (2014).
208. Kiontke, S. *et al.* Architecture and mechanism of the late endosomal Rab7-like Ypt7 guanine nucleotide exchange factor complex Mon1-Ccz1. *Nature communications* **8**, 14034 (2017).
209. Rawlings, N. D. *et al.* The MEROPS database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors in 2017 and a comparison with peptidases in the PANTHER database. *Nucleic acids research* **46**, D624–D632 (2018).
210. Fujinaga, M., Cherney, M. M., Oyama, H., Oda, K. & James, M. N. G. The molecular structure and catalytic mechanism of a novel carboxyl peptidase from *Scytalidium lignicolum*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **101**, 3364–3369 (2004).
211. Kondo, M. Y. *et al.* Studies on the catalytic mechanism of a glutamic peptidase. *The Journal of biological chemistry* **285**, 21437–21445 (2010).
212. Xiang, Y. *et al.* Crystallographic insights into the autocatalytic assembly mechanism of a bacteriophage tail spike. *Molecular cell* **34**, 375–386 (2009).
213. Vogeley, L. *et al.* Structural basis of lipoprotein signal peptidase II action and inhibition by the antibiotic globomycin. *Science (New York, N.Y.)* **351**, 876–880 (2016).
214. Jonathan Kordon. *Peptidase activity of the V. vulnificus MARTX effector protease DUF5. A biochemical characterization in vitro.* Abschlussbericht zum Forschungspraktikum im chemischen Nebenfach des Masterstudiengangs Biochemie an der TU München (Garching, 2016).
215. Biancucci, M. *et al.* Substrate Recognition of MARTX Ras/Rap1-Specific Endopeptidase. *Biochemistry* **56**, 2747–2757 (2017).
216. Hol, W. G. The role of the α -helix dipole in protein function and structure. *Progress in Biophysics and Molecular Biology* **45**, 149–195 (1985).

217. Richardson, J. S. The anatomy and taxonomy of protein structure. *Advances in protein chemistry* **34**, 167–339 (1981).
218. van Duijnen, P. T., Thole, B. T., Broer, R. & Nieuwpoort, W. C. Active-site -helix in papain and the stability of the ion pair RS₂ImH⁺. Ab initio molecular orbital study. *Int. J. Quantum Chem.* **17**, 651–671 (1980).
219. Zakharova, M. Y. *et al.* Substrate recognition of anthrax lethal factor examined by combinatorial and pre-steady-state kinetic approaches. *The Journal of biological chemistry* **284**, 17902–17913 (2009).
220. Chen, S. & Wan, H. Y. Molecular mechanisms of substrate recognition and specificity of botulinum neurotoxin serotype F. *The Biochemical journal* **433**, 277–284 (2011).
221. T. K. Korhonen, K. Lähteenmäki, M. Kukkonen & H. Lang (eds.). *Plasminogen activator of Yersinia pestis* (Elsevier, 2004).
222. Ridky, T. W. *et al.* Drug-resistant HIV-1 proteases identify enzyme residues important for substrate selection and catalytic rate. *Biochemistry* **37**, 13835–13845 (1998).
223. Kalińska, M. *et al.* Substrate specificity of Staphylococcus aureus cysteine proteases--Staphopains A, B and C. *Biochimie* **94**, 318–327 (2012).
224. Sun, P., Austin, B. P., Tözsér, J. & Waugh, D. S. Structural determinants of tobacco vein mottling virus protease substrate specificity. *Protein science: a publication of the Protein Society* **19**, 2240–2251 (2010).
225. Liu, C. C. & Schultz, P. G. Adding new chemistries to the genetic code. *Annual review of biochemistry* **79**, 413–444 (2010).
226. Xiang, Z. *et al.* Proximity-enabled protein crosslinking through genetically encoding haloalkane unnatural amino acids. *Angewandte Chemie (International ed. in English)* **53**, 2190–2193 (2014).
227. Cigler, M. *et al.* Proximity-Triggered Covalent Stabilization of Low-Affinity Protein Complexes In Vitro and In Vivo. *Angewandte Chemie (International ed. in English)* **56**, 15737–15741 (2017).
228. Northwestern University, 2016. *Bacterial toxins and uses thereof as ras-specific proteases*. Inventor: Karla J.F. Satchell, Irena Antic, Marco Biancucci. US 14/816,724., United States patent US 20160030531 A1. 2014 Aug 1st.
229. Reetz, M. T. & Carballeira, J. D. Iterative saturation mutagenesis (ISM) for rapid directed evolution of functional enzymes. *Nature protocols* **2**, 891–903 (2007).
230. Zhang, Z. & Marshall, A. G. 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 (1998).
231. Jansohn, M. & Rothhämel, S. *Gentechnische Methoden. Eine Sammlung von Arbeitsanleitungen für das molekularbiologische Labor*. Kapitel 2 Gelelektrophoresen. 5th ed. (Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 2012).
232. Gibson, D. G. *et al.* Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. *Nature methods* **6**, 343–345 (2009).
233. Hanahan, D., Jessee, J. & Bloom, F. R. in *Bacterial genetic systems*, edited by J. H. Miller (Acad. Press, San Diego, Calif., 1991), pp. 63–113.
234. Chen, D. C., Yang, B. C. & Kuo, T. T. One-step transformation of yeast in stationary phase. *Current genetics* **21**, 83–84 (1992).
235. Barlos, K., Chatzi, O., Gatos, D. & Stavropoulos, G. 2-Chlorotrityl chloride resin. Studies on anchoring of Fmoc-amino acids and peptide cleavage. *International journal of peptide and protein research* **37**, 513–520 (1991).
236. Bollhagen, R., Schmiedberger, M., Barlos, K. & Grell, E. A new reagent for the cleavage of fully protected peptides synthesised on 2-chlorotrityl chloride resin. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*, 2559 (1994).
237. Walter, T. S. *et al.* Lysine methylation as a routine rescue strategy for protein crystallization. *Structure (London, England: 1993)* **14**, 1617–1622 (2006).
238. Wessel, D. & Flügge, U. I. A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids. *Analytical biochemistry* **138**, 141–143 (1984).
239. Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry* **72**, 248–254 (1976).
240. LAEMMLI, U. K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680–685 (1970).

-
241. Voss, S., Krüger, D. M., Koch, O. & Wu, Y.-W. Spatiotemporal imaging of small GTPases activity in live cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **113**, 14348–14353 (2016).
242. Brown, P. H. & Schuck, P. Macromolecular size-and-shape distributions by sedimentation velocity analytical ultracentrifugation. *Biophysical journal* **90**, 4651–4661 (2006).
243. Schuck, P. Size-Distribution Analysis of Macromolecules by Sedimentation Velocity Ultracentrifugation and Lamm Equation Modeling. *Biophysical journal* **78**, 1606–1619 (2000).
244. Jerabek-Willemsen, M. *et al.* MicroScale Thermophoresis. Interaction analysis and beyond. *Journal of Molecular Structure* **1077**, 101–113 (2014).
245. Kelly, S. M., Jess, T. J. & Price, N. C. How to study proteins by circular dichroism. *Biochimica et biophysica acta* **1751**, 119–139 (2005).
246. Ericsson, U. B., Hallberg, B. M., Detitta, G. T., Dekker, N. & Nordlund, P. Thermofluor-based high-throughput stability optimization of proteins for structural studies. *Analytical biochemistry* **357**, 289–298 (2006).

