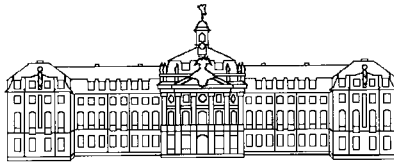


Mikrobiologie

**Analyse der Lokalisation und Protein/Proteininteraktionen
der kleinen GTPase rab1b**



WESTFÄLISCHE
WILHELMS-UNIVERSITÄT
MÜNSTER

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften im Fachbereich Biologie
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von
Miriam Köster
aus Burgsteinfurt

-2003-

Dekan:	Prof. Dr. A. Steinbüchel
Erste Gutachterin:	Prof. Dr. A. Barnekow
Zweiter Gutachter:	Prof. Dr. V. Gerke
Tag der mündlichen Prüfung(en):	01.12.03; 02.12.03; 08.12.03
Tag der Promotion:	08.12.2003

*für meine Eltern
und meine Familie*

Teile dieser Dissertation wurden veröffentlicht:

Poster:

Analysis of rab1b interaction with MSS4 and PRA1

Miriam Köster, Thomas Weide and Angelika Barnekow

(DGZ-Tagung Karlsruhe, 26.-30. März 2000)

Analysis of rab1b interaction with PRA1

Miriam Köster, Thomas Weide and Angelika Barnekow

(DGZ-Tagung Strasbourg, 7.-9. Nov. 2001)

Publikationen

Weide, T., Köster, M., Barnekow, A. (1999):

Inactive and active mutants of rab1b are not tightly integrated into target membranes.

Int. J. Oncol. **15**: 727-736

Köster, M., Weide, T., Barnekow, A. (2000):

Analysis of rab1b interaction with MSS4 and PRA1.

Europ. J. Cell Biol. **79**: 57

Weide, T., Bayer, M., Köster, M., Siebrasse, J.P., Peters, R., Barnekow, A. (2001):

The Golgi matrix protein GM130: a specific interacting partner of the small GTPase rab1b.

EMBO Rep. **2**: 336-341

Köster, M., Weide, T., Barnekow, A. (2001):

Analysis of rab1b interaction with PRA1.

Biology of the Cell **93**: 222

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	V
Tabellenverzeichnis	VI
Abkürzungsverzeichnis	VII

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Die Superfamilie der kleinen ras-ähnlichen GTPasen.....	2
1.2 Die Familien der kleinen rab GTPasen	5
1.3 Die Struktur der rab Proteine.....	5
1.4 Intrazelluläre Lokalisation und Funktion der rab GTPasen.....	8
1.5 Die kleine GTPase rab1	11
1.6 Der GTPase-Zyklus	12
1.7 Interaktionspartner der kleinen GTPase rab1	16
1.8 Interaktionspartner PRA1	18
2. Zielsetzung	20
3. Material	21
3.1 Chemikalien.....	21
3.2 Antibiotika	23
3.3 Reagenziensysteme und <i>Kits</i>	23
3.4 Stammlösungen	24
3.5 Kulturmedien.....	25
3.5.1 Kulturmedien für Bakterien	25
3.5.2 Kulturmedien für Hefe	26
3.5.3 Kulturmedien für eukaryotische Zellen	28
3.6 Enzyme & Marker	29
3.6.1 Restriktionsendonukleasen.....	29
3.6.2 Sonstige Enzyme.....	29
3.6.3 Proteinmarker.....	29
3.6.4 DNA-Marker.....	29
3.7 Immunologische Reagenzien.....	30
3.7.1 Primäre Antikörper	30

3.7.2 Sekundäre Antikörper	30
3.7.3 Farbstoffe	31
3.8 <i>primer</i>	31
3.8.1 Klonierungs <i>primer</i>	31
3.8.2 Sequenzierungs <i>primer</i>	34
3.9 Ausgangsvektoren und Lambda-Bank.....	35
3.9.1 Prokaryotische Expressionsvektoren	35
3.9.2 Vektoren für das <i>yeast two-hybrid</i> -System.....	36
3.9.3 Eukaryotische Expressionsvektoren	36
3.9.4 Lambda-Bank.....	37
3.10 Plasmidkonstrukte.....	37
3.10.1 Verwendete Plasmidkonstrukte für das <i>yeast two-hybrid</i> -System.....	38
3.10.2 Verwendete Plasmidkonstrukte für die eukaryotische Transfektion	41
3.10.3 Verwendete Plasmidkonstrukte für die Expression von Fusionsproteinen.....	42
3.11 Organismen.....	42
3.11.1 Bakterienstämme.....	42
3.11.2 Hefestämme	43
3.11.3 Eukaryotische Zellen.....	43
4. Methoden.....	44
4.1 Anzucht, Kultivierung und Lagerung von Bakterien, Hefen und eukaryotischen Zellen	44
4.1.1 Stammhaltung von Bakterien (DH5 α , BL21).....	44
4.1.2 Stammhaltung von Hefen (Y190).....	44
4.1.3 Zellkultur von eukaryotischen Zellen (BHK-21, HeLa SS6)	45
4.2 Arbeiten mit DNA	47
4.2.1 Isolierung von Plasmid DNA aus <i>E. coli</i>	49
4.2.2 Amplifikation von DNA mittels PCR.....	49
4.2.3 Aufreinigung von PCR-Produkten.....	51
4.2.4 Konzentrationsbestimmung von DNA.....	51
4.2.5 Restriktion von DNA	51
4.2.6 Elektrophoretische Auftrennung von DNA	52
4.2.7 Gelextraktion von DNA	54
4.2.8 Ligation von DNA	54
4.2.9 Transformation von Bakterien	55

4.2.9.1 Herstellung kompetenter Bakterien.....	55
4.2.9.2 Transformation von Bakterien nach der Calciumchlorid-Methode.....	56
4.2.10 Überprüfen einer Klonierung.....	56
4.2.11 Sequenzierung von DNA.....	57
4.3 Das <i>yeast two-hybrid</i> -System.....	58
4.3.1 Herstellung kompetenter Hefen.....	60
4.3.2 Kotransformation von Hefen.....	61
4.3.3 β -Galaktosidase-Filtertest zur Bestätigung von Protein/Proteininteraktionen...	61
4.4 Expression rekombinanter Proteine in eukaryotischen Zellen.....	62
4.4.1 Transiente Transfektion eukaryotischer Zellen.....	64
4.4.1.1 Transiente Transfektion nach der Calcium-Phosphat-DNA- Präzipitationsmethode.....	64
4.4.1.2 Transiente Transfektion nach der PolyFect-Methode.....	65
4.4.2 Herstellung von Zellextrakten.....	65
4.4.2.1 Herstellung von <i>post nuclear supernatant</i> -Extrakten.....	66
4.4.2.2 Herstellung von Gesamtextrakten für <i>GST-pulldowns</i>	67
4.4.3 Zytosol-Membranfraktionierung.....	67
4.4.4 Triton X-114-Extraktion.....	68
4.5 <i>In vitro</i> Bindungsanalyse – <i>GST-pulldown</i>	69
4.5.1 Expression von GST-Fusionsproteinen.....	71
4.5.2 Herstellung des Bakterienlysates nach der Proteinexpression.....	72
4.5.3 Überprüfung der Proteinexpression.....	72
4.5.4 Kopplung der GST-Fusionsproteine an Glutathion-Sepharose <i>beads</i> und Reinigung.....	72
4.5.5 Inkubation mit Zellextrakten.....	73
4.6 Analyse rekombinanter Proteine.....	73
4.6.1 Auftrennung von Proteinen mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	74
4.6.2 <i>Western Blot</i> Analyse.....	74
4.6.3 Immunfluoreszenzanalysen.....	75
5. Ergebnisse.....	79
5.1 Herstellung von Deletionsmutanten des <i>rab1b</i>	79
5.2 Herstellung von <i>rab1b</i> Chimären.....	82
5.3 Lokalisation des Proteins <i>rab1b</i>	85
5.3.1 Expression der Deletionsmutanten und Chimären in HeLa SS6-Zellen.....	85

5.3.2 Analyse der Membranassoziation	87
5.3.3 Analyse der posttranslationalen Modifikation	90
5.3.4 Immunfluoreszenzanalysen zur intrazellulären Lokalisation	93
5.4 PRA1 (<i>prenylated rab acceptor</i>) – Interaktionspartner von rab1b.....	96
5.4.1 Herstellung verschiedener PRA1 Konstrukte	96
5.4.2 Expression von PRA1 in HeLa SS6-Zellen	98
5.4.3 Analyse der Membranassoziation von PRA1	99
5.4.4 Immunfluoreszenzanalysen zur intrazellulären Lokalisation von PRA1.....	101
5.4.5 Analyse der Rab-Spezifität von PRA1.....	102
5.4.6 Analyse der Nukleotid-Spezifität von PRA1	104
5.5 Analyse der daueraktiven Mutanten rab1b Q67R und rab1b Q67L.....	109
5.5.1 Expression der daueraktiven rab1b Mutanten in HeLa SS6-Zellen.....	110
5.5.2 Analyse der Membranassoziation der daueraktiven rab1b Mutanten.....	110
5.6 Charakterisierung der Interaktion des rab1b Proteins mit PRA1	112
5.6.1 Kotransformation des Hefestammes Y190 mit den Deletionsmutanten und Chimären des rab1b Proteins	112
5.6.2 Kotransformation des Hefestammes Y190 mit dem Protein MSS4	114
6. Diskussion.....	116
6.1 Deletionsmutanten und Chimären des rab1b Proteins.....	116
6.2 Analysen zur Lokalisation des Proteins rab1b.....	117
6.3 Das Protein PRA1 – Interaktionspartner von rab1b	122
6.3.1 Analysen zur Membranassoziation des Proteins PRA1	122
6.3.2 Analysen zur Rab-Spezifität des Proteins PRA1	123
6.3.3 Analysen zur Nukleotid-Spezifität des Proteins PRA1.....	125
6.4 Charakterisierung der Interaktion des rab1b Proteins mit PRA1	128
6.5 Ausblick.....	132
7. Zusammenfassung.....	134
8. Literatur.....	135
9. Anhang	151
Danksagung.....	166
Lebenslauf	167

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1:	Die GTPasen der ras Superfamilie.....	4
Abb. 1.2:	Struktur der rab GTPasen.....	6
Abb. 1.3:	Intrazelluläre Lokalisation von rab GTPasen.....	8
Abb. 1.4:	Modell des rab-Zyklus	12
Abb. 4.1:	Schematischer Ablauf der Klonierung von Plasmid DNA	48
Abb. 4.2:	Experimenteller Ablauf des <i>yeast two-hybrid</i> -Systems	60
Abb. 4.3:	Schematischer Ablauf der Expression von rekombinanten Proteinen	63
Abb. 4.4:	Schematische Darstellung des Arbeitsablaufes eines <i>GST-pulldowns</i>	70
Abb. 5.1:	Deletionsmutanten für die Bindungsanalysen.....	80
Abb. 5.2:	Amplifikation der cDNA Fragmente für die rab1b Deletionsmutanten	81
Abb. 5.3:	Chimären für die Bindungsanalysen	82
Abb. 5.4:	Amplifikation der cDNA Fragmente für die Chimären	84
Abb. 5.5:	Expression der rekombinanten rab1b Deletionsmutanten und Chimären.....	86
Abb. 5.6:	Zytosol-Membranfraktionierung der rekombinanten rab1b Deletionsmutanten und Chimären.....	88
Abb. 5.7:	Triton X-114-Extraktion der rekombinanten Deletionsmutanten und Chimären.....	91
Abb. 5.8a:	Intrazelluläre Lokalisation des Wildtyps und der Deletionsmutanten des rab1b Proteins	94
Abb. 5.8b:	Intrazelluläre Lokalisation der rab1b Chimären	95
Abb. 5.9:	Amplifikation der cDNA von PRA1.....	97
Abb. 5.10:	Expression des rekombinanten Proteins PRA1.....	99
Abb. 5.11:	Zytosol-Membranfraktionierung des rekombinanten Proteins PRA1	100
Abb. 5.12:	Intrazelluläre Lokalisation des Fusionsproteins EGFP PRA1	101
Abb. 5.13:	Gesamtextrakte der transfizierten BHK-21-Zellen.....	108
Abb. 5.14:	<i>In vitro</i> Bindungsanalyse von GST-PRA1 und GST mit den rekombinanten rab1b Proteinen (Wildtyp und Mutanten)	109
Abb. 5.15:	Expression der rekombinanten Proteine rab1b Q67L und rab1b Q67R	110
Abb. 5.16:	Zytosol-Membranfraktionierung der rekombinanten Proteine rab1b Q67L und rab1b Q67R.....	111

Tabellenverzeichnis

Tab. 5.1:	<i>Primer und templates</i> für die Amplifikation der rab1b cDNA Fragmente.....	80
Tab. 5.2:	Übersicht über die Fragmentgrößen der Chimären.....	83
Tab. 5.3:	<i>Primer und templates</i> für die Amplifikation der cDNA Fragmente der Chimären.....	83
Tab. 5.4:	<i>Primer und templates</i> für die Amplifikation der cDNA von PRA1	97
Tab. 5.5:	Kotransformation des Hefestammes Y190 zur Überprüfung der Rab-Spezifität von PRA1	103
Tab. 5.6:	Punktmutationen der Proteine rab1a, rab1b, ypt1, rab6a und rho.....	105
Tab. 5.7:	Kotransformation des Hefestammes Y190 zur Überprüfung der Nukleotid-Spezifität von PRA1	106
Tab. 5.8:	Kotransformation des Hefestammes Y190 zur Überprüfung der Interaktion von rab1b mit PRA1	113
Tab. 5.9:	Kotransformation des Hefestammes Y190 zur Überprüfung der Interaktion der Chimären mit MSS4.....	114

Abkürzungsverzeichnis**A**

A	Alanin
<i>A. californica</i>	<i>Aplysia californica</i>
Abb.	Abbildung
Ac	Acetat
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
arf	ADP ribosylierender Faktor
AS	Aminosäure
AT	3-amino-1,2,3-triazol
ATP	Adenosintriphosphat

B

b	Basen
BHK	<i>baby hamster kidney</i>
bidest	zweifach destilliertes Wasser
bp	Basenpaare
BPB	Bromphenolblau
bzw.	beziehungsweise

C

C	Cystein
°C	Grad Celsius
C-	Carboxy-
ca.	circa
CCV	<i>clathrin-coated vesicles</i>
CaCl ₂	Calciumchlorid
CHO	<i>chinese hamster ovary</i>
CIP	<i>calf intestinal phosphatase</i>
CO ₂	Kohlendioxid

D

D	Aspartat
Δ	deletiert
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol,dilactat
dest.	destilliert
DMEM	Dulbeccos <i>Modified Eagle</i> Medium
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	1,4-Dithiothreitol

E

E	Glutamat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i>
ER	endoplasmatisches Retikulum
et al.	et altera
etc.	et cetera

F

F	Phenylalanin
FKS	fötales Kälberserum
FTase	Farnesyl-Transferase

G

G	Glycin
g	Erdbeschleunigung
g	Gramm
gal4-AD	gal4-DNA-Aktivierungsdomäne
gal4-BD	gal4-DNA-Bindungsdomäne
GAP	<i>guanosine activating protein</i>
GDF	<i>GDI dissociation factor</i>
GDI	<i>guanosin dissociation inhibitor</i>
GEF	<i>guanosine exchange factor</i>
GGTase	Geranylgeranyl-Transferase
GST	Glutathion S-Transferase
GTP	Guanosintriphosphat

H

h	Stunde
H	Histidin
HA	Hemagglutinin
HBS	Hepes <i>buffered saline</i>
HCl	Salzsäure
His	Histidin
HRP	<i>horse radish peroxidase</i>

I

I	Isoleucin
Ig	Immunglobulin
<i>in vitro</i>	im Reagenzglas
<i>in vivo</i>	im lebenden System
IPTG	Isopropyl- β -D-Thiogalaktosid

K

K	Lysin
kB	Kilobasen
KCl	Kaliumchlorid
kD / kDa	Kilodalton

L

L	Leucin
l	Liter
LB	Luria Broth
Leu	Leucin

M

M	Methionin
M	mol pro Liter
m	milli
μ	mikro
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MSS4	<i>multicopy suppressor protein of sec4</i>

N

N	Asparagin
N-	Amino-
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
NSF	<i>N-ethyl-maleimide-sensitive fusion protein</i>

O

OD	optische Dichte
----	-----------------

P

P	Prolin
p	pico

p.a.	per analysis
PAA-Gel	Polyacrylamid-Gel
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PEG	Polyethylenglycol
PNS	<i>post nuclear supernatant</i>
PRA	<i>prenylated rab acceptor</i>
PVDF	Polyvinylidendifluorid

Q

Q	Glutamin
---	----------

R

R	Arginin
rab	<i>ras analog in brain</i>
RabF	<i>rab family</i>
RabSF	<i>rab subfamily</i>
ran	<i>ras analog in nucleus</i>
REP	<i>rab escort protein</i>
rho	<i>ras homolog</i>
rpm	<i>rounds per minute</i>
RT	Raumtemperatur

S

S	Serin
sec.	Sekunde
SD	<i>synthetic dropout, Minimalmedium für Hefe</i>
SDS	<i>sodium dodecylsulfate</i>
SNAP	<i>soluble NSF attachment protein</i>
SNARE	<i>soluble NSF attachment protein receptor</i>
SV	<i>simian virus</i>

T

T	Threonin
<i>t-</i>	<i>target-</i>
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-Puffer
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TGN	<i>trans-Golgi network</i>
TRAPP	<i>transport protein particle</i>
Trp	Tryptophan

TX-114 Triton X-114

U

U Unit
u.a. unter anderem
ÜN über Nacht
UV Ultraviolett

V

V Valin; Volt
v- *vesicular-*
VAMP *vesicle associated*
membrane protein
(Synaptobrevin II)
vgl. vergleiche

W

W Tryptophan
wt Wildtyp

X

X-Gal 5-bromo-4-chloro-3-
indolyl- β -D-
galaktopyranosid

Y

Y Tyrosin
YPD *yeast-peptone-dextrose*,
Vollmedium für Hefe
ypt *yeast protein two*
YT *yeast-tryptone* (Medium)

1. Einleitung

Die Zellen aller Organismen besitzen gewisse gemeinsame Strukturmerkmale, beispielsweise beim Aufbau ihrer Membranen. Sowohl die prokaryotischen als auch die eukaryotischen Zellen werden von einer Plasmamembran begrenzt. Im Gegensatz zu den meisten Prokaryoten zeichnen sich eukaryotische Zellen durch eine höhere Komplexität aus. Sie enthalten ausgedehnte innere Membransysteme, die bestimmte Zellbereiche umschließen und diese damit vom Rest des Zytoplasmas abtrennen. So entsteht neben einer Vielzahl von Organellen wie Zellkern, Mitochondrien und Peroxisomen auch ein sorgfältig ausgearbeitetes, intrazelluläres Membransystem, an dem die Kernmembran, das endoplasmatische Retikulum (ER), der Golgi-Apparat, das TGN (*trans-Golgi network*) sowie die Plasmamembran beteiligt sind.

Für den Stoffwechsel der eukaryotischen Zelle ist dieses Membransystem essentiell, da es dem intrazellulären Transport dient. Es vermittelt die Endo-, die Exo- und auch die Transzytose in der Zelle, wobei Proteine und lösliche Substanzen in membranumhüllten Vesikeln zu einer Zielmembran transportiert werden. Damit dieser gerichtete Vesikeltransport gewährleistet werden kann, müssen hocheffiziente zelluläre Steuerungs- und Signalprozesse vorhanden sein.

Der genaue Ablauf dieser komplexen, molekularen Prozesse konnte in den vergangenen Jahren näher charakterisiert werden. Mittlerweile ist eine große Anzahl an Faktoren bekannt, die an der genauen Zielfindung des membranumhüllten Vesikels (*targeting*), an der Anbindung (*docking*) und an der Verschmelzung des Vesikels mit der Zielmembran (*fusion*) beteiligt sind. Davon wurden im wesentlichen zwei Gruppen von Proteinen näher charakterisiert. Dabei handelt es sich zum einen um die Proteine des Fusionskomplexes und zum anderen um die kleinen GTPasen der rab Familie (Pfeffer et al., 1995; Novick & Zerial, 1997).

Zum Fusionskomplex gehören unter anderem die SNARE (*soluble NSF attachment protein receptor*) Proteine, die zum Beispiel für den Fusionsprozess des Vesikels mit der Zielmembran verantwortlich gemacht werden. Es sind integrale Membranproteine, die ursprünglich, ihrer Lokalisation entsprechend, in *v*-SNAREs (*vesicular*-SNARE) und *t*-SNAREs (*target*-SNARE) unterteilt wurden (Söllner et al., 1993). Es zeigte sich jedoch, dass sowohl *v*- als auch *t*-SNAREs nebeneinander auf den Vesikeln und der Zielmembran existieren (Cao & Barlowe, 2000). Nach strukturellen Analysen wurden die SNAREs erneut klassifiziert und aufgrund ihrer konservierten Aminosäure in der zytosolischen Domäne als R-SNARE (Arginin-SNARE) und Q-SNARE (Glutamin-SNARE) bezeichnet (Fasshauer et al., 1998).

Nach einem Schlüssel-Schloss-Prinzip bilden die SNAREs bei der Annäherung eines Vesikels an die Zielmembran einen Proteinkomplex, der aus vier, parallel angeordneten Helices besteht. Typischerweise enthält dieser Komplex eine R-SNARE Helix vom Vesikel und drei Q-SNARE

Helices von der Zielfmembran. Dieser sogenannte *trans*-SNARE-Komplex vermittelt oft die Fusion der beiden Membranen (Sutton et al., 1998; Chen & Scheller, 2001; Whyte & Munro, 2001). Zur Regulation des Transportes sind verschiedene andere Faktoren erforderlich. So sind das Protein α -SNAP (*soluble NSF attachment protein*) und die ATPase NSF (*N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein*) an der Dissoziation des Komplexes nach der Fusion der Membranen beteiligt (Mayer et al., 1996; Chen & Scheller, 2001). Auch die Familie der SM Proteine (Sec1p/Munc18) spielt eine entscheidende Rolle in der Regulation des Membrantransportes. Durch eine Membrandissoziation kontrollieren diese Proteine die Zusammenlagerung des SNARE Komplexes. Sie scheinen als molekulare Schalter zu funktionieren (Bryant & James, 2003; Jahn & Südhof, 2003).

Neben den SNAREs sind weitere Faktoren bekannt, die für die Regulation des Vesikeltransportes wichtig sind. Es wurden mehrere Proteine bzw. Proteinkomplexe identifiziert, die eine Rolle bei der Anbindung des Vesikels an die Zielfmembran spielen. Dazu gehören Uso1p (homolog in Säugerzellen p115), TRAPP (*transport protein particle*) und Exocyst, die vor der Bildung der SNARE Komplexe an die Membranen binden. In *Saccharomyces cerevisiae* sind Uso1p und TRAPP, ein großer Proteinkomplex, am ER-Golgi-Transport beteiligt (Cao et al, 1998; Sacher et al., 1998 und 2000; Whyte & Munro, 2002). Exocyst, ein weiterer Proteinkomplex, ist dagegen ins *targeting* von *post*-Golgi-Vesikeln zur Plasmamembran involviert (Guo et al., 1999; Whyte & Munro, 2002). In Säugerzellen konnte das zu Uso1p homologe Protein p115 identifiziert werden, das zusammen mit den Proteinen GM130 und Giantin einen Komplex bildet. Es ist an der Interaktion von Golgi-Vesikeln mit Golgi-Membranen beteiligt (Nakamura et al., 1997; Sönnichsen et al., 1998).

Eine weitere Gruppe von Proteinen, die eine Schlüsselrolle in der Regulation des Vesikeltransportes übernehmen, sind die rab Proteine, die zur Superfamilie der kleinen GTPasen gehören.

1.1 Die Superfamilie der kleinen ras-ähnlichen GTPasen

Die Familie der kleinen GTP-bindenden Proteine, die auch als „kleine GTPasen“ bezeichnet werden, besteht aus größtenteils monomeren Proteinen mit einem Molekulargewicht von 20-40 kDa (Takai et al., 2001).

Der Prototyp der kleinen GTPasen ist das ras (*rat sarcoma*) Protein. Harvey und Kirsten entdeckten das virale H-ras als transformierendes Prinzip bei Ratten-Sarkomaviren (Harvey, 1964; Shih et al., 1978; Barbacid, 1987). Auch im menschlichen Gewebe wurden zelluläre

Onkogene identifiziert, wobei unter anderem eine mutierte Form von ras in über 35% humaner Karzinome entdeckt wurde (Der et al., 1982; Hall et al., 1983). Die mutierte Form dieses Proteins, das in einem aktiven Zustand fixiert ist, führt zur Stimulation der Proliferation und Transformation von Zellen (Der et al., 1986). Die ras Proteine weisen untereinander eine relativ hohe Homologie der Aminosäuren von 50 bis 55 % auf (Hall, 1990). Sie sind verwandt mit den „großen“ GTPasen (G Proteine), die im Gegensatz zu den kleinen GTPasen heterotrimer sind (Wieland et al., 1999). Zu diesen G Proteinen gehören Elongationsfaktoren wie EF-Tu, die an der Regulation der Proteinsynthese beteiligt sind, und die Dynamine, die die rezeptorvermittelte Endozytose regulieren (Bourne et al., 1990 und 1991).

Bisher sind in Eukaryoten mehr als 100 Proteine identifiziert worden, die zur Superfamilie der ras-ähnlichen GTPasen gezählt werden. Sie weisen eine etwa 30 %ige Homologie zu den ras Proteinen auf, wobei sich die größte Ähnlichkeit in konservierten Sequenzbereichen findet. Diese konservierten Sequenzen sind für die spezifische Interaktion mit GDP und GTP sowie für die GTPase-Aktivität dieser Proteine verantwortlich (Bourne et al., 1990; Hall, 1990; Bourne, et al., 1991; Valencia et al., 1991; Takai et al., 1992).

Durch ihre Fähigkeit zur Bindung und Hydrolyse von GTP und der damit einhergehenden Konformationsänderung spielen die kleinen GTPasen in der Zelle eine Rolle als molekulare Schalter. In der GDP-gebundenen, inaktiven Konformation stimuliert ein *upstream* Signal die Dissoziation von GDP, so dass GTP gebunden werden kann. In diesem aktiven Zustand folgt meist eine Konformationsänderung der Region für die Effektor-Bindung, so dass diese Region mit einem *downstream* Effektor interagieren kann. Auf diese Weise kann die kleine GTPase die Funktion des Effektors beeinflussen (Bourne et al., 1990; Hall, 1990; Takai et al., 1992). Durch die kontinuierliche Bindung und Hydrolyse des GTP durchlaufen diese Proteine einen Zyklus, der im Abschnitt 1.6 am Beispiel der rab Proteine ausführlich erklärt wird.

Aufgrund ihrer funktionellen Ähnlichkeiten und konservierten Strukturen können die ras-ähnlichen Proteine in fünf Familien eingeteilt werden: ras, rho, rab/ypt, arf und ran, wobei die ras, rho und rab/ypt Familien die meisten Mitglieder haben (Hall, 1990). Neben der rab Familie (siehe Abschnitt 1.2) sollen im Folgenden auch die anderen Familien der ras Superfamilie kurz vorgestellt werden.

Die Proteine der namensgebenden ras Familie spielen unter anderem eine wichtige Rolle in der Signaltransduktionskaskade. Dort sind sie an der Weiterleitung von extrazellulären Signalen in den Zellkern beteiligt. Außerdem sind sie an der Regulation der Zellproliferation, Zelldifferenzierung, Morphologie und Apoptose beteiligt (Hall, 1990 und 1992; Whitman & Melton, 1992; Novick & Brenwald, 1993; Kauffmann-Zeh et al., 1997).

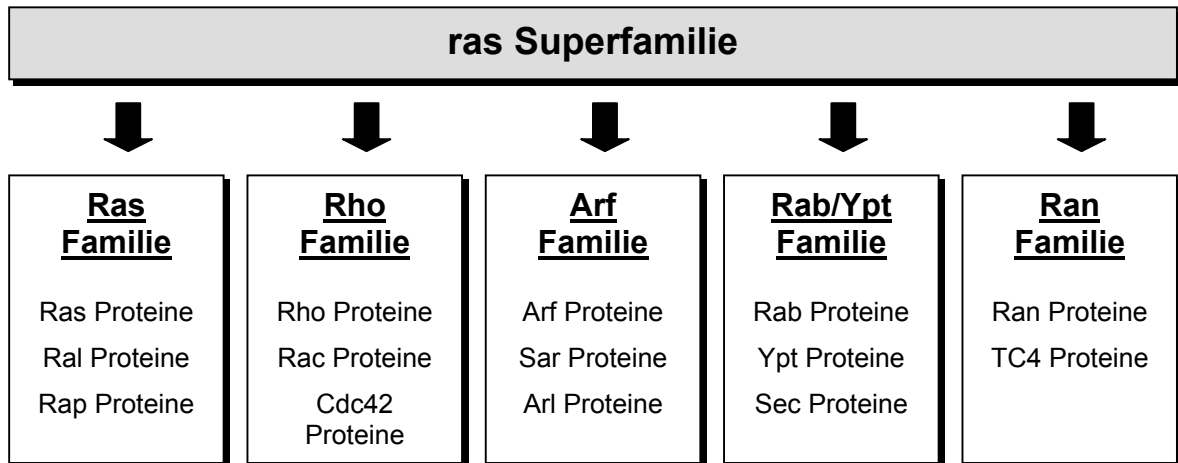


Abb. 1.1: Die GTPasen der ras Superfamilie

Die ras Superfamilie ist in fünf Familien gegliedert, die jeweils mehrere Unterfamilien enthalten.

Ras (*rat sarcoma*), **Rho** (*ras homolog*), **Arf** (*ADP ribosylating factor*), **Rab** (*ras analog in brain*), **Ypt** (*yeast protein*), **Ran** (*ras homolog in nucleus*)

Die Proteine der rho Familie sind von großer Bedeutung in der Genexpression sowie in diversen Zellprozessen wie das Zellwachstum. Auch sind sie an der Reorganisation des Zytoskeletts als Antwort auf extrazelluläre Signale in Säugerzellen beteiligt (Hall, 1992; Khosravi-Far et al., 1995; Takai et al., 1995; Imamura et al., 1997; Li et al., 1997; Tapon & Hall, 1997).

Die anderen drei Proteinfamilien sind in intrazelluläre Transportprozesse involviert.

Die arf Proteine induzieren zusammen mit den sar1 Proteinen die Bildung von Transportvesikeln. Dazu rekrutieren die arf Proteine als Adapterproteine die sogenannten *coat* Proteinkomplexe (COPI bzw. COPII) auf die Membranen der Transportvesikel (Rothman, 1994; Moss & Vaughan, 1995; Rothman & Wieland, 1996; Moss & Vaughan, 1998; Chavrier & Goud, 1999). COPI scheint in verschiedenen Transportabschnitten vom ER zum Golgi-Apparat eine Rolle zu spielen. Dieser Proteinkomplex ist vor allem auf den Vesikeln des retrograden Transportes vom Golgi zum ER und des *intra*-Golgi-Transportes zu finden. Er scheint jedoch auch am anterograden Transport beteiligt zu sein (Nickel et al., 2002; Garcia-Mata et al., 2003). COPII Proteinkomplexe sind dagegen ausschließlich auf Vesikeln zu finden, die vom ER abgeschnürt und in Richtung Golgi-Apparat transportiert werden. Sie vermitteln die Selektion von Cargo-Molekülen für den Transport und sind an der Abschnürung der Vesikel beteiligt (Barlowe, 2002; Stephens & Pepperkok, 2002).

Die Familie der ran Proteine spielt eine zentrale Rolle im nukleozytoplasmatischen Transport. Außerdem sind sie in die Organisation der Mikrotubuli während der M-Phase des Zellzyklusses involviert (Moore & Blobel, 1993; Görlich, 1997; Nakamura et al., 1998; Kalab et al., 1999).

Die rab Proteine sind an der Regulation des Vesikel- und Membrantransportes beteiligt und werden im Folgenden ausführlich beschrieben.

1.2 Die Familie der kleinen rab GTPasen

Bei der Familie der rab/ypt Proteine handelt es sich um die größte Familie der ras Superfamilie (Novick & Zerial, 1997; Schimmöller et al., 1998; Chavrier & Goud, 1999).

Anfang der 80er Jahre wurden in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* erstmals Sec Gene isoliert, die essentiell für die Sekretion sind. Es konnte gezeigt werden, dass das Sec4 Gen für eine kleine GTPase kodiert, die in den Vesikeltransport vom Golgi-Apparat zur Plasmamembran involviert ist (Novick et al., 1980; Salminen & Novick, 1987).

1983 wurde das Hefegen Ypt entdeckt, das zwischen den Genen des Actins und des Tubulins lokalisiert ist und für eine kleine GTPase kodiert (Gallwitz et al., 1983; Schmitt et al., 1988). Das Protein ypt1 ist in den Transport vom ER zum Golgi involviert (Segev et al., 1988; Baker et al., 1990). Durch Hybridisierungsexperimente mit cDNA-Banken (Gehirn) konnten auch in Säugerzellen ypt1/sec4 verwandte Proteine identifiziert werden, die rab (*ras analog in brain*) genannt wurden und homolog zu den ypt Proteinen der Hefe in höheren Eukaryoten sowie den Protozoen und Pflanzen vorkommen (Touchot et al., 1987).

Mittlerweile sind im menschlichen Gewebe etwa 60 rab Proteine bekannt, die meist ubiquitär exprimiert werden (Pereira-Leal & Seabra, 2001; Zerial & McBride, 2001). In der vollständig sequenzierten Hefe *Saccharomyces cerevisiae* konnten 11 ypt Proteine identifiziert werden (Lazar et al., 1997; Takai et al., 2001).

Diese Proteine sind am *docking* und an der Fusion von Vesikeln beteiligt, die sowohl in der Exo- als auch in der Endozytose den Transport von Proteinen zwischen den Kompartimenten vermitteln. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass die einzelnen rab Proteine spezifische Rollen in der Regulation dieses Transportes zwischen den subzellulären Kompartimenten einnehmen (Nuoffer & Balch, 1994; Novick & Zerial, 1997; Schimmöller et al., 1998; Mohrmann & van der Sluijs, 1999).

1.3 Die Struktur der rab Proteine

Die rab Proteine haben ein Molekulargewicht von 20-25 kDa (Day et al., 1998). Wie zu Beginn erwähnt, zeichnen sie sich als Familie der ras Superfamilie durch eine Homologie von 30% zu ras aus. Diese Homologie ist auf Sequenzbereiche zurückzuführen, die in allen kleinen GTPasen konserviert und für ihre Funktion als molekulare Schalter in der Zelle essentiell sind.

In der folgenden Abbildung 1.2 ist die Struktur am Beispiel der GTPase rab1b dargestellt.

Die rab Proteine weisen sechs hochkonservierte Domänen auf, die in allen Mitgliedern der ras Superfamilie vorkommen, da sie die Guanosin-Nukleotid-bindende Tasche bilden.

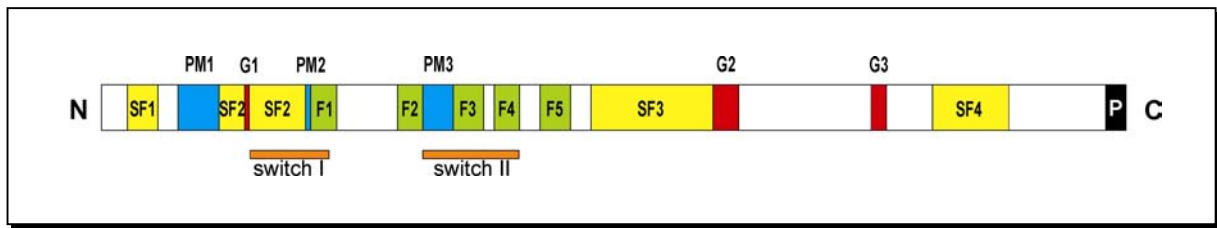


Abb.1.2: Struktur der rab GTPasen

Dargestellt ist die Domänenstruktur der kleinen GTPase rab1b nach dem von J.B. Pereira-Leal und M.C. Seabra im Jahre 2000 veröffentlichten Modell.

N: Amino-Terminus; C: Carboxy-Terminus; **G1-G3**: Guanosin-Bindungsmotiv; **PM1-PM3**: Phosphat/Mg²⁺-Bindungsmotiv; **F1-F5**: *rab family* Region; **SF1-SF4**: *rab subfamily* Region; **P**: Isoprenylierungsmotiv; **switch I-II**: Regionen mit starken Konformationsänderungen während GTP-Hydrolyse und Bindung

Dabei binden die Sequenzmotive G1, G2 und G3 (G = Guanin) die Base des Guanosin-Nukleotids. Die als PM (PM = Phosphat / Mg²⁺) bezeichneten Regionen spielen eine wichtige Rolle in der Phosphat-Bindung, wobei PM1 die α - und β -Phosphatreste des Triphosphates bindet, während das hydrolysierbare γ -Phosphat sowie Mg²⁺ mit Hilfe des Sequenzmotivs PM3 gebunden wird. PM2 enthält ein konserviertes Threonin, welches auch Mg²⁺ bindet, das für die GTPase-Aktivität von großer Bedeutung ist. Außerdem wird vermutet, dass die Region um PM2 auch für die Bindung sowohl eines GTPase-aktivierenden Proteins (GAPs) als auch eines Effektors wichtig ist. Daher wird sie auch als Effektor-Region bezeichnet (Bourne et al., 1991; Valencia et al., 1991; Schiedel et al., 1995; Moore et al., 1995; Pereira-Leal & Seabra, 2000; Stenmark & Olkkonen, 2001).

Die Bindung und Hydrolyse von GTP sind mit starken Konformationsänderungen des Proteins verbunden, wovon hauptsächlich die zwei funktionellen Regionen *switch I* und *switch II* betroffen sind (Pai et al., 1989; Overmeyer et al., 1998).

