

# **Synthese von Guanosinnukleotidanaloga: Zustandskontrolle kleiner G-Proteine durch kovalente Modifikation**

## **Dissertation**

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doktor der Naturwissenschaften  
der Fakultät Chemie der  
technischen Universität Dortmund

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

Vorgelegt von  
David Wiegandt

Dortmund, Januar 2013

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

Erster Gutachter: Prof. Dr. Roger S. Goody  
Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Daniel Rauh





## Inhaltsverzeichnis

<b>1.1 Zusammenfassung</b>	13
<b>1.2 Einleitung</b>	16
1.2.1 Die Ras Superfamilie kleiner G-Proteine	16
1.2.2 Rab Proteine	19
1.2.3 Die G-Domäne	23
1.2.4 Die GTP Hydrolyse	25
1.2.5 Effektorinteraktionen	27
1.2.6 Steuerung kleiner G-Proteine: Darstellung konstitutiv aktiver/inaktiver Proteine	29
1.2.7 Kovalente Verbindung von Nukleotid und Protein: Die Michael-1,4-Addition	33
1.2.8 Acrylguanosin und Rab1b als Akzeptor-Donor Paar	35
<b>1.3 Zielsetzung</b>	38
<b>2 Synthese des Acrylguanosins</b>	39
<b>2.1 Durchführung</b>	41
2.1.1 Aktivierung der Purin C2-Position	41
2.1.2 Einführung des Aminopropyllinkers an der Purin C2-Position	42
2.1.3 Schutzgruppenabspaltung	43
2.1.4 Acrylfunktionalisierung des Linkers	44
<b>3 Phosphorylierung der Ribose 5´ Hydroxylgruppe</b>	45
<b>3.1 Durchführung</b>	47
3.1.1 Monophosphorylierung der 5´-Hydroxylgruppe	47
3.1.2 Phosphorylierung zum 5´-Triphosphat nach Ludwig	48
3.1.3 Phosphorylierung zum 5´-(β,γ-Methylen)-Triphosphat mittels Michelson Anionenaustausch	50
<b>4 Analytik</b>	52
<b>4.1</b> (2 <i>R</i> ,3 <i>R</i> ,4 <i>R</i> ,5 <i>R</i> )-2-(acetoxymethyl)-5-(2-bromo-6-oxo-1 <i>H</i> -purin-9(6 <i>H</i> )-yl)-tetrahydro-furan-3,4-diyl diacetat	52
<b>4.2</b> (2 <i>R</i> ,3 <i>R</i> ,4 <i>R</i> ,5 <i>R</i> )-2-(acetoxymethyl)-5-(2-(3-(tert-butoxycarbonylamino)propylamino) -6-oxo-1 <i>H</i> -purin-9(6 <i>H</i> )-yl)tetrahydrofuran-3,4-diyl diacetat	54
<b>4.3</b> 2-(3-aminopropylamino)-9-((2 <i>R</i> ,3 <i>R</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>R</i> )-3,4-dihydroxy-5-(hydroxymethyl)tetrahydrofuran-2-yl)-1 <i>H</i> -purin-6(9 <i>H</i> )-on	56
<b>4.4</b> <i>N</i> -(3-(9-((2 <i>R</i> ,3 <i>R</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>R</i> )-3,4-dihydroxy-5-(hydroxymethyl)tetrahydrofuran-2-yl)-6-oxo-6,9-dihydro-1 <i>H</i> -purin-2-ylamino)propyl)acrylamid	58

<b>4.5</b> ((2 <i>R</i> ,3 <i>S</i> ,4 <i>R</i> ,5 <i>R</i> )-5-(2-(3-acrylamidopropylamino)-6-oxo-1 <i>H</i> -purin-9(6 <i>H</i> )-yl)-3,4-dihydroxy-β-tetrahydrofuran-2-yl)methyl dihydrogen phosphate	60
<b>4.6</b> ((2 <i>R</i> ,3 <i>S</i> ,4 <i>R</i> ,5 <i>R</i> )-5-(2-(3-acrylamidopropylamino)-6-oxo-1 <i>H</i> -purin-9(6 <i>H</i> )-yl)-3,4-dihydroxytetrahydrofuran-2-yl)methyl tetrahydrogen Triphosphat	61
<b>4.7</b> ((((((2 <i>R</i> ,3 <i>S</i> ,4 <i>R</i> ,5 <i>R</i> )-5-(2-(3-acrylamidopropylamino)-6-oxo-1 <i>H</i> -purin-9(6 <i>H</i> )-yl)-3,4-di-hydroxytetrahydrofuran-2-yl)methoxy)(hydroxy)phosphoryloxy)-(hydroxy)-phosphoryl)-methylphosphonat	62
<b>5 Ergebnisse</b>	63
5.1 Intrinsische Nukleotidfreisetzung durch Rab1b und seine Mutanten: Bestimmung von $k_{off}$ durch Messung der Tryptophanfluoreszenz	65
5.2 Kovalente Modifikation von Rab1b L125C und Rab1b K153C mit AcrylGTP	68
5.3 Kovalente Modifikation von Rab1b Q67L L125C mit AcrylGTP: Darstellung von konstitutiv aktivem Rab1b	71
5.4 Bestimmung der Reaktionsgeschwindigkeit der konjugierten Addition von AcrylGTP an Rab1b Q67L L125C	72
5.5 Kovalente Modifikation Rab7 Q67L L129C mit AcrylGTP	73
5.6 Kovalente Modifikation Rab7 L129C und Rab1b L125C mit AcrylGppCH <sub>2</sub> p	74
5.7 Kovalente Modifikation von Ypt7, CDC42 und H-Ras mit AcrylGTP	76
5.8 Kovalente Modifikation von Rab1b L125C mit Acrylguanosin: Darstellung von nukleosidgebundenem Rab1b	77
5.9 Nachweis der Komplexstabilität von Rab1b L125C-Acrylguanosin: DrrA <sub>GEF</sub> in Gegenwart von GDP	78
5.10 Inhibition des Nukleotidaustauschs an Rab1b L125C durch kovalente Modifikation mit AcrylGDP	80
5.11 Interaktion von Rab1b L125C-AcrylGDP mit DrrA	81
5.12 Bestimmung des Einflusses der kovalenten Modifikation von Rab1b mit AcrylGTP auf die Interaktion mit dem Rab1b GAP TBC1D20	82
5.13 Interaktion von kovalent mit Acrylnukleotiden modifiziertem Rab1b mit seinem Effektor OCRL1	85
5.14 Interaktion von kovalent mit AcrylGTP modifiziertem Rab1b mit seinem Effektor Mical3	87
5.15 Prenylierung von kovalent mit AcrylGDP modifiziertem Rab1b durch REP und GGTase II	89
5.16 Interaktion von kovalent mit AcrylGDP modifiziertem Rab1b L125C mit GDI	92
5.17 Mikroinjektion von kovalent modifiziertem Rab1b in HeLa Zellen	97

<b>6 Diskussion</b>	101
6.1 Synthese der Acrylnukleotide	101
6.2 Einführung von Cys in Rab1b: Identifikation einer geeigneten Mutationsstelle	103
6.3 Darstellung konstitutiv aktiver, inaktiver und nukleosidgebundener kleiner G-Proteine	105
6.4 Biochemische Charakterisierung von konstitutiv aktivem/inaktivem Rab1b	107
6.5 Mikroinjektion von kovalent modifizierten Rab1b Proteinen in HeLa Zellen	111
6.6 Ausblick	114
<b>7 Material und Methoden</b>	116
7.1 Chemikalien	116
7.2 Geräte	117
7.3 Pufferlösungen	117
7.4 Chromatographische Methoden und Trennverfahren	119
7.4.1 Größenausschlusschromatographie	119
7.4.2 Ionenaustauschchromatographie	119
7.4.3 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)	120
7.4.4 Silikagelchromatographie	120
7.4.5 Dünnschichtchromatographie (DC)	121
7.4.6 SDS PAGE	121
7.5 Spektroskopische Methoden	122
7.5.1 Elektrospray-Ionisation Massenspektroskopie (ESI-MS)	122
7.5.2 Messungen der Rab1b Tryptophanfluoreszenz	122
7.5.3 Messung der NBD-Fluoreszenz	123
7.5.4 Kernresonanzspektroskopie (NMR Spektroskopie)	123
7.6 Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen	124
7.6.1 Konzentrationsbestimmung nach Bradford	124
7.6.2 Konzentrationsbestimmung durch Absorptionsmessung	124
7.7 Genexpression und Proteinreinigung	125
7.8 Nukleotidaustausch	126
7.9 Phosphatnachweis durch Zyrkonylchlorid	126
<b>8 Literaturverzeichnis</b>	128
<b>9 Danksagung</b>	145

## Abkürzungsverzeichnis

A	Ampere
Abb	Abbildung
Ac	Acetyl
AcrylG	Acrylguanosin
AcrylGDP	Acrylguanosindiphosphat
AcrylGMP	Acrylguanosinmonophosphat
AcrylGppCH <sub>2</sub> p	Acrylguanosin 5´-(β,γ-Methylen)-Triphosphat
AcrylGppNHp	Acrylguanosin 5´-(β,γ-Imido)-Triphosphat
AcrylGTP	Acrylguanosintriphosphat
AP	Alkalische Phosphatase
Arf	<i>ADP-ribosylation factor</i>
Äq.	Äquivalente
Boc	<i>tert</i> -Butoxycarbonyl
CBR	<i>C-terminal binding region</i>
CDR	<i>Complementary determining region</i>
CIM	<i>CBR interacting motif</i>
COP II	<i>Coat protein complex II</i>
Da	Dalton
DCM	Dichlormethan
DEE	Diethylether
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DrrA	<i>Defekt in rab recruitment A</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
eGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum
EzG	Elektronen ziehende Gruppe
g	Gramm
GGTase	Geranylgeranyltransferase
GAP	<i>GTPase activating protein</i>
GEF	<i>Guanosine nucleotide exchange factor</i>
GDI	Guanosinnukleotid Dissoziationsinhibitor
GDF	GDI Dissoziationsfaktor
GDP	Guanosindiphosphat
GppCH <sub>2</sub> p	Guanosinmonophosphat-β,γ-methylendiphosphonsäure

GppNHp	Guanosinmonophosphat- $\beta,\gamma$ -imidodiphosphat
GTP	Guanosintriphosphat
G Protein	Guanosinnukleotid bindendes Protein
G – Domäne	Guanosinnukleotid bindende Domäne
h	Stunde
HeLa	Henrietta Lacks Zellstamm
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HOMO	<i>Highest occupied molecular orbital</i>
k	Geschwindigkeitskonstante
Kap	Kapitel
kGP	kleines G Protein
K <sub>D</sub>	Dissoziationskonstante
kDa	Kilodalton
L	Liter
LUMO	<i>Lowest unoccupied molecular orbital</i>
M	Mol/Liter
m	meter
Mical	<i>molecule interacting with CasL</i>
min	Minute
Mw	<i>Molecular weight</i>
NADP	Nicotinamidadeninukleotidphosphat
NHS	<i>N</i> -Hydroxysuccinimid
Nu	Nukleophil
OCRL	<i>oculocerebrorenal syndrome of Lowe</i>
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PRA	<i>Prenylated Rab acceptor</i>
Rab	<i>Ras-like proteins in brain</i>
RabF	Rab Familien Motiv
Ran	<i>Ras like nuclear protein</i>
Ras	<i>Rat sarcoma</i>
RBD	Ras bindende Domäne
REP	<i>Rab escort protein</i>
Rho	<i>Ras homologue protein</i>
REP	Rab Escort Protein
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SDS	Sodiumdodecylsulfat

S <sub>N</sub> 2	Nukleophile Substitution Typ 2
SNARE	<i>soluble N-ethylmaleimide sensitive factor attachment protein receptor</i>
T	Temperatur
t	Zeit
TBA	Tri- <i>N</i> -Butylamin
TBA-Br	Tetra- <i>N</i> -Butylammoniumbromid
TCA	Trichloressigsäure
TCEP	Tris(2-chlorethyl)phosphat
TEA	Triethylamin
TFA	Trifluoressigsäure
TMP	Trimethylphosphat
TRAPP	<i>Transport protein particle</i>
U (biochemisch)	Unit
U (physikalisch)	Umdrehung
V	Volt
wt	Wildtyp
Yip	<i>Ypt interacting protein</i>

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

Es wurden die SI Präfixe nach DIN1301 verwendet ([http://www.bipm.org/en/si/si\\_brochure/chapter3/prefixes.html](http://www.bipm.org/en/si/si_brochure/chapter3/prefixes.html)).



## 1.1 Zusammenfassung

Rab Proteine sind Mitglieder der Superfamilie kleiner G-Proteine. Alle Mitglieder dieser Familie sind monomere Proteine und teilen gemeinsame Struktur motive, die sie in die Lage versetzen, sowohl GDP als auch GTP zu binden, sowie GTP zu GDP zu hydrolysieren (Bourne *et al.*, 1991). Die Art des gebundenen Nukleotides definiert die möglichen Interaktionspartner der kleinen G-Proteine, so dass ihre Grundfunktion als binäre molekulare Schalter beschrieben werden kann (Vetter *et al.*, 2001). Um zwischen dem GDP und dem GTP gebundenen Zustand zu wechseln, sind zwei Klassen von Regulatorproteinen von großer Bedeutung. GEFs verringern die Affinität eines kleinen G-Proteins zu Guanosinnukleotiden und ermöglichen so den Austausch von GDP zu GTP und damit die Aktivierung des kleinen G-Proteins (Schmidt *et al.*, 2002). GAPs hingegen beschleunigen die geringe intrinsische Hydrolyseaktivität der kleinen G-Proteine und überführen sie so in ihren inaktiven, GDP gebundenen Zustand (Bernards *et al.*, 2004).

Die Untergruppe der Rab Proteine sind Regulatoren verschiedener Prozesse des intrazellulären Vesikeltransports (Zerial *et al.*, 2001). Rab Proteine enden C-terminal mit verschiedenen, mindestens einem, fast immer jedoch zwei Cysteine enthaltenden Motiven (Takai *et al.*, 2001). Diese Cysteine werden durch GGTase Typ II im ternären Komplex zwischen Rab, REP und GGTase Typ II mit Geranylgeranyl Gruppen modifiziert (Wu *et al.*, 2009). Die C-terminale Lipidmodifikation ist unbedingte Voraussetzung der Rab Lokalisation an den jeweiligen Zielmembranen, wobei die Mechanismen der selektiven Rab Rekrutierung an Membrane Gegenstand aktueller Diskussion sind (Hutagalung *et al.*, 2011). Im physiologischen Gleichgewicht liegen in der Zelle 10-50 % der Rab Proteine im Zytosol vor (Takai *et al.*, 2001). Dafür zeichnet sich eine dritte Klasse von Rab Regulatoren verantwortlich, die GDI Proteine. GDI bindet mit hoher Affinität GDP gebundenes, prenyliertes Rab und ist in der Lage, dieses von Membranen zu extrahieren. Es schirmt die hydrophoben Lipidanteile des Rab Proteins in einer Prenyl-Bindetasche vor dem Zytosol ab und ermöglicht so den Rücktransport von Rab Proteinen zu ihrer jeweiligen Zielmembran (Wu *et al.*, 2007).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde Guanosin an der C2 Position des Purinringes mit 1,3-Diaminopropan über ein sekundäres Amin verknüpft. Das terminale Amin wurde als Amid mit Acrylsäure funktionalisiert. Diese Verbindung wird nachfolgend vereinfacht als Acrylguanosin bezeichnet und AcrylG abgekürzt. Ausgehend von diesem Nukleosid konnten folgende Nukleotide dargestellt werden: AcrylGMP, AcrylGDP, AcrylGTP und AcrylGppCH<sub>2</sub>p. Trotz der Modifikation können die Nukleotide AcrylGDP und AcrylGTP von Rab 1b und Rab 7 weiterhin gebunden werden und den Zustand des kleinen G-Proteins als aktiv oder inaktiv festlegen.

Mittels Michael 1,4 Addition konnte die Acrylgruppe des modifizierten Nukleotides mit den Thiolen durch Mutation eingeführter Cysteine in Rab1b und Rab7 zur Reaktion gebracht werden. Dies resultierte in kovalent mit ihrem Substrat verbundenen Rab Proteinen. Es konnte gezeigt werden, dass die Reaktion zwischen Acrylgruppe und Cystein nur ablaufen kann, wenn beide Reaktanden in räumlicher Nähe zueinander gehalten werden: Die vorherige Bindung des Nukleotides im aktiven Zentrum des Rab Proteins ist unabdingbare Voraussetzung für die kovalente Modifikation. Es konnten keine Nebenreaktionen an weiteren, natürlichen Cysteinen (z.B. an den gut zugänglichen C-terminalen Prenylierungsmotiven) festgestellt werden. Alle kovalent modifizierten Rab Proteine wiesen eine intakte Fähigkeit zur GTP Hydrolyse auf. Nach Einsatz von AcrylGTP zur Modifikation wurde also stets das mit AcrylGDP modifizierte konstitutiv inaktive Protein erhalten. Durch den Einsatz der Hydrolyse defizienten Q67L (in Rab1b) Mutation sowie das nicht hydrolysierbare AcrylGTP Analog AcrylGppCH<sub>2</sub>p wurden auf zwei verschiedenen Wegen konstitutiv aktive Proteine erhalten. Über die Hydrolyse von kovalent an Rab1b gebundenem AcrylGDP durch Alkalische Phosphatase (AP) in Gegenwart des Rab1b GEFs DrrA (Schoebel *et al.* 2009) wurde scheinbar nukleotidfreies mit AG modifiziertes Rab1b erhalten. Alle modifizierten Proteine zeigten in biophysikalischen Untersuchungen die erwarteten Eigenschaften:

- Keines der Proteine ist mehr zu einem Nukleotidaustausch in der Lage
- Mit AcrylGDP oder AcrylGTP modifiziertes Rab 1b zeigt keine Komplexbildung mehr mit seinem GEF DrrA
- Das virtuell nukleotidfreie mit AcrylG modifizierte Rab1b bildet stabile Komplexe mit DrrA auch in Gegenwart von GDP
- Das mit AcrylGTP modifizierte Hydrolyse defiziente Rab1b Q67L zeigt keine abweichende Interaktion mit dem GAP Tbc1D20 im Vergleich zum GTP gebundenen Rab1b Q67L
- Mit AcrylGDP modifiziertes Rab1b wird durch REP erkannt und kann durch GGTase Typ II prenyliert werden. Ein kovalent AcrylGDP gebundenes Rab1b Hybridprotein mit CaaX Box Motiv kann REP unabhängig durch GGTase Typ I prenyliert werden
- Die Rab1b-GDI Interaktion von mit NBD-Farnesyl modifiziertem, kovalent AcrylGDP gebundenem Rab1b ist im Vergleich zum identisch prenylierten Rab1b wt nicht beeinträchtigt
- Die konstitutiv aktiven Rab1b Proteine (sowohl Q67L Mutante als auch AcrylGppCH<sub>2</sub>p modifiziertes) bilden Komplexe mit den Rab1b Effektoren Mical 3 und OCRL 1. Dies trifft auf das mit AcrylGDP modifizierte Protein nicht zu
- Nach der Injektion von sowohl mit AcrylGDP als auch mit AcrylGTP modifizierten Rab1b-eGFP Fusionsproteinen in HeLa Zellen konnte nach einigen Stunden eine vollständige Lokalisation der Proteine an den Membranen des Golgi Apparates beobachtet werden

bachtet werden. Dabei lief die Membranrekrutierung des mit AcrylGDP modifizierten Proteins deutlich schneller ab.

In dieser Arbeit konnte mit AcrylG ein molekulares Werkzeug dargestellt werden, welches es ermöglicht, die Aktivierungszustände von kleinen G-Proteinen eindeutig und irreversibel festzulegen. Es konnte gezeigt werden, dass die Modifikation von Rab1b mit Acrylguanosinnukleotiden die nukleotidabhängigen Wechselwirkungen mit seinen natürlichen Interaktionspartnern *in vitro* nicht nachteilig beeinflusst. Die Ergebnisse eines ersten zellbiologischen Experiments in HeLa Zellen haben Resultate erbracht, die im Einklang mit der Theorie stehen und gezeigt, dass kovalent mit Acrylnukleotiden modifizierte kleine G-Proteine auch *in vivo* native Eigenschaften aufweisen.

## 1.2 Einleitung

### 1.2.1 Die Ras Superfamilie kleiner G-Proteine

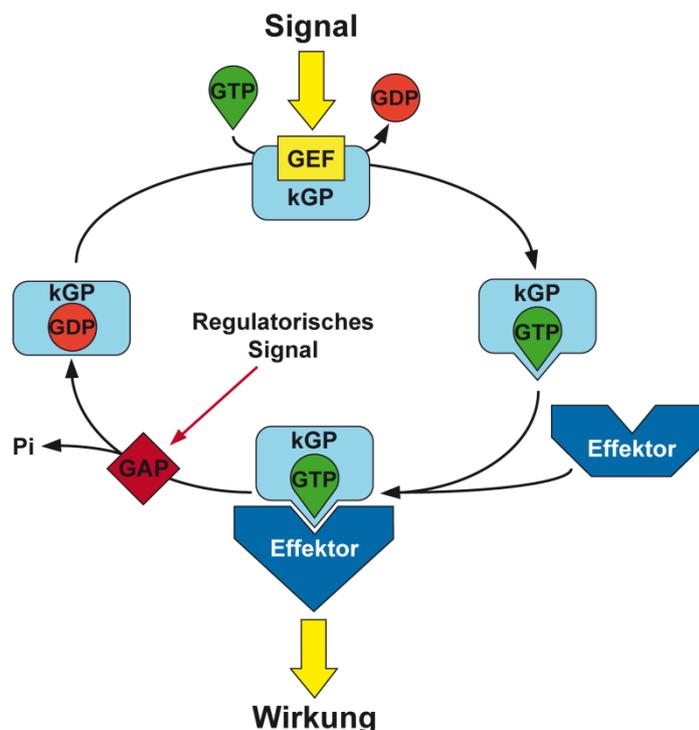
Die Mitglieder der Familie kleiner G-Proteine sind Regulatoren einer Vielzahl von zellulären Prozessen. Grundlage dafür ist ihre Eigenschaft, sowohl Guanosintriphosphat (GTP) als auch Guanosindiphosphat (GDP) zu binden (Bourne *et al.*, 1990). Die Art des gebundenen Nukleotides bestimmt über den Zustand des jeweiligen kleinen G-Proteins und seine mögliche Interaktionspartner (McCormick *et al.*, 1996). GTP gebundene kleine G-Proteine sind aktiv, GDP gebundene inaktiv. Die Fähigkeit der kleinen G-Proteine, GTP zu GDP zu hydrolysieren und signalabhängig GTP zurückbinden zu können, begründet ihre Funktion als molekulare Schalter (Bourne *et al.*, 1990)

Die ersten kleinen G-Protein Gene wurden in den späten 1970iger Jahren als v-Ha-Ras und v-Ki-Ras Protoonkogene von Sarkoma Viren identifiziert (Chien *et al.*, 1979). Wenige Jahre später wurden diese Protoonkogene im Genom humaner Zellen gefunden, darunter auffallend oft Gene mit Punktmutationen in verschiedenen humanen Karzinomen (Der *et al.*, 1982; Murray *et al.*, 1983). Mutierte Versionen der humanen Ras Gene werden heute in über 30 % humaner Karzinome identifiziert (Takai *et al.*, 2001). Darüber hinaus konnten mutierte Formen kleiner G-Proteine als Auslöser zahlreicher Krankheiten identifiziert werden, wie dem Carpenter-Syndrom oder der Charcot-Marie-Tooth-Krankheit (Hidestrand *et al.*, 2009, Barisic *et al.*, 2008). Dies begründet bis heute ein großes Interesse an dieser Klasse von Proteinen, und mittlerweile sind über 150 humane Vertreter dieser Familie bekannt (Colicelli, 2004). In Anlehnung an ihre ersten entdeckten Vertreter wird sie auch als Ras Superfamilie bezeichnet. Anhand von funktionellen Gemeinsamkeiten sowie Sequenzvergleichen werden die kleinen G-Proteine in fünf Unterfamilien eingeteilt: Ras, Rho, Rab, Sar / Arf und Ran (Tabelle 1.2.1.1).

Ras	Wichtige Knotenpunkte in der Weiterleitung extrazellulärer Signale. Regulation der Genexpression, Zelldifferenzierung und Zellproliferation.
Rho / Rac / Cdc42	Regulatoren extrazellulärer Signaltransduktionswege: Aktin Organisation, Zellzyklus Ablauf, Genexpression
Rab	Regulatoren des intrazellulären vesikulären Transports, häufig Identifikation der Zielmembran und Andockprozesse. Proteintransport zwischen Organellen sowie in der Endozytose und Sekretion
Sar1 / Arf	Regulation des vesikulären Transports: Rekrutierung von Hüllproteinen, Frachtsortierung und Vesikelbildung
Ran	RNA und Proteintransport zwischen Zytoplasma und Nukleus. Regulation des mitotischen Spindelapparates, der DNA Replikation und des Kernhüllen Aufbaus

Dabei stellen die Rab Proteine mit über 60 identifizierten Vertretern in humanen Zellen und 11 in Hefe die größte bekannte Gruppe dar (Colicelli, 2004). Die Sequenzhomologien innerhalb der Untergruppen sind vergleichsweise hoch, sie betragen für verschiedene Ras Proteine untereinander 50-55 % (Valencia *et al.*, 1991). Vergleiche der Aminosäure Sequenzen von Rab Proteinen mit denen von Ras Proteinen ergeben ~12 % Sequenzübereinstimmung (Wittinghofer *et al.*, 2011). Trotz der deutlichen Unterschiede zwischen den einzelnen Unterfamilien teilen alle kleinen G-Proteine einen Kern konservierter Sequenzen und Struktur motive: die G-Domäne. Die gesamte G-Domäne entspricht im Ras den Aminosäuren 5-166. Sie besteht aus einem sechssträngigen  $\beta$ -Faltblatt und fünf  $\alpha$ -Helices mit einer Masse von 22 kDa (Wennerberg *et al.*, 2005). Ausgehend vom N-Terminus umfasst sie die Motive G1: GxxxxGKS/T, G2: T, G3: DxxGQ/H/T, G4: T/NKxD und G5: C/SAK/L/T. Diese konservierten Sequenzen sind essentiell für die Erkennung und Bindung von Guaninnukleotiden (Bourne *et al.*, 1991). Dabei werden GDP und GTP, nicht aber Guanosinmonophosphat (GMP) mit vergleichbar hoher Affinität gebunden, so dass die Lage des Bindungsgleichgewichts hauptsächlich durch die umgebende Nukleotidkonzentration definiert wird (Klebe *et al.* 1995, 1; Vetter *et al.* 2001). Die Aktivierung kleiner G-Proteine erfordert den Austausch von GDP durch GTP. Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt ist dabei die Nukleotidfreisetzung. Beobachtete intrinsische  $k_{off}$  Werte liegen in der Größenordnung von  $10^{-5} \text{ s}^{-1}$ , das entspricht einer Halbwertszeit von ~19 h (Klebe *et al.* 1995, 1). GEFs sind in der Lage, die Nukleotidfreisetzung zu beschleunigen, indem sie kleine G-Proteine binden und intermediäre ternäre Komplexe zwischen GEF, kleinem G-Protein und GDP/GTP bilden. Die Affinität zwischen Nukleotid und kleinem G-Protein sowie GEF und kleinem G-Protein ist in diesen Komplexen stark herabgesetzt, und durch Nukleotidfreisetzung werden schließlich binäre Komplexe gebildet. Nach Rückbindung von GDP/GTP an den Komplex aus kleinem G-Protein und GEF kann durch GEF Freisetzung schließlich wieder ein binärer Komplex zwischen kleinem G-Protein und Nukleotid gebildet werden. Bekannte GEFs verschieben nicht die Lage des Gleichgewichtes zwischen GDP und GTP gebundenen kleinem G-Protein, sondern wirken als Katalysatoren, die die Einstellung des Gleichgewichtszustandes beschleunigen (Klebe *et al.* 1995, Vetter *et al.* 2001). Aufgrund der im Vergleich zu GDP höheren GTP Konzentration in Zellen liegt das Gleichgewicht unter physiologischen Bedingungen auf der Seite des GTP gebundenen kleinen G-Proteins (Dyke *et al.*, 1977.) Die Bindung von GTP bewirkt insbesondere in zwei Regionen der G-Domäne konformationelle Änderungen, die aufgrund dessen als *Switch 1* und *Switch 2* benannt wurden (Milburn *et al.* 1990). *Switch 1* und *Switch 2* umfassen im Ras die Aminosäuren 32-38 sowie 59-67 (Vetter *et al.* 2001) und enthalten die Motive G2 (*Switch 1*) und G3 (*Switch 2*). In Kristallstrukturen verschiedener GDP gebundener kleiner G-Proteine liegen diese Regionen ungeordnet vor (Stroupe *et al.*, 2000). In einigen Kristallstrukturen zeigen diese Regionen auch eine geordnete Konformation, die jedoch

auf die Kristallpackung zurückzuführen ist und deutliche Unterschiede zwischen verschiedenen kleinen G-Proteinen aufweist (Lee *et al.*, 2009). Im Gegensatz dazu nehmen beide *Switch*-Regionen im GTP gebundenen Zustand stabile Konformationen an (Dumas *et al.*, 1999), die große Ähnlichkeiten zwischen verschiedenen kleinen G-Proteinen aufweisen (Vetter *et al.*, 2001; Lee *et al.* 2009). Diese konformationellen Änderungen in GTP gebundenen kleinen G-Proteinen sind direkte Voraussetzung für die Bindung der jeweiligen Proteineffektoren. Die Bindungsmodi zwischen Effektor und kleinem G-Protein sind dabei sehr vielfältig und können sich bereits innerhalb einer Unterfamilie deutlich voneinander unterscheiden. Der kleinste gemeinsame Nenner ist dabei, dass die *Switch*-Regionen direkt an der Bindung beteiligt sind (Vetter *et al.*, 2001; Lee *et al.* 2009). Die Bindung des Effektors bewirkt eine Änderung seiner Funktionsweise oder Lokalisation und damit den nächsten Schritt zum Beispiel in einer Signaltransduktionskette.



**Abb. 1.2.1.1:** Ras Zyklus.

Reguliert durch vorgeschaltete Signale katalysiert GEF den Austausch von GDP durch GTP. Das aktivierte kleine G-Protein (kGP) kann nun seinen Effektor binden. Durch die neue Lokalisation des Effektors und / oder durch die Bindung hervorgerufene strukturelle Veränderung kann der Effektor das vorgeschaltete Signal übersetzen bzw. weiterleiten. GAPs terminieren das Signal, indem sie die intrinsische GTP Hydrolyse beschleunigen und so das kGP in den inaktiven GDP gebundenen Zustand zurückführen.

Die Deaktivierung erfolgt durch hydrolytische Spaltung der  $\beta,\gamma$ -Phosphatbindung des gebundenen GTPs. Kleine G-Proteine verfügen über eine geringe intrinsische Hydrolyseaktivität, unter physiologischen Bedingungen wird die Hydrolyse jedoch durch GAPs beschleunigt. GAPs sind essentielle Regulatoren kleiner G-Proteine, die ihre Aktivität nach Erfüllung der

physiologischen Funktion terminieren (Bernards *et al.*, 2004). Der gesamte Vorgang der Aktivierung, Effektorbindung und Deaktivierung wird auch als Ras-Zyklus bezeichnet (Abb. 1.1.2.1).

### 1.2.2 Rab Proteine

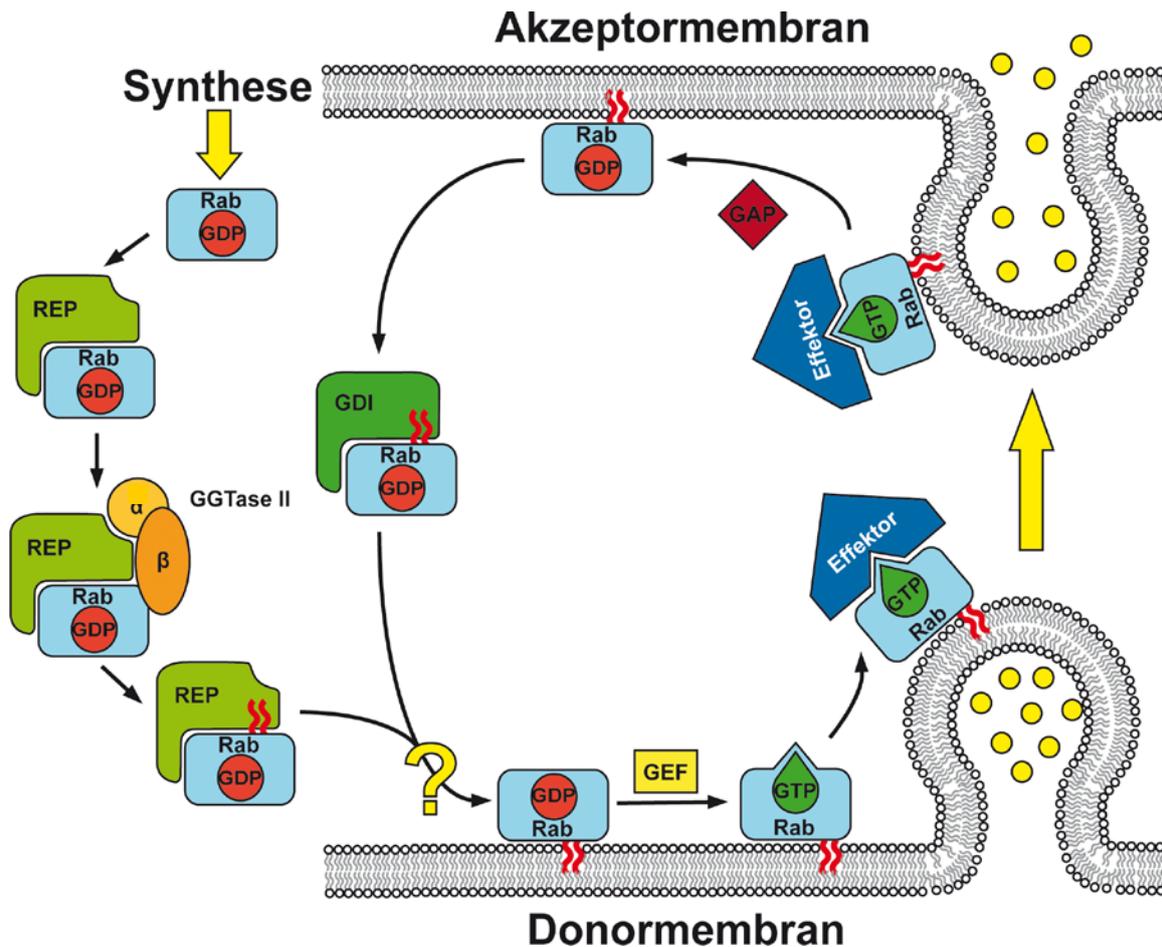
Da die biochemischen Experimente dieser Arbeit an Rab Proteinen als Vertreter der Familie kleiner G-Proteine durchgeführt wurden, soll in diesem Kapitel auf die Besonderheiten dieser Unterfamilie eingegangen werden.

Viele kleine G-Proteine werden posttranslational mit Lipiden modifiziert und sind so in der Lage, mit verschiedenen Membranen zu interagieren. Dazu gehören Proteine der Ras Unterfamilien Ras, Rho, Rab und einige Mitglieder der Arf Gruppe (Wennerberg *et al.*, 2005). Arf Proteine werden an einem N-terminalen Glycin myristoyliert (Farazi *et al.*, 2001), während Ras und Rho Proteine C-terminale Erkennungssequenzen für verschiedene Prenyltransferasen haben: das CaaX Motiv für Farnesyltransferase und das CaaL/F Motiv für Geranylgeranyltransferase Typ I (GGTase I) (Hancock *et al.*, 1989, Cox *et al.*, 2002, Takai *et al.* 2001)). *a* steht für eine beliebige aliphatische, und *X* für eine beliebige Aminosäure.

Im Gegensatz dazu verfügen Rab Proteine über keine Erkennungssequenz, sondern über ein, meistens jedoch zwei C-terminale Cysteine, die entweder direkt benachbart, oder durch eine Aminosäure voneinander getrennt sind (Casey *et al.*, 1996). Den Cysteinen vorgelagert ist eine mindestens neun Aminosäuren lange, hypervariable Sequenz, die in einem hydrophoben Motiv endet (Wu *et al.*, 2009). Rab GGTase, auch als GGTase Typ II bezeichnet, ist im Gegensatz zu anderen Prenyltransferasen nicht in der Lage ihr Substrat direkt zu binden. Sie benötigt das Hilfsprotein *Rab escort protein* (REP) (Goody *et al.*, 2005). REP bindet hauptsächlich über seine *Rab-binding platform* an die G-Domäne von GDP gebundenem Rab. Eine zweite wichtige Interaktion findet statt zwischen der *C-terminal binding region* (CBR) von REP und dem hydrophoben Motiv am C-Terminus des Rab, dem *CBR interacting motif* (CIM). Die Komplexbildung mit Rab erhöht die Affinität von REP für GGTase II um ca. Faktor 1000 und ermöglicht die Bildung des eigentlichen katalytischen ternären Komplexes zwischen Rab, REP und GGTase II. Eine besondere Bedeutung in diesem Komplex kommt der Interaktion von CBR und CIM zu. Die Affinität von Rab und REP wird durch diese Bindung weiter erhöht, vor allem aber wird der flexible C-Terminus des Rab Proteins zum aktiven Zentrum der GGTase II orientiert. Dies führt zu einer erhöhten effektiven Cystein-Konzentration im aktiven Zentrum und ermöglicht der GGTase II den Prenyltransfer durchzuführen. Dieser Mechanismus, der ohne spezifische Erkennungssequenzen auskommt, begründet das weite Substratspektrum der GGTase II: sie ist in der Lage, über 60 verschiedene

kleine G-Proteine der Rab Familie mit individuellen C-terminalen Sequenzen zu prenylieren (Wu *et al.*, 2009).

Die Prenylierung ist unabdingbare Voraussetzung für die Membranassoziation und damit Funktionalität der Rab Proteine in der Regulation vesikulärer Transportprozesse. Wie alle kleinen G-Proteine wechseln sie zyklisch zwischen einem GDP und einem GTP gebundenen Zustand. Gekoppelt an ihren Zustand wechseln Rab Proteine zusätzlich zwischen dem Zytosol und den Akzeptor- und Donormembranen ihres jeweiligen Transportweges (Abb. 1.2.2.1).



**Abb1.2.2.1:** Rab Zyklus

Neu synthetisiertes Rab wird von REP erkannt und gebunden. Im ternären Komplex mit REP und GG-Tase II wird es posttranslational mit einer oder zwei Geranylgeranylgruppen modifiziert. Nach Aktivierung durch GEF kann Rab seine Effektoren rekrutieren und so verschiedene Prozesse im vesikulären Transport regulieren. Nach Deaktivierung durch GAP wird Rab durch GDI von der Akzeptormembran gelöst und ins Zytosol überführt. Der Mechanismus der Rab Freisetzung an die Donormembran sowohl aus dem REP als auch aus dem GDI Komplex ist ungeklärt.

Im Zytosol liegen Rab Proteine im Komplex mit dem Protein GDP-Dissoziationsinhibitor (GDI) vor. GDI ist ein zu REP homologes Protein (Alory *et al.*, 2001), das eine hohe Affinität zu GDP gebundenen, prenylierten Rab Proteinen hat, unprenylierte und / oder GTP gebundene Rab Proteine jedoch nur mit geringer Affinität bindet (Shapiro *et al.*, 1995, Alexandrov *et al.*, 1999). Neben einer *Rab binding platform* hat GDI eine unpolare Tasche, in der es die

hydrophoben Geranylgeranylreste von Rab Proteinen vor dem polaren Zytosol abschirmt. Die Affinität von GDI zu GDP gebundenem, prenyliertem Rab ist groß genug, um membran-assoziiertes Rab von der Membran zu lösen und in das Zytosol zu überführen. Es wird von einem mehrstufigen Prozess ausgegangen, bei dem die G-Domäne des Rab zuerst über die *Rab binding platform von GDI* gebunden wird. Nachfolgend bindet der flexible C-Terminus des Rab Proteins und bringt die GDI Geranylgeranyl-Bindetasche in die Nähe der C-terminalen Prenylgruppen. Dies führt schließlich zu der Extraktion der Prenylgruppen aus der Membran und ihre Überführung in die GDI Geranylgeranyl-Bindetasche (Goody *et al.*, 2005). Die Freisetzung von Rab aus dem Rab-GDI Komplex an seine Zielmembran ist Gegenstand aktueller wissenschaftlicher Diskussion. Ein älteres Modell propagiert die Existenz von GDI Dissoziationsfaktoren (GDF), die sowohl die Dissoziation von Rab aus dem Rab-GDI Komplex als auch die Insertion der Rab-Prenylgruppen in die Membran katalysieren sollen (Pfeffer *et al.*, 2004). Tatsächlich ist gegenwärtig ein Protein bekannt, das nachweislich den Transfer von GDI gebundenen, prenyliertem Rab9 an Membranen katalysiert: das Membranprotein Yip3 in Hefe aus der Yip Familie und sein humanes Homolog PRA1 (Sivars *et al.*, 2003). In diesem Modell erfolgt die Aktivierung des Rab Proteins nach der Membranassoziation durch GEF katalysierten Nukleotidaustausch (Pfeffer *et al.*, 2004). Da allerdings die Affinität von GDI zu GTP gebundenem Rab bedeutend geringer als zu GDP gebundenem ist und GDF nicht in der Lage ist, GTP gebundenes Rab von Membranen zu extrahieren (Pfeffer *et al.*, 1995), sollte der Austausch von GDP gegen GTP für die Dissoziation des Komplexes genügen. Tatsächlich konnte gezeigt werden, dass die GEF Aktivität des bakteriellen Proteins DrrA aus *Legionella pneumophila* ausreichend ist, um in Gegenwart von GTP den Rab1b-GDI Komplex zu dissoziieren (Schoebel *et al.*, 2009). Beide Modelle schließen sich nicht gegenseitig aus: obwohl GEF Aktivität für die Assoziation von Rab aus Rab-GDI Komplexen an Membranen ausreichen kann, ist es durchaus möglich, dass GDFs aus kinetischen Gründen notwendig sind um den Prozess zu beschleunigen.

Nachfolgend kann Rab mit seinen Effektoren interagieren und sie so ebenfalls an die Membran rekrutieren. Rab Effektoren wirken in vielen Bereichen des vesikulären Transports:

- Selektion der transportierten Proteine (Lombardi *et al.*, 1993, Diaz *et al.*, 1998)
- Vesikelbildung (Carlton *et al.*, 2005, Frolov *et al.*, 2008)
- Vesikel-/Organelltransport entlang von mikrotubulären oder Aktin Strukturen (Lipatova *et al.*, 2008, Itoh *et al.*, 2002)
- Vesikelbindung (Tethering) an Akzeptormembran / Akzeptormembran Identifizierung (Schimmöller *et al.*, 1998)
- Fusion der Vesikel mit der Akzeptormembran (Christoforidis *et al.*, 1999)

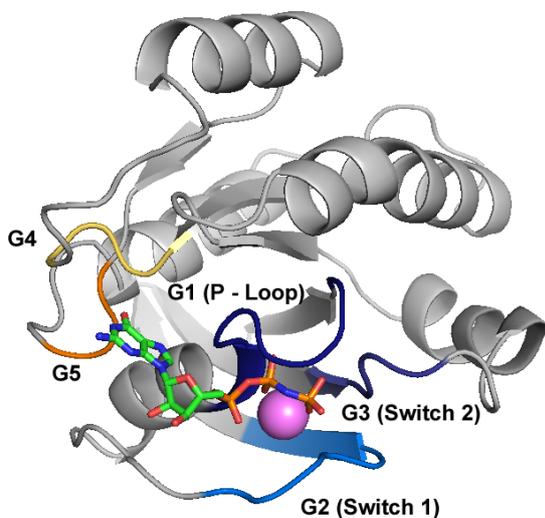
Dabei sind die meisten bekannten Rab Effektoren im Vesikeltransport, in der Vesikelbindung an die Akzeptormembran und der Membranfusion aktiv (Takai *et al.*, 2001).

Nach der Deaktivierung durch GAPs werden Rab Proteine wie oben beschrieben durch GDI von der Membran extrahiert und können für einen weiteren Zyklus an ihre Zielmembran zurück geführt werden.

Die ersten zellbiologischen Experimente sollten mit Rab1b durchgeführt werden. Daher soll an dieser Stelle ein kurzer Überblick über die bekannten Rab1b Funktionen im zellulären Kontext gegeben werden. Rab1b hat wichtige Funktionen in der Regulation des vesikulären Transports vom ER (Endoplasmatisches Retikulum) zum Golgi-Apparat, dem intra-Golgi Transport und dem Recycling von Membranen durch frühe Endosomen (Cai *et al.*, 2007, Hutt *et al.*, 2008). Der vesikuläre Transport kann in vier essentielle Schritte unterteilt werden: Die Knospung (*Budding*), der Transport, die Bindung (*Tethering*) und abschließend die Membranfusion (Bonifaciano *et al.*, 2004). Zwei bekannte Effektoren von Rab1b, p115 und GM130, sind *Tethering*-Faktoren. Beide Proteine binden aktiviertes Rab1b. Am ER wird p115 während der Vesikelknospung durch Rab1b an COP II (*Coat protein complex II*) Vesikel rekrutiert, wo sie mit COP II Vesikel assoziierten SNARE Proteinen (*soluble N-ethylmaleimide sensitive factor attachment protein receptor*) cis-SNARE Komplexe bilden. Durch diese Komplexe wird der Golgi als Zielregion des Vesikels definiert (Allan *et al.*, 2000). GM130 ist an Golgi Membranen lokalisiert und interagiert unabhängig von p115 mit Rab1b. Beide Interaktionen sind essentiell für die Vesikelerkennung am Golgi und die Einleitung der Membranfusion. Rab1b hat also eine regulierende Funktion sowohl an der Donor- als auch an der Akzeptormembran (Moyer *et al.*, 2001). Bekannte Regulatoren von Rab1b in humanen Zellen sind der TRAPP Komplex (*Transport protein particle*) und TBC1D20. TRAPP ist ein Multiprotein *Tethering*-Faktor, der an COP II Vesikel rekrutiert wird. Vier seiner Untereinheiten haben im Zusammenspiel eine GEF Aktivität gegenüber Rab1b (Barrowman *et al.*, 2010). TBC1D20 ist ein an ER Membranen lokalisiertes GAP, das spezifisch für Rab1 und Rab2 ist. Eine Überexpression von TBC1D20 unterbindet durch Inaktivierung von Rab1b den Vesikeltransport vom ER zum Golgi bereits am ER (Haas *et al.*, 2007).

### 1.2.3 Die G-Domäne

Die minimale G-Domäne von G-Proteinen enthält vier bis fünf konservierte Guanosinnukleotid bindende Motive: G1 bis G4/G5 (Bourne *et al.*, 1990, Bourne *et al.*, 1991). Sie hat eine Größe von ~18-22 kDa und besteht aus einem sechssträngigen, gemischtem  $\beta$ -Faltblatt, das beidseitig von insgesamt 5  $\alpha$ -Helices umschlossen ist (Wennerberg *et al.*, 2005, Wittinghofer *et al.*, 2011), (Abb1.2.3.1). Den G-Motiven können drei Funktionen zugeordnet werden: Erhöhung der Affinität des G-Proteins zu Nukleotiden, Erkennung des Nukleotid  $\gamma$ -Phosphats und Diskriminierung zwischen Adenosin- und Guanosinnukleotiden.



**Abb. 1.2.3.1:**

**Links:** H-Ras (5p21) Struktur im Komplex mit GppNHp (Kristallstruktur: Pai *et al.*, 1990). Die fünf G-Motive sind farblich markiert und beschriftet. Das Magnesiumion ist als Kugelmodell violett dargestellt, das Nukleotid als Stabmodell.

**Rechts:** Schematische Darstellung der Interaktionen zwischen Aminosäuren der G-Motive von H-Ras (5p21) und GTP. Magnesium ist als violettes Kugelmodell dargestellt, die G-Motive sind analog zum Strukturmodell farblich markiert. Wasserstoffbrücken und ionische Wechselwirkungen sind als gestrichelte Linien eingetragen (Pai *et al.*, 1990, Wittinghofer *et al.*, 2011). Ladungen, Wassermoleküle und Wasser vermittelte Aminosäure-Protein-Kontakte sind aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht abgebildet.

Einen großen Beitrag zur Nukleotidaffinität liefert das Motiv G1: GxxxxGKS/T, auch Walker-Motiv oder P-Schleife genannt (Walker *et al.*, 1982, Saraste *et al.*, 1990) sowie G4: N/TKxD und G5: SAK (Bourne *et al.*, 1991, Rensland *et al.*, 1995). Die Aminosäuren des G1 Motivs bilden zahlreiche Kontakte zu den Phosphaten des Nukleotides über ihre Peptidketten NH-Gruppen sowie über die Seitenkette des Lys. Mittels der Ser/Thr Seitenkette wird eine koordinative Bindung mit dem Magnesiumion ausgebildet. Das G4 Motiv vermittelt über das Asp einen stabilen zweifachen Kontakt zum Guanin über die primäre Aminogruppe sowie die NH-Gruppe an Position 1 des Purinringes. Weitere Kontakte finden statt zwischen dem Ringsau-

erstoff der Ribose und der Lysinseitenkette sowie der Asparaginseitenkette und Stickstoff an der Purinposition 7. Die G5 Sequenz ist Bestandteil vieler G-Proteine, jedoch ist sie das am wenigsten konservierte Motiv (Bourne *et al.*, 1991, Wennerberg *et al.* 2005: S1, Wittinghofer *et al.*, 2005). Das SAK Motiv von H-Ras kontaktiert den Guanin Sauerstoff über die Alaninpeptidketten NH-Gruppe sowie die Lysinseitenkette. Den Motiven G1, G4 und G5 ist gemein, dass sie unabhängig vom gebundenen Nukleotid immer dieselbe Konformation haben (Stroupe *et al.*, 2000, Lee *et al.* 2009).

Die Motive G2: T und G3: DxxG (Bourne *et al.*, 1991) sind über ihre Seitenketten direkt (Thr) bzw. wasservermittelt (Asp) an der Koordination des Magnesiumions beteiligt (Bourne *et al.*, 1991, Pai *et al.*, 1990). Die einzigen Kontakte zum Nukleotid finden über die Hauptketten NH-Gruppen von Thr bzw. Gly ausschließlich zum  $\gamma$ -Phosphat statt. Diese Kontakte sind stark konserviert und begründen voraussichtlich einen universellen Mechanismus der Nukleotid abhängigen Konformationsänderung in GTP und ATP bindenden Proteinen (Vetter *et al.*, 2001, Wittinghofer *et al.*, 2011). Die Interaktion mit dem  $\gamma$ -Phosphat stabilisiert das G2 und G3 Motiv sowie ihre Umgebung, was zu den beobachteten geordneten Strukturen der *Switch 1*- und *Switch 2*-Regionen im GTP gebundenen Zustand führt (Dumas *et al.*, 1999). Es wird angenommen, dass die Bindung des  $\gamma$ -Phosphats über die Peptidketten NH-Gruppen die konformationellen Änderungen in diesen Regionen weiter verstärkt, da die Interaktion so unmittelbare Auswirkungen auf das Peptidrückgrat hat (Wittinghofer *et al.*, 2011). Nach der Hydrolyse von GTP zu GDP haben weder das G2 noch das G3 Motive direkte Kontakte zum Nukleotid. Das ordnende Element geht verloren und *Switch 1* und *Switch 2* entspannen sich in verschiedene ungeordnete Konformationen. Aus diesem Grund wird der Schaltermechanismus von Nukleotid bindenden Proteinen als ein „gespannte Feder Mechanismus“ beschrieben (Vetter *et al.*, 2001).

Die Motive G1, G2 und G3 sind sowohl in ATP als auch in GTP bindenden Proteinen konserviert (Wittinghofer *et al.*, 2011). Die Motive G4 und G5 hingegen sind spezifisch für G-Proteine (Bourne *et al.*, 1991). Sie tragen nicht nur, wie oben beschrieben zur Guanosinnukleotidaffinität bei, sondern sind auch wichtige Faktoren in der Diskriminierung zwischen Adenosin- und Guanosinnukleotiden: Die Interaktionen zwischen der Ala Hauptketten NH-Gruppe im G5 Motiv mit dem Guanin 6' Sauerstoff, sowie die zwei Wasserstoffbrücken zwischen der Aspartatseitenkette und der exozyklischen Aminogruppe des Guanins und dem Guanin 1' Stickstoff können mit Adenin nicht gebildet werden. Desweiteren konnte an Computermodellen gezeigt werden, dass sich die exozyklische Aminogruppe des Adenins mit der Hauptketten NH-Gruppe des Alanins im G5 Motiv überschneiden würde. Mit beiden Effekten, der fehlenden Interaktionen und der sterischen Hinderung, lässt sich die im Vergleich zu GTP um den Faktor  $10^7$  geringere Affinität von H-Ras zu ATP erklären (Rensland *et al.*, 1994).

#### 1.2.4 Die GTP Hydrolyse

Bereits 1988 wurde durch den Einsatz von  $\gamma$ -O<sup>16</sup>, -O<sup>17</sup>, -O<sup>18</sup> isotopenmarkierten GTP $\gamma$ S gezeigt, dass die H-Ras (p21) katalysierte Hydrolyse von GTP $\gamma$ S zu einer Inversion des Stereozentrums der freigesetzten isotopenmarkierten Thiophosphorsäure führt (Feuerstein *et al.*, 1988). Jeder enzymatische Phosphatgruppentransfer geht mit einer Inversion des Stereozentrums einher. Bei einem Mechanismus, der über eine Phosphoenzym-Zwischenstufe abläuft, käme es zu zwei Inversionen und die Stereochemie bliebe insgesamt nach der Hydrolyse unverändert. Der aus diesem Ergebnis gezogene Schluss, dass die Hydrolyse durch einen direkten Wassertransfer stattfindet, hat sich durch zahlreiche Kristallstrukturen bestätigt (Scheidig *et al.*, 1994, Scheffzek *et al.*, 1997, Scheidig *et al.*, 1999). Ein konserviertes Glutamin (Gln61 in H-Ras), das auf das DxxG Motiv folgt ist essentiell für die Hydrolyse, da es das nukleophile, angreifende Wasser in der Nähe des  $\gamma$ -Phosphats koordiniert (Frech *et al.*, 1994, Scheidig *et al.*, 1999). Tatsächlich führt eine Mutation dieses Glutamins zu einem Verlust der Hydrolyseaktivität in G-Proteinen und ist eine häufige Ursache G-Protein assoziierter Erkrankungen (Barbacid, M., 1987, Bos, J. L., 1989).