8. Anhang

8.1. Ergänzende Abbildungen und Tabellen

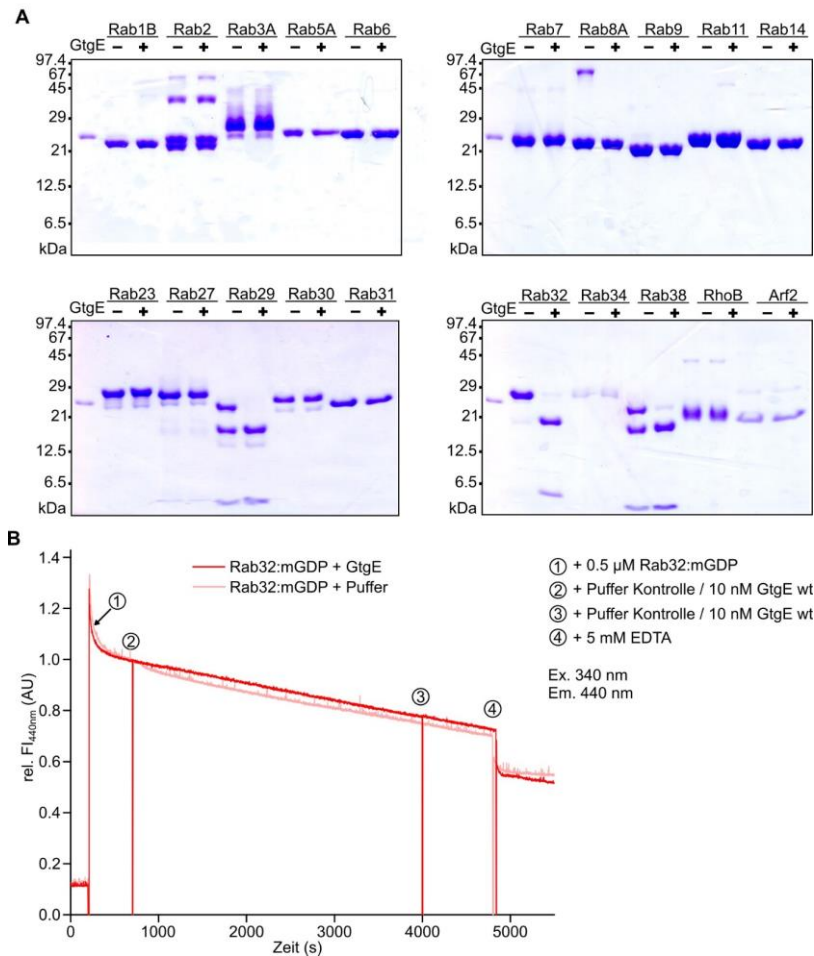


Abbildung 46. Qualitativer Aktivitätsnachweise der Protease GtgE (in Ergänzung zu Abbildung 10). **A** Screening Ansatz mit allen verfügbaren RabGTPasen (bis auf die Rab32-Unterfamilie sowie Rab23 ein Geschenk der Arbeitsgruppe Goody des MPI, Dortmund) und anderen kleinen GTPasen. Die GTPasen wurden zuvor weder massenspektrometrisch auf ihre Integrität noch auf ihre tatsächlichen Nukleotidbeladung untersucht. Die Inkubation mit GtgE erfolgte für nur wenige Sekunden (Minussymbol) oder für 4 Stunden (Plussymbol) in einem molaren Verhältnis von 1:100 (GtgE:Rab). Lediglich die Rab32 Unterfamilie wird erwartungsgemäß modifiziert. **B** Evaluation eines fluoreszenzbasierter Echtzeitnachweis für die Proteolyseaktivität von GtgE mit Mant-GDP (mGDP) beladenen Rab32. Diese fällt wie für die intrinsische Tryptophanfluoreszenz von Rab32 negativ aus.

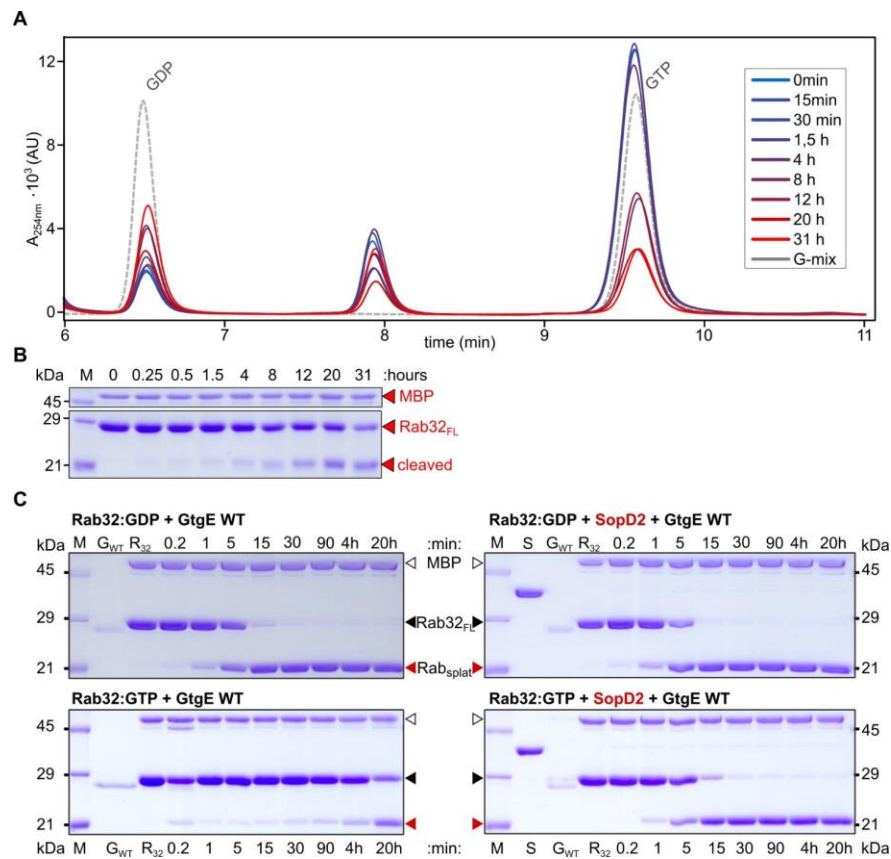


Abbildung 47. Nukleotidabhängige Modifikation von RabGTPasen durch GtgE (in Erweiterung zu Abbildung 11). **A** Intrinsische GTP-Hydrolyse-Aktivität von Rab32. Die zeitabhängige GTP-zu-GDP-Hydrolyse durch Rab32, beladen mit GTP, wurde unter Verwendung einer Ionenpaar-Umkehrphasen-chromatographischen Trennung von GDP und GTP überwacht. Die Signale wurden zur Quantifizierung des Nukleotidgehalts integriert. Die Geschwindigkeitskonstante der GTP-Hydrolyse ($k_{obs,Hydr}$) wurde Anpassung der Daten an eine einfachexponentielle Funktion bestimmt. G-mix enthält GDP und GTP als chromatographische Referenzen. **B** Zeitabhängige GtgE-vermittelte (8 nM) Spaltung von Rab32:GTP (8 μ M, final) in einem SDS-PAGE-basierten Gel-Shift-Nachweis, gefärbt mit Coomassie. MBP wurde als interner Standard zur Quantifizierung verwendet. Die beobachtete Geschwindigkeitskonstante für die Proteolyse ($k_{obs,Prot}$) wurde wie in A bestimmt. Der Rab32_{FL}-Wert wurden mittels densitometrischer Analyse der SDS-PAGE-Bandenintensität erhalten. **C** Abhängigkeit der Rab32-Spaltung durch GtgE von der SopD2-vermittelten GTPase-Aktivierung. SopD2-Interferenz mit der GtgE-vermittelter proteolytischer Rab32-Spaltung über die Zeit, analysiert durch Coomassie-gefärbte SDS-PAGE. Rab32_{FL} (8 μ M) wurde mit GtgE (8 nM) und / oder SopD2 (80 nM) herausgefordert. Weißes Dreieck: MBP-Standard; schwarzer Pfeil Rab32_{FL}; roter Pfeil: Spaltprodukt Rab32₆₀₋₂₂₅.