Neben diesen hochkonservierten Sequenzmotiven weisen die rab Proteine zwei hypervariable Regionen am Amino- und Carboxy-Terminus auf (Amino = N; Carboxy = C). Die N-terminale hypervariable Region beginnt direkt am N-Terminus und erstreckt sich bis zum Sequenzmotiv PM1. Die hypervariable C-terminale Region beginnt zehn Aminosäuren hinter dem Sequenzmotiv G3 und erstreckt sich bis zur Isoprenylierungsstelle am Carboxy-Terminus. Diese Region weist bei den rab Proteinen eine große Diversität auf, wobei bisher zwei Funktionen bekannt. Zum einen scheint dieser Bereich eine wichtige Rolle in der Lokalisation und bei der Interaktion mit anderen Proteinen einzunehmen (Chavrier et al., 1991; Beranger et al., 1994; Olkkonen & Stenmark, 1997; Stenmark & Olkkonen, 2001). Zum anderen scheint dieser Bereich zusammen mit der Effektordomäne für die Interaktion mit spezifischen Effektor-Proteinen verantwortlich zu sein (Novick & Brennwald, 1993; Stenmark et al., 1994; Moore et al., 1995; Burton et al., 1997).

Wichtig für die korrekte Funktion der rab Proteine als molekulare Schalter in der Zelle ist außerdem die posttranslationale Modifikation in Form einer Isoprenylierung (Calero et al., 2003; Gomes et al., 2003).

Bei den Proteinen ras, rho, rac, rap und ral der ras Superfamilie liegt das klassische Prenylierungsmotiv CAAX (C = Cystein; A = aliphatische Aminosäure; X = beliebige Aminosäure) vor. Nur die ras Proteine werden durch die Farnesyltransferase (FTase) farnesyliert, während die anderen Proteine mit diesem klassischen Motiv durch die Geranylgeranyl-Transferase I (GGTase I) modifiziert werden (Seabra et al., 1992; Shen & Seabra, 1996; Gomes et al., 2003).

Auch die rab Proteine werden geranylgeranyliert, weisen aber im Gegensatz zu den obengenannten Proteinen nicht das klassische CAAX-Motiv auf (Khosravi-Far et al., 1991). Für die rab Proteine sind bisher sechs verschiedene Motive am C-Terminus bekannt: XXCC, XCXC, CCXX, CCXXX, XCCX und XCXXX (C = Cystein; X = beliebige Aminosäure) (Pereira-Leal & Seabra, 2000 und 2001; Gomes et al., 2003). Die Anbindung der ein oder zwei C₂₀-Isoprenreste (Geranylgeranylreste) erfolgt durch Thioether an die Cysteine. Dieses geschieht bei den rab Proteinen durch die Geranylgeranyl-Transferase II (GGTase II). Das neu synthetisierte rab Protein wird dafür an ein *rab escort protein* (REP) gebunden, das es zur katalytischen Untereinheit der GGTase II bringt. Die katalytische Untereinheit dieses Enzyms setzt sich aus einer 60 kDa α - und einer 38 kDa β -Untereinheit zusammen und überträgt die Geranylgeranylgruppen auf ein oder zwei Cysteine am C-Terminus (Andres et al., 1993; Cremers et al., 1994). Das REP fungiert als Chaperon, das das hydrophobe, modifizierte rab Protein löslich hält und es zur Membran bringt, wo das rab Protein binden kann (Alexandrov et al., 1994; Pfeffer, 2001).

In die Strukturanalyse kleiner GTPasen wurde bisher viel Arbeit investiert. Die einzelnen Proteine der rab Familie weisen untereinander eine Homologie von 35 bis über 80% auf. Rab Proteine mit einer Homologie über 75% werden als Isoformen bezeichnet. Diese Isoformen scheinen funktionell verwandt zu sein. (Tuvim et al., 2001).

Im Jahr 2000 wurde von José B. Pereira-Leal und Miguel C. Seabra das in der Abbildung 1.3 dargestellte Modell etabliert, in dem sie die konservierten PM und G-Domänen berücksichtigten. Sie konnten fünf rab-konservierte Sequenzen definieren, die sie als RabF (*rab family*) Motive bezeichneten. Diese Motive gruppieren sich um die *switch*-Regionen und spielen bei der Interaktion mit generellen Regulatoren von rab wie dem REP (*rab escort protein*) eine wichtige Rolle. Außerdem definierten sie Bereiche, in denen die Isoformen der rab Proteine eine große Homologie aufweisen, als RabSF (*rab subfamily*) Motive. Diese individuellen Motive der rab

Subfamilien scheinen für die Spezifität der Interaktionen von rab mit Effektoren verantwortlich zu sein. Es konnten bisher zehn Subfamilien von rab identifiziert werden: rab1, rab3, rab4, rab5, rab6, rab8, rab11, rab22, rab27 und rab40. Es gibt aber auch rab Proteine, die sich keiner Subfamilie zuordnen lassen (Pereira-Leal & Seabra, 2000; Stenmark & Olkkonen, 2001).

1.4. Intrazelluläre Lokalisation und Funktion der rab GTPasen

Die rab Proteine sind auf diversen Zellorganellen lokalisiert und in verschiedene Transportschritte der Zelle involviert (Nuoffer & Balch; 1994; Novick & Zerial, 1997; Martinez & Goud, 1998; Schimmöller et al., 1998).

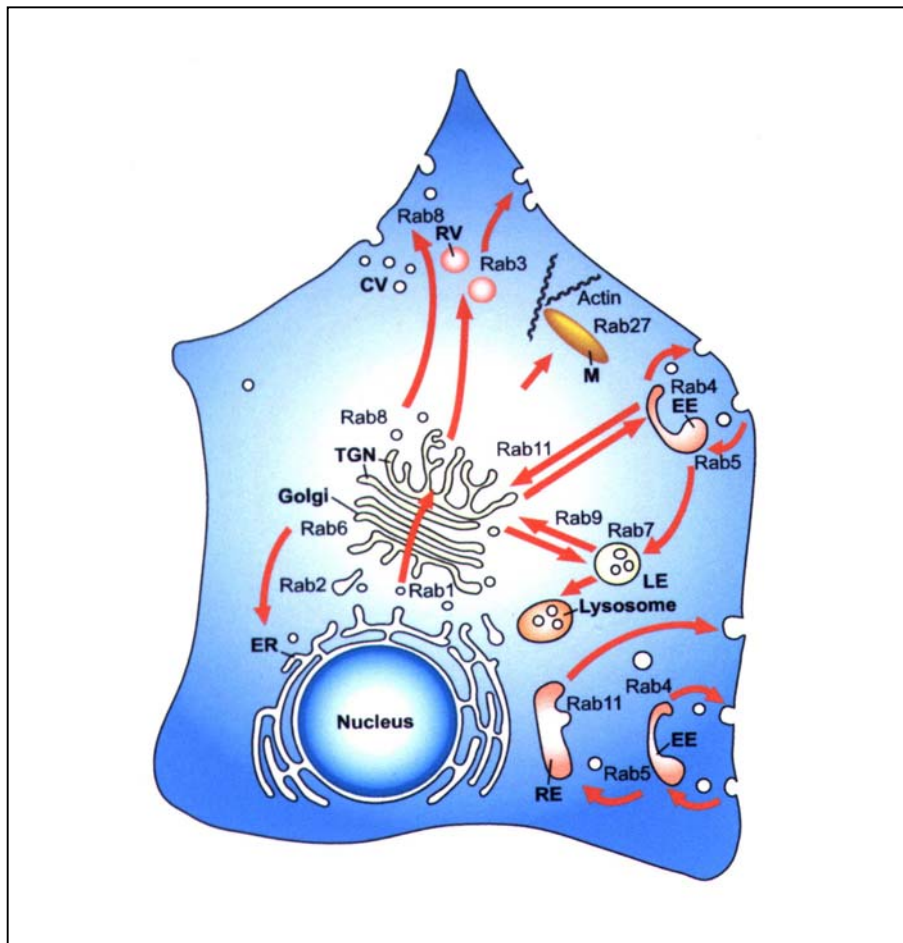


Abb.1.3: Intrazelluläre Lokalisation von rab GTPasen

In dieser Abbildung ist die intrazelluläre Lokalisation einiger rab Proteine dargestellt. Die Pfeile verdeutlichen die Transportprozesse, in die die einzelnen rab Proteine involviert sind.

ER: Endoplasmatisches Retikulum; **TGN:** *trans-Golgi network*; **CV:** *constitutive secretory vesicles* (konstituive sekretorische Vesikel); **RV:** *regulated secretory granules/vesicles* (regulierte sekretorische Granulae / Vesikel); **M:** Melanosom; **EE:** *early endosomes* (frühe Endosomen); **LE:** *late endosomes* (späte Endosomen); **RE:** *recycling endosomes* (*recycling* Endosomen) (aus: Stenmark & Olkkonen, 2001)

Die meisten rab Proteine werden ubiquitär exprimiert (Martinez & Goud, 1998). Einige rab Proteine sind jedoch zelltyp- oder gewebespezifisch, wie zum Beispiel das Protein rab3a, das nur in Neuronen und neuro-endokrinen Zellen exprimiert wird (Fischer von Mollard et al., 1991 und 1994). Das Protein rab17 kann dagegen nur in polarisierten, epithelialen Zellen detektiert werden (Lütcke et al., 1993; Martinez et al., 1998).

Wie in Abbildung 1.3 zu sehen ist, befinden sich die rab Proteine auf verschiedenen Membrankompartimenten der Zelle, wo sie in enger Verbindung zu ihrer Lokalisation verschiedene Schritte des Vesikeltransportes regulieren. Im Folgenden soll die Lokalisation einiger rab Proteine, die in dieser Beziehung bisher am besten untersucht worden sind, kurz vorgestellt werden.

In der Exozytose spielen die Proteine rab1, rab2, rab6, rab11, rab10, rab12, rab30 und rab33b eine wichtige Rolle (Segev, 2001).

In den ersten Schritt der Exozytose vom ER zum Golgi-Apparat sind die Proteine rab1 und rab2 involviert. Das Protein rab1 ist Gegenstand dieser Arbeit und wird daher im Abschnitt 1.5 ausführlich beschrieben.

Das Protein rab2 ist im *intermediate compartment* und im *cis*-Golgi lokalisiert. Es ist wie das rab1 am anterograden Transport beteiligt. Für rab2 wird auch eine Beteiligung am retrograden Transport diskutiert (Chavrier et al., 1990; Tisdale et al., 1992 und 1999).

Das rab6 Protein ist dagegen auf den Membranen im *medialen* und *cis*-Golgi sowie im TGN (*trans-Golgi-network*) zu finden. Dort reguliert es zum einen den *intra*-Golgi-Transport sowie den retrograden Transport vom Golgi-Apparat zum ER (Goud et al., 1990; Martinez et al., 1994; Mayer et al., 1996; Martinez et al., 1997). Neue Studien zeigen, dass die Isoform rab6a' aber auch am Transport von den Endosomen zum TGN beteiligt zu sein scheint (Mallard et al., 2002).

Rab11 ist ein Protein, das an Transportschritten sowohl der Exo- als auch der Endozytose beteiligt ist. Zum einen ist es im TGN und auf *post*-Golgi-Vesikeln zu finden, wo es den Transport vom TGN zur Plasmamembran reguliert. Zum anderen ist es auf *recycling* Endosomen lokalisiert, über die es das Recycling von Proteinen reguliert (Ullrich et al., 1996; Chen et al., 1998; Roosterman et al., 2003).

Das rab33b Protein ist Golgi-assoziiert und am *intra*-Golgi-Transport beteiligt (Zerial & McBride, 2001).

Weitere Golgi-assoziierte Proteine sind rab10, rab12 und rab30, deren Funktion bisher jedoch unbekannt ist (Chen et al., 1993; Olkkonen et al., 1993; de Leeuw et al., 1998; Segev, 2001).

In die Endozytose sind dagegen die Proteine rab4, rab5, rab7, rab9, rab15, rab18, rab22 und rab25 involviert (Segev, 2001). Auf die bekanntesten Proteine soll hier näher eingegangen werden.

Das rab5 Protein ist auf der Plasmamembran, auf *clathrin-coated* Vesikeln (CCV) und auf frühen Endosomen lokalisiert. Es ist zum einen an der homotypischen Fusion von frühen Endosomen und an der Fusion von CCVs mit frühen Endosomen beteiligt. Zum anderen reguliert es den Transport von der Plasmamembran zu den frühen Endosomen (Gorvel et al., 1991; Bucci et al., 1992; Martinez & Goud, 1998; Zerial & McBride, 2001; Vieira et al., 2003).

Das Protein rab4 ist neben rab5 ebenfalls auf den frühen Endosomen wie auch auf *recycling* Endosomen zu finden, auf denen auch das rab11 lokalisiert ist. Dort spielt es eine Rolle im Recycling und im Sortieren der frühen Endosomen (van der Sluijs et al., 1992; Mohrmann & van der Sluijs, 1999; Mohrmann et al., 2002). Alle drei rab Proteine sind hier auf den gleichen Zellorganellen lokalisiert, befinden sich jedoch auf separaten Membrandomänen (Sönnichsen et al., 2000; de Renzis et al., 2002).

Die Proteine rab7 und rab9 sind dagegen in die späten Schritte der Endozytose involviert.

Das rab7 ist auf den späten Endosomen und auf den Lysosomen lokalisiert. Es reguliert sowohl den Transport von den frühen zu den späten Endosomen als auch den Transport von den späten Endosomen zu den Lysosomen (Feng et al., 1995; Vitelli et al., 1997; Mohrmann & van der Sluijs, 1999; Cantalupo et al., 2001).

Auch rab9 ist auf den späten Endosomen, aber auch im TGN lokalisiert. Dieses Protein ist erforderlich für den Transport der Mannose-6-Rezeptoren von den Endosomen zum TGN (Riederer et al., 1994; Soldati et al., 1994; Diaz et al., 1997).

Es gibt auch rab Proteine, die eine spezielle Rolle zum Beispiel in der regulierten oder auch in der polarisierten Sekretion spielen. So ist das rab3a Protein mit seinen drei Isoformen rab3b, rab3c und rab3d, das früher als rab16 bezeichnet wurde, auf sekretorischen Granulae lokalisiert und vermittelt die Ca^{2+} -abhängige Exozytose (Fischer von Mollard et al., 1991 und 1994; Geppert et al., 1997; Zerial & McBride, 2001).

Das Protein rab8 hingegen übernimmt eine wichtige Funktion in der polarisierten Sekretion. Es ist im TGN, auf basolateralen *post*-Golgi-Vesikeln, *tight junction*-Regionen und auf der Plasmamembran epithelialer Zellen zu finden. Dort reguliert es den Transport vom TGN zur Plasmamembran (Peränen et al., 1996).

Die verschiedenen Lokalisationen und Funktionen der rab Proteine zeigen, dass diese kleinen GTPasen in der Regulation des Vesikeltransportes eine Schlüsselrolle einnehmen. Da dieser essentiell für die Zellen ist, konnten auch einige Krankheiten auf die Fehlfunktion der rab

Proteine zurückgeführt werden. Zum Beispiel reguliert das Protein rab27a den Melanosom-Transport und die Sekretion in zytotoxischen T-Lymphozyten. Mutationen in diesem Protein führen zum Griscelli-Syndrom (Ménasché et al., 2000; Stenmark & Olkkonen, 2001; Stinchcombe et al., 2001; Bahadoran et al., 2003; Ménasché et al., 2003).

Neue Studien haben gezeigt, dass Mutationen im Protein rab7 für das Nervenleiden *Charcot-Marie-Tooth* Typ 2B (CMT2B) verantwortlich sind (Verhoeven et al., 2003).

Andere genetische Krankheiten werden durch partielle Fehlfunktion vieler rab Proteine hervorgerufen, die auf Mutationen in generellen Regulatoren von rab zurückzuführen sind. Dazu gehört das REP-1 (*Chorodemia*), die Rab-Geranylgeranyltransferase II (*Hermansky-Pudlak* Syndrom) und das Protein GDI α (*X-linked mental retardation*) (Seabra et al., 1995 und 2002).

1.5 Die kleine GTPase rab1

Das Protein rab1 liegt in den Säugerzellen in zwei Isoformen vor: rab1a und rab1b. Diese beiden Isoformen weisen eine 92%ige Homologie zueinander auf (Touchot et al., 1987). Außerdem sind diese beiden Isoformen zu 75% (rab1a) bzw. 66% (rab1b) identisch mit dem in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* entdeckten Protein ypt1 (Touchot et al., 1987; Nuoffer et al., 1994; Segev, 2001). Die Proteine rab1 und ypt1 weisen damit die höchste Homologie aller rab Proteine auf und sind auch funktionell homolog (Segev, 2001). Es wurde gezeigt, dass rab1a in ypt1-defizienten Hefezellen das essentielle ypt1 Protein funktionell ersetzen kann (Haubruck et al., 1989). Daher werden rab1a und rab1b in den Säugerzellen als Gegenstück zum ypt1 Protein in Hefe betrachtet (Touchot et al., 1987; Tisdale et al., 1992; Nuoffer et al., 1994).

Das Protein rab1 wird ubiquitär exprimiert. Immunfluoreszenzstudien sowie subzelluläre Fraktionierungen zeigen, dass es an den Membranen des glatten ER und des *cis*-Golgi-Apparates lokalisiert ist (Saraste et al., 1995). Außerdem wurde es in kleinen Mengen auch am rauen ER, im Zytosol und in der Kernfraktion gefunden (Plutner et al., 1991).

In Säugerzellen ist das rab1 Protein in die ersten Schritte der Exozytose involviert. *In vitro* und *in vivo* Analysen haben gezeigt, dass rab1a und rab1b sowohl für den Proteintransport vom ER zum *cis*-Golgi als auch für den *intra*-Golgi-Transport (*cis-medial*) benötigt werden (Tisdale et al., 1992; Nuoffer et al., 1994; Martinez & Goud, 1998; Segev, 2001). Neben dem Vesikeltransport scheint rab1b auch eine Rolle in der von arf1-vermittelten Rekrutierung von COPI Vesikeln zu spielen. Wie das rab1b Protein jedoch in diesen Prozess involviert ist, konnte noch nicht geklärt werden (Alvarez et al., 2003).

1.6 Der GTPase-Zyklus

Die kleinen GTPasen der rab/ypt Familie spielen, wie bereits beschrieben, eine wichtige Rolle in der Regulation des Vesikeltransportes. Trotz vielfältiger Studien ist der genaue molekulare Mechanismus noch nicht geklärt.

Es ist jedoch bekannt, dass es sich um molekulare Schalter in der Zelle handelt, die einen inaktiven, GDP-gebundenen oder einen aktiven, GTP-gebundenen Zustand einnehmen können. Dieser Wechsel zwischen inaktiv und aktiv geht außerdem mit einem Membranassoziations-Dissoziationszyklus einher (Fischer von Mollard et al., 1991 und 1994). Außerdem ist bekannt, dass die rab Proteine, während sie diesen komplexen GTP-Zyklus durchlaufen, mit zahlreichen Proteinen interagieren.

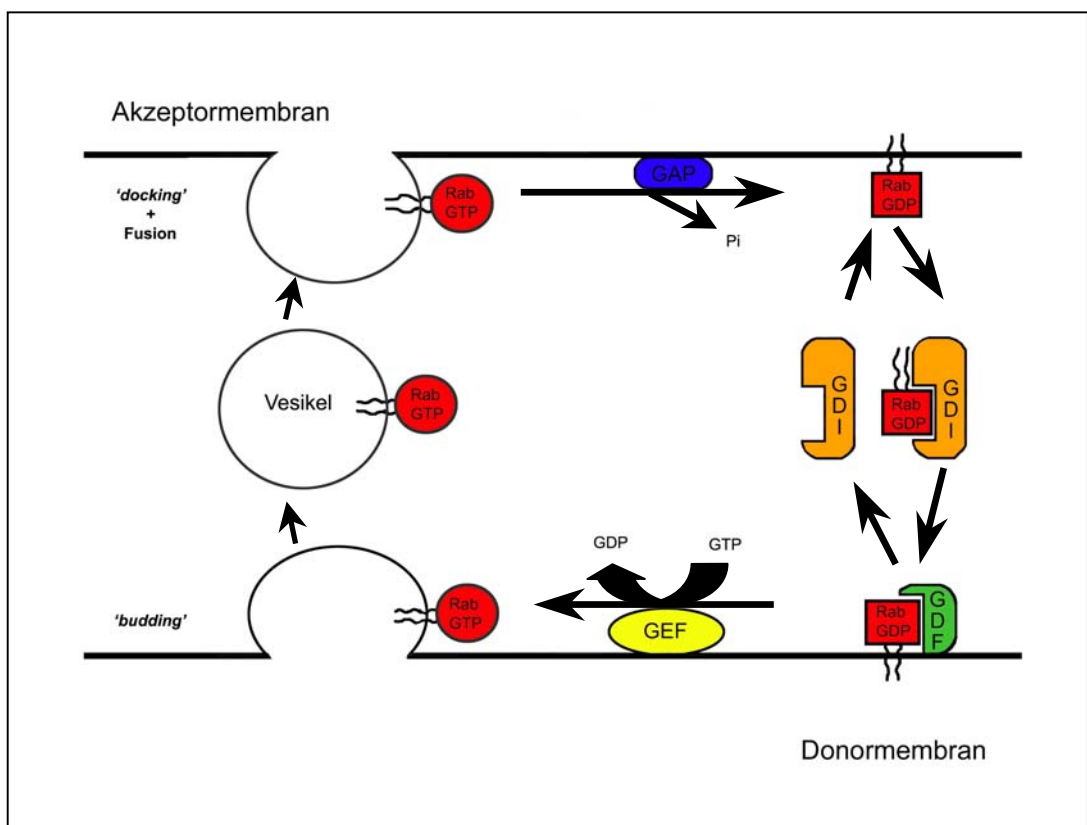


Abb. 1.4: Modell des rab-Zyklus

Die Abbildung zeigt eine stark vereinfachte schematische Darstellung des rab-Zyklus nach den zur Zeit gültigen Theorien. Das aktive, GTP-gebundene rab Protein ist über eine Isoprenylierung in die Donormembran integriert und wird mit dem Vesikel abgeschnürt (*budding*). An der Akzeptormembran findet die Fusion des Vesikels mit der Membran statt. Es wird vermutet, dass Effektor Komplexe an der Akzeptormembran für das gezielte *tethering* verantwortlich sind. Anschließend erhöht ein GAP (*guanosine activating protein*) die intrinsische Aktivität der GTPase, so dass das GTP zu GDP hydrolysiert wird. Das nun GDP-gebundene, inaktive rab Protein wird von einem GDI (*guanosine dissociation inhibitor*) Protein aus der Membran gelöst. Das GDI stabilisiert das rab Protein im Zytosol und bringt es erneut zur Donormembran. Es wird vermutet, dass ein GDF (*GDI dissociation factor*) das rab Protein vom GDI löst und zur Ziel-/ Donormembran bringt. Dort bewirkt ein GEF (*guanosine exchange factor*) den Austausch des GDP durch GTP. Dadurch wird das rab Protein aktiviert und der Zyklus beginnt erneut.

Für die korrekte Funktion der rab Proteine ist zunächst die posttranslationale Prenylierung essentiell. Dazu werden sie, wie in Abschnitt 1.3 beschrieben, an das REP (*rab escort protein*) gebunden und durch die GGTase II (Geranylgeranyl-Transferase II) modifiziert (Seabra, 1996). Diese Reaktion ist nukleotidspezifisch, da nur die inaktive, GDP-gebundene Form der rab GTPasen modifiziert wird. Bisher konnten in Säugerzellen zwei Isoformen des REPs identifiziert werden: das 72 kDa große REP1 und das 74 kDa große REP2 (Cremers et al., 1994; Anant et al., 1998; Pylypenko et al., 2003).

Nach der Prenylierung wird das modifizierte rab Protein zu seiner Zielmembran geleitet. Dabei ist noch nicht geklärt, ob dieses im Komplex mit dem REP geschieht, oder ob das rab Protein von einem GDI (*guanosine dissociation inhibitor*) übernommen und zum Zielkompartiment geleitet wird (Pfeffer et al., 1995; Wilson et al., 1996a; Overmeyer et al., 2001). Nach der Membrananbindung startet der eigentliche Zyklus, der in der Abbildung 1.4 in einem stark vereinfachten Modell dargestellt ist.

Zunächst erfolgt die Aktivierung der kleinen GTPase. Dazu wird das gebundene GDP des Proteins von einem sogenannten GEF (*guanosine exchange factor*) gegen ein GTP ausgetauscht (Ullrich et al., 1994). Der molekulare Mechanismus dieser Reaktion ist unklar und bisher sind nur wenige GEFs bekannt. Als erste wurden das Dss4 (*dominant suppressor of Sec4*) in Hefe und in Säugerzellen das homologe Mss4 (*multicopy suppressor of Sec4p*) isoliert und als GEF charakterisiert (Burton et al., 1993; Moya et al., 1993). Untersuchungen zeigten, dass es sich bei dem Mss4 um ein hydrophiles 14 kDa großes Protein handelt, das im Gegensatz zu generellen Regulatoren der Zelle wie REP oder GDI nur mit ypt1, Sec4, rab1, rab3, rab8 und rab10 interagiert (Burton et al., 1994 a und 1994 b; Wada et al., 1997; Weide et al., 1999). Im Vergleich zu GEFs anderer GTPasen weisen Dss4 und Mss4 auch eine sehr geringe Austauschrate auf. Daher wird vermutet, dass es sich hierbei um molekulare Chaperone handelt, die die nukleotidfreie Konformation der Proteine stabilisieren (Feig, 1994; Nuoffer et al., 1997; Esters et al., 2001).

Bisher konnten drei GEFs für rab Proteine isoliert und charakterisiert werden. Das Rab3 GEF ist spezifisch für die Mitglieder der rab3 Subfamilie, das Rabex-5 ist spezifisch für die Mitglieder der rab5 Subfamilie und Sec2 ist ein GEF für Sec4 (Horiuchi et al., 1997; Wada et al., 1997; Walch-Solimena et al., 1997). Für rab1 konnte bisher außer Mss4 kein Protein mit einer GEF-Aktivität gefunden werden.

Nachdem das rab Protein GTP-gebunden vorliegt, findet eine Integration des rab Proteins in die Membran statt. In dieser Konformation interagiert das rab Protein mit spezifischen Effektoren. Diese Bindung ist der Schlüssel für die Funktion der rab GTPasen. Die rab Effektoren bilden

eine sehr heterogene Proteingruppe (Stenmark & Olkkonen, 2001). Für rab1 sind bisher wenige potentielle Effektoren charakterisiert worden, auf die in Abschnitt 1.7 näher eingegangen wird.

Nach der Fusion des Vesikels mit der Akzeptormembran erfolgt die Inaktivierung des rab Proteins. Dieses geschieht durch einen GAP-Faktor (*GTPase activating protein*), ein Gegenspieler des GEF-Proteins. Beide Regulatoren zusammen ermöglichen den kontrollierten Übergang zwischen den aktiven und inaktiven Konformationen der GTPasen. Das GAP erhöht die intrinsische GTPase-Aktivität der rab Proteine und ermöglicht so die Hydrolyse von GTP zu GDP. Für Säugerzellen konnten bisher drei GAPs identifiziert werden.

Für rab3a konnte das ubiquitär exprimierte rab3 GAP isoliert werden, das aus einer katalytischen und einer nicht katalytischen Untereinheit besteht und spezifisch mit den Proteinen rab3a-d interagiert (Fukui et al., 1997; Nagano et al., 1998). Das GAPCenA wurde als spezifisches rab6 GAP identifiziert, das ebenfalls ubiquitär exprimiert wird. Es liegt hauptsächlich zytosolisch vor, aber eine geringe Menge ist mit dem Centrosom assoziiert (Cuif et al., 1999). Auch für rab5 wurde ein GAP-Faktor beschrieben: Tuberin. Dieses Protein zeigt nur bei rab5 ein GTPase Aktivität (Xiao et al., 1997). Interessant ist, dass die bisher identifizierten GAP-Faktoren der Hefe, die Gyp Proteine, eine signifikante Homologie zu GAPCenA aufweisen, jedoch keine Homologie zu rab3GAP und Tuberin (Segev, 2001; Takai et al., 2001).

Durch die Hydrolyse liegt das rab Protein GDP-gebunden vor und ist schwächer membranassoziiert. Daher kann es durch einen weiteren Regulator, den GDI (*guanosine dissociation inhibitor*), von der Membran gelöst werden, so dass das an GDI-gebundene rab Protein zytosolisch vorliegt. Für GDI sind bisher drei Isoformen beschrieben worden: GDI α , GDI β und GDI γ . Aufgrund von *Southern Blot*-Analysen wird jedoch vermutet, dass in Säugerzellen fünf rab GDIs existieren (Nishimura et al., 1994; Araki et al., 1995; Janoueix-Lerosey et al., 1995; Takai et al., 2001). Die Proteine GDI α und GDI β wurden bisher am Besten untersucht. GDI β wird ubiquitär exprimiert, wohingegen GDI α in neuronalen Zellen exprimiert wird (Nishimura et al., 1994). Trotz dieser unterschiedlichen Verteilung weisen beide Proteine die gleichen biochemischen Eigenschaften auf und binden nur die prenylierte, GDP-gebundene Form des rab Proteins. Außerdem inhibieren sie die basale und GEF-stimulierte Dissoziation von GDP. Auf diese Weise können sie die Aktivität der zytosolischen rab Proteine herunter regulieren. Die GDIs sind in der Lage, das GDP-gebundene rab Protein nach der GTP-Hydrolyse von der Akzeptormembran zu lösen und sind somit für das Recycling der rab Proteine verantwortlich. Außerdem verhindern sie die Bindung des GDP-gebundenen Proteins an die Membran und halten das rab Protein im Zytosol. Zusätzlich spielen sie eine wichtige Rolle, indem sie die GDP-gebundenen rab Proteine zu ihrer jeweiligen Zielmembran bringen (Soldati et

al., 1993; Ullrich et al., 1993; Elazar et al., 1994; Soldati et al., 1994; Pfeffer et al., 1995; Takai et al., 2001). Die GDI Proteine weisen eine hohe strukturelle Ähnlichkeit zum REP auf (Schalk et al., 1996). Wie dieses kann das GDI Protein GDP-gebundene rab Proteine zu deren spezifischen Vesikelmembranen bringen, wobei das GDI jedoch nur prenylierte rab Proteine bindet (Ullrich et al., 1994). Da GDI in einer Zelle in größeren Mengen als das REP vorliegt, wird vermutet, dass das REP für die erste Membrananbindung verantwortlich ist, während das GDI Protein für die wiederholte Anbindung, das sogenannte Recycling der rab Proteine gebraucht wird (Soldati et al., 1993; Ullrich et al., 1993).

Für die reversible Membranlokalisierung der rab Proteine scheint jedoch neben dem GDI noch ein zweiter Faktor wichtig zu sein, der sogenannte GDF (*GDI dissociation factor*). Bei diesem GDF soll es sich um ein Membranprotein handeln, das bevorzugt mit dem GDP-gebundenen rab-GDI-Komplex interagiert und das rab Protein vom GDI lösen kann, um es zur Zielmembran zu rekrutieren. Dieser Faktor wird aus zwei Gründen für die Membranlokalisierung des rab Proteins benötigt. Erstens muss das GDI vom rab Protein dissoziieren, damit das rab Protein das Zytosol verlassen kann und seine funktionelle Assoziation mit der Membran wieder aufnehmen kann. Zweitens werden spezifische Faktoren für die Lokalisation der rab Proteine an ihren spezifischen Membranen gebraucht. Bisher wurde ein membranassoziiertes Protein mit dieser GDF-Aktivität für die endosomalen Proteine rab5, rab7 und rab9 identifiziert. Doch es bedarf noch weiterer Studien, um weitere GDF Proteine zu isolieren und deren Bedeutung zu klären (Dirac-Svejstrup et al., 1997; Segev, 2001; Pfeffer, 2003).

Nach der erneuten Anbindung des rab Proteins an die Membran beginnt der Zyklus mit der Aktivierung durch den GEF erneut.

Der molekulare Schaltermechanismus der rab GTPasen ist bis heute nicht umfassend geklärt. Es zeigt sich jedoch, dass er stark abhängig von vielen Faktoren ist, die regulierend eingreifen. Die bisher bekannten Faktoren lassen sich in Gruppen unterteilen. Es gibt Regulator-Proteine wie REP und GDI, die mit allen rab Proteinen in der GDP-gebundenen Konformation interagieren. Außerdem konnten Proteine identifiziert werden, die nur mit bestimmten rab Subgruppen interagieren, wie zum Beispiel das Mss4. Andere Proteine wie die Effektoren des Proteins rab5, rabaptin5 und EEA1 (*early endosome antigen*), interagieren spezifisch mit einzelnen rab Proteinen.

1.7 Interaktionspartner der kleinen GTPase rab1

Für rab1 wurden bisher nur wenige potentielle Effektoren charakterisiert. Im Folgenden soll deren Lokalisation und Funktion, soweit diese bekannt ist, erläutert werden.

Das Protein p115 wurde als Protein identifiziert, das im *intra*-Golgi-Transport in der Fusion von transzytotischen Vesikeln mit der Plasmamembran eine Rolle spielt (Waters et al., 1992; Barroso et al., 1995). Es ist mit *cis*-Golgi-Elementen und dem *intermediate compartment* assoziiert (Linstedt et al., 2000). Bei p115 handelt es sich um ein myosinähnliches Homodimer, das aus zwei globulären Köpfen und einem langen helikalen Schwanz besteht (Sapperstein et al., 1995; Yamakawa et al., 1996). Das Protein ist in den ER-Golgi-Transport, in den *intra*-Golgi-Transport, in die Bindung von transzytotischen Vesikeln an die Akzeptormembran, in das Stapeln der Golgi-Zisternen sowie die Bindung von COPI Vesikeln an Golgi-Membranen beteiligt (Waters et al., 1992; Barroso et al., 1995; Sönnichsen et al., 1998; Alvarez et al., 1999; Shorter & Warren, 1999). Das homologe Protein Usa1p in *Saccharomyces cerevisiae* spielt im ER-Golgi-Transport eine Rolle (Nakajima et al., 1991). Für p115 wurden zunächst Interaktionen mit den Golgi-Proteinen GM130 und Giantin nachgewiesen. Beide Proteine binden an den C-Terminus des p115 (Nelson et al., 1998; Linstedt et al., 2000). GM130 ist im *cis*-Golgi lokalisiert. Dieses Protein ist auch ein Interaktionspartner von rab1 und wird daher im Anschluss an p115 beschrieben. Bei Giantin handelt es sich um ein etwa 400 kDa großes Protein, das eine *coiled-coil* Region besitzt. Es ist C-terminal in der Membran verankert und auf Golgi-Membranen sowie COPI Vesikeln lokalisiert (Linstedt & Hauri, 1993; Linstedt et al., 1995; Sönnichsen et al., 1998).

In vitro konkurrieren beide Proteine um die Bindung an p115 (Linstedt et al., 2000). Es wird vermutet, dass p115 das *tethering* von COPI Vesikeln vermittelt, indem es das Giantin auf den Vesikeln und das GM130 im Golgi bindet (Sönnichsen et al., 1998).

Allan et al. konnten zeigen, dass p115 auch mit der GTP-gebundenen Form des rab1 interagiert. Das rab1 rekrutiert das p115 während des *buddings* vom ER an COPII Vesikel, wo es mit den SNARE Proteinen Syntaxin5, Sly1, Membrin und Rbet1 interagiert und einen *cis*-SNARE-Komplex bildet. Dadurch wird das *budding* von COPII Vesikeln vom ER für die Fusion mit den Golgi-Membranen programmiert. Dieses lässt vermuten, dass die rab1 abhängige Rekrutierung von p115 den initialen Schritt an der Donormembran darstellt (Allan et al., 2000). Außerdem wird vermutet, dass p115 unabhängig von seiner Interaktion mit GM130 und Giantin eine Rolle in der Erhaltung des Golgi-Apparates spielt (Puthenveedu & Linstedt, 2001).

Wie bereits erwähnt ist GM130 auch ein Interaktionspartner von rab1, wobei diese Interaktion unabhängig von p115 ist (Moyer et al., 2001; Weide et al., 2001). Bei GM130 handelt es sich um

ein 130 kDa großes *cis*-Golgi Matrix Protein mit sechs *coiled-coil* Regionen, das ursprünglich in der Ratte gefunden wurde (Nakamura et al., 1995). Die Bindung an den *cis*-Golgi wird durch das Protein GRASP65 (*Golgi reassembly and stacking protein of 65*) vermittelt. Dieses ist durch N-Myristylierung in der Lage, mit den Golgi-Membranen zu assoziieren (Barr et al., 1997). GM130 ist jedoch nicht spezifisch für rab1, da es auch mit rab2 und rab33b interagiert (Short & Barr, 2003). Es wird vermutet, dass die Interaktion von rab1 mit dem GM130 Komplex das *tethering* der COPII Vesikel am *cis*-Golgi reguliert (Moyer et al., 2001).

Ein weiterer spezifischer Interaktionspartner für rab1 ist das Golgin-84 (Diao et al., 2003). Hierbei handelt es sich um ein Mitglied der Golgin Familie, wie auch p115 und GM130. Es wurde in einem *yeast two-hybrid screen* zum ersten Mal als Interaktionspartner von OCRL-1 (*OculoCerebroRenal syndrome of Lowe*), einer Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphat 5-phosphatase, identifiziert (Bascom et al., 1999). Golgin-84 ist strukturell mit Giantin verwandt und besitzt *coiled-coil* Regionen (Satoh et al., 2003). Dieses integrale Membranprotein wird ubiquitär exprimiert und ist am Golgi-Apparat lokalisiert (Bascom et al., 1999). Es bindet die aktive Form des rab1 Proteins, aber keine *cis*-Golgi Matrix Proteine (Diao et al., 2003).