Der Mechanismus, der dem Angriff des Wassers zu Grunde liegt, ist noch unbekannt. Insbesondere die Frage, ob er über einen S<sub>N</sub>2 artigen, assoziativen Übergangszustand mit einem pentavalenten  $\gamma$ -Phosphat, oder einen dissoziativen Übergangszustand mit einem hochreaktiven Monometaphosphatanion PO<sub>3</sub><sup>2-</sup> abläuft, ist Gegenstand aktueller Diskussion (Wittinghofer, A., 2005)

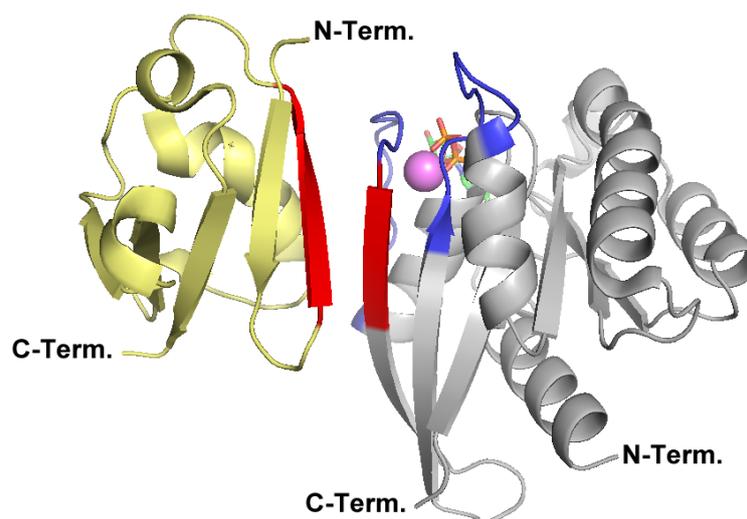
Wie in Kapitel 1.2.1 erwähnt, ist die Geschwindigkeit der intrinsischen GTP Hydrolyse sehr langsam, so dass für physiologische Prozesse GAPs zur Beschleunigung benötigt werden. Dabei weisen die GAPs für verschiedene Unterfamilien kleiner G-Proteine deutlich voneinander abweichende Sequenzen, Strukturen und Interaktionsmuster mit ihren jeweiligen Zielproteinen auf (Rittinger *et al.*, 1997-1, Bernards A., 2003, Vetter *et al.*, 2005). Ras- und Rho- GAPs verfügen über ein sogenanntes Argininfingermotiv (Rittinger *et al.*, 1997-1, Scheffzek *et al.*, 1997, Bernards A., 2003, Vetter *et al.*, 2005), das ein konserviertes Arg (Arg85 in RhoGAP) enthält. In Kristallstrukturen von RhoGAP mit RhoA im Komplex mit GDP und AlF<sub>4</sub><sup>-</sup> konnte gezeigt werden, wie Arg85 den durch GDP und AlF<sub>4</sub><sup>-</sup> simulierten Übergangszustand stabilisiert: Das Aluminiumion liegt als oktaedrischer Komplex vor, dabei bilden die vier Fluoridionen eine äquatoriale Ebene. Es bildet eine Linie mit einem Sauerstoff des  $\beta$ -Phosphats und des angreifenden Wassers. Die Seitenkette des Arg bildet Wasserstoffbrücken sowohl zu einem Fluoridion des AlF<sub>4</sub><sup>-</sup> als auch zu einem Sauerstoff des  $\beta$ -Phosphats aus. Dies ermöglicht es der Guanidinium Gruppe des Arg aufkommende negative Ladungen sowohl des  $\beta$ - $\gamma$  Brückensauerstoffes im Falle eines dissoziativen Mechanismus, als auch der äquatorialen Sauerstoffe in einem pentavalenten, assoziativen Über-

gangszustand zu stabilisieren. Die zweite wichtige Interaktion des Arg ist die Stabilisierung der RhoA Gln63 Seitenkette (Analog zu H-Ras Gln 61) mittels Interaktion des Hauptketten Carbonylsauerstoffs mit dem Gln63 Seitenketten Amidstickstoffs. Mit der Einschränkung der konformationellen Freiheit der Gln63 Seitenkette wird auch die Beweglichkeit des durch Gln63 koordinierten, angreifenden Wassers verringert und dieses so in einer Linie mit dem Aluminiumion und dem  $\beta$ -Phosphatsauerstoff gehalten (Rittinger *et al.* 1997-1). Die geschilderten Interaktionen des RhoGAP Arg85 mit RhoA sind dabei spezifisch für den simulierten Übergangszustand, und können für den RhoGAP-RhoA:GppNHp Komplex nicht beobachtet werden (Rittinger *et al.*, 1997-2). Die gleichen Interaktionsmuster konnten auch für andere GAPs mit Argininfingermotiv beobachtet werden, zum Beispiel für den RasGAP-p21:GDP /  $\text{AlF}_3$  Komplex (Scheffzek *et al.*, 1997, Bernards, A., 2003).

Die meisten bekannten GAPs für Rab Proteine enthalten eine TBC Kerndomäne. Benannt wurde sie nach dem humanen Onkogen Tre2 sowie den Hefeproteinen Bup2p und Cdc16, die allesamt über eine vergleichbare Kerndomäne verfügen (Neuwald, A. F., 1997, Bernards, A. 2003). Sie enthalten in einem konservierten IxxDxxR Motiv ein Arg analog zu dem Argininfingermotiv in Rho und Ras GAPs (Rak *et al.*, 2000). Zusätzlich verfügen sie in einem YxQ Motiv mit Gln über eine weitere konservierte Aminosäure, die direkt an der Hydrolyse beteiligt ist (Pan *et al.*, 2006). Im Komplex zwischen dem TBC-Domänen GAP Gyp1p und Rab33:GDP/ $\text{AlF}_3$  bildet das Arg aus dem IxxDxxR Motiv ähnliche Kontakte zu dem Übergangszustandsanalog wie von dem RhoGAP-RhoA Komplex bekannt: Die Guanidinium Gruppe des Arg bildet Wasserstoffbrücken zu je einem Fluoridion und einem Sauerstoff des  $\beta$ -Phosphats. Das Gln aus dem Rab33 DxxGQ Motiv bildet jedoch weder einen Kontakt zu einem der äquatorialen Fluoridionen noch zu dem angreifenden axialen Wasser. Stattdessen kontaktiert die Seitenkette des Gln das Peptidrückgrat des GAPs am YxQ Motivs: Sie bildet polare Interaktionen mit dem Hauptkettenstickstoff des Tyrosins und der Hauptkettencarbonylgruppe des Gln aus. Dies ermöglicht dem GAP Gln nun, ein äquatoriales Fluoridion zu koordinieren und das angreifende Wasser in axialer Position zum Aluminium zu stabilisieren. Das YxQ Motiv wird in Analogie zum Argininfinger auch als Glutamindaumen bezeichnet (Pan *et al.*, 2006). Durch diesen besonderen katalytischen Mechanismus ist es in hydrolysedefizienten Rab Mutanten ohne Gln nach dem DxxG Motiv möglich, durch Einsatz von TBC Domänen GAPs die Hydrolyseaktivität teilweise zu regenerieren, da das für die Hydrolyse notwendige Glutamin von dem GAP selbst gestellt wird (Pan *et al.*, 2006).

### 1.2.5 Effektorinteraktionen

Als Effektoren von G-Proteinen werden im Allgemeinen Proteine bezeichnet, die bevorzugt mit der GTP-gebundenen Form bestimmter G-Proteine interagieren (Hutagalung *et al.*, 2011, Vetter *et al.*, 2001). Durch die Bindung des Effektors wird dieser an dem zellulären Kompartiment des entsprechenden G-Proteins lokalisiert und/oder im Effektor eine strukturelle Änderung induziert, die zu seiner Aktivierung führt (McCormick *et al.*, 1996). Es gibt vielfältige Mechanismen, welche Effektoren befähigen sowohl zwischen dem aktiven und inaktiven Zustand sowie verschiedenen G-Proteinen zu diskriminieren. Die Effektoren einiger kleiner G-Protein Unterfamilien wie die Ras Effektoren weisen konservierte Bindedomänen für ihr jeweiliges Zielprotein auf und ihre Struktur wird durch die Bindung nur moderat beeinflusst (McCormick *et al.*, 1996, Herrmann, C., 2003). Viele der bekannten Ras bindenden Domänen (RBD) der Effektoren der Ras Unterfamilie weisen dieselben Sekundärstrukturelemente  $\beta\alpha\beta\beta\alpha\beta$  auf und nehmen damit eine Ubiquitin-Faltung an (Herrmann, C., 2003).

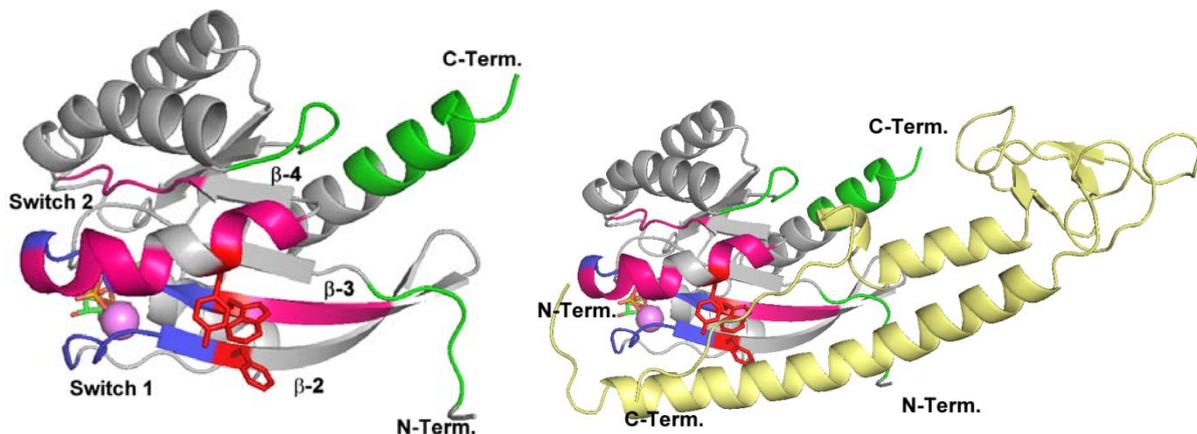


**Abb. 1.2.5.1:** Rap1A:GppNHp (grau) im Komplex mit der RBD Domäne von Raf (gelb). (Kristallstruktur: Nassar *et al.*, 1995). Das RBD  $\beta 2$  und das Rap1A  $\beta 2$  Faltblatt sind rot, die Switch Regionen blau markiert

Auch die Interaktionsmuster der verschiedenen RBD Domänen mit Ras Proteinen ähneln sich in den bisher gelösten Kristallstrukturen sehr: Grundlage der Effektorbindung ist die Interaktion des  $\beta 2$  der RBD mit dem  $\beta 2$  der G-Domäne. Das Resultat ist ein intermolekulares, antiparalleles  $\beta$ -Faltblatt, das im Wesentlichen durch ionische Seitenketten Interaktionen stabilisiert wird (Nassar *et al.*, 1995, Scheffzek *et al.*, 2001, Herrmann, C., 2003) (Abb. 1.2.5.1).

Im Kontrast dazu bilden andere Effektoren wie der Ran Effektor Importin  $\beta$  mit einem Großteil ihres Proteinkörpers Interaktionen mit ihrem Zielprotein aus und umgeben es wie eine Manschette, was einen deutlichen und globalen Einfluss auf die Struktur und Rigidität des Importin  $\beta$  hat (Vetter *et al.* 1999).

Mittels Sequenzvergleichen haben Jose B. Pereira-Leal und Miguel C. Seabra in Rab Proteinen fünf Regionen definiert, die spezifisch für diese Ras Unterfamilie sind und sie mit RabF1 bis RabF5 (*Rab family motif*) bezeichnet. RabF1 liegt in der mutmaßlichen Rab *Switch 1* Region (Schleife 2- $\beta$ 2), während die anderen vier Motive in der Umgebung des *Switch 2* zwischen den Faltblättern  $\beta$ 3 und  $\beta$ 4 gebündelt sind (Abb. 1.2.5.2 links) (Pereira *et al.*, 2000). In fast allen bekannten Kristallstrukturen von Rab Proteinen mit ihren Effektoren sind drei als hydrophobe Triade bezeichnete, konservierte Aminosäuren direkt an der Effektorbindung beteiligt: Phenylalanin und Tryptophan aus der *Interswitch* Region sowie ein Tyrosin aus *Switch 2* (F58, W75 und Y90 in Rab5) (Merithew *et al.*, 2000, Ostermeier *et al.*, 1999, Kukimoto *et al.*, 2008, Chavas, *et al.*, 2008).



**Abb. 1.2.5.2:**

**Links:** Rab3A:GppNHp. **Rechts:** Rab3A:GppNHp im Komplex mit Rabphilin3A. (Kristallstruktur: Ostermeier *et al.*, 1999). Rab3A ist grau, Rabphilin3A gelb dargestellt. Die *Switch* Regionen sind blau, die RabF Motive rosa, und die CDR Motive grün markiert, das RabF1 Motiv in der *Switch 1* Region ist nicht gesondert gekennzeichnet. Die Aminosäureseitenketten der hydrophoben Triade sind rot hervorgehoben.

Desweiteren existieren in Rab Proteinen vier gering konservierte Regionen, die jedoch innerhalb einer Rab Unterfamilie hohe Sequenzübereinstimmungen aufweisen können: RabSF1-RabSF4 (*Rab subfamily motif*) (Moore *et al.*, 1995). Dabei enthalten RabSF1, RabSF3 und RabSF4 die drei Rab CDRs (*Complementary determining region*), die eine essentielle Funktion in der Effektorerkennung haben (Ostermeier *et al.*, 1999, Pereira *et al.*, 2000, Kukimoto *et al.*, 2008, Chavas, *et al.*, 2008).

Die Kristallstruktur des Rab3A-Rabphilin3A Komplexes zeigt, dass die hydrophobe Triade neben der *Switch/Interswitch*-Region eine zentrale Position in der Interaktion mit dem Effektor einnimmt (Abb. 1.2.5.2 rechts). Die CDRs (RabSF1, RabSF3 und RabSF4) bilden eine weitere Interaktionsfläche mit der Rabphilin3A RBD (Rab bindende Domäne) in Form einer Bindetasche aus (Ostermeier *et al.*, 1999). Ähnliche Interaktionsmuster wie für Rab3A und Rabphilin3A, trotz deutlich verschiedener RBD der jeweiligen Effektoren, konnten für Rab27 und Rab7 festgestellt werden (Kukimoto *et al.*, 2008, Chavas, *et al.*, 2008, Wu *et al.*, 2005).

Nicht alle Rab-Effektor Interaktionen beinhalten jedoch die CDR. Die Rab5:Rabaptin5, Rab11:FIP2/FIP3, Rab6:GCC185 Interaktionen sowie die von Rab4 und Rab22 mit der Rabenosyn5 RBD finden in den Kristallstrukturen ausschließlich über die Switch / Interswitch Region sowie die hydrophobe Triade statt (Eathiraj *et al.*, 2005, Eathiraj *et al.*, 2006, Zhu, *et al.*, 2004, Burguete *et al.*, 2008).

Die Frage, welche Wechselwirkungen die Spezifität eines Rab Proteins zu seinen Effektoren bestimmen, ist nicht abschließend geklärt. Die hydrophobe Triade sowie die RabF Motive sind konserviert, gängige Modelle sehen die Selektivität daher in den CDR bzw RabSF Motiven (Ostermeier *et al.*, 1999, Huber, *et al.*, 2005) oder in der Sequenzvariabilität der Switch / Interswitch Region begründet (Eathiraj *et al.*, 2005, Kukimoto *et al.*, 2008).

Bei allen Unterschieden ist den bekannten Interaktionen zwischen kleinen G-Proteinen und ihren jeweiligen Effektoren gemein, dass sie grundsätzlich die *Switch 1*- und/oder die *Switch 2*-Region beinhalten, mutmaßlich als Determinante des G-Protein Zustands (Vetter *et al.*, 2001).

### 1.2.6 Steuerung kleiner G-Proteine: Darstellung konstitutiv aktiver/inaktiver Proteine

Die Funktionsweise von kleinen G-Proteinen als molekulare Schalter bedingt zwei Eigenschaften, denen bei der zellbiologischen Erforschung dieser Proteinklasse Rechnung getragen werden muss:

1.) Sie können in Abhängigkeit von ihrem gebundenen Nukleotid in zwei verschiedenen Aktivierungszuständen vorliegen. Jeder Zustand hat sein eigenes Set an regulatorischen Proteinen und Effektoren, mit denen das kleine G-Protein in Wechselwirkung treten kann. Abhängig vom jeweiligen kleinen G-Protein kann auch die Lokalisation in der Zelle vom Zustand abhängig sein.

2.) Durch Hydrolyse von GTP zu GDP sowie die Freisetzung und Rückbindung von Nukleotiden können kleine G-Proteine zwischen dem aktiven und inaktiven Zustand wechseln.

Die Erforschung kleiner G-Proteine bedarf also der Charakterisierung beider Aktivierungszustände. Dazu ist es erforderlich, gemachte Beobachtungen eindeutig dem aktiven oder dem inaktiven Zustand zuordnen zu können. Am einfachsten ist dies zu erreichen indem sichergestellt wird, dass das zu beobachtende kleine G-Protein nur in einem Zustand vorliegen kann. *In vitro* kann ein definierter Aktivierungszustand erzielt werden, indem die Beladung des kleinen G-Proteins durch das Medium und die in ihm enthaltenen Nukleotide vorgegeben wird. Dabei ist zu beachten, dass viele kleinen G-Proteine über intrinsische Hydrolyseaktivitäten verfügen (in der Größenordnung von  $\sim 10^{-4}$ - $10^{-5}$  s<sup>-1</sup> für Ras Proteine (Wittinghofer *et al.*, 2011)), die bei der Beobachtung aktiver kleiner G-Proteine experimentell nicht vernachlässigbar sind: Halbwertszeiten im Bereich von  $\sim 2$  h bedeuten bereits nach  $\sim 12$  min die Hydro-

lyse von 10 % des Nukleotides und damit eine signifikante Verfälschung der Ergebnisse. Die Lösung *in vitro* ist der Einsatz von nicht hydrolysierbaren GTP Analoga wie dem  $\beta,\gamma$ -Imidodiphosphat GppNHp oder der  $\beta,\gamma$ -Methyldiphosphonsäure GppCH<sub>2</sub>p (Abb1.2.6.1).



**Abb1.2.6.1:**

**Links:** Acrylguanosin 5´-( $\beta,\gamma$ -Imido)-Triphosphat (GppNHp)

**Rechts:** Acrylguanosin 5´-( $\beta,\gamma$ -Methylen)-Triphosphat (GppCH<sub>2</sub>p)

Beide GTP-Analoga enthalten anstelle des  $\beta,\gamma$ -Phosphatestersauerstoffes einen Substituenten, der für die Hydrolyse durch kleine G-Proteine nicht zugänglich ist. Dabei ähnelt die P-N-P Struktur im Imidodiphosphat in Bindungswinkel und Länge dem P-O-P Phosphatester: Die Bindungswinkel für P-N-P bzw. P-O-P betragen 127,2° und 128,6°, die Bindungslängen für eine P-N bzw. eine P-O Bindung 1,68 und 1,63 Å (Larsen *et al.*, 1969, Johnson *et al.*, 2003). Die Abweichungen von der Phosphatesterstruktur sind im Fall des Methyldiphosphonats größer: Der P-C-P Winkel ist ~10° flacher als der P-O-P Winkel, die Bindungslänge einer C-P Bindung ist ~0,21 Å länger als eine O-P Bindung (Engel, R., 1976, Larsen *et al.*, 1969). Die strukturellen Unterschiede von Imidodiphosphat und Methyldiphosphonat zu Pyrophosphat können zu veränderten Affinitäten der Zielproteine zu ihren derart modifizierten Nukleotiden führen, ungeachtet dessen resultiert ihre Bindung jedoch in der Aktivierung kleiner G-Proteine. Beide Substituenten werden daher erfolgreich als nicht hydrolysierbare Triphosphat-Analoga eingesetzt (Snyder *et al.*, 1979, Sydor *et al.*, 1998, Johnson *et al.*, 2003).

Im lebenden System ist es schwieriger, einen definierten Aktivierungszustand eines kleinen G-Proteins zu erreichen: Die zur Bindung verfügbaren Nukleotide werden *in vivo* durch die zelluläre Umgebung vorgegeben. Darüber hinaus wird der Aktivierungszustand durch die gegenwärtigen regulatorischen Proteine beeinflusst (Kap.1.2.1).

Da in zellulären Systemen keine manipulative Kontrolle des Mediums möglich ist, werden in den untersuchten Proteinen durch Mutationen Präferenzen für bestimmte Nukleotide oder Aktivierungszustände induziert. Häufig finden dazu in Ras die Mutationen S17N und Q61L Anwendung, welche das jeweilige Protein präferentiell im inaktiven bzw. aktiven Zustand halten (Feig *et al.*, 1988, Der *et al.*, 1986, Moodie *et al.*, 1995).

Ser17 ist über seine Seitenketten Hydroxylgruppe an der Koordination des Mg<sup>2+</sup> Ions beteiligt (Kap. 1.2.3). Substitution von Ser17 durch Asn verändert die Koordination des Magnesiums und führt eine sterisch anspruchsvolle Gruppe in die phosphatbindende Tasche ein. Dies

resultiert für Ras in einer um den Faktor ~25 herabgesetzten Affinität zu GTP (Feig, L. A., 1999, John *et al.*, 1993). Dieser Effekt ist bezüglich der Bindung von GDP schwächer ausgeprägt, so dass GDP mit einer ~20-fach höheren Affinität über GTP gebunden wird (Feig *et al.*, 1988, Farnsworth *et al.*, 1991, Feig, L. A., 1999). Der relativ geringe Unterschied der Affinitäten der S17N Mutante zu GDP bzw. GTP lässt die zellulären Nukleotidkonzentrationen zu einem wichtigen Faktor für den Aktivierungszustand der Mutante werden. Dabei sind die Nukleotidkonzentrationen in vielen Zellen Schwankungen unterworfen: In Hefezellen liegt das Verhältnis von GTP zu GDP in Abhängigkeit von dem Wachstumsstadium und Nahrungsangebot der Zellen zum Beispiel zwischen 4:1 und 1:1 (Rudoni *et al.*, 2000).

Die Aminosäure Gln61 hat eine essentielle Funktion in der Hydrolyse von GTP zu GDP (Kap. 1.2.4). Mutationen dieser Aminosäure führen zu einem Verlust der Hydrolysefähigkeit und sind als Katalysatoren der Entstehung verschiedener Krebsarten bekannt (Burman *et al.*, 2010). Die Q61L Mutante schaltet die Hydrolysefähigkeit von kleinen G-Proteinen nicht in jedem Fall vollständig aus. So ist die Hydrolyserate von Rab5 Q79L im Vergleich zum Rab5 Wildtyp zwar um den Faktor ~100 reduziert, nicht jedoch eliminiert (Stenmark *et al.*, 1994). Auch die Hydrolysefähigkeit von Rab7 Q67L wird nicht vollständig ausgeschaltet (unveröffentlichte Daten). Weiter erschwert wird die Verwendung der Q61L Mutante in Rab Proteinen *in vivo* durch den besonderen Katalysemechanismus der Rab TBC Domänen GAPs im Vergleich zu Ras und Rho GAPs (Kap. 1.2.4). TBC Domänen GAPs führen ein eigenes Glutamin in das aktive Zentrum von Rab Proteinen ein und können so das Fehlen des Rab eigenen Glutamins kompensieren und die GAP stimulierte Hydrolysefunktion wiederherstellen (Pan *et al.*, 2006).

Beide Mutanten führen in kleinen G-Proteinen also nur zu Präferenzen für einen bestimmten Zustand. Sie gewährleisten keine absolute Kontrolle über den Aktivierungszustand eines kleinen G-Proteins. Zusätzlich sind beide Mutationen in Regionen lokalisiert, die einen direkten Einfluss auf die Nukleotidbindung und Interaktion mit Proteinregulatoren und Effektoren haben. Veränderungen in diesen Regionen können schwer vorhersehbare Auswirkungen auf die Struktur des kleinen G-Proteins und damit auf die Wechselwirkungen mit seinen Interaktionspartnern haben.

Von der H-Ras S17N Mutante ist bekannt, dass sie einen inhibitorischen Effekt auf endogene Ras Aktivität hat (Powers *et al.*, 1989). Die Ursache dafür ist eine im Vergleich zu natürlichen Ras Proteinen erhöhte Affinität zu Ras GEFs und damit eine Verringerung des GEF-Pools, der zur Aktivierung von Ras Proteinen zur Verfügung steht (Feig, L. A., 1999, Shuliang *et al.*, 2004). Die erhöhte Affinität der S17N Mutante zu GEFs begründet sich zum einen mit der geringeren Affinität der Mutante zu Nukleotiden durch den sterisch anspruchsvolleren Asparaginrest und die veränderte Koordination des Magnesiumions in der phosphatbindenden Tasche. Diese erschwert die durch GDP/GTP induzierte Dissoziation des

Ras S17N:GEF Komplexes. Zum anderen weisen S17N Mutanten aber auch in nukleotidfreier Umgebung eine höhere Affinität zu GEFs auf als die jeweiligen Wildtypen (Lai *et al.*, 1993, Feig, L. A., 1999).

Obwohl die S17N Mutanten in der Lage sind GTP zu binden, konnte gezeigt werden, dass GTP gebundenes H-Ras S17N *in vitro* seinen *downstream* Effektor *adenylyl cyclase* nicht mehr aktivieren kann (Farnsworth *et al.*, 1991). Die veränderte Koordination von  $Mg^{2+}$  durch Asn17 wirkt sich hier auf die *Switch 1* Region aus, die im aktiven Zustand über Seitenkette von Thr35 ebenfalls einen direkten Kontakt zum Magnesium ausbildet (Feig, L. A., 1999).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass es gegenwärtig keine Möglichkeit zur eindeutigen manipulativen Kontrolle des Nukleotidzustandes von kleinen G-Proteinen *in vivo* gibt. Die gegenwärtig verwendeten Mutanten weisen nur eine Präferenz für einen Zustand auf, sind jedoch prinzipiell in der Lage sowohl GDP als auch GTP zu binden. Damit können sie auch den Wechsel zwischen den GDP bzw. GTP gebundenen Zuständen *in vivo* vollziehen. Die Mutationsstellen befinden sich in den G-Motiven und haben teilweise deutlich vom Wildtypen abweichende Interaktionsmuster mit ihren Proteinregulatoren und Effektoren.

Durch die Kombination chemischer und biologischer Methoden sollen diese Probleme gelöst werden: Ein mit einer Acrylgruppe modifiziertes Nukleotid soll mit einem durch Mutation in das Zielprotein eingeführtes Cystein zur Reaktion gebracht werden. Die resultierende kovalente Verbindung von Nukleotid und Protein würde eine Änderung des Aktivierungszustandes auch *in vivo* unterbinden. Damit soll es ermöglicht werden, den Aktivierungszustand des Zielproteins ohne Beeinflussung der effektor- und regulatorrelevanten Bindungsstrukturen festzulegen und so die Auswirkungen der Modifikation auf die Proteinstruktur und Funktion zu minimieren.

### 1.2.7 Kovalente Verbindung von Nukleotid und Protein: Die Michael-1,4-Addition

Ein wichtiges Kriterium für die Etablierung von Reaktionen an Proteinen ist aufgrund der Vielzahl an gegenwärtigen reaktiven Gruppen ihre Selektivität. Eine große Zahl von Reaktionen zur kovalenten Modifikation von Proteinen, die absolute Selektivität und Bioorthogonalität gewährleisten, sind heutzutage bekannt. Prominente Vertreter sind die Diels-Alder Reaktion (Reaktion zwischen einem konjugierten Dien und einem substituierten Alken (Diels *et al.*, 1929)), oder die Azid-Alkin Zykladdition (Cu(I) katalysierte Reaktion zwischen einem Alkin und einem Azid (Rostovtsev *et al.*, 2002)). Aber auch Reaktionen wie die Oxim-Ligation (Kondensation eines Oxyamins mit einem Keton oder Aldehyd) und viele weitere (Chen *et al.*, 2011), sind gut etabliert. Allen diesen Reaktionen ist jedoch gemein, dass im Vorfeld eine synthetische Gruppe mittels chemischer oder biochemischer Methoden in das Protein eingeführt werden muss. Um das zu vermeiden, wurde sich in dieser Arbeit für die Michael-1,4-Addition entschieden. Im Gegensatz zu den vorher genannten Reaktionen kann sie an der Seitenkette der natürlichen Aminosäure Cys stattfinden.

Als Michael-1,4-Addition, benannt nach dem amerikanischen Chemiker Arthur Michael (1853-1942), bezeichnet man die Additionsreaktion von einem Nukleophil mit einem aktivierten Alken oder Alkin unter Ausbildung einer Kohlenstoff-Kohlenstoff Bindung (Michael, A., 1887). Als Nukleophile, auch Michael-Donor genannt, wurden ursprünglich Enolate verwendet, heute sind jedoch eine Vielzahl funktioneller Gruppen mit geeigneter Nukleophilie für die Michael-1,4-Addition gebräuchlich. Reaktionen mit Nichtkohlenstoffnukleophilen wie Aminen, Thiolen oder Phosphinen werden als Michael-artige, oder allgemeiner als konjugierte Additionen bezeichnet (Abb.1.2.7.1) (Mather *et al.*, 2006).

**Abb.1.2.7.1:** Allgemeines Reaktionsschema einer konjugierten Addition.  
Nu: Nukleophil. EzG: Elektronen ziehende Gruppe.

Michael-Akzeptoren sind stets ungesättigte Verbindungen, die eine elektronenziehende Gruppe (EzG) haben, die Resonanz ermöglicht. Die EzG verringert die Elektronendichte des  $\beta$ -Kohlenstoffs der Alkenylgruppe und stabilisiert die negative Ladung im Übergangszustand. Es gibt eine Vielzahl geeigneter EzG, ihr Spektrum reicht von Ketonen, Aldehyden und Estern über Amide bis zu Nitroverbindungen, Cyaniden und Sulfonen. Dabei hat die Stärke des von der EzG induzierten negativen mesomeren Effekts einen entscheidenden Einfluss auf die Reaktivität des Michael-Akzeptors (Clayden *et al.*, 2000).

In der geplanten Modifikationsreaktion fungiert die Acrylgruppe des Acrylguanosin-nukleotides als Michael-Akzeptor, die Thiofunktion des durch Mutation in das kleine G-Protein eingeführten Cysteins als Michael-Donor (Abb., 1.2.7.2). Die Carbonylfunktion der Acrylgruppe induziert durch ihren negativen mesomeren Effekt im  $\beta$ -Kohlenstoff eine positive Partialladung. Die deprotonierte Thiolgruppe des Cysteins kann daher am  $\beta$ -Kohlenstoff als Nukleophil angreifen, die dabei übertragene negative Ladung wird durch Delokalisation zwischen dem  $\alpha$ -Kohlenstoff und der EzG Mesomerie-stabilisiert. Durch einen Protonentransfer auf den  $\alpha$ -Kohlenstoff wird schließlich das thermodynamisch begünstigte 1,4-Additionsprodukt gebildet (Clayden *et al.*, 2000).

**Abb.1.2.7.2:** Konjugierte Addition des Acrylrestes und einer Cystein Thiolgruppe.

$K_1$ : Dissoziationskonstante des Thiols

$k_2/k_{-2}$ : Geschwindigkeitskonstanten der Thioetherbildung/Dissoziation

Die Gleichgewichtskonstanten  $K_1$  und  $K_2$  hängen von der Basizität der Umgebung sowie der EzG ab: Die Gegenwart starker Basen verlagert das Gleichgewicht  $K_1$  auf die Seite des deprotonierten Nukleophils. Eine geringe Elektronendichte am Carbonylkohlenstoff vergrößert die Elektrophilie des  $\beta$ -Kohlenstoffs und begünstigt so die Bildung des Übergangszustandes im Gleichgewicht  $K_2$  (Mather *et al.*, 2006). Dieser Effekt kann durch den Einsatz von Lewis Säuren wie  $AlCl_3$  und  $ZnCl_2$  vergrößert werden: durch Ausbildung koordinativer Bindungen zur Carbonylgruppe verringern sie die Elektronendichte am Carbonylkohlenstoff (Hauser *et al.*, 1940).

Durch den Einsatz geeigneter Basen und geschickte Wahl der EzG kann also die Selektivität der konjugierten Addition für bestimmte Nukleophile eingestellt werden. Zusätzlich gibt es unter biokompatiblen Bedingungen in Proteinen mit Thiolen nur eine Gruppe gut geeigneter Nukleophile: Da die Partialladung am  $\beta$ -Kohlenstoff der meisten Michael-Akzeptoren nur gering ausgeprägt ist, genügt die elektrostatische Anziehung zwischen den Reaktanden als treibende Kraft der Additionsreaktion nicht. Wichtig ist eine größtmögliche Überlappung des höchsten besetzten Orbitals (HOMO) des Donors mit dem niedrigsten unbesetzten Orbital (LUMO) des Akzeptors. Reaktionen, die nicht elektrostatisch, sondern durch Orbitalüberlappung angetrieben werden, bevorzugen voluminöse, gut polarisierbare Nukleophile wie Phosphane, Iodide, Thiolate und in deutlich geringerem Maße Amine und Carbanionen, während Alkohole nur schwer und Carbonsäuren und Amide effektiv nicht zur Reaktion zu bringen sind (Clayden *et al.*, 2000).

Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der konjugierten Addition ist der nukleophile Angriff auf den  $\beta$ -Kohlenstoff des Michael-Akzeptors (Abb.1.2.7.2, Gleichgewicht  $K_2$ ) (Mather *et al.*, 2006): Die Reaktion 2. Ordnung ist abhängig von der Konzentration beider Reaktanden. Die Thiolatkonzentration kann über den pH-Wert geregelt werden, während die Acrylylkonzentration durch die Nukleotidbindung in der G-Domäne im Radius der Linkerlänge lokal erhöht ist. Mittels dieser Konzentrationskontrolle soll die Selektivität auch zwischen verschiedenen Cysteinen gewährleistet und eine Mehrfachmodifikation z. B. an den gut zugänglichen C-terminalen Cys von Rab Proteinen vermieden werden.

Der entscheidende Vorteil der konjugierten Addition gegenüber den bioorthogonalen Methoden ist, dass keine synthetische Gruppe in das Protein eingeführt werden muss. Es ist die Kombination aus der gut regulierbaren Reaktivität des Michael-Akzeptor-Donor Paares und die Möglichkeit, eine natürliche Aminosäure als Nukleophil verwenden zu können, die die konjugierte Addition zu einem nützlichen Werkzeug selektiver Proteinmodifikation macht.

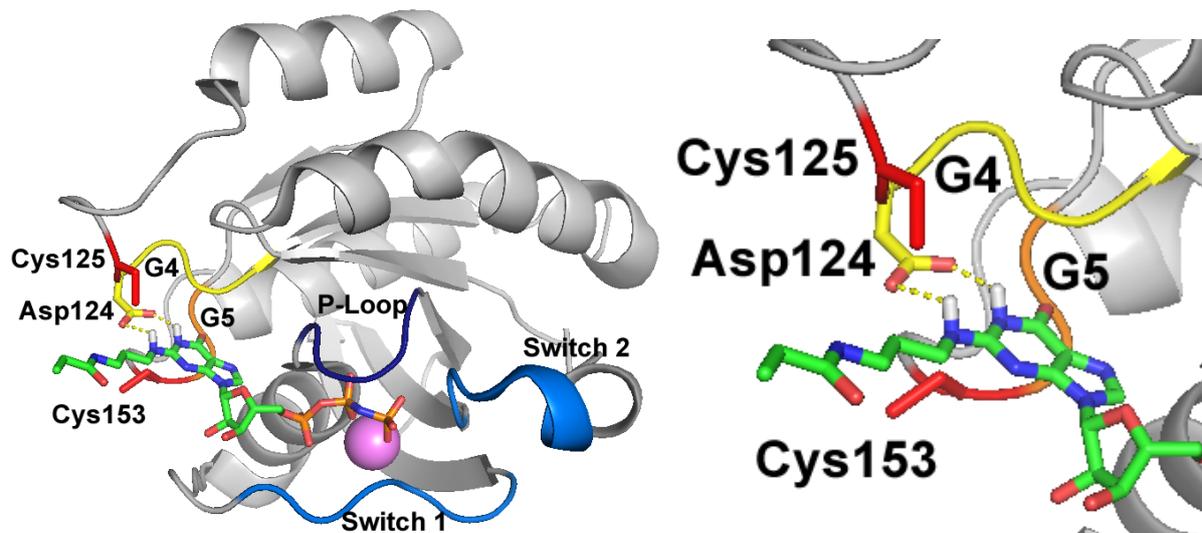
### 1.2.8 Acrylguanosin und Rab1b als Akzeptor-Donor Paar

**Abb. 1.2.8.1:** 9-( $\beta$ -D-Ribofuranosyl)-((6-oxo-6,9-dihydro-1*H*-purin-2-ylamino)propyl)acrylamid, nachfolgend „Acrylguanosin“ genannt.

In Abb.1.2.8.1 ist Acrylguanosin als Vorstufe der Nukleotide zu sehen, die in dieser Arbeit zur Modifikation von kleinen G-Proteinen eingesetzt werden sollen. Das Guanosin ist an seiner Purin 2-Position als Amin mit einem 1,3-Diaminopropyllinker modifiziert. Die funktionelle Gruppe für die konjugierte Addition ist ein als Amid gebundener Acrylrest.

Die kovalente Modifikation kleiner G-Proteine mit Acrylguanosinnukleotiden erfordert die Gegenwart von Cys im kleinen G-Protein (Kap.1.2.7). Die Seitenkette des Cys muss sterisch zugänglich sein und in einer Entfernung zur Purin 2-Aminogruppe des gebundenen Nukleotides liegen, die die Länge des Linkers mit der Acrylgruppe nicht überschreiten, aber auch nicht wesentlich geringer sein darf. Nur so kann durch die Bindung des Nukleotides eine lokal erhöhte Acrylylkonzentration an der gewünschten Cysteinseitenkette generiert und die Selektivität gegenüber anderen Cys im kleinen G-Protein gesteuert werden (Kap. 1.2.7).

Als aussichtsreiche Positionen für die Einführung von Cys wurden Leu an Position 125 und Lys an Position 153 in Rab1b gewählt (Abb. 1.2.8.2).



**Abb. 1.2.8.2: Links:** Rab1b im Komplex mit GppNHp (Kristallstruktur: Müller *et al.*, 2010). Die Struktur wurde mit PyMOL modifiziert: Die Aminosäuren Leu125 und Lys153 (rot) wurden durch Cysteine ersetzt, dabei wurde die Orientierung der Seitenketten beibehalten. An die Purin 2-Aminogruppe wurde der Propyllinker mit der Acrylamidfunktion modelliert. Die Konformation des Linkers wurde so gewählt, dass der Abstand des Acrylyl  $\beta$ -Kohlenstoffs zur Purin 2-Aminogruppe maximal ist.

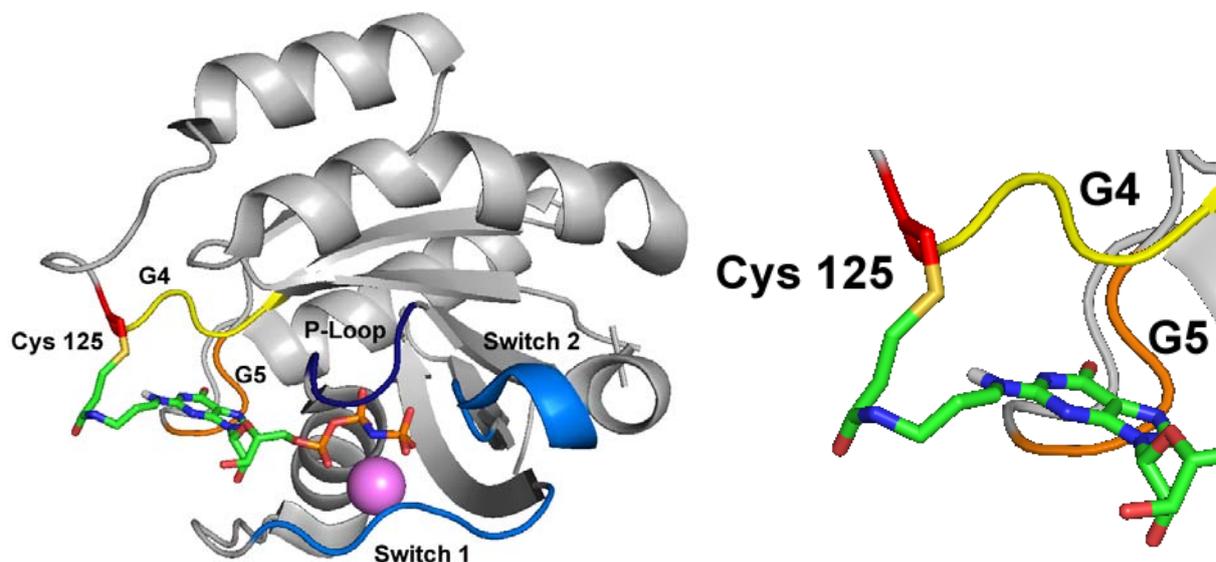
**Rechts:** Vergrößerter Ausschnitt der Region um beide Mutationsstellen. Trotz Modifikation der Purin 2-Aminogruppe mit dem Propyllinker ist die für die Nukleobasenerkennung wichtige Wasserstoffbrückenbindung zwischen Asp124 und der Purin 2-Aminogruppe theoretisch weiter möglich.

Leu125 ist nicht an der Nukleotidbindung beteiligt und kein Bestandteil eines konservierten Motivs in Rab Proteinen. Lys153 hingegen ist Teil des G5 SAK Motivs (Bourne *et al.*, 1991, Rensland *et al.*, 1995), welches Anteil an der Diskriminierung zwischen Adenin- und Guanin-nukleotiden hat sowie an der Nukleotidbindung beteiligt ist (Kap. 1.2.3) (Rensland *et al.*, 1994). Keine der beiden Aminosäuren ist Bestandteil eines RabF Motivs oder einer CDR, die Mutationen an diesen Stellen sollten daher keinen Einfluss auf Interaktionen mit Effektoren haben (Kap. 1.2.5). Die Entfernungen der Schwefelatome von Cys125 und Cys153 zu dem Stickstoff der Purin 2-Aminogruppe wurde mittels PyMol anhand der Kristallstruktur in Abb. 1.2.8.2 ermittelt. Der Abstand beträgt 3,6 Å für Cys125 und 4,7 Å für Cys153. Diese Abstände gelten für den Fall, dass die Cysteinseitenketten dieselbe Konformation annehmen wie die Seitenketten der Aminosäuren Leu125 und Lys153 in der Kristallstruktur. Die tatsächlichen Orientierungen der Cysteinseitenketten sind jedoch nicht bekannt, ebenso der Einfluss der Mutationen auf die Struktur der Schleifen  $\alpha$ 4- $\beta$ 5 (Cys125) und  $\alpha$ 5- $\beta$ 6 (Cys153).

Der Linker am Acrylguanosin wurde unter Berücksichtigung der Tatsache konzipiert, dass die realen Abstände zwischen den Cys Thiolen und der Purin 2-Position größer sein können als 3,6 bzw. 4,7 Å. Er hat von dem Stickstoff der Purin 2-Aminogruppe zum  $\beta$ -Kohlenstoff des Acrylylrests eine Länge von 8,7 Å. Als Modifikationsstelle zur Einführung des Linkers am Guanosin wurde die Purin 2-Position gewählt.

Eine denkbare Alternative wären die 2' bzw. 3' Positionen der Ribose gewesen, da sie keinerlei Proteinkontakte haben. Die Vorteile der Purin 2-Position liegen zum einen in der räumlichen Nähe zu den geplanten Mutationsstellen im Rab1b, zum anderen in der Chemie begründet: die 2', 3' Hydroxylgruppen sind sich chemisch sehr ähnlich, Substitutionsreaktionen resultieren in Gemischen aus 2' und 3' modifizierten Nukleosiden.

Die Purin 2-Aminogruppe bildet über eines seiner Wasserstoffe neben dem Wasserstoff des Purin 1-Stickstoffs des Guanins eine Wasserstoffbrückenbindung zum Asp124 (Asp119 in H-Ras) des G4 NKxD Motivs aus (Pai *et al.*, 1990). Durch Verknüpfung des Propyl-Linkers mit dem Guanin über ein sekundäres Amin (Abb. 1.2.8.2, rechts) bleibt jedoch ein Proton der Aminogruppe erhalten, so dass die Wasserstoffbrückenbindung zum Asp119 theoretisch weiter möglich ist.



**Abb. 1.2.8.3: Links:** Rab1b im Komplex mit GppNHp (Kristallstruktur: Müller *et al.*, 2010). Die Struktur wurde mit PyMOL modifiziert: Die Aminosäure Leu 125 wurde durch Cystein ersetzt und kovalent mit dem Acrylnukleotid verknüpft. Die Struktur wurde mit dem *molecular sculpting* Algorithmus von PyMOL simuliert.

**Rechts:** Vergrößerter Ausschnitt der Region um die Cys 125 Mutationsstelle.

Abb. 1.2.8.3 stellt eine mit Hilfe von PyMOL erstellte Simulation der kovalenten Bindung von AcrylGppNHp an das Cys125 der Rab1b L125C Mutante dar.

### 1.3 Zielsetzung

Im Rahmen dieser Arbeit sollen die Acrylguanosinnukleotide AGMP, AGDP, AGTP sowie das nicht hydrolysierbare AGTP Analog AGppCH<sub>2</sub>p synthetisiert werden. Am Beispiel von Rab Proteinen soll untersucht werden, ob durch kovalente Bindung dieser Nukleotide an ein kleines G-Protein dessen Aktivierungszustand quantitativ und irreversibel definiert werden kann. Die Charakterisierung der Interaktionen des modifizierten kleinen G-Proteins mit seinen Regulatoren und Effektoren *in vitro* soll im Vergleich zum Wildtypprotein Aufschluss über den Einfluss der kovalenten Modifikation auf die Eigenschaften des kleinen G-Proteins geben. Ziel ist es schließlich zu prüfen, ob das kovalent modifizierte Protein auch *in vivo* auf natürliche Weise in Abhängigkeit von dem gebundenen Nukleotid mit seinen Interaktionspartnern in Wechselwirkung tritt.

Im Hinblick auf die zellbiologischen Experimente wurden Rab-Proteine als Modellsystem ausgewählt. Ihre Lokalisation in der Zelle ist abhängig vom gebundenen Nukleotid, und nur prenylierte Rab-Proteine können membranassoziiert vorliegen. Die Beobachtung der Lokalisation eines Rab-Proteins kann Rückschlüsse über eine C-terminale Prenylierung erlauben. Damit steht ein einfacher Nachweis der C-terminalen Modifikation mit Prenylgruppen durch zelluläre Proteine/Enzyme zur Verfügung.

Mit Rab1b steht für diese Arbeit ein biochemisch bereits ausgezeichnet charakterisiertes Protein zur Verfügung: Rab1b reguliert den vesikulären Transport zwischen dem Endoplasmatischen Retikulum und dem Golgi Apparat (Plutner *et al.*, 1991). Die Kristallstruktur wurde unter anderem im Komplex mit der GEF Domäne des *Legionella pneumophila* Proteins DrrA gelöst (Schoebel *et al.*, 2009). Darüber hinaus sind die Mechanismen und beteiligten Proteine der posttranslationalen Prenylierung von Rab1b bekannt (Wu *et al.*, 2009) sowie mindestens ein Vertreter aus jeder Gruppe essentieller Interaktionspartner (GDI, GEF, GAP, Effektoren) (Machner *et al.*, 2007, Pfeffer *et al.*, 1995, Sklan *et al.*, 2007, Fischer *et al.*, 2005, Hyvola *et al.*, 2006).

Am Beispiel von Rab1b soll in dieser Arbeit untersucht werden, ob die kovalente Modifikation von kleinen G-Proteinen mit Acrylguanosinnukleotiden geeignet ist, den Aktivierungszustand eines kleinen G-Proteins irreversibel zu definieren, ohne die Proteinfunktionalität zu beeinträchtigen. Die Mikroinjektion von kovalent nukleotidgebundenem eGFP-Rab1b in HeLa Zellen soll schließlich Aufschluss geben, ob das Konzept der kovalenten Nukleotidbindung auch in zellbiologischen Experimenten anwendbar ist.

Das Ziel ist es, mit diesen Daten den Grundstein zu legen für eine neue Methode zur Manipulation von kleinen G-Proteinen, die nicht auf Mutationen im aktiven Zentrum der Proteine angewiesen ist und so die natürlichen Proteineigenschaften weitestgehend erhält.

## 2 Synthese des Acrylguanosins

In diesem Kapitel sollen die einzelnen Syntheseschritte dargestellt werden, die zum Acrylguanosin als Ausgangsstoff für nachfolgende Phosphorylierungen geführt haben. Die Reaktionskontrollen werden hier nur als HPLC Chromatogramme dargestellt. Die Beschreibung der Durchführung der Umkehrphasen HPLC und anderer Analysemethoden findet sich im Kap. 7 „Material und Methoden“.  $^1\text{H}$ -NMR und  $^{13}\text{C}$ -NMR Spektren sowie die Ergebnisse von HR-ESI-MS werden unter den systematischen Namen der einzelnen Zwischenstufen und Produkte im Kap. 4 „Analytik“ angegeben.

### **Abb. 2.1:** Retrosyntheschema

Schlüsselreaktion der im Retrosyntheschema (Abb. 2.1) dargestellten Synthesestrategie ist eine modifizierte Form der Sandmeyer-Reaktion zur Substitution von aromatischen Aminen durch Brom, Chlor oder Cyan (Sandmeyer, T., 1884). In der durch Kupfer katalysierten Sandmeyer-Reaktion zwischen einem aromatischen Amin, einem Nitritsalz und Chlor- oder Bromwasserstoff greift das Amin als Nukleophil ein Nitrosylkation an. Durch Wasserabspaltung entsteht aus dem in der Addition entstandenen Nitrosamin ein Diazoniumkation. Reduktion durch Cu (I) führt zum Zerfall in elementarem Stickstoff und die eigentliche reaktive Spezies: ein Arylradikal, welches nun mit dem Halogen in einer radikalischen Addition reagiert (Kochi, J. K., 1957).

Die hier verwendete modifizierte Reaktion wurde von J. I. G. Cadogan *et al.* beschrieben und ermöglicht die Substitution auch von heterozyklischen Aminen durch Brom ohne die Gegenwart von Kupfer (Abb. 2.2).

**Abb. 2.2:** Substitution der Purin C2 Aminogruppe durch Brom

Als Nitrosylquelle wird Isoamylnitrit anstelle eines Nitritsalzes verwendet und Bromoform anstelle von Bromwasserstoff oder einem Bromsalz. Die Zugabe von katalytischen Mengen Cu (I) ist nicht notwendig, das Reduktionspotential von Brom ist ausreichend, um das Diazoniumkation zu reduzieren (Cadogan *et al.*, 1966, Luo *et al.* 2009).

Als Ausgangssubstanz wird 2,3,5-Triacetylguanosin verwendet. Die Acetylgruppen dienen nicht als Schutzgruppen, sondern sind ausschließlich Löslichkeitsvermittler während der Bromierung der Purin C2-Position.

Die aktivierte Purin C2-Position wird in einer nukleophilen Substitution mit dem zwei terminale Aminogruppen tragenden Linker, (*tert*-Butyl-3-Aminopropylcarbamate) zur Reaktion gebracht. Um die Verknüpfung zweier Nucleoside über einen Linker zu verhindern, ist eine Aminogruppe mittels einer *tert*-Butoxycarbonyl Gruppe (Boc) geschützt.

Die Boc-Schutzgruppe wird sauer in Gegenwart von Trifluoressigsäure (TFA) abgespalten, die Acetyl-Schutzgruppen basisch durch Ammoniak in Methanol.

Die terminale Aminogruppe des Linkers kann nun selektiv mit dem N-Hydroxysuccinimid-Ester (NHS-Ester) der Acrylsäure zur Reaktion gebracht werden.

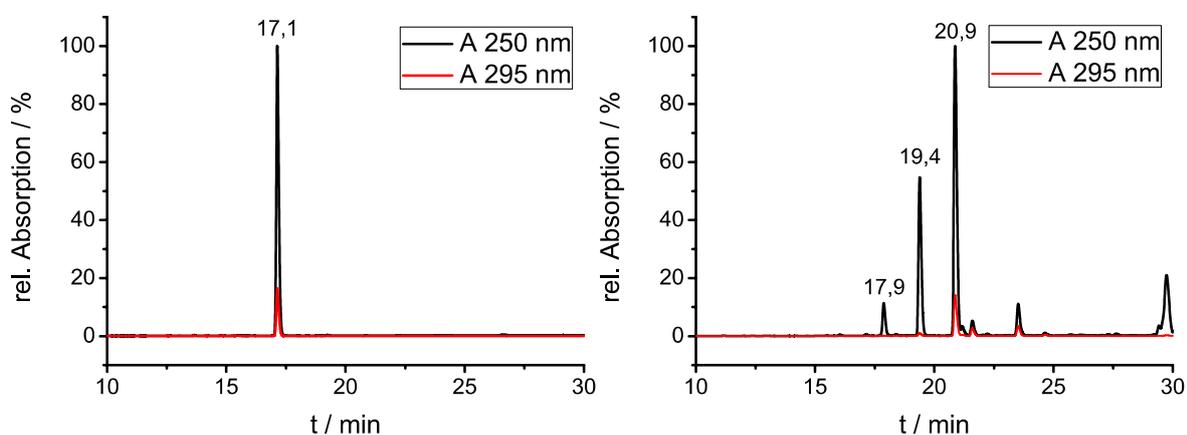
## 2.1 Durchführung

### 2.1.1 Aktivierung der Purin C2-Position

In dieser Reaktion soll die Purin C2-Position mittels Sandmeyer Reaktion als Bromverbindung aktiviert und so für nukleophile Substitutionsreaktionen zugänglich gemacht werden.

**Abb. 2.1.1.1:** Reaktionsschema der Purin C2 Bromierung.

In einem Zweihalskolben mit Rückflusskühler wurden 50 g (122 mmol) 2,3,5-Triacetylguanosen in einer Mischung aus 420 mL (4,88 mol) Bromoform und 206 mL (1,55 mol) Isoamylnitrit vollständig gelöst. Die Lösung wurde unter Lichtausschluss für 2 h bei 90 °C gerührt. Bereits nach wenigen Minuten färbte sich die Reaktionslösung tiefbraun. Der Reaktionsfortschritt wurde mittels Umkehrphasen HPLC beobachtet (Abb. 2.1.1.2).



**Abb. 2.1.1.2:** Umkehrphasen HPLC (C18) Chromatogramme. Links: Edukt. Rechts: Reaktion nach 90 min.

Nach 2 h war die Reaktion abgeschlossen, und die Lösung wurde auf Raumtemperatur (RT) abgekühlt. Das Lösungsmittel wurde mittels Hochvakuum entfernt. Es blieb eine dunkelbraune, zähflüssige Masse zurück.