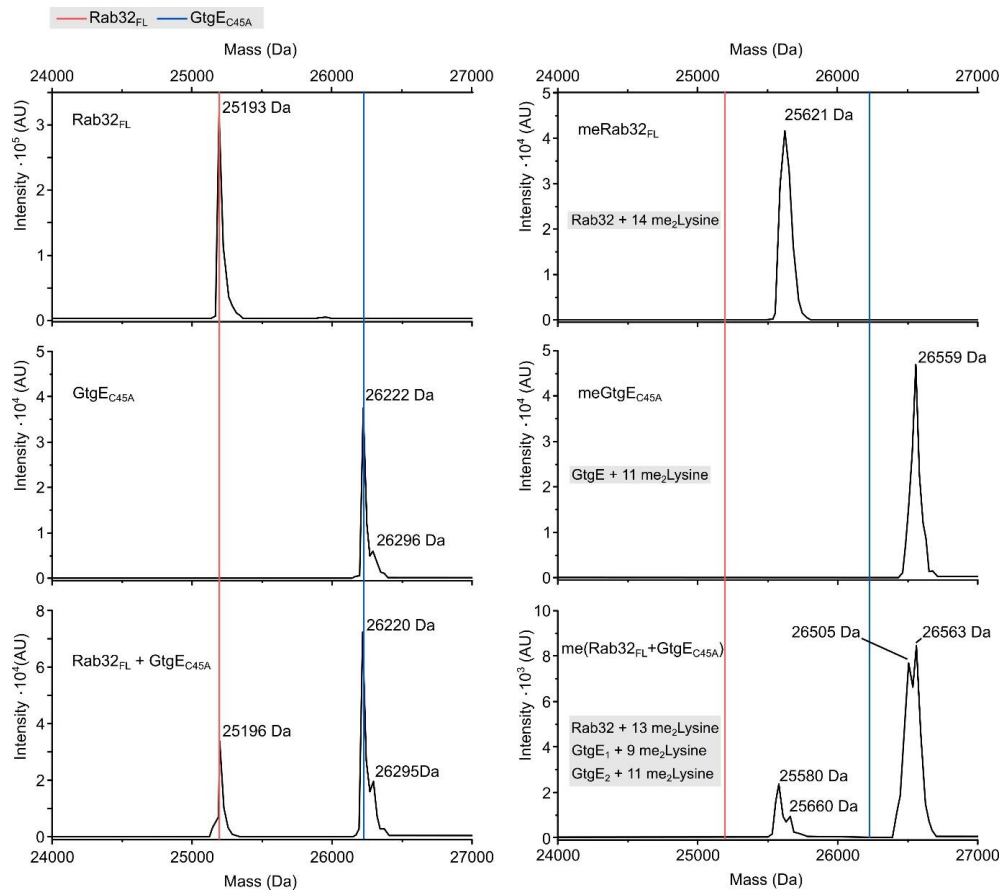


Abbildung 48. Massenspektrometrische Analyse des methylierten volllänge-Rab32:GDP:GtgE_{C45A}-Komplexes. Linkes Feld: oben, Rab32_{FL}; mitte, GtgE_{C45A}; unten, 1:1-Mischung von Rab32_{FL} und GtgE_{C45A}. Rechtes Feld: Analyse von methylierten (me) Proteinen (oben, meRab32_{FL}; mitte, meGtgE_{C45A}; unten, 1:1 Mischung des vorgeformten Komplexes (Rab32_{FL}:GtgE_{C45A})). Die rote und die blaue Linie zeigen die theoretischen Massen von Rab32_{FL} ($M_{\text{cal}}(\text{Rab32}_{\text{FL}}) = 25191$ Da) bzw. GtgE_{C45A} ($M_{\text{cal}}(\text{GtgE}_{\text{C45A}}) = 26226$ Da) an. Graue Kästchen: Anzahl der nachgewiesenen dimethylierten Lysine in den entsprechenden Experimenten (s. Abbildung 15).

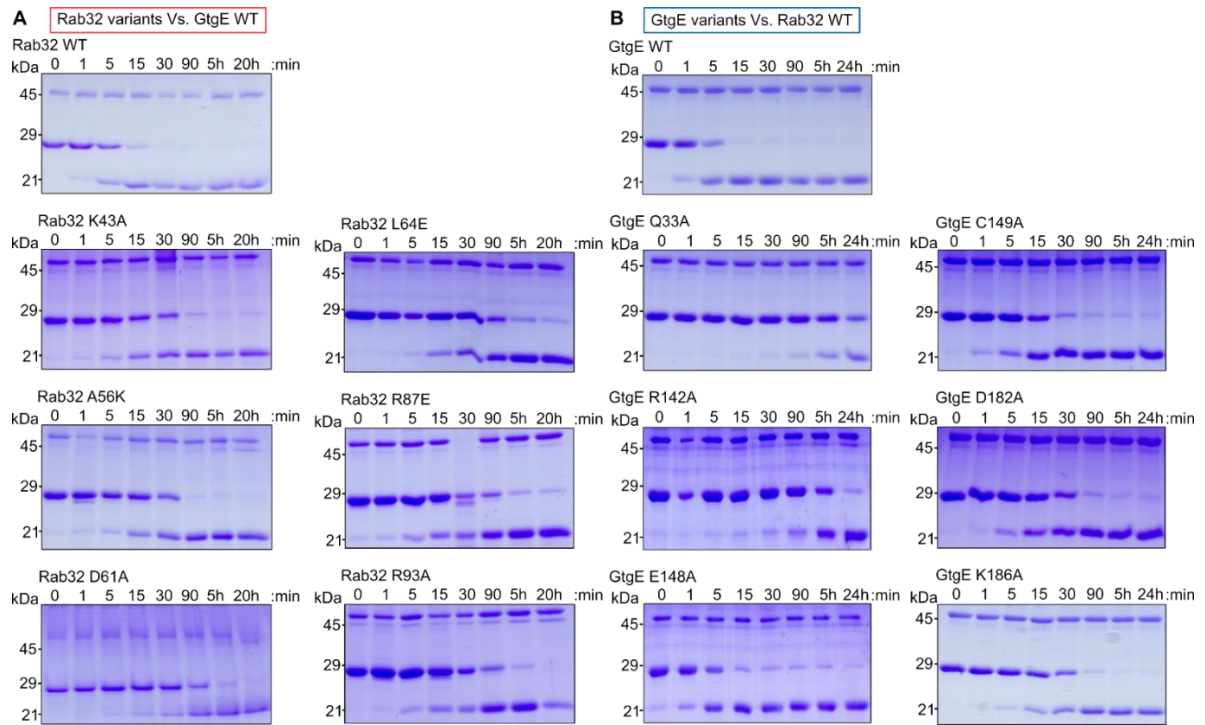


Abbildung 49. Mutationsanalyse von Rab32 und GtgE mit einem Coomassie-gefärbten SDS-PAGE-basierten proteolytischen Rab32-Spaltungsnachweis. Diese Daten bilden die Grundlage zur Bestimmung der proteolytischen Geschwindigkeitskonstanten, der in Abbildung 20C, D dargestellten Ergebnisse. **A** Proteolyse von Rab32:GDP WT als auch dessen Mutanten (8 μ M) durch Wildtyp-GtgE (8 nM). **B** Proteolyse von Rab32:GDP (8 μ M) mit GtgE und dessen Mutanten (8 nM). Für die Datenauswertung s. Abbildung 50.

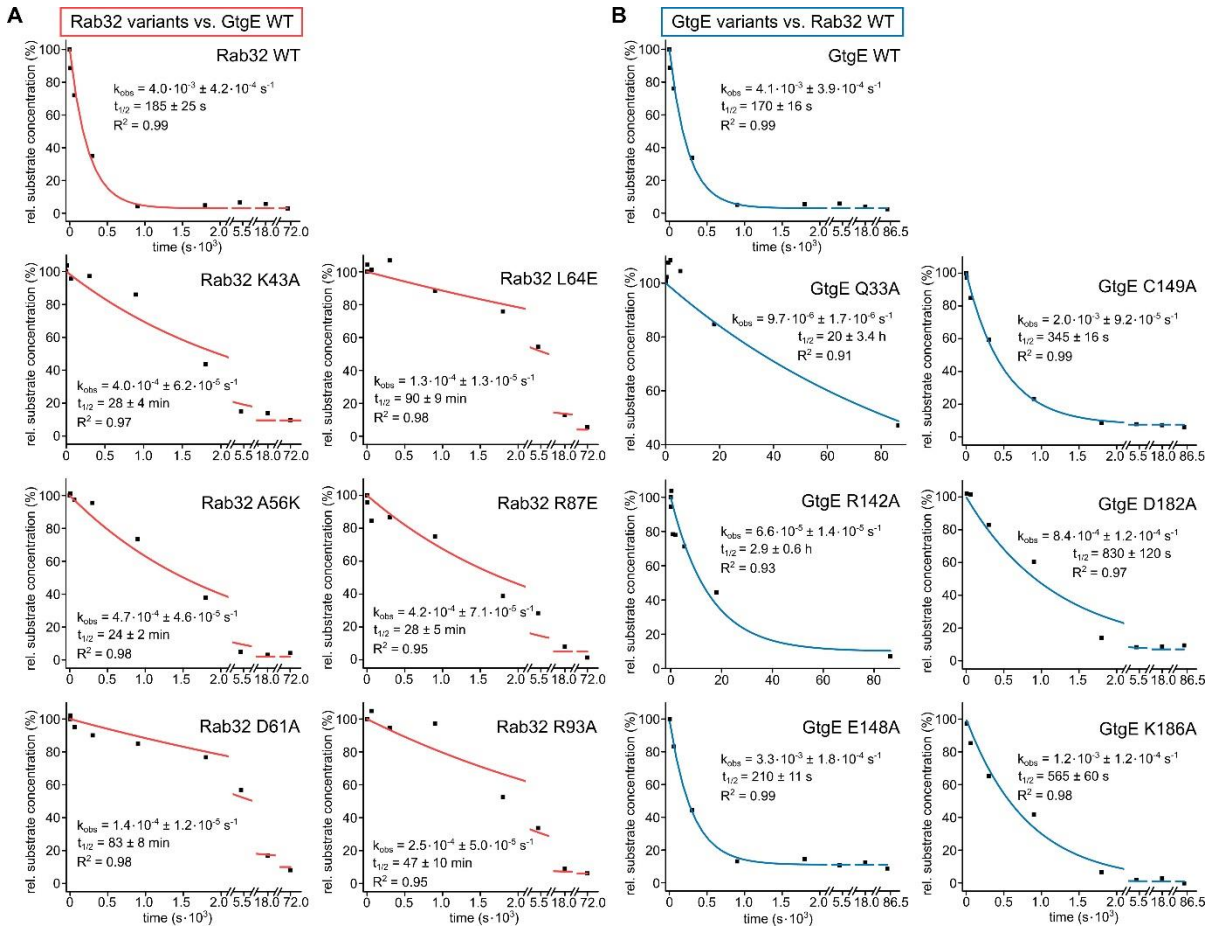


Abbildung 50. Bestimmung der proteolytischen Geschwindigkeiten von GtgE für das Rab32-Substrat und deren Mutanten. Die Ergebnisse basieren auf einer densitometrischen Analyse proteolytischer Rab32-Spaltungsnachweisreaktionen, die durch Coomassie-gefärbte SDS-PAGE überwacht wurden (s. Abbildung 49 und Abbildung 20C, D). Die zeitabhängige Abnahme von Rab32_{FL} wurde an eine Exponentialfunktion erster Ordnung angepasst, um die beobachteten Geschwindigkeitskonstanten (k_{obs}) zu erhalten. Die k_{obs} -Werte werden auch in Halbwertszeiten ($t_{1/2}$) angegeben durch den Zusammenhang $t_{1/2} = \ln(2)/k_{obs}$. Das Bestimmtheitsmaß (R^2) zeigt eine hohe Übereinstimmung (nahe 1) der angepassten Kurven mit den experimentellen Daten an. A Rab32: GDP-Mutanten (8 μM) und Wildtyp inkubiert mit Wildtyp-GtgE (8 nM) (rote Kurven). B GtgE-Mutanten und Wildtyp (beide 8 nM final) wurden mit Wildtyp Rab32: GDP (8 μM) inkubiert (blaue Kurven).