Die Funktion des Golgin-84 konnte bisher nicht genau geklärt werden. Es scheint jedoch in der Aufrechterhaltung der Golgi-Struktur eine wichtige Rolle zu spielen (Diao et al., 2003; Satoh et al., 2003).

Seit kurzem ist bekannt, dass auch MICAL-1 ein Interaktionspartner von rab1 ist (Weide et al., 2003). Dabei handelt es sich um ein 118 kDa großes Protein, das mit CasL, einem Mitglied der p130^{cas} Familie, Vimentin, einer Komponente des Intermediärfilamentes, sowie PlexinA in neuronalen Zellen interagiert (Suzuki et al., 2002; Terman et al., 2002).

MICAL-1 interagiert, soweit bisher bekannt, spezifisch mit rab1 in einer GTP-gebundenen Konformation. Auch das MICAL weist wie zuvor GM130 und Golgin-84 *coiled-coil* Regionen auf. Bisher ist die Funktion dieser Interaktion von rab1 und MICAL-1 nicht bekannt. Es könnte sich um einen Interaktionspartner handeln, der möglicherweise eine Verbindung zwischen dem rab1 Protein und dem Zytoskelett herstellt (Weide et al., 2003).

Ein Interaktionspartner des rab Proteins stellt eine interessante Ausnahme dar, da es sich mit keinem der bisherigen Proteinen vergleichen lässt: PRA1. Da die Interaktion mit diesem Protein in der vorliegenden Arbeit untersucht wurde, wird es im nächsten Abschnitt ausführlich beschrieben.

1.8 Interaktionspartner PRA1

PRA1 (*prenylated rab acceptor*) wurde von Martincic et al. 1997 in einem *yeast two-hybrid screen* als Interaktionspartner von rab3a und VAMP2 (Synaptobrevin II) in der Ratte gefunden. Es handelt sich um ein 20,6 kDa großes Protein, das ubiquitär exprimiert wird. Es besitzt zwei hydrophobe Domänen und weist eine geringe Ähnlichkeit zum Protein Yip3p in Hefe auf (Martincic et al., 1997). Neben PRA1 konnte eine weitere Isoform identifiziert werden: PRA2. Die beiden Proteine weisen keine große Homologie zueinander auf und unterscheiden sich in ihrer zellulären Lokalisation. Während das PRA1 in Immunfluoreszenzanalysen mit dem Golgi-Marker Mannosidase II kolokalisiert ist, findet sich das PRA2 kolokalisiert mit dem ER-Marker Calnexin (Abdul-Ghani et al., 2001).

PRA1 interagiert im Gegensatz zu spezifischen Interaktionspartnern mit mehreren rab Proteinen. Bisher konnten Interaktionen mit den Proteinen rab1, rab3a, rab4b, rab5a und rab5c nachgewiesen werden. Eine leichte Interaktion zeigt dieses Protein auch mit rab4a, rab6, rab7, rab17 und rab22 (Martincic et al., 1997; Bucci et al., 1999). Auch für das Protein Yip3p in Hefe konnte eine Interaktion mit vielen ypt Proteinen und sogar mit rab1 und rab5 gezeigt werden (Calero & Collins, 2002).

Welche Strukturen des rab Proteins für die Bindung mit PRA1 essentiell sind, ist bisher nicht bekannt. Unerlässlich ist auf jeden Fall die Prenylierung des rab Proteins.

Durch den Einsatz verschiedener Mutanten konnte gezeigt werden, dass PRA1 direkt in den anterograden Transport am Golgi involviert ist. Es scheint eine wichtige Rolle bei der Vesikelbildung am Golgi-Komplex einzunehmen (Gougeon et al., 2002). Auch könnte es aufgrund seiner Interaktion mit VAMP2 in die Vesikelanbindung und Fusion eingebunden sein (Martincic et al., 1997).

Interessant ist, dass PRA1 neben verschiedenen rab Proteinen auch mit Piccolo, GDI sowie verschiedenen Virusproteinen interagiert.

Piccolo ist ein präsynaptisches Protein der zytoskelettären Matrix. In Nervenenden von hippocampalen, primären Neuronen konnte für dieses Protein eine Kolokalisation mit PRA1 gezeigt werden. Weitere Studien legen die Vermutung nahe, dass PRA1 eine Komponente von synaptischen Vesikeln darstellt (Fenster et al., 2000).

Ebenso wurde für PRA1 eine schwache Interaktion mit GDI beschrieben. Experimente zeigen, dass PRA1 die Ablösung des membrangebundenen rab Proteins durch GDI hemmen kann. Es könnte sein, dass die Membran-Lokalisation der rab GTPasen von einer gegensätzlichen Handlung der Proteine PRA1 und GDI abhängt (Hutt et al., 2000).

Für PRA1 konnte außerdem eine Interaktion mit dem Epstein-Barr Virus *BHRF1* und mit dem Hüll-Glykoprotein gp42 verschiedener Lentiviren, darunter HIV (*human immunodeficiency virus*), SIV (*simian immunodeficiency virus*) und FIV (*feline immunodeficiency virus*) nachgewiesen werden. Es wird vermutet, dass PRA1 eine Rolle bei der Replikation dieser Viren spielt (Li et al., 2001; Evans et al., 2002). Neu ist die Interaktion von PRA1 mit dem Protein Vp4 des Rotavirus. Da diese Interaktion zusammen mit dem endosomalen Protein rab5 nachgewiesen wurde, könnten diese beiden Proteine vielleicht eine Rolle in der Lokalisation und im Transport von VP4 in der infizierten Zelle spielen (Enouf et al., 2003).

2. Zielsetzung

In der vorliegenden Arbeit standen Untersuchungen zur intrazellulären Lokalisation und zur Protein/Proteininteraktion der kleinen GTPase rab1b mit PRA1 im Vordergrund. Wie beschrieben, zeichnen sich die rab Proteine durch eine komplexe Struktur aus, die in einem engen Zusammenhang mit der Lokalisation und auch mit der Protein/Proteininteraktion der rab Proteine steht. Für die Analyse der Struktur des Proteins rab1b sollten zunächst verschiedene Deletionsmutanten und Chimären dieses Proteins hergestellt werden. Mit Hilfe von Zellfraktionierungstechniken und Immunfluoreszenzanalysen sollte anschließend untersucht werden, welche Struktur motive des rab1b Proteins für die korrekte intrazelluläre Lokalisation essentiell sind.

In Bezug auf die Protein/Proteininteraktion sollte am Beispiel des Interaktionspartners PRA1 geklärt werden, welche Strukturen des Proteins rab1b die Bindung des Interaktionspartners beeinflussen. Durch Bindungsanalysen mit den obengenannten Mutanten und PRA1 sollte untersucht werden, ob das Fehlen einzelner Strukturbereiche des rab1b Proteins dessen Bindung an das Protein PRA1 beeinträchtigt. Dieses sollte mit Hilfe des *yeast two-hybrid*-Systems *in vivo* sowie biochemisch mit *GST-pulldowns in vitro* geprüft werden.

Zudem sollte der Interaktionspartner PRA1 näher charakterisiert werden, da sowohl die Rab- als auch die Nukleotid-Spezifität sowie die Membranassoziation des Proteins PRA1 nicht einwandfrei geklärt sind. In Bindungsanalysen mit verschiedenen rab Proteinen und inaktiven bzw. aktiven Mutanten sollte ermittelt werden, ob es sich bei PRA1 um einen spezifischen Interaktionspartner für rab Proteine handelt, der, wie andere Effektoren, nur an die aktive Konformation dieses Proteins bindet.

3. Material

3.1 Chemikalien

Chemikalien	Hersteller bzw. Vertrieb
ϵ -Amino-n-capronsäure	SIGMA, Sigma-Aldrich Chemie; Taufkirchen
β -Mercaptoethanol	SERVA Elektrophoresis; Heidelberg
3-amino-1,2,3-triazol (3AT)	SIGMA, Sigma-Aldrich Chemie; Taufkirchen
5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galaktopyranosid (X-Gal)	ROTH; Karlsruhe
Aceton	ROTH; Karlsruhe
Agar (Select)	INVITROGEN; Karlsruhe
Agarose	METAPHOR, Biozym Diagnostics; Hessisch Oldendorf
Ammoniumpersulfat (APS)	ROTH; Karlsruhe
Bromphenolblau	SERVA Elektrophoresis; Heidelberg
Calciumchlorid (CaCl ₂)	ROTH; Karlsruhe
Complete™ (EDTA-frei)	ROCHE Diagnostics; Mannheim
Dextrose	ROTH; Karlsruhe
Dithiothreitol (DTT)	ROCHE Diagnostics; Mannheim
Essigsäure	ROTH; Karlsruhe
Ethanol	ROTH; Karlsruhe
Fötale Kälberserum (FKS)	PAN SYSTEMS; Nürnberg
Glukose	ROTH; Karlsruhe
Glutamin	BIOCHROM KG; Berlin
Glycin	ROTH; Karlsruhe
Glyzerin	ROTH; Karlsruhe
Hefeextrakt (Select)	INVITROGEN; Karlsruhe
HEPES	ROTH; Karlsruhe
Isopropanol	ROTH; Karlsruhe
L-Adeninhemisulfat	SIGMA, Sigma-Aldrich Chemie; Taufkirchen
L-Arginin HCl	SIGMA, Sigma-Aldrich Chemie; Taufkirchen
L-Histidin HCl	SIGMA, Sigma-Aldrich Chemie; Taufkirchen

Chemikalien	Hersteller bzw. Vertrieb
L-Isoleucin	SIGMA, Sigma-Aldrich Chemie; Taufkirchen
Lithiumacetat	ROTH; Karlsruhe
L-Lysin HCl	SIGMA, Sigma-Aldrich Chemie; Taufkirchen
L-Methionin	SIGMA, Sigma-Aldrich Chemie; Taufkirchen
L-Phenylalanin	SIGMA, Sigma-Aldrich Chemie; Taufkirchen
L-Threonin	SIGMA, Sigma-Aldrich Chemie; Taufkirchen
L-Tyrosin	SIGMA, Sigma-Aldrich Chemie; Taufkirchen
L-Uracil	SIGMA, Sigma-Aldrich Chemie; Taufkirchen
L-Valin 1	SIGMA, Sigma-Aldrich Chemie; Taufkirchen
Magermilchpulver	DE-VAU-GE Gesundkostwerk; Lüneburg
Methanol	ROTH; Karlsruhe
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	SERVA Elektrophoresis; Heidelberg
Natriumchlorid (NaCl)	ROTH; Karlsruhe
Natriumhydroxid (NaOH)	ROTH; Karlsruhe
Paraformaldehyd	SERVA Elektrophoresis; Heidelberg
Polyethylenglycol (PEG) 4000	ROTH; Karlsruhe
Pepton (Select)	INVITROGEN; Karlsruhe
Rotiphorese Gel 30%	ROTH; Karlsruhe
Salzsäure (HCl)	ROTH; Karlsruhe
SD-Hefe-Basis-Medium	BD Biosciences DIFCO™; Hamburg
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	ROTH; Karlsruhe
Trasylol	BAYER; Leverkusen
Tris-hydroxymethyl-aminohexan (Tris)	ROTH; Karlsruhe
Triton X-100	ROTH; Karlsruhe
Triton X-114	SIGMA, Sigma-Aldrich; Taufkirchen

Die hier nicht aufgeführten Chemikalien wurden als analysenreine Substanzen bei der Firma VWR International GmbH; Darmstadt bezogen.

3.2 Antibiotika

Bei Bakterien dienen Antibiotikaresistenzen als Selektionsmarker. Je nach Plasmid werden verschiedene Antibiotika eingesetzt.

Ampicillin (100 mg/ml)

ROTH; Karlsruhe

Kanamycin (50 mg/ml)

SIGMA, Sigma-Aldrich; Taufkirchen

3.3 Reagenziensysteme und *Kits*

Zur Vereinfachung und Beschleunigung einiger Versuche wurden im Rahmen dieser Arbeit folgende Kits eingesetzt:

Plasmid-Maxipräparation

- QIAGEN[®] Plasmid Maxi Kit (25)
(QIAGEN GmbH; Hilden)

Plasmid-Minipräparation

- QIAprep[®] Spin, Miniprep Kit (50)
(QIAGEN GmbH; Hilden)
- MiniPrep Express[™] Matrix Bio 101
(DIANOVA; Hamburg)

Gelextraktion

- QIAquick[®] Gel Extraction Kit (50)
(QIAGEN GmbH; Hilden)

PCR-Produkt-Aufreinigung

- Nucleotide Removal Kit
(QIAGEN GmbH; Hilden)

Transiente Transfektion

- PolyFect Transfection Reagents
(QIAGEN GmbH; Hilden)

Western Blot-Entwicklung

- SuperSignal[®] West Pico Chemiluminescent Substrat
(PERBIO Science; Bonn
Vertrieb: KMF; Sankt Augustin)
- Uptilight HRP Blot Substrat
(UPTIMA; Vertrieb: KMF; Sankt Augustin)

Sequenzierung

- Thermosequenasen[™] II Dye Terminator Cycle Sequencing Kit
(AMERSHAM Biosciences Europe GmbH; Freiburg)

3.4 Stammlösungen

Es wurden im Rahmen dieser Arbeit mehrfach konzentrierte Stammlösungen angesetzt, die gegebenenfalls autoklaviert oder sterilfiltriert werden.

<u>Konzentration</u> <u>(Molarität)</u>	<u>Stammlösung</u>
0,05 M	Ammoniumchlorid (NH ₄ Cl)
0,1 M	Calciumchlorid (CaCl ₂)
2 M	Calciumchlorid (CaCl ₂)
1 M	Dithiothreitol (DTT)
0,5 M	Ethylendiamintetraacetat (EDTA)
0,2 M	Hepes/KOH pH 7,4
1 M	Kaliumchlorid (KCl)
1 M	Lithiumacetat
1 M	Magnesiumchlorid (MgCl ₂)
3 M	Natriumacetat pH 4,6
5 M	Natriumchlorid (NaCl)
1 M	Sucrose
1 M	Tris/HCl pH 6,8
1 M	Tris/HCl pH 7,4
1 M	Tris/HCl pH 8,8

<u>Konzentration</u> <u>(proz. Anteil)</u>	<u>Stammlösung</u>
40% (w/v)	Glukose
50% (v/v)	Glyzerin
50% (w/v)	PEG 4000
10% (w/v)	Sodiumdodecylsulfat (SDS)
50% (w/v)	Sucrose
20% (v/v)	Triton X-100

<u>mehrfach konzentrierte</u> <u>Stammlösungen</u>	<u>Zusammensetzung</u>
2x HBS (pH 7,05)	280 mM NaCl 10 mM KCl 1,5 mM Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O 12 mM Dextrose 50 mM Hepes einstellen des pH auf 7,05

10x PBS (pH 7,4)	1370 mM NaCl 27 mM KCl 100 mM Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O 20 mM KH ₂ PO ₄ einstellen des pH auf 7,4
0,1x TE (pH 8,0)	1 mM Tris/HCl pH 8,0 0,1 mM EDTA
50x TAE (pH 8,0)	2000 mM Trisacetat 50 mM EDTA
X-Gal-Stammlösung	20 mg/ml 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galaktopyranosid in Dimethylformamid (DMF) lösen und bei -20°C dunkel lagern
Z-Puffer (pH 7,0)	60 mM Na ₂ HPO ₄ ·7H ₂ O 40 mM NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O 10 mM KCl 1 mM MgSO ₄ ·7H ₂ O einstellen des pH auf 7,0

3.5 Kulturmedien

3.5.1 Kulturmedien für Bakterien

Im Allgemeinen wird zur Anzucht und Kultivierung des Bakterienstammes DH5α das Vollmedium 2YT verwendet.

2 YT-Medium / Agar

- 16 g Pepton (tryptisch verdaut)
- 10 g Hefeextrakt
- 5 g NaCl
- ad 1 Liter mit A. bidest
- ggf. 15 g Agar
- autoklavieren

Als Selektionsmarker werden dem Medium Antibiotika zugefügt, die je nach Plasmid variieren. Häufig verwendet wird zum Beispiel Ampicillin, das in einer Endkonzentration von 100 µg/ml

eingesetzt wird. Dieses geschieht aufgrund der Hitzeinstabilität erst, wenn das Medium nach dem Autoklavieren auf eine Temperatur von ca. 50 °C abgekühlt ist.

Der Bakterienstamm BL21 wird zur Expression von GST-Fusionsproteinen in dem Mangelmedium LB (Luria Broth) angezogen.

LB-Medium / Agar

- 10 g Pepton (tryptisch verdaut)
- 5 g Hefeextrakt
- 10 g NaCl
- ad 1 Liter mit A.bidest
- ggf. 15 g Agar
- autoklavieren

Auch diesem Medium wird gegebenenfalls das entsprechende Antibiotikum zugesetzt.

3.5.2 Kulturmedien für Hefen

Für die Anzucht und Kultivierung des in dieser Arbeit verwendeten Hefestammes Y190 werden zwei Arten von Medium benötigt. Zum einen wird ein Vollmedium verwendet, das ein optimales Wachstum der Hefen ermöglicht, zum anderen wird zur Verifizierung von Auxotrophiemarkern ein Selektionsmedium eingesetzt.

YPD-Medium / Agar (Vollmedium)

- 20 g Pepton (tryptisch verdaut)
- 10 g Hefeextrakt
- ad 950 ml mit A. bidest
- ggf. 20 g Agar
- pH-Wert mit HCl auf 5,8 einstellen
- autoklavieren

Nach dem Autoklavieren werden dem Medium 50 ml einer sterilen 40 %igen Glukose-Stammlösung zugesetzt. Diese Zugabe der Glukose sollte erst unmittelbar vor Gebrauch des Mediums erfolgen, um das Risiko einer Kontamination gering zu halten.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Hefezellen mit verschiedenen Plasmiden transformiert. Zur Überprüfung der Transformation und Selektion werden Auxotrophiemarker eingesetzt, die eine individuelle Zusammensetzung des verwendeten Selektionsmediums erfordern.

SD-Medium / Agar (Selektionsmedium)

- 6,7 g DIFCO (Hefe-Basis-Medium)
- ad 850 ml mit A. bidest
- ggf. 20 g Agar
- pH-Wert mit HCl auf 5,8 einstellen
- autoklavieren

Nach dem Autoklavieren wird dieses Hefe-Basis-Medium individuell ergänzt. Grundsätzlich werden 50 ml 40%ige Glukose-Stammlösung und 100 ml einer 10x *drop-out*-Stammlösung zugefügt, die mit Ausnahme von Histidin, Tryptophan und Leucin alle benötigten Aminosäuren enthält.

Dieses Medium wird als SD-Leu/-Trp/-His bezeichnet.

10x *drop-out*-Stammlösung

- | | |
|----------------------|-----------|
| • L-Isoleucin | 300 mg/l |
| • L-Valin | 500 mg/l |
| • L-Adeninhemisulfat | 200 mg/l |
| • L-Arginin HCl | 200 mg/l |
| • L-Lysin HCl | 300 mg/l |
| • L-Methionin | 200 mg/l |
| • L-Phenylalanin | 500 mg/l |
| • L-Threonin | 2000 mg/l |
| • L-Tyrosin | 300 mg/l |
| • L-Uracil | 200 mg/l |

Bei den drei fehlenden Aminosäuren handelt es sich um Auxotrophiemarker, die dem Medium je nach Bedarf zusätzlich zugesetzt werden. Im Rahmen dieser Arbeit wird nur die Aminosäure Histidin zugegeben, so dass ein SD-Leu/-Trp/+His-Medium entsteht.

100x Stammlösung Histidin

L-Histidin HCl	200 mg/ 100 ml
----------------	----------------

Diese Aminosäure wird in Form einer 100x konzentrierten Stammlösung mit *A. bidest* hergestellt und autoklaviert. Zu einem Liter SD-Medium werden 10 ml dieser Stammlösung gegeben.

Für die Selektion von Interaktionen im Rahmen des *yeast two-hybrid*-Systems wurde zudem ein Medium mit der Bezeichnung SD-Leu/-Trp/-His/+ 3AT hergestellt. Hier wird als Marker neben der Leucin- und Tryptophanuxotrophie auch die Histidinauxotrophie eingesetzt.

Da der Hefestamm Y190 trotz seiner Mutationen eine schwache His3p-Expression aufweist, wird zusätzlich 3-Amino-1,2,4-triazol (3 AT) als Bestandteil des SD-Mediums benötigt. Das 3AT ist ein kompetitiver Inhibitor des His3 Proteins und unterdrückt so die natürliche Histidinsynthese.

Es wird eine 1M 3AT-Stammlösung angesetzt, die vor dem Gebrauch sterilfiltriert wird. Das 3AT wird dem SD-Medium in einer Endkonzentration von 50 mM zugesetzt. Hier ist darauf zu achten, dass das Medium auf ca. 55 °C abgekühlt ist, da das 3AT hitzeempfindlich ist.

3.5.3 Kulturmedien für eukaryotische Zellen

Im Rahmen dieser Arbeit wurden alle Zelllinien unter gleichen Bedingungen in sterilem Standardmedium kultiviert.

Standardmedium

- Dulbeccos Modified Eagle Medium (DMEM)
- 10% (v/v) fötales Kälberserum (FKS)
- 1% Glutamin

3.6 Enzyme & Marker

3.6.1 Restriktionsendonukleasen

Für die Restriktionsanalysen werden im Rahmen dieser Arbeit folgende Enzyme eingesetzt:

<i>Bam</i>HI	20 U/ μ l	New England Biolabs; Frankfurt/Main
<i>Bgl</i>II	10 U/ μ l	New England Biolabs; Frankfurt/Main
<i>Bsp</i>681 (<i>Nru</i>I)	10 U/ μ l	MBI Fermentas GmbH; Mannheim
<i>Nde</i>I	20 U/ μ l	New England Biolabs; Frankfurt/Main
<i>Pst</i>I	10 U/ μ l	New England Biolabs; Frankfurt/Main

3.6.2 Sonstige Enzyme

Neben den Restriktionsendonukleasen wurden weitere Enzyme eingesetzt, die im Folgenden aufgeführt sind:

<i>Calf Intestine Alkaline Phosphatase</i>	1 U/ μ l	MBI Fermentas GmbH; Mannheim
<i>Pfu</i>-Polymerase	3 U/ μ l	Promega GmbH; Mannheim
<i>T4</i> DNA-Ligase	1 U/ μ l	MBI Fermentas GmbH; Mannheim

Alle oben aufgeführten Enzyme werden mit einem spezifischen Puffer geliefert, in dem die Enzyme ihre optimale Wirkung entfalten können.

3.6.3 Proteinmarker

In der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurden folgende Proteinmarker eingesetzt:

BenchMark™ Proteinleiter	Invitrogen, Karlsruhe
---------------------------------	-----------------------

3.6.4 DNA-Marker

Für die DNA-Auftrennung im Agarosegel wurden folgende DNA-Marker eingesetzt:

50 bp DNA Leiter (<i>GeneRuler™ 50bp DNA Ladder</i>)	MBI Fermentas GmbH; Mannheim
100 bp DNA Leiter (<i>GeneRuler™ 100bp DNA Ladder</i>)	MBI Fermentas GmbH; Mannheim
100 bp DNA Leiter Plus (<i>GeneRuler™ 100bp DNA Ladder Plus</i>)	MBI Fermentas GmbH; Mannheim
1 kb DNA Leiter (<i>GeneRuler™ 1kb DNA Ladder</i>)	MBI Fermentas GmbH; Mannheim
λ <i>Eco</i>RI/<i>Hind</i>III Marker	Invitrogen; Karlsruhe

Die Abbildungen aller Marker sind im Anhang dargestellt.

3.7 Immunologische Reagenzien

In *Western Blot*- und Immunfluoreszenz-Analysen wurden im Rahmen dieser Arbeit folgende Antikörper bzw. Farbstoffe eingesetzt.

3.7.1 Primäre Antikörper

anti-Calnexin	Monoklonales Maus-IgG, gegen die AS 116-301 des humanen Calnexins gerichtet (Tjoelker et al., 1994)	BD Biosciences Pharmingen; Heidelberg
anti-Giantin	Polyklonaler Kaninchen-Antikörper gegen die AS 1-469 des humanen Giantins gerichtet (Linstedt & Hauri, 1993)	Covance (Babco); Vertrieb: Hiss Diagnostics GmbH; Freiburg
anti-GM130	Monoklonales Maus-IgG, gegen den C-Terminus von GM130 gerichtet (Nakamura et al., 1997)	BD Biosciences Pharmingen; Heidelberg
anti-HA (16B12)	Monoklonales Maus-IgG, gegen das HA-Epitop gerichtet (Tan et al., 1998)	Covance (Babco); Vertrieb: Hiss Diagnostics GmbH; Freiburg
anti-myc (9E10)	Monoklonaler Maus-Antikörper, gegen das myc-Epitop gerichtet; Hybridomaüberstand (Evan et al., 1985)	Arbeitsgruppe Prof. Dr. A. Barnekow
anti-p115	Monoklonales Maus-IgG, gegen den C-Terminus von p115 gerichtet (Nakamura et al., 1997)	BD Biosciences Pharmingen; Heidelberg
anti-rab1b (1E7)	Monoklonaler Maus-Antikörper, gegen den C-Terminus von rab1b gerichtet; Hybridomaüberstand (Elazar et al., 1994)	Arbeitsgruppe Prof. Dr. A. Barnekow
anti-Syntaxin 6	Monoklonales Maus-IgG, gegen Syntaxin 6 gerichtet (Bock et al., 1997)	BD Biosciences Pharmingen; Heidelberg

3.7.2 Sekundäre Antikörper

anti-Maus IgG – horse radish peroxidase (HRP) gekoppelt Amersham Bioscience; Freiburg

anti-Maus IgG – Alexa Fluor 594 gekoppelt Molecular Probes, MoBiTec; Göttingen

anti-Kaninchen IgG – Alexa Fluor 488 gekoppelt	Molecular Probes, MoBiTec; Göttingen
anti-Kaninchen IgG – Alexa Fluor 568 gekoppelt	Molecular Probes, MoBiTec; Göttingen

3.7.3 Farbstoffe

Phalloidin – Alexa Fluor 594 gekoppelt	Molecular Probes, MoBiTec; Göttingen
DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindol,dilactat)	SIGMA, Sigma-Aldrich Chemie; Taufkirchen

3.8 primer

Diese chemisch synthetisierten Oligonukleotide, die spezifisch an komplementäre DNA-Sequenzen binden können, wurden sowohl zur DNA-Amplifikation im Rahmen von Klonierungen, als auch zur Sequenzierung bestimmter DNA-Abschnitte genutzt.

Alle *primer* wurden von der Firma Invitrogen (Karlsruhe) synthetisiert und auf eine Ausgangskonzentration von 100 pmol/μl eingestellt. Für die Sequenzierungen wurden sie auf eine Konzentration von 1 pmol/μl verdünnt.

3.8.1 Klonierungsprimer

Zur Klonierung der Deletionsmutanten von *rab1b* wurden folgende *primer* eingesetzt:

- **F1 (wt+1) *rab1b* (forward)** – 31mer

5'-C CGG TTT CAT ATG AAC CCC GAA TAT GAC TAC-3'

- **R1 (reverse)** – 31mer

5'-TT GGA TCC CTA AGC AGA TTT CAC AGG AGT GC-3'

- **R2 (reverse)** – 31mer

5'-TT GGA TCC CTA GAA TGC CTG TTC AAC ATT GG-3'

- **R3** (*reverse*) – 45mer

5'-TT GGA TCC CTA GCA GCA GCC ACC ACT GAA TGC CTG TTC AAC ATT G-3'

Zur Klonierung der Chimären (rab1b/rab6a/rhoA) wurden folgende *primer* verwendet:

- **RAB1B-N-F** (*forward*) – 32mer

5'-GGA ATT CCC ATA TGA ACC CCG AAT ATG ACT AC-3'

- **RAB1B-4-R** (*reverse*) – 36mer

5'-AAG GAT CCA AGA TCT GAC TTG TTG CCT ACC AGC AGT-3'

- **RAB1B-5-R** (*reverse*) – 35mer

5'-AAG GAT CCA TCG CGA GCA CTT GTC TCC AGG AAG GG-3'

- **RAB1B-4-F** (*forward*) – 27mer

5'-TTA GAT CTC ACC ACC AAG AAG GTC GTG-3'

- **RAB1B-C-R** (*reverse*) – 29mer

5'-AAG GAT CCC TAG CAG CAG CCA CCA CTA GC-3'

- **RAB6-N-F** (*forward*) – 32mer

5'-GGA ATT CCC ATA TGT CCA CGG GCG GAG ACT TC-3'

- **RAB6-4-R** (*reverse*) – 32mer

5'-AAG GAT CCG AGA TCT GTT TTA TTT CCT ACT AG-3'

- **RAB6-4-F** (*forward*) – 24mer

5'-TTA GAT CTT GCT GAC AAG AGG CAA-3'

- **RAB6-C-R** (*reverse*) – 29mer

5'-AAG GAT CCT TAG CAG GAA CAG CCT CCT TC-3'

- **RHO-4-F** (*forward*) – 24mer

5'-TCA GAT CTT CGG AAT GAT GAG CAC-3'

- **RHO-5-F** (*forward*) – 31mer

5'-TTT TGC TCG CGA TAT GGC AAA CAG GAT TGG C-3'

- **RHO-C-R** (*reverse*) – 29mer

5'-AAG GAT CCT CAC AAG ACA AGG CAA CCA GA-3'

Zur Amplifikation der cDNA von PRA1 aus einer λ gt11-Expressionsbank wurden in einer *nested* PCR folgende *primer* eingesetzt:

- **PRA 1F** (*forward*) – 28mer

5'-CTT ATT TCA TAT GGC GGC CCA GAA GGA C-3'

- **PRA 1R** (*reverse*) – 29mer

5'-TTG GAT CCT TAC ACA GGT TTC ATC TGC AG-3'

- **PRA 3F** (*forward*) – 20mer

5'-ACA GCG GTT CTA TTC ACT GC-3'

- **PRA 4R** (*reverse*) – 20mer

5'-TCT GAG TTG AGC TGA GTG TC-3'

3.8.2 Sequenzierungsprimer

Für die Sequenzierung von pAS-Konstrukten wurden folgende *primer* eingesetzt:

- **bait 1F** (*forward*) – 17mer

5'-TCA TCG GAA GAG AGT AG-3'

- **bait 2R** (*reverse*) – 22mer

5'-CGT TTT AAA ACC TAA GAG TCA C-3'

Für die Sequenzierung des pGADT7-Konstruktes wurden folgende *primer* verwendet:

- **fish 1F** (*forward*) – 18mer

5'-ATA CCA CTA CAA TGG ATG-3'

- **fish 2R** (*reverse*) – 22mer

5'-CAG TTG AAG TGA ACT TGC GGG G-3'

Für die Sequenzierung der pSV-Konstrukte wurden die folgenden *primer* genutzt:

- **Sp6** (*forward*) – 18mer

5'-ATT TAG GTG ACA CTA TAG-3'

- **T7 (reverse)** – 22mer

5'-TTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG C-3'

Für die Sequenzierung zur Überprüfung des bakteriellen Expressionsplasmids pGEX wurden diese *primer* eingesetzt:

- **GEX F (forward)** – 23mer

5'-GGG CTG GCA AGC CAC GTT TGG TG-3'

- **GEX R (reverse)** – 23mer

5'-CCG GGA GCT GCA TGT GTC AGA GG-3'

3.9 Ausgangsvektoren und Lambda-Bank

Im Rahmen dieser Arbeit wurden unterschiedliche Vektoren benötigt. Für die Methode der GST-*pulldowns* wurden prokaryotische Expressionsvektoren eingesetzt. Für das *yeast two-hybrid*-System sowie zur Expression von Proteinen in eukaryotischen Zellen durch Transfektion wurden sogenannte *shuttle*-Vektoren verwendet. Diese zeichnen sich dadurch aus, dass sie sowohl in Prokaryoten, als auch in Hefen und anderen eukaryotischen Zellen repliziert bzw. exprimiert werden können.

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Ausgangsvektoren werden im Folgenden aufgeführt.

3.9.1 Prokaryotische Expressionsvektoren

Für die Expression der im Rahmen dieser Arbeit hergestellten GST-Fusionsproteine wurde als Ausgangsvektor pGEX KG verwendet.

- **pGEX KG** GST-Gen Fusionsvektor, enthält das Glutathion S-Transferase-Gen aus *Schistosoma japonicum*; (Guan & Dixon, 1991)

- **pGEX42 IP500** Modifizierter pGEX KG-Vektor, enthält ein ca. 500 bp großes Iporin-Fragment, das als *Bam*HI/*Bg*III Insert eingefügt wurde, wodurch die *Bam*HI-Schnittstelle des Vektors zerstört wurde. Die im Insert nachstehende *Nde*I-Schnittstelle sowie die *downstream* gelegene *Bam*HI-Schnittstelle ermöglichen das Einklonieren von DNA-Fragmenten über *Nde*I/*Bam*HI. Dieser Vektor wurde freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Konstantinos Bilbilis (Bilbilis, 2002)

3.9.2 Vektoren für das *yeast two-hybrid*-System

Im *yeast two-hybrid*-System werden zwei Arten von Vektoren genutzt. Als „Köder“ bzw. *bait* werden die Plasmide bezeichnet, die für eine GAL4-DNA-Bindedomäne kodieren. Die Plasmide, die eine GAL4-Aktivierungsdomäne exprimieren, werden als „Beute“- bzw. *prey*-Plasmid bezeichnet. Die Vektoren können bis auf den Vektor pACT*minus* von der Firma BD Biosciences Clontech (Heidelberg) bezogen werden.

- **pAS 2-1** *bait*-Vektor des Matchmaker II Systems, enthält die gal4BD (*binding domain*); (Harper et al., 1993)
- **pACT2** *prey*-Vektor des Matchmaker II Systems, enthält die gal4AD (*activating domain*); (Li & Fields, 1993)
- **pACT*minus*** Derivat des pACT2-Vektors; die *Hind*III-Schnittstelle in Position 4739 wurde durch *fill in ligation* entfernt. Dieser Vektor wurde freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Thomas Weide (Weide, 1998)
- **pGADT7** *prey*-Vektor des Matchmaker III Systems, enthält die gal4AD (*activating domain*); (Chien et al., 1991)

3.9.3 Eukaryotische Expressionsvektoren

Für die transiente Transfektion werden Vektoren mit einem starken viralen Promotor wie zum Beispiel einem SV40-Promotor verwendet. Dadurch werden die rekombinanten Proteine in der transfizierten Zelle überexprimiert, die dann in weiteren Analysen eingesetzt werden können.

- **pSV-Sport 1** Vektor zur Transfektion von Säugerzellen; enthält einen SV40-Promotor; (Invitrogen; Karlsruhe)
- **pSV42** Derivat des pSVSport-1; die *Nde*I-Schnittstelle in der Position 629 und die *Bam*HI-Schnittstelle in der Position 1013 wurden durch *fill in ligation* entfernt; (Arbeitsgruppe Prof. Dr. A. Barnekow)

- **pSV42HA** modifizierter pSV42-Vektor; enthält vor der *NdeI*-Schnittstelle eine HA-kodierende Sequenz, so dass entsprechend translatierte Proteine immer ein aminoterminaleres HA-*tag* besitzen; (Arbeitsgruppe Prof. Dr. A. Barnekow)
- **pSV42myc** modifizierter pSV42-Vektor; enthält vor der *NdeI*-Schnittstelle eine myc-kodierende Sequenz, so dass entsprechend translatierte Proteine immer ein aminoterminaleres myc-*tag* besitzen; (Arbeitsgruppe Prof. Dr. A. Barnekow)
- **pEGFP-C2** modifizierte Form des GFP (*green fluorescence protein*)-Vektors; er zeichnet sich durch eine optimale Fluoreszenz und eine hohe Expression in Säugerzellen aus. Die MCS (*multiple cloning site*) liegt zwischen der EGFP-kodierenden Sequenz und dem SV40-Polyadenylierungssignal, so dass entsprechend translatierte Proteine carboxyterminal am EGFP exprimiert werden (Prasher et al., 1992). Dieser Vektor kann von der Firma BD Biosciences Clontech (Heidelberg) bezogen werden.
- **pEGFP-IJ $\Delta 4$** modifizierte Form des Vektors pEGFP-C2; durch *fill in ligation* wurde die interne *NdeI*-Schnittstelle entfernt; die ursprüngliche MCS wurde durch Schneiden mit *BglII* und *BamHI* entfernt; eine neue MCS aus pACT-X11L2 $\Delta 4$ wurde eingefügt; die Sequenz ist der Vektorkarte pEGFP PRA1 im Anhang zu entnehmen; die neue MCS ermöglicht das Einklonieren neuer DNA-Fragmente über *NdeI/BamHI*. Dieser Vektor wurde freundlicherweise von Indra Brüggemann zur Verfügung gestellt (Brüggemann, 2002)

3.9.4 Lambda-Bank

Für die Amplifikation von PRA1 wurde eine **λ gt11-Expressionsbank** aus Rattenhirn verwendet. Diese Bank wurde freundlicherweise vom Institut für Physiologische Chemie und Pathobiochemie, Universität Münster zur Verfügung gestellt. Diese Expressionsbank kann von der Firma BD Biosciences Clontech (Heidelberg) bezogen werden.

3.10 Plasmidkonstrukte

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die folgenden Plasmidkonstrukte im *yeast two-hybrid*-System, zur Expression von rekombinanten Proteinen in Säugerzellen sowie zur Expression von Fusionsproteinen eingesetzt.

Ein großer Teil der benötigten Konstrukte wurde im Rahmen dieser Arbeit hergestellt. Die Vektorkarten dieser Plasmidkonstrukte sind im Anhang der Arbeit zu finden.