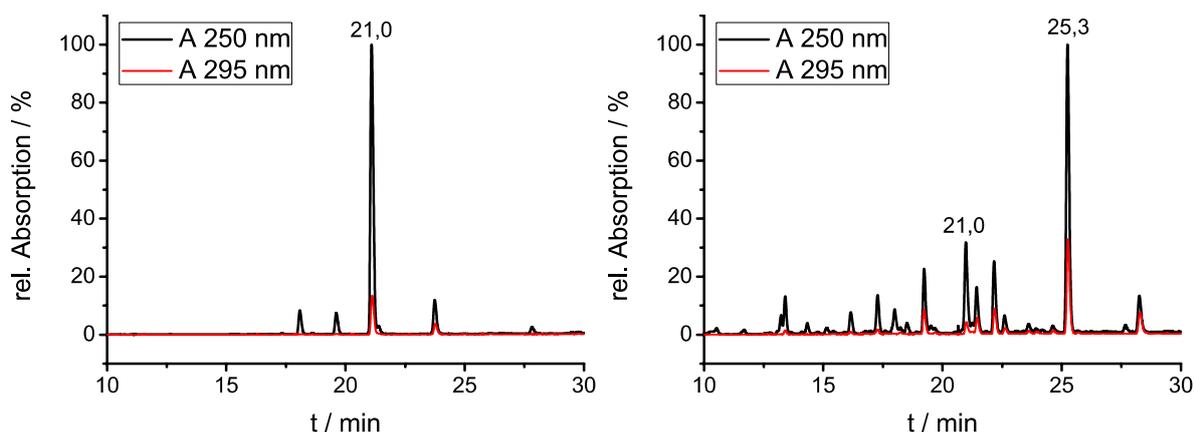
Das Rohprodukt wurde an 4,5 L Silikagel mit einem Ethylacetat-Methanolgemisch (19:1) bei einem Fluss von ~40 mL/min (~1,5 bar) aufgereinigt, um 35,8 g (76 mmol) des gewünschten Produktes in Form eines orangegelben Pulvers zu erhalten. Dies entspricht einer Ausbeute von 62 % nach Reinigung.

## 2.1.2 Einführung des Aminopropyllinkers an der Purin C2-Position

Mittels nukleophiler Substitution soll der Aminopropyllinker an der Purin C2-Position über ein sekundäres Amin in das Nukleosid eingeführt werden

**Abb. 2.1.2.1:** Reaktionsschema der Einführung des Aminopropyllinkers an der Purin C2-Position durch nukleophile Substitution.

In einem Zweihalskolben mit Rückflusskühler wurden 4 g Edukt (8,47 mmol) in 65 mL 2-Methoxyethanol vollständig gelöst. Die Lösung wurde auf 105 °C erhitzt und über einen Zeitraum von 2 h in Intervallen von 10 Minuten insgesamt 2,5 mL *tert*-Butyl-3-Aminopropylcarbammat (14,39 mmol) zugetropft. Die ursprünglich orangefarbene Lösung färbte sich während der Zugabe des *tert*-Butyl-3-Aminopropylcarbamats zunehmend braun. Nach vollständiger Zugabe des Reagenz wurde die Temperatur unter Rühren für weitere 3 h gehalten. Der Reaktionsfortschritt wurde mittels Umkehrphasen HPLC beobachtet (Abb. 2.1.2.2).



**Abb. 2.1.2.2:** Umkehrphasen HPLC (C18) Chromatogramme. Links: Edukt. Rechts: Reaktion nach 240 min.

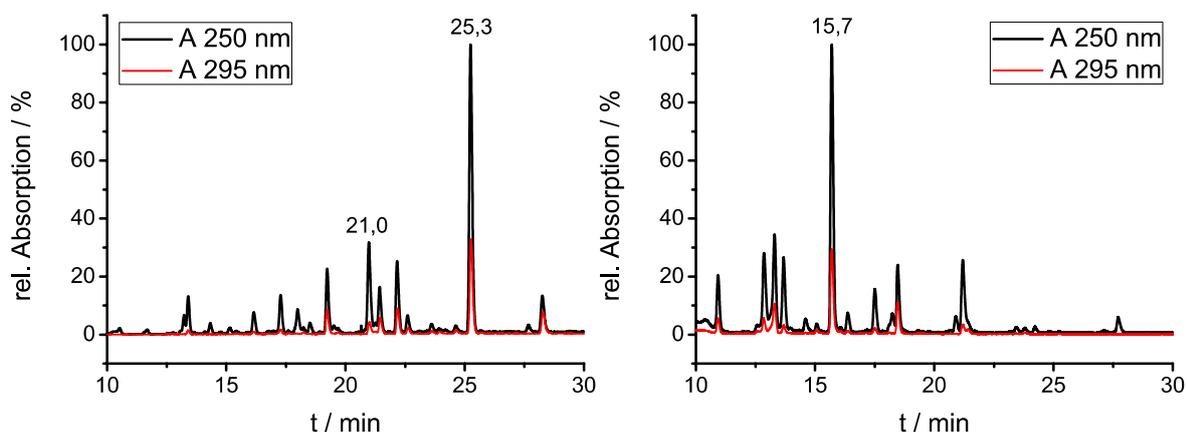
Nach 240 min war kein weiterer Reaktionsfortschritt zu beobachten. Die Reaktionslösung wurde nach 290 min auf RT abgekühlt und das Lösungsmittel am Vakuum vollständig entfernt. Der zähflüssige, braune Rückstand wurde in 200 mL H<sub>2</sub>O/MeCN (7:3) aufgenommen und lyophilisiert. Es wurden 4,9 g des Rohprodukts als braunes Pulver erhalten. Das Rohprodukt wurde nicht weiter aufgearbeitet.

### 2.1.3 Schutzgruppenabspaltung

Durch die Abspaltung der Aminoschutzgruppe (Boc) wird das Nukleosid für die Funktionalisierung als Acrylamid präpariert. Die Abspaltung der Acetylschutzgruppen vor Einführung der Acrylgruppe ist notwendig, da Acrylamid gegenüber gängigen Reagenzien zur Acetylabspaltung nicht inert ist (Greene *et al.* 1999, Clayden *et al.* 2000).

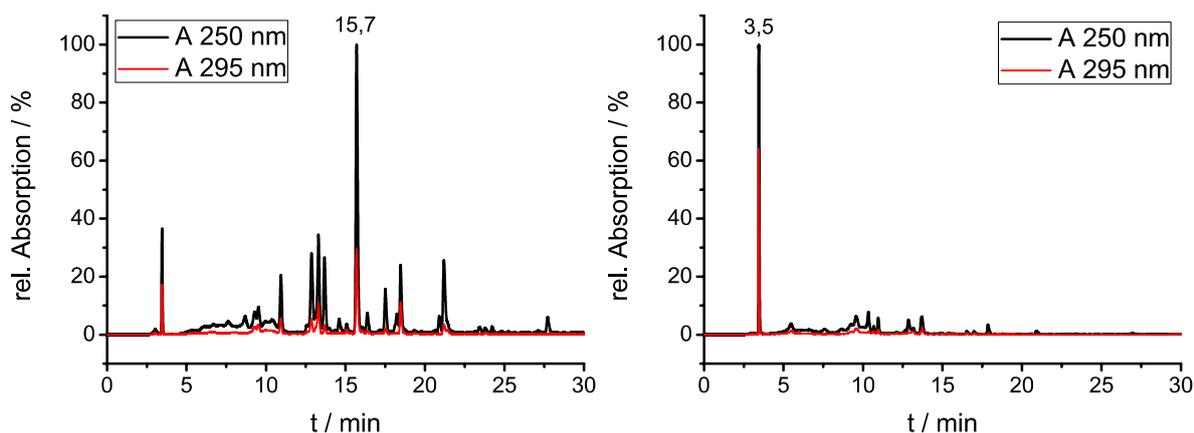
**Abb. 2.1.3.1:** Reaktionsschema der Schutzgruppenabspaltungen.

Zur Abspaltung der Boc-Schutzgruppe wurden 4,9 g des Rohprodukts aus 2.1.2 in 120 mL DCM mit 13,7 % (v/v) TFA und 0,6 % (v/v) H<sub>2</sub>O vollständig gelöst. Die Lösung wurde für 7,5 h bei 33 °C gerührt. Der Fortschritt der Abspaltung wurde mittels Umkehrphasen HPLC beobachtet (Abb. 2.1.3.2).



**Abb. 2.1.3.2:** Umkehrphasen HPLC Chromatogramme. Links: Edukt. Rechts: Boc-Abspaltung nach 345 min.

Die Boc-Schutzgruppenabspaltung war nach 345 min abgeschlossen. Das Lösungsmittel wurde am Hochvakuum vollständig entfernt. Der braune Rückstand wurde in 60 mL einer 7 M NH<sub>3</sub> Lösung in Methanol vollständig gelöst und 6 h bei Raumtemperatur gerührt. Der Fortschritt der Acetylgruppenabspaltung wurde mittels Umkehrphasen HPLC beobachtet (Abb. 2.1.3.3). Das Lösungsmittel wurde am Hochvakuum entfernt.



**Abb. 2.1.3.3:** Umkehrphasen HPLC (C18) Chromatogramme. Links: Edukt. Rechts: Acetylgruppenabspaltung nach 225 min.

Die Reinigung erfolgte an 120 mL Silikagel mit einem Fluss von  $\sim 5$  mL/min. Verunreinigungen wurden mit MeCN/H<sub>2</sub>O 9:1 ausgewaschen, das Produkt wurde mit MeCN/H<sub>2</sub>O 3:1 von dem Säulenmaterial eluiert. Erhalten wurden 1,96 g (5,76 mmol) des Produkts als schwach gelbes Pulver. Das entspricht einer Ausbeute nach Reinigung von 68 % für die Einführung des Aminopropyllinkers und beide Schutzgruppenabspaltungen.

#### 2.1.4 Acrylfunktionalisierung des Linkers

Die Aktivierung der Acrylsäure als NHS-Ester erlaubt die selektive Einführung der Acrylgruppe an Aminen gegenüber primären und sekundären Alkoholen.

**Abb. 2.1.4.1:** Reaktionsschema der Acrylfunktionalisierung des Aminopropyllinkers.

In einem 100 mL Zweihalskolben wurden unter Argonatmosphäre 1 g (2,94 mmol) Edukt in 40 mL trockenem Methanol vorgelegt. Das Edukt geht nicht vollständig in Lösung über. Es wurden 611  $\mu$ L (4,41 mmol) über Phosphorpentoxid getrocknetes und frisch destilliertes Triethylamin zugegeben. Nach Zugabe von 647 mg (3,82 mmol) Acrylsäure-N-Hydroxysuccinimidester wurde die Suspension 18 h bei RT gerührt.

Weder das Edukt noch das Produkt erfahren während einer HPLC auf C18 funktionalisierten Kieselgelsäulen eine signifikante Retention. Die Reaktionskontrolle fand daher mittels Dünnschichtchromatographie auf Kieselgelplatten mit einem Laufmittelgemisch aus MeCN und H<sub>2</sub>O im Verhältnis 9:1 statt.

Nach 18 h wurde das Lösungsmittel am Hochvakuum entfernt. Der blass gelbe Rückstand wurde an 300 mL Silikagel mit MeCN/H<sub>2</sub>O 9:1 und 0,1 % TFA bei einem Fluss von ~10 mL/min aufgereinigt. Es wurden 368,1 mg (915 µmol) des Produkts in Form eines weißen Pulvers erhalten. Das entspricht einer Ausbeute nach Reinigung von 31 %.

### 3 Phosphorylierung der Ribose 5´ Hydroxylgruppe

**Abb. 3.1:** Retrosyntheschema der Phosphorylierung nach Ludwigs (B) und mittels Michelson Anionenaustausch (A)

Um das Acrylguanosin an der 5´-Hydroxylgruppe zu phosphorylieren wurden zwei verschiedene Verfahren angewandt. Das 5´-Triphosphat **B** wurde wie von Ludwig (Ludwig, 1981) beschrieben über den direkten Umsatz von Pyrophosphat mit dem 5´-Phosphoroxydichloridester des Nukleosides dargestellt. Für die Darstellung des 5´-(β,y-Methylen)-Triphosphats **A** wurde das 5´-Monophosphat als dreifach verestertes Pyrophosphat aktiviert und durch einen Anionenaustausch mit Methylendiphosphonat das Produkt gebildet (Michelson, 1964).

Beide Synthesen gehen vom ungeschützten Acrylguanosin aus. Die erste Phosphorylierung wird mit Phosphoroxyltrichlorid (POCl<sub>3</sub>) als Reagenz durchgeführt. Phosphorchloride reagieren mäßig mit Alkoholen. Abhängig vom Alkohol und Lösungsmittel werden entweder Phosphatester und HCl oder Phosphate und Chloralkane gebildet. Dabei zeigen primäre Alkohole eine größere Tendenz zur Bildung von Phosphatestern als sekundäre oder tertiäre (Yoshikawa *et al.*, 1969). Durch Verwendung von Trimethylphosphat (TMP) als Lösungsmit-

tel kann mit moderaten Mengen  $\text{POCl}_3$  eine selektive Phosphorylierung der 5'-Hydroxylgruppe von ungeschützten Nukleosiden erreicht werden (Yoshikawa *et al.*, 1969).

**A:** Die Synthese von Triphosphaten nach Ludwig sieht die direkte Umsetzung des 5'-Phosphoroxydichloridesters mit Pyrophosphat vor. Um die Reaktion zu beschleunigen und die Ausbeute zu erhöhen, wird dem Lösungsmittelgemisch *N,N*-Dimethylformid (DMF) als Katalysator zugegeben. Formamide bilden mit Phosphorchloriden hochreaktive Imidoylphosphate (Abb. 3.2, oben), die mit einer Vielzahl von funktionellen Gruppen spontan reagieren (Cramer *et al.*, 1960): mit Alkoholen zu Phosphatestern, mit Karbonsäuren zu Anhydriden, mit Aminen zu Phosphoramiden und mit Phosphaten zu Pyrophosphaten.

**Abb. 3.2: Oben:** Bildung des Imidoylphosphats aus DMF und Phosphoroxychlorid.  
**Unten:** Reaktion zum Pyrophosphat unter Regeneration des DMF.

Nach der Bildung des Triphosphats liegt die Verbindung als 5'-( $\alpha$ -Chlor)-Triphosphat vor. Als Nebenreaktion wird in einer intramolekularen Kondensation das zyklische Trimetaphosphat gebildet (Abb. 3.3).

**Abb. 3.3:** DMF katalysierte intramolekulare Kondensation des 5'-( $\alpha$ -Chlor)-Triphosphats zum zyklischen Trimetaphosphat

Diese Verbindung ist hochreaktiv und nur in inerten Lösungsmitteln stabil. In Gegenwart von Wasser wird sie schnell und quantitativ zum Triphosphat hydrolysiert (Glonek *et al.*, 1974).

**B:** Für die weitere Phosphorylierung mittels Michelson Anionenaustausch wird der 5'-Phosphoroxydichloridester zunächst in Triethylammoniumkarbonatpuffer zum Monophosphat hydrolysiert. Die Aktivierung der 5'-Phosphatgruppe erfolgt mittels Diphenylphosphochloridat durch Bildung eines dreifach veresterten Pyrophosphats. Über einen nukleophilen Angriff am  $\alpha$ -Phosphat durch Methylendiphosphonat wird das 5'-( $\beta,\gamma$ -Methylen)-Triphosphat unter Abspaltung von Diphenylphosphat gebildet. Die Reaktion wird gesteuert über die Abgangsgruppeneigenschaften und Säurestärken der beteiligten Reaktanden. Diphenylphos-

phat ist eine bedeutend stärkere Säure als Phosphat, Pyrophosphat oder Nukleotide. Substitution des beständigeren Anions des Diphenylphosphats durch Methylendiphosphonat führt daher irreversibel zur Bildung eines neuen und stabileren Phosphatesters (Michelson, 1964). Dabei führen Substitutionen an dreifach veresterten Pyrophosphaten stets zur Bildung des einfach veresterten Produkts: Bei Substitutionen an Phosphoranhydriden ist weniger der positive Charakter der Phosphoratome maßgebend, als die Stabilität der abgestoßenen Anionen (Cramer *et al.*, 1960-2). Allgemein sind die Triester von Pyrophosphaten im Vergleich zu anderen Anhydriden verhältnismäßig reaktionsträge. Um den nukleophilen Angriff durch schwächere Säuren als Diphenylphosphat zu ermöglichen, ist die Zugabe von Pyridin als Base notwendig (Cramer *et al.*, 1960-2, Michelson *et al.*, 1963).

### 3.1 Durchführung

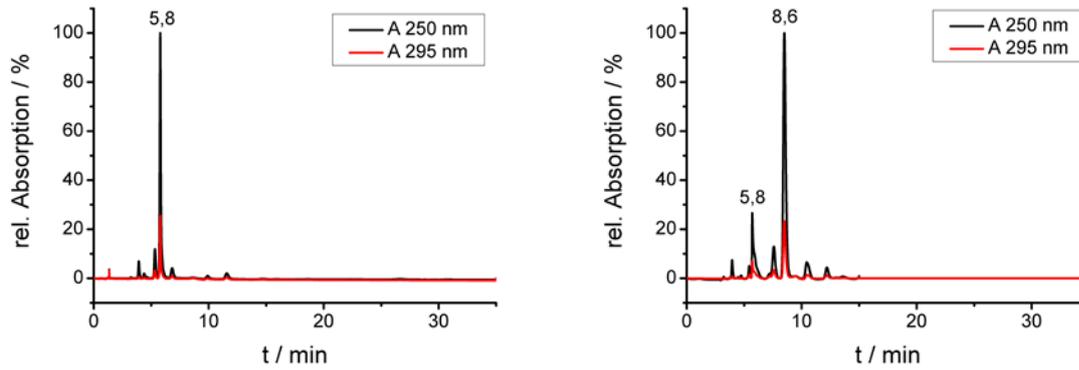
#### 3.1.1 Monophosphorylierung der 5'-Hydroxylgruppe

Die Verwendung eines moderaten Überschusses an  $\text{POCl}_3$  in Trimethylphosphat ermöglicht die bevorzugte Phosphorylierung von primären Alkoholen gegenüber sekundären.

**Abb. 3.1.1.1:** Reaktionsschema zur Phosphorylierung der 5'-Hydroxylgruppe mit  $\text{POCl}_3$ .

In einem 50 mL Zweihalskolben wurden unter Argonatmosphäre 316 mg (803  $\mu\text{mol}$ ) Acrylguanosin vorgelegt und in 11 mL Trimethylphosphat  $((\text{MeO})_3\text{PO})$  aufgenommen. Die schwach trübe, farblose Suspension wurde im Eisbad auf 0 °C gekühlt. Nach Zugabe von 292  $\mu\text{L}$  (3,2 mmol)  $\text{POCl}_3$  wurde das Eisbad entfernt und die Lösung für eine Stunde gerührt. In diesem Zeitraum klarte das Reaktionsgemisch vollständig auf und nahm eine blass gelbe Farbe an. Überschüssiges  $\text{POCl}_3$  wurde am Hochvakuum entfernt.

Die Reaktionskontrolle wurde mittels Umkehrphasen HPLC mit TBA-Br Puffer als Laufmittel durchgeführt.  $\text{TBA}^+$  fungiert als Gegenion zu den Phosphatgruppen (Kap. 7.4.3).



**Abb. 3.1.1.2:** Reaktionskontrolle mittels Umkehrphasen HPLC (C18). Isokratische Läufe mit TBA-Br als Gegenionen.

**Links:** Edukt. **Rechts:** Reaktion nach 60 min.

Die Reaktion war nach 60 min weitestgehend abgeschlossen. Für die Phosphorylierung nach Ludwig wurde das Rohprodukt nicht weiter aufgearbeitet.

Für den Michelson Anionenaustausch wurde das Rohprodukt in 50 mM Triethylammoniumkarbonatpuffer aufgenommen und an 200 mL Q-Sepharose FF mittels Anionenaustauschchromatographie aufgereinigt. Die Produktfraktionen wurden vereint und lyophilisiert. Das Triethylammoniumsalz wurde im Anschluss durch mehrmalige Aufnahme in MeOH und anschließender Einengung am Rotationsverdampfer entfernt.

### 3.1.2 Phosphorylierung zum 5'-Triphosphat nach Ludwig

Phosphoroxychloride reagieren nur träge mit Phosphaten. Über die Bildung hochreaktiver Imidoylphosphate mit Phosphoroxychloriden kann die Reaktion durch DMF katalysiert werden (Cramer *et al.*, 1960).

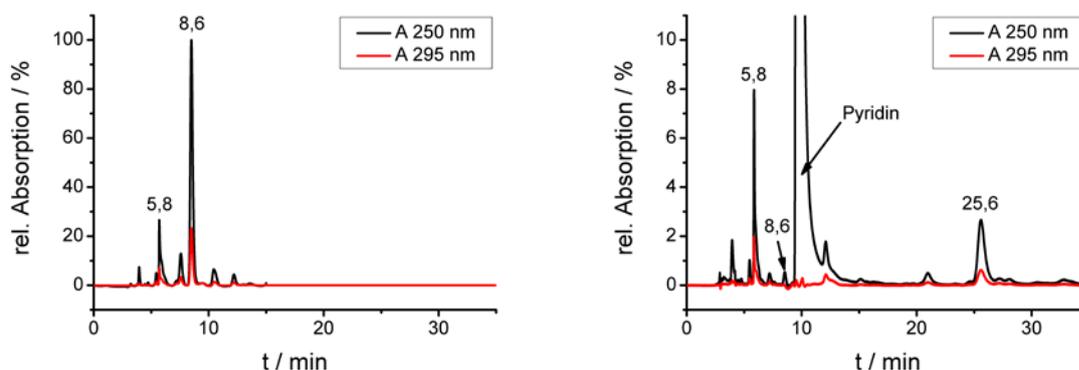
**Abb. 3.1.2.1:** Reaktionsschema zur Phosphorylierung nach Ludwig.

Im Vorfeld der Reaktion wurde das Pyrophosphat vorbereitet: Pyrophosphat Dinatriumsalz (250 mg, 1,1 mmol) wurden in 20 mL H<sub>2</sub>O vollständig gelöst. 300 mL Dowex-50 Kationentau-

schermaterial wurden mit 500 mL Pyridin/Wasser 1:1 in die Pyridiniumform überführt und gründlich mit Wasser gewaschen, bis ein pH-Wert nahe 7 erreicht wurde. Das Pyrophosphat wurde langsam in die Säule einlaufen gelassen und über einen Zeitraum von 30 min mit MeOH/Wasser 1:1 eluiert. Mittels Zirkonylchloridfällung wurden die phosphathaltigen Fraktionen identifiziert. Die vereinten Fraktionen wurden mit 5 mL TBA versetzt und am Rotationsverdampfer vollständig eingetrocknet. Der farblose Rückstand wurde in trockenem Pyridin/DMF 1:3 aufgenommen und erneut eingetrocknet. Nur bei vollständiger Lösung war der Kationentausch erfolgreich! Dieser Vorgang wurde zweimal wiederholt. Im Anschluss wurde der Feststoff in 5 mL trockenem TBA gelöst, vollständig eingetrocknet und in 5 mL trockenem DMF aufgenommen um eine farblose Lösung des Pyrophosphats als TBA Salz zu erhalten.

Zu 50  $\mu\text{mol}$  des Rohproduktes aus Kap. 3.1.1 in  $(\text{MeO})_3\text{PO}$  wurden unter Argonatmosphäre  $>10$  Äq. Pyrophosphat TBA Salz in DMF gegeben und 10 min bei RT gerührt.

Die Reaktionskontrolle wurde mittels Umkehrphasen HPLC mit TBA-Br Puffer als Laufmittel durchgeführt.



**Abb. 3.1.2.2:** Reaktionskontrolle mittels Umkehrphasen HPLC (C18). Isokratische Läufe mit TBA-Br als Gegenionen.

**Links:** Edukt. **Rechts:** Reaktion nach 10 min. Retentionszeit Edukt: 8,6 min.  
Retentionszeit Produkt: 25,6 min

Die DMF katalysierte Reaktion zwischen Pyrophosphat und Phosphoroxychloridester läuft sehr schnell ab: bereits nach 10 min sind mittels HPLC Analyse nur noch Spuren des Edukts nachweisbar. Obwohl das Edukt vollständig umgesetzt wurde, kann über die Integration der Peakflächen nur eine Ausbeute von 28 % ermittelt werden.

Das Rohprodukt wurde in 50 mM Triethylammoniumcarbonatpuffer aufgenommen und an 200 mL Q-Sepharose FF mittels Anionenaustauschchromatographie aufgereinigt. Die Produktfraktionen wurden vereint und lyophilisiert. Das Triethylammoniumsalz wurde im Anschluss durch mehrmalige Aufnahme in MeOH und anschließender Einengung am Rotationsverdampfer entfernt.

### 3.1.3 Phosphorylierung zum 5´-( $\beta,\gamma$ -Methylen)-Triphosphat mittels Michelson Anionenaustausch

Die Aktivierung des 5´Monophosphats als dreifach verestertes Pyrophosphat mit Diphenylphosphochloridat ist eine Alternative zur Phosphorylierung nach Ludwig unter milderer Reaktionsbedingungen.

**Abb. 3.1.3.1:** Reaktionsschema zur Bildung des dreifach veresterten Pyrophosphats als reaktive Spezies.

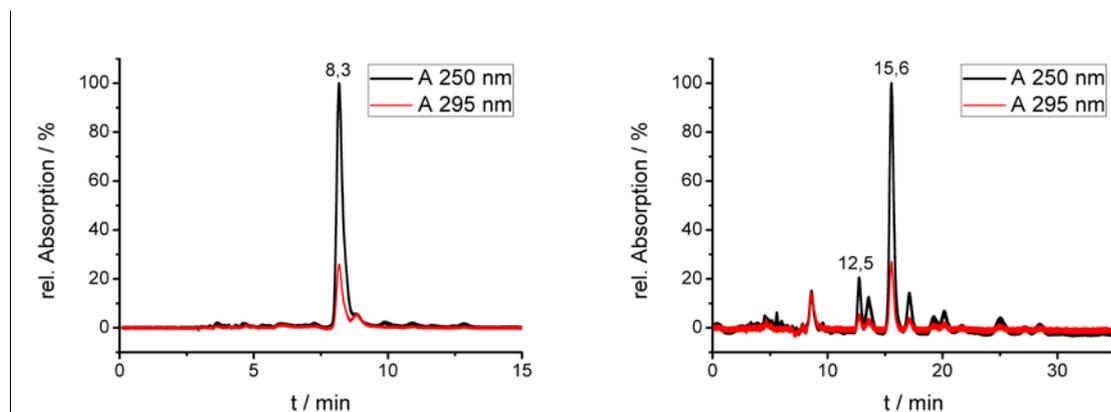
**A:** In einem Zweihalskolben unter Argonatmosphäre wurden 76 mg (160  $\mu$ mol) AcrylGMP vorgelegt und vollständig in 2 mL trockenem DMF/THF 1:1 mit 2,5 % TBA gelöst. Nach Zugabe von 53  $\mu$ L (255  $\mu$ mol) Diphenylphosphochloridat wurde die farblose Lösung für 3 h bei RT gerührt. Im Anschluss wurde das Lösungsmittel am Hochvakuum entfernt und der Rückstand mit 10 mL trockenem Diethylether (DEE) überschichtet. Die farblose Suspension wurde 45 min bei 0 °C gerührt. Der klare Überstand wurde vorsichtig dekantiert und Reste des DEE am Hochvakuum vollständig entfernt. Der Rückstand wurde in 2 mL trockenem DMF/THF 1:1 vollständig gelöst.

**Abb. 3.1.3.2:** Reaktionsschema zum Michelson Anionenaustausch.

**B:** Das Methylendiphosphonat lag als freie Säure vor. 60 mg (340  $\mu$ mol) des Methylendiphosphonats wurden in 3 mL trockenem Pyridin/TBA 3:1 vollständig gelöst und am Rotati-

onsverdampfer eingetrocknet. Dieser Vorgang wurde zweimal wiederholt. Der Rückstand wurde in 2 mL trockenem Pyridin vollständig gelöst.

Die Lösungen aus **A** und **B** wurden unter Argonatmosphäre vereint und 12 h bei RT gerührt. Die Reaktionskontrolle wurde mittels HPLC mit TBA-Br Puffer als Laufmittel durchgeführt. Die Probe nach 12 h wurde am Hochvakuum eingetrocknet, um Pyridin zu entfernen.



**Abb. 3.1.3.3:** Reaktionskontrolle mittels Umkehrphasen HPLC (C18). Isokratische Läufe mit TBA-Br als Gegenionen.

**Links:** AcrylGMP. **Rechts:** Reaktion nach 12 h.

Retentionszeit Edukt: 8,3 min.

Retentionszeit Produkt: 15,6 min

Nach 8 h ist die Reaktion des aktivierten Pyrophosphats mit Methylendiphosphonat vollständig abgeschlossen. Es ist kein Edukt mehr nachweisbar, das Monophosphat konnte also vollständig aktiviert werden und es ist während der Reaktion keine Hydrolyse des aktivierten Pyrophosphats zum unreaktiven Monophosphat aufgetreten. Vielmehr fand eine fast vollständige Umsetzung zum gewünschten Produkt statt (Retentionszeit: 15,6 min). Als Nebenprodukt konnte mittels HPLC und ESI-MS AcrylGDP (Retentionszeit: 12,5 min) identifiziert werden (Abb. 3.1.3.3). Eine Erklärung dafür sind mögliche Reste von anorganischem Phosphat in dem verwendeten AcrylGMP aus Kap. 3.1.1. Die Integration der Peakflächen liefert eine Ausbeute der Reaktion von 89 %.

Das Rohprodukt wurde am Hochvakuum vollständig eingetrocknet. der Rückstand wurde in 50 mM Triethylammoniumkarbonatpuffer aufgenommen und an 200 mL Q-Sepharose FF mittels Anionenaustauschchromatographie aufgereinigt. Die Produktfraktionen wurden vereint und lyophilisiert. Das Triethylammoniumsalz wurde im Anschluss durch mehrmalige Aufnahme in MeOH und anschließender Einengung am Rotationsverdampfer entfernt.

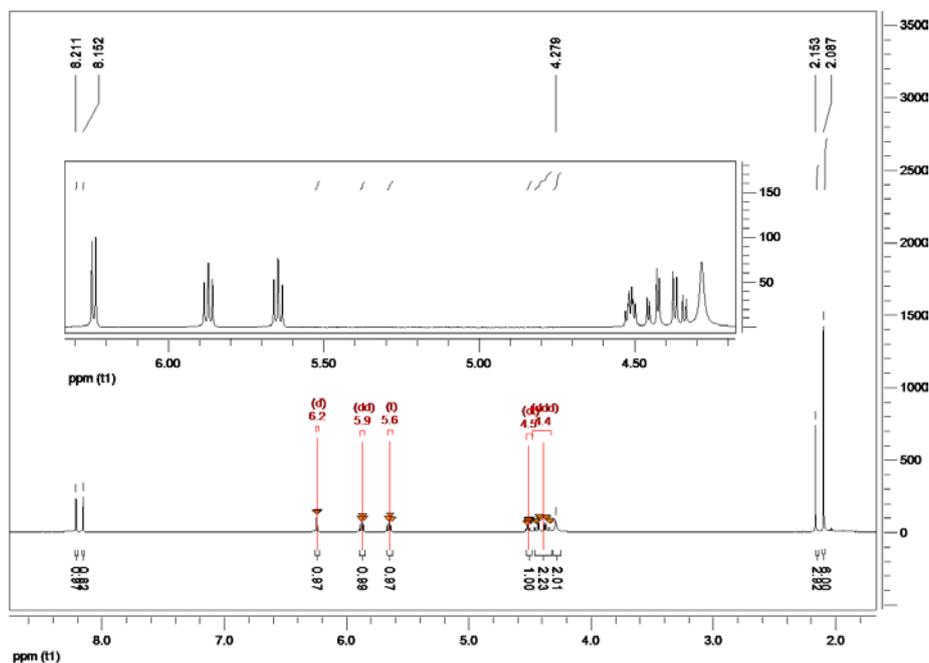
## 4 Analytik

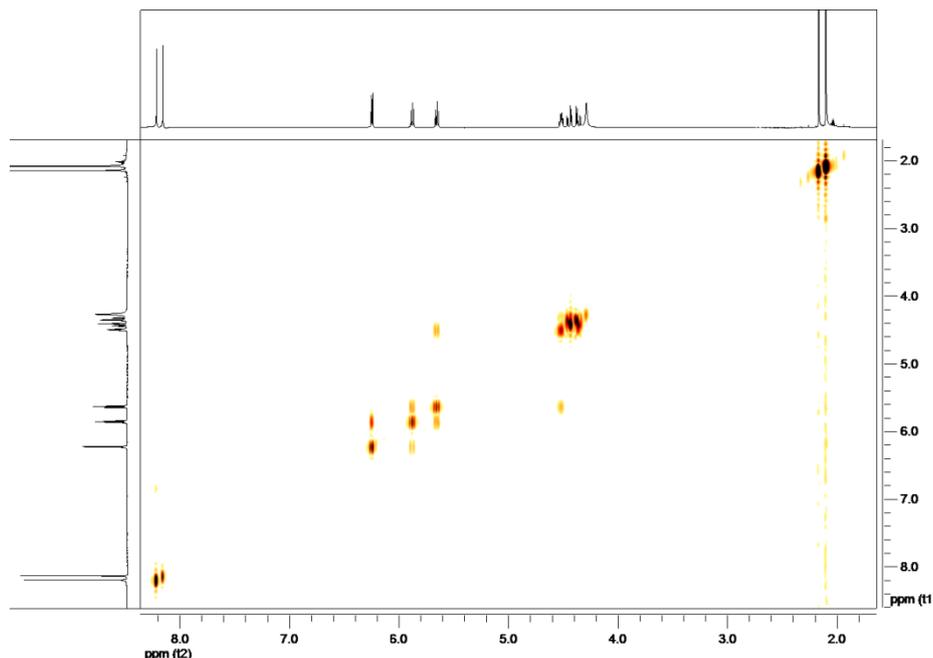
In diesem Kapitel werden die dargestellten Zwischenstufen und Produkte der in Kap.2 und 3 geschilderten Synthesen mittels  $^1\text{H-NMR}$ ,  $^{13}\text{C-NMR}$  und HR-ESI-MS charakterisiert. Für die NMR Spektren wurden jeweils 25  $\mu\text{mol}$  Substanz in 400  $\mu\text{L}$  deuteriertem Lösungsmittel ( $\text{D}_2\text{O}/\text{CD}_3\text{CN}$ , 1:1) gelöst. Als interner Standard wurden 25  $\mu\text{mol}$  3-(Trimethylsilyl)propion-2,2,3,3- $\text{D}_4$ -säure-Natriumsalz zugegeben.

### 4.1 (2R,3R,4R,5R)-2-(acetoxymethyl)-5-(2-bromo-6-oxo-1H-purin-9(6H)-yl) tetrahydro-furan-3,4-diyl diacetat

Produkt aus Kap. 2.1.1

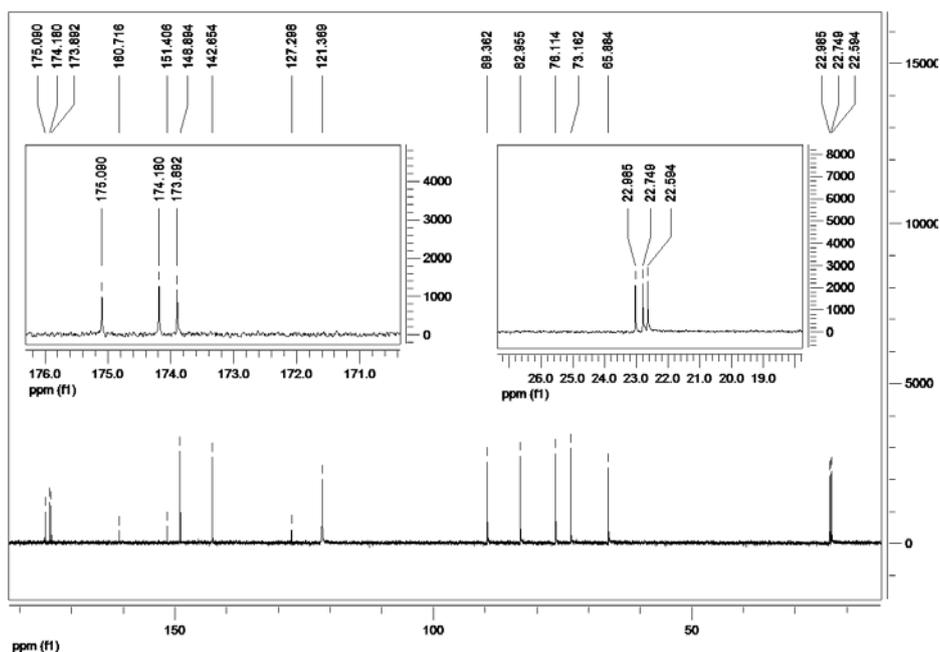
**Abb. 4.1.1:** (2R,3R,4R,5R)-2-(acetoxymethyl)-5-(2-bromo-6-oxo-1H-purin-9(6H)-yl) tetrahydro-furan-3,4-diyl diacetat. Zur vereinfachten Beschreibung der NMR Spektren wurde eine fortlaufende Nummerierung nicht nach IUPAC Regeln gewählt.





**Abb. 4.1.2:**  $^1\text{H}$ -NMR Spektrum, HH-COSY Spektrum.

$^1\text{H}$ -NMR (400 MHz,  $\text{D}_2\text{O}/\text{CD}_3\text{CN}$  1:1):  $\delta$  [ppm], J [Hz]: 2,09 (s, 6H, 18-H, 19-H), 2,15 (s, 3H, 20-H), 4,28 (s,  $\text{H}_2\text{O}$ ), 4,39 (ddd, J1: 3,90, J2: 12,38, J3:17,02, 2H, 5-H), 4,51 (dt, J13,19, J2, 4,78, J3, 4,82, 1H, 4-H), 5,65 (t, J1: 5,45, J2: 5,45, 1H, 3-H), 5,87 (dd, J1: 5,09, J2: 5,68, 1H, 2-H), 6,24 (d, J:4,98, 1H, 1-H), 8,15 (s, 1H, 6-H), 8,21 (s, 1H, 13-H)



**Abb. 4.1.3:**  $^{13}\text{C}$ -NMR Spektrum

$^{13}\text{C}$ -NMR (400 MHz,  $\text{D}_2\text{O}/\text{CD}_3\text{CN}$  1:1):  $\delta$  [ppm]: 22,59 (s, 20-C), 22,75 (s, 19-C), 22,99 (s, 18-C), 65,88 (s, 5-C), 73,16 (s, 3-C), 76,11 (s, 2-C), 82,96 (s, 4C), 89,36 (s, 1-C), 121,37 (s,  $\text{CD}_3\text{CN}$ ), 127,30 (s, 10-C), 142,65 (s, 13-C), 148,89 (s, 9-C), 151,41 (s, 7-C), 160,72 (s, 11-C), 173,89 (s, 16-C), 174,18 (s, 18-C), 175,09 (s, 17-C)

Mittels HR-ESI-MS konnten folgende Massen ermittelt werden:

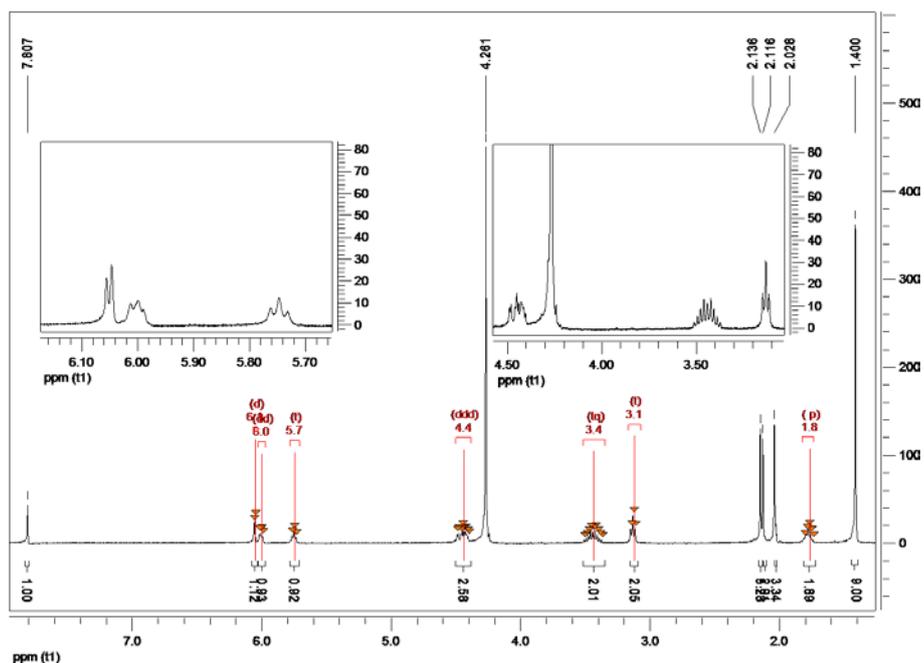
473.03031 und 475.02823 Da. Die zwei Massen resultieren aus den beiden stabilen Bromisotopen  $^{79}\text{Br}$  und  $^{81}\text{Br}$  (Verteilung: 50,7 zu 49,3 %). Die theoretischen Massen der einfach

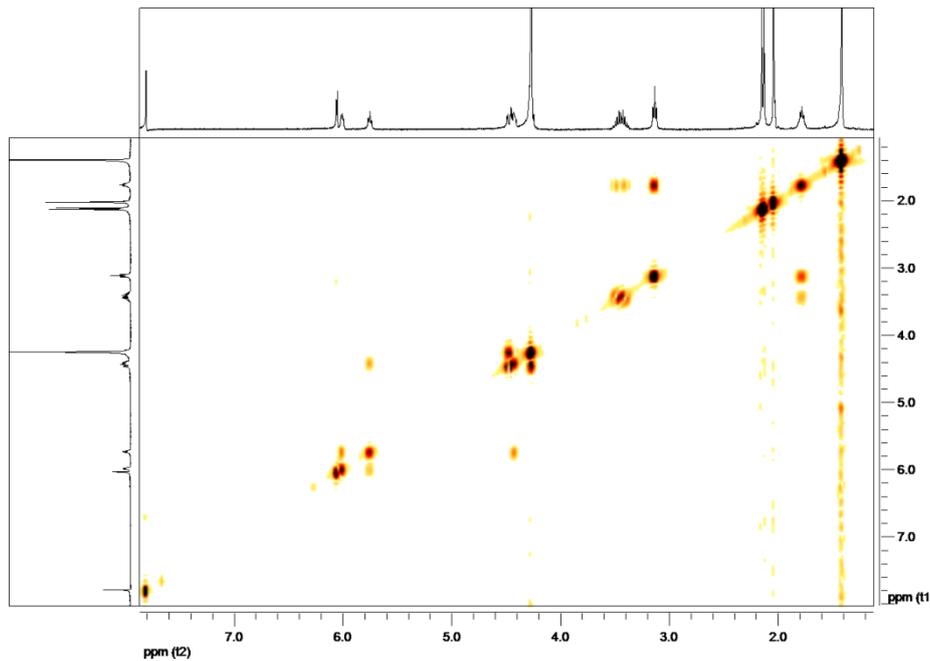
positiv geladenen Ionen sind 473.03025 und 475.02821 Da. Die Abweichungen der Messwerte von der Theorie betragen damit 0.12152 und 0.06031 ppm.

#### 4.2 (2*R*,3*R*,4*R*,5*R*)-2-(acetoxymethyl)-5-(2-(3-(tert-butoxycarbonylamino)propylamino)-6-oxo-1*H*-purin-9(6*H*)-yl)tetrahydrofuran-3,4-diyl diacetat

Produkt aus Kap. 2.1.2.

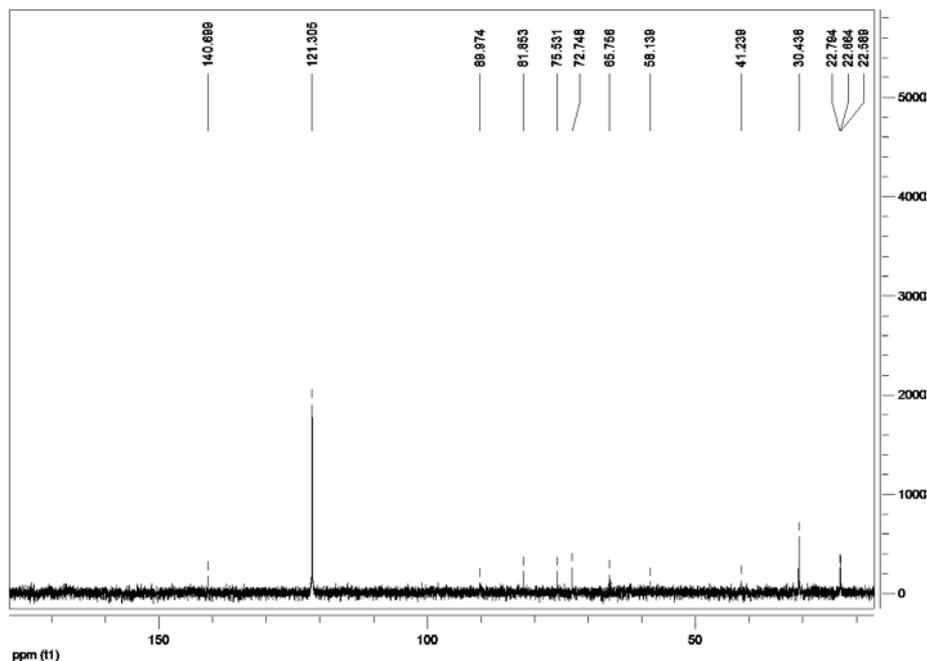
**Abb. 4.2.1:** (2*R*,3*R*,4*R*,5*R*)-2-(acetoxymethyl)-5-(2-(3-(tert-butoxycarbonylamino)propylamino)-6-oxo-1*H*-purin-9(6*H*)-yl)tetrahydrofuran-3,4-diyl diacetat. Zur vereinfachten Beschreibung der NMR Spektren wurde eine fortlaufende Nummerierung nicht nach IUPAC Regeln gewählt.





**Abb. 4.2.2:**  $^1\text{H}$ -NMR Spektrum, HH-COSY Spektrum.

$^1\text{H}$ -NMR (400 MHz,  $\text{D}_2\text{O}/\text{CD}_3\text{CN}$  1:1):  $\delta$  [ppm], J [Hz]: 1,40 (s, 9H, 28-H, 29-H, 30-H), 1,77 (p,  $J_1=J_2$ : 6,56,  $J_3=J_4$ : 6,46, 2H, 23-H), 2,03 (s, 1H, 19-H), 2,12 (s, 1H, 18-H), 2,14 (s, 1H, 20-H), 3,12 (t,  $J_1=J_2$ : 6,73, 2H, 24-H), 3,43 (tq,  $J_1=J_2$ : 6,80,  $J_3=J_4=J_5$ : 13,78, 2H, 22-H), 4,26 (s,  $\text{H}_2\text{O}$ ), 4,27 (m, 4-H), 4,44 (ddd,  $J_1$ : 3,47,  $J_2$ : 10,62,  $J_3$ : 15,24, 2H, 5-H), 5,75 (t,  $J_1=J_2$ : 6,43, 1H, 3-H), 6,00 (dd,  $J_1$ : 4,00,  $J_2$ : 5,64, 1H, 2-H), 6,05 (d,  $J$ : 3,60, 1H 1-H), 7,81 (s, 1H, 13-H)



**Abb. 4.2.3:**  $^{13}\text{C}$ -NMR Spektrum

$^{13}\text{C}$ -NMR (400 MHz,  $\text{D}_2\text{O}/\text{CD}_3\text{CN}$  1:1):  $\delta$  [ppm]: 22,59 (s, 20-C), 22,66 (s, 19-C), 22,79 (s, 18-C), 30,44 (s, 3C, 28-C, 29-C, 30-C), 41,24 (s, 23-C), 58,14 (s, 22-C oder 24-C), 65,76 (s, 5-C), 72,75 (s, 3-C), 75,53 (s, 2-C), 81,85 (s, 4-C), 89,97 (s, 1-C), 121,31 (s,  $\text{CD}_3\text{CN}$ ), 140,70 (s, 13-C)

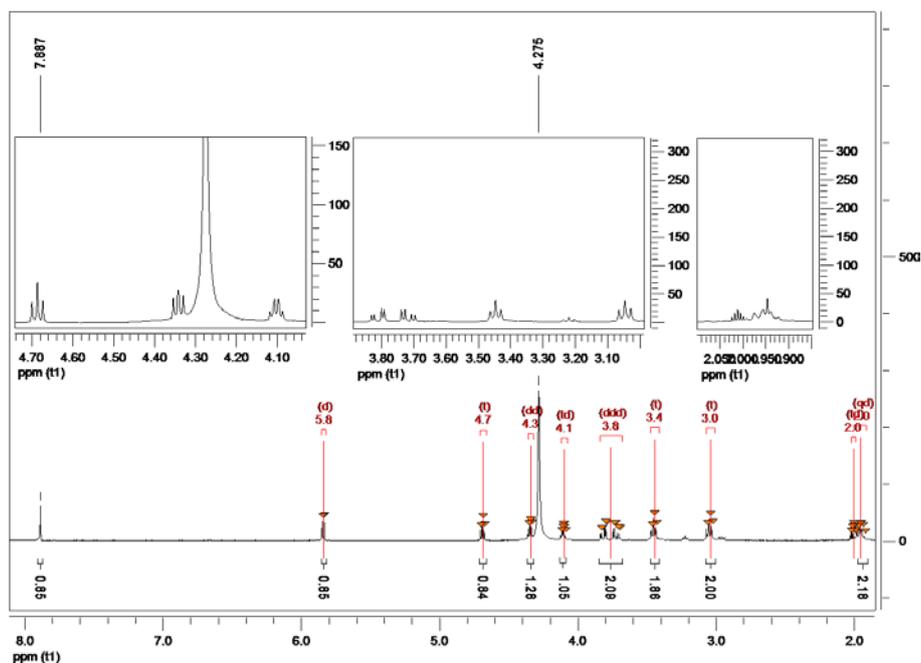
Mittels HR-ESI-MS konnte folgende Masse ermittelt werden:

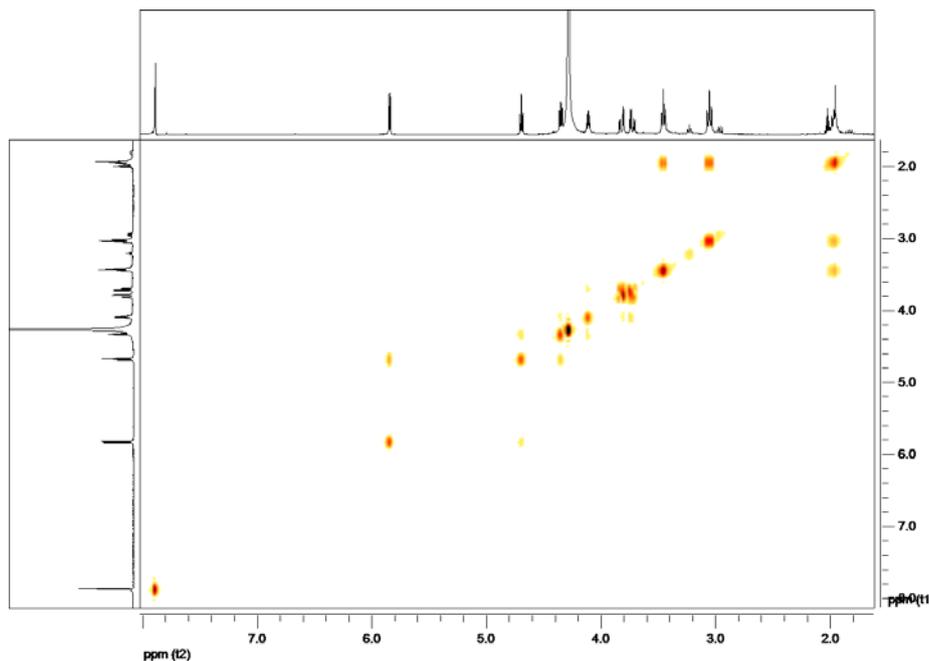
567,23065 Da. Die theoretische Masse des einfach positiv geladenen Ions beträgt 567,24029. Die Abweichung des Messwerts von der Theorie beträgt damit 17 ppm und weist auf eine leichte Verunreinigung des Produkts hin.

#### 4.3 2-(3-aminopropylamino)-9-((2*R*,3*R*,4*S*,5*R*)-3,4-dihydroxy-5-(hydroxymethyl) tetrahydrofuran-2-yl)-1*H*-purin-6(9*H*)-on

Produkt aus Kap. 2.1.3.

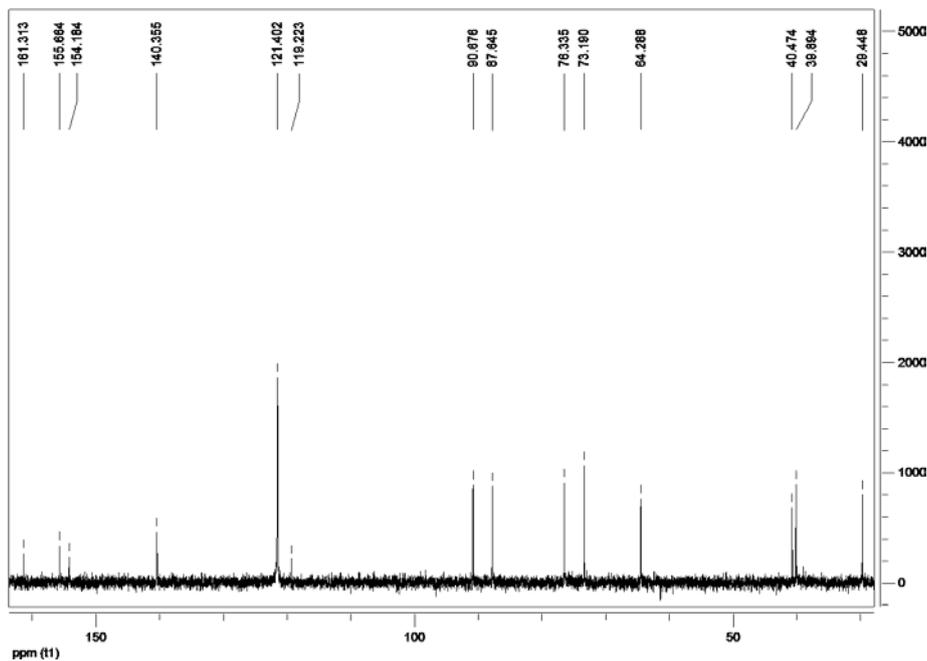
**Abb. 4.3.1:** 2-(3-aminopropylamino)-9-((2*R*,3*R*,4*S*,5*R*)-3,4-dihydroxy-5-(hydroxymethyl) tetrahydrofuran-2-yl)-1*H*-purin-6(9*H*)-on. Zur vereinfachten Beschreibung der NMR Spektren wurde eine fortlaufende Nummerierung nicht nach IUPAC Regeln gewählt.