Tabelle 17. Kinetische Parameter der proteolytischen Aktivität von verkürzten GtgE-Varianten mit Rab32:GDP. Daten wurden aus der Abnahmerate der Rab32_{FL}-Banden in einer densitometrischen Analyse von Coomassie-gefärbten SDS-PAGE-Assays berechnet (s. Abbildung 12C, D).

GtgE	Rab32	k_{cat}/K_M ($\text{s}^{-1}\text{M}^{-1}$)	Relative Aktivität zur FL (%)
1-228 (FL)	WT	$5.1 \times 10^5 \pm 4.9 \times 10^4$	100.0
1-214	WT	$2.7 \times 10^5 \pm 3.6 \times 10^4$	52.9
21-214	WT	$1.4 \times 10^5 \pm 1.4 \times 10^4$	27.5
34-214	WT	$6.5 \times 10^3 \pm 4.3 \times 10^3$	1.3
43-214	WT	$1.3 \times 10^3 \pm 6.8 \times 10^2$	0.3

Tabelle 18. Kinetische Parameter der GtgE-Aktivität für Rab32:GDP. Daten wurden aus der Abnahmerate der Rab32_{FL}-Banden in einer densitometrischen Analyse von Coomassie-gefärbten SDS-PAGE-Assays berechnet (s. Abbildung 50).

GtgE	Rab32	k_{cat}/K_M ($s^{-1}M^{-1}$)	Relative Aktivität zum WT (%)
WT	WT	$5.1 \times 10^5 \pm 4.9 \times 10^4$	100.0
Q33A	WT	$1.2 \times 10^3 \pm 2.1 \times 10^2$	0.2
R142A	WT	$8.3 \times 10^3 \pm 1.8 \times 10^3$	1.6
E148A	WT	$4.2 \times 10^5 \pm 2.2 \times 10^4$	82.0
C149A	WT	$2.5 \times 10^5 \pm 1.2 \times 10^4$	49.3
D182A	WT	$1.0 \times 10^5 \pm 1.5 \times 10^4$	20.5
K186A	WT	$1.5 \times 10^5 \pm 1.5 \times 10^4$	30.0
WT	K43A	$5.1 \times 10^4 \pm 7.8 \times 10^3$	10.0
WT	A56K	$6.1 \times 10^4 \pm 6.8 \times 10^3$	12.0
WT	D61A	$1.7 \times 10^4 \pm 1.6 \times 10^3$	3.4
WT	L64E	$1.6 \times 10^4 \pm 1.7 \times 10^3$	3.2
WT	R87E	$3.1 \times 10^4 \pm 6.2 \times 10^3$	6.0
WT	R93A	$5.2 \times 10^4 \pm 8.9 \times 10^3$	10.2

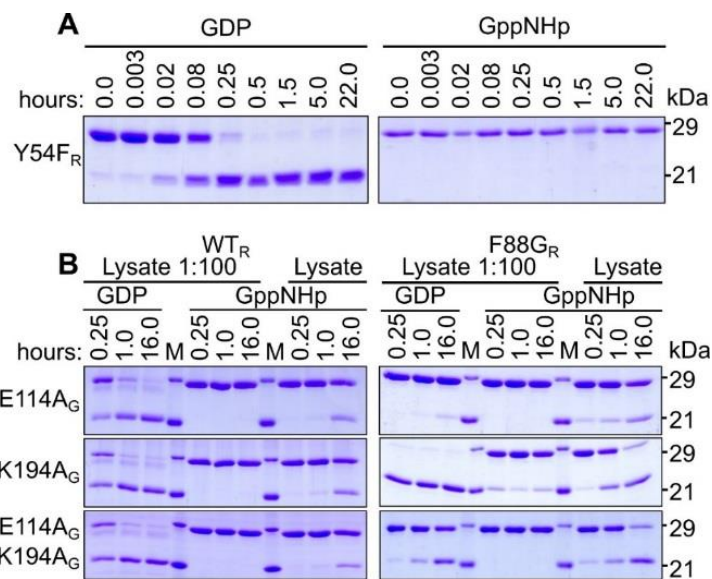


Abbildung 51. Qualitative Gel-Shift Analyse potenzieller Nukleotidselektionszentren. A Bedeutung der Hub 2 Mutante Y54F_R jeweils präparativ beladen mit GDP oder GppNHp. **B** Bedeutung der Mutanten von Hub 3: Rab F88G, beladen mit GDP oder GppNHp, wurde mit geklärtetem *E. coli*-Lysat (oder 1: 100 verdünntem Lysat) inkubiert, in dem jeweils die GtgE E114A, K194A oder die Doppelmutante überexprimiert vorlagen (s. Abbildung 21).