3.10.1 Verwendete Plasmidkonstrukte für das *yeast two-hybrid*-System

prey-Plasmide

- pGADT7 PRA1** enthält die *full length* cDNA des PRA1 (Ratte); Insertion über *NdeI/BamHI*; hergestellt im Rahmen dieser Arbeit
- pACT Mss4** der pACT_{minus}-Vektor enthält die *full length* cDNA des Mss4 (human); Insertion über *NdeI/BamHI*; (Weide, 1998)

bait-Plasmide

- pAS rab1a wt** enthält die *full length* cDNA des rab1a Wildtyps (human); Insertion über *NdeI/BamHI*; (Weide et al., 2003)
- pAS rab1a S25N** enthält die cDNA der inaktiven Mutante rab1a S25N (human); Insertion über *NdeI/BamHI*; (Weide et al., 2003)
- pAS rab1a Q70L** enthält die cDNA der aktiven Mutante rab1a Q70L (human); Insertion über *NdeI/BamHI*; (Weide et al., 2003)
- pAS rab1b wt** enthält die *full length* cDNA des rab1b Wildtyps (Ratte); Insertion über *NdeI/BamHI*; (Weide et al., 2001)
- pAS rab1b N121I** enthält die cDNA der inaktiven Mutante rab1b N121I (Ratte); Insertion über *NdeI/BamHI*; (Weide et al., 2001)
- pAS rab1b S22N** enthält die cDNA der inaktiven Mutante rab1b S22N (Ratte); Insertion über *NdeI/BamHI*; (Weide et al., 2001)
- pAS rab1b Q67R** enthält die cDNA der aktiven Mutante rab1b Q67R (Ratte); Insertion über *NdeI/BamHI*; (Weide et al., 2001)
- pAS rab1b Q67L** enthält die cDNA der aktiven Mutante rab1b Q67L (Ratte); Insertion über *NdeI/BamHI*; (Weide et al., 2003)
- pAS rab1b wt Δ C1** enthält die cDNA (AS 1-196) des rab1b Wildtyps (Ratte); Insertion über *NdeI/BamHI*; hergestellt im Rahmen dieser Arbeit

pAS rab1b wt ΔC2	enthält die cDNA (AS 1-162) des rab1b Wildtyps (Ratte); Insertion über <i>NdeI/BamHI</i> ; hergestellt im Rahmen dieser Arbeit
pAS rab1b wt ΔC3	enthält die cDNA (AS 1-162; 197-202) des rab1b Wildtyps (Ratte); Insertion über <i>NdeI/BamHI</i> ; hergestellt im Rahmen dieser Arbeit
pAS rab1b wt ΔN1	enthält die cDNA (AS 9-202) des rab1b Wildtyps (Ratte); Insertion über <i>NdeI/BamHI</i> ; hergestellt von Dr. M. Bayer, Abt. Exp. Tumorbilogie
pAS rab1b wt ΔN1ΔC3	enthält die cDNA (AS 9-162; 197-202) des rab1b Wildtyps (Ratte); Insertion über <i>NdeI/BamHI</i> ; hergestellt von Dr. M. Bayer, Abt. Exp. Tumorbilogie
pAS rab1b-2-rhoA	enthält die cDNA des rab1b-N-Terminus (AS 1-123; Ratte) und des rhoA-C-Terminus (AS 120-194; human); Insertion über <i>NdeI/BamHI</i> ; hergestellt im Rahmen dieser Arbeit
pAS rab1b-3-rhoA	enthält die cDNA des rab1b-N-Terminus (AS 1-152; Ratte) und des rhoA-C-Terminus (AS 145-194; human); Insertion über <i>NdeI/BamHI</i> ; hergestellt im Rahmen dieser Arbeit
pAS rab1b-2-rab6a	enthält die cDNA des rab1b-N-Terminus (AS 1-123; Ratte) und des rab6a-C-Terminus (AS 129-209; human); Insertion über <i>NdeI/BamHI</i> ; hergestellt im Rahmen dieser Arbeit
pAS rab1b Q67L-2-rab6a	enthält die cDNA des N-Terminus einer aktiven rab1b Mutante (AS 1-123; Ratte) und des rab6a-C-Terminus (AS 129-209; human); Insertion über <i>NdeI/BamHI</i> ; (Matanis et al., 2002)
pAS rab6a-2-rab1b	enthält die cDNA des rab6a-N-Terminus (AS 1-129; human) und des rab1b-C-Terminus (AS 125-202; Ratte); Insertion über <i>NdeI/BamHI</i> ; hergestellt im Rahmen dieser Arbeit
pAS rab6a Q72L-2-rab1b	enthält die cDNA des N-Terminus einer aktiven rab6a Mutante (AS 1-129; human) und des rab1b-C-Terminus (AS 125-202; Ratte); Insertion über <i>NdeI/BamHI</i> ; (Matanis et al., 2002)
pAS ypt1 wt	enthält die <i>full length</i> cDNA des ypt1p (Hefe); freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. D. Gallwitz, MPI Göttingen
pAS ypt1 N121I	enthält die cDNA der inaktiven Mutante ypt1 N121I (Hefe); freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. D. Gallwitz, MPI Göttingen

- pAS rab2 wt** enthält die *full length* cDNA des rab2 Wildtyps (human); Insertion über *NdeI/BamHI*; hergestellt von Dr. M. Bayer; Abt. Exp. Tumorbioogie
- pAS rab3d wt** enthält die *full length* cDNA des rab3d Wildtyps (Ratte); freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Brian Knoll, Baylor College of Medicine, Houston / Texas
- pAS rab4a wt** enthält die *full length* cDNA des rab4a Wildtyps (human); freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Brian Knoll; Baylor College of Medicine, Houston / Texas
- pAS rab5a wt** enthält die *full length* cDNA des rab5a Wildtyps (human); freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Brian Knoll; Baylor College of Medicine, Houston / Texas
- pAS rab6a wt** enthält die *full length* cDNA des rab6a Wildtyps (human); Insertion über *NdeI/BamHI*; (Weide et al., 2001)
- pAS rab6a N126I** enthält die cDNA der inaktiven Mutante rab6a N126I (human); Insertion über *NdeI/BamHI*; (Weide et al., 2001)
- pAS rab6a T27N** enthält die cDNA der inaktiven Mutante rab6a T27N (human); Insertion über *NdeI/BamHI*; (Weide et al., 2001)
- pAS rab6a Q72R** enthält die cDNA der aktiven Mutante rab6a Q72R (human); Insertion über *NdeI/BamHI*; (Weide et al., 2001)
- pAS rho wt** enthält die *full length* cDNA des rho Wildtyps (*Aplysia californica*); Insertion über *NdeI/BamHI*; hergestellt von Dr. Thomas Weide, Cilian AG / Münster
- pAS rho N117I** enthält die cDNA der inaktiven Mutante rho N117I (*Aplysia californica*); Insertion über *NdeI/BamHI*; hergestellt von Dr. Thomas Weide, Cilian AG / Münster
- pAS rho G14V** enthält die cDNA der aktiven Mutante rho G14V (*Aplysia californica*); Insertion über *NdeI/BamHI*; hergestellt von Dr. Thomas Weide, Cilian AG / Münster
- pAS rho Q63L** enthält die cDNA der aktiven Mutante rho Q63L (*Aplysia californica*); Insertion über *NdeI/BamHI*; hergestellt von Dr. Thomas Weide, Cilian AG / Münster
- pAS rhoA** enthält die *full length* cDNA des rhoA Wildtyps (human); Insertion über *BamHI/PstI*; hergestellt im Rahmen dieser Arbeit

3.10.2 Verwendete Plasmidkonstrukte für die eukaryotische Transfektion

pSV42HA rab1b wt	enthält die <i>full length</i> cDNA des rab1b Wildtyps (Ratte); Insertion über <i>NdeI/BamHI</i> ; (Weide et al., 2001)
pSV42HA rab1b S22N	enthält die cDNA der inaktiven Mutante rab1b S22N (Ratte); Insertion über <i>NdeI/BamHI</i> ; (Weide et al., 2001)
pSV42HA rab1b Q67R	enthält die cDNA der aktiven Mutante rab1b Q67R (Ratte); Insertion über <i>NdeI/BamHI</i> ; (Weide et al., 2001)
pSV42HA rab1b Q67L	enthält die cDNA der aktiven Mutante rab1b Q67L (Ratte); Insertion über <i>NdeI/BamHI</i> ; hergestellt im Rahmen dieser Arbeit
pSV42HA rab1b wt ΔC1	enthält die cDNA (AS 1-196) des rab1b Wildtyps (Ratte); Insertion über <i>NdeI/BamHI</i> ; hergestellt im Rahmen dieser Arbeit
pSV42HA rab1b wt ΔC2	enthält die cDNA (AS 1-162) des rab1b Wildtyps (Ratte); Insertion über <i>NdeI/BamHI</i> ; hergestellt im Rahmen dieser Arbeit
pSV42HA rab1b wt ΔC3	enthält die cDNA (AS 1-162; 197-202) des rab1b Wildtyps (Ratte); Insertion über <i>NdeI/BamHI</i> ; hergestellt im Rahmen dieser Arbeit
pSV42HA rab1b wt ΔN1	enthält die cDNA (AS 9-202) des rab1b Wildtyps (Ratte); Insertion über <i>NdeI/BamHI</i> ; hergestellt im Rahmen dieser Arbeit
pSV42HA rab1b wt ΔN1ΔC3	enthält die cDNA (AS 9-162; 197-202) des rab1b Wildtyps (Ratte); Insertion über <i>NdeI/BamHI</i> ; hergestellt im Rahmen dieser Arbeit
pSV42HA rab1b-2-N	enthält die cDNA des rab1b-N-Terminus (AS 1-124; Ratte); Insertion über <i>NdeI/BamHI</i> ; hergestellt im Rahmen dieser Arbeit
pSV42HA rab1b-3-N	enthält die cDNA des rab1b-N-Terminus (AS 1-153; Ratte); Insertion über <i>NdeI/BamHI</i> ; hergestellt im Rahmen dieser Arbeit
pSV42HA rab6a-2-N	enthält die cDNA des rab6a-N-Terminus (AS 1-130; human); Insertion über <i>NdeI/BamHI</i> ; hergestellt im Rahmen dieser Arbeit

pSV42HA rab1b-2-rhoA	enthält die cDNA des rab1b-N-Terminus (AS 1-123; Ratte) und des rhoA-C-Terminus (AS 120-194; human); Insertion über <i>NdeI/BamHI</i> ; hergestellt im Rahmen dieser Arbeit
pSV42HA rab1b-3-rhoA	enthält die cDNA des rab1b-N-Terminus (AS 1-152; Ratte) und des rhoA-C-Terminus (AS 145-194; human); Insertion über <i>NdeI/BamHI</i> ; hergestellt im Rahmen dieser Arbeit
pSV42HA rab1b-2-rab6a	enthält die cDNA des rab1b-N-Terminus (AS 1-123; Ratte) und des rab6a-C-Terminus (AS 129-209; human); Insertion über <i>NdeI/BamHI</i> ; hergestellt im Rahmen dieser Arbeit
pSV42HA rab6a-2-rab1b	enthält die cDNA des rab6a-N-Terminus (AS 1-129; human) und des rab1b-C-Terminus (AS 125-202; Ratte); Insertion über <i>NdeI/BamHI</i> ; hergestellt im Rahmen dieser Arbeit
pSV42myc PRA1	enthält die <i>full length</i> cDNA des PRA1 (Ratte); Insertion über <i>NdeI/BamHI</i> ; hergestellt im Rahmen dieser Arbeit

3.10.3 Verwendete Plasmidkonstrukte für die Expression von Fusionsproteinen

pEGFP PRA1	enthält die <i>full length</i> cDNA des PRA1 (Ratte); Insertion über <i>NdeI/BamHI</i> ; hergestellt im Rahmen dieser Arbeit
pGEX42 PRA1	enthält die <i>full length</i> cDNA des PRA1 (Ratte); Insertion über <i>NdeI/BamHI</i> ; hergestellt im Rahmen dieser Arbeit

3.11. Organismen

3.11.1 Bakterienstämme

Bei allen verwendeten Bakterienstämmen handelt es sich um *E. coli* Derivate, die zur Amplifikation und Klonierung von DNA, sowie zur Expression von rekombinanten Proteinen eingesetzt wurden.

DH5α	<i>supE44 ΔlacU169 (Φ80 <i>lacZ</i>ΔM15) <i>hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1</i> (Hanahan, 1983; Woodcock et al., 1989)</i>
BL21	<i>F⁻ompT <i>hsdS_B</i> (rB⁻ mB⁻) <i>gal dcm</i> (DE3) (Studier & Moffat, 1986)</i>

3.11.2 Hefestämme

Es wurde der Hefestamm Y190 des Matchmaker II *yeast two-hybrid*-Systems verwendet.

Saccharomyces cerevisiae **MATa**, *ura3-52*, *his3-200*, *lys2-801*, *ade2-101*, *trp1-901*, *leu2-3, 112*, *gal4Δ*, *met-*, *gal80Δ*, *cyh^r2*
Y190 LYS2:: *GAL1*_{UAS}-*HIS3*_{TATA}-*HIS3*
 URA3:: *GAL1*_{UAS}-*GAL1*_{TATA}-*lacZ*
 (Flick & Johnston, 1990; Harper et al., 1993)

3.11.3 Eukaryotische Zellen

Die folgenden Zelllinien wurden für die Expression rekombinanter Proteine eingesetzt:

HeLa SS6-Zellen Die HeLa-Zellen stammen von einem humanen epithelialen Cervical-Carcinom und stellen eine kontinuierliche Zelllinie dar (Gey et al., 1951). Die Zellen wurden freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. V. Gerke (Med. Biochemie; ZMBE Münster)

BHK-21-Zellen Die BHK (*baby hamster kidney*)-Zellen stammen aus den Nieren von Hamstern, die einen Tag alt waren (McPherson & Stoker, 1962). Diese Zellen wurden freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. V. Gerke (Med. Biochemie; ZMBE Münster)

4. Methoden

4.1 Anzucht, Kultivierung und Lagerung von Bakterien, Hefen und eukaryotischen Zellen

4.1.1 Stammhaltung von Bakterien (DH5 α , BL21)

Anzucht und Kultivierung

Die Anzucht und Kultivierung von Bakterien wie *Escherichia coli* erfolgt in einer Schüttelkultur oder auf Agarplatten. Dazu werden 5 ml 2YT-Medium oder eine 2YT-Agarplatte entweder mit Material aus einer Glyzerinkultur oder mit einer, direkt von einer Agarplatte entnommenen Einzelkolonie angeimpft. Die Schüttelkultur wird bei 37°C und 250 rpm auf einem Rundschüttler, die Agarplatte bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

Bei transformierten Bakterienstämmen mit einem Selektionsmarker wird dem Medium ein entsprechendes Antibiotikum zugesetzt. Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei verschiedene Antibiotika eingesetzt. Für die Stammhaltung mit dem Vektor pEGFP wurde dem Medium Kanamycin in einer Endkonzentration von 50 $\mu\text{g/ml}$ zugesetzt und für die Arbeiten mit den restlichen Vektoren wurde Ampicillin in einer Endkonzentration von 100 $\mu\text{g/ml}$ verwendet. Beim Gießen der Agarplatten ist darauf zu achten, dass das Antibiotikum erst dem auf 55°C abgekühlten Agar zugesetzt wird.

Lagerung

In Schüttelkulturen überleben Bakterien bei 4°C ca. eine Woche. Agarplatten, die zum Schutz vor dem Austrocknen und Kontamination mit Parafilm verschlossen werden, können bis zu drei Monaten im Kühlschrank gelagert werden. Zur langfristigen Lagerung werden Glyzerinkulturen angelegt. Dazu wird zu einem Aliquot einer frischen, dichten Schüttelkultur steriles Glyzerin mit einer Endkonzentration von 15% (v/v) gegeben und die Suspension bei -80°C eingefroren.

4.1.2 Stammhaltung von Hefen (Y190)

Anzucht

Der verwendete Hefestamm Y190 wird in YPD-Vollmedium mit Glukose angezogen. Hierzu wird eine ca. 2-3 mm große Kolonie mit einer Impföse von einer Agarplatte oder aus einer Glyzerinkultur steril entnommen und in dem Medium suspendiert. Diese Schüttelkultur wird im Rundschüttler bei 30°C und ca. 250 rpm für mindestens 12 Stunden bzw. über Nacht inkubiert. Bei der Inkubation ist auf eine optimale Sauerstoffversorgung zu achten, indem die Suspension gut durchmischt wird. Im Gegensatz zu Bakterien teilen sich die Hefen etwa alle zwei Stunden.

Nach der Inkubation sollte die Hefesuspension eine OD_{600nm} (optische Dichte) von 1,3-1,5 aufweisen, bei der sich die Hefen in der stationären Phase befinden. Der Zustand der Hefen lässt sich zudem mikroskopisch sehr gut beurteilen. In der logarithmischen Phase sollten sie eine sehr deutliche Knospung zeigen.

Auf Agarplatten ausgestrichene Hefen bilden nach ca. 2-4 Tagen Inkubation bei 30°C im Brutschrank deutlich sichtbare Kolonien.

Kultivierung

Aus bestehenden Schüttelkulturen wird je nach Dichte der Suspension ein Aliquot entnommen, in frischem Medium suspendiert und weiter bei 30°C auf dem Rundschtüttler inkubiert. Agarplatten werden überstrichen und ebenfalls weiter bei 30°C im Brutschrank inkubiert. Dieses geschieht nach jeweils 2-4 Tagen.

Lagerung

Die Hefen können auf Agarplatten, die zum Schutz vor Austrocknen und Kontamination mit Parafilm verschlossen sind, bei 4°C bis zu vier Monaten aufbewahrt werden. Für eine langfristige Lagerung empfiehlt sich das Anlegen von Glycerinkulturen. Hierbei wird einer ÜN-Kultur Glycerin in einer Endkonzentration von 25% (v/v) zugesetzt und die Suspension bei -80°C eingefroren.

4.1.3 Zellkultur von eukaryotischen Zellen (BHK-21, HeLa SS6)

Anzucht

Die Säugerzellen werden dem Stickstofftank (-196°C) entnommen und zügig in einem Wasserbad bei 37°C aufgetaut. Um das enthaltene DMSO zu entfernen, werden die aufgetauten Zellen für 5 min bei 1000 x g und RT abzentrifugiert. Der DMSO-haltige Überstand wird verworfen und das Zellpellet in 10 ml frischem Zellkulturmedium (DMEM + 10% FKS + 1% Glutamin) resuspendiert. Danach werden die Zellen mit dem Medium auf eine Gewebekulturschale (Ø 10 cm) gegeben und im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert.

Kultivierung

Die ausgesäten BHK- bzw. HeLa SS6-Zellen heften sich an der Matrix der Gewebekulturschale an und bilden einen typischen *monolayer* aus. Wenn die Schale vollständig mit Zellen bedeckt ist, spricht man von einem konfluenten Wachstum. Dabei setzt eine Kontaktinhibition ein, so

dass die Zellen absterben. Um das zu verhindern, müssen die Zellen regelmäßig passagiert, das heißt, von der Kulturschale abgelöst und verdünnt ausgesät werden.

Dazu werden die Zellen zunächst mit sterilem PBS (*phosphat buffered saline*) gewaschen, um abgestorbene Zellen sowie Mediumreste zu entfernen. Da die Proteine, mit deren Hilfe sich die Zellen an das Substrat anheften, durch Calcium- und Magnesiumionen stabilisiert werden, wird anschließend für einige Sekunden ca. 3 ml Trypsin in Kombination mit EDTA auf die Zellen gegeben und wieder abgenommen.

Trypsin/EDTA

- 0,05% (w/v) Trypsin
- 2 mM EDTA

Das Trypsin ist eine Protease, die auf die Struktur des Zytoskeletts wirkt. Sie hat die Aufgabe, die Adhäsionsproteine, die der Verankerung der Zelle dienen, zu spalten. Das EDTA bindet dabei alle zweiwertigen Kationen und erleichtert das Ablösen der Zellen. Um die Wirkung des Enzyms zu unterstützen, wird die Gewebekulturschale für 30-60 sec in den Brutschrank bei 37°C gestellt, bis sich die Zellen durch Klopfen von der Schale ablösen. Durch die Zugabe von 10 ml Medium wird die Enzymreaktion durch die im FKS enthaltenen Proteaseinhibitoren inaktiviert. Um die EDTA-Reste zu entfernen, werden die Zellen bei 1000 x g abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Zellen werden in 10 ml frischem Medium gut resuspendiert und in entsprechender Verdünnung auf neue Gewebekulturschalen überführt. Anschließend wird das Volumen je nach Größe der Kulturschale mit Zellmedium aufgefüllt. Auf der Schale wird immer die Passagennummer notiert, da mit steigender Passage die morphologischen und physiologischen Veränderungen der Zellen zunehmen können.

Lagerung

Säugerzellen können über längere Zeit in flüssigem Stickstoff (-196°C) gelagert werden. Dazu wird eine konfluent bewachsene Gewebekulturschale mit einer möglichst geringen Passagennummer mit sterilem PBS gewaschen und – wie oben beschrieben – mit Trypsin oder Trypsin/EDTA behandelt. Danach werden die Zellen bei 1000 x g abzentrifugiert. Zum Einfrieren der Zellen wird folgendes eiskaltes Gefriermedium verwendet:

- 90% (v/v) FKS
- 10% Dimethylsulfoxid (DMSO)
- auf Eis gekühlt

Nach dem Zentrifugieren wird der Überstand verworfen und das auf Eis gekühlte Zellpellet mit 1,8 ml FKS versetzt. Dann werden 200 µl DMSO tropfenweise zugegeben und gemischt. Anschließend werden 1,8 ml dieser Suspension in ein Kryoröhrchen gefüllt und für 24 Stunden bei -70°C langsam eingefroren. Danach wird es im Tank mit flüssigem Stickstoff gelagert.

4.2 Arbeiten mit DNA

Für verschiedene Methoden wurde Plasmid DNA isoliert und eingesetzt. Die verwendeten Plasmide wurden zum Teil zur Verfügung gestellt, ein großer Teil musste jedoch im Rahmen dieser Arbeit hergestellt werden. Eingesetzt wurde diese Plasmid DNA unter anderem im *yeast two-hybrid*-System (siehe 4.3.2) und in der transienten Transfektion von Säugerzellen (siehe 4.4.1) zur Herstellung rekombinanter Proteine.

Die folgende Abbildung 4.1 zeigt den schematischen Ablauf einer Klonierung, deren einzelne Methoden im Folgenden erläutert werden. Die hergestellten cDNA Konstrukte werden in Vektoren eingebaut, die die gezielte Vervielfältigung der rekombinanten DNA erlauben.

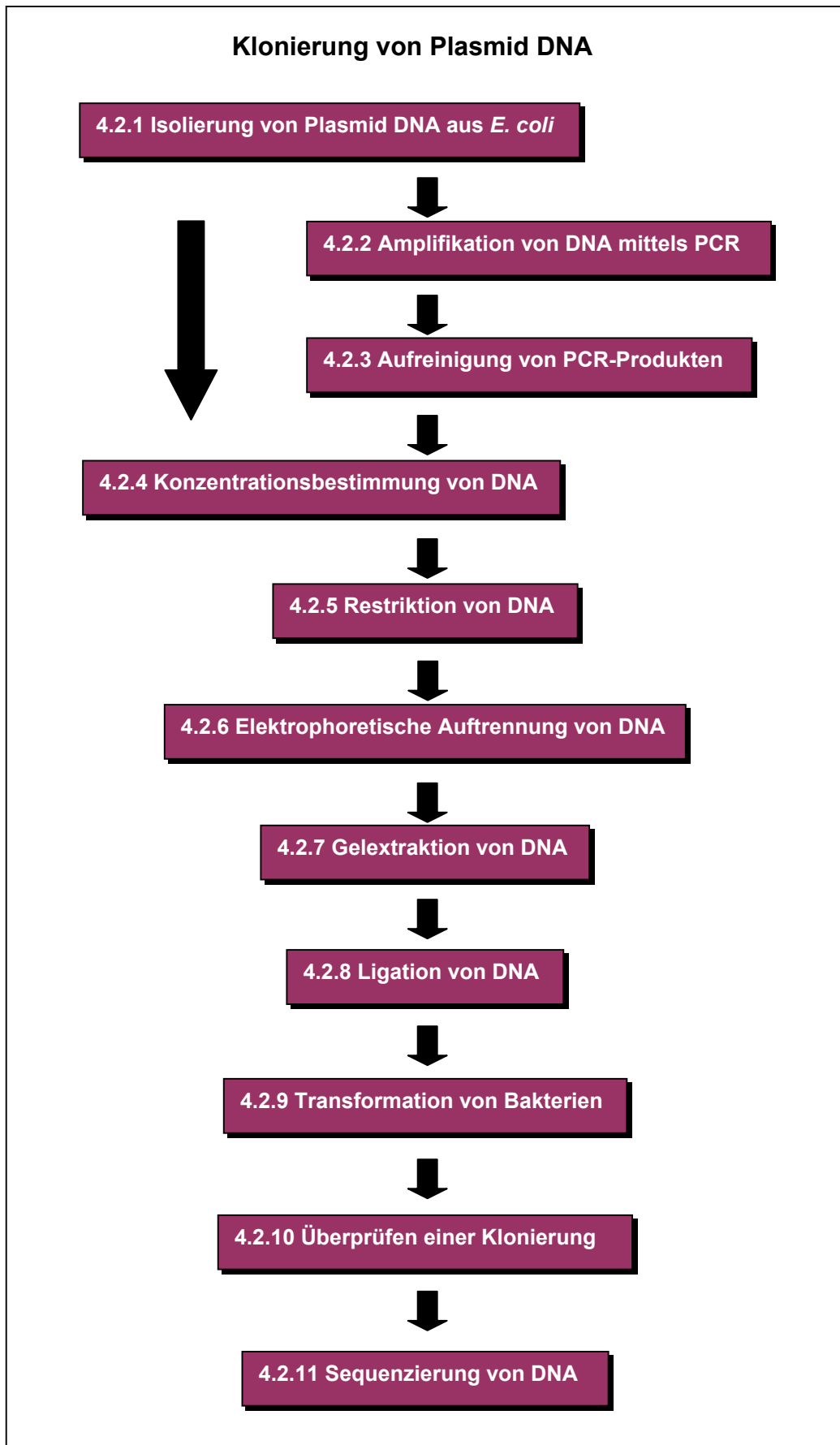


Abb. 4.1: Schematischer Ablauf der Klonierung von Plasmid DNA

4.2.1 Isolierung von Plasmid DNA aus *E. coli*

Für die Arbeit mit Plasmid DNA muss diese zunächst isoliert werden. Mit der von Birnboim und Doly entwickelten Methode wird die Plasmid DNA aus *E. coli* unter Abtrennung der chromosomalen DNA isoliert (Birnboim & Doly 1979). Dieses geschieht durch eine Lyse der *E. coli* Zellen mit anschließender alkalischer Denaturierung der kompletten DNA. Die folgende Neutralisationsreaktion führt zu einer Renaturierung der Plasmid DNA. Die chromosomale DNA bleibt im Gegensatz dazu denaturiert. Zur Aufreinigung der Plasmid DNA werden spezielle *ready to use kits* eingesetzt:

Plasmid-Maxipräparation	<ul style="list-style-type: none">• QIAGEN® Plasmid Maxi Kit (Qiagen GmbH, Hilden)
Plasmid-Minipräparation	<ul style="list-style-type: none">• QIAprep® Spin, Miniprep Kit (Qiagen GmbH, Hilden)• MiniPrep Express™ Matrix Bio 101 (Dianova, Hamburg)

Hierbei wird die Plasmid DNA an eine Matrix gebunden und unter Verwendung verschiedener Puffer von der denaturierten chromosomalen DNA sowie den denaturierten Proteinen im Lysat getrennt und aufgereinigt.

Für große Mengen an Plasmid DNA werden Maxipräparationen durchgeführt, für eine Klonierung genügt der Einsatz von Minipräparationen. Die genaue Handhabung der *kits* sowie der Puffer und Säulen erfolgt nach dem Protokoll des Herstellers.

4.2.2 Amplifikation von DNA mittels PCR

Für die Klonierung von cDNAs wird oft eine Polymerase-Kettenreaktion (PCR, *polymerase chain reaction*) durchgeführt. Hierbei können spezielle DNA-Sequenzen exponentiell *in vitro* amplifiziert werden (Saiki et al., 1985).

Dazu werden zwei spezifische Oligonukleotide (*primer*) eingesetzt, die antiparallel zueinander an die beiden Stränge der zu amplifizierenden DNA (*template*) binden. Zunächst wird die DNA bei 94°C denaturiert. An die so entstandene einzelsträngige *template*-DNA binden bei Erreichen der Hybridisierungs-(*annealing*-) Temperatur die *primer*. Nach einer leichten

Temperaturerhöhung auf die optimale Arbeitstemperatur des Enzyms erfolgt – ausgehend vom 3'-Hydroxyende – durch eine thermostabile DNA-Polymerase die DNA-Neusynthese des jeweils komplementären DNA-Stranges. Hierbei wird zur Herstellung von Klonierungskonstrukten die *Pfu*-Polymerase aus *Pyrococcus furiosus* eingesetzt, da diese eine 3'-5'-Exonukleaseaktivität besitzt, die eine Korrekturaktivität (*proofreading*) erlaubt. Zur Synthese der neuen DNA-Stränge werden die einzelnen Nukleotide benötigt, die als dNTP-Mix zugesetzt werden. Im nächsten Schritt wird die neu synthetisierte DNA erneut thermisch denaturiert und es wiederholen sich die zuvor beschriebenen Schritte. Durch diese Vorgehensweise lässt sich die DNA exponentiell vermehren.

Eine Variante der PCR ist die *nested* PCR, bei der insgesamt vier *primer* eingesetzt werden. Diese Methode besteht aus zwei aufeinanderfolgenden PCR-Reaktionen. Bei der ersten Reaktion wird die Target-Sequenz mit zwei außerhalb dieser Sequenz liegenden *primern* amplifiziert. Dieses PCR-Produkt wird in einer zweiten PCR eingesetzt, bei der das zweite *primer*-Paar zwischen dem ersten liegt. Auf diese Weise gelingt es, einen sehr schwer amplifizierbaren Bereich einzugrenzen und eine sehr hohe Ausbeute zu erreichen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die *nested* PCR zur Amplifikation der cDNA von PRA1 eingesetzt. Die anderen Teilsequenzen zur Klonierung der Deletionsmutanten, der Chimären und der humanen rhoA cDNA wurden in einer einfachen PCR-Reaktion amplifiziert.

Folgende Komponenten werden in einem 500 µl Reaktionsgefäß für einen exemplarischen PCR-Ansatz zusammen pipettiert:

Gesamtansatz 50 µl

- 3,0 µl *template* DNA
- 0,5 µl *primer forward* (100 pmol/µl)
- 0,5 µl *primer reverse* (100 pmol/µl)
- 4,0 µl Nukleotid-Mix (2,5 mM je Nukleotid)
- 0,5 µl *Pfu*-Polymerase
- 5,0 µl *Pfu*-Reaktionspuffer (10x)
- ad 50 µl mit PCR-H₂O

Die PCR-Produkte werden zur Kontrolle auf ein Agarosegel aufgetragen.

4.2.3 Aufreinigung von PCR-Produkten

Die PCR-Produkte werden mit „QIAquick *Nucleotide Removal Kit*“ der Firma Qiagen GmbH, Hilden aufgereinigt. Die Durchführung erfolgt nach dem Protokoll des Herstellers.

4.2.4 Konzentrationsbestimmung von DNA

Für die Klonierung ist es wichtig, die Konzentration und auch die Reinheit der DNA zu überprüfen. Dieses geschieht photometrisch bei einer Absorption von 260 nm.

Dazu wird eine geeignete Verdünnung der Probe (1 µl Probe + 59 µl EB-Puffer) hergestellt und in einer Einmalküvette in das Photometer gestellt. Zur Bestimmung der Konzentration wird zunächst die Grundabsorption bei 230 nm gemessen. Anschließend wird die Absorption einmal bei 260 nm und einmal bei 280 nm gemessen, da dort das Absorptionsmaximum von Proteinen liegt. Aus dem Verhältnis OD_{260nm}/OD_{280nm} lässt sich der Reinheitsgrad der Probe bestimmen. Bei einer sauberen Präparation liegt der Wert bei ca. 1,8. Verunreinigungen durch Proteine führen zu niedrigeren Werten.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Photometer der Firma Eppendorf (Hamburg) verwendet, das in einem Schritt die Konzentration der DNA sowie deren Reinheitsgrad berechnet.

4.2.5 Restriktion von DNA

Für die Klonierung von Plasmidkonstrukten ist es wichtig, die DNA an definierten Sequenzmotiven zu schneiden.

Hierzu werden Restriktionsendonukleasen der Klasse II eingesetzt, die in der Lage sind, doppelsträngige DNA an spezifischen Stellen zu erkennen und zu schneiden. Je nach Restriktionsenzym entstehen hierbei zwei Typen von Schnittstellen. Es entstehen entweder glatte Enden (*blunt ends*) oder versetzte bzw. sogenannte klebrige Enden (*sticky ends*). Die 3'-Enden besitzen immer eine OH-Gruppe, die 5'-Enden eine freie Phosphatgruppe.

Für die optimale Aktivität der Enzyme sind die Reaktionsbedingungen sehr wichtig. Neben dem pH-Wert und der Temperatur spielen die Ionenstärke und Mg^{2+} -Konzentration eine entscheidende Rolle. Um die optimale Aktivität zu erreichen, wird der vom Hersteller mitgelieferte Puffer verwendet und auf die spezifische enzymabhängige Temperatur geachtet.

Im Rahmen von Klonierungen werden sowohl die Klonierungsvektoren als auch die späteren *inserts* zumeist mit zwei Restriktionsenzymen gleichzeitig geschnitten.

Durchführung

Folgende Komponenten werden in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß für einen exemplarischen Restriktionsansatz zusammen pipettiert.

Gesamtansatz 20 µl

- 1-5 µg Plasmid DNA
- 0,5 µl Enzym 1 (1U pro 1 µg DNA)
- 0,5 µl Enzym 2 (1U pro 1 µg DNA)
- 2,0 µl Puffer (vgl. Hersteller des Enzyms)
- ad 20 µl mit A. bidest

Die Inkubation erfolgt für ca. 2 Stunden im Thermoblock bei 37°C. Daran schließt sich eine Überprüfung des Restriktionsansatzes mit Hilfe einer gelelektrophoretischen Auftrennung (siehe 4.2.6) an.

Wenn zum Beispiel ein Vektor nur mit einem Enzym geschnitten bzw. linearisiert wird, besteht bei der Ligation die Möglichkeit der Religation. Um dieses zu verhindern, werden die 5'-Phosphatgruppen der DNA nach der Restriktion mit alkalischer Phosphatase (*calf intestinal phosphatase*) entfernt. Hierzu wird 1U dieses Enzyms zum Restriktionsansatz gegeben und für 60 min bei 37°C inkubiert.

4.2.6 Elektrophoretische Auftrennung von DNA

Eine Standardmethode zur Analyse von DNA-Fragmenten ist die elektrophoretische Auftrennung. Hierbei wird die negative Ladung des Zucker-Phosphat-Rückgrats der DNA ausgenutzt. Durch das Anlegen einer Spannung wandern die negativen Makromoleküle im elektrischen Feld von der Kathode zur Anode. Dabei hängt die Wanderungsgeschwindigkeit der einzelnen DNA-Fragmente von ihrem Molekulargewicht sowie von der Dichte der Matrix ab.

Zur Auftrennung der Plasmid DNA wird ein Agarosegel verwendet. Agarose – ein aus roten Meeresalgen gewonnenes Polysaccharid – löst sich beim Erhitzen in Wasser und bildet beim Abkühlen doppelhelikale Strukturen, die sich parallel zu ihrer Längsachse zu Bündeln zusammenlagern. Somit bilden sie eine dreidimensionale Matrix mit einer definierten Porengröße. Durch die Variation der Agarose-Konzentration (0,5-2%) lässt sich die Porengröße und damit die Auflösung des Gels beeinflussen.

Durch die umgekehrte Proportionalität zwischen dem Logarithmus des Molekulargewichtes und der Mobilität der Fragmente im Agarosegel kann die Größe einer unbekanntes DNA (z.B. eines

Restriktionsfragmentes oder eines PCR-Produktes) durch den Vergleich mit einem DNA-Längenstandard bestimmt werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden je nach Fragmentgröße verschiedene Längenstandards eingesetzt (vgl. 3.6.4).

Da die DNA während der Elektrophorese nicht sichtbar ist, wird der DNA-Probe ein Lauffrontmarker wie Orange G (6x konz.: 0,25% (w/v) Orange G, 30% (v/v) Glycerin) zugesetzt, um die Lauffront der Proben im Agarosegel überwachen zu können. Außerdem sorgt das Glycerin im Orange G für eine höhere Dichte der Proben, so dass diese im TAE-Puffer direkt in die Probentasche sinken und sich somit nicht vermischen können.

Durchführung

Als Standardgel wird ein 1%iges Agarosegel verwendet. Da im Rahmen dieser Arbeit jedoch meist kleine DNA-Fragmente isoliert werden sollten, wurde ein 1,5%iges Agarosegel verwendet. Dazu werden 0,75 g Agarose eingewogen und 50 ml 1x TAE-Puffer hinzugefügt. Die Lösung wird in der Mikrowelle erhitzt, bis eine klare, schlierenfreie Lösung entsteht. Dieser werden 5 µl Ethidiumbromidlösung (10 mg/ml Ethidiumbromid in A. bidest) zugesetzt.

Das Ethidiumbromid interkaliert zwischen die Basenpaare der DNA. Da es sich um eine organische Verbindung handelt, besitzt sie chromophore Eigenschaften. Dadurch bewirkt eine Anregung mit UV-Licht (312 nm) eine Emission von orangefarbenem Licht, so dass die DNA-Fragmente im Gel lokalisiert werden können.