**Abb. 4.3.2:**  $^1\text{H}$ -NMR Spektrum, HH-COSY Spektrum.

$^1\text{H}$ -NMR (400 MHz,  $\text{D}_2\text{O}/\text{CD}_3\text{CN}$  1:1):  $\delta$  [ppm], J [Hz]: 1,95 (qd,  $J_1=J_2$ : 6,70,  $J_3$ : 6,58,  $J_4$ : 13,24, 2H, 23-H), 3,04 (t, 2H, 24-H), 3,44 (t, 2H, 22-H), 3,76 (ddd,  $J_1$ : 4,04,  $J_2$ : 12,43,  $J_3$ : 17,08, 2H, 5-H), 4,10 (td,  $J_1=J_2$ : 3,43,  $J_3$ : 4,40, 1H, 4-H), 4,28 (s,  $\text{H}_2\text{O}$ ), 4,34 (dd,  $J_1$ : 4,58,  $J_2$ : 5,23, 1H, 3-H), 4,69 (t,  $J_1=J_2$ : 5,34, 1H, 2-H), 5,84 (d,  $J$ : 5,34, 1H, 1-H), 7,89 (s, 1H, 13-H)



**Abb. 4.3.3:**  $^{13}\text{C}$ -NMR Spektrum

$^{13}\text{C}$ -NMR (400 MHz,  $\text{D}_2\text{O}/\text{CD}_3\text{CN}$  1:1):  $\delta$  [ppm]: 29,45 (s, 23-C), 39,89 (s, 24-C), 40,47 (s, 22-C), 64,29 (s, 5-C), 73,19 (s, 3-C), 76,34 (s, 2-C), 87,65 (s, 4-C), 90,68 (s, 1-C), 119,22 (s, 10-C), 121,40 (s,  $\text{CD}_3\text{CN}$ ), 140,36 (s, 13-C), 154,18 (s, 9-C), 155,66 (s, 7-C), 161,31 (s, 11-C)

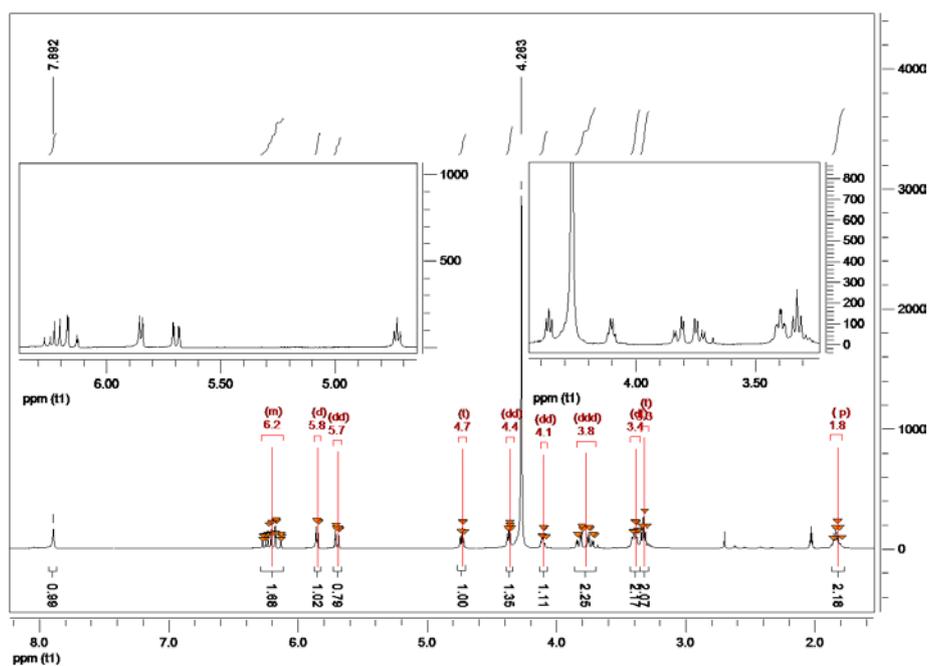
Mittels HR-ESI-MS konnte folgende Masse ermittelt werden:

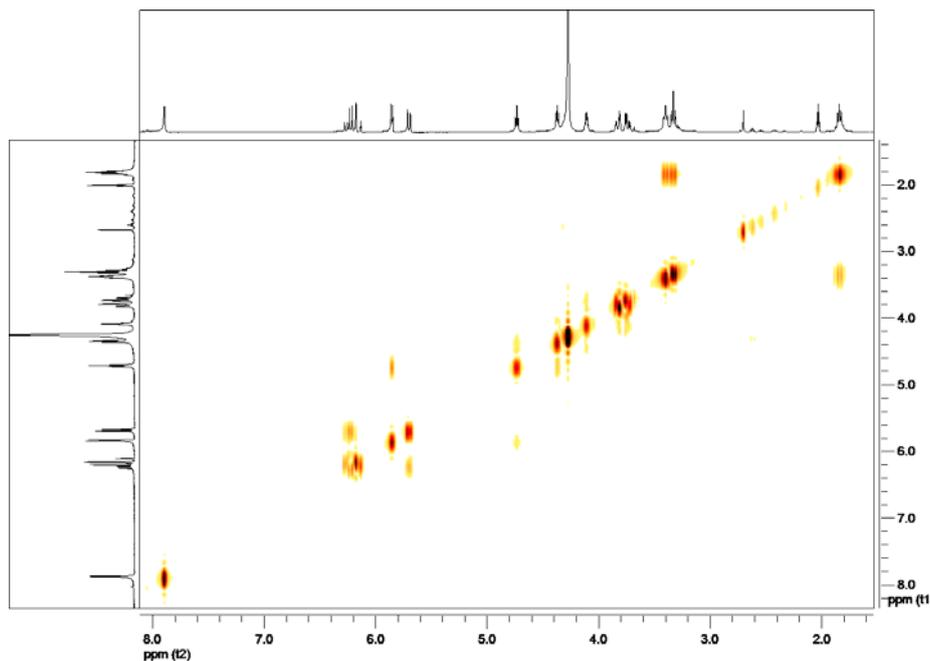
341,15679 Da. Die theoretische des einfach positiv geladenen Ions Masse beträgt 341,15718 Da. Die Abweichung des Messwerts von der Theorie beträgt damit 1,119 ppm.

#### 4.4 *N*-(3-(9-((2*R*,3*R*,4*S*,5*R*)-3,4-dihydroxy-5-(hydroxymethyl)tetrahydrofuran-2-yl)-6-oxo-6,9-dihydro-1*H*-purin-2-ylamino)propyl)acrylamid

Produkt aus Kap.2.1.4.

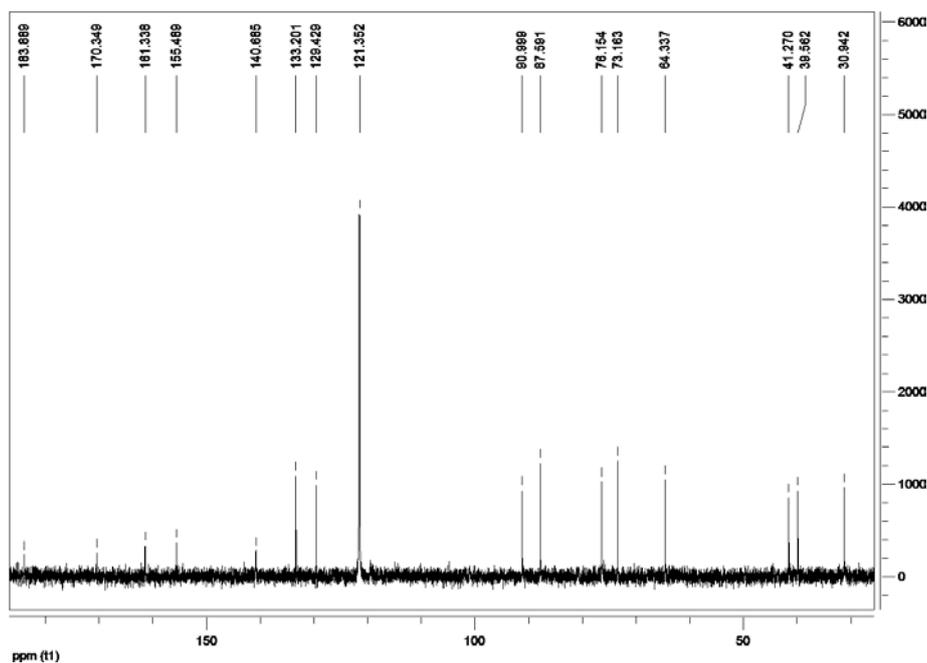
**Abb. 4.4.1:** *N*-(3-(9-((2*R*,3*R*,4*S*,5*R*)-3,4-dihydroxy-5-(hydroxymethyl)tetrahydrofuran-2-yl)-6-oxo-6,9-dihydro-1*H*-purin-2-ylamino)propyl)acrylamid. Zur vereinfachten Beschreibung der NMR Spektren wurde eine fortlaufende Nummerierung nicht nach IUPAC Regeln gewählt.





**Abb. 4.4.2:**  $^1\text{H}$ -NMR Spektrum, HH-COSY Spektrum.

$^1\text{H}$ -NMR (400 MHz,  $\text{D}_2\text{O}/\text{CD}_3\text{CN}$  1:1):  $\delta$  [ppm], J [Hz]: 1,83 (p,  $J_1=J_2=J_3=J_4$ : 6,90, 2H, 23-H), 3,32 (t,  $J_1=J_2$ : 6,82, 2H, 22-H), 3,39 (dt,  $J_1$ : 2,09,  $J_2$ : 6,84,  $J_3$ : 6,67, 2H, 24-H), 3,77 (ddd,  $J_1$ : 4,06,  $J_2$ : 12,39,  $J_3$ : 17,01, 2H, 5-H), 4,10 (dd,  $J_1$ : 4,46,  $J_2$ : 8,05, 1H, 4-H), 4,26 (s,  $\text{H}_2\text{O}$ ), 4,36 (dd,  $J_1$ : 4,41,  $J_2$ : 5,43, 1H, 3-H), 4,73 (t,  $J_1=J_2$ : 5,29, 1H, 2-H), 5,69 (dd,  $J_1$ : 1,80,  $J_2$ : 9,98, 1H, 27-H), 5,85 (d, J: 5,30, 1H, 1-H), 6,20 (m, 2H, 28-H), 7,89 (s, 1H, 13-H)



**Abb. 4.4.3:**  $^{13}\text{C}$ -NMR Spektrum

$^{13}\text{C}$ -NMR (400 MHz,  $\text{D}_2\text{O}/\text{CD}_3\text{CN}$  1:1):  $\delta$  [ppm]: 30,94 (s, 23-C), 39,56 (s, 24-C), 41,27 (s, 22-C), 64,34 (s, 5-C), 73,16 (s, 3-C), 76,15 (s, 2-C), 87,59 (s, 4-C), 91,00 (s, 1-C), 121,25 (s,  $\text{CD}_3\text{CN}$ ), 129,43 (s, 27-C), 133,20 (s, 28-C), 140,69 (s, 13-C), 155,49 (s, 9-C), 161,34 (s, 7-C), 170,35 (s, 11-C), 183,89 (s, 26-C)

Mittels HR-ESI-MS konnte folgende Masse ermittelt werden:

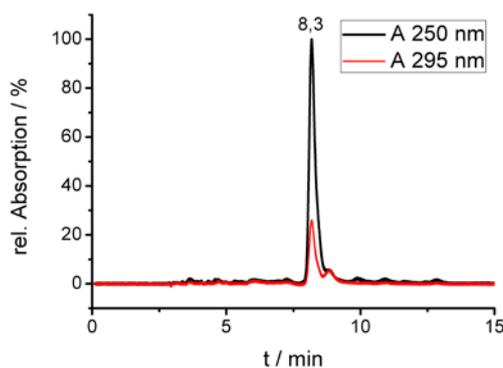
395,16707 Da. Die theoretische Masse des einfach positiv geladenen Ions beträgt 395,16736 Da. Die Abweichung des Messwerts von der Theorie beträgt damit 0,732 ppm.

#### 4.5 ((2*R*,3*S*,4*R*,5*R*)-5-(2-(3-acrylamidopropylamino)-6-oxo-1*H*-purin-9(6*H*)-yl)-3,4-dihydroxytetrahydrofuran-2-yl)methyl dihydrogen phosphat

Produkt aus Kap. 3.1.1.

**Abb. 4.5.1:** ((2*R*,3*S*,4*R*,5*R*)-5-(2-(3-acrylamidopropylamino)-6-oxo-1*H*-purin-9(6*H*)-yl)-3,4-dihydroxytetrahydrofuran-2-yl)methyl dihydrogen phosphat.

Das Produkt wurde mittels Anionenaustauschchromatographie in Triethylammoniumkarbonatpuffer aufgereinigt (Kap. 7.4.4). Das Triethylammoniumkarbonat konnte weitestgehend, jedoch nicht vollständig entfernt werden. Aus diesem Grund lieferte die Analyse mit NMR spektroskopischen Methoden keine verwertbaren Daten.



**Abb. 4.5.2:** Reinheitskontrolle mittels Umkehrphasen HPLC (C18). Isokratischer Lauf mit TBA-Br als Gegenionen.

Mittels HR-ESI-MS konnte folgende Masse ermittelt werden:

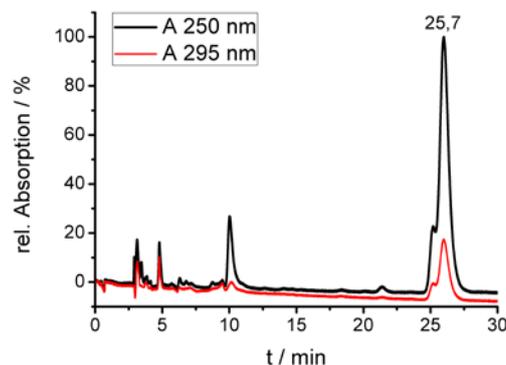
475,13334 Da. Die theoretische Masse des einfach positiv geladenen Ions beträgt 475,13369 Da. Die Abweichung des Messwerts von der Theorie beträgt damit 0,737 ppm.

#### 4.6 ((2*R*,3*S*,4*R*,5*R*)-5-(2-(3-acrylamidopropylamino)-6-oxo-1*H*-purin-9(6*H*)-yl)-3,4-dihydroxytetrahydrofuran-2-yl)methyl tetrahydrogen triphosphat

Produkt aus Kap. 3.1.2

**Abb. 4.6.1:** ((2*R*,3*S*,4*R*,5*R*)-5-(2-(3-acrylamidopropylamino)-6-oxo-1*H*-purin-9(6*H*)-yl)-3,4-dihydroxytetrahydrofuran-2-yl)methyl tetrahydrogen triphosphat.

Das Produkt wurde mittels Anionenaustauschchromatographie in Triethylammoniumkarbonatpuffer aufgereinigt (Kap. 7.4.4). Das Triethylammoniumkarbonat konnte weitestgehend, jedoch nicht vollständig entfernt werden. Aus diesem Grund lieferte die Analyse mit NMR spektroskopischen Methoden keine verwertbaren Daten.



**Abb. 4.6.2:** Reinheitskontrolle mittels Umkehrphasen HPLC (C18). Isokratischer Lauf mit TBA-Br als Gegenionen.

Weder mittels HPLC noch ESI-MS Analyse konnten Verunreinigungen durch andere Nucleotide, insbesondere AcrylGMP oder AcrylGTP nachgewiesen werden.

Mittels HR-ESI-MS konnte folgende Masse ermittelt werden:

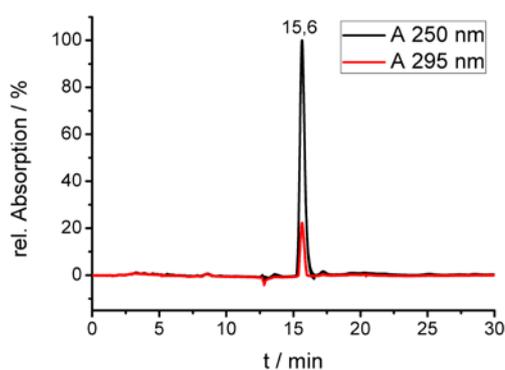
635,06621 Da. Die theoretische Masse des einfach positiv geladenen Ions beträgt 635,06635 Da. Die Abweichung des Messwerts von der Theorie beträgt damit 0,217 ppm.

#### 4.7 (((((2*R*,3*S*,4*R*,5*R*)-5-(2-(3-acrylamidopropylamino)-6-oxo-1*H*-purin-9(6*H*)-yl)-3,4-dihydroxytetrahydrofuran-2-yl)methoxy)(hydroxy)phosphoryloxy)(hydroxy)phosphoryl)-methylphosphonat

Produkt aus Kap. 3.1.3

**Abb. 4.7.1:** (((((2*R*,3*S*,4*R*,5*R*)-5-(2-(3-acrylamidopropylamino)-6-oxo-1*H*-purin-9(6*H*)-yl)-3,4-dihydroxytetrahydrofuran-2-yl)methoxy)(hydroxy)phosphoryloxy)(hydroxy)phosphoryl)-methylphosphonat.

Das Produkt wurde mittels Anionenaustauschchromatographie in Triethylammoniumkarbonatpuffer aufgereinigt (Kap. 7.4.4). Das Triethylammoniumkarbonat konnte weitestgehend, jedoch nicht vollständig entfernt werden. Aus diesem Grund lieferte die Analyse mit NMR spektroskopischen Methoden keine verwertbaren Daten.



**Abb. 4.7.2:** Reinheitskontrolle mittels HPLC. Isokratischer Lauf mit TBA-Br als Gegenionen.

Mittels HR-ESI-MS konnte folgende Masse ermittelt werden:

633,08729 Da. Die theoretische Masse des einfach positiv geladenen Ions beträgt 633,08709 Da. Die Abweichung des Messwerts von der Theorie beträgt damit 0,325 ppm.

## **5 Ergebnisse**

In diesem Teil sollen die Ergebnisse der biochemischen Experimente an verschiedenen kleinen G-Proteinen präsentiert werden. Einen schematischen Überblick über die durchgeführten Experimente und was in ihnen untersucht werden sollte bietet das Organigramm in Abb. 5.1.

**Abb. 5.1:** Organigramm der durchgeführten Experimente.

Die Synthese der Acrylnukleotide wurde in den Kap. 2 und 3 beschrieben. Die theoretischen Aspekte bei der Auswahl der Mutationsstellen K153C und L125C in Rab1b wurden in Kap. 1.2.8 erörtert.

Die Bindung von Nukleotiden ist essentiell für die Funktionalität kleiner G-Proteine. In Nukleotidaustauschexperimenten sollte untersucht werden, ob die Mutanten eine deutlich

vom Wildtyp abweichende Fähigkeit zur Nukleotidbindung haben, und wenn nein, ob ein Austausch von GDP gegen AcrylGTP an ihnen möglich ist.

Die Experimente zur kovalenten Modifikation sollten Aufschluss geben, ob die konjugierte Addition selektiv an dem durch Mutation eingeführten Cys stattfindet. Besonderes Augenmerk lag dabei auf der Frage, ob das Nukleotid nach der kovalenten Bindung im aktiven Zentrum gebunden ist, und ob unerwünschte Mehrfachmodifikationen z. B. an den C-terminalen Cys zu beobachten sind.

Nach Identifikation einer geeigneten Mutationsstelle in Rab1b sollte ihre Anwendbarkeit in anderen kleinen G-Proteinen überprüft werden.

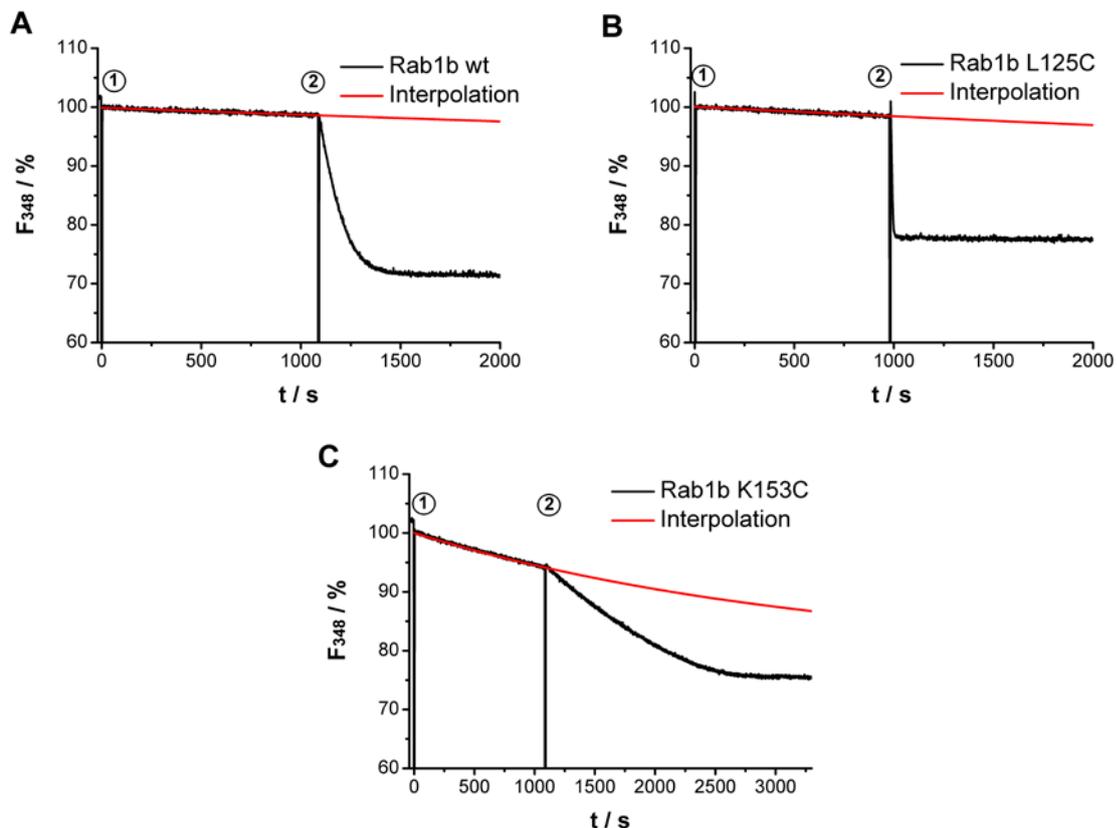
Um in zellbiologischen Experimenten aussagekräftige Ergebnisse erzielen zu können, müssen die kovalent modifizierten kleinen G-Proteine in Abhängigkeit von ihrem gebundenen Nukleotid auf natürliche Weise mit ihren Effektoren und Regulatoren interagieren. Daher sollten in verschiedenen biochemischen Experimenten die Interaktionen von kovalent modifiziertem Rab1b exemplarisch mit je einem Vertreter jeder Klasse an natürlichen Interaktionspartnern charakterisiert und in direkten Vergleich zu nicht kovalent modifiziertem Rab1b gestellt werden.

Schließlich sollte in einem ersten zellbiologischen Experiment die Prenylierung von konstitutiv aktivem und inaktivem Rab1b *in vivo* beobachtet werden, um einen möglichen Einfluss des gebundenen Nukleotides auf die Prenylierung *in vivo* zu untersuchen.

## 5.1 Intrinsische Nukleotidfreisetzung durch Rab1b und seine Mutanten: Bestimmung von $k_{\text{off}}$ durch Messung der Tryptophanfluoreszenz

Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt des intrinsischen Nukleotidaustauschs kleiner G-Proteine ist die Nukleotidfreisetzung (Kap. 1.2.1) (Klebe *et al.*, 1995, 1, 2). Durch Messung der Tryptophanfluoreszenzänderung (Goody *et al.*, 2012) sollen die Geschwindigkeitskonstanten  $k_{\text{off}}$  der intrinsischen Nukleotidfreisetzung der beiden Mutanten Rab1b L125C und Rab1b K153C ermittelt werden. Der Vergleich mit  $k_{\text{off}}$  von Rab1b wt soll zeigen, ob die Mutanten eine vom Wildtyp abweichende Fähigkeit zur Nukleotidbindung aufweisen. In einer zweiten Versuchsreihe soll überprüft werden, ob AcrylGTP durch Rab1b wt sowie die beiden Mutanten gebunden werden kann.

Gemessen wurde die intrinsische Tryptophanfluoreszenz bei 25 °C. Es wurde Proteinstandardpuffer verwendet, das Probenvolumen betrug jeweils 1 mL. Es wurde eine 2  $\mu\text{M}$  Proteinkonzentration eingestellt. Nach Stabilisierung der Emissionsintensität bei 348 nm wurden 50 nmol (50  $\mu\text{M}$ ) GTP zugegeben. Um den Endwert der Fluoreszenz zu ermitteln wurde die Einstellung des Bindungsgleichgewichts nach 10-15 min durch Zugabe von 20 pmol (20 nM) DrrA<sub>GEF</sub> beschleunigt.



**Abb. 5.1.1:** Intrinsischer Nukleotidaustausch GDP gegen GTP an Rab1b wt, Rab1b L125C und Rab1b K153C. Dargestellt ist die Änderung der Tryptophanfluoreszenz bei 348 nm in Abhängigkeit von der Zeit. **A:** Rab1b wt. **B:** Rab1b L125C. **C:** Rab1b K153C

1.) Zugabe von 50 nmol GTP

2.) Zugabe von 20 pmol DrrA<sub>GEF</sub>

Die Daten wurden im Zeitintervall 250-750 s mit dem Programm GraFit als einfach exponentielle Funktion interpoliert:

$$F = F_a \cdot e^{(-k_{obs} \cdot t)} + F_0$$

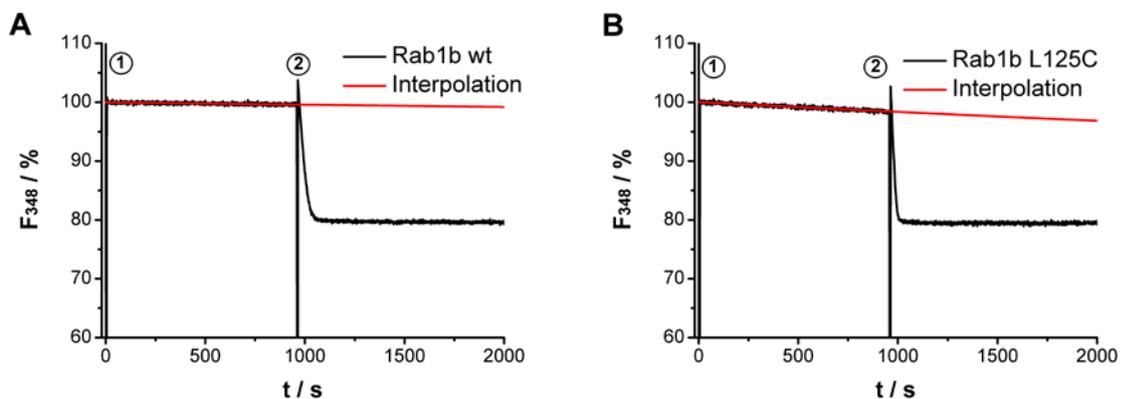
**Formel 5.1.2:** Konstanten:  $F_0$  = Endwert: ermitteltes Fluoreszenzminimum  
 Parameter:  $k_{obs}$  = beobachtete Geschwindigkeitskonstante des Nukleotidaustauschs  
 $F_{max}$  = Maximalwert  
 $F_a = F_{max} - F_0$   
 Variable:  $t$  = Zeit in Sekunden

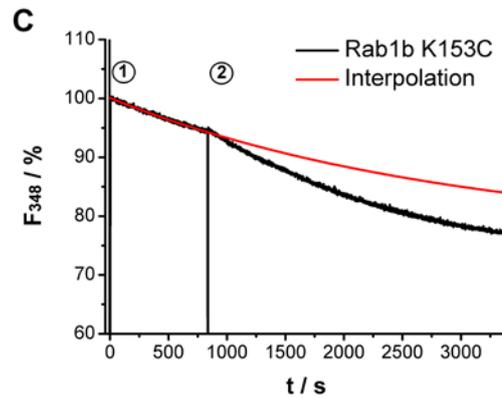
Mit Formel 5.1.2 wurden folgende Werte für  $k_{obs}$  und  $F_a$  ermittelt:

	$k_{obs} [s^{-1}]$	$\sigma_k$	$F_a [\%]$
Rab1b wt	$4,9 \cdot 10^{-5}$	$7,3 \cdot 10^{-7}$	29,0
Rab1b K153C	$7,9 \cdot 10^{-5}$	$8,2 \cdot 10^{-7}$	25,2
Rab1b K153C	$3,0 \cdot 10^{-4}$	$9,4 \cdot 10^{-7}$	24,8

**Tabelle 5.1.3:** Ergebnisse der Interpolationen der Messdaten des GDP/GTP Austauschs für  $k_{obs}$  und  $F_a$  mit Formel 5.1.2.  $\sigma_k$  ist die Standardabweichung.

Beide Mutanten sind zu einem Nukleotidaustausch befähigt, auch wenn Rab1b K153C eine im Vergleich zum Wildtyp erhöhte Geschwindigkeit der Nukleotidfreisetzung zeigt. Um zu überprüfen ob AcrylGTP durch Rab1b wt und seine beiden Mutanten gebunden werden kann, wurde in einer zweiten Messreihe anstelle von GTP 50 nmol AcrylGTP zu den Proteinen gegeben.





**Abb. 5.1.4:** Intrinsischer Nukleotidaustausch von GDP gegen AcrylGTP an Rab1b wt, Rab1b L125C und Rab1b K153C. Dargestellt ist die Änderung der Tryptophanfluoreszenz bei 348 nm in Abhängigkeit von der Zeit. **A:** Rab1b wt. **B:** Rab1b L125C. **C:** Rab1b K153C

- 1.) Zugabe von 50 nmol AcrylGTP
- 2.) Zugabe von 20 pmol DrrA<sub>GEF</sub>

Die Daten wurden im Zeitintervall 250-750 s mit dem Programm GraFit als einfach exponentielle Funktion (Formel 5.1.2) interpoliert.

	$k_{\text{obs}}$ [s <sup>-1</sup> ]	$\sigma_k$	$F_a$ [%]
Rab1b wt	$2,3 \cdot 10^{-5}$	$1,2 \cdot 10^{-6}$	21,7
Rab1b L125C	$8,9 \cdot 10^{-5}$	$1,0 \cdot 10^{-6}$	22,4
Rab1b K153C	$3,0 \cdot 10^{-4}$	$1,4 \cdot 10^{-6}$	23,6

**Tabelle 5.1.5:** Ergebnisse der Interpolationen der Messdaten des GDP/AcrylGTP Austauschs für  $k_{\text{obs}}$  und  $F_a$  mit Formel 5.1.2.  $\sigma_k$  ist die Standardabweichung.

Der Nukleotidaustausch ist ein zweistufiger Prozess: Die beobachtete Geschwindigkeitskonstante enthält also sowohl die Geschwindigkeitskonstante 1. Ordnung  $k_{\text{off}}$  für die Dissoziation von GDP als auch die Geschwindigkeitskonstante 2. Ordnung  $k_{\text{on}}$  für die Assoziation von GTP/AcrylGTP. Die Dissoziationsgleichgewichtskonstanten (kurz: Dissoziationskonstanten)  $K_D$  der Nukleotidfreisetzung liegen für kleine G-Proteine in der Größenordnung von  $10^{-11}$  M (Goody *et al.*, 1991), die  $k_{\text{on}}$  Werte wurden in der Größenordnungen von  $10^6$  M<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup> ermittelt (John *et al.*, 1990). Die Geschwindigkeit der Assoziation ist also groß genug, um  $k_{\text{on}}$  vernachlässigen und  $k_{\text{obs}} = k_{\text{off}}$  setzen zu können.

In Tabelle 5.1.3 sind die Ergebnisse des Austauschs von GDP gegen GTP aufgelistet. Der  $k_{\text{off}}$  Werte der L125C Mutante unterscheidet sich lediglich um 60 % vom Wildtyp, die Mutation beeinträchtigt die Affinität des Rab Proteins zu GDP also nicht signifikant. Anders verhält es sich mit der K153C Mutante: sie weist eine im Vergleich zum Wildtyp 16-mal schnellere intrinsische Austauschrate auf. Die Aminosäure Lys 153 ist Bestandteil des G5 SAK-Motivs. In H-Ras bildet sie über ihre Seitenkettenaminogruppe eine Wasserstoffbrückenbindung zum

Purin C6 Sauerstoff aus (Abb. 1.2.3.1, Wittinghofer *et al.* 2011). Eine solche Wechselwirkung konnte in Kristallstrukturen von Rab1b nicht festgestellt werden. Dennoch zeigen die erhöhten  $k_{\text{off}}$ -Werte der Mutante, dass Lys153 auch in Rab1b einen Einfluss auf die Nukleotidbindung hat.

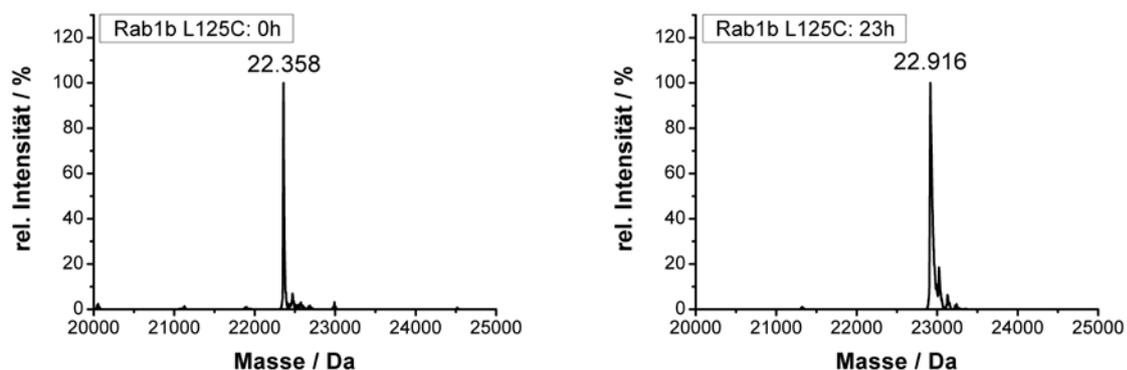
Die Ergebnisse des Austauschs von GDP gegen AcrylGTP in Abb. 5.1.4 und Tabelle 5.1.3 zeigen, dass alle drei Proteine in der Lage sind, AcrylGTP zu binden. Die ermittelten  $k_{\text{off}}$ -Werte sind beinahe mit denen des Austauschs von GDP gegen GTP identisch. Dies entspricht der Erwartung, da der geschwindigkeitsbestimmende Schritt die GDP Freisetzung aus dem Rab:GDP Komplex ist.

Obwohl beide Mutanten in der Lage sind, AcrylGTP zu binden, erscheint die L125C Mutation aufgrund ihres geringeren Einflusses auf die Nukleotidbindung durch Rab1b besser zur Einführung der kovalenten Modifikation geeignet zu sein.

## 5.2 Kovalente Modifikation von Rab1b L125C und Rab1b K153C mit AcrylGTP

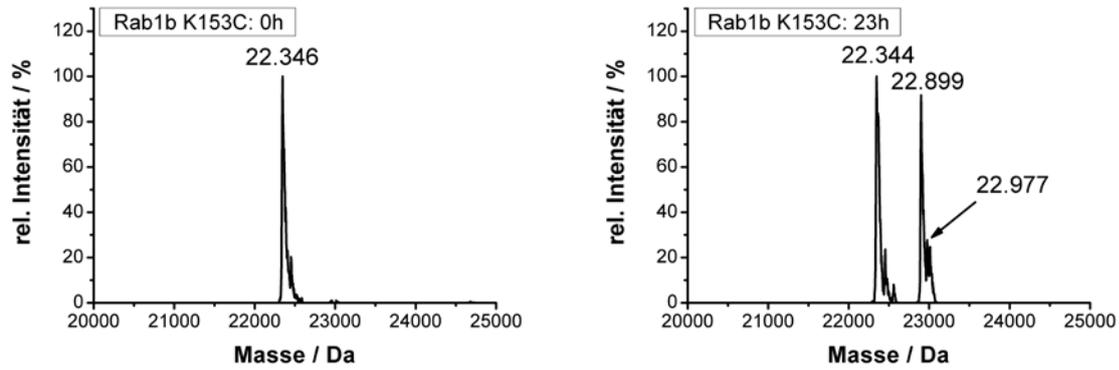
In dieser Versuchsreihe soll AcrylGTP unter Ausbildung einer kovalenten Bindung mit den Mutanten Rab1b L125C und Rab1b K153C zur Reaktion gebracht werden. Kontrollexperimente mit Rab1b wt sollen zeigen, dass die Reaktion ausschließlich an den durch Mutation eingeführten Cysteinen an den Positionen Leu 125 bzw. Lys 153 stattfindet. In Lösung vorhandenes oder proteingebundenes  $\text{Mg}^{2+}$  soll in Chelatkomplexen durch EDTA (Ethylen-diamintetraacetat) gebunden und so der Nukleotidaustausch von GDP durch AcrylGTP beschleunigt werden.

Die Reaktionskontrolle wurde mittels ESI-MS mit vorgeschalteter Umkehrphasen HPLC an einer analytischen C4-Säule durchgeführt. Pro Ansatz wurde eine 50  $\mu\text{M}$  Proteinkonzentration in 50  $\mu\text{L}$  Gesamtvolumen EDTA-Puffer eingestellt. Nach Zugabe von 10 Äq. AcrylGTP wurden die Ansätze bei 25 °C in einem Thermoschüttler bei 300 U/min inkubiert.



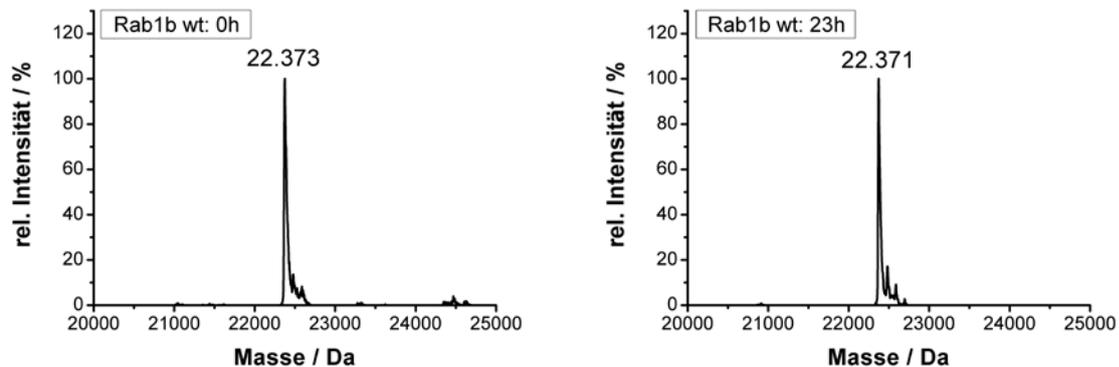
**Abb. 5.2.1:** Reaktionskontrolle der Modifikation von Rab1b L125C mit AcrylGTP mittels ESI-MS.

Theoretische Massen:	Rab1b L125C	: 22.355 Da
	Rab1b L125C-AcrylGDP	: 22.909 Da
	Rab1b L125C-AcrylGTP	: 22.989 Da



**Abb. 5.2.2:** Reaktionskontrolle der Modifikation von Rab1b K153C mit AcrylGTP mittels ESI-MS.

Theoretische Massen:	Rab1b K153C	: 22.340 Da
	Rab1b K153C-AcrylGDP	: 22.894 Da
	Rab1b K153C-AcrylGTP	: 22.974 Da



**Abb. 5.2.3:** Reaktionskontrolle der Modifikation von Rab1b wt mit AcrylGTP mittels ESI-MS.

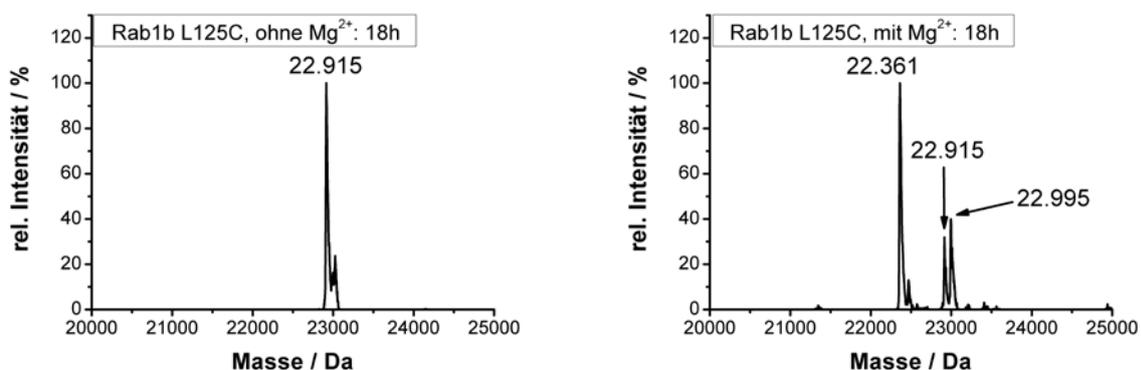
Theoretische Massen:	Rab1b wt	: 22.365 Da
	Rab1b wt-AcrylGDP	: 22.919 Da
	Rab1b wt-AcrylGTP	: 22.999 Da

Die Reaktionskontrolle der Modifikation von Rab1b L125C (Abb. 5.2.1) zeigt nach 23 h nur noch einen Massenpeak: 22.916 Da. Dies entspricht der Masse von Rab1b L125C als Addukt mit einem Molekül AcrylGDP. Die Reaktion von Rab1b K153C ist nach 23 h nur zu ca. 50 % abgeschlossen (Abb. 5.2.2). Neben der Masse von Rab1b K153C (22.344 Da) sind zwei weitere Peaks zusehen, die den Adduktmassen von Rab1b K153C-AcrylGDP (22.894 Da) und Rab1b K153C-AcrylGTP (22.974 Da) entsprechen. Rab1b wt reagiert nicht unter Ausbildung kovalenter Bindungen mit AcrylGTP: auch nach 23 h ist keine Adduktmasse von Rab1b wt mit einem Acrylnukleotid nachweisbar (Abb. 5.2.3).

Die Ergebnisse zeigen, dass AcrylGTP mit beiden Mutanten zur Reaktion gebracht werden kann. Allerdings ist die Reaktion mit Rab1b K153C auch nach 70 h Reaktionszeit nicht vollständig abgeschlossen und stagniert schließlich bei ca. 80 % Umsatz. Obwohl alle drei Rab-Varianten über zwei C-terminale, gut zugängliche Cysteine verfügen, sind keine Mehrfachmodifikationen oder eine Modifikation des Rab1b wt nachweisbar. Dies spricht dafür, dass die Modifikation tatsächlich an den durch Mutation eingeführten Cysteinen stattfindet. Die

kovalent gebundenen Nukleotide liegen nach 23 h vollständig (Rab1b L125C) bzw. fast vollständig (Rab1b K153C) als Diphosphate vor. Unter den Reaktionsbedingungen (pH=7,5; T=25 °C) ist der  $\beta$ - $\gamma$  Phosphatester jedoch über einen Zeitraum von 23 h stabil. Die Hydrolyse von AcrylGTP zu AcrylGDP zeigt also, dass das kovalent gebundene Nukleotid im aktiven Zentrum analog zu GTP koordiniert wird, und die intrinsische Hydrolysefähigkeit der Rab Proteine trotz Modifikation erhalten bleibt. Die Struktur der G-Domäne scheint durch die Modifikation nicht maßgeblich beeinträchtigt zu werden.

Die nicht beobachtete Modifikation der C-terminalen Cysteine deutet darauf hin, dass die konjugierte Addition zwischen den Seitenkettenthiole von Cysteinen und dem Acrylylrest von AcrylGTP mit einer sehr geringen Geschwindigkeit stattfindet. Erst die Erhöhung der lokalen Acrylylkonzentration an der Cysteinseitenkette durch Bindung des Acrylnukleotids würde dieser Annahme nach die Reaktionsgeschwindigkeit auf ein Maß anheben, dass die beobachtete Modifikation ermöglicht. Um diese Annahme zu überprüfen, wurden zwei Testreaktion mit Rab1b L125C und AcrylGTP durchgeführt: eine in Gegenwart von  $Mg^{2+}$ , eine ohne  $Mg^{2+}$  in Gegenwart von EDTA. Pro Ansatz wurde eine 50  $\mu$ M Proteinkonzentration in 50  $\mu$ L Gesamtvolumen Proteinstandard-/EDTA-Puffer eingestellt. Nach Zugabe von 10  $\text{\AA}$ q. AcrylGTP wurden die Ansätze bei 25 °C in einem Thermoschüttler bei 300 U/min inkubiert.



**Abb.5.2.4:** Vergleich der Reaktion von Rab1b L125C mit AcrylGTP in An- und Abwesenheit von  $Mg^{2+}$  mittels ESI-MS. Theoretische Massen:

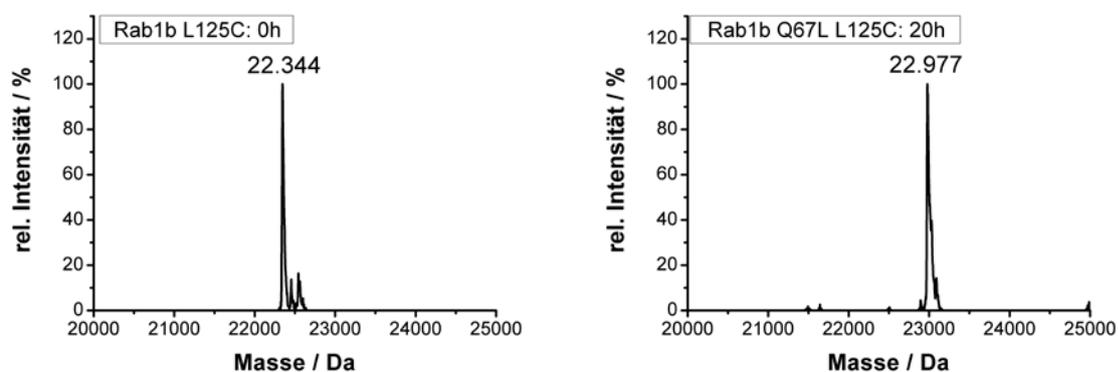
Rab1b L125C	: 22.355 Da
Rab1b L125C-AcrylGDP	: 22.909 Da
Rab1b L125C-AcrylGTP	: 22.989 Da

Die in Abwesenheit von  $Mg^{2+}$  durchgeführte Reaktion war nach 18 h vollständig abgeschlossen (Abb. 5.2.4). Für den Ansatz in Gegenwart von  $Mg^{2+}$  zeigt die Integration der Signalintensitäten nach 18 h, das lediglich 42 % des Rab Proteins mit AcrylGTP/AcrylGDP modifiziert worden sind. Diese Ergebnisse zeigen, dass ein direkter Zusammenhang zwischen dem Nukleotidaustausch und der Modifikation mit AcrylGTP besteht: Eine Beschleunigung der Nukleotidaustauschrate durch Entzug von  $Mg^{2+}$  hat eine Beschleunigung der Modifikationsreaktion zur Folge. Dies stützt die Annahme, dass eine Bindung von AcrylGTP im aktiven Zentrum des Rab Proteins und damit verbunden die Herstellung räumlicher Nähe zwischen den Reaktionspartnern Bedingung für die konjugierte Addition von Acrylylrest und Thiol ist.

### 5.3 Kovalente Modifikation von Rab1b Q67L L125C mit AcrylGTP: Darstellung von konstitutiv aktivem Rab1b

Durch Verwendung der hydrolysedefizienten Rab1b Q67L L125C Doppelmutante (Kap. 1.2.6, Burman *et al.*, 2010) soll die Hydrolyse von kovalent gebundenem AcrylGTP unterbunden und konstitutiv aktives Rab1b dargestellt werden.

Die Reaktionskontrolle wurde mittels ESI-MS mit vorgeschalteter HPLC an einer analytischen C4-Säule durchgeführt. Es wurde eine 50 µM Proteinkonzentration in 50 µL Gesamtvolumen EDTA-Puffer eingestellt. Nach Zugabe von 10 Äq. AcrylGTP wurde der Ansatz bei 25 °C in einem Thermoschüttler bei 300 U/min inkubiert.



**Abb. 5.3.1:** Reaktionskontrolle der Modifikation von Rab1b Q67L L125C mit AcrylGTP mittels ESI-MS.  
Theoretische Massen: Rab1b Q67L L125C : 22.340 Da  
Rab1b Q67L L125C-AcrylGDP : 22.894 Da  
Rab1b Q67L L125C-AcrylGTP : 22.974 Da

Die Modifikationsreaktion ist nach 20 h vollständig abgeschlossen. Es ist nur ein Massenpeak bei 22.977 Da zu sehen, das entspricht der Adduktmasse von Rab1b Q67L L125C mit einem Molekül AcrylGTP. Es ist kein mit AcrylGDP modifiziertes Protein nachweisbar: Die Rab1b Q67L L125C Doppelmutante verfügt über keine relevante intrinsische Hydrolyseaktivität und eignet sich zur Darstellung von konstitutiv inaktivem Rab1b.

#### 5.4 Bestimmung der Reaktionsgeschwindigkeit der konjugierten Addition von AcrylGTP an Rab1b Q67L L125C

Über Integration der Signalintensitäten einer nach der Zeit aufgelösten ESI-MS Messreihe soll die Reaktionsgeschwindigkeit der konjugierten Addition von AcrylGTP an Rab1b Q67L L125C bestimmt werden. Dazu wurde im Vorfeld ein Screening mit 50  $\mu\text{M}$  Rab1b Q67L L125C Lösungen in EDTA-Puffer nach der optimalen Reaktionstemperatur, pH-Wert und Äquivalenten AcrylGTP mit folgender Rasterung durchgeführt:

Temperatur:	10 °C, 15 °C, 20 °C, 25 °C, 30 °C, 35 °C
Äquivalente AcrylGTP:	1,5 Äq., 5 Äq., 7,5 Äq., 10 Äq.
pH:	7,5 und 8,5

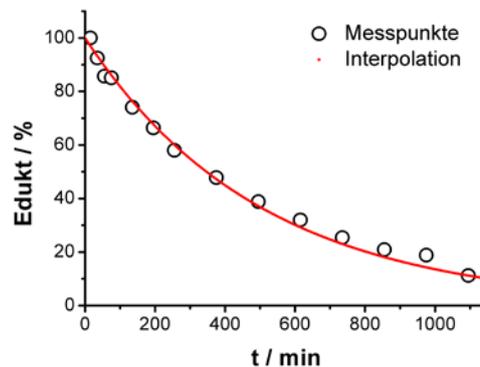
ESI-MS Proben wurden ab 14 h Reaktionszeit alle zwei Stunden entnommen. Als optimale Reaktionsbedingungen unter den Gesichtspunkten einer möglichst kurzen Reaktionszeit und vollständiger Modifikation wurden folgende Werte ermittelt:

Temperatur:	25 °C
Äquivalente AcrylGTP:	7,5 Äq.
pH:	7,5 oder 8,5

Nur unter diesen Reaktionsbedingungen war eine vollständige Modifikation nach 18 h zu beobachten. Niedrigere Temperaturen führten zu längeren Reaktionszeiten, höhere Temperaturen zu unvollständigen Reaktionen. Eine Erklärung dafür ist die Denaturierung von Teilen des Rab Proteins: Bei 35 °C ist nach 18 h Niederschlag zu erkennen. Mehr als 7,5 Äq. AcrylGTP hatten keinen positiven Einfluss auf die Reaktionsgeschwindigkeit, die Reaktionen mit 5 Äq. hingegen liefen langsamer ab, mit 1,5 Äq. war keine vollständige Modifikation zu erreichen. Sowohl die Reaktionen bei pH=7,5 und pH=8,5 bei 25 °C mit 7,5 Äq. AcrylGTP waren nach 18 h vollständig abgeschlossen. Ein Einfluss des pH-Werts in der Spanne zwischen pH=7,5 und pH=8,5 konnte im Rahmen dieses Versuchsaufbaus nicht nachgewiesen werden.

Für die Ermittlung der Reaktionsgeschwindigkeit der konjugierten Addition wurde eine 50  $\mu\text{M}$  Rab1b Q67L L125C Konzentration in 1500  $\mu\text{L}$  Gesamtvolumen EDTA-Puffer eingestellt. Nach Zugabe von 7,5 Äq. AcrylGTP wurde der Ansatz 30 min bei 25 °C im Thermoschüttler bei 300 U/min inkubiert und im Anschluss bei 25 °C in der Probenkammer des ESI-MS gelagert. Die Reaktionskontrollen mittels ESI-MS wurden mit vorgeschalteter HPLC an einer ana-

lytischen C4-Säule durchgeführt. Die Signalintensitäten wurden mit Hilfe des Programms OriginPro8 integriert (Abb. 5.4.1).



**Abb. 5.4.1:** Auftrag der integrierten ESI-MS Signalintensitäten des unmodifizierten Rab1b Q67L L125C gegen die Zeit.

Die Daten wurden im Zeitintervall 50-1000 min mit dem Programm GraFit als einfach exponentielle Funktion für eine Reaktion pseudoerster Ordnung interpoliert:

$$E = E_a \cdot e^{(-k_{obs} \cdot t)}$$

**Formel 5.4.2:** Konstanten:  $E_a$  = unmodifiziertes Protein bei  $t_0$   
 Parameter:  $k_{obs}$  = beobachtete Geschwindigkeitskonstante der Produktbildung  
 Variable:  $t$  = Zeit in Minuten

Die Daten wurden unter der Annahme interpoliert, dass ab  $t=50$  min der Nukleotidaustausch abgeschlossen ist und das Rab Protein vollständig AcrylGTP gebunden vorliegt. Nach 24 h (1440 min) konnte mittels ESI-MS kein unmodifiziertes Rab1b mehr nachgewiesen werden. Für die Geschwindigkeitskonstante der Reaktion pseudoerster Ordnung wurde so folgender Wert ermittelt:

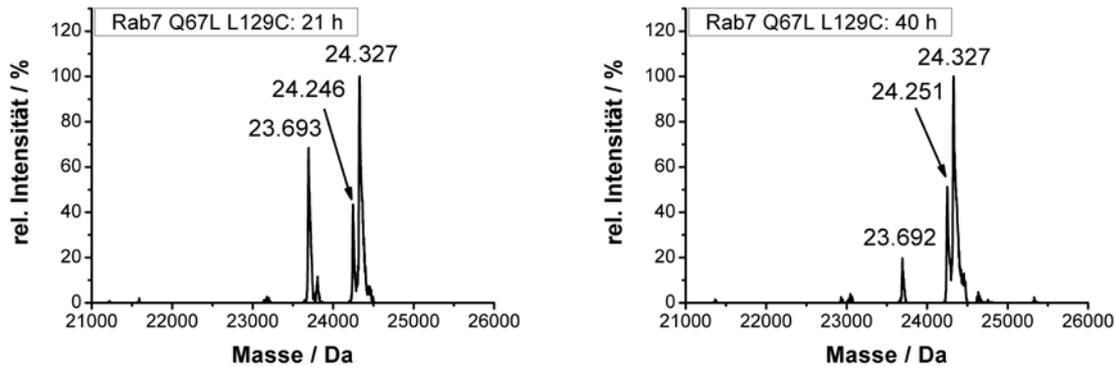
$$k_{obs} = 3,3 \cdot 10^{-5} \text{ s}^{-1}, \sigma_k = 8,1 \cdot 10^{-7}$$

Das entspricht einem halben Formelumsatz der konjugierten Addition nach 5,9 h.

## 5.5 Kovalente Modifikation von Rab7 Q67L L129C mit AcrylGTP

Die Mutation L129C in Rab7 entspricht der Mutation L125C in Rab1b. Mit der Mutante Rab7 Q67L L129C soll konstitutiv aktives Rab7 dargestellt werden.

Die Reaktionskontrolle wurde mittels ESI-MS mit vorgeschalteter HPLC an einer analytischen C4-Säule durchgeführt. Es wurden eine 50  $\mu\text{M}$  Proteinkonzentrationen in je 50  $\mu\text{L}$  Gesamtvolumen EDTA-Puffer eingestellt. Nach Zugabe von je 7,5  $\mu\text{M}$  AcrylGTP wurden die Ansätze bei 25 °C in einem Thermoschüttler bei 300 U/min inkubiert.