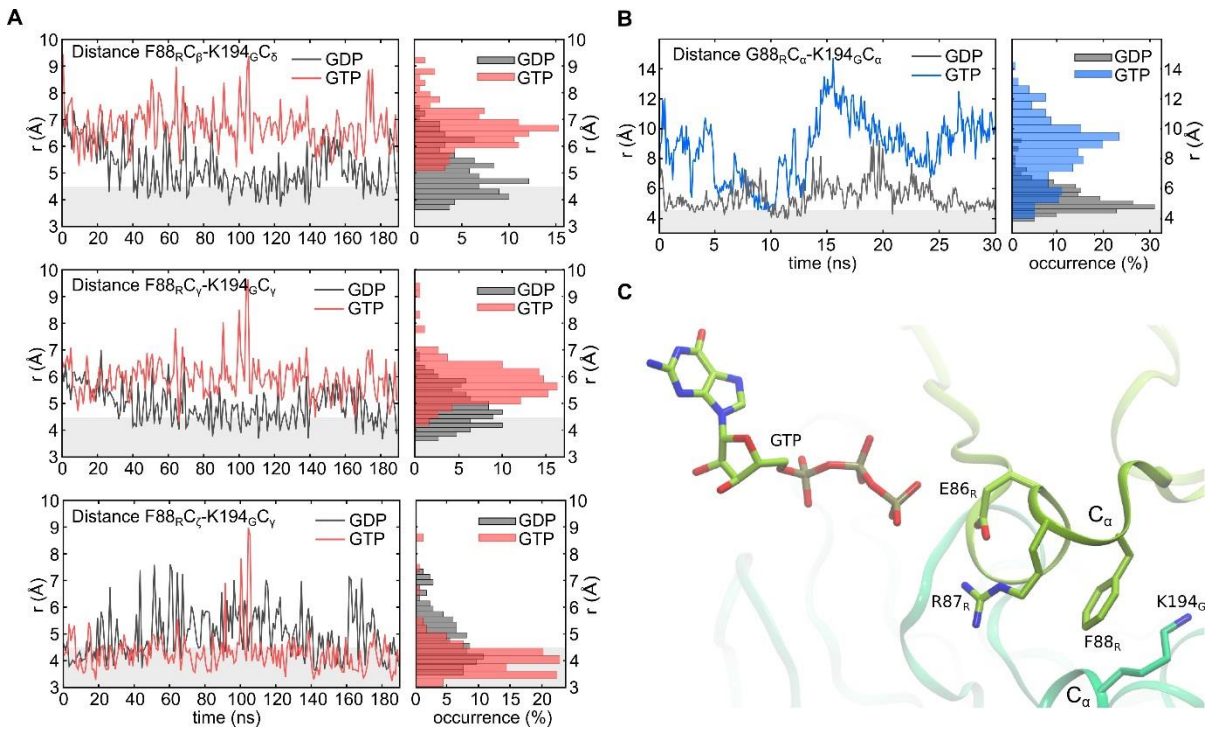


Abbildung 52. Ausgewählte Atompaarabstände in einem GDP-gebundenen und hypothetischen GTP-gebundenen Rab32:GtgE-Komplex aus MD-Simulationen (linke Flächen), und entsprechende Distanzverteilung als Histogramme aufgetragen (occurrence, rechte Flächen). Die Abstandsschwelle für Van-der-Waals-Wechselwirkungen ($<4,5 \text{ \AA}$) ist als grau schattierte Fläche markiert. **A** Die F88_R-Mutante könnte ein entscheidendes Element für die Präferenz des GtgE für GDP-gebundenes Rab32 sein. Spezifische Atompaarabstände sind für F88_R aus Rab32 und K194_G aus GtgE (oben: F88_RC_β-K194_GC_δ, Mitte: F88_RC_γ-K194_GC_γ, unten: F88_RC_ζ-K194_GC_γ) aus MD-Simulationen des GDP- (in schwarz) und GTP-gebundenen (in rot) Rab32:GtgE-Komplexe (s. Abbildung 21D, rechts). Eine hydrophobe Wechselwirkung zwischen F88_R und K194_G wird nur GDP-gebundenen Komplex (schwarz) angezeigt, während der hypothetische GTP-gebundene Komplex zu einer Zunahme des Abstandes zwischen F88_RC_β-K194_GC_δ und F88_RC_γ-K194_GC_γ führt, nicht aber zwischen F88_RC_ζ-K194_GC_γ (in rot). Dies legt nahe, dass die Van-der-Waals-Wechselwirkungen zwischen Rab32 und GtgE im hypothetischen GTP-Zustand abnehmen, was zur Dissoziation von GtgE von Rab32 führen könnte. **B** Atompaar-Abstände in der F88_G_R-Mutante basierend auf MD-Simulationen der GDP- (in schwarz) und GTP-gebundenen (in blau) Rab32:GtgE-Komplexe. In F88_G_R wird eine höhere Population für G88_R-K194_G-Wechselwirkungen ($<4,5 \text{ \AA}$) relativ zum Wildtyp gebildet (s. Abbildung 21E). **C** Strukturelle Darstellung der MD-Simulation des hypothetischen GTP-gebundenen Rab32:GtgE-Komplexes nach 190 ns. Hervorgehoben in Stäbchen: Hub 1-Rest E86_R mit R87_R, die ein Ionenpaar bilden (s. Abbildung 21A und Abbildung 21E, oben), und in Hub 3 sind F88_R und K194_G mit einer Abstandszunahme der C-Atome dargestellt (s. Abbildung 21E, unten). Die Daten der Abstandsmessung basieren auf atomistischen molekulardynamischen Simulationen von Sophie Mader und Prof. Ville Kaila (Arbeitsgruppe für Computergestützte Biokatalyse der TUM).

Tabelle 19. Molekulare Wechselwirkungen im Rab32:GDP:GtgE-Komplex zwischen Rab32₁₈₋₂₀₁:GDP und GtgE_{21-214,C45A} (Details zu Abbildung 18E). A Polare Wechselwirkungen einschließlich Salzbrücken mit den jeweiligen Atomabständen wechselwirkender Atompaare. **B** Hydrophobe Wechselwirkungen wie in A gezeigt.

A Polare Wechselwirkungen			B Hydrophobe Wechselwirkungen		
Rab32	Distanz (Å)	GtgE _{C45A}	Rab32	Distanz (Å)	GtgE _{C45A}
G59 (O)	2.44	Q33 (NE2)	L64	3.5	F34
V60 (O)	2.62	S144 (OG)	F62	3.5	M171
T57 (O)	2.67	L150 (N)	V94	3.7	L145
D61 (O)	2.70	G146 (N)	V60	3.8	L41
D81 (N)	2.75	G146 (O)	W80	3.8	L145
D61 (OD1)	2.76	L145 (N)	L64	3.9	L41
T57 (OG1)	2.88	G80 (N)	I58	3.9	W46
R76 (NE)	2.89	N39 (OD1)	H47	3.9	L78
D61 (OD2)	2.92	R142 (NH2)	I58	3.9	I81
R76 (NH2)	2.93	T37 (O)	T92	3.9	D185
H47 (NE2)	3.03	I77 (O)	I58	3.9	I202
D61 (OD1)	3.10	R142 (NH1)	I58	4.0	C86
R55 (NH2)	3.14	E79 (OE2)	L49	4.1	L78
I58 (N)	3.14	I81 (O)	A56	4.1	I83
R55 (NH1)	3.22	D82 (OD2)	I58	4.1	I141
R93 (NE)	3.23	D182 (OD1)	V94	4.1	D185
G59 (N)	3.24	L150 (O)	G59*	4.2*	A45*
R93 (NH2)	3.27	D182 (OD1)	I58	4.2	L150
I58 (O)	3.29	I81 (N)	I58	4.2	A152
G59 (O)	3.36	A45 (N)	F88	4.2	K194
V60 (O)	3.41	C149 (SG)	Q85	4.2	Y195
R87 (NH1)	3.42	K194 (O)	V66	4.3	N39
R93 (NH2)	3.51	S179 (OG)	T57	4.3	N76
D61 (O)	3.52	S147 (N)	V60	4.3	M171
D81 (O)	3.68	S147 (N)	T36	4.4	E148
V60 (N)	3.70	N43 (OD1)	Y54	4.4	E148
D61 (O)	3.80	L145 (N)	G84	4.4	Y195
Salzbrücken			[V60	4.5	N43
Rab32	Distance (Å)	GtgE_{C45A}	T36	4.5	E148
K43 (NZ)	4.00	E148 (OE1)	A56	4.5	C149
K43 (NZ)	3.69	E148 (OE2)	D61	4.5	H151
R55 (NE)	3.34	E79 (OE2)	V94	4.5	K186
R55 (NH1)	3.22	D82 (OD2)	F88	4.5	Y195]
R55 (NH2)	3.14	E79 (OE2)	* Interaktionen die nicht in Abbildung 18E gezeigt werden, wegen der C45A _G Mutation.		
R93 (NE)	3.23	D182 (OD1)	[] potenzielle Interaktionen mit einer Distanz von 4.5 Å Abbildung 18E.		
R93 (NE)	3.92	D182 (OD2)			
R93 (NH2)	3.27	D182 (OD1)			
R93 (NH2)	3.97	D182 (OD2)			
D61 (OD1)	3.55	R142 (NH2)			
D61 (OD1)	3.10	R142 (NH1)			
D61 (OD2)	2.92	R142 (NH2)			
D61 (OD2)	3.86	R142 (NH1)			

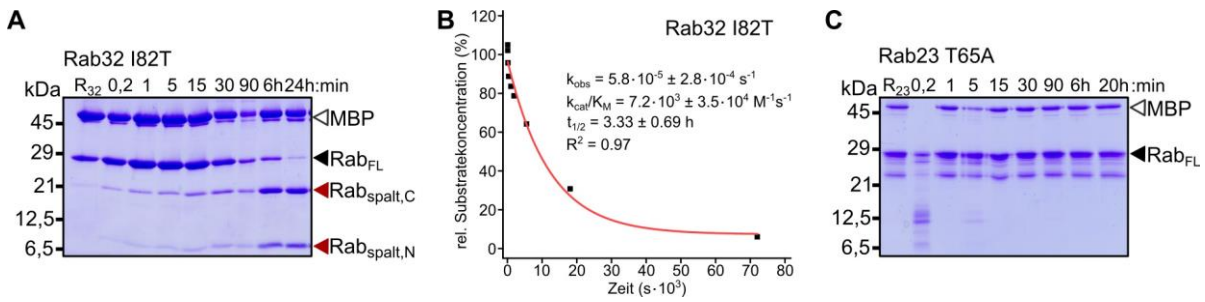


Abbildung 53. Die GtgE-vermittelte proteolytische Modifikation von Rab32 I82T. A Gel-Shift-Aktivitätsnachweise von Rab32 I82T mit GtgE_{WT}. **B** Bestimmung der Spaltungsrate von Rab32_{FL} I82T aus A basierend auf einer densitometrischen Gel-Analyse. Die Daten wurden an eine einfachexponentielle Funktion angepasst (s. Abbildung 23C). **C** Gel-Shift-Aktivitätsnachweise von Rab23 T65A mit GtgE_{WT}. Farbige Dreiecke: MBP (weiß); volllänge-Rab (schwarz); Rab Spaltprodukte (rot).

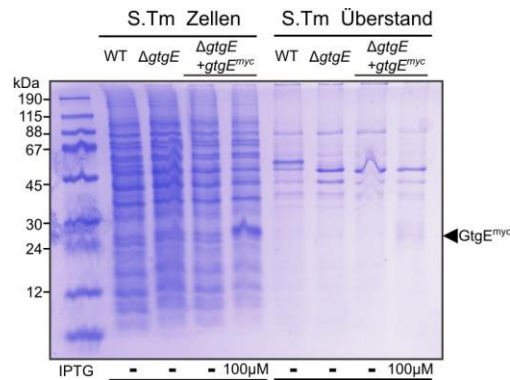


Abbildung 54. In vitro-Nachweis der GtgE^{myc}-Expression und Sekretion aus S. Typhimuirum ΔgtgE mittels SDS-PAGE.