Die warme Agarose-Lösung wird in einen Gelschlitten gegossen, der nach dem Erstarren des Gels in eine horizontale Gelkammer gelegt wird. Auf der Kathodenseite des Gels wird direkt nach dem Gießen ein Kamm fixiert. Dieser wird nach dem Erstarren des Gels entfernt, wodurch die Taschen für die Proben entstehen. Die Gelkammer wird vor dem Auftrag der Proben mit 1x TAE-Puffer gefüllt, so dass das Agarosegel sowie die Probentaschen mit Flüssigkeit bedeckt sind. Nun werden die Taschen mit einer Mikroliterpipette befüllt.

Nach dem Auftrag der Proben wird eine Spannung von 100 V angelegt, so dass die negativ geladenen DNA-Moleküle durch das Gel in Richtung der Anode wandern. Dabei werden sie – ihrer Molekülgröße entsprechend – aufgetrennt.

Mit Hilfe einer elektronischen Bildverarbeitung (Intas, Göttingen) können die Agarosegele dokumentiert werden.

4.2.7 Gelextraktion von DNA

Durch die elektrophoretische Trennung im Agarosegel (siehe 4.2.6) sind Proteinbestandteile – wie Restriktionsenzyme, RNAsen, Polymerasen usw. – entfernt worden.

Für die Klonierung werden die linearisierten DNA-Fragmente benötigt. Dazu werden die gewünschten DNA-Fragmente (Vektor- und Insertions-DNA) des Restriktionsverdau mit einem sterilen Skalpell aus dem Agarosegel herausgeschnitten und in Reaktionsgefäße überführt.

Durch die Verwendung des „QIAquick® *Gel Extraction Kit*“ der Firma Qiagen GmbH (Hilden) können die DNA-Fragmente direkt aus dem Gel isoliert und aufgereinigt werden. Die Durchführung erfolgt nach Angaben des Herstellers.

Die aufgereinigte DNA kann direkt für weitere enzymatische Reaktionen eingesetzt werden.

4.2.8 Ligation von DNA

Zur Verknüpfung der einzelnen DNA-Fragmente werden DNA-Ligasen verwendet. Diese Klasse von Enzymen katalysiert die Ausbildung von Phosphodiester-Bindungen zwischen 3'-Hydroxy- und 5'-Phosphatgruppen doppelsträngiger DNA-Moleküle. Die vom Phagen T4 kodierte Ligase ist ein 68 kDa großes Protein, das ATP als Energiequelle und Mg^{2+} als Cofaktor benötigt. Dieses Enzym ist in der Lage, sowohl klebrige Enden (*sticky ends*) als auch glatte Enden (*blunt ends*) zu verknüpfen.

Durchführung

Pro Ligasereaktion werden ca. 25-50 ng aufgereinigte Vektor-DNA eingesetzt und ein etwa 3-5-fach molarer Überschuss an Insertions-DNA zugefügt.

Das Standard-Volumen eines Ligationsansatzes beträgt 10-20 μ l. Im Rahmen dieser Arbeit wurden zur Herstellung der Chimären jedoch größere Mengen benötigt. Daher wurden für den Ligationsansatz folgende Komponenten zusammen pipettiert:

- 25-50 ng restringierte Vektor-DNA
- x ng restringierte Insert-DNA
- 2 μ l T4-Ligase
- 3 μ l 10x Ligasepuffer
- ad 30 μ l mit A. bidest auffüllen

Zur Kontrolle werden zwei zusätzliche Ansätze hergestellt. Sie enthalten die restringierte Vektor-DNA und keine Insert-DNA. Nur einem dieser Ansätze wird außerdem T4-Ligase zugefügt (lig⁺).

Sowohl die Kontrollen als auch die Ligationsansätze werden über Nacht bei 16°C inkubiert und dann zur Transformation eingesetzt.

4.2.9 Transformation von Bakterien

Bei der Transformation handelt es sich in der Gentechnologie um die Übertragung von gereinigter und auch rekombinanter DNA auf Bakterien.

Viele Bakterienarten besitzen eine sogenannte „natürliche Kompetenz“, durch die sie in der Lage sind, DNA aus dem Medium aufzunehmen. Dieses geschieht jedoch mit einer sehr geringen Effizienz. Um die Transformationseffizienz zu steigern, werden die Bakterien einer physikalischen oder chemischen Behandlung unterzogen. Nach der Transformation werden die Bakterien auf Selektionsplatten ausgestrichen. Diese enthalten ein Antibiotikum als Selektionsmarker, so dass nur Bakterien wachsen können, die eine durch das Plasmid vermittelte Antibiotikumresistenz aufweisen.

4.2.9.1 Herstellung kompetenter Bakterien

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die *E. coli* Bakterienstämme DH5 α und BL21 nach der CaCl₂-Methode von Dagert und Ehrlich transformiert (Dagert & Ehrlich, 1979). Dazu werden zunächst kompetente Bakterien hergestellt.

Durchführung

Zunächst wird eine Vorkultur angesetzt. Dazu werden 5 ml 2YT-Medium mit dem jeweiligen Bakterienstamm aus einer Glyzerinkultur angeimpft und über Nacht auf dem Rundschüttler bei ca. 250 rpm und 37°C inkubiert. Am nächsten Morgen werden dieser Vorkultur ca. 500 μ l Suspension entnommen und in ca. 50 ml 2YT-Medium überführt. Diese neue Kultur wird wiederum bei 250 rpm und 37°C geschüttelt, bis eine OD_{600nm} von 0,4-0,6 erreicht worden ist. Die Bakterien sollten sich zu diesem Zeitpunkt in der logarithmischen Wachstumsphase befinden. Anschließend wird die Bakteriensuspension für 20 min bei 4°C und 2000 x g abzentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Bakterienpellet in 20 ml eiskalter 100 mM CaCl₂-Lösung resuspendiert. Nach einer Inkubation von 30 min auf Eis erfolgt eine zweite

Zentrifugation mit den gleichen Parametern. Wiederum wird der Überstand verworfen und das Pellet in 1-2 ml eiskalter 100 mM CaCl₂-Lösung resuspendiert. Abschließend werden die Bakterien zur Erhöhung der Kompetenz für mindestens 1-2 Stunden auf Eis inkubiert. Sie können dann für die Transformation genutzt werden.

Zur weiteren Erhöhung der Kompetenz können die Bakterien über Nacht bei 4°C inkubiert werden, wobei die Kompetenz nach 12-24 Stunden ihr Maximum erreicht.

4.2.9.2 Transformation von Bakterien nach der Calciumchlorid-Methode

Für die Transformation werden kompetente Bakterien (vgl. 4.2.9.1) sowie Plasmid DNA bzw. ein Ligationsansatz (vgl. 4.2.8) benötigt.

Durchführung

Zunächst werden in einem Reaktionsgefäß 25 µl Plasmid DNA und 125 µl kompetente Bakterien für 30 min auf Eis inkubiert. Danach erfolgt der Hitzeschock für 1 min bei 42°C und anschließend ein Kälteschock für 5 min auf Eis.

Der Transformationsansatz wird mit 800 µl vorgewärmtem 2YT-Medium versetzt und für ca. 30-60 min bei 37°C auf dem Rundschüttler inkubiert. Während dieser Zeit wird der durch das Plasmid aufgenommene Antibiotikumresistenzmarker in den Bakterien exprimiert.

Anschließend werden 200 µl des Ansatzes auf eine 2YT-Agarplatte, die das entsprechende Antibiotikum enthält, ausplattiert. Die Agarplatte wird über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert und am nächsten Tag auf vorhandene Kolonien kontrolliert. Die gewachsenen Kolonien können am nächsten Tag in frisches 2YT-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum überimpft und für weitere Untersuchungen genutzt werden.

4.2.10 Überprüfen einer Klonierung

Um den Erfolg der Transformation bzw. der Klonierung zu überprüfen, muss die Aufnahme des korrekten Plasmids kontrolliert werden.

Dazu werden nach der Transformation gewachsene Kolonien in 5 ml 2YT-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum angezogen. Nach einer Inkubation über Nacht erfolgt eine Plasmidisolierung (vgl. 4.2.1). Die aufgereinigte Plasmid DNA wird einer Restriktion unterzogen (vgl. 4.2.5) und elektrophoretisch überprüft (vgl. 4.2.6). Wenn ein Klon das entsprechende Plasmid enthält, wird dieser abschließend nach der Kettenabbruchmethode von

Sanger sequenziert, um Mutationen während der Klonierung auszuschließen (Sanger et al., 1977).

4.2.11 Sequenzierung von DNA

Dazu wird das „*Sequencing Kit*“ von Amersham Biosciences Europe GmbH (Freiburg) genutzt. Hierbei werden anstelle der von Sanger benutzten radioaktiv markierten Desoxynukleotide fluoreszenzmarkierte Didesoxynukleotide als Terminatoren eingesetzt. Der Einbau dieser Analoga blockiert das weitere Wachstum der Kette durch die DNA-Polymerase, da die 3'-Hydroxygruppe zur Bildung einer Phosphodiesterbindung fehlt. Jeder dieser vier Terminatoren ist mit einem spezifischen Farbstoff gekoppelt, der durch die *laser-scanning*-Einheit des Sequenzierungsautomaten detektiert werden kann. Zusätzlich zu den Terminatoren sind Desoxynukleotide in dem Ansatz enthalten, die eine normale Kettenverlängerung ermöglichen. Mit einer statistischen Wahrscheinlichkeit sind nach Beendigung des PCR-Programmes alle möglichen Kettenlängen in diesem Reaktionsgemisch enthalten. Der Sequenzierungsautomat trennt dieses Gemisch mittels einer Kapillar-Gelelektrophorese der Größe nach auf und die jeweiligen Farbstoffe an jedem Kettenende werden detektiert (Bayer, 1999).

Alle im Rahmen dieser Arbeit hergestellten Plasmidkonstrukte wurden mit einer Sequenzierung überprüft.

Durchführung

Der erste Schritt einer Sequenzierung ist eine *cycle-sequencing*-PCR. Hierbei werden die Terminatoren in die amplifizierte DNA eingebaut. Dazu wird der „*Thermosequenase II Dye Terminator Cycle Sequencing Kit*“ der Firma Amersham Biosciences Europe (Freiburg) verwendet. Die Komponenten A und B dieses Kits werden zu gleichen Teilen gemischt. Der fertige Mix enthält neben den fluoreszenzmarkierten Didesoxynukleotiden die DNA-Polymerase, die Desoxynukleotide sowie einen entsprechenden Puffer. Der zu sequenzierende Ansatz wird wie folgt in einem 0,5 ml Reaktionsgefäß zusammen pipettiert:

- 0,2-2 µg DNA
- 2,5 pmol *primer*
- 2,0 µl Mix A+B
- ad 10 µl mit PCR-Wasser

Dieser Ansatz wird sehr gut gemischt und kurz abzentrifugiert, bevor er in der PCR-Maschine folgendes Programm durchläuft:

• 96°C	30 sec (Denaturierung)	} 49 Zyklen
• 50°C	15 sec (<i>annealing</i>)	
• 60°C	60 sec (Polymerasereaktion)	
• 4°C	∞ (Stop der Reaktion)	

Wichtig ist, dass die eingesetzte DNA sehr „sauber“ ist. Sie sollte daher über eine Säule aufgereinigt werden.

Die im Rahmen dieser Arbeit zur Sequenzierung genutzten *primer* sind unter 3.8.2 aufgeführt.

Um im Anschluss an die PCR die DNA zu fällen, werden dem Ansatz 1 µl Na-Acetat-EDTA-Puffer aus dem Kit und 34 µl Ethanol (100% p.a.) zugefügt. Der Ansatz wird gemischt und für 15 min auf Eis inkubiert. Es erfolgt eine Zentrifugation für 20 min bei 10000 x g. Der Überstand wird vorsichtig abgesaugt und das Pellet mit 250 µl Ethanol (70%) gewaschen. Nach einer erneuten Zentrifugation für 5 min bei 10000 x g wird der Überstand erneut verworfen und das Pellet für 1 min bei 90°C getrocknet. Das Pellet wird in einem Polymer aufgenommen und in den Sequenzierungsautomat eingesetzt. Die weitere Vorgehensweise erfolgt laut Betriebsanleitung des Sequenzierungsautomaten ABI PRISM[®] 310 (PE Biosystems, Weiterstadt).

4.3 Das *yeast two-hybrid*-System

Mit diesem von Fields und Song entwickelten *yeast two-hybrid*-System ist es möglich, interagierende Proteine in einem *screening*-Verfahren aufzuspüren und die entsprechende cDNA zu isolieren (Fields & Song, 1989). Mit diesem System können sowohl unbekannte Interaktionspartner gefunden, als auch potenzielle Protein/Proteininteraktionen verifiziert werden. Hierbei können zum Beispiel durch den Einsatz spezifischer Mutanten für die Interaktion verantwortliche Domänen näher charakterisiert werden. Es ist von Vorteil, dass es sich bei diesem System um ein *in vivo* System handelt.

Dieser hefe-genetische Ansatz beruht auf dem modularen Charakter des Transkriptionsaktivators GAL4. Dieser enthält die beiden Komponenten GAL4-BD (DNA-bindende Domäne) und GAL4-AD (aktivierende Domäne). Die GAL4-BD bindet an spezifische UAS-Sequenzen

(*upstream activating sequences*) vor einem zu exprimierenden Reporter-gen. Die GAL4-AD dagegen bindet an einen Transkriptionskomplex und führt so zur Transkription des unter GAL4-Kontrolle stehenden Reporter-gens.

Dieser modulare Charakter des GAL4 wurde nun in der Form genutzt, dass Plasmide konstruiert wurden, die die Bildung von Hybridgenen ermöglichen (Bayer, 1999). Im Rahmen dieser Arbeit wurden zum einen Hybridgene aus GAL4-BD und verschiedenen *rab* cDNA-Fragmenten als *bait*-Plasmide (Köder-Plasmide) verwendet. Zum anderen wurden Hybridgene aus GAL4-AD und PRA1 cDNA bzw. MSS4 cDNA als *prey*-Plasmide (Beute-Plasmide) eingesetzt. Nach einer Kotransformation in GAL4-defizienten Hefezellen erfolgt die Expression von Fusionsproteinen in Form von *bait*-GAL4-BD und *prey*-GAL4-AD. Nur wenn eine Interaktion zwischen diesen beiden Fusionsproteinen stattfindet, wird ein dem GAL4 ähnlicher Transkriptionsaktivator aus diesen beiden Fusionsproteinen gebildet. Dieses hat zur Folge, dass nur bei einer Interaktion der beiden Proteine das entsprechende Reporter-gen exprimiert wird. Der in dieser Arbeit verwendete Hefestamm Y190 trägt als Reporter-gen das *lacZ*-Gen, das für die β -Galaktosidase kodiert sowie das *his3*-Gen, das für ein Protein des Histidin-stoffwechsels kodiert. Daher kann mit einem β -Galaktosidase-Filtertest und einer Wachstumskontrolle auf Histidin-defizienten Agarplatten eine Interaktion der Proteine einfach kontrolliert werden.

Zusätzlich enthalten die Plasmide Marker, die eine Selektion sowohl in Hefen als auch in Bakterien ermöglicht.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das *yeast two-hybrid*-System sowohl zur Verifizierung der Protein/Proteininteraktion von PRA1 als auch zur Eingrenzung der Interaktionsdomänen auf Seiten des *rab1b* Proteins genutzt. Dafür wurden als *bait*-Plasmide pAS-Konstrukte und als *prey*-Plasmide pACT- bzw. pGADT7-Konstrukte verwendet. Alle drei Plasmide enthalten als Selektionsmarker eine Ampicillinresistenz. Außerdem enthalten die pAS-Konstrukte ein Gen für die Tryptophansynthese und die *prey*-Plasmide pACT und pGADT7 ein Gen für die Leucinsynthese. Auf diese Weise kann auf Agarplatten, die Tryptophan- und Leucin-defizient sind, die Transformationseffizienz überprüft werden. Die im Rahmen dieser Arbeit benutzten Plasmidkonstrukte sind im Materialteil unter dem Punkt 3.10.1 aufgeführt.

In der Abbildung 4.2 ist ein Fließschema dargestellt, das den Arbeitsablauf des *yeast two-hybrid*-Systems verdeutlichen soll.

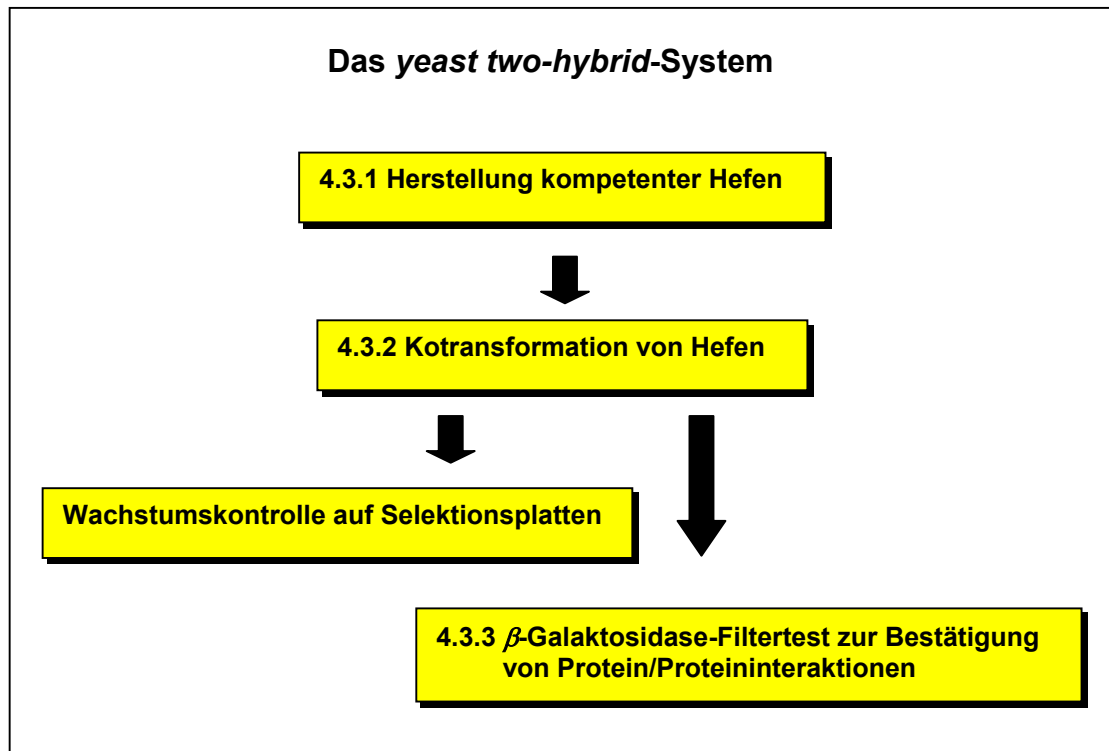


Abb. 4.2: Experimenteller Ablauf des yeast two-hybrid-Systems

4.3.1 Herstellung kompetenter Hefen

Um eine effektive Aufnahme der Fremd-DNA (Plasmid DNA) zu erreichen, müssen Hefezellen, die transformiert werden sollen, einer chemischen Behandlung unterzogen werden. Diese erhöht die Kompetenz der Hefezellen.

Durchführung

Zunächst werden für eine Vorkultur 20 ml YPD-Medium (+ Glukose) in einem Schikanekolben mit Hefezellen des Stammes Y190 angeimpft und über Nacht auf dem Rundschtüttler bei 30°C inkubiert. Am nächsten Tag wird eine Hauptkultur von 100-500 ml YPD-Medium (+ Glukose) mit der Vorkultur auf eine OD_{600nm} von ca. 0,2 angeimpft. Die Hefen werden für 3-4 Stunden bei 30°C auf dem Rundschtüttler inkubiert, bis sie eine OD_{600nm} von 0,6-0,8 erreicht haben. Die Kultur wird dann für 5 min bei 1500 x g und RT abzentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Pellet mit 25 ml A. bidest gewaschen. Anschließend folgt eine erneute Zentrifugation unter den oben genannten Bedingungen. Der Überstand wird erneut verworfen und das Pellet in 5-25 ml 50% (w/v) PEG 4000 resuspendiert bis eine homogene Hefesuspension entstanden ist. Die kompetenten Hefezellen können nun für die Transformation verwendet werden.

4.3.2 Kotransformation von Hefen

Bei einer Transformation wird Plasmid DNA in die Hefezellen eingebracht. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Kotransformationen durchgeführt, wobei die Hefen in einem Schritt mit zwei verschiedenen Plasmiden – einem *prey*- und einem *bait*-Plasmid – transformiert wurden. Diese beiden Plasmide werden im Folgenden exemplarisch als Plasmid 1 und Plasmid 2 bezeichnet.

Durchführung

Für die Transformation werden pro Ansatz folgende Komponenten vorgelegt und auf Eis inkubiert:

- 5 µl Plasmid DNA 1 (0,5-1 µg *bait*-Plasmid)
- 5 µl Plasmid DNA 2 (0,5-1 µg *prey*-Plasmid)
- 5 µl *herring testes carrier*-DNA (10 mg/ml)

Zu jedem Ansatz werden je 360 µl der Hefesuspension, 54 µl 1 M Lithiumacetat und 68 µl A. bidest gegeben. Der Ansatz wird gut gemischt und für 30 min auf dem Rundschtüttler bei 30°C und 250 rpm inkubiert. Anschließend folgt der Hitzeschock bei 42°C ebenfalls 30 min inkubiert. Nach einem Zentrifugationsschritt für 3 min bei 1500 x g und RT wird der Überstand möglichst vollständig abgenommen und das Hefepellet in 200 µl A. bidest aufgenommen. Pro Ansatz (200 µl) werden jeweils 100 µl auf zwei verschiedene SD-Agarplatten ausgestrichen.

- **SD/-Trp/-Leu-Platten** zur Kontrolle der Plasmidaufnahme
- **SD/-Trp/-Leu/-His/+ 50 mM 3AT-Platten** zur Überprüfung der Interaktion

Diese Platten werden 2 bis 4 Tage im Brutschrank bei 30°C inkubiert.

4.3.3 β -Galaktosidase-Filtertest zur Bestätigung von Protein/Proteininteraktionen

Der β -Galaktosidase-Filtertest wird zur Bestätigung einer Protein/Proteininteraktion durchgeführt. Er beruht auf der Expression des Reportergens *lacZ* (vgl. 4.3). Dieses Reportergen wurde aus *E. coli* isoliert und kodiert für das Enzym β -Galaktosidase. Die β -Galaktosidase katalysiert die Reaktion von X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galaktopyranosid) zu

einem sichtbaren, blauen Farbstoff. Die Intensität dieser Blaufärbung korreliert mit der Stärke der Protein/Proteininteraktion.

Durchführung

Für die Durchführung des β -Galaktosidase-Filtertests müssen die Selektionsplatten (SD/-Trp/-Leu/-His/+ 3AT) für ca. 2-5 Tage bei 30°C inkubiert worden sein.

Zunächst werden entsprechend der Anzahl der zu testenden Selektionsplatten Petrischalen (\varnothing 10 cm) mit einem Filterpapier (\varnothing 8 cm) versehen und bereitgestellt. Die β -Gal-Testlösung (100 ml Z-Puffer, 1,67 ml X-Gal-Stammlösung, 270 μ l β -Mercaptoethanol) wird stets frisch angesetzt. Auf jedes Filterpapier werden 2 ml Testlösung gegeben.

Je Ansatz wird ein weiteres Filterpapier mit einem wasserunlöslichen Stift beschriftet. Dieses Filterpapier wird, mit der beschrifteten Seite nach oben, auf die jeweilige Selektionsplatte gedrückt, etwas angerieben und mit der Pinzette wieder abgezogen. Es sollten nun am Filterpapier deutlich sichtbar Kolonien haften geblieben sein. Dieses wird für etwa 10 sec in flüssigen Stickstoff getaucht, damit die Zellwand der Hefen aufbricht. Nachdem das Filterpapier an der Luft etwas angetaut ist, wird es mit den Hefezellen auf der Oberseite luftblasenfrei auf eines der zuvor getränkten Filterpapiere gelegt. Die Filter werden anschließend bei RT für 2-12 Stunden unter dem Abzug inkubiert. Je nach β -Galaktosidaseaktivität tritt eine mehr oder weniger intensive Blaufärbung der Hefekolonien nach unterschiedlicher Inkubationsdauer auf. Diese Blaufärbung lässt Rückschlüsse auf die Stärke der Protein/Proteininteraktion zu.

4.4. Expression rekombinanter Proteine in eukaryotischen Zellen

Der Vorteil der Expression in Säugerzellen ist, dass die rekombinanten Proteine korrekt gefaltet und posttranslational modifiziert werden können. Durch den Einsatz von Deletionsmutanten lässt sich der Einfluss einzelner Domänen auf die Interaktion oder auch die Lokalisation des Proteins untersuchen. Dafür werden die eukaryotischen Zellen zunächst transient transfiziert.

Bei der transienten Transfektion nimmt die Zelle die fremde Plasmid DNA auf, integriert sie jedoch im Gegensatz zur stabilen Transfektion nicht in ihr Genom. Nach einigen Tagen geht diese neue DNA wieder verloren. Während dieser Zeit unterliegt sie jedoch den Regulationsmechanismen der Zelle, die auch die Expression zelleigener Gene steuern. Durch den Einsatz eines starken viralen Promotors kommt es zu einer Überexpression der eingeschleusten Plasmid DNA in der transfizierten Zelle, so dass eine große Menge des gewünschten Proteins

exprimiert wird. Zu diesem Zweck wurden im Rahmen dieser Arbeit sogenannte *shuttle*-Plasmidkonstrukte (pSV-Konstrukte) verwendet, die einerseits in *E. coli* problemlos vermehrt werden und deren kodierende cDNA-Insertionen anschließend mit Hilfe des viralen Promotors SV40 in der Zelle exprimiert werden können. Nach der Expression der Proteine werden entweder Zellextrakte hergestellt oder es werden Immunfluoreszenzanalysen durchgeführt. Die Zellextrakte können mit Hilfe von einer Zytosol-Membranfraktionierung oder einer Triton X-114-Extraktion weiter analysiert werden. Die Durchführung der verschiedenen Methoden ist im Folgenden erläutert. Das Fließschema in der Abbildung 4.3 verdeutlicht den Ablauf der Methoden, wie sie in der vorliegenden Arbeit eingesetzt wurden.

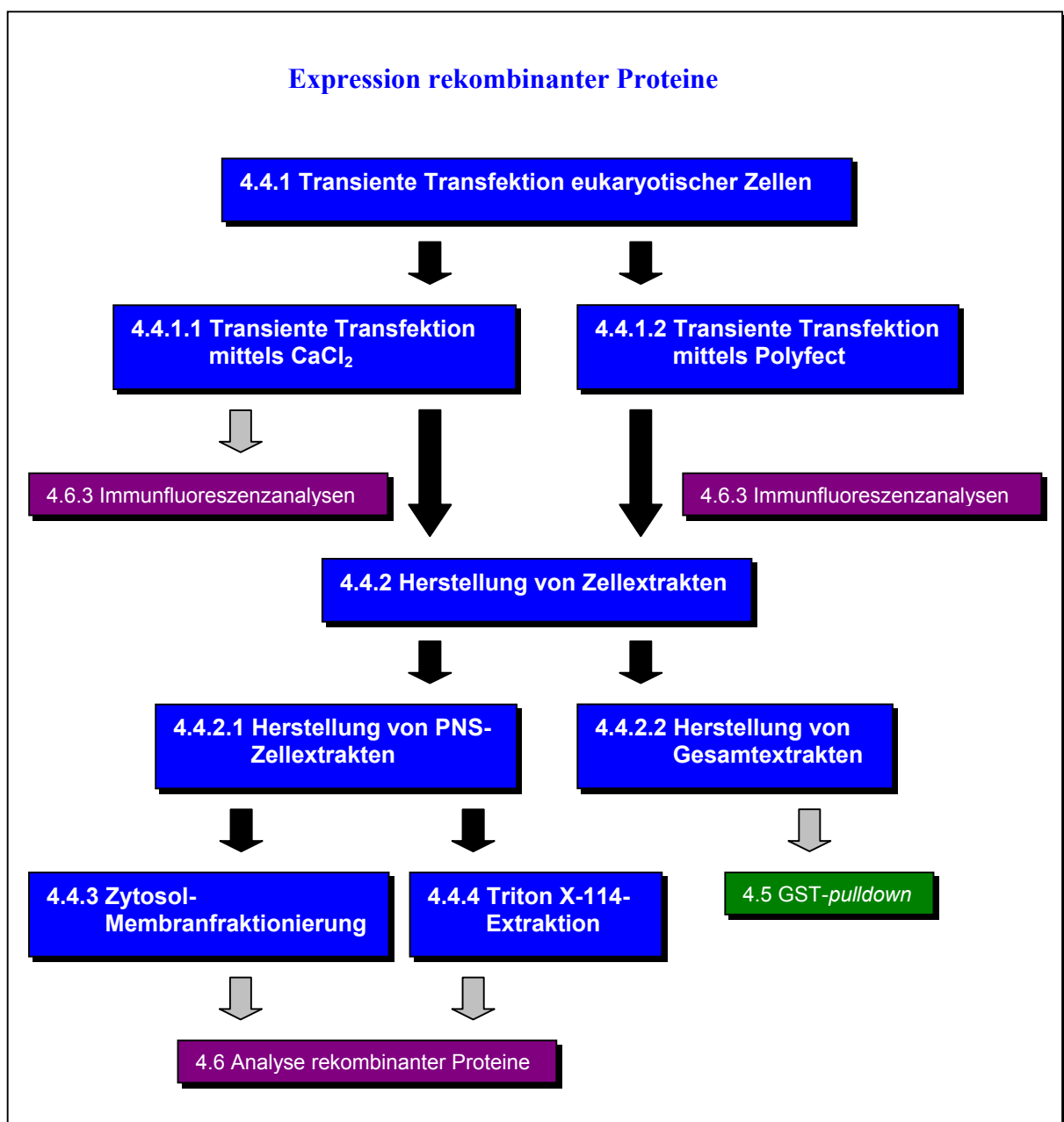


Abb. 4.3: Schematischer Ablauf der Expression von rekombinanten Proteinen

4.4.1 Transiente Transfektion eukaryotischer Zellen

Zur Transfektion von Zelllinien gibt es verschiedene Möglichkeiten: Es gibt z.B. die Transfektion mit Hilfe der Elektroporation oder auch die Lipofektion, bei der die DNA in Liposomen verpackt und in die Zelle eingebracht wird.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die transiente Transfektion von BHK-21 (*baby hamster kidney*)- und HeLa SS6-Zellen zum einen mit Hilfe der Calcium-Phosphat-DNA-Präzipitationsmethode nach Graham und van der Eb durchgeführt (Graham & van der Eb, 1973). Zum anderen wurde das Transfektionsreagenz „PolyFect“ der Firma Qiagen GmbH (Hilden) eingesetzt. Beide Methoden werden im Folgenden erläutert.

4.4.1.1 Transiente Transfektion nach der Calcium-Phosphat-DNA-Präzipitationsmethode

Bei der Calcium-Phosphat-DNA-Präzipitationsmethode nach Graham & van der Eb werden durch die Zugabe von Calcium kleine Präzipitate hergestellt, indem sich das Calcium an den „Phosphat-Rücken“ der DNA legt. Dieses Gemisch wird auf die zu transfizierenden Zellen gegeben. Die Aufnahme der DNA in die Zellen erfolgt mittels Endozytose. Diese Aufnahme kann durch einen Glycerinschock unterstützt werden, da durch die Zugabe von Glycerin die Zellmembran aufquillt.

Durchführung

Für eine Transfektion wird zunächst eine konfluent bewachsene Kulturschale (\varnothing 10 cm) passagiert (vgl. 4.1.3). Um für die Transfektion am folgenden Tag *semi*-konfluent bewachsene Kulturschalen zu erhalten, werden BHK-21-Zellen in einer Dichte von ca. 3×10^5 bzw. HeLa SS6-Zellen in einer Dichte von ca. 1×10^6 auf Kulturschalen (\varnothing 10 cm) ausgesät, die über Nacht bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert werden.

Am nächsten Morgen wird für die Transfektion pro Gewebekulturschale (\varnothing 10 cm) folgender Ansatz hergestellt:

- | | |
|---|----------------|
| • 2x HBS | 750 μ l |
| • Plasmid DNA (60-100 μ g) | x μ l |
| • 0,1x TE-Puffer (zusammen mit der Plasmid DNA) | ad 660 μ l |

Diese drei Komponenten werden in einem sterilen Röhrchen vorgelegt und gründlich auf dem Vibromix gemischt. Danach erfolgt innerhalb von 3 min unter ständigem Mischen die

tropfenweise Zugabe von 93 µl sterilem 2 M CaCl₂. Durch das kontinuierliche Mischen und die tropfenweise Zugabe entsteht ein sehr feines Präzipitat aus Plasmid DNA und Calciumphosphat-Kristallen. Dieser Transfektionsansatz wird für 30 min bei RT inkubiert und anschließend mit 12 ml DMEM (komplett) versetzt. Für eine kleine Gewebekulturschale (Ø 6 cm) wird jeweils ein Drittel der angegebenen Volumina eingesetzt. Die *semi*-konfluent bewachsenen Gewebekulturschalen werden mit PBS gewaschen, bevor der Transfektionsansatz zugefügt wird. Der feine Niederschlag aus Plasmid DNA und Calciumphosphat legt sich auf die Zellen und kann von diesen aufgenommen werden. Um die Aufnahme der Plasmid DNA zu unterstützen, erfolgt nach 4-6 Stunden ein Glyzerinschock (Parker & Stark, 1979). Dafür wird zunächst vorsichtig das Medium abgenommen und anschließend 4 ml 10% (v/v) Glycerin für 1 min auf die Zellen gegeben. Es ist darauf zu achten, die Zeit genau einzuhalten, da sonst die Zellen Schaden nehmen könnten. Nach dem Entfernen des Glycerins werden die Zellen zweimal vorsichtig mit PBS gewaschen und mit 10 ml frischem DMEM (komplett) versetzt. Anschließend werden die Zellen für 24 Stunden im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert.

4.4.1.2 Transiente Transfektion nach der PolyFect-Methode

Bei dieser Methode wird das käufliche Transfektionsreagenz „PolyFect“ der Firma Qiagen GmbH (Hilden) verwendet.

Dieses Reagenz bildet mit der eingesetzten Plasmid DNA einen Komplex, der eine netto positive Ladung aufweist. Dieser DNA-PolyFect-Komplex ist in der Lage, an die negativ geladenen Rezeptoren der Zelloberfläche (z.B. Glykoproteine) von eukaryotischen Zellen zu binden und anschließend in die Zelle aufgenommen zu werden. Dort fusioniert dieser mit den Endosomen der Zelle. Der Abbau dieses Komplexes wird verhindert, indem das Transfektionsreagenz eine gewisse Pufferwirkung besitzt, die zu einer pH-Wert Inhibition der lysosomalen Nukleasen führt. Durch diese Stabilität kann die intakte DNA in den Zellkern transportiert werden.

Die Durchführung erfolgte nach den Angaben des Protokolls für BHK- und HeLa-Zellen des Herstellers.

4.4.2 Herstellung von Zellextrakten

Um die rekombinanten und auch endogenen Proteine analysieren zu können, werden für die folgenden Methoden Zellextrakte benötigt. Dafür werden die Zellen 24 Stunden nach der Transfektion extrahiert. Es wurden im Rahmen dieser Arbeit zwei Arten von Zellextrakten

benötigt. Zum einen wurden *post nuclear supernatant* (PNS) –Zellextrakte und zum anderen Gesamtextrakte verwendet. Die Herstellung dieser Zellextrakte wird im Folgenden erläutert.

4.4.2.1 Herstellung von *post nuclear supernatant*-Extrakten

Für die Methoden der Zytosol-Membranfraktionierung und Triton X-114-Extraktion werden PNS-Zellextrakte gebraucht. Durch die schonende Aufarbeitung ohne Detergenzien werden die Proteine nicht aus der Zellstruktur heraus gelöst. Durch einen kurzen Zentrifugationsschritt werden nur die Zellkerne und große Zellrümpfer entfernt.

Durchführung

Nach einer Expressionszeit von 24-26 Stunden wird die Gewebekulturschale mit den transient transfizierten Zellen auf Eis inkubiert. Das Medium wird abgenommen und die Zellen zweimal vorsichtig mit eiskaltem PBS gewaschen. Anschließend werden die PBS-Reste entfernt. Es erfolgt die Zugabe von 300 µl CMF-Puffer (Sucrose 250 mM, HEPES/KOH pH 7,4 10 mM, EDTA 1 mM, Complete™ (EDTA-frei)) auf eine Gewebekulturschale (Ø 10 cm). Dieser Puffer enthält keine Detergenzien, so dass keine Membranproteine aus den Membranen herausgelöst werden. Daher können diese Extrakte optimal für Methoden wie zum Beispiel die Triton X-114-Extraktion und Zytosol-Membranfraktionierung eingesetzt werden. Bei einer Lagerung bei 4°C kann dieser Puffer ca. 4 Wochen verwendet werden.

Mit einem *rubber policeman* werden die Zellen von der Gewebekulturschale abgelöst und in ein Reaktionsgefäß überführt. Zum Aufschluss der Zellen werden diese zweimal in flüssigem Stickstoff schockgefrostet und wieder aufgetaut, bevor sie anschließend ca. 10 Mal durch eine 26G-Nadel gezogen werden. Es folgt ein kurzer Zentrifugationsschritt für 2 min bei 1000 x g und 4°C. Der Überstand (= PNS-Zellextrakt) wird in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Während der Extraktion ist zu beachten, dass die Zellextrakte stets auf Eis bzw. bei 4°C inkubiert werden, um einen möglichen Proteinabbau zu verhindern.

Für die Überprüfung der Proteinexpression wird ein Aliquot des Extraktes abgenommen. Der Rest dieser PNS-Extrakte wird bis zur weiteren Verarbeitung in einer Zytosol-Membranfraktionierung (siehe 4.4.3) oder Triton X-114-Extraktion (siehe 4.4.4) in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70°C gelagert.