**Abb. 5.5.1:** Reaktionskontrolle der Modifikation von Rab7 Q67L L129C mit AcrylGTP mittels ESI-MS.

Theoretische Massen: Rab7 Q67L L129C : 23.689 Da  
 Rab7 Q67L L129C-AcrylGDP : 24.243 Da  
 Rab7 Q67L L129C-AcrylGTP : 24.323 Da

Nach 21 h sind in der ESI-MS Kontrolle drei Massenpeaks zu erkennen, die dem unmodifizierten Rab7 Q67L L129C (23.693 Da), sowie dem einfach mit AcrylGDP (24.246 Da) und einfach mit AcrylGTP (24.327 Da) modifizierten Protein zuzuordnen sind. Nach 40 h ist die Reaktion beinahe abgeschlossen (Abb. 5.5.1). Auch wenn die konjugierte Addition an Rab7 Q67L L129C langsamer abläuft als an Rab1b Q67L L125C, eignet sich die L129C Mutation in Rab7 analog zu der L125C Mutation in Rab1b zur kovalenten Modifikation mit Acrylnukleotiden. Überraschenderweise wird das gebundene AcrylGTP jedoch trotz Q67L Mutation im Laufe der Modifikationsreaktion in nicht zu vernachlässigender Weise (~24 % nach 40 h) hydrolysiert. Auch vorherige Dialyse der eingesetzten Rab7 Mutante gegen  $Mg^{2+}$ -freien EDTA-Puffer konnte in einem weiteren Experiment die Hydrolyse nicht unterbinden.

## 5.6 Kovalente Modifikation von Rab7 L129C und Rab1b L125C mit AcrylGppCH<sub>2</sub>p

Die Rab7 Q67L L129C Mutante ist nicht vollständig hydrolysedefizient und daher ungeeignet zur Darstellung von konstitutiv aktivem Rab7. Die Hydrolyseaktivität von Rab1b Q67L L125C kann durch das TBC Domänen GAP TBC1D20 teilweise wiederhergestellt werden (Pan *et al.*, 2006), was sich im Hinblick auf zellbiologische Experimente als nachteilig erweisen kann. Daher sollen Rab7 L129C und Rab1b L125C in diesem Versuch mit dem nicht hydrolysierbaren AcrylGTP Analog AcrylGppCH<sub>2</sub>p modifiziert werden. Die 5'  $\beta,\gamma$ -Methylengruppe im AcrylGppCH<sub>2</sub>p hat vom 5'  $\beta,\gamma$ -Sauerstoff im GTP abweichende Bindungswinkel und Längen (Engel 1977). Dies führt zu deutlich herabgesetzten Affinitäten des AcrylGppCH<sub>2</sub>p zu Rab7 L129C und Rab1b L125C im Vergleich zu GDP. Das Bindungsgleichgewicht liegt in Gegenwart von GDP und AcrylGppCH<sub>2</sub>p auf Seiten des GDP gebundenen Proteins, so dass eine kovalente Modifikation mit AcrylGppCH<sub>2</sub>p durch GDP drastisch verlangsamt wird.

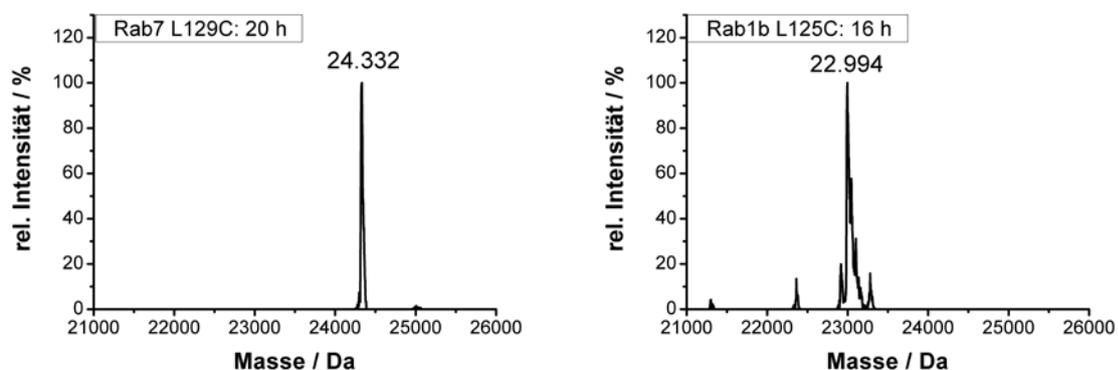
Um die Bindung von AcrylGppCH<sub>2</sub>p zu beschleunigen, soll GDP *in situ* durch Alkalische Phosphatase (AP) zu Guanosin abgebaut werden. Die nicht spezifische Phosphomonoeste-

rase ist ein dimeres Metalloenzym mit zwei  $Zn^{2+}$  und einem  $Mg^{2+}$  Ion in jedem seiner aktiven Zentren (Kim *et al.*, 1990). Um das proteingebundene GDP für die AP verfügbar zu machen, muss die Nukleotidfreisetzung beschleunigt werden. Für Rab1b L125C ist dazu mit DrrA<sub>GEF</sub> ein GEF verfügbar. Rab7 L129C soll gegen EDTA Puffer dialysiert werden. Da der katalytische Mechanismus der AP  $Zn^{2+}$  abhängig ist (Kim *et al.*, 1990), muss das EDTA vor der Modifikationsreaktion in Gegenwart von AP wieder entfernt werden.

Rab1b L125C: Es wurde eine 50  $\mu$ M Proteinkonzentrationen in 50  $\mu$ L Gesamtvolumen Proteinstandardpuffer eingestellt. Nach Zugabe von 2,5 pmol DrrA<sub>GEF</sub> (50 nM), 18,8 nmol AcrylGppCH<sub>2</sub>p (375  $\mu$ M, 7,5  $\text{\AA}$ q.) und 2 U AP wurde der Ansatz bei 25 °C und 300 U/min im Thermoschüttler inkubiert.

Rab7 L129C: Es wurde eine 50  $\mu$ M Proteinkonzentration in 100  $\mu$ L Gesamtvolumen EDTA-Puffer eingestellt. Die Lösung wurde für 60 min bei RT gegen 50 mL EDTA-Puffer dialysiert. Im Anschluss wurde das Protein an einer NAP5 Säule mit  $Mg^{2+}$  freiem Proteinstandardpuffer entsalzen. Das gesammelte Eluat wurde konzentriert, bis eine 50  $\mu$ M Proteinkonzentration erreicht war. Zu 50  $\mu$ L der 50  $\mu$ M Rab7 L129C Lösung wurden 18,8 nmol AcrylGppCH<sub>2</sub>p (375  $\mu$ M, 7,5  $\text{\AA}$ q.) und 2 U AP gegeben. Der Ansatz wurde bei 25 °C und 300 U/min im Thermoschüttler inkubiert.

Die Reaktionskontrollen wurden mittels ESI-MS mit vorgeschalteter Umkehrphasen HPLC an einer analytischen C4-Säule durchgeführt.



**Abb. 5.6.1:** Reaktionskontrolle der Modifikation von Rab1b L125C und Rab7 L129C mit AcrylGTP mittels ESI-MS.

Theoretische Massen:	Rab1b L125C	: 22.355 Da
	Rab1b L125C-AcrylGppCH <sub>2</sub> p	: 22.970 Da
	Rab7 L129C	: 23.704 Da
	Rab7 L129C-AcrylGppCH <sub>2</sub> p	: 24.336 Da

Nach 20 h sind beide Reaktionen abgeschlossen. Die detektierten Massen entsprechen den Adduktmassen von AcrylGppCH<sub>2</sub>p mit Rab1b L125C (22.994 Da) und Rab7 L129C (24.332 Da). Die Modifikation mit AcrylGppCH<sub>2</sub>p ermöglicht die Darstellung von konstitutiv aktivem Rab1b und Rab7 ohne Q67L Mutation.

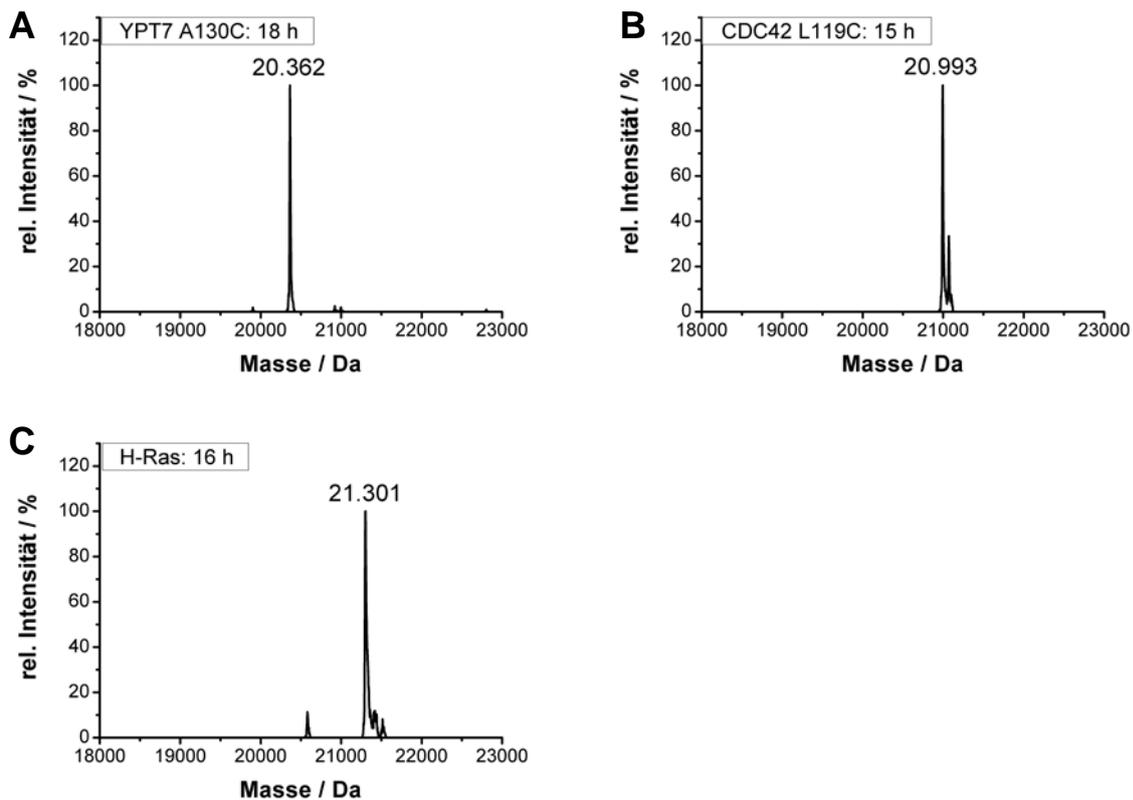
## 5.7 Kovalente Modifikation von Ypt7, CDC42 und H-Ras mit AcrylGTP

In diesem Experiment soll an Ypt7, CDC42 und H-Ras untersucht werden, ob die Einführung von Cys an Position Leu125 in Rab1 einen allgemeinen Ansatz zur kovalenten Modifikation von kleinen G-Proteinen darstellt.

Ypt7 ist ein Rab7 homolog aus *S. cerevisiae*, das an der Regulation von endozytotischen Prozessen beteiligt ist (Wichmann *et al.*, 1992).

CDC42 (*cell division controll protein 42*) ist ein kleines G-Protein aus *S. cerevisiae* und Mitglied der Rho-Unterfamilie. Es ist beteiligt an der Ausbildung der Zellpolarität während der Zellteilung (Gao *et al.*, 2007).

In beiden Proteinen wurden die zu Leu 125 in Rab1b analogen Aminosäuren durch Cys substituiert. Die Mutanten Ypt7 A130C und CDC42 L119C sollen mit AcrylGTP modifiziert werden. Das G4 Motiv von H-Ras besteht aus den Aminosäuren NKCD L. Das auf Asp folgende Leu entspricht Leu 125 in Rab1b. In einem weiteren Experiment soll überprüft werden, ob das Cys im H-Ras G4 Motiv für die Modifikation mit AcrylGTP zugänglich ist.



**Abb. 5.7.1:** Reaktionskontrolle der Modifikation von **A:** Ypt7 A130C, **B:** CDC42 L119C und **C:** H-Ras mit AcrylGTP mittels ESI-MS.

Theoretische Massen:	Ypt7 A130C	: 20.363 Da
	CDC42 L119C	: 20.994 Da
	H-Ras	: 21.298 Da

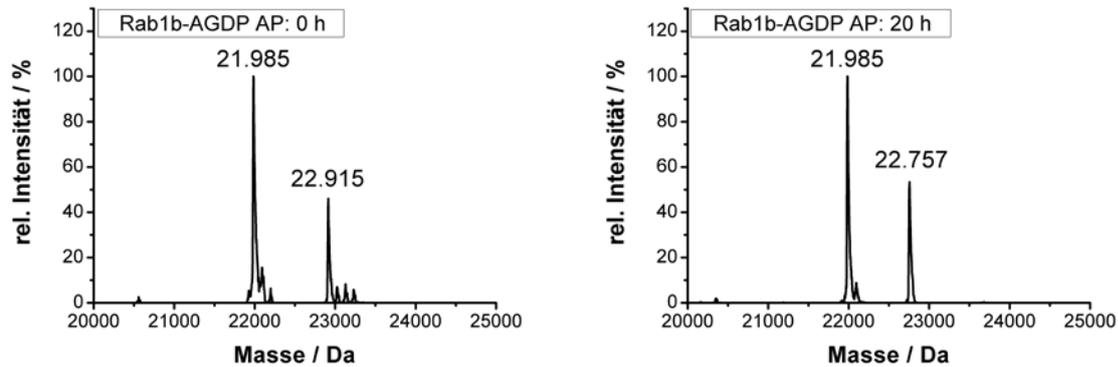
Pro Ansatz wurde eine 50  $\mu\text{M}$  Proteinkonzentration in 50  $\mu\text{L}$  Gesamtvolumen EDTA-Puffer eingestellt. Nach Zugabe von 10  $\text{\AA}q$ . AcrylGTP wurden die Ansätze bei 25  $^{\circ}\text{C}$  in einem Thermoschüttler bei 300 U/min inkubiert. Die Reaktionskontrollen mittels ESI-MS wurden mit vorgeschalteter Umkehrphasen HPLC an einer analytischen C4-Säule durchgeführt.

In keinem der Experimente konnte eine Modifikation des jeweiligen Proteins nachgewiesen werden (Abb. 5.7.1). Um sicherzustellen, dass ein Nukleotidaustausch stattgefunden hat, wurden die Proben mittels NAP5 Säulen entsalzen und die im jeweiligen Protein gebundenen Nukleotide mittels Umkehrphasen HPLC analysiert: Für jeden Ansatz konnte ein 1:9 Verhältnis von GDP zu AcrylGTP ermittelt werden. Obwohl ein Nukleotidaustausch stattgefunden hat sind die Seitenketten der Cysteine Cys 130 in Ypt7, Cys 119 in CDC42 sowie Cys 118 in H-Ras für eine konjugierte Addition an den Acrylylrest des AcrylGTPs nicht zugänglich.

### **5.8 Kovalente Modifikation von Rab1b L125C mit Acrylguanosin: Darstellung von nukleosidgebundenem Rab1b**

Durch Reaktion der Rab1b Mutanten Rab1b L125C sowie Rab1b Q67L L125C mit AcrylGTP und AcrylGppCH<sub>2</sub>p ist es möglich, konstitutiv inaktive und aktive Rab1b Proteine darzustellen. In diesem Experiment soll Rab1b so modifiziert werden, dass es nicht in der Lage ist, GDP oder GTP zu binden. Durch Modifikation mit Acrylguanosin (AcrylG) oder AcrylGMP soll virtuell und konstitutiv nukleotidfreies Rab1b generiert werden, das weder in der aktiven noch in der inaktiven Konformation vorliegt. Die Affinität von kleinen G-Proteinen zu GMP ist deutlich geringer als zu GDP/GTP. Der Unterschied zwischen den Dissoziationskonstanten der Komplexe H-Ras:GMP ( $K_D=10^{-5}$  M) und H-Ras:GTP ( $K_D=10^{-11}$  M) hat den Faktor  $10^6$  (Goody *et al.*, 1991, John *et al.*, 1990, Rensland *et al.*, 1995). Tatsächlich konnte in vorangegangenen Versuchen Rab1b nicht direkt mit AcrylGMP modifiziert werden. Dies steht mit der Theorie im Einklang, dass die Bindung des Acrylnukleotides am kleinen G-Protein Bedingung für die kovalente Modifikation ist. Aus diesem Grund soll Rab1b L125C in einem ersten Schritt mit AcrylGTP modifiziert werden. Das kovalent gebundene Nukleotid soll anschließend durch Alkalische Phosphatase zu Acrylguanosin hydrolysiert werden. Durch Zugabe von DrrA<sub>GEF</sub> soll das Nukleotid für die AP verfügbar gemacht werden.

Zu 25  $\mu\text{L}$  einer 50  $\mu\text{M}$  Rab1b L125C-AcrylGDP (1,25 nmol) Lösung in Proteinstandardpuffer wurden 1,25 nmol DrrA<sub>GEF</sub> (50  $\mu\text{M}$ ) und 10 U AP gegeben. Der Ansatz wurde bei 25  $^{\circ}\text{C}$  in einem Thermoschüttler bei 300 U/min inkubiert. Die Reaktionskontrollen mittels ESI-MS wurden mit vorgeschalteter Umkehrphasen HPLC an einer analytischen C4-Säule durchgeführt.



**Abb. 5.8.1:** Reaktionskontrolle der Hydrolyse von Rab1b L125C-AcrylGDP zu Rab1b L125C-Acrylguanosen mittels ESI-MS

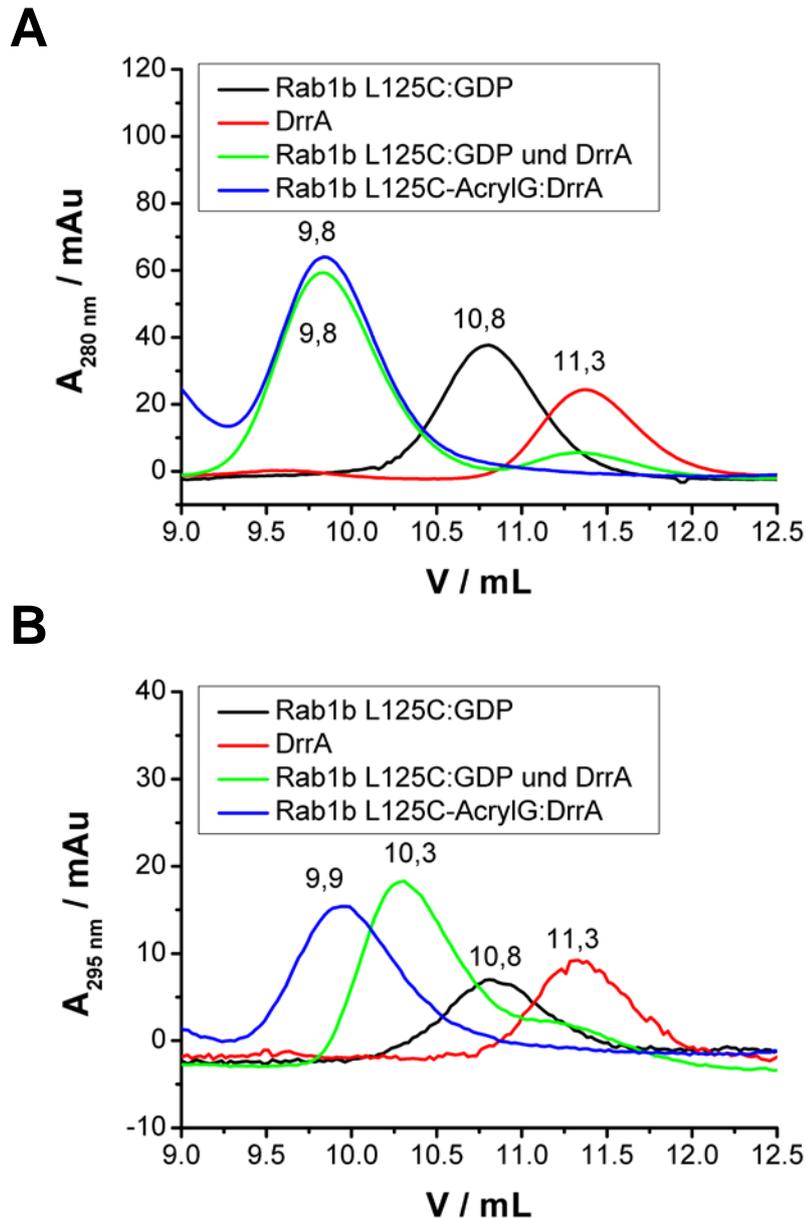
Theoretische Massen:	Rab1b L125C-AcrylGDP	: 22.909 Da
	Rab1b L125C-Acrylguanosen	: 22.749 Da
	DrrA <sub>GEF</sub>	: 21.982 Da

Nach 20 h ist die Reaktion vollständig abgeschlossen. Die mittels ESI-MS detektierten Massen entsprechen der Masse von DrrA<sub>GEF</sub> (21.985 Da) und der Adduktmasse von Rab1b L125C und AcrylG (22.757 Da). Die Analyse des erhaltenen Produkts mittels Größenausschlusschromatographie (Kap.5.9) zeigt, dass das Rab1b L125C-AcrylG nicht frei, sondern quantitativ im Komplex mit DrrA<sub>GEF</sub> vorliegt.

### 5.9 Nachweis der Komplexstabilität von Rab1b L125C-Acrylguanosen:DrrA<sub>GEF</sub> in Gegenwart von GDP

In diesem Experiment soll untersucht werden, ob kovalent mit AcrylG modifiziertes Rab1b Nukleotide binden kann oder auch in Gegenwart von GDP in einem nukleotidfreiem Zustand bleibt. Als Indikator soll die Stabilität des Rab1b L125C AcrylG:DrrA<sub>GEF</sub> Komplexes in Gegenwart von GDP verwendet werden: gemessen wird die Retentionszeit des Komplexes bei einer Größenausschlusschromatographie an einer analytischen SD75 Säule. Je stärker sich das Gleichgewicht durch Bindung von GDP auf die Seite der voneinander dissoziierten Proteine verschiebt, desto kürzer liegen sie im statistischen Mittel als Komplex vor, was sich bei einer Größenausschlusschromatographie in einer Erhöhung des Retentionsvolumens auswirkt.

Als Laufmittel wurde in einer ersten Messreihe Proteinstandardpuffer verwendet, in einer zweiten Messreihe wurde Proteinstandardpuffer mit 100  $\mu$ M GDP eingesetzt. Die Flussgeschwindigkeit betrug 0,5 mL/min. Gemessen wurde im GDP-freien Puffer die Absorption bei 280 nm. Aufgrund der starken Absorption des GDP-haltigen Puffers bei 280 nm wurde in der zweiten Messreihe die Absorption bei 295 nm gemessen. Es wurden jeweils 120  $\mu$ L einer 15  $\mu$ M Proteinlösung im jeweiligen Laufmittel in eine 100  $\mu$ L Schleife injiziert (1,5 nmol).



**Abb. 5.9.1.:** Größenausschlusschromatographie an einer analytischen SD75 Säule mit einem Fluss von 0,5 mL/min.

**A:** Läufe in Proteinstandardpuffer ohne GDP. **B:** Läufe in Proteinstandardpuffer mit 100  $\mu$ M GDP.

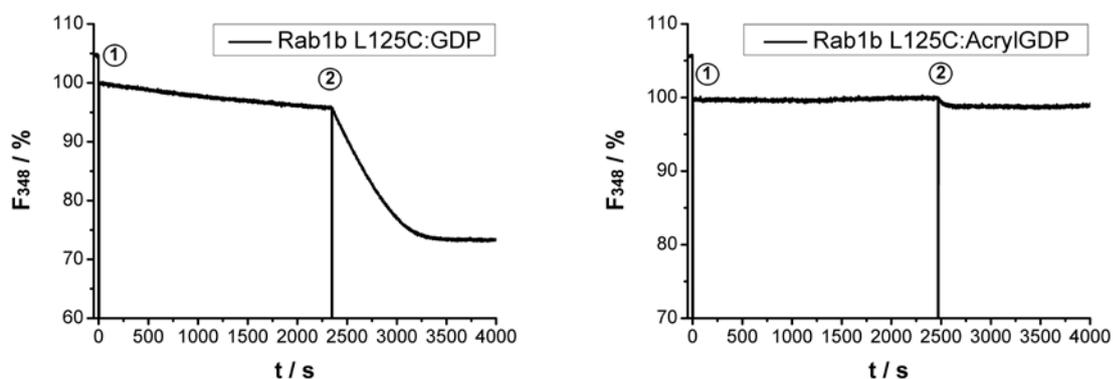
Sowohl Rab1b L125C:GDP als auch Rab1b L125C-AcrylG bilden im GDP freien Puffer Komplexe mit DrrA<sub>GEF</sub> (Abb. 5.9.1, **A**). Beide Komplexe haben in den Chromatogrammen identische Retentionsvolumen, in keinem Chromatogramm ist freies Rab zu erkennen. Auch in Gegenwart von 100  $\mu$ M GDP (Abb. 5.9.1, **B**) wird der Rab1b L125C:DrrA<sub>GEF</sub> Komplex nicht vollständig dissoziiert, es ist weder freies Rab noch DrrA<sub>GEF</sub> nachweisbar. Jedoch ist eine Verschiebung des Retentionsvolumens des Peaks von 9,8 mL hin zu 10,3 mL zu beobachten. Ursache der beobachteten Abnahme der Partikelgröße ist die Einstellung eines dynamischen Gleichgewichts, in dem Rab1b L125C sowohl im Komplex mit GDP als auch mit DrrA<sub>GEF</sub> vorliegt. Der Einfluss von GDP auf den Rab1b L125C-AcrylG:DrrA<sub>GEF</sub> Komplex ist dagegen minimal, das Retentionsvolumen des Komplexpeaks bleibt mit 9,9 mL im Vergleich zu

9,8 mL im GDP-freien Puffer annähernd gleich. Die Gegenwart von GDP führt also nicht zu einer signifikanten Verschiebung des Dissoziationsgleichgewichts des Rab1b L125C-AcrylG:DrrA<sub>GEF</sub> Komplexes. Die kovalente Modifikation mit AcrylG hat einen inhibitorischen Effekt auf die Bindung von GDP und damit die Dissoziation des Rab1b L125C-AcrylG:DrrA<sub>GEF</sub> Komplexes. Die Ergebnisse zeigen, dass mit Rab1b L125C-AcrylG ein kleines G-Protein dargestellt werden konnte, das auch in Gegenwart von GDP konstitutiv virtuell nukleotidfrei vorliegt.

### 5.10 Inhibition des Nukleotidaustauschs an Rab1b L125C durch kovalente Modifikation mit AcrylGDP

Durch Messung der Tryptophanfluoreszenz an Rab1b L125C-AcrylGDP soll untersucht werden, ob die kovalente Modifikation sowohl den intrinsischen als auch GEF vermittelten Nukleotidaustausch am Rab1b L125C verhindert.

Gemessen wurde die intrinsische Tryptophanfluoreszenz bei 25 °C (Goody *et al.*, 2012). Es wurde Proteinstandardpuffer verwendet, das Probenvolumen betrug jeweils 1 mL. Es wurde eine 2 µM Proteinkonzentration eingestellt. Nach Stabilisierung der Emissionsintensität bei 348 nm wurden 50 nmol (50 µM) GppNHp zugegeben. Nach ~35 min wurden 20 pmol (20 nM) DrrA<sub>GEF</sub> zugegeben.



**Abb. 5.10.1:** Intrinsischer und DrrA<sub>GEF</sub> vermittelter Nukleotidaustausch an Rab1b L125C:GDP (links) und Rab1b L125C-AcrylGDP (rechts). Dargestellt ist die Änderung der Trp-fluoreszenz bei 348 nm in Abhängigkeit von der Zeit.

- 1.) Zugabe von 50 nmol GppNHp
- 2.) Zugabe von 20 pmol DrrA<sub>GEF</sub>

In Abb. 5.10.1 ist links der intrinsische und DrrA<sub>GEF</sub> vermittelte Austausch von GDP gegen GppNHp an Rab1b L125C zu abgebildet. Im Vergleich dazu ist deutlich zu sehen, dass weder die Zugabe von GppNHp noch von DrrA<sub>GEF</sub> zu Rab1b L125C-AcrylGDP zu einer Fluoreszenzabnahme führt. Die beiden Trp in Rab1b (Trp62 und Trp102) befinden sich im β-Faltblatt β3 und der α-Helix α4. Sie liegen damit an der zur Acrylgruppe entgegengesetzten Seite des

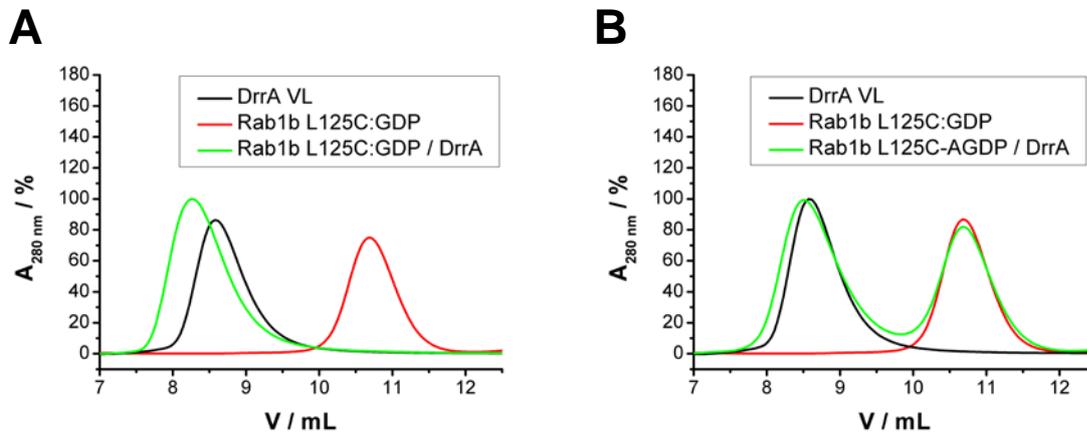
Proteins, womit ein quenchender Effekt der Modifikation auf die Tryptophanfluoreszenz effektiv ausgeschlossen werden kann.

Die kovalente Modifikation mit AcrylGDP verhindert sowohl den intrinsischen als auch den GEF vermittelten Nukleotidaustausch.

### 5.11 Interaktion von Rab1b L125C-AcrylGDP mit DrrA

In Kap. 5.10 konnte gezeigt werden, dass die kovalente Modifikation mit AcrylGDP auch DrrA katalysierten Nukleotidaustausch unterbindet. In diesem Experiment soll untersucht werden, ob durch die kovalente Modifikation mit AcrylGDP die Komplexbildung mit DrrA inhibiert wird.

Es wurden je 50  $\mu\text{L}$  einer 100  $\mu\text{M}$  Rab1b L125C:GDP bzw. Rab1b L125C-AcrylGDP Lösung (Proteinstandardpuffer) mit 50  $\mu\text{L}$  einer 100  $\mu\text{M}$  DrrA (Volllänge) Lösung (Proteinstandardpuffer) vereint und 60 min bei 25  $^{\circ}\text{C}$  und 300 U/min im Thermoschüttler inkubiert. Die Proben wurden mittels Größenausschlusschromatographie an einer analytischen SD75 Säule analysiert. Als Laufmittel wurde Proteinstandardpuffer bei einem Fluss von 0,5 mL/min verwendet. Es wurden jeweils 120  $\mu\text{L}$  einer 29  $\mu\text{M}$  Proteinlösung in eine 100  $\mu\text{L}$  Schleife injiziert (2,9 nmol).



**Abb. 5.11.1:** Größenausschlusschromatographie an einer analytischen SD75 Säule mit einem Fluss von 0,5 mL/min.

**A:** Rab1b L125C:GDP und DrrA (Volllänge).

**B:** Rab1b L125C-AcrylGDP und DrrA (Volllänge).

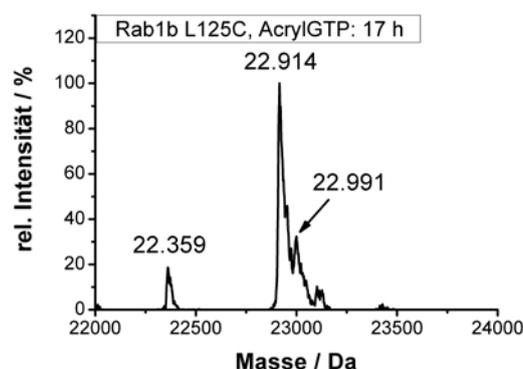
Im Chromatogramm der Komplexbildung zwischen Rab1b L125C:GDP und DrrA ist nur ein Peak zu sehen. Das Fehlen des DrrA und Rab1b L125C:GDP Peaks zeigt vollständige Komplexbildung an (Abb. 5.11.1, **A**). Im Gegensatz dazu ist im Ansatz mit Rab1b L125C-AcrylGDP und DrrA keine Komplexbildung nachzuweisen. Das Chromatogramm zeigt zwei Peaks, die in Intensität und Retentionsvolumen mit den Peaks beider Edukte übereinstimmen (Abb. 5.11.1, **B**). Das Rab1b L125C-AcrylGDP verhält sich damit gegenüber DrrA er-

wartungsgemäß: Komplexe zwischen GEFs und kleinen G-Proteinen sind in der Gegenwart von Guanosinnukleotiden instabil (Vetter *et al.*, 2001).

### 5.12 Bestimmung des Einflusses der kovalenten Modifikation von Rab1b mit AcrylGTP auf die Interaktion mit dem Rab1b GAP TBC1D20

In diesem Experiment soll untersucht werden, ob die Mutation von Leu 125 zu Cys oder die kovalente Modifikation mit AcrylGTP einen negativen Einfluss auf die Interaktion von Rab1b mit seinem GAP TBC1D20 hat. Als Indikator der Interaktion soll die TBC1D20 katalysierte Beschleunigung der GTP Hydrolyse gemessen werden. Die beobachtete Messgröße ist die intrinsische Trp-Fluoreszenz von Rab1b in Abhängigkeit von der Zeit.

In der Versuchsplanung wurde der direkte Vergleich der TBC1D20 katalysierten Hydrolyse zwischen Rab1b L125C:GTP und Rab1b L125C-AcrylGTP angestrebt. Vergleiche der intrinsischen Hydrolyseraten verschiedener kleiner G-Proteine (Rab6:  $5 \cdot 10^{-6} \text{ s}^{-1}$  (Bergbrede *et al.*, 2005); Rab5:  $5,5 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ ; Rab7:  $4,5 \cdot 10^{-5} \text{ s}^{-1}$  (Simon *et al.*, 1996); Rab1b:  $4,3 \cdot 10^{-5} \text{ s}^{-1}$  (Müller *et al.*, 2012); H-Ras (p21):  $5,5 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$  (Scheidig *et al.*, 1994)) mit der beobachteten Umsatzrate der konjugierten Addition an Rab1b L125C ( $k_{\text{obs}} = 3,26 \cdot 10^{-5} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ , Kap. 5.4) zeigen hier jedoch ein generelles Problem auf: Außer für Rab6, dass unter den Rab Proteinen aufgrund seiner geringen intrinsischen Hydrolyserate hervorsteht, ist die Geschwindigkeit der konjugierten Addition tendenziell geringer als die bekannten Hydrolyseraten. Dies führt dazu, dass bei vollständigem Abschluss der kovalenten Modifikation auch der größte Teil des kovalent gebundenen AcrylGTPs bereits hydrolysiert wäre. Dies deckt sich mit den Beobachtungen aus den kovalenten Modifikationen von Rab1b L125C (Abb. 5.12.1) und Rab7 L129C:



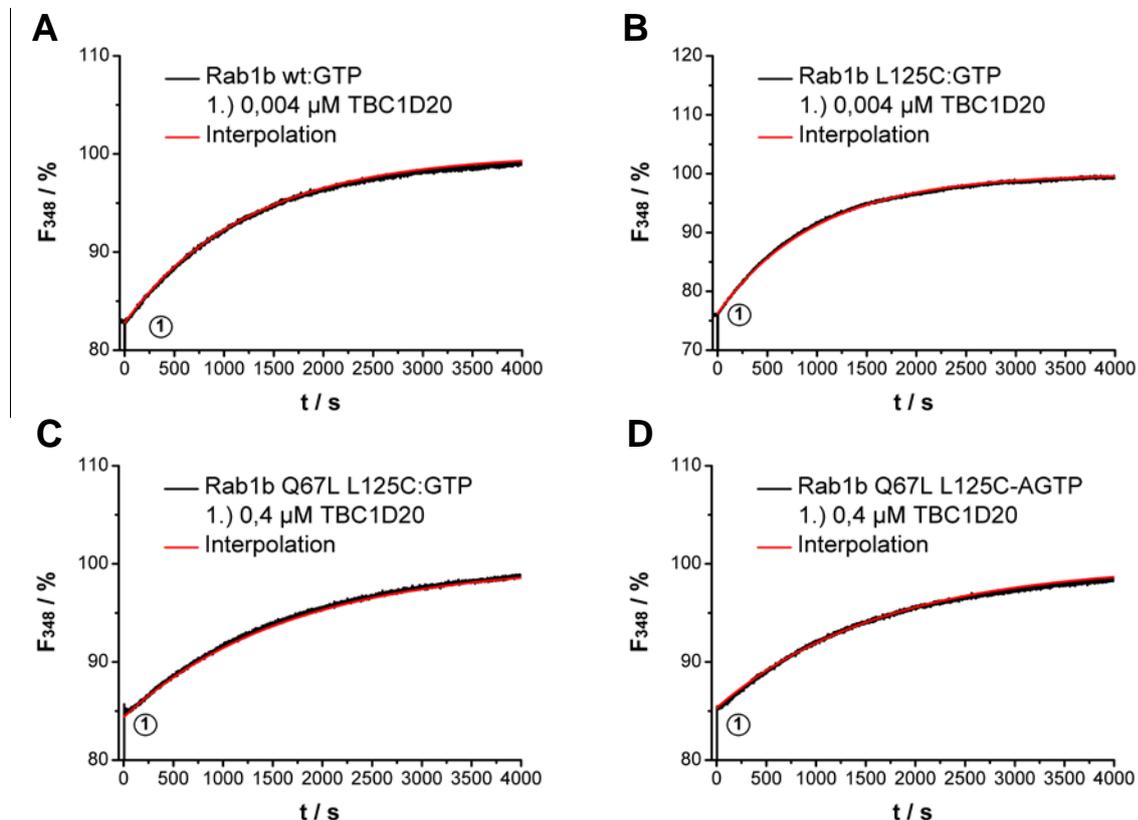
**Abb. 5.12.1:** Reaktionskontrolle der Modifikation von Rab1b L125C mit 7,5 Äq. AcrylGTP bei 25 °C nach 17 h mittels ESI-MS.

Theoretische Massen:	Rab1b L125C	: 22.355 Da
	Rab1b L125C-AcrylGDP	: 22.909 Da
	Rab1b L125C-AcrylGTP	: 22.989 Da

Die Integration der Peakflächen ergibt, dass die Reaktion nach 17 h zu 88 % abgeschlossen ist, und bereits 75 % des kovalent gebundenen AcrylGTPs zu AcrylGDP hydrolysiert wurden.

Versuche, durch Eliminierung von  $Mg^{2+}$  mittels Dialyse gegen EDTA-Puffer und anschließende Entsalzung über NAP5 Säulen die Hydrolyse zu unterbinden, waren nicht erfolgreich. Aus diesem Grund soll in diesem Experiment die hydrolysedefiziente Rab1b Q67L L125C Mutante eingesetzt werden. Möglich ist dies aufgrund der Besonderheit von TBC-Domänen GAPs, ein eigenes Gln in das aktive Zentrum von Rab Proteinen einzuführen und so die Hydrolysefähigkeit von Q67L (in Rab1b) und analogen Mutanten teilweise wiederherzustellen (Kap. 1.2.4) (Pan *et al.*, 2006).

Gemessen wurde die intrinsische Tryptophanfluoreszenz bei 25 °C. Es wurde Proteinstandardpuffer verwendet, das Probenvolumen betrug jeweils 1 mL. Es wurde eine 4  $\mu$ M Proteinkonzentration eingestellt. Nach Stabilisierung der Emissionsintensität bei 348 nm wurden für Rab1b wt und Rab1b L125C 4 fmol TBC1D20 (4 pM) und für Rab1b Q67L L125C 400 fmol TBC1D20 (400 pM) zugegeben.



**Abb. 5.12.2:** TBC1D20 katalysierte Hydrolyse von GTP und AcylGTP durch Rab1b. Dargestellt ist die Änderung der Tryptophanfluoreszenz bei 348 nm in Abhängigkeit von der Zeit.

**A:** Rab1b wt:GTP und 0,004  $\mu$ M TBC1D20. **B:** Rab1b L125C:GTP und 0,004  $\mu$ M TBC1D20.

**C:** Rab1b Q67L L125C:GTP und 0,4  $\mu$ M TBC1D20

**D:** Rab1bQ67L L125C-AcylGTP und 0,4  $\mu$ M TBC1D20

1.) Zugabe von TBC1D20

Die Daten wurden im Zeitintervall 50-3500 s mit dem Programm GraFit als einfach exponentielle Funktion interpoliert:

$$F = F_e - (F_e - F_a) \cdot e^{(-k_{obs} \cdot t)}$$

**Formel 5.12.3:** Konstanten:  $F_e$  = Endwert  
 Parameter:  $k_{obs}$  = beobachtete Geschwindigkeitskonstante der Hydrolyse  
 $F_a$  = Startwert  
 Variable:  $t$  = Zeit in Sekunden

Mit der Formel 5.12.3 wurden folgende Werte für  $k_{obs}$  und  $F_a$  ermittelt:

	Nukleotid	Konzentration (GAP)	$k_{obs}$ [s <sup>-1</sup> ]	$\sigma_k$	$F_a$ [%]
Rab1b wt	GTP	0,04 $\mu$ M TBC1D20	<i>9,2 · 10<sup>-3</sup></i>	<i>6,6 · 10<sup>-5</sup></i>	83,3
	GTP	0,004 $\mu$ M TBC1D20	8,0 · 10 <sup>-4</sup>	6,0 · 10 <sup>-7</sup>	82,8
Rab1b L125C	GTP	0,04 $\mu$ M TBC1D20	<i>1,3 · 10<sup>-2</sup></i>	<i>4,8 · 10<sup>-5</sup></i>	74,6
	GTP	0,004 $\mu$ M TBC1D20	1,0 · 10 <sup>-3</sup>	7,6 · 10 <sup>-7</sup>	76,3
Rab1b Q67L L125C	GTP	0,4 $\mu$ M TBC1D20	6,0 · 10 <sup>-4</sup>	3,6 · 10 <sup>-7</sup>	84,4
	GTP	0,2 $\mu$ M TBC1D20	3,0 · 10 <sup>-4</sup>	2,5 · 10 <sup>-7</sup>	84,2
	AcrylGTP	0,4 $\mu$ M TBC1D20	5,0 · 10 <sup>-4</sup>	4,4 · 10 <sup>-7</sup>	84,6
	AcrylGTP	0,4 $\mu$ M TBC1D20	6,0 · 10 <sup>-4</sup>	5,7 · 10 <sup>-7</sup>	85,3

**Tabelle 5.12.4:** Ergebnisse der Interpolationen der Messdaten der TBC1D20 katalysierten Hydrolyse von GTP/AcrylGTP durch Rab1b für  $k_{obs}$  und  $F_a$  mit Formel 5.12.3.

Die ersten Messungen an Rab1b wt und Rab1b L125C wurden bei einer TBC1D20 Konzentration von 0,04  $\mu$ M durchgeführt. Die Hydrolyse fand so schnell statt, dass die Messwerte des Reaktionsbeginns am FluoroMax-3 nicht erfasst werden konnten. Dies spiegelt sich in um den Faktor 100 größeren Standardabweichungen in den  $k_{obs}$ -Werten wieder. Die ermittelten Werte für  $k_{obs}$  stimmen jedoch mit den Messungen mit 0,004  $\mu$ M TBC1D20 überein und sind daher kursiv in Tabelle 5.12.4 angegeben: Die beobachtete Hydrolysegeschwindigkeit ist direkt abhängig von der Konzentration des Rab1b:TBC1D20 Komplexes und damit proportional zu der Konzentration von TBC1D20.

Die Unterschiede der beobachteten Geschwindigkeitskonstanten zwischen Rab1b wt und Rab1b L125C sind sehr gering. Der Faktor beträgt 1,25 für 0,004  $\mu$ M TBC1D20 und 1,43 für 0,04  $\mu$ M TBC1D20. Der Einfluss der L125C Mutation auf die TBC1D20 katalysierte Hydrolyse ist minimal.

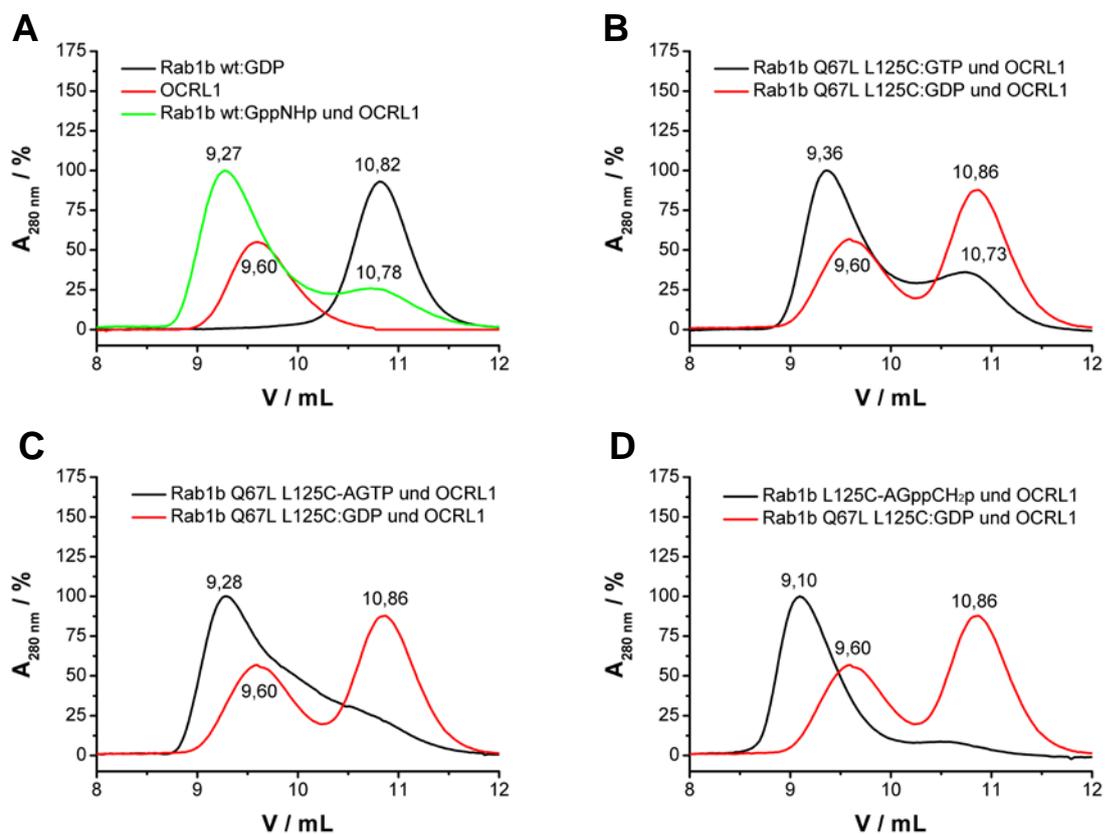
Es ist für die Rab1b Q67L L125C Mutante die 100-fache Menge TBC1D20 notwendig um die gleiche Hydrolysegeschwindigkeit wie für Rab1b wt und Rab1b L125C beobachtet zu erreichen. Der Unterschied der Hydrolysegeschwindigkeiten von GTP und AcrylGTP durch

Rab1b Q67L L125C hat den Faktor 1,1. Dieses Ergebnis zeigt, dass die kovalente Modifikation von Rab1b keinen negativen Einfluss auf die Interaktion mit TBC1D20 hat.

### 5.13 Interaktion von kovalent mit Acrylnukleotiden modifiziertem Rab1b mit seinem Effektor OCRL1

Durch Beobachtung der Komplexbildung mittels Größenausschlusschromatographie soll untersucht werden, ob das konstitutiv aktive Rab1b Q67L L125C-AcrylGTP in der Lage ist mit seinem Effektor OCRL1 zu interagieren. Das OCRL1 (*oculocerebrorenal syndrome of Lowe*) Protein ist eine 105 kDa große Phosphoinositol-5-Phosphatase, die durch Interaktion mit Rab Proteinen an Membrane rekrutiert wird (Hou *et al.*, 2011).

Zur Bildung der Komplexe wurden 50  $\mu$ M Lösungen angesetzt und äquimolare Mengen Rab1b und OCRL1<sub>539-991</sub> (41,6 kDa) für 60 min bei 25 °C und 300 U/min im Thermoschüttler inkubiert. Die Proben wurden mittels Größenausschlusschromatographie an einer analytischen SD75 Säule analysiert. Als Laufmittel wurde Proteinstandardpuffer bei einem Fluss von 0,5 mL/min verwendet. Es wurden jeweils 120  $\mu$ L einer 20  $\mu$ M Proteinlösung in eine 100  $\mu$ L Schleife injiziert. Das entspricht einem Auftrag von 2,0 nmol Protein.



**Abb. 5.13.1:** Größenausschlusschromatographie zur Kontrolle der Komplexbildung zwischen Rab1b und OCRL1 an einer analytischen SD75 Säule mit einem Fluss von 0,5 mL/min.

**A:** Rab1b wt positiv Kontrolle

**B:** Rab1b Q67L L125C positiv und negativ Kontrolle

**C:** Rab1b Q67L L125C-AcrylGTP

**D:** Rab1b Q67L L125C-AcrylGppCH<sub>2</sub>p

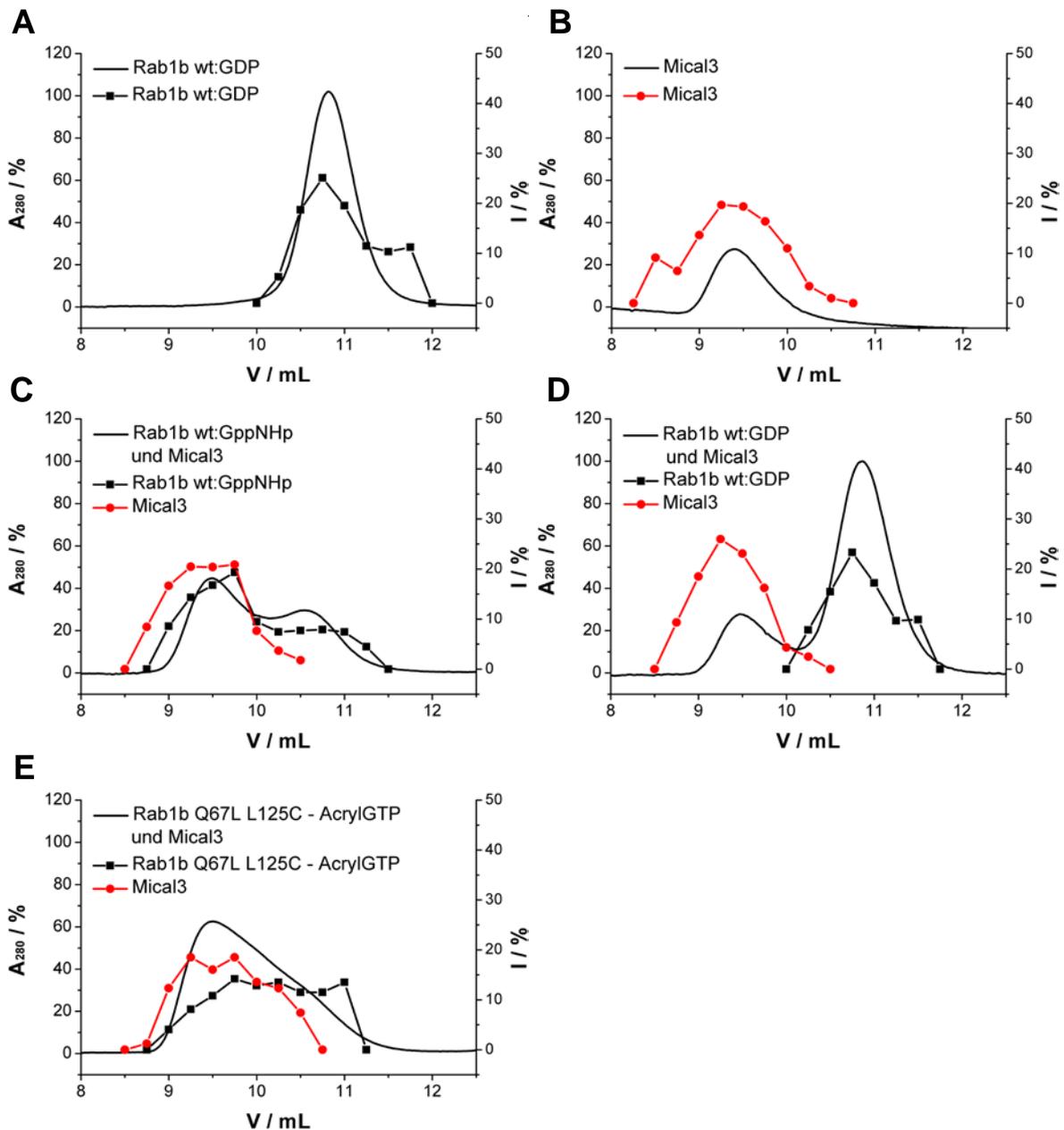
In Abb. 5.13.1 (A) sind die Chromatogramme des Komplexes zwischen Rab1b wt:GppNHp und OCRL1<sub>539-991</sub> sowie der beiden monomeren Proteine als Positivkontrolle abgebildet. Es ist ein deutlicher Komplexpeak bei einem Retentionsvolumen von 9,27 mL bei gleichzeitiger Abnahme der Peakfläche des Rab1b wt Peaks zu sehen. Im Komplexpeak weist kein Schenkel auf die Gegenwart von monomerem OCRL1<sub>539-991</sub> hin. Auch Rab1b Q67L L125C:GTP zeigt deutliche Komplexbildung mit OCRL1<sub>539-991</sub>, während in der Negativkontrolle mit Rab1b Q67L L125C:GDP nur die monomeren Proteine nachweisbar sind (Abb. 5.13.1, B). Das mit AcrylGTP kovalent modifizierte Rab1b Q67L L125C bildet mit OCRL1<sub>539-991</sub> ebenfalls den charakteristischen Komplexpeak bei einem Retentionsvolumen von 9,28 mL aus (Abb. 5.13.1, C). Gleichzeitig sind der Komplexpeak und der Peak des monomeren Rab1b Proteins jedoch nicht klar voneinander getrennt, sondern durch einen Schenkel verbunden. Unter der Annahme eines dynamischen Gleichgewichts zwischen Komplexbildung und Komplexdissoziation wäre ein einziger Peak zu erwarten, der je nach Gleichgewichtslage und damit der mittleren Partikelgröße zu höheren Retentionsvolumen verschoben ist. Dies trifft hier nicht zu. Die Beobachtungen führen vielmehr zu dem Schluss, dass es zwei verschiedene Populationen an Rab1b Q67L L125C-AcrylGTP gibt: Ein Teil des Rab1b Q67L L125C-AcrylGTP kann stabile Komplexe mit OCRL1<sub>539-991</sub> bilden, während ein bestimmter Anteil des Rab1b Q67L L125C-AcrylGTPs in seiner Interaktion mit OCRL1<sub>539-991</sub> beeinträchtigt zu sein scheint und Komplexe mit geringerer Stabilität bildet. Das mit dem nichthydrolysierbaren AcrylGTP Analog AcrylGppCH<sub>2</sub>p kovalent modifizierte Rab1b L125C zeigt in der Kontrolle der Komplexbildung mit OCRL1<sub>539-991</sub> die gleichen Eigenschaften wie Rab1b wt:GppNHp: Es ist ein deutlicher Komplexpeak ohne Schenkel zu sehen (Abb. 5.13.1, D).