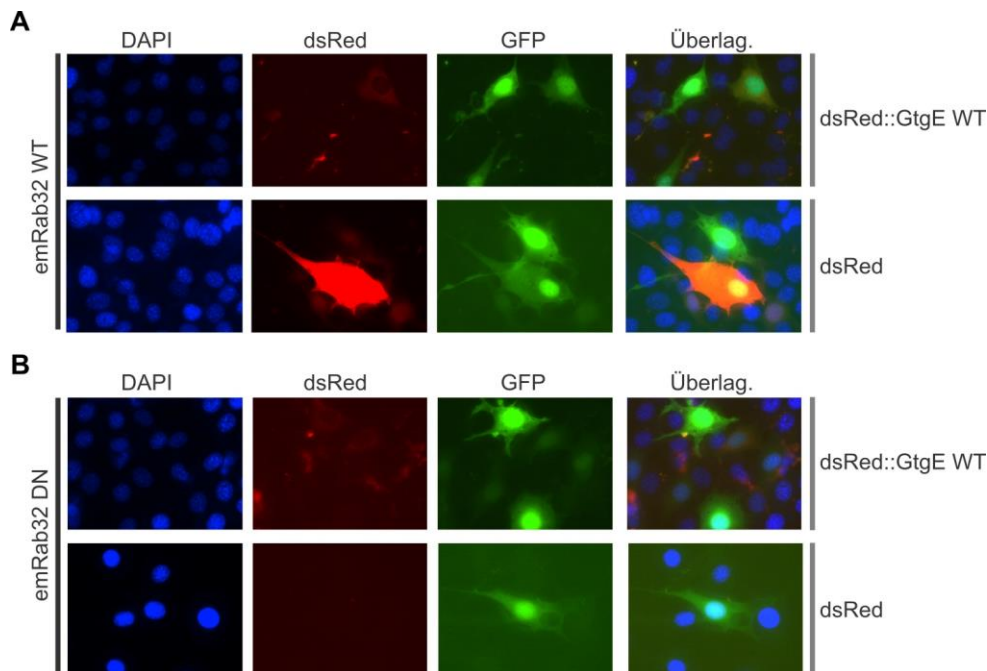


Abbildung 55. Kolokalisationsstudien von Rab32 und GtgE in embryonalen Fibroblasten aus Mäusen (NIH-3T3 Zellen). Beide Proteine wurden als Fusionskonstrukt mit fluoreszenten Proteinen co-transfiziert. Die Proben wurden fixiert und die Zellkerne mit DAPI gefärbt. Fluoreszenzkanäle für die einzelnen Komponenten sowie die Überlagerung (rechts). **A** Emerald-Rab32 WT (GFP-Derivat, grüne Fluoreszenz) mit dsRed-GtgE WT (GFP-Derivat, rote Fluoreszenz). Untere Zeile: Negative Kontrolle ohne GtgE. **B** Dasselbe Experiment wie in A mit der konstitutiv inaktiven Mutante von emRab32 (DN).

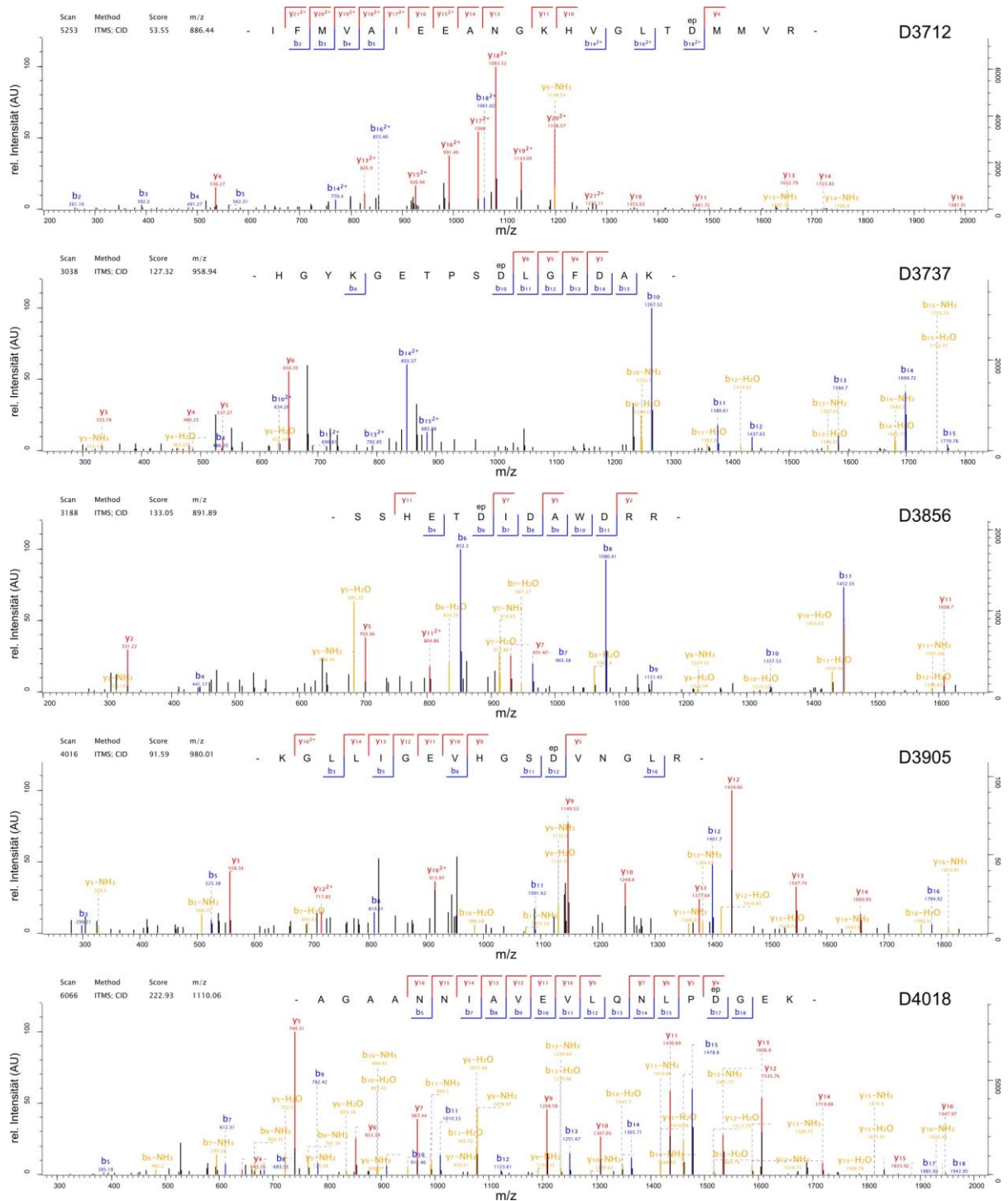


Abbildung 56. Tandem-MS Spektren der signifikanten Treffer von EPNP-modifizierten Peptiden mit Aspartatseitenketten als Modifikationsstelle (s. Abbildung 32B). Rote Peaks: Fragmente der y-Ionenreihe; blau Peaks: Fragmente der b-Ionenreihe; gelbe Peaks: Fragmente beider Ionenreihen, die einen Verlust von 17 Da (-NH₃) oder von 18 Da (-H₂O) des indizierten Ions aufweisen. ITMS *ion trap mass spectrometry* CID: *collision-induced dissociation*.