4.4.2.2 Herstellung von Gesamtextrakten für GST-pulldowns

Für GST-pulldowns werden Gesamtextrakte der transfizierten Zellen benötigt. Daher wird hier im Gegensatz zu den PNS-Zellextrakten ein detergenzhaltiger Puffer verwendet, um die Proteine aus der Zellstruktur zu lösen und aufzuschließen.

Durchführung

Nach einer Expressionszeit von 24-26 Stunden wird die Gewebekulturschale mit den transient transfizierten Zellen auf Eis gestellt, das Medium abgenommen und die Zellen werden zweimal vorsichtig mit eiskaltem PBS gewaschen. Anschließend werden die PBS-Reste entfernt. Nach der Zugabe von 300 µl PD-Complete-Puffer (Tris/HCl pH 7,4 10 mM, NaCl 150 mM, MgCl₂ 1mM, CaCl₂ 1 mM, Triton X-100 0,2 %, Complete™ (EDTA-frei)) auf eine Gewebekulturschale (Ø 10 cm) werden die Zellen mit dem *rubber policeman* abgelöst, in ein Reaktionsgefäß überführt und homogenisiert.

Dieser erste Rohextrakt aus lysierten Zellen wird für 1 Stunde bei 16000 x g zentrifugiert. Anschließend wird der Überstand vorsichtig abgenommen. Wenn es sich bei den zu analysierenden Proteinen um detergenzlösliche Proteine handelt, kann das Pellet verworfen werden. Zur Überprüfung der Expression wird ein Aliquot dieses Gesamtextraktes abgenommen und der Rest wird schockgefrostet und bei -70°C eingefroren. Diese Extrakte werden für die Methode der GST-pulldowns genutzt, die unter Punkt 4.5 ausführlich erläutert wird.

4.4.3 Zytosol-Membranfraktionierung

Die Zytosol-Membranfraktionierung dient zur groben Lokalisation der Proteine in der Zelle. In einem Zentrifugationsschritt bei 100000 x g wird das Zytosol der Zellen von den Membranen getrennt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein modifiziertes Protokoll von Linstedt angewandt (Linstedt et al., 2000).

Durchführung

Zunächst werden 200µl des PNS-Zellextraktes in einem Reaktionsgefäß mit 10 µl 50% (w/v) Sucrose unterschichtet und anschließend für 15 min bei 14000 x g und 4°C zentrifugiert. In diesem Schritt werden die großen Membranen abgetrennt. Der Überstand wird zusammen mit dem Sucrosekissen für den Zentrifugationsschritt bei 100000 x g in ein Polycarbonatröhrchen überführt. Das Pellet mit den großen Membranen wird zunächst einmal vorsichtig mit 200 µl CMF-Puffer (Zusammensetzung vgl. 4.4.2.1) gewaschen, bevor es noch einmal für 15 min bei

14000 x g und 4°C zentrifugiert wird. Der Überstand wird verworfen und das gewaschene Pellet mit den großen Membranen in 25 µl 2x HKT-Puffer (Hepes/KOH pH 7,4 20 mM, KCl 200 mM, EDTA 2 mM, DTT 2 mM, Triton X-100 1 %, Complete™ (EDTA-frei)) gut resuspendiert.

Nachdem der Puffer durch Zugabe von 25 µl A. bidest auf die einfache Konzentration (1x HKT) verdünnt wurde, wird das Lysat für eine Stunde bei 16000 x g und 4°C zentrifugiert. Mit Hilfe dieses Puffers können Proteine, die detergenzlöslich sind, aus den Membranen herausgelöst werden. Nach der Zentrifugation befinden sich die Proteine der großen Membranen (= P14) im Überstand. Das Pellet wird verworfen.

Das Polycarbonatröhrchen mit dem Überstand des ersten Zentrifugationsschrittes (= S14) wird in der Ultrazentrifuge (Beckmann, SW60-Rotor) für eine Stunde bei 100000 x g und 4°C zentrifugiert. Anschließend werden 150 µl des Überstandes vorsichtig abgenommen (= S100). Diese Fraktion enthält die zytosolischen Proteine. Das Pellet mit den kleinen Membranen wird einmal mit 200 µl CMF-Puffer gewaschen und noch einmal für 15 min bei 100000 x g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und auch dieses Pellet wird, zum Herauslösen der detergenzlöslichen Membranproteine, in 25 µl 2x HKT-Puffer gut resuspendiert. Nachdem 25 µl A. bidest hinzugefügt wurden, wird dieses Lysat ebenfalls für eine Stunde bei 16000 x g und 4°C abzentrifugiert. Der Überstand (= P100) enthält die detergenzlöslichen Proteine der kleinen Membranen. Die Verteilung der Proteine zwischen den kleinen und großen Membranen sowie dem Zytosol kann in einem *Western Blot* (siehe 4.6.3) mit den entsprechenden Antikörpern analysiert werden.

4.4.4 Triton X-114-Extraktion

Durch eine Triton X-114-Extraktion kann indirekt die Prenylierung eines Proteins nachgewiesen werden. Bei dieser Methode der Phasentrennung nach Bordier wird ausgenutzt, dass die Mizellengröße von Triton exponentiell mit der Temperatur zunimmt, so dass es bei einer Temperatur von 30°C ausfällt (Bordier, 1981). Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Protokoll nach Bordier modifiziert.

Durchführung

Für die Triton X-114-Extraktion werden 200 µl PNS-Zelleextrakt mit 2 µl Triton X-114 (TX-114) versetzt und auf dem Vibromix gut durchmischt.

Für die anschließende Phasentrennung wird der Ansatz zunächst für 3 min im Eisbad inkubiert. Bei diesem Schritt lösen sich die Membranen im TX-114 auf. Es folgt eine Inkubation im

Wasserbad bei 30°C für 3 min, so dass das TX-114 ausfällt. Nachdem das Gemisch 3 min bei 25°C zentrifugiert wird, liegen eine untere TX-114 reiche Phase, die integrale Membranproteine enthält, und eine obere TX-114 arme Phase vor, in der sich die zytosolischen Proteine befinden. Da diese obere Phase ebenfalls TX-114 enthält, können auch in der oberen Phase Membranproteine detektiert werden.

Der Überstand (TX-114 arme Phase) wird abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt (\ddot{U}_1). Die viskose, untere Phase (TX-114 reich) wird mit 200 μ l CMF-Puffer (Zusammensetzung vgl. 4.4.2.1) versetzt und gut vermischt (P_1). Es folgt eine erneute Phasentrennung mit den gleichen Schritten wie oben beschrieben. Diese Wiederholung kann als „Waschschritt“ angesehen werden.

Nach der Zentrifugation sind in den beiden Ansätzen \ddot{U}_1 und P_1 erneut zwei Phasen erkennbar. Es zeigt sich, dass nach einer Zugabe von 2 μ l Triton X-114 genug Detergenz für zwei Phasentrennungen vorhanden ist.

Vom Ansatz \ddot{U}_1 wird die obere, TX-114 arme Phase abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt (\ddot{U}_2). Diesem Ansatz \ddot{U}_2 werden noch einmal 2 μ l TX-114 zugesetzt und das Ganze gut gemischt. Die untere Phase des Ansatzes \ddot{U}_1 wird verworfen.

Vom Ansatz P_1 wird die obere Phase verworfen und die viskose, TX-114 reiche Phase erneut mit 200 μ l CMF-Puffer versetzt (P_2).

Es werden noch zwei Waschschritte durchgeführt, wobei dem Ansatz bzw. Überstand \ddot{U}_3 kein Triton X-114 zugefügt wird. Nach insgesamt vier Phasentrennungen wird die TX-114 reiche Phase (P_4) in 50 μ l SDS-Probenpuffer aufgenommen. Damit ist diese Probe 4-fach konzentriert gegenüber der TX-114 armen Phase (\ddot{U}_4).

Die Ansätze (\ddot{U}_4 und P_4) können anschließend in einem *Western Blot* (siehe 4.6.3) überprüft werden. Wenn in der TX-114 reichen Phase bei Einsatz des entsprechenden Antikörpers ein Signal detektiert werden kann, ist dieses Protein im Fall der rab Proteine durch eine Prenylierung fähig, an die Membran zu binden.

4.5 *In vitro* Bindungsanalyse – GST-pulldown

Zur Verifizierung von Protein/Proteininteraktionen wurde im Rahmen dieser Arbeit unter anderem die Methode des GST-pulldown eingesetzt. Im Gegensatz zum *yeast two-hybrid*-System handelt es sich hierbei um eine *in vitro* Bindungsanalyse.

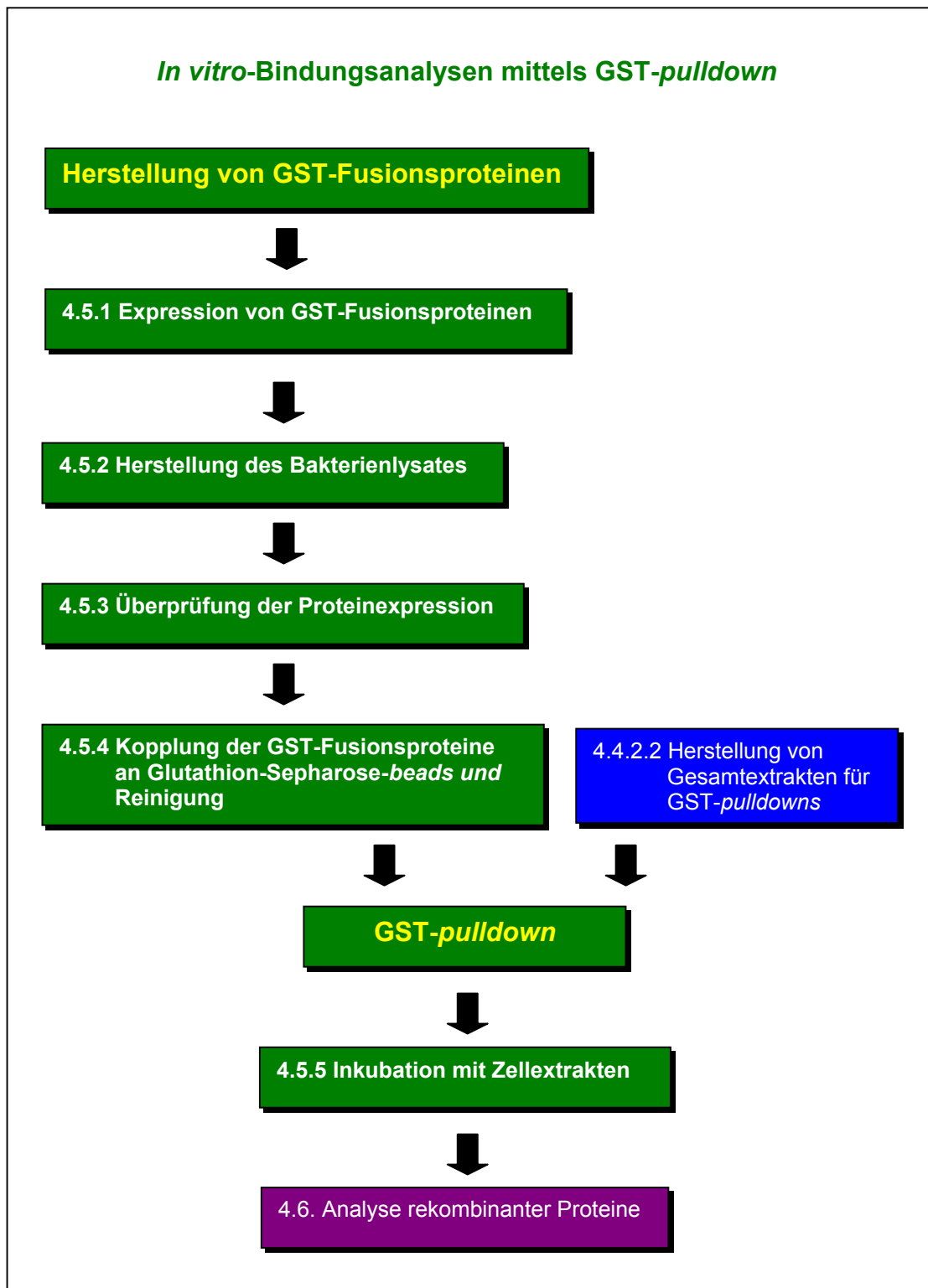


Abb. 4.4: Schematische Darstellung des Arbeitsablaufes eines GST-pulldowns

Bei dieser Methode wird eines der zu untersuchenden Interaktionsproteine als rekombinantes GST (Glutathion-S-Transferase)-Fusionsprotein in Bakterien exprimiert (Guan & Dixon, 1991). Dieses Fusionsprotein zeichnet sich durch eine hohe Affinität zu Glutathion aus und kann dadurch an spezielle Glutathion-Sepharose Partikel (*beads*) binden. Es folgt eine Inkubation mit

einem Zellextrakt, der einen möglichen überexprimierten Interaktionspartner des Fusionsproteins enthält. Die erfolgreiche Bindung eines Interaktionspartners an das GST-Fusionsprotein kann in einer SDS-Gelelektrophorese mit anschließender *Western Blot* Analyse nachgewiesen werden (siehe 4.6). Die Abbildung 4.4 zeigt zur Verdeutlichung eine schematische Abfolge der einzelnen Arbeitsschritte einer solchen *in vitro* Bindungsanalyse. Im Folgenden werden die einzelnen Schritte eines GST-pulldowns erläutert.

4.5.1 Expression von GST-Fusionsproteinen

Für die Expression von GST-Fusionsproteinen in Bakterien werden sogenannte pGEX-Vektoren verwendet. Diese enthalten das Glutathion-S-Transferase-Gen aus *Schistosoma japonicum* direkt vor der MCS (*multiple cloning site*), in die das Gen eines gewünschten Proteins inseriert werden kann. Die Expression des fusionierten Gens steht unter der Kontrolle eines *tac*-Promotors, der mit Hilfe des Lactose-Analogons Isopropylthio- β -Galaktopyranosid (IPTG) induziert werden kann. Das gebildete Fusionsprotein besitzt am N-Terminus einen ca. 26 kDa großen GST-Anteil.

Durchführung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde für die Bindungsanalyse *in vitro* das Plasmidkonstrukt pGEX PRA1 hergestellt und induziert. Dazu wird zunächst der *E. coli* Bakterienstamm BL21 mit der Plasmid DNA des obengenannten Plasmidkonstruktes sowie pGEX KG transformiert (vgl. 4.2.9). Nach Überprüfen der Transformation wird von je einem positiven Klon eine Glycerinkultur angelegt (vgl. 4.1).

Für die Expression des GST-Fusionsproteins wird zunächst eine Vorkultur angezogen. Dazu werden 5 ml LB-Medium mit 1% Glukose sowie Ampicillin mit der Glycerinkultur angeimpft und über Nacht auf dem Rundschtüttler bei 37°C und 250 rpm inkubiert. Am nächsten Tag werden 500 ml frisches LB-Medium (+Ampicillin) mit 3 ml der Übernachtskultur angeimpft und erneut bei 37°C und 250 rpm geschüttelt, bis eine OD_{600nm} von 0,6-0,8 erreicht ist. Vor der Induktion wird 1 ml der Bakteriensuspension entnommen, in einer Zentrifuge pelletiert und das Pellet bei -20°C eingefroren. Dieses nicht-induzierte Aliquot dient als Negativkontrolle.

Im Rahmen dieser Arbeit fand die Induktion der Proteinexpression durch die Zugabe von 250 μ l IPTG (1M) zur Bakterienkultur statt, so dass eine Endkonzentration von 0,5 mM erreicht wurde. Die Kultur wird für weitere 2,5 Stunden auf dem Rundschtüttler bei 37°C und 250 rpm inkubiert. Diese sind die Bedingungen, unter denen das Protein GST-PRA1 erfolgreich und in ausreichender Menge für die folgenden Versuche exprimiert werden konnte.

Unter den gleichen Bedingungen wurde auch der Vektor pGEX KG induziert, so dass allein das Glutathion-S-Transferase-Protein exprimiert wird. Dieses GST-Protein dient als Negativkontrolle bei den GST-pull-downs.

4.5.2 Herstellung des Bakterienlysates nach der Proteinexpression

Das tiefgefrorene Bakterienpellet einer 500 ml Kultur wird auf Eis aufgetaut und in 25 ml PBS/Complete resuspendiert, bis eine homogene Suspension entstanden ist. Zusätzlich werden die Bakterien zweimal in flüssigem Stickstoff schockgefrostet und wieder aufgetaut. Die Lyse der Zellen erfolgt durch Ultraschall. Im Anschluss daran wird der Suspension 1% Triton X-100 zugesetzt. Nach einer Inkubation von 30 min auf Eis wird das Bakterienlysate für 60 min bei 16000 x g pelletiert. Der Überstand mit den extrahierten Proteinen wird abgenommen und bis zur weiteren Verwendung bei -70°C eingefroren.

4.5.3 Überprüfung der Proteinexpression

Zur Überprüfung der Expression sowohl des Fusionsproteins als auch des GST-Proteins wird mit den Negativkontrollen, die vor der Induktion entnommen wurden, und einem Aliquot des jeweiligen aufgearbeiteten Bakterienlysates eine SDS-PAGE durchgeführt (siehe 4.6.1) und das Gel mit *Coomassie Brilliant Blue* angefärbt (siehe 4.6.2). Bei den induzierten Proben sollten zusätzliche Proteinbanden in der Größe des Fusionsproteins bzw. des GST-Proteins im Gel sichtbar sein.

4.5.4 Kopplung der GST-Fusionsproteine an Glutathion-Sepharose beads und Reinigung

In diesem Schritt wird das GST-Fusionsprotein bzw. für die Negativkontrolle das GST-Protein an die Glutathion-Sepharose beads der Firma Amersham Biosciences (Freiburg) gebunden. Zunächst werden nach Angaben des Herstellers 665 µl Originalbeads in einem 2 ml Reaktionsgefäß abzentrifugiert, so dass sich ein „Bettvolumen“ von 500 µl beads ergibt. Diese werden anschließend 4-5 mal mit PBS gewaschen. Anschließend werden 1,5 ml PBS zugesetzt, so dass sich eine Lösung mit einer Konzentration von 25% (25% slurry) ergibt, und gut gemischt. Dieses Gemisch ist ca. 4 Wochen haltbar.

Kopplung und Reinigung

Bei der Kopplung werden in einem 15 ml Röhrchen 40 µl Glutathion-Sepharose *beads* (25% *slurry*) mit Bakterienlysat versetzt. Zunächst werden verschiedene Volumina an Bakterienlysat eingesetzt, um mittels BSA auf einem anschließenden mit Coomassie Blue gefärbten SDS-Polyacrylamidgel (siehe 4.6.1) die Menge an GST bzw. Fusionsprotein im Bakterienlysat abschätzen zu können. Dieses ist wichtig, um innerhalb eines *pulldowns* äquivalente Mengen des GST und des Fusionsproteins einsetzen zu können. Die einzusetzenden Volumina können sehr unterschiedlich sein, so dass zum Ausgleich beide Ansätze mit PBS + 1% Triton X-100 auf 500 µl aufgefüllt werden.

Für die Kopplung werden die Ansätze anschließend über Nacht bei 4°C im Rotator inkubiert. Danach werden die Ansätze 3 min bei 1000 x g zentrifugiert, so dass die *beads* pelletiert werden. Die Überstände werden abgenommen und es folgen drei Waschschriffe mit PD-Puffer (vgl. 4.4.2.2). Dabei wird der Puffer auf die *beads* gegeben, der Ansatz kurz gemischt, abzentrifugiert und der Überstand vorsichtig abgesaugt. Nach dem letzten Waschschriff kann die Inkubation mit den Zellextrakten erfolgen, die mögliche Interaktionspartner enthalten.

4.5.5 Inkubation mit Zellextrakten

Ca. 10 µg des GST-Fusionsproteins bzw. ca. 15 µg des GST-Proteins werden mit Zellextrakten versetzt. Diese Zellextrakte enthalten äquivalente Mengen an überexprimierten Proteinen. Die Volumina werden mit PD-Complete-Puffer (vgl.4.4.2.2) auf 400 µl aufgefüllt und für 4 Stunden bei 4°C im Rotator inkubiert. Anschließend werden die Ansätze mit PD-Puffer ohne Complete™ gewaschen, um alle unspezifischen Bindungen an die Sepharose *beads* und alle überschüssigen Proteine zu entfernen. Nach dem letzten Waschschriff wird der Überstand möglichst vollständig abgesaugt, die Ansätze mit je 13 µl 2 x SDS-Probenpuffer versetzt und für 5 min bei 95°C unter Schütteln denaturiert. In einer abschließenden Zentrifugation werden die Sepharose *beads* pelletiert, und der Überstand mit dem GST-Fusionsprotein sowie möglichen Interaktionspartnern kann in einer SDS-PAGE mit anschließendem *Western Blot* analysiert werden (siehe 4.6).

4.6 Analyse rekombinanter Proteine

Die Expression rekombinanter und endogener Proteine kann zum einen direkt in den transient transfizierten Zellen mit Hilfe einer Immunfluoreszenz analysiert werden. Zum anderen kann eine SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese durchgeführt werden, in der alle Proteine des

Zellextraktes ihrem Molekulargewicht entsprechend aufgetrennt werden. Dieses Polyacrylamidgel kann auf verschiedene Weise behandelt werden. Mit einer irreversiblen Färbung können zum Beispiel Proteinbanden nachgewiesen werden. Mit dieser Färbung ist es jedoch nicht möglich, ein spezifisches Protein nachzuweisen, da alle Proteinbanden auf dem Polyacrylamidgel angefärbt werden. Die Expression eines bestimmten Proteins nach einer transienten Transfektion, sowie die Verteilung eines Proteins nach einer Zytosol-Membranfraktionierung oder einer Triton X-114-Extraktion kann in einem *Western Blot* mit einem spezifischen Antikörper nachgewiesen werden. Dazu werden die Proteine vom Polyacrylamidgel auf eine Membran geblottet und diese einer Behandlung mit Antikörpern, die gegen das Protein gerichtet sind, unterzogen. Mit Hilfe einer abschließenden Chemilumineszenz-Reaktion kann ein Signal des entsprechenden Proteins auf einem Röntgenfilm detektiert werden. Die einzelnen Methoden werden im Folgenden erläutert.

4.6.1 Auftrennung von Proteinen mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinextrakten geht auf eine Methode von Laemmli zurück (Laemmli, 1970). Es handelt sich um eine SDS-PAGE (SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese) in einem diskontinuierlichen Puffersystem, mit deren Hilfe die Proteine unter denaturierenden Bedingungen nach ihrem Molekulargewicht getrennt werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde zur Auftrennung ein vertikales Flachbettgel aus Polyacrylamid genutzt. Eine genaue Beschreibung der Elektrophorese ist meiner Diplomarbeit zu entnehmen (Köster, 1999).

Das Polyacrylamidgel kann nach der Elektrophorese direkt mit *Coomassie Brilliant Blue* R250 gefärbt werden. Dazu wird das Gel nach der Auftrennung der Proteine zunächst 10-20 min in *Coomassie Brilliant Blue* R250 gefärbt. Danach wird das Gel für 20-30 min in Entfärber I und abschließend in Entfärber II inkubiert, bis die einzelnen Proteinbanden gut sichtbar sind. Das Gel wird daraufhin für 30 min. in A. bidest gewässert und unter Vakuum bei 65°C für eine Stunde getrocknet. Angaben zu dem Färber und den Entfärbern sind der Diplomarbeit von Indra Brüggemann zu entnehmen (Brüggemann, 2002).

4.6.2 Western Blot Analyse

Die gelelektrophoretisch getrennten Proteine werden zur weiteren Analyse nach dem von Kyshe und Anderson entwickelten *semi-dry*-Elektroblotting-Verfahren vom Polyacrylamidgel auf eine

PVDF (Polyvinylidendifluorid)-Membran (Immobilon P, Millipore, Eschborn) transferiert (Kyshe & Anderson, 1984). Diese Membran besitzt gegenüber einer Nitrocellulose-Membran den Vorteil, dass sie ohne Probleme getrocknet und aufbewahrt werden kann. Eine ausführliche Beschreibung dieser Methode ist meiner Diplomarbeit zu entnehmen (Köster, 1999).

Mit spezifischen Antikörpern kann die Expression rekombinanter und endogener Proteine nachgewiesen werden. Dazu wird die Membran für eine Stunde mit einem primären Antikörper, der gegen das jeweilige Protein gerichtet ist, unter leichtem Schütteln, bei RT inkubiert. Der Antikörper wird in 5% (w/v) Milchpulver/PBS/Tween entsprechend verdünnt.

Antikörperverdünnung

• anti-Calnexin	1: 500
• anti-HA (16B12)	1:1000
• anti-myc (9E10)	1: 50
• anti-p115	1: 500
• anti-rab1b	1: 50
• anti-Syntaxin 6	1: 500

Dann wird die Membran mit PBS/Tween für 30 min gewaschen, wobei der Waschpuffer mindestens sechsmal gewechselt werden sollte. Es folgt die Inkubation (30 min., RT) mit dem sekundären Antikörper (anti-Maus IgG (HRP) 1:1000). Anschließend wird gründlich mit PBS/Tween gewaschen.

Die Detektion des Proteins erfolgt in einer Chemolumineszenz-Reaktion („SuperSignal® West Pico Chemiluminescent Substrate“ bzw. das „Uptilight HRP Blot Substrate“) nach Protokoll des jeweiligen Herstellers und die Membran wird auf einem Röntgenfilm (Fuji Medical Röntgenfilm, Fuji Photo Film Co., Japan) exponiert. Das Enzym HRP setzt das angebotene Substrat um, so dass in einer Chemolumineszenz-Reaktion Licht entsteht, das den Röntgenfilm schwärzt.

4.6.3 Immunfluoreszenzanalysen

Endogene und rekombinante Proteine, die nach einer transienten Transfektion in der Zelle exprimiert werden, können entweder als EGFP-Fusionsproteine direkt oder nach einer Behandlung mit spezifischen Antikörpern indirekt in der Zelle mit Hilfe der Immunfluoreszenz lokalisiert werden. Der mit einem fluoreszierenden Farbstoff gekoppelte sekundäre Antikörper

kann durch Anregung mit Licht einer bestimmten Wellenlänge und der damit verbundenen Emission das gesuchte Protein als farbiges Signal im Fluoreszenzmikroskop sichtbar machen.

Die Kombination unterschiedlicher Farbmarkierungen erlaubt auch parallele Lokalisationsanalysen zweier Proteine.

Durchführung

Vorbereitung der Deckgläschen

Deckgläschen werden zum Entfetten 3-4 Stunden in Aceton gelegt, anschließend mit Seidenpapier trockengetupft und über Nacht in 2% (w/v) Na_2CO_3 -Lösung inkubiert. Am nächsten Tag werden die Deckgläschen vorsichtig fünf- bis sechsmal mit A. bidest gewaschen, bevor sie einzeln in eine mit Filterpapier ausgelegte Petrischale gelegt werden. Zur Sterilisierung wird die Schale über Nacht mit offenem Deckel unter die UV-Lampe einer sterilen Werkbank gestellt.

Immunfluoreszenzanalysen

Für die Immunfluoreszenzen werden die vorbehandelten sterilen Deckgläschen beim Passagieren der Zellen für eine Transfektion (vgl. 4.4.1) vor dem Aussäen vorsichtig mit einer sterilen Pinzette in die Gewebekulturschale gelegt. Die Zellen wachsen somit auf den Deckgläschen und werden ca. 24 Stunden nach der Transfektion und Expression der Proteine vorsichtig mit einer sterilen Pinzette aus der Gewebekulturschale in eine 6-Lochplatte überführt, in der je Loch 3 ml kaltes PBS vorgelegt worden sind. Daraufhin werden die Deckgläschen dreimal mit PBS gewaschen und anschließend für die Immunfluoreszenz mit folgenden Lösungen behandelt:

Zur Fixierung werden die Zellen für 15 min in eiskaltem 4% PFA auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgt eine weitere Inkubation in eiskaltem 8% PFA für 30 min bei RT. Wichtig ist, dass bei den Arbeiten mit Paraformaldehyd unter dem Abzug gearbeitet und dieses in gesonderten Abfallbehältern gesammelt wird.

Alle weiteren Schritte erfolgen bei RT. Das PFA wird abgenommen und die Zellen dreimal mit PBS (RT) gewaschen. Zur Absättigung der reaktiven Aldehydgruppen des PFA werden ca. 3 ml 50 mM Ammoniumchlorid zu den Deckgläschen gegeben und für 10 min inkubiert. Es folgen drei Waschschritte mit PBS, bevor die Zellen permeabilisiert werden. Dieses geschieht durch eine Inkubation für 5 min in 0,2% TX-100/PBS. Danach werden die Zellen erneut dreimal mit PBS gewaschen.

Waschpuffer		
• PBS		
• 0,2% Gelatine/PBS		0,2% (w/v) Gelatine in PBS
Fixieren		
• 4% PFA	4% (w/v) Paraformaldehyd in 250 mM Hepes (pH 7,4)	
• 8% PFA	8% (w/v) Paraformaldehyd in 250 mM Hepes (pH 7,4)	
Neutralisieren		
• 50 mM Ammoniumchlorid-Lösung		
Permeabilisieren		
• 0,2% TX-100/PBS		0,2% (v/v) Triton X-100 in PBS
Blocken		
• 10% Ziegen Serum/Gelatine/PBS		10% Ziegen Serum in 0,2% Gelatine/PBS

Vor der Antikörper-Inkubation werden die Zellen dreimal mit 0,2% Gelatine/PBS gewaschen und anschließend 15 min in 10% Ziegen Serum/Gelatine/PBS inkubiert.

Nach diesem Abblocken folgt die Inkubation mit spezifischen, primären Antikörpern. Dazu wird der Antikörper in 0,2% Gelatine/PBS verdünnt. Zusätzlich werden dieser Verdünnung 2% Ziegen Serum zugesetzt.

<u>Antikörperverdünnung</u>		
• anti-HA (16B12)	1:1000	} monoklonale Maus-Antikörper
• anti-rab1b (1E7)	1: 50	
• anti- p115	1: 50	
• anti-GM130	1: 200	
• anti-Giantin	1:1000	} polyklonaler Kaninchen-Antikörper

Nach einer Inkubationszeit von 20-30 min wird die Antikörperlösung entfernt und die Zellen werden dreimal mit 0,2% Gelatine/PBS gewaschen, bevor der sekundäre Antikörper auf die Zellen gegeben wird. Auch dieser Antikörper wird in 0,2% Gelatine/PBS plus 2% Ziegen Serum verdünnt. Er bindet an den primären Antikörper und ist außerdem mit einem fluoreszierenden Farbstoff gekoppelt. Auch der sekundäre Antikörper wird für 20 min inkubiert. Dabei ist es

wichtig, die Zellen möglichst vor Licht zu schützen, um ein Ausbleichen der Präparate zu verhindern.

Antikörperverdünnung

- anti-Maus IgG – Alexa 594 1:1000
- anti-Kaninchen IgG – Alexa 488 1:1000
- anti-Kaninchen IgG – Alexa 568 1:1000

Parallel dazu können die Zellen auch mit Farbstoffen zur Markierung von Zellstrukturen behandelt werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden DAPI zur Kennzeichnung des Zellkerns und Phalloidin zur Kennzeichnung des Zytoskeletts eingesetzt. Diese Farbstoffe können zusammen dem zweiten Antikörper inkubiert werden.

Farbstoffe

- DAPI 1:2000
- Phalloidin – Alexa 594 1:1000

Nach der Inkubation des sekundären Antikörpers werden die Zellen dreimal mit 0,2% Gelatine/PBS und dreimal mit PBS gewaschen, bevor die Deckgläschen zum Entsalzen kurz in A. bidest getaucht werden. Im Anschluss werden sie mit der von Zellen bewachsenen Seite nach unten in 8-10 µl Moviol eingebettet, das über Nacht bei 4°C abgedunkelt aushärtet. Die Auswertung erfolgt mit Hilfe eines konfokalen Fluoreszenz-Mikroskops.

5. Ergebnisse

Bisher sind in Säugerzellen mehr als 60 rab Proteine identifiziert worden. Wie bereits in der Einleitung ausführlich beschrieben, sind diese auf verschiedenen Zellkompartimenten lokalisiert und regulieren dort den intrazellulären Transport. Das Protein rab1b ist in den Vesikeltransport vom ER zum *cis*-Golgi-Apparat und im *intra*-Golgi-Transport involviert (Tisdale et al., 1992; Nuoffer et al., 1994; Martinez & Goud, 1998; Segev, 2001). Daher unterscheidet es sich in der Lokalisation von anderen rab Proteinen wie zum Beispiel rab5 oder rab7, die in der Endozytose eine Rolle spielen (Stenmark & Olkkonen, 2001). Die unterschiedliche Lokalisation der rab Proteine deutet darauf hin, dass ein oder mehrere Strukturbereiche für die spezifische Lokalisation jedes rab Proteins verantwortlich sind. Bis heute ist jedoch nicht bekannt, welche Struktur motive des Proteins rab1b für dessen spezifische Lokalisation verantwortlich sind.

Auch die Bindung verschiedener Interaktionspartner scheint an bestimmte Strukturmerkmale des rab Proteins gebunden zu sein. So interagiert jedes rab Protein zum einen mit generellen Regulatorproteinen wie REP oder GDI, zum anderen geht jedes rab Protein Bindungen zu Effektorproteinen ein, die mit einem oder mehreren rab Proteinen interagieren. Daher lässt sich vermuten, dass für diese Interaktionen verschiedene Struktur motive verantwortlich sind. Im Rahmen dieser Arbeit sollten verschiedene Deletionsmutanten und Chimären des Proteins rab1b hergestellt und anschließend in verschiedenen Studien zur Lokalisation und Protein/Proteininteraktion eingesetzt werden. Außerdem sollte der Interaktionspartner PRA1 im Hinblick auf seine Membranassoziation sowie seine Rab- und Nukleotid-Spezifität näher untersucht werden, da die Aussagen hierzu widersprüchlich sind (Martincic et al., 1997; Bucci et al., 1999; Abdul-Ghani et al., 2000; Figueroa et al., 2001).

5.1 Herstellung von Deletionsmutanten des rab1b

Zunächst sollten Deletionsmutanten des rab1b Proteins hergestellt werden, denen spezifische Struktur motive am N- bzw. C-Terminus, die potentiell für die Lokalisation des rab1b Proteins und dessen Interaktion mit anderen Proteinen wichtig sein könnten, fehlen. Die verschiedenen Deletionsmutanten sind in Abbildung 5.1 zusammengefasst.

Die Mutanten rab1b wt Δ N1 und rab1b wt Δ N1 Δ C3 lagen bereits vor und wurden mir freundlicherweise von Dr. M. Bayer zur Verfügung gestellt.

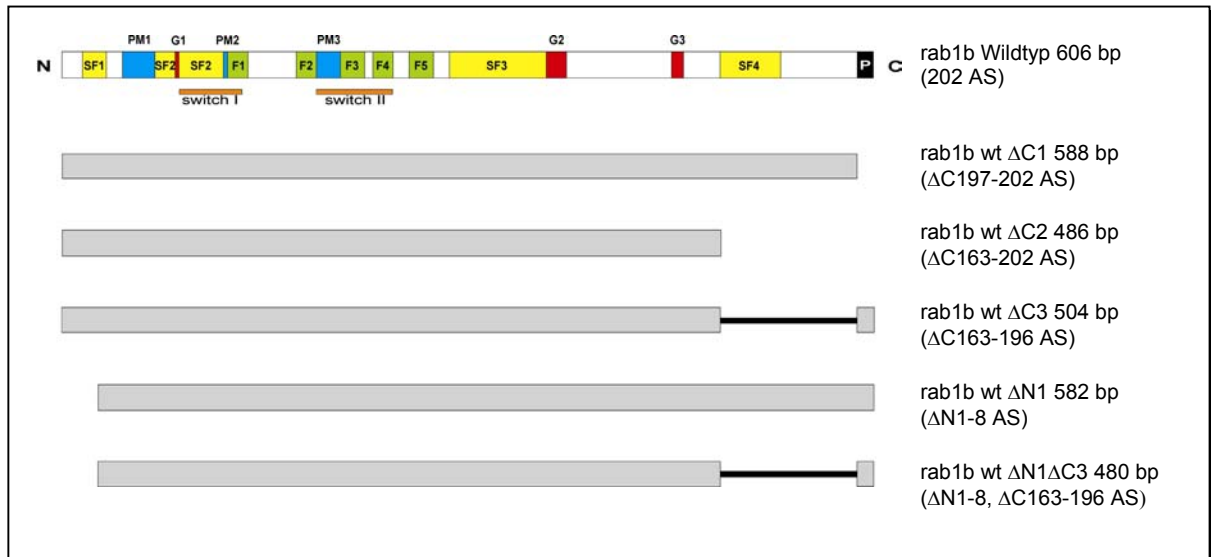


Abb. 5.1: Deletionsmutanten für die Bindungsanalysen

Schematische Darstellung der Deletionsmutanten im Vergleich zum rab1b Wildtyp.

N: Amino-Terminus; **C:** Carboxy-Terminus; **G1-G3:** Guanosin-Bindungsmotiv; **PM1-PM3:** Phosphat/Mg²⁺-Bindungsmotiv; **F1-F5:** *rab family* Region; **SF1-SF4:** *rab subfamily* Region; **P:** Isoprenylierungsmotiv; **switch I-II:** Regionen mit starken Konformationsänderungen während GTP-Hydrolyse und Bindung; **Δ:** deletiert; **AS:** Aminosäuren; **bp:** Basenpaare

Die verkürzten cDNA Fragmente des rab1b wurden mittels einer PCR hergestellt, wobei als *template* die cDNA des rab1b Wildtyps (wt) aus der Ratte verwendet wurde. Die cDNA Fragmente sollten bei der Amplifikation mit den Schnittstellen *NdeI* am N-Terminus und *BamHI* am C-Terminus versehen werden, damit sie für Untersuchungen in verschiedene Expressionsvektoren inkloniert werden konnten. Daher wurden für die PCR *primer* mit überhängenden *NdeI*- bzw. *BamHI* Schnittstellen konstruiert.