Mittels Größenausschlusschromatographie lässt sich weder für die Q67L Mutation noch die kovalente Modifikation mit Acrylnukleotiden allein ein negativer Effekt auf die Interaktion von Rab1b mit OCRL1<sub>539-991</sub> nachweisen. Erst die Kombination beider Veränderungen am Rab1b scheint einen leichten Einfluss auf die Komplexbildung mit OCRL1 von Teilen des Rab1b Proteins zu haben.

## 5.14 Interaktion von kovalent mit AcrylGTP modifiziertem Rab1b mit seinem Effektor Mical3

Durch die Kombination von Größenausschlusschromatographie und SDS-PAGE sollen die Interaktionen von Rab1b Q67L L125C-AcrylGTP und Rab1b wt:GppNHp mit dem Rab1b Effektor Mical3 verglichen werden. Die Multidomänenproteine der Mical Familie (*molecule interacting with CasL*) sind NADPH abhängige Flavoprotein Monooxygenasen. Sie verfügen über Bindedomänen für verschiedene Proteine, darunter eine C-terminale Rab-bindende Domäne. (Fischer *et al.*, 2004, Kolk *et al.*, 2007, Ratnayake *et al.*, 2012). In diesem Experiment wurde die Rab-bindende Domäne von humanem Mical3 zur Komplexbildung mit Rab1b eingesetzt. Sie umfasst die Aminosäuren 1841-1990 und hat ein Molekulargewicht von 18.168 Da. Aufgrund des geringen Absorptionskoeffizienten bei 280 nm des Fragments von  $6990 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  soll die Komplexbildung zwischen Rab1b und Mical3<sub>1841-1990</sub> zusätzlich zur Größenausschlusschromatographie auch mittels SDS-PAGE beobachtet werden.

Zur Bildung der Komplexe wurden 70  $\mu\text{M}$  Proteinlösungen angesetzt und äquimolare Mengen Rab1b und Mical3<sub>1841-1990</sub> für 30 min bei 25 °C und 300 U/min im Thermoschüttler inkubiert. Die Proben wurden mittels Größenausschlusschromatographie an einer analytischen SD75 Säule untersucht und die Eluate in 250  $\mu\text{L}$  Fraktionen gesammelt. Als Laufmittel wurde Proteinstandardpuffer bei einem Fluss von 0,5 mL/min verwendet. Es wurden jeweils 120  $\mu\text{L}$  einer 35  $\mu\text{M}$  Proteinlösung in eine 100  $\mu\text{L}$  Schleife injiziert. Das entspricht einem Auftrag von 3,5 nmol Protein. Die gesammelten Fraktionen wurden mittels Lyophilisation getrocknet. Die Salze aus dem Proteinstandardpuffer wurden mittels Trichloressigsäurefällung der Proteine abgeschieden. Die erhaltenen Präzipitate wurden in 10  $\mu\text{L}$  Wasser und 4  $\mu\text{L}$  SDS-4X Probenpuffer aufgenommen und für 3 min auf 90 °C erwärmt. Es wurden jeweils 10  $\mu\text{L}$  in die Probenkammern eines 16,5 %igen Polyacrylamidgels aufgetragen und die Gele bei 120 V entwickelt. Die Proteine wurden mit Coomassie Brillantblau angefärbt und die Bandenintensitäten mit Hilfe des Programms AIDA quantifiziert und ausgewertet.



**Abb. 5.14.1:** Die Absorptionen bei 280 nm der größenausschlusschromatographischen Läufe zur Kontrolle der Komplexbildung zwischen Rab1b und Mical3 sind als schwarze Linien eingetragen. Die mittels AIDA ermittelten Bandenintensitäten der SDS-PAGE Analyse der gesammelten Fraktionen sind als schwarze Quadrate (Rab1b) und rote Kreise (Mical3) eingetragen.  
**A:** Rab1b wt:GDP.    **B:** Mical3    **C:** Rab1b wt:GppNHp und Mical3 (Positivprobe)  
**D:** Rab1b wt:GDP und Mical3 (Negativprobe)  
**E:** Rab1b Q67L L125C-AcrylGTP und Mical3

Der Vergleich der Chromatogramme von Rab1b wt und Mical3<sub>1841-1990</sub> (Abb. 5.14.1 **A** und **B**) zeigt ein unerwartetes Laufverhalten für Mical3<sub>1841-1990</sub>: Die Molekulargewichte von Rab1b wt (22,4 kDa) und Mical3<sub>1841-1990</sub> (18,2 kDa) lassen vermuten, dass Rab1b wt ein geringeres Retentionsvolumen als Mical3<sub>1841-1990</sub> hat. Obwohl die Massen durch SDS-PAGE bestätigt werden, ist jedoch das Gegenteil zu beobachten. Ursache dafür ist die Struktur des Mical3<sub>1841-1990</sub>: Die C-terminalen, Rab bindenden Domänen von Proteinen aus der Mical-Familie liegen als doppelhelikale (*coiled coil*) Strukturen vor (Weide *et al.*, 2003). Ihre Oberfläche

weicht stark vom Idealfall eines globulären Proteins ab, durch ihre längliche Struktur ist ihr hydrodynamischer Radius deutlich grösser als der reale Proteinradius. Dies resultiert in der beobachteten Verschiebung hin zu einem geringeren Retentionsvolumen. Selbst die Komplexbildung mit Rab1b wt:GppNH (Abb. 5.14.1, **C**) hat keinen Einfluss auf das Retentionsvolumen: es beträgt 9,47 mL für Mical3<sub>1841-1990</sub> und 9,48 mL für den Komplex zwischen Mical3<sub>1841-1990</sub> Rab1b wt:GppNHp. Die Bildung des Komplexes ist im Chromatogramm durch die Abnahme der Peakfläche des Rab1b wt sowie die Zunahme der Peakfläche bei einem Retentionsvolumen von 9,48 mL zu erkennen. Der Nachweis der Komplexbildung gelingt durch die SDS-PAGE: sie zeigt, dass in den Fraktionen zwischen 8,75 und 10,25 mL sowohl Rab1b wt als auch Mical3<sub>1841-1990</sub> enthalten sind. Das ist in der Negativkontrolle für Rab1b wt:GDP und Mical3<sub>1841-1990</sub> (Abb. 5.14.1, **D**) nicht zu beobachten: In jedem Peak kann mittels SDS-PAGE jeweils nur Rab1b wt bzw. nur Mical3<sub>1841-1990</sub> nachgewiesen werden. Rab1b Q67L L125C-AcrylGTP schließlich wird ebenfalls durch Mical3<sub>1841-1990</sub> gebunden (Abb. 5.14.1 **E**). Abweichend von der Positivkontrolle mit Rab1b wt:GppNHp ist jedoch eine Schenkelbildung am Komplexpeak zu beobachten. Dies entspricht der Beobachtung, die bereits für die Interaktion zwischen Rab1b Q67L L125C-AcrylGTP und OCRL1<sub>539-991</sub> gemacht wurde (Kap. 5.13).

### **5.15 Prenylierung von kovalent mit AcrylGDP modifiziertem Rab1b durch REP und GGTase II**

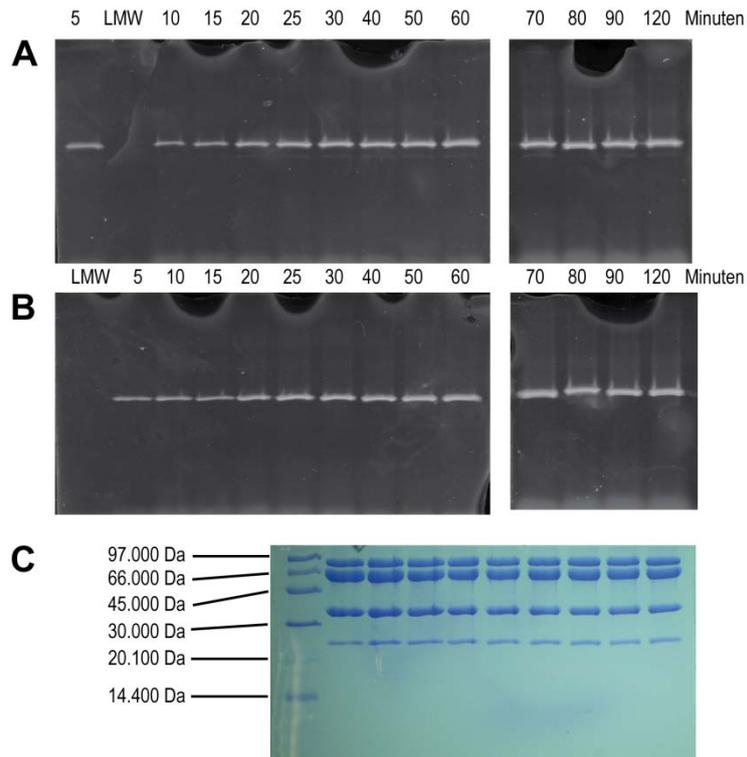
Rab Proteine werden, wie in Kapitel 1.2.2 geschildert, an ihren C-terminalen Cysteinen post-translational durch das Enzym GGTase II mit zwei (in Ausnahmen einer) Geranylgeranylgruppe(n) modifiziert. GGTase II ist ein heterodimeres Enzym und neben Farnesyltransferase und GGTase I eine von drei bekannten Isoprenyltransferasen in eukaryotischen Zellen (Brown *et al.*, 1993). Anders als Farnesyltransferase und GGTase I erkennt GGTase II seine Zielproteine nicht direkt über eine Erkennungssequenz: Rab Proteine werden zunächst durch REP gebunden. Dies erhöht die Affinität zwischen REP und der  $\gamma$ -Untereinheit der GGTase II und ermöglicht die Bildung des katalytisch aktiven ternären Komplexes zwischen Rab, REP und GGTase II (Kap. 1.2.2, Wu *et al.*, 2009). REP ist ein zu GDI homologes Protein (Alory *et al.*, 2001), hat wie dieses eine Präferenz für GDP gebundenes Rab und inhibiert die Dissoziation von GDP (Shapiro *et al.*, 1995, Alexandrov *et al.*, 1999). REP ist in der Lage, zytosolisches prenyliertes Rab an seine Zielmembran zu transportieren (Alexandrov *et al.*, 1994).

In diesem Experiment soll kovalent mit AcrylGDP modifiziertes Rab1b L125C durch REP und GGTase II prenyliert werden. Durch Vergleich mit Rab1b L125C:GDP soll festgestellt werden, ob die kovalente Modifikation einen negativen Einfluss auf die Interaktion mit REP und

die Bildung des katalytisch aktiven ternären Komplexes zwischen REP, Rab und GGTase II hat. Anstelle von Geranylgeranylpyrophosphat, des natürlichen Substrats der GGTase II, soll ein fluoreszierendes Analog, NBD-Farnesylpyrophosphat eingesetzt werden (Abb. 5.15.1). Proben sollen mittels SDS-PAGE untersucht und durch Bestimmung der Fluoreszenzintensitäten der Rab1b Banden der zeitabhängige Ablauf der Prenylierungsreaktion beobachtet werden.

**Abb. 5.15.1:** **A:** Geranylgeranyl  
**B:** 3,7,11-trimethyl-12-(7-nitro-benzo[1,2,5]oxadiazol-4-ylamino)-dodeca-2,6,10-trien  
(NBD-Farnesyl)

Es wurden zwei Ansätze in GDP-Puffer mit jeweils 150 µL Gesamtvolumen vorbereitet, einer mit Rab1b L125C:GDP und einer mit Rab1b L125C-AcrylGDP. Es wurden 0,6 nmol (4 µM) Rab1b vorgelegt und nachfolgend 0,9 nmol (6 µM) REP1, 0,7 nmol (4,7 µM) GGTase II und 7,5 nmol (50 µM) NBD-Farnesylpyrophosphat zugegeben. Die Ansätze wurden bei 25 °C und 300 U/min im Thermoschüttler inkubiert. Es wurden in bestimmten Zeitabständen jeweils 10 µL Proben entnommen, direkt mit 4 µL SDS-4X Probenpuffer versetzt und 3 min auf 90 °C erwärmt um die Reaktion zu quenchen. Es wurden jeweils 10 µL in die Probenkammern eines 16,5 %igen Polyacrylamidgels aufgetragen und die Gele bei 120 V entwickelt. Die Fluoreszenz wurde am FLA 3000 ausgelesen: Die NBD-Fluoreszenz wurde bei 473 nm angeregt und bei 510 nm detektiert. Die Fluoreszenzintensitäten der einzelnen Banden wurden mit Hilfe des Programms AIDA quantifiziert und ausgewertet. Im Anschluss wurden die Gele mittels Coomassie Brilliantblau eingefärbt.



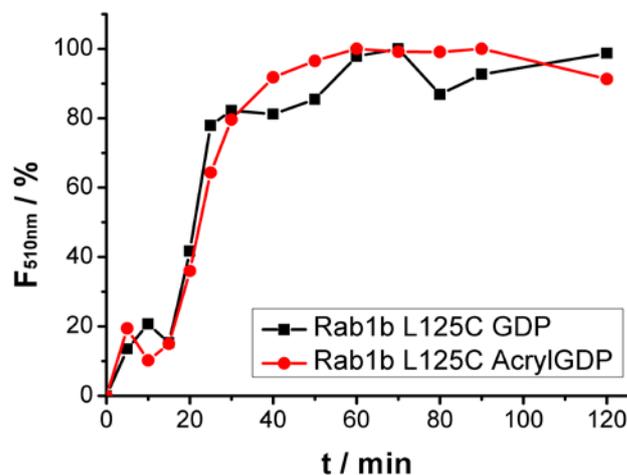
**Abb. 5.15.2:** SDS-PAGE Analyse der Prenylierungen.

**A:** Rab1b L125C-AcrylGDP. Fluoreszenz bei 510 nm nach Anregung bei 473 nm.

**B:** Rab1b L125C:GDP. Fluoreszenz bei 510 nm nach Anregung bei 473 nm.

**C:** Rab1b L125C:GDP. Färbung mit Coomassie Brillantblau.

Nach Färbung der Gele mit Coomassie Brillantblau sind in jeder Probe vier Banden zu sehen (Abb. 5.15.2 C): REP1 bei ~80 kDa (73,9 kDa), die GGTase II  $\alpha$  Untereinheit bei ~58,9 kDa (67 kDa), die GGTase II  $\beta$  Untereinheit bei 33,9 kDa (33 kDa) und Rab1b bei 23,4 kDa (22,4 kDa). Die theoretischen Massen sind in Klammern angegeben. Anhand des Laufweges wurde für die fluoreszierenden Banden (Abb.5.15.2 A und B) eine Masse von 23,4 kDa ermittelt. Die Fluoreszenzzunahme ist also an den Rab1b Banden zu beobachten.



**Abb. 5.15.3:** Auftrag der Fluoreszenzintensitäten der Rab1b Banden in Abhängigkeit von der Zeit

Für die Bestimmung der Fluoreszenzintensitäten wurde mit dem Programm AIDA für jede Bande eine identische Fläche untersucht und die mittlere Fluoreszenzintensität der Fläche pro Pixel bestimmt. Bereits nach 5 min ist sowohl für Rab1b L125C:GDP als auch Rab1b L125C-AcrylGDP eine deutliche Fluoreszenz zu beobachten (Abb. 5.15.2, **A** und **B**). Die Fluoreszenzentwicklung scheint zu stagnieren, um dann zwischen 15 min und 30 min ihre größte Zunahme zu erfahren. Die scheinbare Stagnation hat ihre Ursache in der Datenerfassung: Bei geringen Fluoreszenzintensitäten hat die Peakfläche einen deutlichen Einfluss auf die ermittelte Fluoreszenzintensität. Eine große Peakfläche führt so zu künstlich erhöhten Fluoreszenzwerten. Die Bande für Rab1b L125C-AcrylGDP bei 5 min (Abb. 5.15.2, **A**) ist auffallend breit und verschwommen, dies resultiert in der unerwartet hohen ermittelten Fluoreszenzintensität. Das Gegenteil ist für die Bande von Rab1b L125C nach 15 min zu beobachten: die schmale Bande führt zu einer negativen Abweichung vom Erwartungswert. Qualitativ ist kein Unterschied zwischen der Prenylierung von Rab1b L125C:GDP und Rab1b L125C-AcrylGDP zu beobachten. Bei beiden Proteinen findet die Fluoreszenzzunahme im gleichen Zeitraum zwischen 0 und 60 min statt und resultiert in einem fast identischen Maximalwert. Die Modifikation von Rab1b L125C mit AcrylGDP hat keine signifikanten Auswirkungen auf die Bindung durch REP1 und die Bildung des ternären Komplexes aus Rab1b, REP1 und GGTase II.

### **5.16 Interaktion von kovalent mit AcrylGDP modifiziertem Rab1b L125C mit GDI**

Nachdem Rab einen Zyklus aus Aktivierung und Deaktivierung durchlaufen hat, wird es im GDP gebundenen Zustand durch GDI aus den Akzeptormembranen extrahiert. Im Rab:GDI Komplex werden die hydrophoben Prenylgruppen vor dem Zytosol abgeschirmt und so der Rücktransport von Rab Proteinen an die entsprechende Donormembran ermöglicht (Kap.1.2, Shapiro *et al.*, 1995, Alexandrov *et al.*, 1999, Goody *et al.*, 2005).

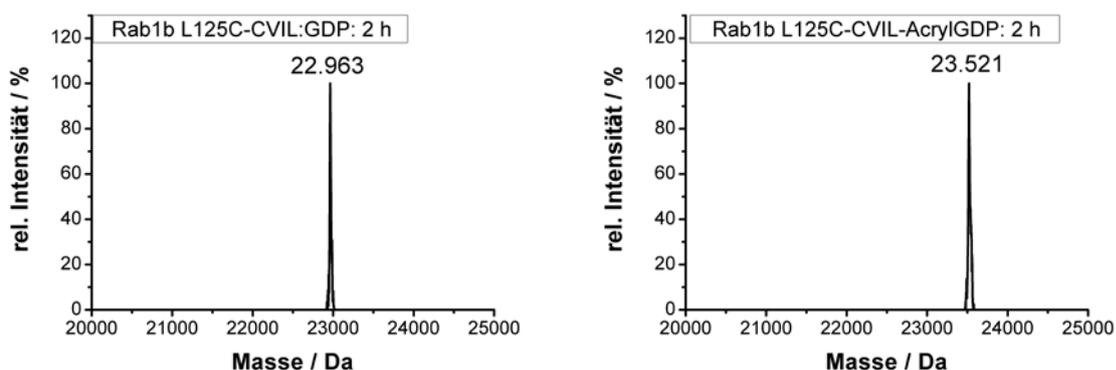
Die intakte Interaktion mit GDI ist essentiell für die Lokalisation von Rab Proteinen in Zellen. In dieser Versuchsreihe sollen die  $k_{on}$  und  $k_{off}$  Werte der Assoziation/Dissoziation des Rab1b L125C-AcrylGDP:GDI Komplexes bestimmt und mit denen des Rab1b L125C:GDP:GDI Komplexes verglichen werden.

GDI hat nur eine geringe Affinität zu nicht prenyliertem Rab (Wu *et al.*, 2007). Aus diesem Grund müssen die eingesetzten Rab Proteine im Vorfeld mit Prenylgruppen modifiziert werden. Die Prenylierung durch REP und GGTase II ist dafür nicht praktikabel, da das prenylierte Rab Protein im Anschluss als Komplex mit REP vorliegt. Der  $K_D$  des Komplexes liegt für Rab7 zwischen 61 pM für einfach geranyliertes und 1,3 nM für zweifach geranyliertes Protein (Wu *et al.*, 2007). Eine effiziente Dissoziation des Komplexes und Trennung der Proteine ist nicht möglich (Shapiro *et al.*, 1995, Kalinin *et al.*, 2001). Um dieses Problem zu umgehen,

wurde durch Mutation C-terminal ein CaaL Erkennungsmotiv für GGTase I in Rab1b eingeführt. GGTase I ist nicht auf ein Hilfsprotein angewiesen sondern bindet lediglich das C-terminale Erkennungsmotiv CVIL (Zhang *et al.*, 1996). Das natürliche Substrat für GGTase I ist Geranylgeranylpyrophosphat. Hier soll das fluoreszierende Analog NBD-Farnesylpyrophosphat verwendet werden, um gleichzeitig mit der Prenylgruppe einen Fluoreszenzmarker in das Rab Protein einzuführen (Methode: Wu *et al.*, 2007).

In 160 µL Gesamtvolumen Proteinstandardpuffer mit 2 % (v/v) DMSO und 5 % (v/v) Glycerol wurden 22,1 nmol (138 µM) Rab1b L125C-CVIL-AcrylGDP, 11 nmol (69 µM) GGTase I und 110,5 nmol (690 µM) NBD-Farnesylpyrophosphat für 2 h bei 25 °C und 300 U/min im Thermoschüttler unter Lichtausschluss inkubiert.

In 147 µL Gesamtvolumen Proteinstandardpuffer mit 2 % (v/v) DMSO und 5 % (v/v) Glycerol wurden 22,1 nmol (150 µM) Rab1b L125C-CVIL:GDP, 11 nmol (75 µM) GGTase I und 110,5 nmol (750 µM) NBD-Farnesylpyrophosphat für 2 h bei 25 °C und 300 U/min im Thermoschüttler unter Lichtausschluss inkubiert.



**Abb. 5.16.1:** Reaktionskontrolle der NBD-Farnesylierung von Rab1b L125C-CVIL:GDP und Rab1b L125C-CVIL-AcrylGDP mittels ESI-MS.

Theoretische Massen:	Rab1b L125C-CVIL	: 22.587 Da
	Rab1b L125C-NBD-F	: 22.969 Da
	Rab1b L125C-CVIL-AcrylGDP	: 23.141 Da
	Rab1b L125C-AcrylGTP-NBD-F	: 23.525 Da

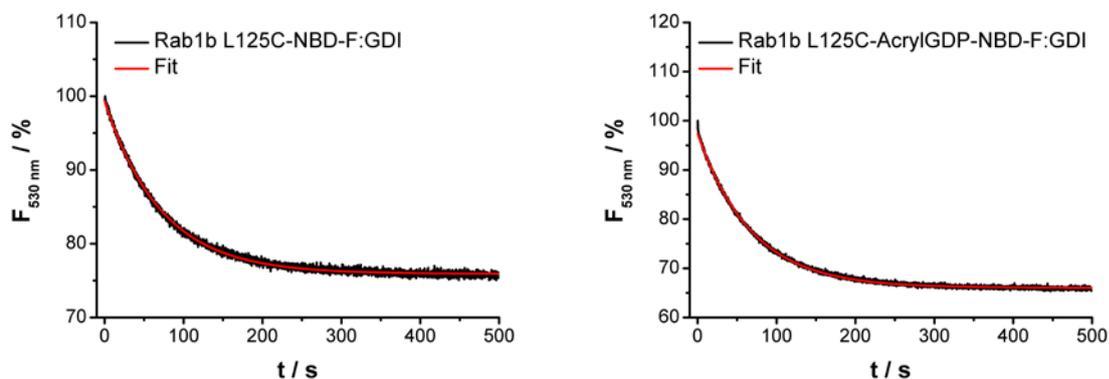
Die Reaktionskontrolle mittels ESI-MS zeigt, dass sowohl Rab1b L125C-CVIL:GDP als auch Rab1b L125C-CVIL-AcrylGDP quantitativ mit NBD-Farnesyl modifiziert werden konnten.

In den nachfolgenden Experimenten wird die Änderung der NBD-Fluoreszenz bei 530 nm in Abhängigkeit von der Assoziation/Dissoziation der Rab1b:GDI Komplexe gemessen. Ursache der Fluoreszenzänderung ist die Änderung der Polarität der NBD-Umgebung (Kap. 7.5.3).

Bestimmung der  $k_{off}$  Werte für die Dissoziation des Rab1b:GDI Komplexes:

In Gegenwart von LidA soll die zeitabhängige Fluoreszenzänderung bei 530 nm einer Rab1b-NBD-F:GDI Lösung beobachtet werden. LidA ist ein Rab Effektor des Bakteriums *Legionella pneumophila*. Eine Besonderheit dieses Proteins ist, dass es sowohl die GDP als auch die GTP gebundene Form verschiedener Rab Proteine mit ausgesprochen hoher Affinität bindet. Experimentelle Ergebnisse beziffern die  $K_D$  auf 30 pM für GDP gebundenes Rab1b (Schoebel *et al.*, 2011). Der für einfach mit NBD-Farnesyl modifizierte Rab Proteine ermittelte  $K_D$  Wert des Rab:GDI Komplexes ist mit 13 nM um den Faktor 2300 größer (Wu *et al.*, 2010). Damit ist LidA in der Lage eine Rückbindung von freiem Rab1b an GDI zu verhindern und erlaubt so die Bestimmung des  $k_{off}$  Werts für die Dissoziation des Rab1b:GDI Komplexes.

Zur Bildung der Rab1b:GDI Komplexe wurden jeweils 50 pmol Rab1b mit 75 pmol GDI in 1 mL Proteinstandardpuffer für 60 min bei 25 °C inkubiert. Gemessen wurde die NBD-Fluoreszenz oberhalb von 530 nm nach Anregung bei 437 nm bei 25 °C an einem Stopped Flow System. Als Stocklösungen wurde jeweils eine 0,1 µM Rab1b:GDI Lösung und eine 2 µM LidA Lösung verwendet. Von jeder Lösung wurden pro Messung 50 µL injiziert.



**Abb. 5.16.2:** Beispielmessungen der Dissoziation des Rab1b:GDI Komplexes. Dargestellt ist die Änderung der NBD-Fluoreszenz bei 530 nm in Abhängigkeit von der Zeit nach Zugabe von LidA.

Die Daten wurden im Zeitintervall 0-500 s mit dem Programm GraFit als einfach exponentielle Funktion interpoliert:

$$F = F_a \cdot e^{(-k_{off} \cdot t)} + F_0$$

<b>Formel 5.16.3:</b>	Konstanten:	$F_0$	= Endwert
	Parameter:	$k_{off}$	= Geschwindigkeitskonstante der Dissoziation
		$F_{max}$	= Maximalwert
		$F_a$	= $F_{max} - F_0$
	Variable:	$t$	= Zeit in Sekunden

Mit Formel 5.16.3 wurden folgende Werte für  $k_{\text{off}}$  und  $F_a$  ermittelt:

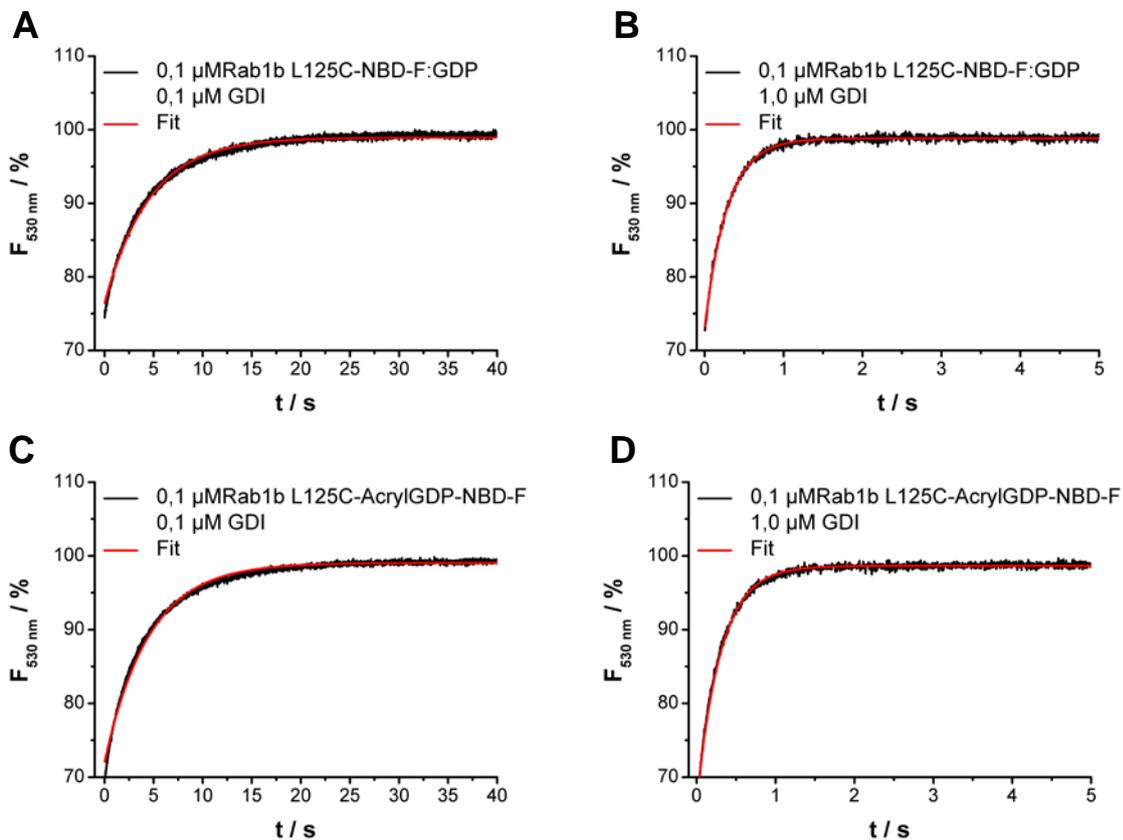
	$k_{\text{off}} [\text{s}^{-1}]$	$\sigma_k$	$F_a [\%]$
Rab1b L125C-NBD-F:GDP	0,0172	$1,1 \cdot 10^{-4}$	24,4
Rab1b L125C-AcrylGDP-NBD-f	0,0144	$1,7 \cdot 10^{-5}$	31,9

**Tabelle 5.16.4:** Ergebnisse für  $k_{\text{off}}$  und  $F_a$  der Interpolationen der Messdaten der Rab1b:GDI Dissoziation mit Formel 5.16.3.  $\sigma_k$  ist die Standardabweichung.

Die beobachteten  $k_{\text{off}}$ -Werte liegen in der gleichen Größenordnung und weichen nur minimal voneinander ab. Die kovalente Modifikation hat keinen signifikanten Einfluss auf die Dissoziationsgeschwindigkeit des Rab1b:GDI Komplexes.

Bestimmung der  $k_{\text{on}}$  Werte für die Assoziation des Rab1b:GDI Komplexes:

Gemessen wurde die NBD-Fluoreszenz bei 530 nm nach Anregung bei 437 nm bei 25 °C an einem Stopped Flow System. Es wurden jeweils eine 0,1  $\mu\text{M}$  Rab1b-NBD-F Stocklösung sowie 0,1; 0,2; 0,5 und 1,0  $\mu\text{M}$  GDI Lösungen vorbereitet. Pro Messung wurden jeweils 50  $\mu\text{L}$  Rab1b und GDI Lösungen injiziert.



**Abb. 5.16.5:** Beispielmessungen der Assoziation des Rab1b:GDI Komplexes. Dargestellt ist die Änderung der NBD-Fluoreszenz bei 530 nm in Abhängigkeit von der Zeit.

**A:** Rab1b L125C:GDP und 0,1  $\mu\text{M}$  GDI

**B:** Rab1b L125C:GDP und 1  $\mu\text{M}$  GDI

**C:** Rab1b L125C-AcrylGDP und 0,1  $\mu\text{M}$  GDI

**D:** Rab1b L125C-AcrylGDP und 1  $\mu\text{M}$  GDI

Die Daten wurden mit dem Programm GraFit als einfach exponentielle Funktion für eine Reaktion pseudoerster Ordnung interpoliert:

$$F = F_e - (F_e - F_a) \cdot e^{(-k'_{on} \cdot t)}$$

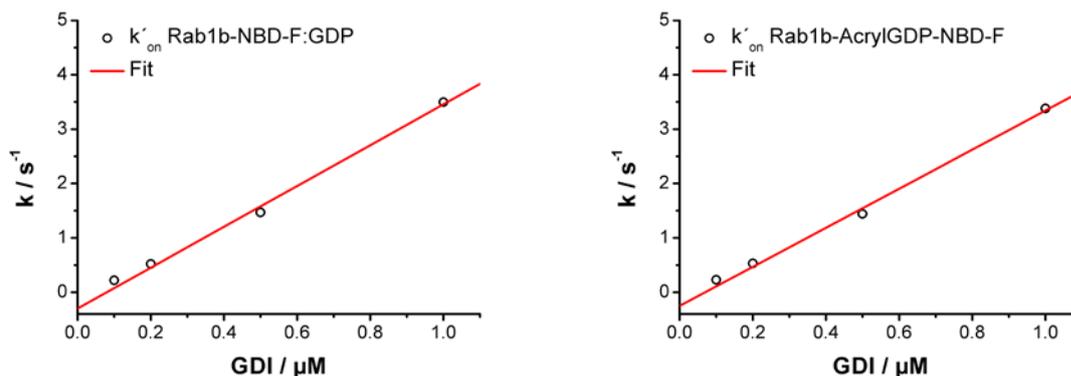
**Formel 5.16.6:** Konstanten:  $F_e$  = Endwert  
 Parameter:  $k'_{on}$  = beobachtete Geschwindigkeitskonstante der Hydrolyse  
 $F_a$  = Startwert  
 Variable:  $t$  = Zeit in Sekunden

Mit der Formel 5.16.6 wurden folgende Werte für die konzentrationsabhängigen Geschwindigkeitskonstanten pseudoerster Ordnung der Assoziation  $k'_{on}$  und  $F_a$  ermittelt:

	Rab1b L125C-NBD-F:GDP			Rab1b L125C-AcrylGDP-NBD-F		
GDI	$k'_{on} [s^{-1}]$	$\sigma_k$	$F_a [\%]$	$k'_{on} [s^{-1}]$	$\sigma_k$	$F_a [\%]$
0,1 $\mu M$	0,22	0,0005	76,8	0,23	0,0006	72,6
0,2 $\mu M$	0,52	0,0013	75,2	0,53	0,0025	75,2
0,5 $\mu M$	1,47	0,0052	73,4	1,44	0,0051	71,1
1 $\mu M$	3,50	0,0179	73,5	3,38	0,0122	65,6

**Tabelle 5.16.7:** Ergebnisse für  $k_{on}$  und  $F_a$  der Interpolationen der Messdaten der Rab1b:GDI Assoziation mit Formel 5.16.6.  $\sigma_k$  ist die Standardabweichung.

Durch Auftrag der Geschwindigkeitskonstanten pseudoerster Ordnung  $k'_{on}$  gegen die GDI Konzentration wurden die Geschwindigkeitskonstanten  $k_{on}$  ermittelt.



**Abb. 5.16.8:** Auftrag der Geschwindigkeitskonstanten pseudoerster Ordnung  $k'_{on}$  gegen die GDI Konzentration

Die Datenpunkte wurden mit dem Programm Graphit als lineare Funktion interpoliert.

$$k'_{on} = c_{(GDI)} \cdot k_{on} + b$$

**Formel 5.16.9:** Parameter:  $k_{on}$  = Geschwindigkeitskonstante zweiter Ordnung  
 $b$  = Y-Achsenabschnitt (=  $k_{off}$ )  
 Variable:  $c_{(GDI)}$  =  $\mu M$

Für Rab1b-NBD-F:GDP:GDI wurden mit Formel 5.16.9 folgende Werte ermittelt:

$$k_{\text{on}} = 3,75 \cdot 10^6 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$$

Für Rab1bAcrylGDP-NBD-F:GDI wurden mit Formel 5.16.9 folgende Werte ermittelt:

$$k_{\text{on}} = 3.59 \cdot 10^6 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$$

Die ermittelten  $k_{\text{on}}$  Werte sind fast identisch: die kovalente Modifikation mit AcrylGDP hat keine negativen Auswirkungen auf die Bindung von Rab1b durch GDI.

Mit Hilfe der ermittelten  $k_{\text{on}}$  und  $k_{\text{off}}$  Werte kann der  $K_D$  der beiden untersuchten Komplexe nach  $K_D = k_{\text{off}}/k_{\text{on}}$  errechnet werden.

Rab1b-NBD-F:GDP:GDI :  $K_D = 4,59 \text{ nM}$

Für Rab1bAcrylGDP-NBD-F:GDI :  $K_D = 4,01 \text{ nM}$

Auch die  $K_D$  Werte sind annähernd identisch. Sie liegen im einstelligen nanomolaren Bereich und befinden sich damit in der gleichen Größenordnung wie die Dissoziationskonstanten der Rab1b-NBD-G:GDI (NBD-G: Geranyl-NBD) (Schoebel *et al.*, 2009) und Rab7-NBD-G:GDI / Rab7-NBD-F:GDI Komplexe (Wu *et al.*, 2007, Wu *et al.*, 2010) aus der Literatur.

Die Kovalente Modifikation mit AcrylGDP hat keinen messbaren Einfluss auf die Interaktion zwischen Rab1b und GDI.

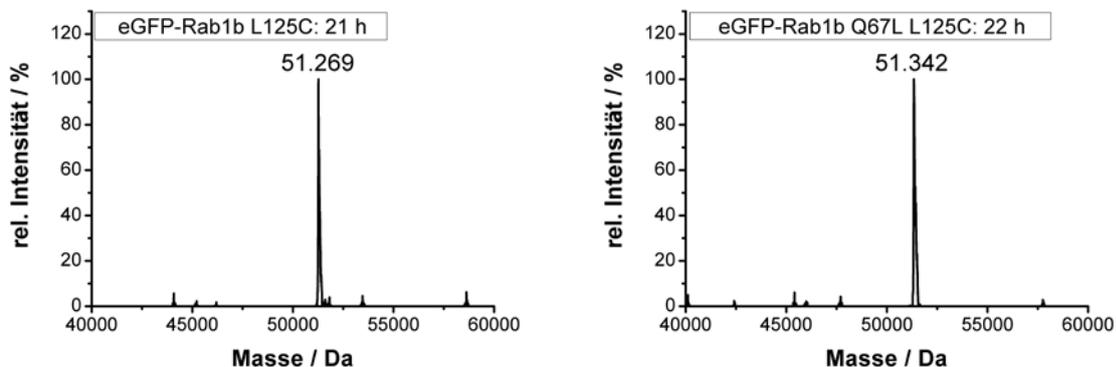
### 5.17 Mikroinjektion von kovalent modifiziertem Rab1b in HeLa Zellen

Mittels Mikroinjektion soll kovalent mit AcrylGTP/AcrylGDP modifiziertes eGFP-Rab1b Fusionsprotein in HeLa (Henrietta Lacks Zellstamm) Zellen eingeführt werden. Die Beobachtung der zeitabhängigen Lokalisation der eGFP Fluoreszenz in den Zellen mit einem konfokalen Fluoreszenzmikroskop soll zeigen, ob das kovalent modifizierte eGFP-Rab1b zytosolisch oder membranassoziiert vorliegt. Aus diesen Daten sollen Rückschlüsse über eine mögliche Prenylierung der eGFP-Rab1b Proteine *in vivo* sowie den Einfluss der gebundenen Nukleotide auf ihre Lokalisation gezogen werden.

Rab1b wird *in vivo* durch das Enzym GGTase II und das Hilfsprotein REP mit zwei Geranylgeranylgruppen modifiziert (Kap. 1.2.2). In Kapitel 5.15 konnte gezeigt werden, dass die kovalente Modifikation von Rab1b mit AcrylGDP die Bildung des katalytisch aktiven ternären Komplexes zwischen Rab1b, REP und GGTase II *in vitro* nicht nachweisbar beeinträchtigt.

Im Vorfeld dieses Experiments mussten eGFP-Rab1b L125C und eGFP-Rab1b Q67L L125C mit AcrylGTP modifiziert werden. Dazu wurde jeweils eine 50  $\mu\text{M}$  Proteinkonzentration in 200  $\mu\text{L}$  Gesamtvolumen EDTA-Puffer eingestellt. Nach Zugabe von 7,5  $\text{\AA}q$ . AcrylGTP wurde

der Ansatz bei 25 °C in einem Thermoschüttler bei 300 U/min inkubiert. Die Reaktionskontrollen mittels ESI-MS wurden mit vorgeschalteter Umkehrphasen HPLC an einer analytischen C4-Säule durchgeführt.



**Abb. 5.17.1:** Reaktionskontrolle der Modifikation von eGFP-Rab1b L125C (links) und eGFP-Rab1b Q67L L125C (rechts) mit 7,5 Äq. AcrylGTP bei 25 °C mittels ESI-MS.

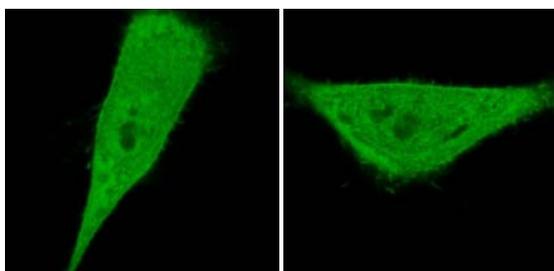
Theoretische Massen: eGFP-Rab1b L125C-AcrylGDP : 51.268 Da  
 eGFP-Rab1b Q67L L125C-AcrylGTP : 51.333 Da

Beide Proteine konnten quantitativ mit Acrylnukleotiden modifiziert und so als konstitutiv inaktives (eGFP-Rab1b L125C-AcrylGDP) bzw. konstitutiv aktives (eGFP-Rab1b Q67L L125C-AcrylGTP) Rab1b dargestellt werden.

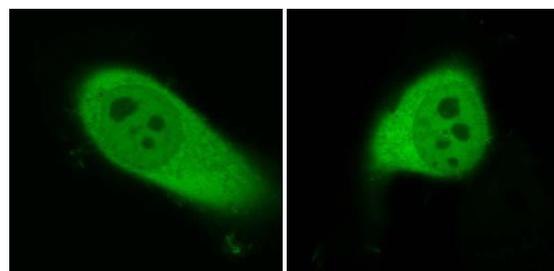
Mikroinjektionsexperimente (von Fu Li durchgeführt):

Für jede Messreihe wurde eine 100 µM Rab1b Lösung in GDP-Puffer in 50 HeLa Zellen injiziert. Die Mikroinjektionen wurden mit Hilfe der Geräte „Eppendorf Transinjector 5246“ und „Eppendorf Micromanipulator 5171“ durchgeführt. Die Aufnahmen der Zellen wurden in einem Zeitraum von 0-24 h in DMEM Medium an einem konfokalen Fluoreszenzmikroskop des Typs „inverted confocal and multiphoton system Leica TCS SP2“ aufgenommen. Die Anregung von eGFP fand bei 488 nm statt, gemessen wurde die Emission bei 509 nm.

**Konstitutiv inaktives Rab1b, 15 min**



**Konstitutiv aktives Rab1b, 30 min**



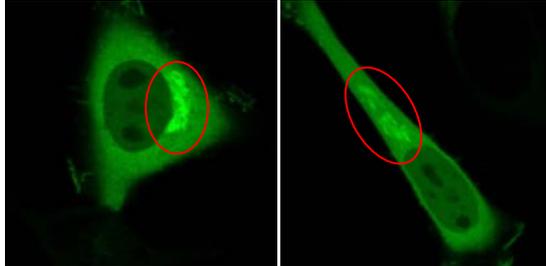
**Abb. 5.17.2:** eGFP Emission (509 nm) nach Mikroinjektion in HeLa Zellen.

**Links:** eGFP-Rab1b L125C-AcrylGDP, 15 min nach Mikroinjektion.

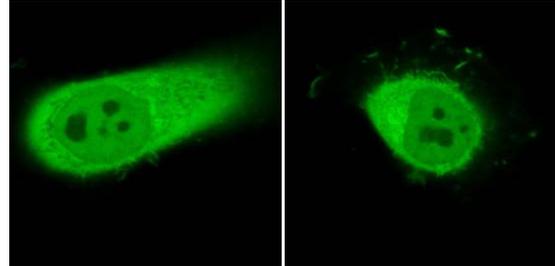
**Rechts:** eGFP-Rab1b Q67L L125C-AcrylGTP, 30 min nach Mikroinjektion.

Nach 15 bzw. 30 min ist sowohl für das konstitutiv inaktive als auch aktive Rab1b eine fast gleichmäßige Fluoreszenzverteilung im Zytosol zu beobachten. Kurz nach der Injektion liegen also beide Proteine zytosolisch vor.

#### Konstitutiv inaktives Rab1b, 1 h



#### Konstitutiv aktives Rab1b, 1 h



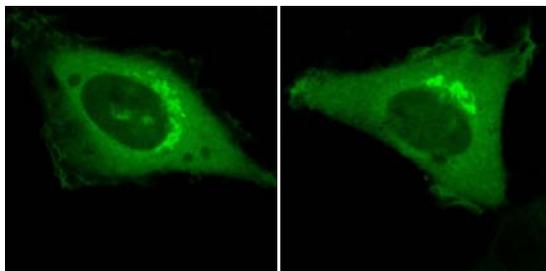
**Abb. 5.17.3:** eGFP Emission (509 nm) nach Mikroinjektion in HeLa Zellen.

**Links:** eGFP-Rab1b L125C-AcylGDP, 1 h nach Mikroinjektion.

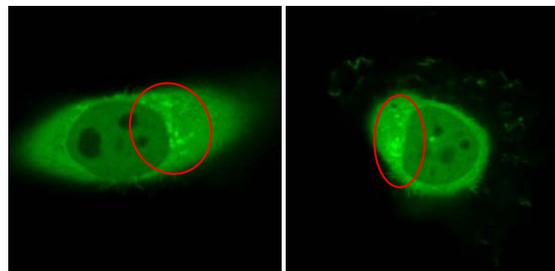
**Rechts:** eGFP-Rab1b Q67L L125C-AcylGTP, 1 h nach Mikroinjektion.

Bereits eine Stunde nach der Mikroinjektion ist für das inaktive Rab1b eine Konzentration der Fluoreszenz in räumlich abgegrenzten Strukturen in Zellkernnähe zu beobachten (Abb. 5.17.3 links, rote Markierungen). Für das aktive Rab1b kann eine Konzentration der Fluoreszenz in scharf abgegrenzten Bereichen nicht beobachtet werden.

#### Konstitutiv inaktives Rab1b, 1,5 h



#### Konstitutiv aktives Rab1b, 1,5 h



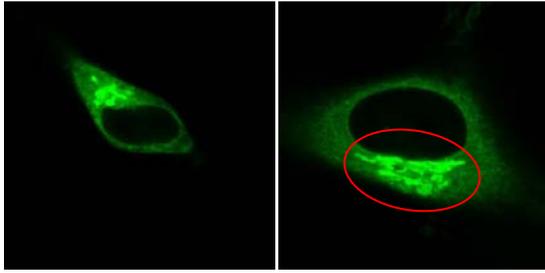
**Abb. 5.17.4:** eGFP Emission (509 nm) nach Mikroinjektion in HeLa Zellen.

**Links:** eGFP-Rab1b L125C-AcylGDP, 1,5 h nach Mikroinjektion.

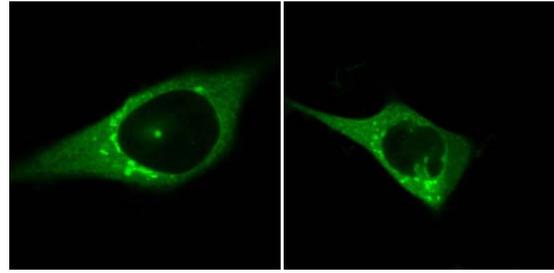
**Rechts:** eGFP-Rab1b Q67L L125C-AcylGTP, 1,5 h nach Mikroinjektion.

Nach 1,5 h kann auch für das aktive Rab1b die Bildung von räumlich abgegrenzten Bereichen erhöhter Fluoreszenz in Zellkernnähe beobachtet werden (Abb. 5.17.4, rechts, rote Markierungen). Sie weisen im Vergleich mit den durch das aktive eGFP-Rab1b sichtbar gewordenen Strukturen jedoch eine geringere Fluoreszenzintensität auf.

### Konstitutiv inaktives Rab1b, 8 h



### Konstitutiv aktives Rab1b, 13 h



**Abb. 5.17.5:** eGFP Emission (509 nm) nach Mikroinjektion in HeLa Zellen.

**Links:** eGFP-Rab1b L125C-AcrylGDP, 8 h nach Mikroinjektion.

**Rechts:** eGFP-Rab1b Q67L L125C-AcrylGTP, 13 h nach Mikroinjektion.

Nach 8 h bzw. 13 h hat die Fluoreszenzintensität der abgegrenzten Strukturen für beide Rab1b Proteine weiter zugenommen, während sich zytosolische Fluoreszenz deutlich verringert hat. Die Areale erhöhter Fluoreszenz liegen in Zellkernnähe und bilden ein System von gestapelten Membranstrukturen (Abb. 5.17.5, links, rote Markierung). Lokalisation und Ausprägung der Strukturen erlauben den Schluss, dass es sich um die Membrane des Golgi Apparates handelt.

Sowohl für das konstitutiv aktive als auch inaktive Rab1b kann eine Rekrutierung der Proteine aus dem Zytosol an das gleiche Membransystem (Golgi) beobachtet werden. Dieser Vorgang bedingt die C-terminale Modifikation mit Geranylgeranylgruppen durch REP und GGase II. Die Ergebnisse der Mikroinjektion beweisen, dass beide kovalent modifizierten Proteine *in vivo* prenyliert werden. Dabei läuft der gesamte Prozess aus Prenylierung und Membranrekrutierung am konstitutiv inaktiven Rab1b schneller ab als am konstitutiv aktiven Rab1b. Diese Beobachtung entspricht der Erwartung: REP hat eine deutlich höhere Affinität (Faktor 1200 für Rab7-NBD-Farnesyl) für GDP- als für GTP-gebundene Rab Proteine (Wu *et al.*, 2010). Tatsächlich konnte *in vitro* eine schnellere Prenylierung von GDP gebundenen im Vergleich zu GTP gebundenen Rab Proteinen nachgewiesen werden (Seabra, M. C., 1996). Damit zeigt das Experiment, dass sich die kovalent modifizierten Rab1b Proteine *in vivo* abhängig von ihrem Nukleotidzustand unterschiedlich verhalten. Die Beobachtung der langsameren Membranrekrutierung des konstitutiv aktiven Rab1b lassen sich im Einklang mit der Theorie im Sinne einer im Vergleich zum konstitutiv inaktiven Rab1b herabgesetzten Affinität zu REP erklären.

## 6 Diskussion und Ausblick

### 6.1 Synthesen der Acrylnukleotide

Die Sandmeyer Reaktion ist ein Verfahren zur Substitution aromatischer Amine (Sandmeyer, T., 1884). Obwohl Guanosin keine aromatische Verbindung ist, kann seine Purin C2-Position dennoch durch eine nukleophile Reaktion des Amins in einer Sandmeyer Reaktion selektiv als Bromverbindung aktiviert werden. Die Reaktion läuft über ein intermediäres Diazoniumion ab, welches erst nach Reduktion als elementarer Stickstoff abgespalten wird und so ein Radikal an der Purin C2-Position bildet (Kochi, J. K., 1957). Aliphatische Diazoniumionen sind instabil und zerfallen spontan in Stickstoff und Carbokationen. (Hauptmann, S. 1985) Am aromatischen System wird das intermediär auftretende Diazoniumion durch den positiven Mesomerieeffekt des Aromaten stabilisiert (Clayden *et al.*, 2000). Am Guanin hingegen haben die Imine des Heterozyklus und das Amid der Nucleobase einen positiven mesomeren Effekt auf das Diazoniumion. Damit steht mit 2'3'5'-Triacetylguanosin eine günstige und gut verfügbare Ausgangsverbindung für die Synthese von Purin C2 substituierten Nucleosiden und Nucleotiden zur Verfügung.

Das erhaltene 2'3'5'-Triacetyl-2-Brominosin ist für verschiedene nukleophile Substitutionen zugänglich. Für diese Arbeit relevant ist die nukleophile Substitution des Broms durch ein primäres Amin: das hieraus resultierende sekundäre Amin soll bei der Nucleotidbindung durch ein kleines G-Protein als Wasserstoffbrückendonator zum Asp des G4 N/TKxD Motivs analog zum primären Amin des Guanosins fungieren. Hier wurde das Brom durch *tert*-Butyl-3-Aminopropylcarbamate substituiert um einen über ein sekundäres Amin verbrückten Propyllinker einzuführen. Je nach den Ansprüchen an das Produkt, wie z. B. die Länge des Linkers, können an dieser Stelle jedoch auch andere Substituenten mit einem primären Amin eingeführt werden. Nach Einführung des *tert*-Butyl-3-Aminopropylcarbamats liegt das Nucleosid vollständig geschützt vor. Dabei sind die Schutzgruppen der Ribose Hydroxylgruppen (Acetyl) und der terminalen Aminogruppe des Propyls (*tert*-Butyloxycarbonyl) orthogonal zueinander. Damit ergibt sich die Möglichkeit, gezielt nur die Hydroxyl- bzw. Aminogruppe zu entschützen. Eine vielversprechende Anwendung wäre z. B. die selektive Entschützung der Hydroxylgruppen: Nach selektiver Phosphorylierung zum 5'-Monophosphat (Kap. 3.1.1) könnte über die Reaktion mit *N*-Methylisatosäureanhydrid (Abb. 6.1.1) ein *N*-Methylantranoylrest als Fluoreszenzmarker an der 2'- bzw. 3'-Hydroxylgruppe eingeführt werden.

**Abb. 6.1.1: Links:** *N*-Methylisatosäureanhydrid. **Rechts:** *N*-Methylantranoylgruppe.

Ein derart modifiziertes Nukleotid würde z. B. die Charakterisierung der Bindungskinetiken von Acrylnukleotiden an kleinen G-Proteinen ohne geeignete Tryptophanfluoreszenz (Kap. 7.5.2) ermöglichen.

Bei der Einführung der Acrylgruppe als Acrylamid am primären Amin des Propyllinkers findet die Reaktion mit dem NHS-Ester der Acrylsäure unter den gewählten Reaktionsbedingungen auch in Gegenwart ungeschützter Hydroxylgruppen am Nukleosid selektiv statt. Für die Modifikation des Linkers mit einer Acrylgruppe ist dies hilfreich: Gegenüber den gängigen Reagenzien zur Acetylgruppenabspaltung, wie z. B.  $\text{NH}_3/\text{MeOH}$ ,  $\text{KCN}/\text{EtOH}$  und  $\text{MeOH}/\text{NaOMe}$  (Greene *et al.* 1999) ist die Acrylgruppe nicht inert, sondern in unterschiedlichem Maße einer konjugierten 1,4-Addition zugänglich (Clayden *et al.* 2000).

Für die Phosphorylierung des Nukleosids wurden in dieser Arbeit zwei unterschiedliche Methoden angewandt: Die Synthese von Triphosphaten nach Ludwig (Ludwig, J., 1981) und der Michelson Anionenaustausch (Michelson, A. M., 1964). Die selektive Phosphorylierung der 5'-OH Gruppe zu 5'-Phosphoroxydichlorid/Monophosphat wurde bei beiden Methoden identisch mit  $\text{POCl}_3$  in Trimethylphosphat durchgeführt (Yoshikawa *et al.*, 1969).

Die Phosphorylierung zum Triphosphat nach Ludwig wird direkt ohne weitere Aufarbeitung an dem 5'-Phosphoroxydichlorid vorgenommen. Trotz der einfachen experimentellen Durchführbarkeit hat die Methode jedoch klare Nachteile: Das überschüssige  $\text{POCl}_3$  kann ohne weitere Reinigung nicht quantitativ aus der Reaktionslösung entfernt werden. Das zur Katalyse der Phosphatesterbildung benötigte DMF bildet auch mit dem verbliebenen  $\text{POCl}_3$  hochreaktive Imidoylphosphate und Imidoylchloride (Abb. 6.1.2), die mit einer Vielzahl von funktionellen Gruppen verschiedene Phosphatverbindungen bilden (Cramer *et al.*, 1960) (Kap. 3.1.3). An Nukleosiden betrifft dies vor allem die 2'- und 3'-OH Gruppen.