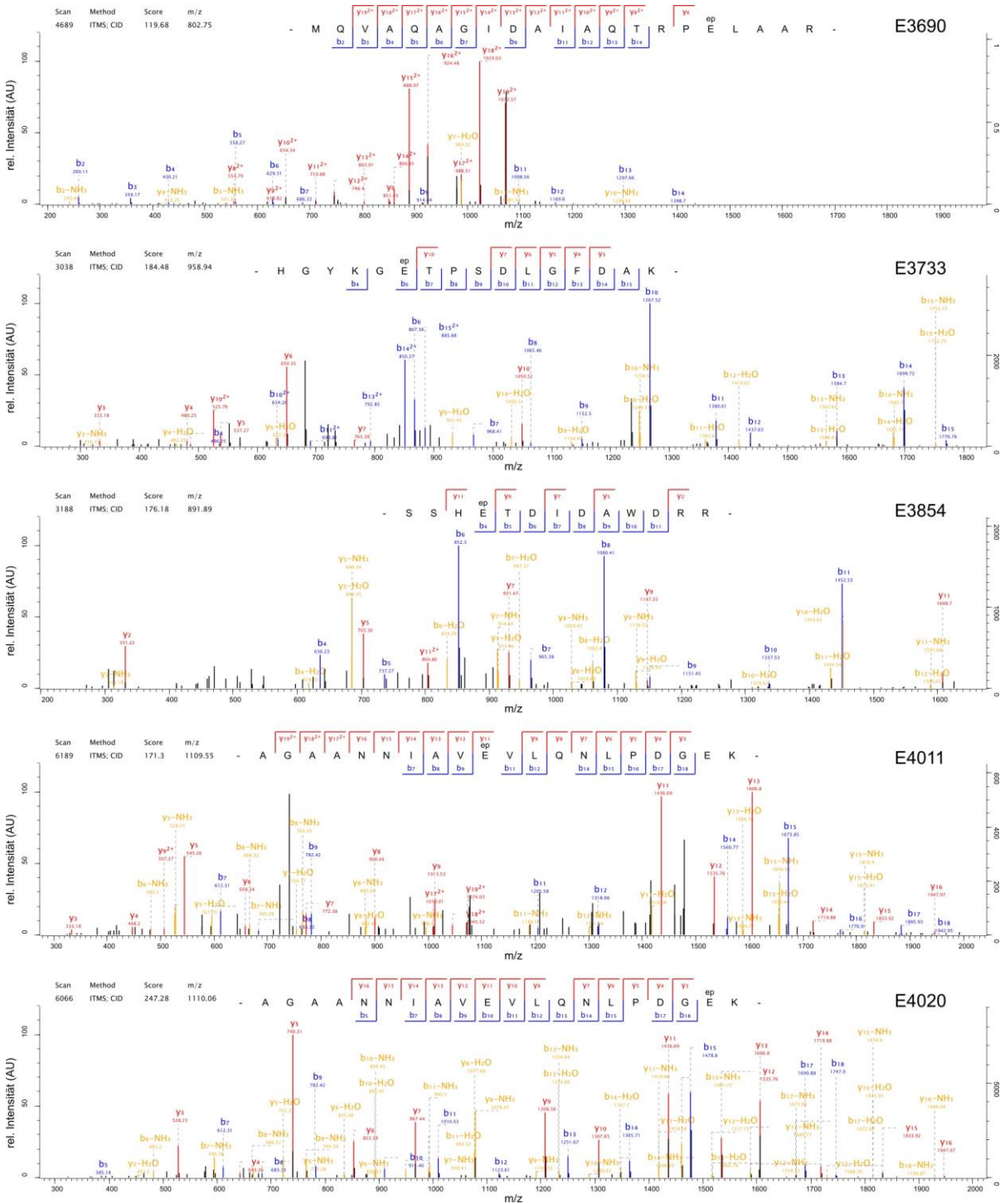


Abbildung 57. Tandem-MS Spektren der signifikanten Treffer von EPNP-modifizierten Peptiden mit Glutamatseitenketten als Modifikationsstelle (außer E3900, E3930)(s. Abbildung 32B, C). Rote Peaks: Fragmente der y-Ionenserie; blau Peaks: Fragmente der b-Ionenserie; gelbe Peaks: Fragmente beider Ionenserien, die einen Verlust von 17 Da (-NH₃) oder von 18 Da (-H₂O) des indizierten Ions aufweisen. ITMS ion trap mass spectroemetry CID: collision-induced dissociation.

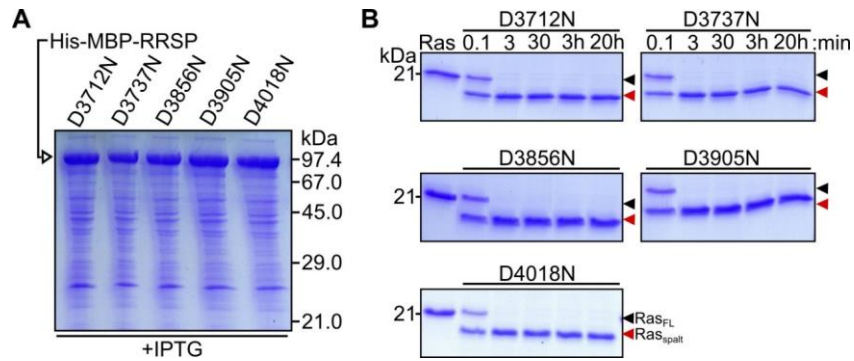


Abbildung 58. Evaluierung der identifizierten RRSP-Glutamat-Mutanten in einem Aktivitätsschnelltest (s. Abbildung 32B, Abbildung 33C) A Expressionsniveau der MBP-RRSP Fusionsproteine aus geklärten *E. coli*-Lysaten, die in Aktivitätsschnelltest eingesetzt wurden. **B** Schnelltest der Proteolyseaktivität von RRSP-Mutanten (aus A) an Ras:GDP in einem qualitativen Gel-Shift-Nachweis im zeitlichen Verlauf.

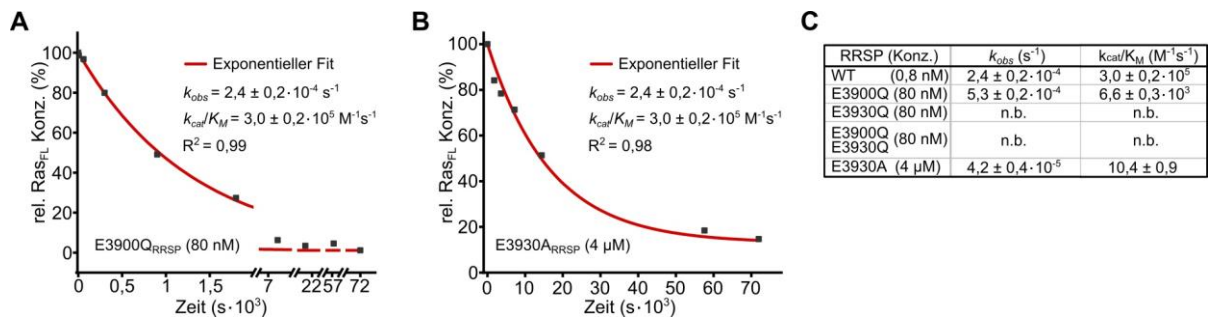


Abbildung 59. Quantifizierung der katalytischen Effizienz von RRSP-Mutanten des aktiven Zentrums. A Bestimmung der Spaltungsrate (k_{obs}) von Ras:GDP (8 μ M) mit RRSP E3900Q (8 nM) basierend auf einer densitometrischen Gel-Analyse. Die Daten wurden an eine einfachexponentielle Funktion angepasst (für Gel-Bild s. Abbildung 34A) **B** Bestimmung von (k_{obs}) wie in A für die RRSP Mutante E3930A (4 μ M) (für Gel-Bild s. Abbildung 34B). **C** Tabellarische Zusammenfassung der ermittelten k_{obs} - und k_{cat}/K_M -Werte für den RRSP_{WT} sowie die Mutanten des katalytischen Zentrums (Abbildung 34C).

8.2. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1. Lipidierungen als posttranslationale Modifikationen kleiner GTPasen.....	15
Tabelle 2. Auswahl posttranslationaler Modifikationen an kleinen GTPasen	17
Tabelle 3. Vergleich enzymatischer Parameter von Proteasen ausgewählter Pathogene ...	86
Tabelle 4: Register aller kommerziellen Quellen verwendeter Materialien	90
Tabelle 5: Aufführung häufig verwendeter Chemikalien mit Herstellerangaben.	91
Tabelle 6: Aufführung der verwendeten Enzyme, Reagenzien, Antibiotika sowie Referenz- und Größenstandards mit Herstellerangaben.	91
Tabelle 7: Auflistung aller verwendeten Bakterien-, Hefestämme sowie Zelllinien.....	92
Tabelle 8: Verwendete DNA-Plasmide mit den darin kodierten wildtypischen Proteinen.	93
Tabelle 9: Liste der verwendeten Verbrauchsmittel sowie die Herstellerangaben.	94
Tabelle 10: Liste der verwendeten Instrumente und Chromatographiezubehör	94
Tabelle 11: Zusammensetzung von Stocklösungen und Feststoffgemischen für die Herstellung von Hefeselektionsmedien (SD-Medien).	96
Tabelle 12: Zusammensetzung häufig verwendeter Lösungen und Wachstumsmedien.....	96
Tabelle 13. Codon-optimierte DNA-Sequenzen synthetischer Gene der Proteasen GtgE und RRSP/DUF5Vv.	102
Tabelle 14: Pufferzusammensetzungen für die Proteinreinigung kleiner GTPasen.....	106
Tabelle 15: Pufferzusammensetzungen für die Proteinreinigung bakterieller Effektoren ...	106
Tabelle 16: Pufferzusammensetzungen für die Proteinreinigung der Rab32-Effektordomäne von VARP.	106
Tabelle 17. Kinetische Parameter der proteolytischen Aktivität von GtgE-Varianten	138
Tabelle 18. Kinetische Parameter der GtgE-Aktivität für Rab32:GDP.	139
Tabelle 19. Molekulare Wechselwirkungen im Rab32:GDP:GtgE-Komplex zwischen Rab32 ₁₈₋₂₀₁ :GDP und GtgE _{21-214,C45A}	141