Für die PCR wurden die in Tabelle 5.1. dargestellten *templates* und *primer* eingesetzt.

Tab. 5.1: Primer und templates für die Amplifikation der rab1b cDNA Fragmente

Die cDNA Fragmente der Deletionsmutanten des rab1b Proteins wurden mit den aufgeführten *primern* und *templates* amplifiziert.

cDNA Fragment	template	primer forward	primer reverse
rab1b wt ΔC1	pSV42HA rab1b wt	F1	R1
rab1b wt ΔC2	pSV42HA rab1b wt	F1	R2
rab1b wt ΔC3	pSV42HA rab1b wt	F1	R3

Die PCR wurde, wie unter 4.2.2 beschrieben, durchgeführt, und die PCR-Produkte anschließend in einem 1,5%igen Agarosegel aufgetrennt (vgl. 4.2.6.). Das Ergebnis ist in Abbildung 5.2. dargestellt.

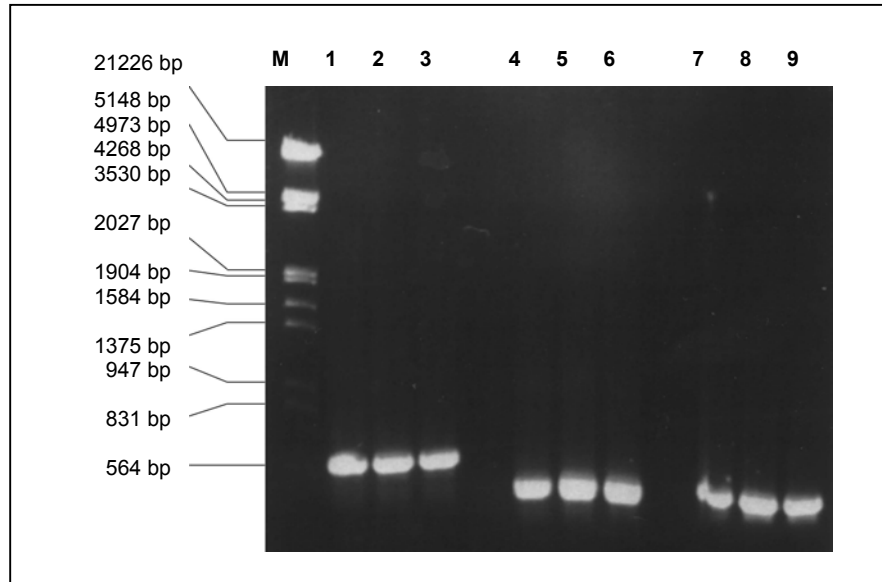


Abb. 5.2: Amplifikation der cDNA Fragmente für die rab1b Deletionsmutanten

Dargestellt ist die Auftrennung der PCR-Produkte aus der Amplifikation auf einem 1,5%igen Agarosegel. Es wurde jeweils der komplette PCR-Ansatz (50 μ l) auf je drei Spuren verteilt. **M:** λ *EcoRI/HindIII* Marker; **Spur 1-3:** rab1b wt Δ C1 cDNA Fragment (ca. 600 bp); **Spur 4-6:** rab1b wt Δ C2 cDNA Fragment (ca. 500 bp); **Spur 7-9:** rab1b wt Δ C3 cDNA Fragment (ca. 500 bp)

Pro Amplifikation war jeweils nur eine Bande in der entsprechenden Größe zu erkennen, so dass davon ausgegangen werden konnte, dass es sich um das jeweils gewünschte Fragment handelt. Die amplifizierte cDNA wurde mit Hilfe des „QIAquick Gel Extraction Kits“ aus dem Gel isoliert (vgl.4.2.3), mit den Enzymen *NdeI* und *BamHI* restringiert (vgl. 4.2.5) und anschließend in den, mit gleichen Restriktionsenzymen geschnittenen, *bait*-Vektor pAS 2-1 des *yeast two-hybrid*-Systems eingefügt (vgl. 4.2). Die Klonierung wurde mittels einer Restriktion (*NdeI/BamHI*) des rekombinierten Vektors überprüft. Zur Kontrolle wurde anschließend jeweils ein Klon mit den Sequenzierungsprimern *bait* 1F und *bait* 2R sequenziert. Die drei cDNA Fragmente rab1b wt Δ C1, rab1b wt Δ C2 und rab1b wt Δ C3 entsprachen der jeweils erwarteten Sequenz.

Für die Analysen in Säugerzellen wurden die drei in der PCR hergestellten Fragmente in den HA-getagten Expressionsvektor pSV42 subkloniert. Auch die im pAS 2-1 Vektor zur Verfügung gestellten Fragmente rab1b wt Δ N1 und rab1b wt Δ N1 Δ C3 wurden in diesen Expressionsvektor subkloniert.

Für die Bindungsanalysen mit dem *yeast two-hybrid*-System sowie für die Expression in Säugerzellen lagen somit die in Abbildung 5.1. dargestellten Deletionsmutanten jeweils im *bait* Vektor pAS 2-1 und *shuttle* Plasmid pSV42HA vor.

5.2 Herstellung von rab1b Chimären

Neben den Deletionsmutanten sollten Chimären hergestellt werden, bei denen einzelne Strukturbereiche des rab1b Proteins durch äquivalente Strukturbereiche des rab6a bzw. rhoA Proteins ersetzt werden. Dabei sollte die Tatsache genutzt werden, dass alle kleinen GTPasen konservierte Sequenzbereiche aufweisen, so dass die einzelnen Sequenzen des N- und C-Terminus der verschiedenen Proteine jeweils über das konservierte Strukturmotiv G2 bzw. G3 zusammen gefügt werden können. Die verschiedenen Chimären sind in Abbildung 5.3 zusammengefasst.

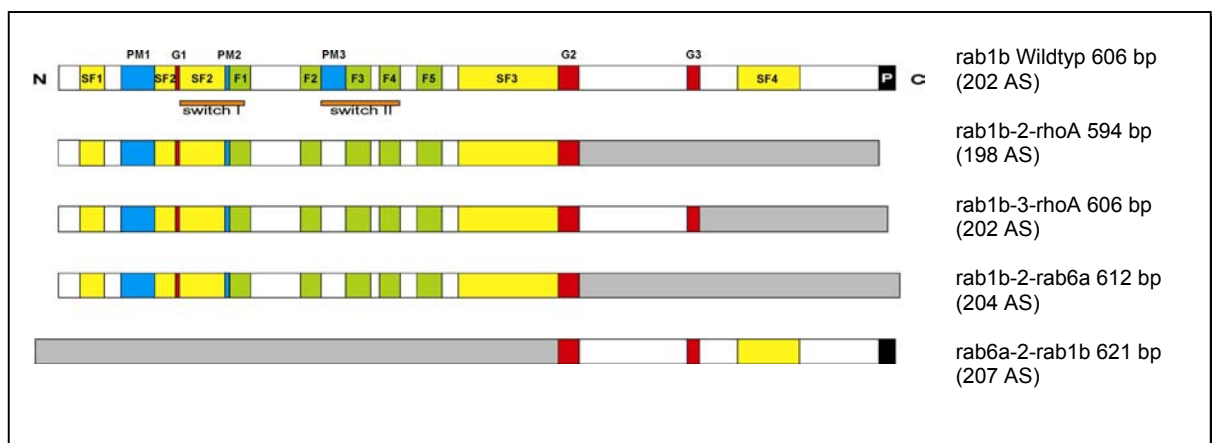


Abb. 5.3: Chimären für die Bindungsanalysen

Schematische Darstellung der verschiedenen hergestellten Chimären im Vergleich zum rab1b Wildtyp.

N: Amino-Terminus; **C:** Carboxy-Terminus; **G1-G3:** Guanosin-Bindungsmotiv; **PM1-PM3:** Phosphat/Mg²⁺-Bindungsmotiv; **F1-F5:** *rab family* Region; **SF1-SF4:** *rab subfamily* Region; **P:** Isoprenylierungsmotiv; **switch I-II:** Regionen mit starken Konformationsänderungen während GTP-Hydrolyse und Bindung; **bp:** Basenpaare; **AS:** Aminosäuren

Es sollte eine Klonierung in zwei Schritten durchgeführt werden. In dem ersten Schritt sollte das N-terminale Fragment über die Schnittstellen *NdeI/BamHI* in den *bait*-Vektor pAS 2-1 inkloniert werden. In einem zweiten Schritt sollte der rekombinierte Vektor über die eingefügten Schnittstellen *BglII/BamHI* (rab1b-2-rhoA, rab1b-2-rab6a, rab6a-2-rab1b) bzw. *Bsp681/BamHI* (rab1b-3-rhoA) restringiert werden, um über diese Schnittstellen das jeweilige C-terminale Fragment einfügen zu können. In der Tabelle 5.2 sind die Fragmentgrößen der einzelnen Chimärenbereiche dargestellt.

Tab. 5.2: Übersicht über die Fragmentgrößen der Chimären

In dieser Tabelle sind die Fragmentgrößen der N-terminalen und C-terminalen Bereiche der Chimären sowie die *full length* Größe der Chimäre aufgeführt.

Chimäre	<i>full-length</i> Größe	N-Terminus	C-Terminus
rab1b-2-rhoA	594 bp (198 AS)	rab1b 369 bp (1-123 AS)	rhoA 225 bp (120-194 AS)
rab1b-3-rhoA	606 bp (202 AS)	rab1b 456 bp (1-152 AS)	rhoA 150 bp (145-194 AS)
rab1b-2-rab6a	612 bp (204 AS)	rab1b 369 bp (1-123 AS)	rab6a 243 bp (129-209 AS)
rab6a-2-rab1b	621 bp (207 AS)	rab6a 387 bp (1-129 AS)	rab1b 234 bp (125-202 AS)

Für diese 2-Schritt-Klonierung mussten zunächst die einzelnen cDNA Fragmente mittels einer PCR amplifiziert werden. Um die Schnittstellen für die Klonierung zu erhalten, wurden für die N-terminalen Fragmente *primer* mit überhängenden *NdeI* und *BamHI* Schnittstellen konstruiert. Um das zweite Fragment einfügen zu können, wurde hinter die *BamHI* Schnittstelle des reversen *primers* eine *BglII* bzw. für die rab1b-3-rhoA Chimäre eine *Bsp68I* Schnittstelle gesetzt.

Als *templates* wurden die cDNA des rab1b Wildtyps aus der Ratte, die cDNA des humanen rab6a Wildtyps und die humane rhoA cDNA (Wildtyp) verwendet.

Für die PCR wurden die in Tabelle 5.3 dargestellten *templates* und *primer* eingesetzt.

Tab. 5.3: Primer und templates für die Amplifikation der cDNA Fragmente der Chimären

Die cDNA Fragmente der Chimären wurden mit Hilfe der aufgeführten *primer* und *templates* amplifiziert.

Chimäre	cDNA Fragment	<i>template</i>	<i>primer forward</i>	<i>primer reverse</i>
rab1b-2-rhoA	rab1b (N-Terminus)	pSV42HA rab1b wt	RAB1B-N-F	RAB1B-4-R
	rhoA (C-Terminus)	pGEX rhoA wt	RHO-4-F	RHO-C-R
rab1b-3-rhoA	rab1b (N-Terminus)	pSV42HA rab1b wt	RAB1B-N-F	RAB1B-5-R
	rhoA (C-Terminus)	pGEX rhoA wt	RHO-5-F	RHO-C-R
rab1b-2-rab6a	rab1b (N-Terminus)	pSV42HA rab1b wt	RAB1B-N-F	RAB1B-4-R
	rab6a (C-Terminus)	pAS rab6a wt	RAB6-4-F	RAB6-C-R
rab6a-2-rab1b	rab6a (N-Terminus)	pAS rab6a wt	RAB6-N-F	RAB6-4-R
	rab1b (C-Terminus)	pSV42HA rab1b wt	RAB1B-4-F	RAB1B-C-R

Die PCR wurde, wie beschrieben, durchgeführt (vgl. 4.2.2) und die PCR-Produkte wurden anschließend in einem 1,5%igen Agarosegel aufgetrennt (vgl.4.2.6). Das Ergebnis ist in Abbildung 5.4 dargestellt

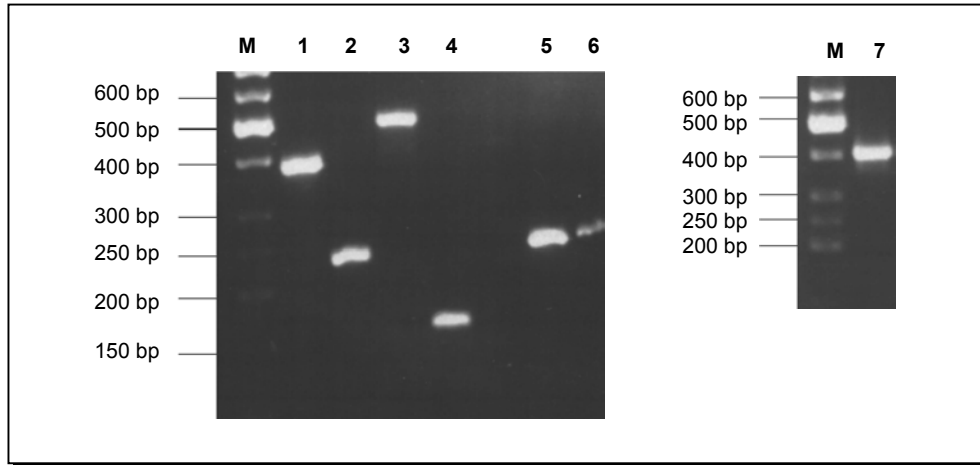


Abb. 5.4: Amplifikation der cDNA Fragmente für die Chimären

Dargestellt ist die Auftrennung der PCR-Produkte aus der Amplifikation auf einem 1,5%igen Agarosegel. Es wurden jeweils 6 µl pro Spur aufgetragen.

M: 50 bp DNA Leiter; **Spur 1:** N-terminales, kurzes rab1b Fragment (ca. 400 bp); **Spur 2:** C-terminales, langes rhoA Fragment (ca. 240 bp); **Spur 3:** N-terminales, langes rab1b Fragment (ca. 500 bp); **Spur 4:** C-terminales, kurzes rhoA Fragment (ca. 160 bp); **Spur 5:** C-terminales rab1b Fragment (ca. 250 bp); **Spur 6:** C-terminales rab6a Fragment (ca. 250 bp); **Spur 7:** N-terminales rab6a Fragment (ca. 400 bp)

Pro Spur war nur eine Bande zu erkennen, die der jeweils erwarteten Größe entsprach. Daher wurden die PCR-Produkte mit dem „QIAquick Nucleotide Removal Kit“ aufgereinigt (vgl. 4.2.3).

Anschließend wurden die N-terminalen Fragmente mit den Enzymen *NdeI* und *BamHI* restringiert (vgl. 4.2.5) und in den, mit gleichen Restriktionsenzymen geschnittenen, HA-getagten Expressionsvektor pSV42 eingefügt (vgl. 4.2). Jeweils ein positiver Klon mit dem N-terminalen Fragment (rab1b-2-N, rab1b-3-N, rab6a-2-N) wurde zur Kontrolle mit den Sequenzierungsprimern Sp6 und T7 sequenziert.

Für den zweiten Schritt wurden diese rekombinierten Vektoren erneut restringiert. Bis auf den Vektor, der das lange N-terminale rab1b Fragment für die Chimäre rab1b-3-rhoA enthält, wurden die Vektoren mit den Restriktionsenzymen *BglIII/BamHI* linearisiert. Für den Vektor der rab1b-3-rhoA Chimäre wurden *Bsp681/BamHI* verwendet. In diese restringierten Vektoren wurde das jeweilige C-terminale Fragment eingefügt (siehe Tab. 5.2). Die Klonierung wurde in einem Restriktionsverdau überprüft und jeweils ein positiver Klon wurde anschließend zur Kontrolle mit den Sequenzierungsprimern Sp6 und T7 sequenziert.

Für Analysen mit dem *yeast two-hybrid*-System wurde die komplette cDNA der jeweiligen Chimäre über *NdeI/BamHI* in den *bait* Vektor pAS 2-1 subkloniert.

Für die Bindungsanalysen mit dem *yeast two-hybrid*-System sowie für die Expression in Säugerzellen lagen somit die in Abbildung 5.3 dargestellten Chimären jeweils im *bait* Vektor pAS 2-1 und im *shuttle* Plasmid pSV42HA vor.

5.3. Lokalisation des Proteins rab1b

Mit Hilfe der Deletionsmutanten und Chimären des rab1b Proteins sollte untersucht werden, welche Struktur motive des rab1b Proteins die Membranassoziation bzw. intrazelluläre Lokalisation des Proteins beeinflussen. Dazu sollten die Mutanten in Säugerzellen exprimiert werden und die Zellextrakte anschließend zur Überprüfung der Membranassoziation in eine Zellfraktionierung eingesetzt werden. In einer Immunfluoreszenzanalyse sollte die intrazelluläre Lokalisation der Deletionsmutanten und Chimären im Vergleich zum Wildtyp des rab1b Proteins untersucht werden.

5.3.1 Expression der Deletionsmutanten und Chimären in HeLa SS6-Zellen

Zunächst musste überprüft werden, ob sich die Deletionsmutanten und Chimären in Säugerzellen exprimieren lassen.

Der Vorteil der Expression rekombinanter Proteine in Säugerzellen liegt darin, dass die exprimierten Proteine eine authentische zelluläre Umgebung vorfinden, in der sie korrekt gefaltet und posttranslational modifiziert werden können. Außerdem besteht die Möglichkeit, die rekombinanten Proteine in Analysen zur Membranassoziation und Lokalisation einsetzen zu können. Es werden Zellen transient transfiziert und die rekombinanten Proteine anschließend in einer *Western Blot* Analyse mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden transient exprimierte Proteine mit sogenannten Epitop-*tags* versehen. Das HA-Epitop bewirkt eine zusätzliche aminoternale Insertion der Aminosäuren M-A-Y-P-Y-D-V-P-D-Y-A-S-L-G-G-H, wobei das eigentliche HA-Epitop in fetten Buchstaben dargestellt ist. Gegen dieses Epitop wird der monoklonale Antikörper 16B12 eingesetzt. Durch das aminoternale myc-Epitop werden die Aminosäuren M-E-E-K-L-I-S-E-D-L-H eingefügt, welches mit Hilfe des monoklonalen Antikörpers 9E10 nachgewiesen werden kann. Beide Epitope ermöglichen zum einen die deutliche Unterscheidung von rekombinanten und

endogenen zellulären Proteinen. Zum anderen können auch rekombinante Proteine nachgewiesen werden, gegen die kein spezifischer Antikörper zur Verfügung steht.

Im Rahmen dieser Arbeit sollten die im Expressionsvektor pSV42HA vorliegenden Deletionsmutanten und Chimären (vgl. 5.1 u. 5.2) durch transiente Transfektionen in HeLa SS6-Zellen eingebracht werden. Der pSV42-Vektor besitzt einen frühen SV40-Promotor, ein SV40-Intron sowie eine SV40-Polyadenylierungsstelle. Nach einer transienten Transfektion wird über den SV40-Promotor die Überexpression der einzelnen rekombinanten Proteine gesteuert.

In mehreren Versuchen wurden sowohl die Expressionsdauer als auch die Transfektionsmethode variiert, um die Transfektionsbedingungen zu optimieren. Schließlich wurde die transiente Transfektion unter folgenden Bedingungen durchgeführt.

HeLa SS6-Zellen wurden mit Hilfe des Transfektionsreagenz PolyFect mit den pSV42HA Plasmidkonstrukten der rab1b Deletionsmutanten und Chimären transient transfiziert (vgl. 4.4.1.2). Nach 24-26 Stunden konnten die sogenannten *post nuclear supernatant* (PNS) Zellextrakte hergestellt werden (vgl. 4.4.2.1) und die Expression der rekombinanten Proteine in einer *Western Blot* Analyse mit dem HA-Antikörper 16B12 nachgewiesen werden. Das Ergebnis dieser *Western Blot* Analyse ist in Abbildung 5.5 dargestellt.

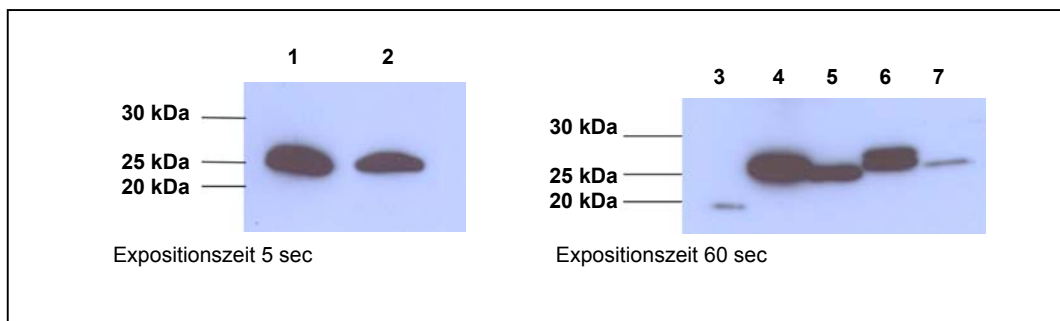


Abb. 5.5: Expression der rekombinanten rab1b Deletionsmutanten und Chimären

Auf einem 13 %igen SDS PAA-Gel wurden 10 μ l PNS-Zellextrakt der transient mit den pSV42HA Plasmidkonstrukten der Deletionsmutanten und Chimären transfizierten HeLa SS6-Zellen aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. In der *Western Blot* Analyse wurden zur Detektion der monoklonale Antikörper 16B12 (1:1000) und als sekundärer Antikörper HRP-gekoppeltes anti-Maus IgG (1:1000) eingesetzt. Die Chemilumineszenz-Reaktion erfolgte mit dem „Uptilight HRP Blot Substrate“.

Spur 1: PNS-Zellextrakt HA rab1b wt Δ C1; **Spur 2:** PNS-Zellextrakt HA rab1b wt Δ N1; **Spur 3:** PNS-Zellextrakt HA rab1b wt Δ C3; **Spur 4:** PNS-Zellextrakt HA rab1b-2-rhoA; **Spur 5:** PNS-Zellextrakt HA rab1b-3-rhoA; **Spur 6:** PNS-Zellextrakt HA rab1b-2-rab6a; **Spur 7:** PNS-Zellextrakt HA rab6a-2-rab1b

Es zeigte sich, dass die Deletionsmutanten rab1b wt Δ C1, rab1b wt Δ C3 und rab1b wt Δ N1 in den HeLa SS6-Zellen exprimiert werden können. Die Deletionsmutanten rab1b wt Δ C2 und rab1b wt Δ N1 Δ C3 konnten trotz Änderung verschiedener Parameter nicht exprimiert werden.

Der Wildtyp des Proteins rab1b besitzt laut Literatur eine Größe von 22,1 kDa (Touchot et al., 1989; Vielh et al., 1989). Die Mutanten des rab1b Proteins weisen eine Größe von ca. 25 kDa (rab1b wt Δ C1, rab1b wt Δ N1) auf. Da das HA-Epitop eine Größe von 2-3 kDa aufweist, entspricht dieses Ergebnis den Erwartungen. Die Deletionsmutante rab1b wt Δ C3, deren C-terminaler hypervariabler Bereich entfernt wurde, ist mit 20 kDa deutlich kleiner. Auffällig ist, dass die Proteine rab1b wt Δ C1 und rab1b wt Δ N1 schon nach einer Exposition von 5 sec. ein starkes Signal aufwiesen. Diesen beiden Mutanten fehlen jeweils weniger als zehn Aminosäuren im N- bzw. C-terminalen Bereich. Das stark verkürzte Protein rab1b wt Δ C3 zeigte im Vergleich dazu selbst nach einer Exposition von 60 sec. nur ein sehr schwaches Signal. Die Chimären konnten ebenfalls in den HeLa SS6-Zellen exprimiert werden. Die beiden rab/rhoA Chimären weisen eine Größe von ca. 25 kDa auf. Die rab6a-2-rab1b Chimäre ist mit ca. 26 kDa etwas größer. Dieses entspricht den Erwartungen, da der Wildtyp des Proteins rab6a sieben Aminosäuren mehr als der Wildtyp des rab1b Proteins besitzt. Die Chimären rab1b-2-rhoA, rab1b-3-rhoA und rab1b-2-rab6a wiesen nach einer Exposition von 60 sec. ein starkes Signal auf. Die Chimäre rab6a-2-rab1b zeigte im Vergleich dazu nach einer Exposition von 60 sec. ein schwaches Signal. Trotz der schwachen Expression der Deletionsmutante rab1b wt Δ C3 und der Chimäre rab6a-2-rab1b wurden sie in die weiteren Analysen zur Membranassoziation des rab1b Proteins einbezogen.

5.3.2 Analyse der Membranassoziation

Um zu zeigen, wie sich die Entfernung bzw. der Austausch definierter Struktur motive des rab1b Proteins auf dessen Membranassoziation auswirkt, sollten mit den Deletionsmutanten rab1b wt Δ C1, rab1b wt Δ N1 und rab1b wt Δ C3 sowie mit den Chimären rab1b-2-rhoA, rab1b-2-rab6a und rab6a-2-rab1b Zellfraktionierungen durchgeführt werden. Dabei werden zytosolische von membrangebundenen Proteinen getrennt. Zur Kontrolle wurde auch der Wildtyp des rab1b Proteins fraktioniert. Die Chimäre rab1b-3-rhoA wurde hier nicht eingesetzt, da die Chimäre rab1b-2-rhoA das Strukturmotiv RabSF4 der rab1b-3-rhoA Chimäre abdeckt.

Für die Zytosol-Membranfraktionierung wurden PNS-Zellextrakte aus transienten Transfektionen von HeLa SS6-Zellen eingesetzt (vgl.4.4.3) und in eine Zytosol und zwei Membranfraktionen getrennt. In der Zytosolfraktion (S100) finden sich die zytosolischen Proteine, in der ersten Membranfraktion (P14) die Proteine der großen Membranen und in der zweiten Membranfraktion (P100) die Proteine der kleinen Membranen. Die rekombinanten Proteine wurden anschließend in einer *Western Blot* Analyse mit dem Antikörper 16B12

nachgewiesen. Die Ergebnisse dieser Zytosol-Membranfraktionierung sind in Abbildung 5.6 dargestellt.

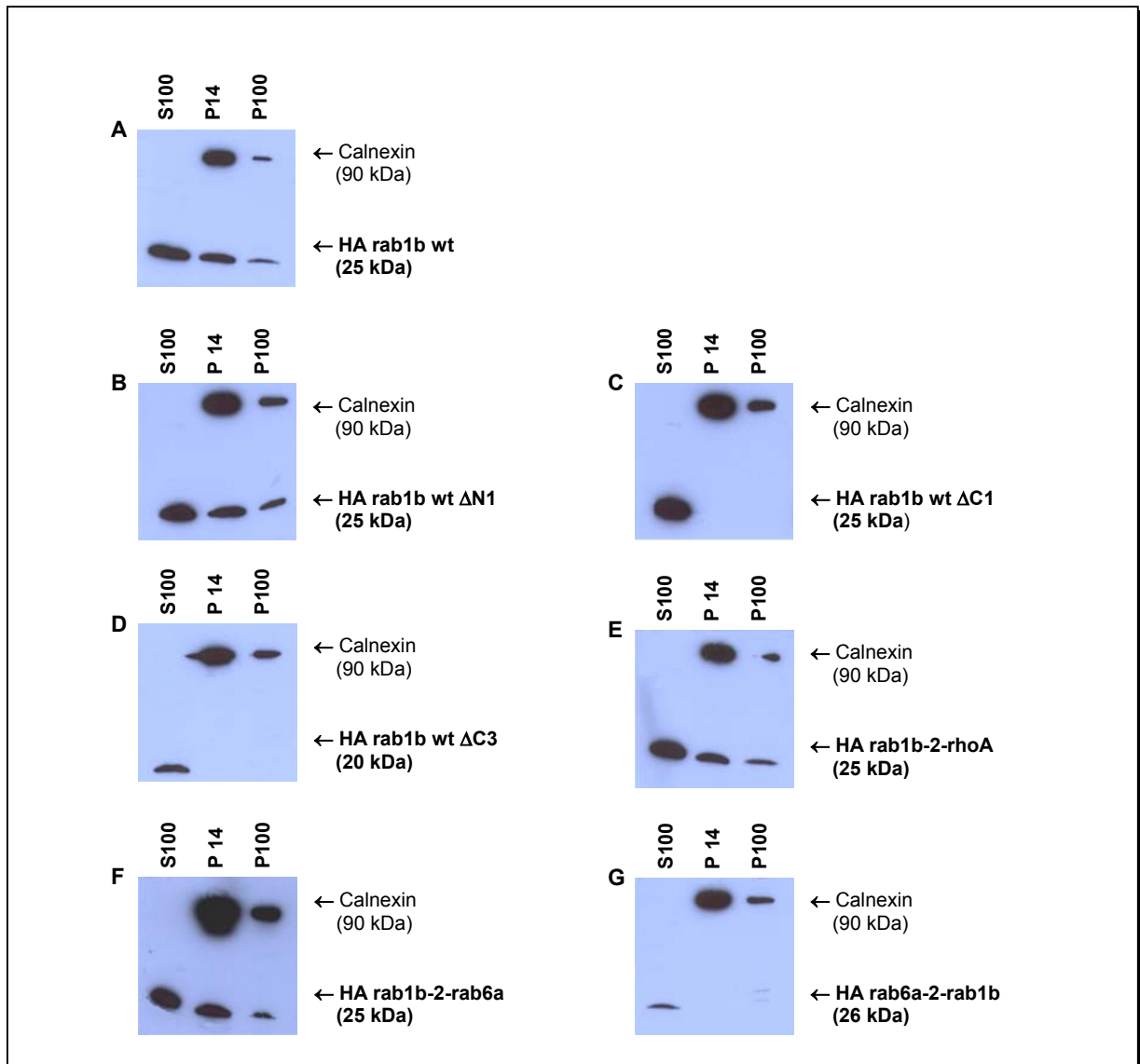


Abb. 5.6: Zytosol-Membranfraktionierung der rekombinanten rab1b Deletionsmutanten und Chimären

Mit den PNS-Zellextrakten der transient transfizierten HeLa SS6-Zellen wurde eine Zytosol-Membranfraktionierung durchgeführt. Die Fraktionen wurden in einem 13 %igen SDS PAA-Gel aufgetrennt, wobei jeweils äquivalente Mengen der einzelnen Fraktionen aufgetragen wurden. In der *Western Blot* Analyse wurden der gegen das HA-Epitop des rekombinanten Proteins gerichtete Antikörper 16B12 (1:1000) sowie der Calnexin-Antikörper (1:500) und als sekundärer Antikörper HRP-gekoppeltes anti-Maus IgG eingesetzt. Die Chemilumineszenz-Reaktion erfolgte mit dem „*Uptilight HRP Blot Substrate*“. **Exp.:** Expositionszeit; **S100:** Zytosolfraction; **P14:** Fraktion der großen Membranen; **P100:** Fraktion der kleinen Membranen; **A:** HA rab1b wt (Wildtyp) (Exp.: 60sec.); **B:** HA rab1b wt ΔN1 (Exp.: 30 sec.); **C:** HA rab1b wt ΔC1 (Exp.: 30 sec.); **D:** HA rab1b wt ΔC3 (Exp.: 60 sec.); **E:** HA rab1b-2-rhoA (Exp.: 180 sec.); **F:** HA rab1b-2-rab6a (Exp.: 180 sec.); **G:** HA rab6a-2-rab1b (Exp.: 300 sec.)

Zur Kontrolle der Membranfraktionen wurde außerdem das endogene Calnexin detektiert. Dabei handelt es sich um ein 90 kDa großes integrales Membranprotein, das primär im endoplasmatischen Retikulum lokalisiert ist. Es wird durch eine carboxyterminale

Transmembranregion in der Membran verankert, wodurch es sich nach dieser Zytosol-Membranfraktionierung nur in der Membranfraktion nachweisen lassen sollte. Durch die Detektion des Calnexins kann überprüft werden, ob die Aufarbeitung der Membranfraktion korrekt verlaufen ist. Dieses ist vor allem für die Zellfraktionierungen wichtig, in denen das rekombinante Protein nicht in den Membranfraktionen detektiert werden kann. Die Abbildung 5.6 der *Western Blot* Analyse zeigt, dass die Kontrollen der Fraktionierung in Ordnung waren. Das integrale Membranprotein Calnexin konnte in jeder Membranfraktion nachgewiesen werden. Damit kann davon ausgegangen werden, dass alle Membranfraktionen korrekt aufgearbeitet wurden.

Der Wildtyp des rab1b Proteins verhielt sich, wie erwartet. Das Protein war sowohl in der Zytosol als auch in den beiden Membranfraktionen zu detektieren, wobei die Zytosolfraktion das stärkste Signal zeigte. Dieses könnte auf die Überexpression des Proteins zurückzuführen sein.

Auch die Deletionsmutante rab1b wt Δ C1 diente der Kontrolle. Aufgrund des fehlenden Isoprenylierungsmotivs kann diese Mutante nicht prenyliert werden. Da die Isoprenylierung jedoch eine Voraussetzung für die Membranassoziation des rab1b Proteins ist, darf diese Mutante in beiden Membranfraktionen nicht nachweisbar sein. Da in der *Western Blot* Analyse ein starkes Signal nur in der Zytosolfraktion detektiert werden konnte, entspricht dieses Ergebnis den Erwartungen. Da die Deletionsmutante rab1b wt Δ N1 sowie die Chimären rab1b-2-rhoA und rab1b-2-rab6a wie der Wildtyp des rab1b Proteins sowohl in den Zytosol- als auch in den Membranfraktionen nachgewiesen werden konnten, lässt sich vermuten, dass die Deletion des hypervariablen Bereich am N-Terminus sowie der Austausch des Strukturbereiches RabSF4 am C-Terminus gegen den äquivalenten Bereich einer anderen rab bzw. rhoA GTPase keine Beeinträchtigung der Membranbindung des Proteins zeigen.

Die Chimäre rab6a-2-rab1b wurde in den HeLa SS6-Zellen, wie schon in Abbildung 5.5 gezeigt, sehr schwach exprimiert. Sie zeigte im Gegensatz zu den anderen Chimären trotz einer vergleichsweise langen Expositionszeit von 300 sec. ein kaum detektierbares Signal in der Membranfraktion P100. Auch das Signal in der Zytosolfraktion war trotz der langen Expositionszeit sehr schwach. Es könnte mehrere Gründe für das extrem schwache Signal in der Membranfraktionen P100 geben. Zum Beispiel könnte die Proteinmenge dieser Chimäre in den Membranfraktionen aufgrund der schwachen Expression unter der Nachweisgrenze liegen. Es besteht auch die Möglichkeit, dass das Protein nicht korrekt modifiziert wird.

Auch für die Deletionsmutante rab1b wt Δ C3 konnte ein Signal nur in der Zytosolfraktion nachgewiesen werden. Die nicht zu detektierende Membranassoziation könnte auch hier durch eine unkorrekte Modifizierung dieser Deletionsmutante verursacht werden. Möglich ist auch,

dass der deletierte hypervariable C-Terminus mit dem Strukturmotiv RabSF4 wichtig für eine Membranbindung des rab1b Proteins ist.

Deshalb sollte im nächsten Schritt die Isoprenylierung der Deletionsmutanten und aller Chimären überprüft werden. Dieses war auch im Hinblick auf spätere Analysen in Bezug auf die Interaktion mit dem Protein PRA1 von großer Bedeutung, denn diese posttranslationale Modifikation eines rab Proteins ist eine Voraussetzung für dessen Interaktion mit PRA1.

5.3.3 Analyse der posttranslationalen Modifikation

Mit Hilfe der Triton X-114-Extraktion sollte die Isoprenylierung der Deletionsmutanten sowie der Chimären des rab1b Proteins überprüft werden. Bei dieser Methode handelt es sich um einen indirekten Nachweis. Das Prinzip beruht darauf, dass sich nach der Zugabe des Detergenz Triton X-114 bei einer Temperatur von 30 °C zwei Phasen ausbilden. In der unteren, Triton X-114 reichen Phase (P) sammelt sich ein Großteil der lipid-modifizierten Proteine. Dort sind demnach nur prenylierte Proteine nachzuweisen. Die obere Triton X-114 arme Phase (Ü) beinhaltet die nicht-modifizierten, zytosolischen sowie einen Teil der modifizierten Proteine, da sich eine geringe Menge des Triton X-114 auch in dieser Phase befindet. Daher wird auch von einer Triton X-114 reichen und einer Triton X-114 armen Phase gesprochen. Durch eine anschließende Phasentrennung können die modifizierten Proteine in der unteren Phase von den restlichen Proteinen isoliert werden (Bordier, 1981).

Voraussetzung für die Prenylierung der Deletionsmutanten und Chimären von rab1b ist die Expression in Säugerzellen, da die rekombinanten Proteine aufgrund vorhandener Enzyme posttranslational modifiziert werden können.

Dazu wurden HeLa SS6-Zellen mit den pSV42HA Plasmidkonstrukten der Deletionsmutanten rab1b wt Δ C1, rab1b wt Δ N1, rab1b wt Δ C3, der Chimären rab1b-2-rhoA, rab1b-3-rhoA, rab1b-2-rab6a, rab6a-2-rab1b sowie zum Vergleich mit dem pSV42HA Plasmidkonstrukt des rab1b Wildtyps transient transfiziert (vgl. 4.4.1.2). Nach 25 Stunden wurden aus den transfizierten Zellen PNS-Zellextrakte hergestellt (vgl. 4.4.2.1) und anschließend der Triton X-114-Extraktion (vgl. 4.4.4) unterzogen. Zur Kontrolle der Membranfraktionen wurde in der *Western Blot* Analyse wie in der Zytosol-Membranfraktionierung (vgl. 5.3.2) neben den rekombinanten Proteinen wiederum das integrale Membranprotein Calnexin nachgewiesen. Die Ergebnisse sind in der Abbildung 5.7 dargestellt.