**Abb. 6.1.2:** Gleichgewicht zwischen DMF (Links), Imidoylphosphat (Mitte) und Imidoylchlorid (rechts)

Trotz vollständigen Umsatzes des Edukts konnte nur eine 28 % Ausbeute des gewünschten Triphosphats erzielt werden. Desweiteren ist die Methode limitiert auf die Synthese von Triphosphaten (Johnson *et al.*, 2003). Der Einsatz von Orthophosphorsäure analog zum Pyro-

phosphat resultiert aufgrund der zwei Chloratome am 5'-Phosphoroxydichlorid nicht in dem Diphosphat, sondern in einem verzweigten Triphosphat. Dieses kann durch das aus DMF und Phosphoroxychlorid gebildete Imidoylchlorid (Vilsmeier Reagenz) zum Metaphosphat verknüpft werden und nach Hydrolyse Triphosphat bilden (Johnson *et al.*, 2003). Auch die Synthese von Triphosphatanaloga wie GppNHp unterliegt Beschränkungen: unter den Reaktionsbedingungen sind Imidophosphatbindungen nicht stabil.

Aus diesen Gründen wurde die Synthese von AcrylGppCH<sub>2</sub>p nach einem alternativen Verfahren, dem Michelson Anionenaustausch durchgeführt. Im Gegensatz zur Phosphorylierung nach Ludwig ist der Michelson Anionenaustausch ein mehrstufiges Verfahren. Nach der Phosphorylierung zum Monophosphat muss eine Reinigung erfolgen, um aus überschüssigem POCl<sub>3</sub> entstandene Orthophosphorsäure vollständig zu entfernen: Orthophosphorsäure würde nachfolgend das Diphosphat als Endprodukt bilden. Die anschließende Reaktion mit Diphenylphosphochloridat resultiert in einem dreifach veresterten Pyrophosphat als reaktive Gruppe für die nachfolgende Phosphatesterbildung mit Methylendiphosphonat. Dreifachester des Pyrophosphats zeigen eine für Anhydride ungewöhnlich geringe Reaktivität (Cramer *et al.*, 1960-2), was die Reaktion gut steuerbar macht. Die Reaktion läuft sauber ab: Es konnte eine Ausbeute an AcrylGppCH<sub>2</sub>p von 89 % vor anschließender Reinigung erzielt werden. Als einzige Verunreinigung konnte AcrylGDP identifiziert werden: Entweder aus der Reinigung des Monophosphats oder durch das Methylendiphosphonat muss Orthophosphorsäure in die Reaktion eingeführt worden sein.

Insgesamt hat sich in dieser Arbeit der Michelson Anionenaustausch im direkten Vergleich zur Phosphorylierung nach Ludwigs trotz größeren experimentellen Aufwands als die vielseitigere und effizientere Methode zur Phosphorylierung von Acrylguanosin erwiesen.

## **6.2 Einführung von Cys in Rab1b: Identifikation einer geeigneten Mutationsstelle**

Für die kovalente Modifikation von kleinen G-Proteinen mit Acrylnukleotiden müssen geeignete Cys für die konjugierte Addition im jeweiligen Protein vorhanden sein. Im Fall von Rab1b muss ein solches Cys durch Mutation in das Protein eingeführt werden. Wichtige Kriterien für die Auswahl der Mutationsstelle sind in Kap.1.2.8 erörtert worden: gute sterische Zugänglichkeit der Seitenkette und räumliche Nähe zur Acrylgruppe des im kleinen G-Protein gebundenen Acrylnukleotids. Darüber hinaus soll die Mutation einen möglichst geringen Einfluss auf die Proteinfunktionalität haben. Als aussichtsreiche Mutationsstellen wurden in Rab1b die Aminosäuren Leu125 und Lys153 bestimmt: Die Seitenketten beider Aminosäuren sind in Kristallstrukturen von Rab1b (Kristallstruktur: Müller *et al.*, 2010) der Modifikation am Nukleotid zugewandt und liegen innerhalb des durch Acrylgruppe und Propyllinker gebil-

deten Radius. Desweiteren sind für beide Aminosäuren in Rab1b keine direkten Interaktionen mit dem gebundenen Nukleotid bekannt.

Im Vorfeld der kovalenten Modifikation wurden die  $k_{\text{off}}$  Werte der Dissoziation von GDP aus dem Rab1b:GDP Komplex als Indikator für die Affinität der jeweiligen Mutante zu GDP ermittelt. Dabei wich der  $k_{\text{off}}$  Wert für Rab1b L125 nur um +60 % von dem des Rab1b wt ab. Die Geschwindigkeit der Nukleotidfreisetzung an der Rab1b K153C Mutante hingegen fand 16-mal schneller als am Rab1b wt statt. Die Freisetzung von GDP wurde für alle drei Proteine sowohl in Gegenwart von GTP als auch AcrylGTP beobachtet. Dabei ergaben die Messungen des Austauschs von GDP gegen GTP annähernd identische Werte wie für den Austausch von GDP gegen AcrylGTP. Diese ersten Messungen haben gezeigt, dass AcrylGTP von Rab1b erkannt und gebunden wird. Dabei zeigt die Rab1b K153C Mutante im Gegensatz zu Rab1b L125C eine deutlich vom Rab1b wt abweichende Fähigkeit zur Nukleotidbindung. In H-Ras bildet das Lys147 des SAK (G5) Motivs eine seitenkettenvermittelte Wasserstoffbrücke zum Sauerstoff der Nukleobase aus (Wittinghofer *et al.*, 2011). Diese Beobachtung kann für Lys153 des Rab1b SAK Motivs nicht gemacht werden (Kristallstruktur: Müller *et al.*, 2010). Die Ergebnisse zeigen jedoch, dass die L153K Mutation in Rab1b trotzdem einen deutlichen Effekt auf die Fähigkeit zur Nukleotidbindung hat. Denkbar ist ein Einfluss des durch Mutation eingeführten Cys auf die benachbarten Aminosäuren. Die Seitenkette von Cys153 befindet sich in direkter Nähe zur Carbonsäurefunktion von Asp124 das NKxD (G4) Motivs. Eine Wasserstoffbrückenbindung zwischen Cys153 und Asp124 würde die Interaktion zwischen Asp124 und der Purin C2-Aminogruppe beeinträchtigen und so auch die Fähigkeit der Mutante zur Nukleotidbindung beeinflussen. Ungeachtet der genauen Ursache der verringerten Affinität der K153C Mutante zu Guanosinnukleotiden erscheint die Position Leu125 unter dem Kriterium einer geringen Beeinträchtigung der Proteinfunktionalität als die geeignetere Mutationsstelle.

Die vorangegangenen Guanosinnukleotidbindungsexperimente geben noch keinen Aufschluss über die Zugänglichkeit der Seitenkette des jeweiligen mutierten Cys für die Acrylgruppe des gebundenen Nukleotides. Daher wurden die ersten Modifikationsexperimente mit beiden Mutanten durchgeführt. Nach Umsatz beider Mutanten mit 10 Äq. AcrylGTP in EDTA-haltigem Puffer wurde Rab1b L125C nach 23 h vollständig, Rab1b K153C zu 50 % modifiziert. Massenspektrometrische Reaktionskontrollen zeigen für beide Proteine nur die Adduktmasse für die Modifikation mit einem Acrylnukleotid. Dabei liegt Rab1b L125C vollständig AcrylGDP gebunden vor, während für Rab1b K153C neben der Masse von Rab1b K153C-AcrylGDP auch die Masse von Rab1b K153C-AcrylGTP nachgewiesen werden kann. Diese Ergebnisse erlauben zwei Aussagen über die kovalente Modifikation:

Da eine Hydrolyse von AcrylGTP zu AcrylGDP stattfindet, muss die Bindung der Acrylnukleotide im aktiven Zentrum von Rab1b erfolgen.

Beide Mutanten sind Volllängenproteine und verfügen über zwei frei zugängliche C-terminale Cys. Da eine Hydrolyse der kovalent gebundenen Nukleotide stattfindet und keine Mehrfachmodifikation nachgewiesen werden kann, muss die Nukleotidbindung Voraussetzung für die kovalente Modifikation sein. Erst die Bindung des Acrylnukleotides erhöht die lokale Thiolkonzentration an der Acrylgruppe soweit, dass die konjugierte Addition mit relevanter Geschwindigkeit ablaufen kann.

Die Position Leu125 erwies sich auch hier als besser geeignet zur Einführung des Cys als Lys153. Die langsame Modifikation der Rab1b K153C Mutante kann zwei Ursachen haben: Die Nukleotidbindung dieser Mutante ist bereits intrinsisch beeinträchtigt. Zur Beschleunigung des Nukleotidaustausches wurde EDTA-haltiger Puffer verwendet, der die Affinität zwischen Nukleotid und Rab1b weiter verringert. Da die Nukleotidbindung Voraussetzung für die Modifikation ist, kann eine zu geringe Affinität zwischen Rab1b und dem Acrylnukleotid die Modifikationsreaktion negativ beeinträchtigen. Zum anderen besteht die Möglichkeit unerwünschter Interaktionen des Cys mit benachbarten Aminosäuren, die es vor der Acrylgruppe abschirmen. Als Kandidat für eine solche Interaktion in Form einer Wasserstoffbrückenbindung käme aufgrund der räumlichen Nähe beider Seitenketten vor allem Asp124 aus dem Rab1b NKxD Motv in Frage.

Resultierend aus diesen Ergebnissen wurden nachfolgend die Rab1b L125C und analoge Mutanten verwendet.

### **6.3 Darstellung konstitutiv aktiver, inaktiver und nukleosidgebundener kleiner G-Proteine**

Für die Geschwindigkeit der kovalenten Modifikation wurde eine Geschwindigkeitskonstante pseudoerster Ordnung von  $k_{\text{obs}} = 3,3 \cdot 10^{-5} \text{ s}^{-1}$  ermittelt, das entspricht einer Halbwertszeit der Reaktion von 5,9 h. Der Vergleich mit den Halbwertszeiten der intrinsischen Hydrolyse durch Rab1b von 4,5 h (Müller *et al.*, 2012) und Rab7 von 4,3 h (Simon *et al.*, 1996) begründet die Beobachtung, dass bis zum Abschluss der Modifikationsreaktionen die kovalent gebundenen Nukleotide fast vollständig hydrolysiert wurden. Daher konnte auf die gesonderte Synthese von AcrylGDP verzichtet werden: konstitutiv inaktives Rab1b L125C und Rab7 L129C wurden durch kovalente Modifikation mit AcrylGTP dargestellt.

Für die Darstellung konstitutiv aktiver Rab1b und Rab7 Proteine wurden zwei verschiedene Methoden angewandt.

Die Einführung der hydrolysedefizienten Q67L Mutation (Burman *et al.*, 2010) in Rab1b ermöglichte die Präparation von stabilem Rab1b Q67L L125C-AcrylGTP. Die analoge Mutation führte jedoch in Rab7 nicht zu einer vollständigen Eliminierung der intrinsischen Hydrolyseaktivität, so dass während der Modifikation ~24 % des Nukleotides hydrolysiert wurden.

Durch Modifikation von Rab1b L125C und Rab7 L129C mit dem nicht hydrolysierbaren AcrylGTP Analog AcrylGppCH<sub>2</sub>p konnten schließlich beide Proteine in einer konstitutiv aktiven Form dargestellt werden.

Im Komplex mit ihrem GEF liegen kleine G-Proteine in einem nukleotidfreien Zustand vor (Klebe *et al.* 1995). Durch kovalente Modifikation mit AcrylG oder AcrylGMP sollte Rab1b scheinbar nukleotidfrei vorliegen und die Bindung anderer Nukleotide unterbunden werden können, um so diesen Zustand zu simulieren. Die direkte Modifikation von Rab1b L125C mit AcrylGMP war jedoch nicht möglich. Wahrscheinliche Ursache dafür ist die deutlich verringerte Affinität von kleinen G-Proteinen zu GMP im Vergleich zu GDP/GTP (Faktor 10<sup>-6</sup>, (Goody *et al.*, 1991, John *et al.*, 1990, Rensland *et al.*, 1995)). Dieses Resultat steht in gutem Einklang mit dem Ergebnis, dass die Acrylnukleotidbindung direkte Voraussetzung für die konjugierte Addition ist. Die Darstellung von Rab1b L125C-AcrylG gelang schließlich durch den Umsatz von Rab1b L125C-AcrylGTP mit äquimolaren Mengen DrrA<sub>GEF</sub> und katalytischen Mengen Alkalischer Phosphatase (AP). Die GEF-Domäne von DrrA (DrrA<sub>GEF</sub>) bildet temporäre Komplexe mit Rab1b L125C-AcrylGTP, in denen das kovalent gebundene Nukleotid aus dem aktiven Zentrum des Rab Proteins verdrängt wird. Die temporäre Freistellung der Nukleotide genügt, um durch die AP zum Nukleosid hydrolysiert zu werden. Das Resultat sind stabile Rab1b L125C-AcrylG:DrrA<sub>GEF</sub> Komplexe. In der Größenausschlusschromatographie war der Komplex tatsächlich auch in der Gegenwart von Nukleotiden (100 µM GDP) stabil: Damit konnte gezeigt werden, dass eine Bindung von GDP und damit Dissoziation von DrrA<sub>GEF</sub> nicht stattfindet. Die Modifikation von Rab1b mit AcrylG inhibiert also den Nukleotidaustausch und resultiert in einem konstitutiv nukleotidfreien Protein.

An Ypt7 und CDC42 sollte überprüft werden, ob analoge Mutationen zu L125C in Rab1b einen generellen Ansatz zur kovalenten Modifikation von kleinen G-Proteinen mit Acrylnukleotiden liefern. Die entsprechende Mutation in Ypt7 ist A130C, in CDC42 ist es L119C. Für beide Proteine konnte jedoch keine Modifikation trotz erfolgreicher Nukleotidbeladung nachgewiesen werden. Die Aminosäure Ala130 folgt in Ypt7 analog zu Leu125 in Rab1b direkt auf das Asp des G4 Motivs, ebenso Leu119 in CDC42. In Ypt7 und Rab1b sind die Aminosäuren in der β5-α4 Schleife lokalisiert, ihre jeweiligen Seitenketten sind für die Acrylgruppe sterisch gut zugänglich und liegen in vergleichbarer Entfernung zur Purin C2-Aminogruppe des gebundenen Nukleotides (Kristallstrukturen: Pai *et al.*, 1990, Constantinescu *et al.*, 2002). In CDC42 sind hier anstelle einer Schleife α-helikale Strukturen zu sehen, die die Flexibilität der Region möglicherweise einschränken (Kristallstruktur: Abdul *et al.*, 1999). Betrachtet man die durch Mutation eingeführten Cys in Ypt7 und Rab1b isoliert, so ist kein Grund ersichtlich, warum nur eine der beiden Thiolgruppen kovalent modifiziert werden kann. Aufgrund der Tatsache, dass Thiole sowohl als Akzeptoren als auch Donatoren Wasserstoffbrücken ausbilden können und jeweils ein aliphatischer durch einen polaren Aminosäurerest

ersetzt wird, ist jedoch davon auszugehen, dass sie einen verändernden Einfluss auf ihre Umgebung haben und umgekehrt. Ohne Kristallstrukturen der jeweiligen Mutanten wird es jedoch schwer sein, diese Wechselwirkungen der durch Mutation eingeführten Thiolgruppe zu bestimmen.

Anhand strukturebiologischer Überlegungen können also vielversprechende Mutationsstellen ausgewählt werden, die tatsächliche Zugänglichkeit der Mutanten für eine kovalente Modifikation muss jedoch im Einzelfall mit biochemischen Methoden überprüft werden. Durch Einführung der Mutationen L125C in Rab1b und L129C in Rab7 konnten beide Proteine als konstitutiv aktiv und inaktiv dargestellt werden. Zusätzlich konnte Rab1b mit Acrylguanosin modifiziert und so ein nukleotidfreies kleines G-Protein präpariert werden.

#### **6.4 Biochemische Charakterisierung von konstitutiv aktivem/inaktivem Rab1b**

Um kovalent modifizierte kleine G-Proteine in zellbiologischen Experimenten einsetzen zu können, müssen sie zwei Anforderungen erfüllen:

- Ihr Zustand muss stabil sein, es darf kein Nukleotidaustausch am modifizierten Protein stattfinden.
- Sie müssen in Abhängigkeit von ihrem gebundenen Nukleotid mit ihren natürlichen Effektoren und Regulatoren die gleichen Interaktionsmuster zeigen wie der Wildtyp des Proteins.

Mit Rab1b steht ein biochemisch ausgezeichnet charakterisiertes Protein zur Verfügung, für das aus jeder Klasse essentieller Interaktionspartner mindestens ein Vertreter bekannt ist. Die Interaktionen von kovalent modifiziertem Rab1b mit seinen Regulatoren, dem GEF DrrA (aus *Legionella pneumophila* (Schoebel *et al.*, 2009)), dem GAP TBC1D20 (Sklan *et al.*, 2007) und GDI (Pfeffer *et al.*, 1995) sowie seinen Effektoren OCRL1 und Mical3 (Hou *et al.*, 2011, Fischer *et al.*, 2004), sollten charakterisiert werden. Anhand der erhaltenen Daten sollte an Rab1b exemplarisch untersucht werden, ob kovalent modifizierte kleine G-Proteine auf natürliche Weise mit ihren Regulatoren und Effektoren interagieren.

Die Mechanismen der posttranslationalen Modifikation mit zwei Geranylgeranylgruppen von Rab Proteinen durch REP und GGTase II sind bekannt (Wu *et al.*, 2009). Im Hinblick auf erste zellbiologische Experimente sollte geprüft werden, ob eine Prenylierung von kovalent mit AcrylGDP modifiziertem Rab1b durch REP und GGTase II *in vitro* erreicht werden kann. Damit stünde ein einfacher Test für erste Mikroinjektionsexperimente zur Verfügung: eine Lokalisation der injizierten Rab1b Proteine an Membranen würde anzeigen, dass eine Prenylierung auch *in vivo* stattfindet.

#### 6.4.1 Interaktion mit dem GEF DrrA

Um zu prüfen, ob der Nukleotidaustausch durch die kovalente Modifikation inhibiert wird wurden Fluoreszenzmessungen an Rab1b L125C:GDP und Rab1b L125C-AcrylGDP durchgeführt. Nach Zugabe von GppNHp war für Rab1b L125C:GDP eine Abnahme der Tryptophanfluoreszenz zu beobachten, die durch Zugabe von DrrA<sub>GEF</sub> beschleunigt wurde. Für das kovalent modifizierte Rab1b war dagegen keine Änderung festzustellen. Die beiden Trp in Rab1b (Trp62 und Trp102) befinden sich im  $\beta$ -Faltblatt  $\beta$ 3 und der  $\alpha$ -Helix  $\alpha$ 4. Sie liegen damit an der zur Acrylgruppe entgegengesetzten Seite des Proteins, womit ein quencher Effekt der Modifikation auf die Tryptophanfluoreszenz effektiv ausgeschlossen werden kann. Gemeinsam mit der Messung der Rab1b L125C-AcrylG:DrrA<sub>GEF</sub> Komplexstabilität in Gegenwart von GDP zeigt dieses Experiment, dass der Austausch von Nukleotiden durch die kovalente Modifikation mit Acrylnukleotiden und Acrylnukleosiden inhibiert wird.

Die Interaktion zwischen Rab1b L125C und DrrA wurde mittels Größenausschlusschromatographie anhand der Retentionszeiten analysiert. Rab1b L125C lag vollständig im Komplex mit DrrA vor, während für das kovalent mit AcrylGDP modifizierte Rab1b L125C keine Komplexbildung oder eine Veränderung der Retentionszeit in Gegenwart von DrrA nachzuweisen war. Die Mutation L125C an Rab1b inhibiert nicht die Bildung stabiler Komplexe mit DrrA, wohl aber die Modifikation mit AcrylGDP. Dieses Ergebnis entspricht der Erwartung: Die Bindung eines GEF an ein kleines G-Protein resultiert über einen intermediären ternären Komplex in der Nukleotidfreisetzung und Bildung eines in Abwesenheit von Nukleotiden stabilen binären Komplexes aus kleinem G-Protein und GEF. Dieser Prozess ist umkehrbar, so dass die Bindung eines Nukleotides über einen ternären Komplex zur Freisetzung des GEFs und Bildung des binären Komplexes zwischen kleinem G-Protein und Nukleotid führt (Klebe *et al.*, 1995, Vetter *et al.*, 2001). Die Hydrolyse von kovalent an Rab1b gebundenem AcrylGTP in Gegenwart von AP und DrrA<sub>GEF</sub> hat gezeigt, dass DrrA zwar Komplexe mit kovalent modifiziertem Rab1b bildet. Hier kommt es jedoch zu einer direkten Rückbindung des kovalent gebundenen AcrylGDP und damit zur Dissoziation von DrrA. Aufgrund ihres kurzlebigen Charakters führen diese Interaktionen nicht zu einer Veränderung der Retentionszeit.

#### 6.4.2 Interaktion mit dem GAP TBC1D20

Die Interaktionen zwischen kovalent modifiziertem Rab1b und seinem GAP TBC1D20 wurden durch Bestimmung der GAP-katalysierten Hydrolyseraten mittels Messung der Tryptophanfluoreszenz charakterisiert. Durch Vergleich der TBC1D20 katalysierten GTP-Hydrolyseraten von Rab1b L125C und Rab1b wt konnte im Vorfeld gezeigt werden, dass die L125C Mutation keinen messbaren Einfluss auf die Interaktion von Rab1b und TBC1D20 hat. Die eigentlichen Messungen wurden an den hydrolysedefizienten Proteinen Rab1b Q67L L125C:GTP und Rab1b Q67L L125C-AcrylGTP durchgeführt. Möglich war das

aufgrund des besonderen Katalysemechanismus der TBC-Domänen GAPs, der es ihnen ermöglicht, die Fähigkeit zur GTP Hydrolyse in Q67L Mutanten wieder herzustellen (Kap.1.2.4) (Pan *et al.*, 2006).

Die ermittelten Geschwindigkeitskonstanten der Hydrolyse zeigen, dass für beide Q67L Mutanten die 100-fache Menge TBC1D20 notwendig ist, um die gleiche Hydrolyserate wie für den Rab1b wt zu erreichen. Die Hydrolyseraten von Rab1b Q67L L125C:GTP und Rab1b Q67L L125C-AcrylGTP sind dabei identisch. Die kovalente Modifikation hat keinen nachweisbaren Einfluss auf die TBC1D20 vermittelte Hydrolyse. Das ist ein starkes Indiz dafür, dass auch die Interaktionen von kovalent modifiziertem Rab1b mit TBC1D20 nicht beeinträchtigt sind.

#### 6.4.3 Interaktion mit GDI

Um die Interaktion von kovalent modifiziertem Rab1b mit GDI über die Bestimmung der Dissoziationskonstante zu charakterisieren wurden im Vorfeld Rab1b Proteine mit einem C-terminalen CaaX-Box Motiv (hier: CVIL) durch GGTase I mit NBD-Farnesyl modifiziert. Eine Prenylierung durch REP und GGTase II ist hier nicht zielführend, da die Komplexe zwischen REP und prenylierten Rab Proteinen  $K_D$  Werte zwischen 61 pM und 1,3 nM aufweisen (Wu *et al.*, 2007). Eine effiziente Dissoziation der Komplexe und Trennung der Proteine unter nativen Bedingungen ist praktisch nicht möglich (Shapiro *et al.*, 1995, Kalinin *et al.*, 2001). Die Geschwindigkeitskonstanten  $k_{on}$  und  $k_{off}$  der Assoziation bzw. Dissoziation der Komplexe Rab1b L125C:GDP:GDI und Rab1b L125C-AcrylGDP:GDI wurden über Messung der Intensitätsänderung der NBD-Fluoreszenz ermittelt. Die Bestimmung der Geschwindigkeitskonstanten  $k_{off}$  der Dissoziation wurden in Gegenwart von LidA durchgeführt. LidA ist ein Rab1b Effektor aus *Legionella pneumophila*, der Rab1b mit einer ausgesprochen hohen Affinität bindet. Für Rab1b:GDP wurde eine Dissoziationskonstante  $K_D = 30$  pM ermittelt (Schoebel *et al.*, 2011). Da der  $K_D$  Wert des Komplexes von GDI mit einfach NBD modifiziertem Rab1b nur 13 nM beträgt (Wu *et al.*, 2010), kann eine Rückbindung von dissoziiertem Rab1b an GDI in Gegenwart von LidA ausgeschlossen werden.

Die ermittelten  $k_{on}$  Werte von Rab1b L125C:GDP und Rab1b L125C-AcrylGDP sind identisch. Auch die  $k_{off}$  Werte zeigen keinen Unterschied zwischen kovalent modifiziertem und dem nicht modifizierten Rab1b L125C. Die aus den Geschwindigkeitskonstanten ermittelten  $K_D$  Werte liegen im einstelligen nanomolaren Bereich (4,0-4,6 nM) und damit in der gleichen Größenordnung wie zuvor ermittelte Dissoziationskonstanten für einfach prenylierte Rab1b und Rab7 Proteine (Schoebel *et al.*, 2009, Wu *et al.*, 2007, Wu *et al.*, 2010). Die Ergebnisse zeigen, dass die kovalente Modifikation mit AcrylGDP keinen negativen Einfluss auf die Affinität von Rab1b zu GDI hat. Vergleiche mit Dissoziationskonstanten von Rab:GDI Komple-

zen aus der Literatur machen deutlich, dass auch die L125C Mutation keinen signifikanten Einfluss haben kann.

#### 6.4.4 Interaktion mit den Effektoren OCRL1 und Mical3

Mit OCRL1 und Mical3 wurde die Interaktion von kovalent modifiziertem Rab1b mit zwei verschiedenen Effektoren mittels Größenausschlusschromatographie untersucht. Für jeden Effektor wurden zum Vergleich Negativproben mit Rab1b:GDP und Positivproben mit Rab1b:GppNHp gemessen. Das konstitutiv inaktive Rab1b L125C-AcrylGDP hat ebenso wie Rab1b:GDP mit keinem der beiden Effektoren Komplexe gebildet. Für das konstitutiv aktive Rab1b Q67L L125C-AcrylGTP konnte dagegen für beide Effektoren sehr deutlich eine Komplexbildung nachgewiesen werden. Abweichend von Rab1b:GppNHp wiesen die Peaks beider Komplexe einen leichten rechtsseitigen Schenkel auf. Diese Beobachtung ist ein Indiz, dass zwei verschiedene Populationen des konstitutiv aktiven Rab1b vorliegen: Ein Teil bildet stabile Komplexe analog zu Rab1b:GTP, ein anderer Teil scheint Komplexe geringerer Stabilität mit den Effektoren auszubilden, die zu höherer Retentionszeit verschoben eluiert werden. Für OCRL1 wurde zusätzlich ein Experiment mit dem konstitutiv aktiven Rab1b L125C-AcrylGppCH<sub>2</sub>p durchgeführt. Hier konnten die gebildeten Komplexe als scharfer Peak, wie er auch für Rab1b:GTP beobachtet wurde, nachgewiesen werden.

In diesen Experimenten konnte klar gezeigt werden, dass die kovalent modifizierten Rab1b Proteine in Abhängigkeit von ihrem gebundenen Nukleotid mit ihren Effektoren OCRL1 und Mical3 interagieren. Nur die konstitutiv aktiven Formen bilden Komplexe mit diesen Effektoren. Geringfügige Abweichungen vom Interaktionsmuster des Rab1b wt konnte nur für Rab1b Q67L L125C-AcrylGTP beobachtet werden, nicht jedoch für Rab1b L125C-AcrylGppCH<sub>2</sub>p. Die Protein-Proteinkontakte im Komplex Rab8:OCRL werden vor allem mit Aminosäuren der Rab8 *Switch1*, *Interswitch* und *Switch2* Region ausgebildet (Hou *et al.*, 2011). Mit der Q67L Mutation in Rab1b wurde eine polare durch eine aliphatische Aminosäure in direkter Nähe des *Switch2* substituiert. Da sich das mit AcrylGppCH<sub>2</sub>p modifizierte Rab1b L125C identisch zum Rab1b wt verhält, ist das geringfügig abweichende Verhalten des Rab1b Q67L L125C-AcrylGTP eher mit dem Einfluss der Q67L Mutation auf die mit OCRL1 interagierenden Motive als mit der von der Rab1b-OCRL1 Interaktionsfläche abgewandten Verbindung zwischen AcrylGTP und Rab1b zu begründen.

#### 6.4.5 Modifikation mit NBD-Farnesyl durch REP und GGTase II

Um die Prenylierung von Rab1b durch GGTase II und REP beobachten und quantifizieren zu können, wurde das fluoreszierende NBD-Farnesyl-PP<sub>i</sub> anstelle von Geranylgeranyl-PP<sub>i</sub> eingesetzt. Die Analyse der Proben fand mittels SDS-PAGE statt, es wurde die Fluoreszenzin-

tensität der Rab1b Banden bestimmt. Verglichen wurde der zeitliche Verlauf der Prenylierung von Rab1b L125C:GDP und Rab1b L125C-AcrylGDP.

Weder im zeitlichen Verlauf der Fluoreszenzintensität noch im erreichten Fluoreszenzmaximum war ein signifikanter Unterschied zwischen beiden Proteinen festzustellen. Sowohl Rab1b L125C:GDP als auch das konstitutiv inaktive Rab1b L125C-AcrylGDP werden mit gleicher Geschwindigkeit durch GGTase II und REP mit NBD-Farnesyl modifiziert. Ein negativer Einfluss auf die initiale Bindung von kovalent modifiziertem Rab1b durch REP und die anschließende Bildung des ternären, katalytisch aktiven Komplexes aus Rab1b, REP und GGTase II kann nicht festgestellt werden.

## 6.5 Mikroinjektion von kovalent modifiziertem Rab1b in HeLa Zellen

Die biochemischen Charakterisierungen von kovalent modifizierten Rab1b Proteinen haben gezeigt, dass sie *in vitro* auf native Weise mit ihren Regulatoren und Effektoren interagieren. Als Grundlage für die geplanten Mikroinjektionsexperimente konnte gezeigt werden, dass konstitutiv inaktives Rab1b L125C-AcrylGDP durch REP und GGTase II *in vitro* C-terminal mit NBD-Farnesyl modifiziert werden konnte.

Durch die Mikroinjektion von kovalent modifizierten, nicht prenylierten eGFP-Rab1b Fusionsproteinen in HeLa Zellen sollte anhand der zeitabhängigen Lokalisation der Rab1b Proteine primär beobachtet werden, ob eine C-terminale Modifikation mit Prenylgruppen auch in zytosolischer Umgebung erfolgt. Besonderes Augenmerk lag dabei auf den Unterschieden und Gemeinsamkeiten zwischen dem konstitutiv aktiven eGFP-Rab1b Q67L L125C-AcrylGTP und dem konstitutiv inaktiven eGFP-Rab1b L125C-AcrylGDP. Beobachtet wurde die zeitabhängige Verteilung der eGFP-Fluoreszenz in den Zellen.

Sowohl für das konstitutiv inaktive als auch aktive Rab1b ergab sich zu Beginn und zum Ende der Beobachtungen ein identisches Bild: nach 15/30 min war kein Muster für die Verteilung der eGFP-Fluoreszenz zu erkennen, beide Proteine lagen also im Zytosol der Zellen vor. Nach 8/13 h hatte die Fluoreszenzintensität im Zytosol drastisch abgenommen. Stattdessen war für beide Proteine eine Konzentration der Fluoreszenz in räumlich scharf abgegrenzten Strukturen in Zellkernnähe zu beobachten. Es war jeweils eine Ansammlung mehrerer fluoreszierender Strukturen zu sehen. Sowohl die Lokalisation in Zellkernnähe als auch die gestapelte Anordnung der fluoreszierenden Strukturen lassen darauf schließen, dass die beiden kovalent modifizierten Rab1b Proteine an den Membranen des Golgi-Apparates lokalisiert waren. Der einzige zu beobachtende Unterschied zwischen dem konstitutiv aktiven und inaktiven Rab1b lag im zeitlichen Verlauf der Lokalisation vom Zytosol zum Golgi-Apparat: Bereits nach 1 h war ein Großteil des konstitutiv inaktiven Rab1b an Membrane des Golgi-Apparats assoziiert, während bei dem konstitutiv aktiven Rab1b noch keine Golgi-

Strukturen zu erkennen waren. Auch nach 13 h ist die Fluoreszenzintensität im Zytosol für das aktive Protein größer als für das inaktive.

Anhand dieser Beobachtungen können drei Aussagen gemacht werden:

- Sowohl konstitutiv aktives als auch inaktives Rab1b werden *in vivo* durch REP und GGTase II erkannt und prenyliert.
- Im Anschluss an die C-terminale Modifikation mit Geranylgeranylgruppen werden beide Proteine an die Membrane der gleichen Zellorganelle transportiert: den Golgi-Apparat.
- Die Art des gebundenen Nukleotides hat einen Einfluss auf die Geschwindigkeit der Prenylierung/Membranrekrutierung.

Die Geschwindigkeit der beobachteten Membranassoziation hängt von zwei Faktoren ab: Der Prenylierung des Rab1b als direkte Voraussetzung einer Membranassoziation sowie dem Transport zur und die Rekrutierung an die Membran.

Die Prenylierung von Rab Proteinen durch GGTase II ist abhängig von der Bindung des Rab durch REP. Dabei bindet REP bevorzugt GDP gebundenes Rab (Wu *et al.*, 2010). Für Rab7-NBD-Farnesyl ist die Affinität zu REP im GDP gebundenem Zustand z.B. 1200-mal größer als für das GTP gebundene Protein (Wu *et al.*, 2010). Tatsächlich konnte *in vitro* eine schnellere Prenylierung von GDP gebundenen im Vergleich zu GTP gebundenen Rab Proteinen nachgewiesen werden (Seabra, M. C., 1996). Die beobachtete schnellere Lokalisation des konstitutiv inaktiven Rab1b am Golgi kann also im Einklang mit der Theorie im Sinne einer schnelleren Modifikation durch REP und GGTase II interpretiert werden.

Rab1b hat wichtige Funktionen in der Regulation des vesikulären Transports vom ER (Endoplasmatisches Retikulum) zum Golgi-Apparat, dem intra-Golgi Transport und dem Recycling von Membranen durch frühe Endosomen (Cai *et al.*, 2007, Hutt *et al.*, 2008). Für die Rekrutierung von Rab Proteinen an Membrane werden gegenwärtig zwei Mechanismen diskutiert (Kap. 1.2.2): Die Herabsetzung der Affinität von Rab zu REP/GDI durch GEF katalysierten Nukleotidaustausch (Schoebel *et al.*, 2009) und die Freisetzung von Rab aus dem Komplex mit REP/GDI durch einen Dissoziationsfaktor GDF (Pfeffer *et al.*, 2004). Beide Modelle schließen sich nicht gegenseitig aus.

Die Lokalisation sowohl des konstitutiv aktiven als auch inaktiven Rab1b ausschließlich an Membranen des Golgi wirft Fragen auf. Für das inaktive, mit AcrylGDP modifizierte Rab1b wäre nach der Prenylierung erwartet worden, dass es zu deutlichen Teilen im Komplex mit GDI zytosolisch vorliegt: Im physiologischen Gleichgewicht liegen in der Zelle 10-50 % der Rab Proteine im Zytosol vor (Takai *et al.*, 2001). Dies konnte nicht beobachtet werden.

Für das konstitutiv aktive Rab1b wäre eine Rekrutierung am ER, dem Donorkompartiment des von Rab1b regulierten vesikulären Transports zu erwarten gewesen. Die Mechanismen der Rekrutierung beider Proteine an Golgi Membrane können mit den vorliegenden Daten nicht geklärt werden. Eine Membranrekrutierung über den GEF Mechanismus kann jedoch ausgeschlossen werden: ein Nukleotidaustausch an kovalent modifiziertem Rab1b ist nicht möglich. Das konstitutiv aktive Rab1b liegt dagegen bereits GTP gebunden vor. Die Affinität zu REP ist also gering genug, um eine Freisetzung an eine Membran zu ermöglichen. Obwohl unter thermodynamischen Gesichtspunkten hierfür keine weiteren Faktoren notwendig sind (Schoebel *et al.*, 2009), kann ausschließlich eine Lokalisation an Membranen des Golgi-Apparates beobachtet werden. Es muss also für beide Proteine einen dirigierenden, GEF-unabhängigen Rekrutierungsmechanismus geben. Folgendes Modell wird für die Rekrutierung beider Proteine am Golgi vorgeschlagen:

Eine initiale Rekrutierung von konstitutiv aktivem Rab am ER kann anhand der Daten nicht ausgeschlossen werden. Die Ergebnisse der biochemischen Charakterisierung von kovalent modifiziertem Rab1b erlauben die Annahme, dass Rab1b Q67L L125C-AcrylGTP mit seinen Effektoren p115 (Allan *et al.*, 2000) während der Vesikelknospung und GM130 (Moyer *et al.*, 2001) während der Vesikelerkennung am Golgi-Apparat auf natürliche Weise interagieren und den ER-Golgi Vesikeltransport so ermöglichen kann. Ein anschließender Rücktransport des konstitutiv aktiven Rab1b vom Golgi zum ER durch GDI ist nicht möglich, so dass schließlich die beobachtete Akkumulation des Rab1b am Golgi-Apparat stattfindet.

Auch für das konstitutiv inaktive Rab1b ist eine initiale Rekrutierung am ER denkbar. Ein durch natives Rab1b vermittelter vesikulärer Co-Transport von Rab1b L125C-AcrylGDP vom ER zum Golgi könnte aufgrund eines Überschusses an Rab1b gegenüber GDI zu der beobachteten Akkumulation von eGFP-Rab1b L125-AcrylGDP im Golgi führen.

Einen alternativen Erklärungsansatz der beobachteten Lokalisation von Rab1b am Golgi liefern Ergebnisse einer Arbeitsgruppe um M. Seabra. An verschiedenen Rab Proteinen konnte gezeigt werden, dass ein Verlust der ursprünglichen Zielinformation eines Rabs durch Mutation zu einer Fehllokalisierung an Membrane des ER/Golgi führte (Ali *et al.* 2004). Als mitverantwortliche Regionen für die native Lokalisation von Rab5a und Rab27a konnten die Rab Motive RabSF2, RabSF3 und RabF4 identifiziert werden (Ali *et al.* 2004). Keines dieser Motive liegt in der Nähe der Mutationsstelle Leu125 in Rab1b (Pereira *et al.* 2000). Da es jedoch keine umfassende Kenntnis aller an der Lokalisation beteiligten Regionen in Rab Proteinen gibt, kann der von Seabra beobachtete Effekt der Fehllokalisierung am ER/Golgi in diesem Experiment nicht vollständig ausgeschlossen werden. Unter diesem Gesichtspunkt ist zur Absicherung der Ergebnisse eine Wiederholung des Experiments mit einem Rab erstrebenswert, das nativ weder am ER noch am Golgi lokalisiert ist.

Dieses erste zellbiologische Experiment hat bewiesen, dass sowohl konstitutiv aktives als auch konstitutiv inaktives Rab1b *in vivo* durch GGTase II und REP prenyliert wird. Die Membranrekrutierung am Golgi-Apparat ist für das konstitutiv inaktive Rab1b eher und in größerem Umfang zu beobachten. Da auch Rab1b L125C-AcrylGDP an Membrane lokalisiert wird, muss es für Rab1b einen vom Nukleotidaustausch unabhängigen Rekrutierungsmechanismus an Membrane geben.

## 6.6 Ausblick

Die einzelnen Schritte der beschriebenen Synthese von Acrylnukleotiden können leicht modifiziert werden, um die Nukleotide an verschiedene Anforderungen anzupassen. Vielversprechend erscheint insbesondere die Einführung einer *N*-Methylantranoylgruppe an den 2'/3'-Hydroxylgruppen der Ribose, um mit der kovalenten Modifikation direkt einen Fluoreszenzmarker in das jeweilige Protein einzuführen. Die Länge des Linkers kann annähernd frei variiert und das Nukleotid so für die Anwendung in verschiedenen G-Proteinen optimiert werden. Mit Acrylamid und Cystein wurde ein Michaelakzeptor -donor Paar gefunden, das an kleinen G-Proteinen selektiv zur Reaktion gebracht werden kann. Da die Bindung des Nukleotides jedoch Voraussetzung für die Reaktion ist, können kleine G-Proteine nicht direkt mit AcrylGMP und AcrylG modifiziert werden. Die Einführung reaktiverer Gruppen am Linker wie z.B. 2-Iodacetamid könnte auch eine Modifikation ohne vorherige Nukleotidbindung auf Kosten der Selektivität der Reaktion erlauben.

In dieser Arbeit konnte scheinbar nukleotidfreies Rab1b im Komplex mit DrrA<sub>GEF</sub> dargestellt und gezeigt werden, dass dieser Komplex auch in Gegenwart von Nukleotiden stabil ist. Dass nur für einen Bruchteil der Rab Proteine die korrespondierenden GEFs bekannt sind, macht konstitutiv nukleotidfreie kleine G-Proteine insbesondere für zwei Anwendungen interessant: immobilisiert könnten sie verwendet werden, um GEFs aus Zelllysaten zu fischen, in zellbiologischen Experimenten wären sie einsetzbar, um den GEF Pool eines Rab Proteins zu erschöpfen. Damit könnte natives Rab deaktiviert werden, ohne dass Kenntnisse seiner GEFs oder GAPs notwendig wären.

Mit Rab1b und Rab7 konnten in dieser Arbeit zwei kleine G-Proteine über die L125C (L129C) Mutation kovalent modifiziert werden. Sophie Vieweg konnte in ihrer Masterarbeit (TU München/Max Planck Institut Dortmund, 2012) mit E35C in Rab1b eine Mutationsstelle identifizieren, an der die folgenden kleinen G-Proteine kovalent modifiziert werden konnten: Rab1b E35C, Rab6 N40C, Rab7 N35C, Rab8 S35C, Cdc42 S30C und Ypt7 Q35C. Mit CDC42 konnte auch ein kleines G-Protein aus der Rho-Familie modifiziert werden. Diese Ergebnisse stimmen optimistisch, dass bei richtiger Abstimmung von Linkerlänge und Mutationsstelle der Ansatz allgemein auf kleine G-Proteine angewandt werden kann.

Die zwei wesentlichen Voraussetzungen für die Modifikation eines Proteins mit einem Acrylguanoseninnukleotid sind seine Fähigkeit zur Bindung von Acrylguanoseninnukleotiden und die Möglichkeit, ein sterisch zugängliches Cys in direkter Nähe zur Acrylfunktion einzuführen. Die erste Voraussetzung erfüllen gegenwärtig potentiell alle 37.767 bekannten Proteine mit einer G-Domäne (Wittinghofer *et al.*, 2011, <http://supfam.org>). Die Suche von geeigneten Mutationsstellen für die Einführung eines Cys müsste schließlich für jede der 22 G-Protein Familien und 57 Unterfamilien (Leipe *et al.*, 2002) individuell nach denselben Kriterien, wie sie in Kap.1.2.8 für Rab1b beschrieben wurden, durchgeführt werden. Insgesamt spricht in der Theorie nichts gegen eine allgemeine Übertragung des hier beschriebenen Ansatzes zur Zustandskontrolle kleiner G-Proteine durch kovalente Modifikation auf die Gesamtheit der G-Proteine.

## 7 Material und Methoden

### 7.1 Chemikalien

Hersteller	Chemikalie
Acros Organics	Isopröpanol, <i>N,N</i> -Dimethylformamid, <i>N,N</i> -Dimethylformamid trocken, Tetrahydrofuran trocken, Trimethylphosphat, Tri- <i>N</i> -Butylamin,
Applichem	Acrylamid 4K Lösung (30 %)
Carl Roth GmbH + Co KG	Trifluoressigsäure, Trichloressigsäure, Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan, Kaliumdihydrogenphosphat
Fisher Scientific	Acetonitril HPLC Grade, Cyclohexan, Ethylacetat, Dichlormethan, Chloroform
Fluka Chemie AG	Tetra- <i>N</i> -butylammoniumbromid, Zirkonylchlorid
Fluka-Sigma Aldrich Chemie GmbH	Methanol
GERBU Biotechnik GmbH	<i>N</i> -(Tri(hydroxymethyl)methyl)Glycin, EDTA Disodium
Mallinckrodt Baker B. V. Holland	Dikaliumhydrogenphosphat, Essigsäure, Magnesiumchloridhexahydrat, Natronlauge 1 M, Salzsäure 2 M
SERVA Electrophoresis GmbH	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure Natriumsalz, Bromphenolblau <i>N,N,N,N</i> -Tetramethylethyldiamin, Ammoniumpersulfat, Coomassie Brilliant Blau R250, $\beta$ -Mercaptoethanol
Sigma Aldrich Chemie GmbH	Essigsäure 99 %, Ethanol abs., Guanosin, Guanosin-5'-Monophosphat, Guanosin-5'-Diphosphat, Guanosin-5'-Triphosphat, Guanosin-5'- $\beta,\gamma$ -Imido-triphosphat, Bromoform, Isoamylnitrit, 2-Methoxyethanol, <i>Tert</i> -butyl-3-aminocarbamat, Phospharpentoxid, 7N NH <sub>3</sub> in MeOH, MeOH trocken, Diethylether trocken, Pyridin trocken, Pyridin, Phosphoroxchlorid, Pyrophosphat Tetrasodium, Methylendiphosphonat, Triethylamin, Diphenylphosphochlorinat, Acrylsäure- <i>N</i> -Hydroxysuccinimidester
Thermo Scientific	Tris-(Carboxyethyl)-phosphin Hydrochlorid
Thermo Fisher Scientific	Coomassie Protein Assay Reagenz

NBD-Farnesylpyrophosphat wurde von Yaowen Wu bereit gestellt.

## 7.2 Geräte

Hersteller	Gerät
Applied Photophysics Ltd., Surrey, Großbritannien	Stopped Flow Gerät
Beckmann Coulter, Vernon Hills USA	HPLC System, Beckmann Coulter Gold
Bio-Rad Laboratories GmbH München, Deutschland	SDS PAGE System und Zubehör
Eppendorf, Hamburg, Deutschland	Tischzentrifugen (5415 C&D), Zentrifuge 5810R, Thermomixer Comfort
Fujifilm Holdings Corporation, Tokio, Japan	FLA 5000 Fluorescence Image Reader
GE Healthcare, München, Deutschland	Äkta Purifier HPLC/GeFi System
Gilson Inc., Middleton USA	2,5 µl, 10 µl, 20 µl, 100 µl, 200 µl und 1000 µl Pipetten
Horiba Jobin Yvon Inc., Edison, U.S.A.	FluoroMax-3
Kern & Sohn GmbH, Balingen, Deutschland	Präzisionswaage Kern 572
Knick elektronische Messgeräte GmbH & Co. KG, Berlin, Deutschland	pH-Meter (Calimatic 761)
PeqLab Biotechnology GmbH (Erlangen, Deutschland)	Nanodrop Spectrophotometer ND-1000
Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA	ESI-MS System LCQ Advantage Max
Varian Inc.,	NMR System Varian Mercury 400

## 7.3 Pufferlösungen

Coomassie Brilliantblau Färbelösung

44 % (v/v) Ethanol  
12 % (v/v) Essigsäure  
0,15 % (w/v) Coomassie Brilliant Blau  
R250

EDTA-Puffer

20 mM HEPES  
50 mM NaCl  
1 mM TCEP  
1 mM EDTA  
pH=7,5 über NaOH

DMEM ( <i>Dulbecco's modified eagle medium</i> )	Nährmedium für humane und tierische Zellkulturen. Hersteller: Pan Biotech GmbH, Deutschland Produktnummer: P04-01163
GDP-Puffer	20 mM HEPES 50 mM NaCl 1 mM TCEP 1 mM EDTA 10 µM GDP pH=7,2 über NaOH
Proteinstandardpuffer	20 mM HEPES 50 mM NaCl 1 mM TCEP 1 mM MgCl <sub>2</sub> pH=7,5 über NaOH
SDS-PAGE Anodenpuffer	0,2 M Tris pH=8,9 über HCl
SDS-PAGE Entfärbelösung	10 % (v/v) Essigsäure
SDS-PAGE Katodenpuffer	0,1 M Tris 0,1 M Tricin 0,1 % SDS pH=8,25 über HCl
SDS-4X Probenpuffer	200 mM Tris 8 % (w/v) SDS 40 % (v/v) Glycerin 0,4 % Bromphenolblau 10 % (v/v) β-Mercaptoethanol pH=6,8 über HCl
TBA-Br Puffer	100 mM KP <sub>i</sub> 10 mM TBA-Br 10 % (v/v) MeCN pH=7,0
Triethylammoniumkarbonatpuffer	Durch 3 M TEA wurde CO <sub>2</sub> geleitet, bis ein pH-Wert von 7,5 erreicht wurde. Der Puffer wurde nach Bedarf verdünnt

Sämtliche Puffer wurden mit entionisiertem Wasser angesetzt.

## **7.4 Chromatographische Methoden und Trennverfahren**

### **7.4.1 Größenausschlusschromatographie**

Bei der Größenausschlusschromatographie handelt es sich um ein physikalisches Verfahren zur Trennung von Partikeln anhand ihres hydrodynamischen Radius (auch „Stokes Radius“). Die Probe wird dabei durch ein poröses Material mit definierten Porengrößen geleitet. Erlaubt der hydrodynamische Radius eines Partikels die Diffusion in die Poren, vergrößert sich sein zur Verfügung stehendes Diffusionsvolumen im Vergleich zu Partikeln, die nicht in die Poren diffundieren können. Mit dem Diffusionsvolumen steigt die Retentionszeit eines Partikels. Die Porengröße bestimmt dabei den Trennbereich des Materials: Partikel deren hydrodynamischer Radius bedeutend kleiner oder größer als der Radius der Poren sind, können nicht voneinander getrennt werden. In dieser Arbeit wurde Superdex 75 Säulenmaterial in einer 10/30 Säule an einem Äkta Purifier System verwendet. Die Flussgeschwindigkeit betrug jeweils 0,5 mL/min, wenn nicht anders beschrieben wurde Proteinstandardpuffer als Laufmittel eingesetzt.

### **7.4.2 Ionenaustauschchromatographie**

Die Ionenaustauschchromatographie ist ein Verfahren zur Trennung von Stoffen anhand ihrer Ladungen. Die stationäre Phase besteht aus einer meistens polymeren Basis, die mit Ladungsträgern als funktionellen Gruppen modifiziert ist. Reversibel gebundene Gegenionen können durch geladene Analyten in der mobilen Phase verdrängt werden. Abhängig von ihrer Ladung erfahren die Analyten so unterschiedliche Retentionen aufgrund ionischer Wechselwirkungen. Um die Analyten wieder von der festen Phase zu lösen, werden dem Laufmittel Gegenionen zugesetzt, die um die ionischen Wechselwirkungen an der festen Phase konkurrieren.

Zur Aufreinigung der synthetisierten Nukleotide wurde Q-Sepharose FF Material verwendet. Es handelt sich um einen Anionentauscher mit einem quartären Ammoniumion als funktioneller Gruppe. Es wurden 200 mL Säulenmaterial bei einer Betthöhe von 20 cm an einem Äkta Purifier System eingesetzt. Der Fluss betrug 1 mL/min, als Laufmittel A wurde 50 mM Triethylammoniumcarbonatpuffer, als Laufmittel B 1 M Triethylammoniumcarbonatpuffer eingesetzt. Der Anteil von Puffer B wurde linear von 0 % auf 100 % in 500 min erhöht.

### 7.4.3 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)

Die HPLC ist ein Verfahren zur Trennung von Substanzen anhand ihrer Polarität. In dieser Arbeit wurde Umkehrphasen HPLC eingesetzt, bei der eine polare mobile Phase über eine unpolare stationäre Phase geleitet wird. Die Elutionskraft der mobilen Phase steigt dabei mit sinkender Polarität. Als stationäre Phase wurde mit Octadecan modifiziertes Silikagel eingesetzt (C18).

Die Reaktionskontrollen wurden an analytischen C18-Säulen bei einer Flussgeschwindigkeit von 1 mL/min an Beckmann Gold Systemen durchgeführt. Als Laufmittel A wurde Wasser mit 0.1 % TFA, als Laufmittel B MeCN mit 0,08 % TFA eingesetzt. Der Anteil an Puffer B wurde linear von 5 % auf 65 % in 30 min erhöht.

Für die Reaktionskontrollen der Phosphorylierungen sowie zu Nukleotidnachweisen wurden isokratische Läufe mit TBA-Br Puffer durchgeführt. Guanosinnukleotide sind zu polar, um auf C18 Säulen eine Retention zu erfahren, sie bleiben vollständig in der mobilen Phase gelöst. Aus diesem Grund wurde Tetra-*N*-butylammonium als Gegenion eingesetzt. Die Tetra-*N*-butylammoniumionen werden über ihre aliphatischen Gruppen auf dem C18-Material reversibel immobilisiert und bewirken durch ionische Wechselwirkungen mit den Phosphatanionen eine Auftrennung der Nukleotide nach Anzahl ihrer negativen Ladungen.

Im Vorfeld der Nukleotidnachweise wurden Proteinproben mittels einer NAP5 Säule nach Beschreibung des Herstellers in Nukleotidfreien Proteinstandardpuffer überführt. Die Proteine wurden im Anschluss mittels Hitzeschock denaturiert und durch Zentrifugation abgetrennt. Die Nukleotidnachweise und Reaktionskontrollen der Phosphorylierungen wurden an analytischen C18-Säulen bei einem Fluss von 0,8 mL/min an Beckmann Gold Systemen durchgeführt.

### 7.4.4 Silikagelchromatographie

Bei der Silikagelchromatographie werden Substanzen anhand ihrer Polarität voneinander getrennt. Als stationäre Phase wird Kieselgel verwendet, bestehend aus Partikeln amorphen Siliciumdioxids mit großer innerer Oberfläche. Die Hydroxylgruppen an ihrer Oberfläche verleihen den Silikaten einen polaren Charakter. Als mobile Phase werden unpolare Laufmittel eingesetzt, deren Elutionskraft mit steigender Polarität zunimmt.

Die Aufreinigungen der einzelnen Synthesestufen wurden mittels Silikagelsäulenchromatographie durchgeführt. Säulenvolumina, Laufmittelgemische und Flussgeschwindigkeiten sind im Abschnitt „Synthesen“ vermerkt.

#### 7.4.5 Dünnschichtchromatographie (DC)

Zur Reaktionskontrolle der einzelnen Synthesestufen wurde ergänzend DC durchgeführt. Es wurden DC Platten der Firma Macherey Nagel eingesetzt, bei denen Kieselgel auf einer Aluminiumplatte immobilisiert und mit einem Fluoreszenzfarbstoff versetzt ist. Die Platten wurden in ein Reservoir mit dem jeweiligen Laufmittel gestellt, durch Kapillarkräfte am porösen Kieselgel entsteht ein Flüssigkeitsstrom.

Der Nachweis der einzelnen Probensubstanzen wurde über die Bildung schwach fluoreszierender Areale bei einer Anregungswellenlänge von 254 nm geführt: Die Purinbasen der Nucleoside absorbieren bei 254 nm und verringern so die zur Verfügung stehende Anregungsenergie für den Fluoreszenzfarbstoff auf den DC-Platten.