8.3. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1. Strukturelemente und der Regulationszyklus kleiner GTPasen	6
Abbildung 2. Schematische Auswahl von Ras-stimulierten Signalwegen.....	8
Abbildung 3. Lokalisations-Schalt-Zyklus von RabGTPasen im vesikulären Transport.....	10
Abbildung 4. Übersicht der Funktionen und Lokalisation von RabGTPasen.	11
Abbildung 5. Phylogenetischer Baum humaner Rab und Rab-ähnlicher GTPasen.....	12
Abbildung 6. Strukturübersicht posttranslationaler Modifikationen an kleinen GTPasen	18
Abbildung 7. Intrazellulärer Infektionsverlauf von <i>Salmonella</i> Typhimurium.....	21
Abbildung 8. MARTX Toxin-geleiteter <i>Vibrio vulnificus</i> Infektionsverlauf.....	24
Abbildung 9. Hauptproteaseklassen und ihr katalytischer Mechanismus.	27
Abbildung 10. Aktivitätsnachweis von GtgE an GTPasen der Rab32-Unterfamilie	32
Abbildung 11. GtgE spaltet ausschließlich inaktive RabGTPasen.....	34
Abbildung 12. Proteolytische Effizienz der Protease GtgE an inaktiven RabGTPasen.	35
Abbildung 13. Heterokomplex-Formierung auf der analytischen SEC zwischen GtgE-Mutanten und Rab32:GDP.....	36
Abbildung 14. Die inaktive Mutante GtgE _{C45A} hat eine hohe Affinität für Rab32:GDP	37
Abbildung 15. Formierung eines alkylierten Hetero-Komplexes aus GtgE und Rab32.....	38
Abbildung 16. Proteinkristalle alkylierter Rab32:GtgE-Komplexe.	39
Abbildung 17. Sequenz-Struktur Übersicht der individuellen Proteine des Rab32:GtgE-Komplex.	41
Abbildung 18. Die Rab32:GDP:GtgE _{C45A} -Komplexstruktur.	43
Abbildung 19. Vergleich der Bindung von GtgE und GDI an kleinen GTPasen.....	44
Abbildung 20. Analyse der Rab32:GtgE-Komplex-Schnittstellen und des katalytischen Mechanismus.....	45
Abbildung 21. Die molekulare Grundlagen der GDP-Nukleotidspezifität von GtgE.....	49
Abbildung 22. Einblick in die molekulare Grundlage der Rab-Substratspezifität von GtgE.	51
Abbildung 23. Bedeutung von Ile82 im <i>switch II</i> von Rab32 für die Interaktion mit GtgE	52
Abbildung 24. <i>In vitro</i> Lipidierung von GtgE durch humane Prenyltransferasen.....	54
Abbildung 25. Evaluierung der intrazellulären GtgE-Lokalisation.	55
Abbildung 26. Nachweis der GtgE-Lokalisation über einen Antikörper basierten Myc-Epitoptag nachweis.....	56
Abbildung 27. <i>In silico</i> -Strukturhomologiemodell von RRSP.	57
Abbildung 28. Charakterisierung der Enzymaktivität von RRSP.....	59
Abbildung 29. Endopeptidaseaktivität von RRSP	60
Abbildung 30. Inhibitionsstudien von RRSP zur Eingrenzung des enzymatischen Mechanismus.....	63
Abbildung 32. Massenspektrometrische Identifikation von nukleophilen Säuregruppen	64
Abbildung 33. Evaluierung der identifizierten RRSP-Glutamat-Mutanten.....	65

Abbildung 34. Katalytischen Effizienz von RRSP-Mutanten des aktiven Zentrums.....	66
Abbildung 35. Hefe-Toxizitätstest von RRSP-Varianten.....	67
Abbildung 36. Komplexbildung zwischen Ras:GDP und RRSP-Mutanten.....	68
Abbildung 37. Konsequenzen der <i>switch</i> I-Spaltung von Ras und Rab32.....	69
Abbildung 38. GDP-Dissoziationsgeschwindigkeit bei unmodifizierten und gespaltenen kleinen GTPasen.	70
Abbildung 39. Komplexbildung zwischen Rab32 und der VARP-ANK1 Domäne	71
Abbildung 40. Mechanistisches Modell der sequenziellen Rab32-Inaktivierung.....	75
Abbildung 41. Struktur von Ypt7 im Komplex mit dem Heterodimer Mon1/Ccz1	77
Abbildung 42. Strukturelle Aspekte der Interaktionen von Rab32 und Ras.	78
Abbildung 43. Auswahl katalytischer Zentren von Carboxyl-Endopeptidasen.....	82
Abbildung 44. Postulierte Substratbindung und Katalysemechanismus.....	83
Abbildung 45: Verwendete PCR-Reaktionsansätze und Temperaturzyklusprogramme.....	98

Ergänzende Abbildungen:

Abbildung 46. Qualitativer Aktivitätsnachweise der Protease GtgE.....	134
Abbildung 47. Nukleotidabhängige Modifikation von RabGTPasen durch GtgE	135
Abbildung 48. Massenspektrometrische Analyse des methylierten volllänge-Rab32:GDP:GtgE _{C45A} -Komplexes.....	136
Abbildung 49. Mutationsanalyse von Rab32 und GtgE mit einem Coomassie-gefärbten SDS-PAGE-basierten proteolytischen Rab32-Spaltungsnachweis.	137
Abbildung 50. Bestimmung der proteolytischen Geschwindigkeiten von GtgE für das Rab32-Substrat und deren Mutanten.....	138
Abbildung 51. Qualitative Gel-Shift Analyse potenzieller Nukleotidselektionszentren	139
Abbildung 52. Ausgewählte Atompaaarabstände in einem GDP-gebundenen und hypothetischen GTP-gebundenen Rab32:GtgE-Komplex aus MD-Simulationen	140
Abbildung 53. Die GtgE-vermittelte proteolytische Modifikation von Rab32 I82T.....	142
Abbildung 54. <i>In vitro</i> -Nachweis der GtgE ^{myc} -Expression und Sekretion aus <i>S. Typhimurium</i> Δ gtgE mittels SDS-PAGE.	142
Abbildung 55. Kolokalisationsstudien von Rab32 und GtgE in embryonalen Fibroblasten	142
Abbildung 56. Tandem-MS Spektren der signifikanten Treffer von EPNP-modifizierten Peptiden mit Aspartseitenketten als Modifikationsstelle	143
Abbildung 57. Tandem-MS Spektren der signifikanten Treffer von EPNP-modifizierten Peptiden mit Glutamatseitenketten als Modifikationsstelle	144
Abbildung 58. Evaluierung der identifizierten RRSP-Glutamat-Mutanten in einem Aktivitätsschnelltest.....	145
Abbildung 59. Quantifizierung der katalytischen Effizienz von RRSP-Mutanten des aktiven Zentrums.....	145

Danksagung

Hiermit möchte ich mich sehr herzlich bei folgenden Personen bedanken:

Prof. Dr. Aymelt Itzen für die Initiierung spannender Projekte und die freundliche sowie kompetente Betreuung während der gesamten Dauer der Dissertation hinweg. Die wissenschaftlichen Freiräume bei der Projektentwicklung und die anregenden Diskussionen waren äußerst motivierend und trugen wesentlich zum Gelingen der Arbeit bei.

Prof. Dr. Bernd Reif (Technische Universität München, Fakultät für Chemie) für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Prof. Dr. Michael Groll für die Bereitstellung zahlreicher Ressourcen. Bastian Bräuning für eine bereichernde und produktive Zusammenarbeit sowie für Hilfestellungen und wertvolle Hinweise bei der Proteinkristallisation.

Felix Ecker für die gewissenhafte Durchführung von Experimenten während seiner Bachelorarbeit und eines Forschungspraktikums.

Prof. Dr. Ville R. I. Kaila und Sophie L. Mader für die kompetente Unterstützung des GtgE-Projekts durch molekulardynamische Simulationen sowie hilfreiche Diskussionen.

Prof. Dr. Stephan A. Sieber für den Zugang zu massenspektrometrischen Methoden sowie Prof. Dr. Johannes Buchner für die Bereitstellung verschiedener Instrumente.

Prof. Dr. Vassilis Koronakis (University of Cambridge, Department of Pathology, UK) für die freundliche Aufnahme in seinem Arbeitskreis und Dr. Daniel Humphreys (derzeit an der University of Sheffield, Department of Biomedical Science, UK) für die kompetente Einführung in infektionsbiologische Methoden mit Salmonellen sowie die Fluoreszenzmikroskopie.

Allen Mitgliedern der AG Proteinchemie für die überaus herzliche und kollegiale Arbeitsatmosphäre, die mit hilfreichen Diskussionen und Anregungen den Laboralltag bereichert haben.

Meiner gesamten Familie - insbesondere meinen Eltern und Brüdern - sowie meiner Partnerin Andrea Eibl für ihre liebevolle Art und die uneingeschränkte Unterstützung, die mir ein unschätzbare Rückhalt in all den Jahren waren und mich prägen.

Eidesstattliche Erklärung

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

München, April 2018



(Rudolf Wachtel)