#### 7.4.6 SDS PAGE

Die analytische Trennung von Proteinen erfolgte nach dem Polyacrylamidgelelektrophoretischen (PAGE) Verfahren nach Schägger und Jagow (Schägger *et al.*, 1987). Vor dem Auftrag in die Probenaschen wurden die Proteine mit 25 % des Probenvolumens SDS-4X Probenpuffer für 3 min bei 90 °C inkubiert. Hierbei lagern sich Dodecylsulfationen (SDS) an die Proteine an und tragen zur Denaturierung bei. Die Anzahl der gebundenen SDS-Ionen steht bei vollständiger Denaturierung in linearem Zusammenhang zur Größe des Proteins. Durch das konstante Verhältnis von Ladung zu Größe können die Proteine im elektrischen Feld nach ihrer Gelpermeabilität getrennt werden. Als Gele wurden 16,5 %ige Acrylamidgele mit einem überschichteten 5 %igen Sammelgel verwendet. Es wurde eine konstante Spannung von 120 V an das Gel angelegt, bis das Bromphenolblau des Probenpuffers vollständig aus dem Gel gelaufen war.

Die Gele wurden im Anschluss mit einer Coomassie Färbelösung für 1-2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Coomassie Brilliantblau lagert sich unspezifisch an basische und aromatische Aminosäurereste an. Daher bleiben nach der Behandlung mit der Entfärbelösung (10 % (v/v) Essigsäure) die Regionen des Gels in denen sich Proteine befinden als blaue Banden sichtbar. Zur Größenbestimmung der Proteine wurde auf jedem Gel folgende Proteinstandardlösung aufgetragen: LMW Calibration Kit von GE Healthcare.

Salzhaltige Proben wurden vor der SDS PAGE durch Trichloressigsäurefällungen entsalzen. Die Proben wurden mit 25 % des Probenvolumens einer 50 % (v/v) TCA-Lösung versetzt und zentrifugiert. Der Überstand wurde mit Hilfe einer Pipette entfernt und das Pellet vorsichtig mit Ethanol bei -20 °C gewaschen. Nach kurzer Zentrifugation wurde das Ethanol mit einer Pipette entfernt und das Pellet unter einem Luftstrom getrocknet.

## **7.5 Spektroskopische Methoden**

### **7.5.1 Elektrospray-Ionisation Massenspektroskopie (ESI-MS)**

Die ESI-MS ist ein schonendes Verfahren zur Ionisierung von Probenmolekülen und anschließender Detektion der Masse-Ladungsverhältnisse. Sämtlichen ESI-MS Messungen wurden am LCQ Advantage Max ESI-MS von Thermo Fisher Scientific Inc. durchgeführt. Proteinproben wurden an einer dem ESI-MS vorgelagerten analytischen C4-Säule mittels Umkehrphasen HPLC entsalzen, Nukleoside und Nukleotide wurden direkt aufgetragen. Nach Auftrag werden die Analyten durch eine Metallkapillare geleitet. An der Metallkapillare ist eine Spannung angelegt, durch eine Gegenelektrode entsteht ein elektrostatisches Feld. In diesem Feld bewegen sich geladene Teilchen elektrophoretisch zu ihrem Gegenpol. Hierdurch kommt es zu einer Konzentration gleichgeladener Teilchen in der Spitze der Kapillare, die sich gegenseitig abstoßen. Im Zusammenspiel von innerem hydrostatischem Druck, äußerem Gasdruck, elektrostatischen Kräften und der Oberflächenspannung bildet sich ein Taylorkegel. Sobald die elektrostatischen Kräfte die Oberflächenspannung übertreffen, tritt an der Spitze des Kegels ein Spray gleichgeladener Teilchen aus, welche sich im elektrischen Feld Richtung Gegenelektrode bewegen. Die Teilchen werden in einer Quadrupol Ionenfalle nach Masse-Ladungsverhältnis getrennt. Die Auswertung der Daten erfolgte mit den Programmen Qual Browser 2.0.7 SP1 von Thermo Fisher Scientific Inc. und Mag Tran 1.02 von Z. Zhang und A. G. Marshall.

### **7.5.2 Messungen der Rab1b Tryptophanfluoreszenz**

Mit Fluoreszenz wird der spontane Übergang eines angeregten elektrischen Systems in einen Zustand niedriger Energie unter Emission von Licht bezeichnet. Wurde die Anregung durch die Absorption von Licht erzielt, spricht man von Photolumineszenz. Nicht jede Anregung resultiert dabei in Fluoreszenz: das Verhältnis von absorbierten und emittierten Photonen wird als Quantenausbeute bezeichnet. Gemäß dem Energieerhaltungssatz und der Stokesschen Regel ist die Fluoreszenz stets von gleicher oder bedingt durch strahlungslose Relaxation größerer Wellenlänge als das anregende Licht. Die Anregung eines Fluorophors erzeugt in diesem eine Änderung seines Dipolmoments. Die Umgebung eines Fluorophors kann dabei einen direkten Einfluss auf die Quantenausbeute und die Wellenlänge des emittierten Lichts haben. Zum einen über spezifische chemische Wechselwirkungen wie Komplexbildungen, zum anderen über die durch den Fluorophor induzierten Dipolmomente in den Lösungsmittelmolekülen.

Für Rab1b konnte beobachtet werden, dass ein Übergang vom GDP zum GTP gebundenen Zustand durch Veränderung der Tryptophanumgebung in einer Abnahme der Tryptophanfluoreszenz bei 340 nm nach Anregung bei 297 nm von 30 % resultiert (Goody *et al.*, 2012). Dieses Phänomen ist die Grundlage der Fluoreszenzspektroskopischen Messungen der GTP Hydrolyseraten und der Nukleotidaustauschraten an Rab1b.

In dieser Arbeit wurden die Messungen der Tryptophanfluoreszenz an dem Gerät FluoroMax-3 von Horiba Jobin Yvon Inc. durchgeführt. Die Temperatur wurde während der Messungen konstant bei 25 °C gehalten. Die Anregung fand bei 297 nm statt, gemessen wurde die Signalintensität bei 348 nm. Es wurde jede Sekunde ein Signal mit einer Integrationszeit von einer Sekunde aufgenommen. Als Probenbehälter wurde eine 10 mm Quartzküvette der Firma Hellma GmbH & Co. KG verwendet.

### **7.5.3 Messung der NBD-Fluoreszenz**

Um die schnelle Kinetik der Assoziation von Rab1b und GDI erfassen zu können, wurde die NBD-Fluoreszenz an einem *Stopped Flow* Gerät der Firma Applied Photophysics Ltd gemessen. Das *Stopped Flow* Verfahren erlaubt die schnelle Vermengung zweier Volumina. Dies ermöglicht es, Reaktionen im Bereich von Millisekunden zu erfassen.

Pro Messung wurden jeweils 50 µL beider Reaktanden in die Probenkammer injiziert. Die Temperatur wurde mittels eines Thermostats konstant bei 25 °C gehalten. Die Anregung des NBD erfolgte bei 437 nm, detektiert wurde die Fluoreszenz oberhalb von 500 nm durch einen *Cut-off* Filter.

Grundlage der Messungen ist die mit der Bindung von Rab1b an GDI einhergehende Verringerung der Polarität der NBD Umgebung, die durch Zunahme der Fluoreszenzintensität oberhalb von 500 nm beobachtet werden kann.

### **7.5.4 Kernresonanzspektroskopie (NMR Spektroskopie)**

Die NMR-Spektroskopie ist eine Methode zur Strukturaufklärung von Molekülen. Sie ermöglicht die Charakterisierung der elektrischen Umgebung von Atomen mit einem magnetischen Moment. Grundlage ist der Zeeman Effekt: wird an Kerne mit eigenem magnetischem Moment ein äußeres magnetisches Feld angelegt, werden ihre energetisch entarteten Zustände aufgrund der Wechselwirkungen von magnetischem Moment und Feld in verschiedene energetische Zustände aufgespalten. Die Energiedifferenz der Zustände ist abhängig von der Stärke des auf den Kern wirkenden magnetischen Feldes. Dabei hat die Elektronenhülle eines Atoms einen abschirmenden Effekt auf den Kern. Werden die Atome im magnetischen Feld mit elektromagnetischen Wellen bestrahlt, deren Energie der Energiedifferenz der ver-

schiedenen Zustände entspricht, können sie absorbiert werden und Übergänge in energetisch höhere Zustände anregen. Die Energie wird bei der Relaxation der angeregten Kerne als Strahlung wieder freigesetzt.

Sämtliche Messungen wurden an einem Varian Mercury 400 NMR-Spektrometer durchgeführt. Gemessen wurde der freie Induktionsabfall (*free induction decay*, FID) nach einer Anregung mit einem Hochfrequenzimpuls (400 MHz). Durch Fourier Transformation mittels des Programms MesTreC 4.9.9.9 von Mestrelab Research wurde die erhaltene Funktion der Zeit in eine Funktion der Frequenz transformiert und ausgewertet. Für  $^1\text{H}$  Spektren wurden standardmäßig 16, für  $^{13}\text{C}$  Spektren 512 Pulsreihen gemessen.  $^{13}\text{C}$  Spektren wurden standardmäßig Protonenentkoppelt aufgenommen.

## **7.6 Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen**

### **7.6.1 Konzentrationsbestimmung nach Bradford**

Zur Konzentrationsbestimmung unbekannter Proteinlösungen wurde die Methode nach Bradford verwendet (Bradford 1976). Als Nachweisreagenz wird der Farbstoff Coomassie Brilliantblau eingesetzt. Dieser kann mit basischen und aromatischen Aminosäureseitenketten interagieren, was in einer Zunahme der Absorption des Farbstoffs bei 595 nm resultiert. Wahrscheinliche Ursachen dafür ist die Stabilisierung des Farbstoffs in seiner anionischen Sulfonatform. Das Maß dieser Farbreaktion ist abhängig vom jeweiligen Protein, der Temperatur und Inkubationszeit. Hier wurden die Proben 10 min bei RT mit 900  $\mu\text{L}$  Coomassie Protein Assay Reagent Kit. von Thermo Scientific inkubiert und mit Eichwerten bekannter BSA-Lösungen verglichen. Das Verfahren ist anfällig für Störungen insbesondere durch Detergenzien sowie basische und aromatische Substanzen. Aus diesem Grund wurde wenn möglich zur Kontrolle auch eine Konzentrationsbestimmung mittels Absorptionsmessung durchgeführt.

### **7.6.2 Konzentrationsbestimmung durch Absorptionsmessung**

Gemessen wurde die Absorption bei 280 nm an einem NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer. Bei 280 nm tragen die Reste der aromatischen Aminosäuren Trp, Tyr und in geringem Maße Phe zur Absorption bei. Mithilfe des Programms ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam>) wurde der Extinktionskoeffizient eines Proteins bei 280 nm anhand der Extinktionskoeffizienten der einzelnen Aminosäuren berechnet. Die einzelnen Messungen wurden auf den jeweiligen Proteinpuffer als Nullwert geeicht, und die Protein-

konzentration aus der Absorption und dem Exkttinktionskoeffizienten nach dem Lambert Beerschen Gesetz berechnet.

$$A_{280} = \epsilon_{280} \cdot c \cdot d$$

**Formel 7.6.2.1:** Lambert Beersches Gesetz  
 $A_{280}$ : Absorption bei 280 nm  
 $\epsilon_{280}$ : Exkktionkoeffizient des Proteins bei 280 nm [m<sup>2</sup>/mol]  
c: Konzentration [mol/L]  
d: Schichtdicke [m]

Waren in der Proteinlösung Nukleotide in bekannter Konzentration gegenwärtig, wurde der Anteil der Nukleotide an der Absorption bei 280 nm gesondert berechnet und das Ergebnis der Messungen um diesen Wert bereinigt.

## 7.7 Genexpression und Proteinaufreinigung

Alle verwendeten Rab1b, Rab7 CDC42 und Ypt7 Proteine wurden von N. Bleimling und Janine Beine für dieses Projekt dargestellt. Die zielgerichteten Mutationen der Gensequenzen wurden mittels Quick Change Protokoll an der Plasmid DNA durchgeführt. Die Plasmide wurden mittels Elektroporation in elektrokompetente *E. coli* BL21 DE3 (Rab1b, Rab7, Ypt7) bzw. *E. coli* BL21 DE3 RIL Zellen (Rab5, CDC42) transformiert. Die Genexpression wurde durch Induktion mit Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG) induziert. Nach Aufschluss der Zellen an einem Mikrofluidizer wurden die Zellen mittels einer Kombination von Nickel-Affinitätschromatographie und Größenausschlusschromatographie gereinigt.

Detaillierte Protokolle der Expressions- und Reinigungsschritte wie sie hier durchgeführt wurden finden sich in folgenden Publikationen: Schoebel *et al.*, 2009, Müller *et al.*, 2010, Österlin *et al.*, 2012.

Plasmid	Kodiertes Protein
2662-pMAL Rab1b L125C	Rab1b L125C
2663-pMAL Rab1b K153C	Rab1b K153C
3431-pMAL Rab1b L125C Q67L	Rab1b Q67L L125C
3480-pOPiN EGFP Rab1b L125C	eGFP-Rab1b L125C
3552-pOPiN EGFP Rab1b L125C Q67L new	eGFP-Rab1b Q67L L125C
3468-pMAL Rab1b CVIL L125C	Rab1b L125C CVIL
3432-pMAL Rab7 L129C Q67L	Rab7 Q67L L129C
2658-pMAL Rab7 L129C	Rab7 L129C
3474-pMAL Ypt7 1-182 A130C	Ypt7 <sub>1-182</sub> A130C
3467-pOPiNM Cdc42 1-188 L119C	CDC42 <sub>1-188</sub> L119C

**Tab.7.7.1:** Verwendete Plasmide

Von folgenden Proteinen wurden Proben freundlich bereit gestellt von:

DrrA <sub>GEF</sub> (340-533), GDI-1	L. K. Österlin
GGTase I (α und β Untereinheit)	
DrrA, Mical3 (1841-1990)	M. Müller
TBC1D20 (14-305)	E. M. Gazdag
OCRL1 (539-901)	X. Hou
LidA, , REP, Rab1b wt	N. Bleimling
GGTase II (α und β Untereinheit)	

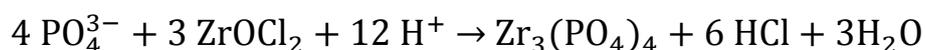
## 7.8 Nukleotidaustausch

Aufgrund der intrinsischen Hydrolysefähigkeit kleiner G-Proteine liegen sie im Anschluss an ihre Aufreinigung voraussichtlich teilweise oder vollständig im GDP gebundenen Zustand vor. Im Einzelfall wurde die Beladung eines kleinen G-Proteins durch einen Nachweis der gebundenen Nukleotide mittels HPLC überprüft (Kap. XXX). Das zentrale Magnesiumion in der Nukleotidbindetasche kleiner G-Proteine wird sowohl durch Phosphatgruppen des Nukleotides als auch durch Aminosäuren der G-Domäne koordiniert und trägt maßgeblich zur Stabilität des Protein-Nukleotidkomplexes bei (Kap. XXX). Durch die Chelatierung des Magnesiums mit EDTA soll die Affinität des jeweiligen kleinen G-Proteins zu Nukleotiden gesenkt und so die Nukleotidfreisetzung beschleunigt werden.

Die Probe wurde mit EDTA-Puffer verdünnt, bis ein fünffacher Überschuss von EDTA über Magnesium gegeben war. Es wurde ein 20-facher Überschuss an Nukleotid gegenüber dem Protein zugegeben und die Lösung 2 h bei RT gerührt. Das Protein wurde im Anschluss mittels einer NAP5 Säule nach Angaben des Herstellers in Nukleotidfreien Proteinstandardpuffer überführt. Die Beladung des kleinen G-Proteins mit dem gewünschten Nukleotid wurde mittels HPLC überprüft (Kap. XXX).

## 7.9 Phosphatnachweis durch Zyrkonylchlorid

Phosphate und Nukleotide lassen sich als wasserunlösliche Zirkoniumphosphatverbindungen nachweisen.



**Abb.7.9.1:** Reaktionsgleichung der Phosphatfällung durch Zyrkonylchlorid

Mittels pH-Papier wurde überprüft, ob der pH Wert der Probe <7 war. Bei einem pH Wert >7 wurde die Probe mit HCl angesäuert. Es wurde je 1 µL einer gesättigten ZrOCl<sub>2</sub> Lösung in

H<sub>2</sub>O zu der Probe gegeben. Ein weißer, voluminöser Niederschlag zeigte die Gegenwart von Phosphaten oder Nukleotiden an.

## **8 Literaturverzeichnis**

**Abdul, N., Aghazadeh, B., Liu, G. A., Majumdar, A., Querfelli, O., Siminovitch, K. A., Rosen, M. K. (1999)**

Structure of Cdc42 in complex with the GTPase-binding domain of the "Wiscott Aldrich syndrome" protein

*Nature*, 399, 379 – 383

**Admiraal, S. J., Herschlag, D. (1995)**

Mapping the transition state for ATP hydrolysis: implications for enzymatic catalysis.

*Chemistry & Biology*, 2, 729 – 739

**Alexandrov, K., Horiuchi, H., Steele, O., Seabral, M. C., Zerial, M. (1994)**

Rab escort protein-1 is a multifunctional protein that accompanies newly prenylated rab proteins to their target membranes.

*The EMBO Journal*, 13, 5262 – 5273

**Alexandrov, K., Simon, I., Yurchenkov, V., Iakovenko, A., Rostkova, E., Scheidig, A. J., et al., (1999)**

Characterization of the ternary complex between Rab7, REP-1, and Rab geranylgeranyl transferase.

*Eur. J. Biochem.*, 265, 160 – 170

**Ali B. R., Wasmeier, C., Lamoreux, L., Strom, M., Seabra, M. C. (2004)**

Multiple regions contribute to membrane targeting of Rab GTPases.

*Journal of Cell Science*, 117, 6401 – 6412

**Allan, B. B., Moyer, B. D., Balch, W. E. (2000)**

Rab1 Recruitment of p115 into a cis-SNARE Complex: Programming Budding COPII Vesicles for Fusion.

*Science*, 289, 444 – 448

**Alory, C., Balch, W. E., (2001)**

Organization of the Rab-GDI/CHM Superfamily: The Functional Basis for Choroideremia Disease.

*Traffic*, 2, 532 – 543

**Barbacid, M. (1987)**

ras GENES

*Ann. Rev. Biochem.*, 56, 779 – 827

**Barisic, N., Claeys, K., Siritkovic, M., Löfgren, A., Nelis, E., De Jonghe, P., Timmerman, V. (2008)**

Charcot-Marie-Tooth disease: a clinic-genetic confrontation.

*Ann. Hum. Genet.*, 72, 416 – 441

**Barrowman, J., Bhandari, D., Reinisch, K., Ferro, S. (2010)**

TRAPP complexes in membrane traffic: convergence through a common Rab.  
*Molecular Cell Biology*, 11, 759 – 763

**Bergbrede, T., Pylypenko, O., Rak, A., Alexandrov, K. (2005)**

Structure of the extremely slow GTPase Rab6A in the GTP bound form at 1.8Å resolution.  
*Journal of Structural Biology*, 152, 235 – 238

**Bernards, A. (2003)**

GAPs galore! A survey of putative Ras superfamily GTPase activating proteins in man and Drosophila.

*Biochimica et Biophysica Acta*, 1603, 47 – 82

**Bernards, A., Settleman, J. (2004)**

GAP control: regulating the regulators of small GTPases.

*Trends Cell Biol.*, 14, 377 – 385

**Bonifacino, J. S., Glick, B.S. (2004)**

The mechanisms of vesicle budding and fusion.

*Cell*, 116, 153 – 166

**Bos, J. L. (1989)**

Ras oncogenes in human cancer: a review.

*Cancer Research*, 49, 4682 – 4689

**Bourne, H. R., Sanders, D. A., McCormick, F. (1990)**

The GTPase superfamily: a conserved switch for diverse cell functions.

*Nature*, 348, 125 – 132

**Bourne, H. R., Sanders, D. A., McCormick, F. (1991)**

The GTPase superfamily: conserved structure and molecular mechanism.

*Nature*, 349, 117 – 127

**Bradford, M.M. (1976)**

A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.

*Anal. Biochem.*, 72, 248 – 254

**Brown, M. S., Goldstein, J. L. (1993)**

Mad Bet for Rab.

*Nature*, 366, 14 – 15

**Buhrman, G., Holzapfel, G., Fetics, S., Mattos C. (2010)**

Allosteric modulation of Ras positions Q61 for a direct role in catalysis.

*PNAS*, 107, 4931 – 4936

**Burguete, A. S., Fenn, T. D., Brunger, A. T., Pfeffer, S. R. (2008)**

Rab and Arl GTPase family members cooperate in the localization of the golgin GCC185.

*Cell*, 132, 286 – 298

**Cadogan, J. I. G., Roy, D. A., Smith, D. M. (1966)**

An Alternative to the Sandmeyer Reaction.

*J. Chem. Soc., (C)*, 1249 – 1250

**Cai, H., Reinisch, K., Ferro, S. (2007)**

Coats, Tethers, Rabs, and SNAREs Work Together to Mediate the Intracellular Destination of a Transport Vesicle.

*Developmental Cell*, 12, 671 – 682

**Carlton, J., Bujny, M., Rutherford, A., Cullen, P. (2005)**

Sorting Nexins – Unifying Trends and New Perspectives.

*Traffic*, 6, 75 – 82

**Casey, P. J., Seabra, M. C., (1996)**

Protein Prenyltransferases.

*J. Biol. Chem.*, 271, 5289 – 5292

**Chavas, L. M., Ihara, K., Kawasaki, M., Torii, S., Uejima, T., Kato, R., Izumi, T., Wakatsuki, S. (2008)**

Elucidation of Rab27 recruitment by its effectors: structure of Rab27a bound to Exophilin4/Slp2-a.

*Structure*, 16, 1468 – 1477

**Chen, Y., Triola, G., Waldmann, H. (2011)**

Bioorthogonal Chemistry for Site-Specific Labeling and Surface Immobilization of Proteins.

*Accounts of Chemical Research*, 44, 762 – 773

**Chien, Y., Lai, M., Shih, T. Y., Verma, I. M., Scolnick, E. M., Roy-Burman, P., Davidson, N. (1979)**

Heteroduplex analysis of the sequence relationships between the genomes of Kirsten and Harvey sarcoma viruses, their respective parental Murine leukemia viruses, and the rat endogenous 30S RNA

*Journal Of Virology*, 31, 752 – 760

**Christoforidis, S., McBride, H. M., Burgoyne, R. D., Zerial, M. (1999)**

The Rab5 effector EEA1 is a core component of endosome docking.

*Nature*, 397, 621 – 625

**Clayden, J., Greeves, N., Warren, S., Wothers, P. (2000)**

Organic Chemistry - Lehrbuch

*Oxford University Press*, 1. Edition

**Colicelli, J. (2004)**

Human RAS superfamily proteins and related GTPases.

*Sci. STKE*, RE13

**Constantinescu, A. T., Rak, A., Alexandrov, K., Esters, H., Goody, R. S., Scheidig, A. J. (2002)**

Rab-subfamily-specific regions of Ypt7p are structurally different from other RabGTPases..  
*Structure*, 4, 569 – 579

**Cox, A. D., Der, C. J. (2002)**

Ras family signaling: therapeutic targeting.  
*Cancer Biology & Therapy*, 1, 599 – 606

**Cramer, F., Winter, M. (1960)**

Katalytische Wirkung von Dimethylformamid bei Reaktionen von Phosphorsäureesterchloriden.

*Chem. Ber.*, 94, 989 – 996

**Cramer, F., Wittmann, R. (1960-2)**

Die Reaktionen von Triestern der Pyrophosphorsäure.

*Chem. Ber.*, 94, 322 – 328

**Der, C. J., Krontiris, T. G., Cooper, G. M. (1982)**

Transforming genes of human bladder and lung carcinoma cell lines are homologous to the ras genes of Harvey and Kirsten sarcoma viruses.

*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79, 3637 – 3640

**Der, C. J., Finkel, T., Cooper, G. M. (1986)**

Biological and Biochemical Properties of Human rasH Genes Mutated at Codon 61.

*Cell*, 44, 167 – 176

**Diaz, E., Pfeffer, S. R., (1998)**

TIP47: A Cargo Selection Device for Mannose 6-Phosphate Receptor Trafficking.

*Cell*, 93, 433 – 443

**Diels, O., Alder, K. (1929)**

Synthesis in the hydroaromatic series, IV. Announcement: The rearrangement of malein acid anhydride on arylated diene, triene and fulvene.

*Chemische Berichte*, 62, 2081 – 2087

**Dumas, J. J., Zhu, Z., Connolly, J. L., Lambright, D. G. (1999)**

Structural basis of activation and GTP hydrolysis in Rab proteins.

*Structure*, 7, 413 – 423

**Dyke, K. V., Robinson, R., Urquilla, P., Smith, D., Taylor, M., Trush, M., Wilson, M. (1977)**

An analysis of nucleotides and catecholamines in bovine medullary granules by anion exchange high pressure liquid chromatography and fluorescence. Evidence that most of the catecholamines in chromaffin granules are stored without associated ATP.

*Pharmacology*, 15, 377–391

- Eathiraj, S., Pan, X., Ritacco, C., Lambright, D. G. (2005)**  
Structural basis of family-wide Rab GTPase recognition by rabenosyn-5.  
*Nature*, 436, 415 – 419
- Eathiraj, S., Mishra, A., Prekeris, R., Lambright, D. G. (2006)**  
Structural basis for Rab11 mediated recruitment of FIP3 to recycling endosomes.  
*Journal of Molecular Biology*, 364, 121 – 135
- Engel, R. (1976)**  
Phosphonates as Analogues of Natural Phosphates.  
*Chemical Reviews*, 77, 349 – 367
- Farazi, T. A., Waksman, G., Gordon, J. I., (2001)**  
The Biology and Enzymology of Protein *N*-Myristoylation.  
*Journal of biological chemistry*, 276, 39501 – 39504
- Farnsworth, C. L., Feig, L. A. (1991)**  
Dominant Inhibitory Mutations in the Mg<sup>2+</sup>-Binding Site of RasH Prevent Its Activation by GTP.  
*Molecular and Cellular Biology*, 11, 4822 – 4829
- Feig, L.A., Cooper, G. M. (1988)**  
Inhibition of NIH 3T3 Cell Proliferation by a Mutant ras Protein with Preferential Affinity for GDP.  
*Molecular and Cellular Biology*, 8, 3235 – 3243
- Feig, L. A. (1999)**  
Tools of the trade: use of dominant inhibitory mutants of Ras-family GTPases.  
*Nature Cell Biology*, 1, E25 – E27
- Feuerstein, J., Goody, R. S., Webb, M. R. (1988)**  
The Mechanism of Guanosine Nucleotide Hydrolysis by p21 c-Hs-ras.  
*The Journal of Biological Chemistry*, 264, 6188 – 6190
- Fischer, J., Weide, T., Barnekow, A. (2005)**  
The Mical proteins and Rab1: a possible link to the cytoskeleton?  
*Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 328, 415 – 423
- Frech, M., Darden, T. A., Pedersen, L. G., Foley, C. K., Charifson, P. S., Anderson, M. W., Wittinghofer A. (1994)**  
Role of Glutamine-61 in the Hydrolysis of GTP by p21H-ras: An Experimental and Theoretical Study.  
*Biochemistry*, 33, 3237 – 3244
- Frolov, A. V., Zimmerberg, J. (2008)**  
Flexible Scaffolding Made of Rigid BARs.  
*Cell*, 132, 727 – 729

**Gao, X. D., Sperber, L. M., Kane, S. A., Tong, Z., Tong, A. H., Boone, C., Bi, E. (2007)**  
Sequential and distinct roles of the cadherin domain-containing protein Axl2p in cell polarization in yeast cell cycle.  
*Cell*, 18, 2542 – 2560

**Glonek, T., Kleps, R. A., Myers, T. C. (1974)**  
Cyclization of the Phosphate Side Chain of Adenosine Triphosphate: Formation of Monoadenosine 5'-Trimetaphosphate.  
*Science*, 185, 352 – 355

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

**Goody, R. S., Frech, M., Wittinghofer, A. (1991)**  
Affinity of guanine nucleotide binding proteins for their ligands: facts and artefacts.  
*Biochem. Sci.*, 16, 327 – 328

**Goody, R. S., Rak, A., Alexandrov K., (2005)**  
The structural and mechanistic basis for recycling of Rab proteins between membrane compartments.  
*Cell. Mol. Life Sci.*, 62, 1657 – 1670

**Greene, T. W., Wuts, P. G. M. (1999)**  
Protective Groups in Organic Synthesis  
*John Wiley and Sons, Inc.*, Third Edition

**Haas, A. K., Yoshimura, S., Stephens, D. J., Preisinger, C., Fuchs, E., Barr, F. A. (2007)**  
Analysis of GTPase-activating proteins: Rab1 and Rab43 are key Rabs required to maintain a functional Golgi complex in human cells.  
*Journal of Cell Science*, 120, 2997 – 3010

**Hancock, J. F., Magee, A. I., Childs, J. E., Marshall, C. J., (1989)**  
All ras proteins are polyisoprenylated but only some are palmytoylated  
*Cell*, 57, 1167 - 1177

**Hauptmann, S. (1985)**  
Organische Chemie  
*Harri Deutsch Verlag*, 531

**Hauser, C. R., Breslow, D. S. (1940)**  
Condensations. XII. A general theory for certain carbon—carbon condensations effected by acidic and basic reagents.  
*J. Am. Chem. Soc.*, 62, 2389 – 2392

**Herrmann, C. (2003)**  
Ras-effector interactions: after one decade.  
*Current Opinion in Structural Biology*, 13, 122 – 129

**Hidestrand, P., Vasconet, H., Cottrill, C. (2009)**

Carpenter Syndrome

*J. Craniofac. Surg.*, 20, 254 – 256

**Hou, X., Hagemann, N., Schoebel, S., Blankenfeldt, W., Goody, R. S., Erdmann, K. S., Itzen, A. (2011)**

A structural basis for Lowe syndrome caused by mutations in the Rab-binding domain of OCRL1.

*The EMBO Journal*, 30, 1659 – 1670

**Hutagalung, A. H., Novick, P. J. (2011)**

Role of Rab GTPases in Membrane Traffic and Cell Physiology

*Physiol. Rev.*, 91, 119 – 149

**Huber, S. K., Scheidig, A. J. (2005)**

High resolution crystal structures of human Rab4a in its active and inactive conformations.

*FEBS Lett.*, 579, 2821 – 2829

**Hutt, M. D., Balch, W. E. (2008)**

Rab1b Silencing Using Small Interfering RNA for Analysis of Disease-Specific Function

*Methods in Enzymology*, 438, 1 – 10

**Hyvola, N., Diao, A., McKenzie, E., Skippen, A., Cockcroft, S., Lowe, M. (2006)**

Membrane targeting and activation of Lowe syndrome protein OCRL1 by Rab GTPases.

*EMBO J.*, 25, 3750 – 3761

**Itoh, T., Watabe, A., Toh-e, A., Matsui, Y. (2002)**

Complex Formation with Ypt11p, a rab-Type Small GTPase, Is Essential To Facilitate the Function of Myo2p, a Class V Myosin, in Mitochondrial Distribution in *Saccharomyces cerevisiae*

*Molecular and Cellular Biology*, 22, 7744 – 7757

**Jacob, J., Sohmen, R., Feuerstein, J., Linke, R., Wittinghofer, A., Goody, R. S. (1990)**

Kinetics of Interaction of Nucleotides with Nucleotide-Free H-ras p21.

*Biochemistry*, 29, 6058 – 6065

**John, J., Sohmen, R., Feuerstein, J., Linke, R., Wittinghofer, A., Goody, R. S. (1990)**

Kinetics of interaction of nucleotides with nucleotide-free H-ras p21.

*Biochemistry*, 29, 6058 – 6065

**John, J., Rensland, H., Schlichting, I., Vetter, I., Borasiog, G. D., Goody, R. S., Wittinghofer, A. (1993)**

Kinetic and Structural Analysis of the Mg<sup>2+</sup>-binding Site of the Guanine Nucleotide-binding Protein p21 H-ras.

*Journal of Biological Chemistry*, 268, 923 – 929

**Johnson, D. C., Widlanski, T. S. (2003)**

Overview of the Synthesis of Nucleoside Phosphates and Polyphosphates  
*Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry*, 13.1.1 - 13.1.31

**Kalinin, A., Thoma, N. H., Iakovenko, A., Heinemann, I., Rostkova, E., Constantinescu, A. T., Alexandrov, K. (2001)**

Expression of mammalian geranylgeranyltransferase type-II in *Escherichia coli* and its application for *in vitro* prenylation of Rab proteins.  
*Protein Expr. Purif.*, 22, 84 – 91

**Kim, E. E., Wyckoff, H. W. (1990)**

Reaction Mechanism of Alkaline Phosphatase Based on Crystal Structures.  
*J. Mol. Biol.*, 218, 449 – 464

**Klebe, C., Prinz, H., Wittinghofer, A., Goody, R. S. (1995, 1)**

The Kinetic Mechanism of Ran-Nucleotide Exchange Catalyzed by RCC 1.  
*Biochemistry*, 34, 12543 – 12552

**Klebe, C., Bischoff, F. R., Ponstingl, H., Wittinghofer, A. (1995, 2)**

Interaction of the Nuclear GTP-Binding Protein Ran with Its Regulatory Proteins RCC1 and RanGAP1  
*Biochemistry*, 34, 639 – 647

**Kochi, J. K. (1957)**

The Mechanism of the Sandmeyer and Meerwein Reactions.  
*J. Am. Chem. Soc.*, 79, 2942 – 2948

**Kolk, S. M., Pasterkamp, R. J. (2007)**

MICAL Flavoprotein Monooxygenases: Structure, Function and Role in Semaphorin Signaling.  
*Landes Bioscience and Springer Science+Business Media*, "Semaphorins: Receptor and Intracellular Signaling Mechanisms", edited by R. Jeroen Pasterkamp. ©2007

**Kukimoto, M., Sakamoto, A., Kanno, E., Hanawa, K., Terada, T., Shirouzu, M., Fukuda, M., Yokoyama, S. (2008)**

Structural basis for the exclusive specificity of Slac2-a/melanophilin for the Rab27 GTPases.  
*Structure*, 16, 1478 – 1490

**Lai, C. C., Boguski, M., Broek, D., Powers, S. (1993)**

Influence of guanine nucleotides on complex formation between Ras and CDC25 proteins.  
*Molecular and Cellular Biology*, 13, 1345 – 1352

**Larsen, M., Willet, R., Yount, R. G. (1969)**

Imidodiphosphate and pyrophosphate: Possible biological significance of similar structures.  
*Science*, 166, 1510 – 1511

**Lee, M., Mishra, A., Lambright, D. G. (2009)**

Structural Mechanisms for Regulation of Membrane Traffic by Rab GTPases.  
*Traffic*, 10, 1377 – 1389

**Leipe, D. D., Wolf, Y. I., Koonin, E. V., Aravind, L. (2002)**

Classification and evolution of P-Loop GTPases and related ATPases.

*J. Mol. Biol.*, 317, 41 – 72

**Lipatova, Z., Tokarev, A. A., Jin, Y. Mulholland, J., Weisman, L. S., Segev, N. (2008)**

Direct Interaction between a Myosin V Motor and the Rab GTPases Ypt31/32 Is Required for Polarized Secretion.

*Molecular Biology of the Cell*, 19, 4177 – 4187

**Lombardi, D., Soldati, T., Riederer, M. A., Goda, Y., Zerial, M., Pfeffer, S. R. (1993)**

Rab9 functions in transport between late endosomes and the trans Golgi network.

*The EMBO Journal*, 12, 677 – 682

**Lowe, C. U., Terrey, M., MacLachlan E. A. (1952)**

Organic-aciduria, decreased renal ammonia production, hydrophthalmos, and mental retardation; a clinical entity.

*American journal of diseases of children*, 83, 164 – 184

**Ludwig, J. (1981)**

A new route to nucleoside 5' triphosphates.

*Acta. Biochim. and Biophys. Acad. Sci. Hung*, 16, 131 – 133

**Luo, Y., Fischer, J. J., Graebner, O. Y., Schreyb, A. K., Ungewissa, J., Glinka, M., Sefkova, M., Dreger, M., Koester, H. (2009)**

GDP-Capture Compound - A novel tool for the profiling of GTPases in pro- and eukaryotes by capture compound mass spectrometry (CCMS)

*Journal of Proteomics*, 73, 815 - 819

**McCormick, F., Wittinghofer, A. (1996)**

Interactions between Ras proteins and their effectors.

*Current Opinion in Biotechnology*, 7, 449 – 456

**Machner, M. P., Isberg, R. R. (2007)**

A bifunctional bacterial protein links GDI displacement to Rab1 activation.

*Science*, 318, 974 – 977

**Mather, B. D., Viswanathan, K., Miller, K. M., Long, T. E. (2006)**

Michael addition reactions in macromolecular design for emerging technologies.

*Prog. Polym. Sci.*, 31, 487 – 531

**Merithew, E., Hatherly, S., Dumas, J. J., Lawe, D. C., Heller-Harrison, R., Lambright, D. G. (2001)**

Structural Plasticity of an Invariant Hydrophobic Triad in the Switch Regions of Rab GTPases Is a Determinant of Effector Recognition.

*The Journal of Biological Chemistry*, 276, 13982 – 13988

**Michael, A. (1887)**

On the addition of sodium acetacetic ether and analogous sodium compounds to unsaturated organic ethers.

*Am. Chem. J.*, 9, 115

**Michelson, A. M. (1963)**

The chemistry of nucleosides and nucleotides.

*Academic Press, London*, 194

**Michelson, A. M. (1964)**

Synthesis of nucleotide anhydrides by anion exchange.

*Biochimica et Biophysica Acta*, 91, 1 – 13

**Milburn, M. V., Tong, L., Devos, A. M., Brunger, A., Yamaizumu, Z., Nishimura, S., Kim, S. (1990)**

Molecular Switch for Signal Transduction: Structural Differences Between Active and Inactive Forms of Protooncogenic ras Proteins

*Science*; 247, 939 – 945

**Moodie, S. A., Paris, M., Villafranca, E., Kirshmeier, P., Willumsen, B. M., Wolfman, A.(1995)**

Different structural requirements within the switch II region of the Ras protein for interactions with specific downstream targets.

*Oncogene*, 11, 447 – 457

**Moore, I., Schell, J., Palme, K. (1995)**

Subclass-specific sequence motifs identified in Rab GTPases.

*Biochem. Sci.*, 20, 10 – 12

**Moyer, B. D., Allan, B. B., Balch, W. E. (2001)**

Rab1 Interaction with a GM130 Effector Complex Regulates COPII Vesicle *cis*-Golgi Tethering.

*Traffic*, 2, 268 – 276

**Murray, M. J., Cunningham, J. M., Parada, L. F., Dautry, F., Lebowitz, P., Weinberg, R. A. (1983)**

The HL-60 transforming sequence: a ras oncogene coexisting with altered myc genes in hematopoietic tumors.

*Cell*, 33, 749 – 757

**Müller, M., Peters, H., Blümer, J., Blankenfeld, W., Goody, R. S., Itzen, A. (2010)**

The Legionella effector protein DrrA AMPylates the membrane traffic regulator Rab1b.

*Science*, 329, 946 – 949

**Müller, M. P., Shkumatov, A. V., Oesterlin, L. K., Schoebel, S., Goody, P. R., Goody, R. S., Itzen, A. (2012)**

Characterization of Enzymes from *Legionella pneumophila* Involved in Reversible Adenylation of Rab1 Protein.

*The Journal of Biological Chemistry*, 287, 35036 – 35046

**Nassar, N., Horn, G., Herrmann, C., Scherer, A., McCormick, F., Wittinghofer, A. (1995)**  
The 2.2 Å crystal structure of the Ras-binding-domain of the serin/threonine kinase c-Raf1 in complex with Rap1A and a GTP analogue.  
*Nature*, 375, 554 – 560

**Neuwald, A. F. (1997)**  
A shared domain between a spindle assembly checkpoint protein and Ypt/Rab-specific GTPase-activators.  
*Trends Biochem. Sci.*, 22, 243 – 244

**Olivos-Glander, I. M., Janne, P. A., Nussbaum, R. L. (1995)**  
The Oculocerebrorenal Syndrome Gene Product Is a 105-kD Protein Localized to the Golgi Complex  
*Am. J. Hum. Genet.*, 57, 817 – 823

**Oesterlin, L. K., Goody, R. S., Itzen, A. (2012)**  
Posttranslational modifications of Rab proteins cause effective displacement of GDP dissociation inhibitor.  
*PNAS*, 109, 5621 – 5626

**Ostermeier, M., Brunger, A. T. (1999)**  
Structural Basis of Rab Effector Specificity: Crystal Structure of the Small G Protein Rab3A Complexed with the Effector Domain of Rabphilin-3A.  
*Cell*, 96, 363 – 374

**Pai, E. F., Kregel, U., Petsko, G. A., Goody, R. S., Kabsch, W., Wittinghofer, A. (1990)**  
Refined crystal structure of the triphosphate conformation of H-ras p21 at 1.35 Å resolution: implications for the mechanism of GTP hydrolysis.  
*The EMBO Journal*, 9, 2351 – 2359

**Pan, X., Eathiraj, S., Munson, M., Lambright, D. G. (2006)**  
TBC-domain GAPs for Rab GTPases accelerate GTP hydrolysis by a dual-finger mechanism.  
*Nature*, 442, 303 – 306

**Pereira, J. B., Seabra, M. C. (2000)**  
The Mammalian Rab Family of Small GTPases: Definition of Family and Subfamily Sequence Motifs Suggest a Mechanism for Functional Specificity in the Ras Superfamily.  
*J. Mol. Biol.*, 301, 1077 – 1087

**Pfeffer, S., Dirac, A. B., Soldati, T., (1995)**  
Rab GDP dissociation inhibitor: putting Rab GTPases in the right place.  
*J. Biol. Chem.*, 270, 17057 – 17059

**Pfeffer, S., Aivazian, D., (2004)**  
Targeting Rab GTPases to distinct membrane compartments.  
*Nature*, 428, 886 – 896

**Powers, S., O'Neill, K., Wigler, M. (1989)**

Dominant yeast and mammalian RAS mutants that interfere with the CDC25-dependent activation of wild-type RAS in *Saccharomyces cerevisiae*.

*Mol. Cell. Biol.*, 9, 390 – 395

**Plutner, H., Cox, A., Pind, S., Khosravi, R., Bourne, J., Schwaninger, R., Der, C., Balch, W. (1991)**

Rab1b regulates vesicular transport between the endoplasmatic reticulum and successive Golgi compartments.

*J. Cell. Biol.*, 115, 31 – 43

**Rak, A. Fedorov, R., Alexandrov, K., Albert, S., Goody, R. S., Gallwitz, D., Scheidig, A. (2000)**

Crystal structure of the GAP domain of Gyp1p: first insights into interaction with Ypt/Rab proteins.

*Embo Journal*, 19, 5105 – 5113

**Ratnayake, M., Reynard, L. N., Raine, E. V., Santibanez, M., Loughlin, J. (2012)**

Allelic expression analysis of the osteoarthritis susceptibility locus that maps to MICAL3.

*BMC Medical Genetics*, 13:12, 1 – 11

**Rittinger, K., Walker, P. A., Ecclestone, J. F., Smerdon, S. J., Gamblin, S. J. (1997-1)**

Structure at 1.65 Å of RhoA and its GTPase-activating protein in complex with a transition-state analogue.

*Nature*, 389, 758 – 762

**Rittinger, K., Walker, P. A., Eccleston, J. F., Nurmahomed, K., Owen, D., Laue, E., Gamblin, S. J., Smerdon, S. J. (1997-2)**

Crystal structure of a small G protein in complex with the GTPase-activating protein RhoGAP.

*Nature*, 388, 693 – 697

**Rensland, H., John, J., Linke, R., Simon, I., Schlichting, I., Wittinghofer, A., Goody, R. S. (1995)**

Substrate and Product Structural Requirements for Binding of Nucleotides to H-ras p21 : The Mechanism of Discrimination between Guanosine and Adenosine Nucleotides.

*Biochemistry*, 1995, 34, 593 – 599

**Rostovtsev, V. V., Green, L. G., Fokin, V. V., Sharpless, K. B. (2002)**

A Stepwise Huisgen Cycloaddition Process: Copper(I)-Catalyzed Regioselective Ligation of Azides and Terminal Alkynes.

*Angewandte Chemie, International Edition*, 41, 2596 – 2599

**Rudoni, S., Colombo, S., Coccetti, P., Martegani, E. (2000)**

Role of guanine nucleotides in the regulation of the Ras/cAMP pathway in *Saccharomyces cerevisiae*.

*Biochimica et Biophysica Acta*, 1538, 181 – 189

**Sandmeyer, T. (1884)**

Über die Ersetzung der Amidgruppe durch Chlor, Brom und Cyan in den aromatischen Substanzen.

*Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft*, 17, 2650 – 2653

**Saraste, M., Sibbald, P. R., Wittinghofer, A. (1990)**

The P – loop - a common motif in ATP- and GTP- binding proteins.

*Trends Biochem. Sci.*, 15, 430 – 434

**Schägger, H., Jagow, G. (1987)**

Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa.

*Anal. Biochem.*, 166, 368 – 379

**Scheffzek, K., Ahmadian, M. R., Kabsch, W., Wiesmüller, L., Lautwein, A., Schmitz, F., Wittinghofer, A. (1997)**

The Ras-RasGAP Complex: Structural Basis for GTPase Activation and Its Loss in Oncogenic Ras Mutants.

*Science*, 277, 333 – 338

**Scheffzek, K., Grunewald, P., Wohlgemut, S., Kabsch, W., Tu, H., Wigler, M., Wittinghofer, A., Herrmann, C. (2001)**

The Ras-Byr2RBD complex: structural basis for Ras effector recognition in yeast.

*Structure*, 9, 1043 – 1050

**Scheidig, A. J., Llorente, A., Lautwein, A., (1994)**

Crystallographic Studies on p21 H - ras Using the Synchrotron Laue Method: Improvement of Crystal Quality and Monitoring of the GTPase Reaction at Different Time Points.

*Acta Crystallogr.*, 50, 512 – 520

**Scheidig, A. J., Burmester, C., Goody, R. S. (1999)**

The pre – hydrolysis state of p21<sup>ras</sup> in complex with GTP: new insights into the role of water molecules in the GTP hydrolysis reaction of ras – like proteins.

*Structure*, 7, 1311 – 1324

**Schimmöller, F., Simon, I. Pfeffer, S. R. (1998)**

Rab GTPases, Directors of Vesicle Docking.

*The Journal of Biological Chemistry*, 273, 22161 – 22164

**Schoebel, S., Oesterlin, L. K., Blankenfeld, W., Goody, R. S., Itzen, A. (2009)**

RabGDI Displacement by DrrA from Legionella Is a Consequence of Its Guanine Nucleotide Exchange Activity.

*Molecular Cell*, 36, 1060 – 1072

**Schoebel, S., Cichy, A. L., Goody, R. S., Itzen, A. (2011)**

Protein LidA from Legionella is a Rab GTPase supereffector.

*PNAS*, 108, 17945 – 17950

**Schmidt, Anja and Hall, Alan (2002)**

Guanine nucleotide exchange factors for Rho GTPases: turning on the switch.  
*Genes Dev.*, 16, 1587 - 1609

**Schweins, T., Geyer, M., Scheffzek, K., Warshel, A., Kalbitzer, H. R., Wittinghofer, A. (1995)**

Substrate-assisted catalysis as a mechanism of GTP hydrolysis of p21ras and other GTP-binding proteins.  
*Structural Biology*, 2, 36 – 44

**Seabra, M. C. (1996)**

Nucleotide Dependence of Rab Geranylgeranylation.  
*J. Biol. Chem.*, 271, 14398 – 14404

**Shapiro, A. D., Pfeffer, S. R., (1995)**

Quantitative analysis of the interactions between prenyl Rab9, GDP dissociation inhibitor – alpha, and guanine nucleotides.  
*J. Biol. Chem.*, 270, 11085 – 11090

**Shi, S., Noda, M., Kitayama, H. (2004)**

Rap1 mutants with increased affinity for the guanine-nucleotide exchange factor C3G.  
*Oncogene*, 23, 8711 – 8719

**Simon, I., Zerial, M., Goody, R. S. (1996)**

Kinetics of Interaction of Rab5 and Rab7 with Nucleotides and Magnesium Ions.  
*The Journal of Biological Chemistry*, 271, 20470 – 20478

**Sivars, U., Aivazian, D. und Pfeffer, S.R. (2003)**

Yip3 catalyses the dissociation of endosomal Rab-GDI complexes.  
*Nature* 425, 856 – 859

**Sklan, E. H., Serrano, R. L., Einav, S., Pfeffer, S. R., Lambright, D. G., Glenn, J. S. (2007)**

TBC1D20 Is a Rab1 GTPase-activating Protein That Mediates Hepatitis C Virus Replication  
*The Journal of Biological Chemistry*, 282, 36354 – 36361

**Snyder, F. F., Carter, R. J. (1979)**

Specificity for guanine nucleotide activation and stabilization of rabbit cardiac adenylate cyclase.  
*The Biochemical journal*, 183, 589 – 594

**Stenmark, H., Parton, R. G., Steele-Mortimer, O., Lutcke, A., Gruenberg, J., Zerial, M. (1994)**

Inhibition of rab5 GTPase activity stimulates membrane fusion in endocytosis.  
*The EMBO Journal*, 13, 1287 - 1296

**Stroupe, C., Brunger, A. T. (2000)**

Crystal structures of a Rab protein in its inactive and active conformations.  
*J. Mol. Biol.*, 304, 585 – 598

- Sydor, J. R., Engelhard, M., Wittinghofer, A., Goody, R. S., Herrmann, C. (1998)**  
Transient Kinetic Studies on the Interaction of Ras and the Ras-Binding Domain of c-Raf-1 Reveal Rapid Equilibration of the Complex.  
*Biochemistry*, 37, 14292 – 14299
- Takai, Y., Sasaki, T. and Takashi M. (2001)**  
Small GTP – Binding Proteins.  
*Physiological Rev.* 81, 153 – 208
- Valencia, A., Chardin, P., Wittinghofer, A., Sander, C. (1991)**  
The ras protein family: evolutionary tree and role of conserved amino acids.  
*Biochemistry*, 30, 4637 – 4648
- Vetter, I. R., Arndt, A., Kutay, U., Görlich, D., Wittinghofer, A. (1999)**  
Structural View of the Ran–Importin  $\beta$  Interaction at 2.3 Å Resolution.  
*Cell*, 97, 635 – 646
- Vetter, I. R and Wittinghofer, A. (2001)**  
The guanine nucleotide-binding switch in three dimensions.  
*Science*, 294, 1299 – 1304
- Walker, J. E., Saraste, M., Runswick, M. J., Gay, N. J. (1982)**  
Distantly related sequences in the  $\alpha$ - and  $\beta$ -subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold.  
*The EMBO Journal*, 1, 945 – 951
- Weide, T., Teuber, J., Bayer, M., Barnekow, A. (2003)**  
MICAL-1 isoforms, novel rab1 interacting proteins.  
*Biochemical and Biophysical Research Communications*, 306, 79 – 86
- Wennerberg, K., Rossman, K. L., Channing, J. D. (2005)**  
The Ras superfamily at a glance  
*Journal of Cell Science*, 118, 843 – 846
- Wichmann, H., Hengst, L., Gallwitz, D. (1992)**  
Endocytosis in yeast: evidence for the involvement of a small GTP-binding protein (Ypt7p).  
*Cell*, 71, 1131 – 1142
- Wittinghofer, A. (2005)**  
Phosphoryl transfer in Ras proteins: conclusive or elusive?  
*Trends in Biochemical Sciences*, 31, 20 – 23
- Wittinghofer, A., Vetter, I. R. (2011)**  
Structure – Function Relationship of the G Domain, a Canonical Switch Motif.  
*Annu. Rev. Biochem.*, 80, 943 – 971
- Wu, M., Wang, T., Loh, E., Hong, W., Song, H. (2005)**  
Structural basis for recruitment of RILP by small GTPase Rab7.  
*Embo Journal*, 24, 1491 – 1501

**Wu, Y. W., Goody, R. S., Abagyan, R., Alexandrov, K. (2009)**

Structure of the Disordered C Terminus of Rab7 GTPase Induced by Binding to the Rab Geranylgeranyl Transferase Catalytic Complex Reveals the Mechanism of Rab Prenylation.  
*J. Of Biol. Chem.*, 19, 13185 – 13192

**Wu, Y., Tan, K., Waldmann, H., Goody, R. S., Alexandrov, K. (2007)**

Interaction analysis of prenylated Rab GTPase with Rab escort protein and GDP dissociation inhibitor explains the need for both regulators  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 104, 12294 – 12299

**Wu, Y., Oesterlin, L. K., Tan, K., Waldmann, H., Alexandrov, K., Goody, R. S. (2010)**

Membrane targeting mechanism of Rab GTPases elucidated by semisynthetic protein probes.  
*Nature Chemical Biology*, 6, 534 – 540

**Yoshikawa, M., Kato, T., Takenishi, T. (1969)**

Studies of Phosphorylation. III. Selective Phosphorylation of Unprotected Nucleosides.  
*Bull. Chem. Soc.*, 42, 3505 – 3508

**Zerial, M., McBride, H. (2001)**

Rab proteins as membrane organizers.  
*Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2, 107 – 117

**Zhang, F. L., Casey, P. L. (1996)**

Protein prenylation: Molecular mechanisms and functional consequences.  
*Annu. Rev. Biochem.*, 65, 241 – 269

**Zhang, B., Zhang, Y., Shacter, E., Zheng, Y. (2004)**

Mechanism of the Guanine Nucleotide Exchange Reaction of Ras GTPases Evidence for a GTP/GDP Displacement Model.  
*Biochemistry*, 44, 2566 – 2576

**Zhu, G., Zhai, P., Liu, J., Terzyan, S., Li, G., Zhang, X. C. (2004)**

Structural basis of Rab5-Rabaptin5 interaction in endocytosis.  
*Nat. Struct. Mol. Biol.*, 11, 975 – 983



## 9 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt folgenden Personen:

Prof. Dr. Roger S. Goody für das in mich gesetzte Vertrauen bei der Bearbeitung dieses vielseitigen und faszinierenden Projekts.

Prof. Dr. Daniel Rauh für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens.

Prof. Dr. Aymelt Itzen für seinen stets freundlich gewährten fachlichen Rat und die Betreuung der biophysikalischen Experimente.

Nathalie Bleimling für ihre stets hilfsbereite und freundliche Art sowie die Präparation einer Vielzahl der eingesetzten Proteine.

Dr. Yaowen Wu für hilfreiche fachliche Diskussionen und Anregungen.

Fu Li für die Durchführung der Mikroinjektionsexperimente.

Sophie Vieweg für die gute Zusammenarbeit während ihrer Masterarbeit.

Den Mitgliedern der Arbeitsgruppen Engelhard und Seebeck für viele heitere Stunden und die angenehme Zusammenarbeit in Labor und Büro.

Den Mitgliedern der Arbeitsgruppe Goody sowie der gesamten Abteilung III für die tolle Arbeitsatmosphäre und die allgegenwärtige Hilfsbereitschaft untereinander.



**Eidesstattliche Erklärung:**

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig, und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln angefertigt habe.

Dortmund, den

\_\_\_\_\_  
David Wiegandt