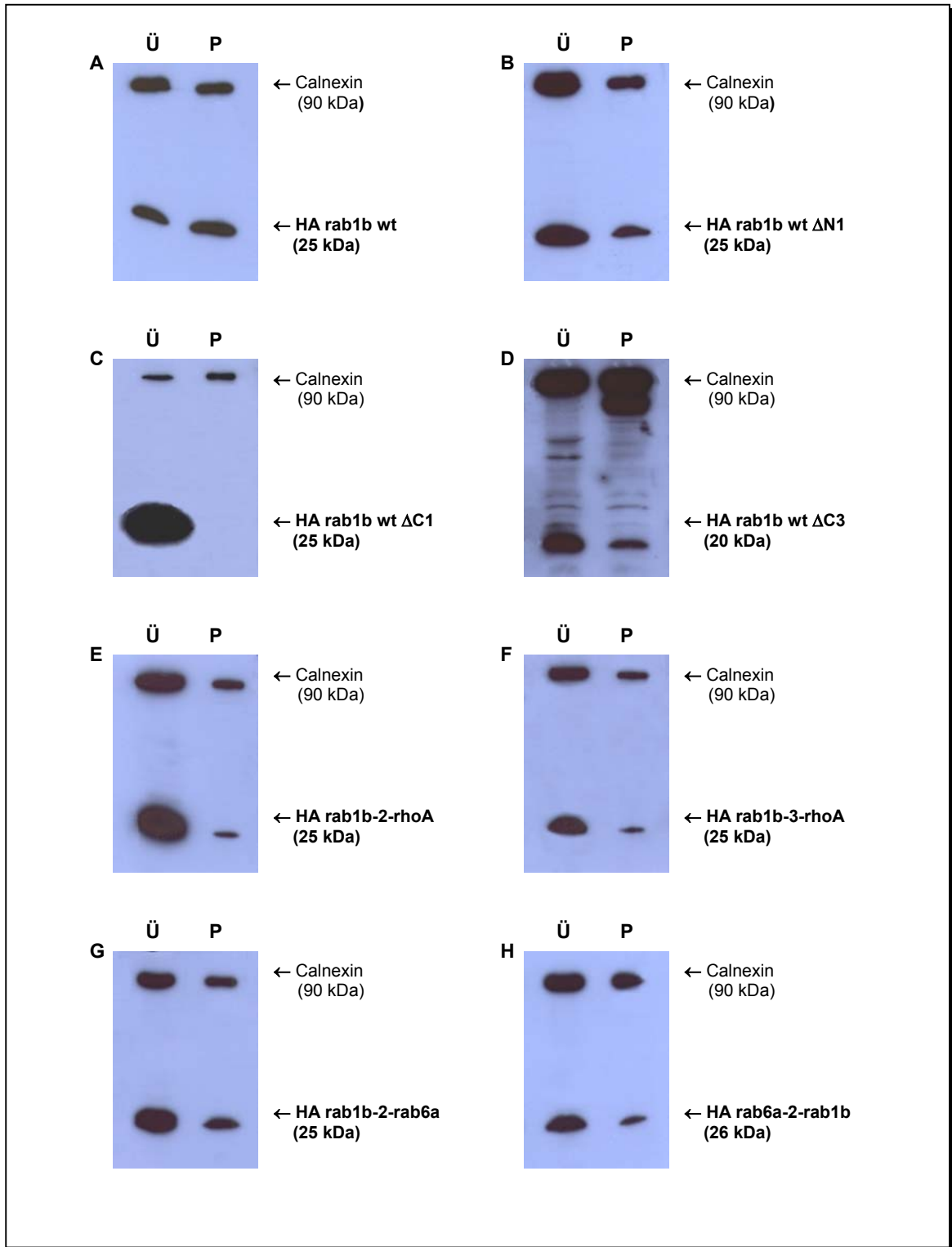


Abb. 5.7: Triton X-114-Extraktion der rekombinanten Deletionsmutanten und Chimären

Mit den PNS-Zellextrakten der transient transfizierten HeLa SS6-Zellen wurden Triton X-114-Extraktionen durchgeführt. Je 13 µl der Triton X-114 reichen bzw. Triton X-114 armen Phase wurden in einem 13 %igen SDS PAA-Gel aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. In der *Western Blot* Analyse wurden der HA-Antikörper 16B12 (1:1000) sowie anti-Calnexin (1:500) und als sekundärer Antikörper HRP-gekoppeltes anti-Maus IgG (1:1000) eingesetzt. Die Chemilumineszenz-Reaktion erfolgte mit dem „Uptilight HRP Blot Substrate“.

Ü: Triton X-114 arme Phase; P: Triton X-114 reiche Phase; Exp.: Expositionszeit;

A: HA rab1b wt (Wildtyp) (Exp.: 1 min.); B: HA rab1b wt ΔN1 (Exp.: 1 min.); C: HA rab1b wt ΔC1 (Exp.: 1 min.); D: HA rab1b wt ΔC3 (Exp.: 60 min.); E: HA rab1b-2-rhoA (Exp.: 6 min.); F: HA rab1b-3-rhoA (Exp.: 6 min.); G: HA rab1b-2-rab6a (Exp.: 6 min.); H: HA rab6a-2-rab1b (Exp.: 15 min.)

Den *Western Blot* Analysen ist zu entnehmen, dass die Kontrollen der Triton X-114-Extraktion den Erwartungen entsprechen. Das Calnexin konnte sowohl in der Triton X-114 reichen als auch in der Triton X-114 armen Phase nachgewiesen werden. Da es sich um ein integrales Membranprotein handelt, kann es nur mit Hilfe eines Detergenzes wie Triton X-114 aus der Membran gelöst werden. Daher muss es sich sowohl in der Triton X-114 reichen als auch in der Triton X-114 armen Phase nachweisen lassen. Der Wildtyp des Proteins rab1b wurde, wie erwartet, durch die Geranylgeranyl-Transferase II modifiziert und zeigte ebenfalls Signale in beiden Phasen. Die Deletionsmutante rab1b wt Δ C1 wurde hier als Negativ-Kontrolle eingesetzt, da diese Mutante kein Isoprenylierungsmotiv besitzt und somit nicht modifiziert werden kann. Daher wurde erwartet, dass es nur in der Triton X-114 armen Phase nachzuweisen ist. Das Ergebnis entspricht ebenfalls den Erwartungen.

Die Mutanten rab1b wt Δ N1, rab1b wt Δ C3 sowie die Chimären rab1b-2-rhoA, rab1b-3-rhoA, rab1b-2-rab6a und rab6a-2-rab1b wiesen, wie der rab1b Wildtyp, jeweils Signale in der Triton X-114 armen und Triton X-114 reichen Phase auf. Dieses spricht für eine Isoprenylierung dieser Proteine.

Die Expositionszeit der Röntgenfilme war sehr unterschiedlich. Während der Wildtyp des rab1b Proteins, die Deletionsmutanten rab1b wt Δ C1 und rab1b wt Δ N1 nach einer Expositionszeit von 1 min. bereits deutliche Signale auf dem Röntgenfilm zeigten, mussten die Chimären (6-15 min.) sowie die Deletionsmutante rab1b wt Δ C3 (60 min.) deutlich länger exponiert werden. Dieses lässt sich mit der schwächeren Expression dieser Proteine in den HeLa SS6-Zellen erklären.

Interessant sind die Ergebnisse der Deletionsmutante rab1b wt Δ C3 und der Chimäre rab6a-2-rab1b in Bezug auf die im Abschnitt 5.3.2 beschriebene Zytosol-Membranfraktionierung. Für die Chimäre rab6a-2-rab1b konnte in der Membranfraktion P100 der Zytosol-Membranfraktionierung erst nach einer Exposition von 5 min. ein extrem schwaches Signal nachgewiesen werden.

In der Triton X-114-Extraktion konnte nach einer 15 minütigen Exposition in der Triton X-114-reichen Phase ein Signal detektiert werden. Dieses bestätigt die Vermutung, dass die Proteinmenge der Membranfraktionen in der Zytosol-Membranfraktionierung unter der Nachweisgrenze gelegen hat.

Die Deletionsmutante rab1b wt Δ C3 zeigte nach der Zellfraktionierung kein Signal in den Membranfraktionen. Doch, wie in der Triton X-114-Extraktion zu sehen ist, zeigte dieses Protein ein Signal in der Triton X-114-reichen Phase nach einer Exposition von 60 min. Dieses deutet daraufhin, dass dieses Protein eine Isoprenylierung aufweist, diese jedoch vielleicht unzureichend ist. Es könnte aber auch ein Hinweis darauf sein, dass der entfernte C-terminale

hypervariable Bereich mit dem Strukturmotiv RabSF4 die Membranbindung des rab1b Proteins beeinflusst.

Im nächsten Schritt sollte daher die intrazelluläre Lokalisation der Deletionsmutanten und Chimären überprüft werden.

5.3.4 Immunfluoreszenzanalysen zur intrazellulären Lokalisation

Mit Hilfe von Immunfluoreszenzanalysen sollte überprüft werden, ob das Fehlen einzelner Strukturbereiche des rab1b Proteins oder deren Ersatz durch äquivalente Strukturbereiche des rab6a bzw. rhoA Proteins die Lokalisation des rab1b Proteins beeinflusst.

Dazu wurden HeLa SS6-Zellen mit den pSV42HA Plasmidkonstrukten des rab1b Wildtyps, der Deletionsmutanten rab1b wt Δ N1, rab1b wt Δ C1 und rab1b wt Δ C3 sowie der Chimären rab1b-2-rhoA und rab6a-2-rab1b mit dem Transfektionsreagenz PolyFect transient transfiziert. Durch die Transfektion mit pSV42HA rab1b wt sollte der Einfluss einer Überexpression der Proteine auf die intrazelluläre Lokalisation kontrolliert werden. Nach der Fixierung und Permeabilisierung der Zellen (vgl. 4.6.3), 24 Stunden nach der Transfektion, wurde die Immunfärbung durchgeführt. Da das rab1b Protein hauptsächlich im Golgi-Apparat lokalisiert ist, wurde zusätzlich das endogene Giantin detektiert. Dieses ca. 400 kDa große Protein ist ebenfalls im Golgi-Apparat lokalisiert und dient daher als Marker dieses Organells. Die Methode wurde, wie in Abschnitt 4.6.3 beschrieben, durchgeführt. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe eines konfokalen Fluoreszenz-Mikroskops. Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 5.8 a und 5.8 b dargestellt. Die rekombinanten Proteine weisen eine rote Färbung und das endogene Golgi Protein Giantin eine grüne Färbung auf. Nach dem Übereinanderlegen der Bilder, dem sogenannten *overlay* erscheinen die Bereiche, in denen die rekombinanten Proteine mit dem endogenen Golgi-Marker Giantin kolokalisiert sind, gelb.

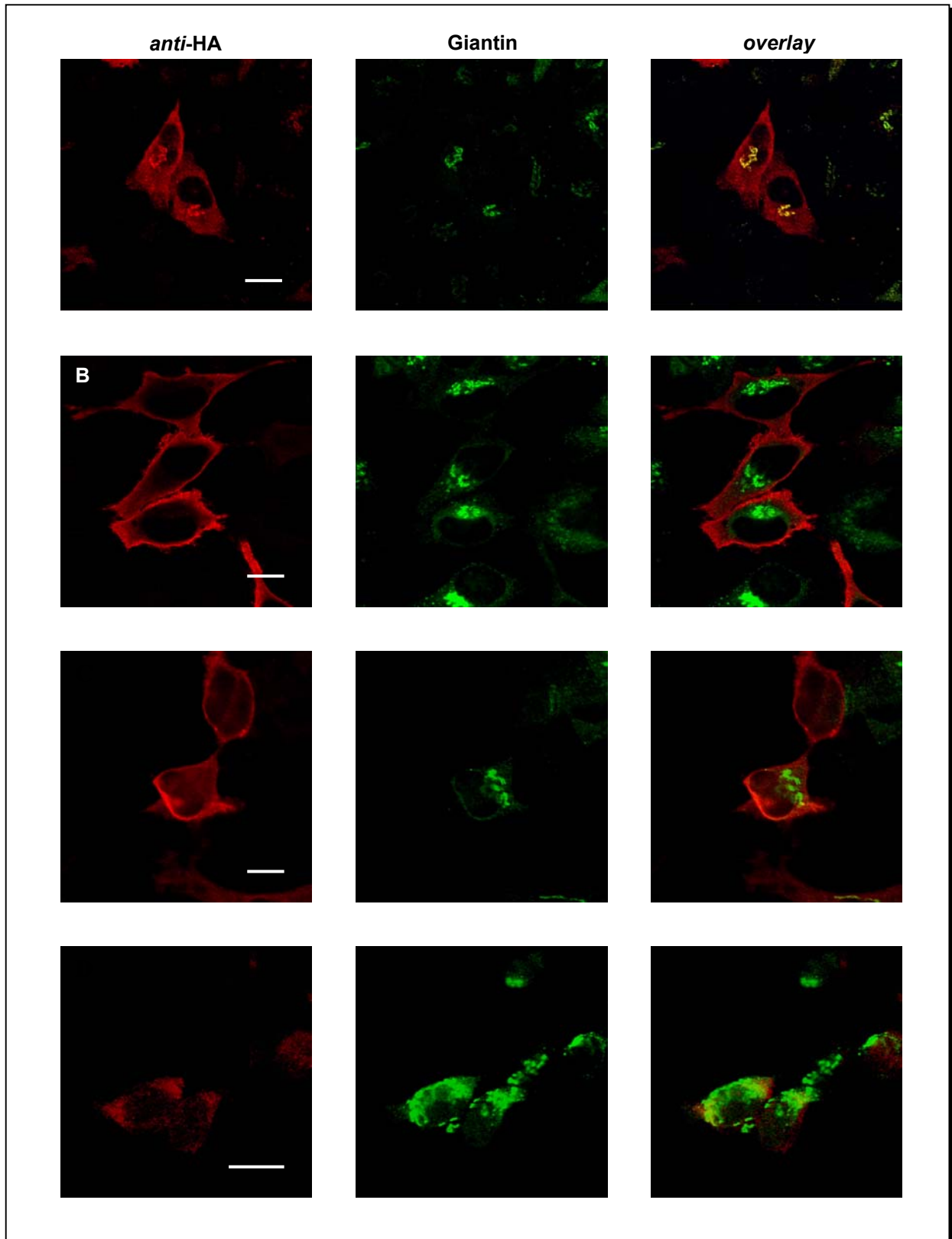


Abb. 5.8 a: Intrazelluläre Lokalisation des Wildtyps und der Deletionsmutanten des rab1b Proteins

Für die Immunfluoreszenzanalysen wurden HeLa SS6-Zellen mit den pSV42HA Plasmidkonstrukten des rab1b Wildtyps sowie der Deletionsmutanten transient transfiziert. Die rekombinanten Proteine wurden mit dem monoklonalen HA-Antikörper 16B12 (1:1000) nachgewiesen und als sekundärer Antikörper Alexa 594 gekoppeltes anti-Maus IgG (1:1000) eingesetzt (linke Spalte). Als Golgi-Marker wurde der polyklonale Giantin-Antikörper (1:1000) und als sekundärer Antikörper Alexa 488 gekoppeltes anti-Kaninchen IgG (1:1000) verwendet (mittlere Spalte). In der rechten Spalte ist ein *overlay* der beiden Immunfluoreszenzen abgebildet. Der Balken entspricht 10µm. **A:** HA rab1b Wildtyp; **B:** HA rab1b wt Δ C1; **C:** HA rab1b wt Δ N1; **D:** HA rab1b wt Δ C3

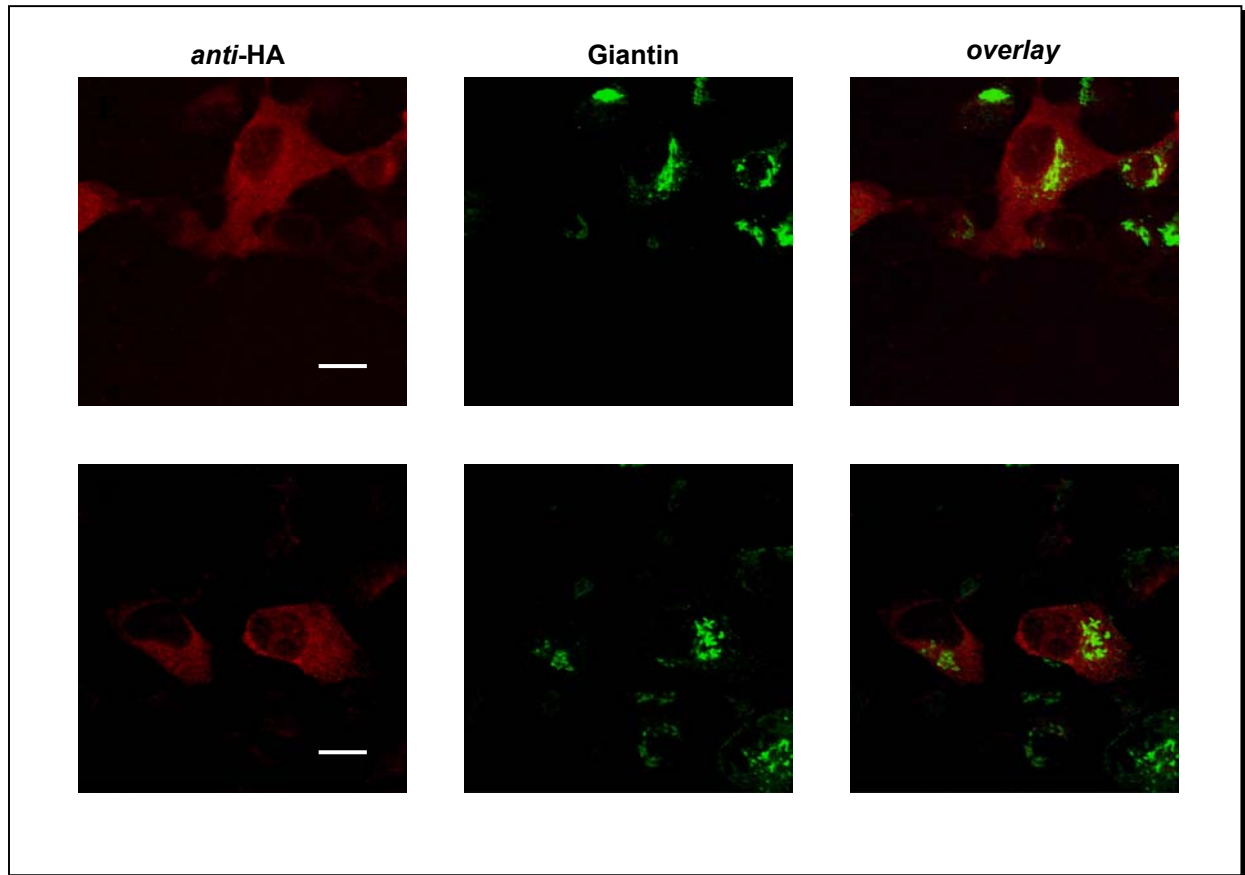


Abb.5.8 b: Intrazelluläre Lokalisation der rab1b Chimären

Für die Immunfluoreszenzanalysen wurden HeLa SS6-Zellen mit den pSV42HA Plasmidkonstrukten der rab1b Chimären transient transfiziert. Die rekombinanten Proteine wurden mit dem monoklonalen HA-Antikörper 16B12 (1:1000) nachgewiesen und als sekundärer Antikörper Alexa 594 gekoppeltes anti-Maus IgG (1:1000) eingesetzt (linke Spalte). Als Golgi-Marker wurde der polyklonale Giantin-Antikörper (1:1000) und als sekundärer Antikörper Alexa 488 gekoppeltes anti-Kaninchen IgG (1:1000) verwendet (mittlere Spalte). In der rechten Spalte ist ein *overlay* der beiden Immunfluoreszenzen abgebildet. Der Balken entspricht 10 μ m. **E:** HA rab1b-2-rhoA Chimäre; **F:** HA rab6a-2-rab1b Chimäre

Frühere Immunfluoreszenzstudien zeigten, dass das endogene rab1b Proteins hauptsächlich im glatten ER und im *cis*-Golgi-Apparat der Zelle lokalisiert ist (Saraste et al., 1995). Die Abbildung 5.8.a zeigt, dass der rekombinante Wildtyp des rab1b Proteins (**A**) nicht nur am Golgi-Apparat zu finden war, der durch das endogene Giantin markiert wurde. Da die ganze Zelle diffus angefärbt war, könnte dieses ein Hinweis darauf sein, dass bei einer Überexpression das Protein rab1b in der gesamten Zelle außerhalb des Zellkerns lokalisiert ist. Dieses würde das starke Signal in der Zytosolfraktion der Zellfraktionierung erklären. Der rekombinante Wildtyp zeigte dennoch eine starke Kolokalisation mit dem endogenen Giantin und somit mit dem Golgi-Apparat.

Die Deletionsmutante rab1b wt Δ C1 (**B**) besitzt kein Isoprenylierungsmotiv und kann nur in peripheren Bereichen der Zelle detektiert werden. Diese Deletionsmutante zeigte keinerlei Kolokalisation mit Giantin. Ebenso verhielt sich die Deletionsmutante rab1b wt Δ N1 (**C**), deren

hypervariabler N-terminaler Bereich (RabSF1) fehlt. Auch diese Mutante ließ sich hauptsächlich im peripheren Bereich der Zelle detektieren. Sie zeigte jedoch auch eine schwächere diffuse Verteilung in der Zelle. Trotzdem konnte auch hier keine Kolo-kalisation mit dem Giantin nachgewiesen werden.

Trotz einer schlechten Transfektionsrate konnte für die Deletionsmutante rab1b wt Δ C3 (**D**) in einigen Bereichen eine sehr schwache, kaum detektierbare Kolo-kalisation mit dem Giantin nachgewiesen werden.

Die in Abbildung 5.8.b dargestellten Chimären rab1b-2-rhoA (**E**) und rab6a-2-rab1b (**F**) zeigten, wie der rekombinante Wildtyp des rab1b Proteins, eine diffuse Verteilung in der Zelle. Im Gegensatz zum überexprimierten Wildtyp des rab1b Proteins konnte für beide Chimären jedoch keine stärkere Färbung im Bereich des Golgi-Apparates nachgewiesen werden. Beide Proteine zeigten eine sehr schwache Kolo-kalisation mit dem endogenen Golgi Protein Giantin. Insgesamt zeigten die Deletionsmutanten rab1b wt Δ C1 und rab1b wt Δ N1 den größten Unterschied in der Lokalisation im Vergleich zum Wildtyp des rab1b Proteins. Dieses deutet darauf hin, dass die fehlenden Strukturbereiche einen sehr großen Einfluss auf die Lokalisation des rab1b Proteins haben.

5.4 PRA1 (*prenylated rab acceptor*) – Interaktionspartner von rab1b

Das PRA1 wurde 1997 als Interaktionspartner der daueraktiven Mutante rab3a Q81L gefunden (Martincic et al., 1997). Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Interaktion von rab1b mit dem Protein PRA1 näher untersucht werden, da bisher nicht bekannt ist, welche Struktur-motive des rab1b Proteins für die Interaktion mit dem Protein PRA1 verantwortlich sind. Zudem sollte auch der Interaktionspartner PRA1 näher charakterisiert werden, da sowohl dessen Rab- als auch dessen Nukleotid-Spezifität sowie die Membranassoziation nicht einwandfrei geklärt sind.

5.4.1 Herstellung verschiedener PRA1 Konstrukte

Für die folgenden Analysen musste zunächst die cDNA des PRA1 mittels einer *nested* PCR (vgl.4.2.2) amplifiziert werden. Dafür wurde als *template* eine λ gt11 Expressionsbank aus Rattenhirn verwendet. Für die PCR wurden die in Tabelle 5.4. aufgeführten *templates* und *primer* verwendet.

Tab. 5.4: Primer und templates für die Amplifikation der cDNA von PRA1

Die cDNA von PRA1 wurde in einer *nested* PCR amplifiziert. In den beiden PCR Ansätzen wurden folgende *templates* und *primer* eingesetzt.

<i>nested</i> PCR	<i>template</i>	<i>primer forward</i>	<i>primer reverse</i>
1. PCR	λgt11 Expressionsbank	PRA3F	PRA4R
2. PCR	10 µl PCR Produkt aus der 1. Reaktion	PRA1F	PRA1R

Im ersten Schritt der *nested* PCR wurden die *primer* PRA3F und PRA4R eingesetzt, deren Bindungsstellen vor bzw. hinter dem kodierenden Bereich der PRA1 cDNA liegen. Die PCR wurde, wie unter 4.2.2 beschrieben, durchgeführt und das Produkt anschließend mit dem „QIAquick *Nucleotide Removal Kit*“ aufgereinigt (vgl.4.2.3). Von dem PCR-Produkt dieser ersten Amplifikation wurden 10 µl in einer zweiten PCR eingesetzt. Um die cDNA des PRA1 anschließend über die Schnittstellen *Nde*I und *Bam*HI in verschiedene Vektoren einfügen zu können, wurden für diese PCR *primer* mit überhängenden *Nde*I (PRA1F) und *Bam*HI Schnittstellen (PRA1R) konstruiert. Nach erneuter Amplifikation wurden von dem zweiten PCR-Produkt zur Kontrolle 5µl in einem 1,5 %igen Agarosegel aufgetrennt (vgl. 4.2.6).

Das Ergebnis ist in Abbildung 5.9 dargestellt.

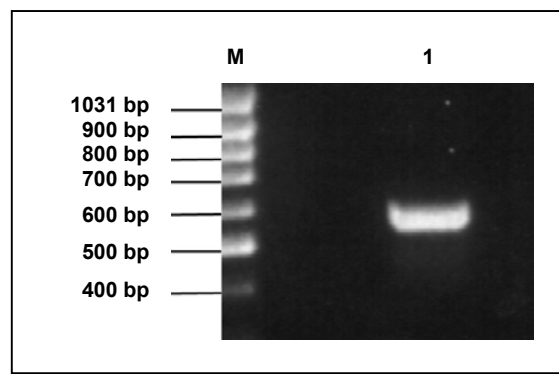


Abb. 5.9: Amplifikation der cDNA von PRA1

Dargestellt ist die Auftrennung des Produktes aus der zweiten PCR in einem 1,5 %igen Agarosegel. Es wurden 5 µl des Gesamtansatzes (50 µl) aufgetragen. **M:** Marker 50 bp DNA Leiter; **Spur 1:** PRA1 cDNA (ca. 550 bp)

Für die cDNA von PRA1 wurde eine Bande von ca. 558 bp erwartet. Da auf dem Agarosegel nur eine Bande in der entsprechenden Größe zu erkennen war, wurde das PCR-Produkt mit Hilfe des „QIAquick *Nucleotide Removal Kits*“ aufgereinigt und konnte in verschiedene Klonierungen eingesetzt werden.

Zunächst sollte die cDNA des PRA1 für die Analysen im *yeast two-hybrid* System in den *prey* Vektor pGADT7 subkloniert werden. Dazu wurde das PCR-Produkt mit den Enzymen *NdeI* und *BamHI* restringiert (vgl. 4.2.5) und in den, mit den gleichen Restriktionsenzymen geschnittenen Vektor pGADT7 eingefügt (vgl. 4.2). Die Klonierung wurde mittels einer Restriktion (*NdeI/BamHI*) des rekombinierten Vektors überprüft, und ein positiver Klon wurde zur Kontrolle mit den Sequenzierungsprimern *bait 1F* und *bait 2R* sequenziert. Die Sequenzierung zeigte, dass es sich bei dem isolierten Fragment um die mit einer *NdeI*- und *BamHI*-Schnittstelle versehene PRA1 cDNA handelte, die in ihrer Sequenz mit der von Martincic et al. angegebenen Basenabfolge übereinstimmt (Martincic et al., 1997).

Anschließend wurde die cDNA des PRA1 für die Analyse in Säugerzellen in den Expressionsvektor pEGFP und in den *myc-getagten* Expressionsvektor pSV42 einkloniert. Für die bakterielle Expression des PRA1 wurde die cDNA außerdem in den pGEX42 Vektor eingefügt, um GST-*pulldowns* durchführen zu können. Von jedem Konstrukt wurde ein positiver Klon durch eine Sequenzierung mit entsprechenden Sequenzierungsprimern (vgl. 3.8.2) überprüft. Somit lagen für weitere Analysen die Konstrukte pGADT7 PRA1 (*yeast two-hybrid*-System), pSV42myc PRA1 und pEGFP PRA1 (eukaryotische Expression) sowie pGEX42 PRA1 (bakterielle Expression) vor.

5.4.2 Expression von PRA1 in HeLa SS6- Zellen

Zunächst sollte überprüft werden, ob sich das Protein PRA1 in Säugerzellen exprimieren lässt, da dieses eine Voraussetzung für weitere Analysen war. Dafür wurden HeLa SS6-Zellen mit dem Plasmid pSV42myc PRA1 transient transfiziert. Da gegen das Protein PRA1 kein Antikörper vorliegt, wurde das rekombinante Protein in der *Western Blot* Analyse mit dem monoklonalen Antikörper 9E10, der gegen das myc-Epitop gerichtet ist, nachgewiesen.

Für die transiente Transfektion wurde eine *semi*-konfluent mit HeLa SS6-Zellen bewachsene Gewebekulturschale mit Hilfe des Transfektionsreagenz PolyFect mit dem Plasmid pSV42myc PRA1 transient transfiziert (vgl. 4.4.1.2). Nach 26 Stunden konnte aus den transfizierten Zellen ein PNS-Zellextrakt hergestellt werden (vgl. 4.4.2.1). Die Expression des rekombinanten Proteins wurde in einer *Western Blot* Analyse nachgewiesen. Das Ergebnis ist in Abbildung 5.10 dargestellt.

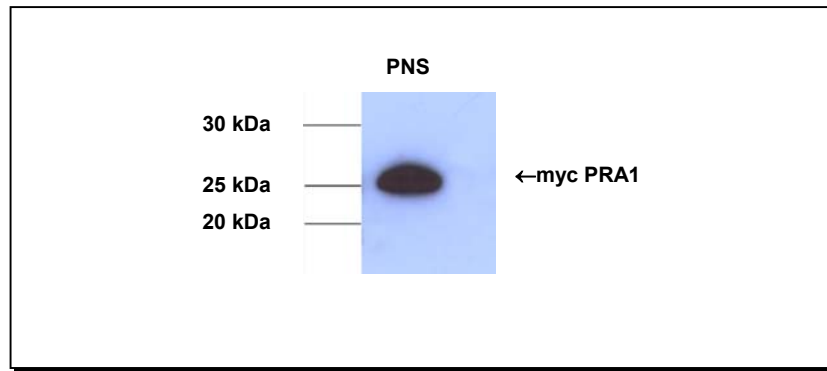


Abb. 5.10: Expression des rekombinanten Proteins PRA1

In einem 13 %igen SDS PAA-Gel wurden 10 µl PNS-Zellextrakt der transient mit dem pSV42myc PRA1 transfizierten HeLa SS6-Zellen aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. In der *Western Blot* Analyse wurden zur Detektion der monoklonale myc-Antikörper 9E10 (1:50) und als sekundärer Antikörper HRP-gekoppeltes anti-Maus IgG (1:1000) eingesetzt. Die Chemilumineszenz-Reaktion erfolgte mit dem „*Super Signal Chemiluminescent Substrate*“.

Die *Western Blot* Analyse zeigte, dass das „myc-getagte“ Protein PRA1 in HeLa SS6-Zellen gut exprimiert wurde. Nach 60 sec. war ein starkes Signal zu sehen, dass eine Größe von ca. 25 kDa aufweist. Da dieses den Erwartungen entspricht, konnte das Protein PRA1 in weiteren Analysen eingesetzt werden.

5.4.3 Analyse der Membranassoziation von PRA1

Für das aus der Ratte isolierte Protein PRA1 liegen zur Membranassoziation dieses Proteins verschiedene Aussagen vor (Martincic et al., 1997; Hutt et al., 2000; Abdul-Ghani et al., 2001). Um einen Hinweis zu bekommen, ob es sich bei PRA1 um ein zytosolisches Protein oder ein membranassoziiertes bzw. integrales Membranprotein handelt, sollte eine Zytosol-Membranfraktionierung durchgeführt werden. Dazu wurde der PNS-Zellextrakt aus einer transienten Transfektion (PolyFect) von HeLa SS6-Zellen eingesetzt (vgl. 4.4.3). Durch die Zytosol-Membranfraktionierung wird der PNS-Zellextrakt, wie bereits in Abschnitt 5.3.2 beschrieben, in eine Zytosolfraction (S100) sowie die zwei Membranfraktionen P14 (große Membranen) und P100 (kleine Membranen) getrennt und das rekombinante Protein anschließend in einer *Western Blot* Analyse nachgewiesen. Zusätzlich zum myc-getagten Protein PRA1 wurden zur Kontrolle verschiedene endogene Proteine detektiert.

Es wurde wiederum das endogene integrale Membranprotein Calnexin nachgewiesen, das bereits in Abschnitt 5.3.2 beschrieben wurde. Auch das endogene integrale Membranprotein Syntaxin 6 wurde detektiert. Dabei handelt es sich um ein 31 kDa großes Protein mit einer

carboxyterminalen Transmembranregion, das im Golgi-Apparat lokalisiert ist. Außerdem sollte das endogene Protein p115 nachgewiesen werden. Dabei handelt es sich um ein 115 kDa großes Protein, das im Gegensatz zu Calnexin und Syntaxin 6 nur membranassoziiert ist. Zusätzlich sollte auch das endogene rab1b Protein mit dem Antikörper 1E7 nachgewiesen werden. Das Ergebnis der *Western Blot* Analyse ist in Abbildung 5.11 dargestellt.

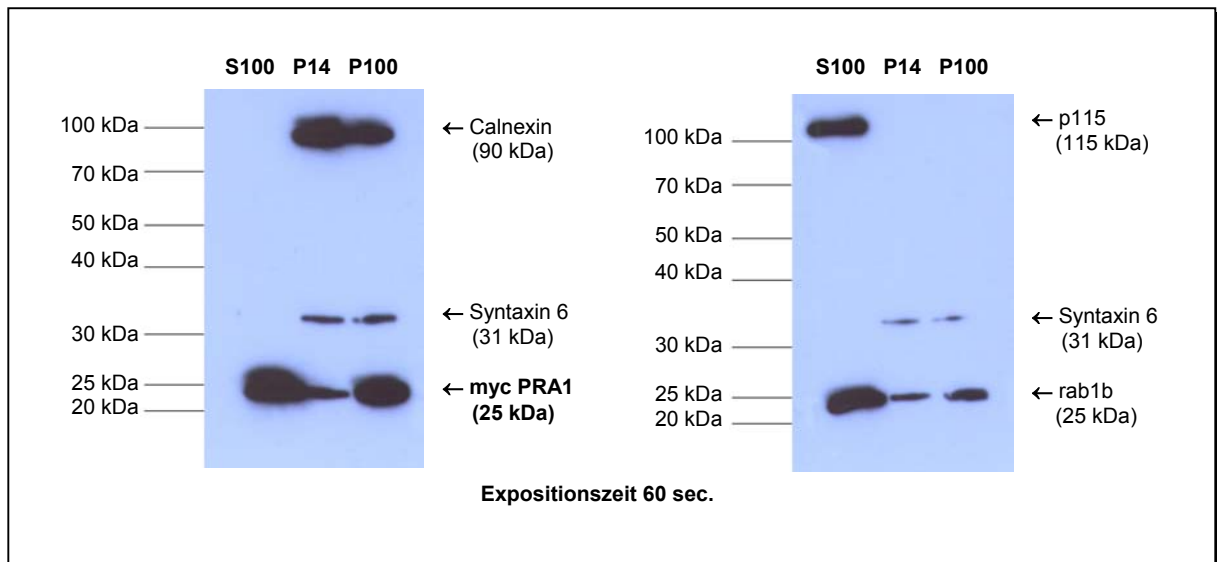


Abb. 5.11: Zytosol-Membranfraktionierung des rekombinanten Proteins PRA1

Mit dem PNS-Zellextrakt der transient mit dem pSV42myc PRA1 transfizierten HeLa SS6-Zellen wurde eine Zytosol-Membranfraktionierung durchgeführt. Die Fraktionen des myc PRA1 wurden in einem 13 %igen SDS PAA-Gel aufgetrennt, wobei jeweils äquivalente Mengen der einzelnen Fraktionen aufgetragen wurden. In der *Western Blot* Analyse wurden der myc-Antikörper 9E10 (1:50), ein Calnexin-Antikörper (1:500), ein Syntaxin 6-Antikörper (1:500), ein p115-Antikörper (1:500) sowie der Antikörper 1E7 (1:50) gegen das endogene rab1b eingesetzt. Als sekundärer Antikörper wurde HRP-gekoppeltes anti-Maus IgG verwendet. Die Chemilumineszenz-Reaktion erfolgte mit dem „*Super Signal Chemiluminescent Substrate*“.

S100: Zytosolfraktion; **P14:** 1. Membranfraktion; **P100:** 2. Membranfraktion

Wie in der Abbildung zu sehen ist, war das rekombinante PRA1 sowohl in der Zytosolfraktion S100 als auch in beiden Membranfraktionen P14 und P100 nachzuweisen, wobei das Signal der Fraktion P14 (große Membranen) erheblich schwächer war.

Auch das endogene rab1b Protein konnte in jeder Fraktion detektiert werden. Dieses entspricht den Erwartungen, da es mit früheren Ergebnissen übereinstimmt und das Ergebnis des rekombinanten Wildtyps des rab1b Proteins der Zytosol-Membranfraktionierung in Abschnitt 5.3.2 bestätigt.

Die integralen Membranproteine Calnexin und Syntaxin 6 wiesen mit 90 bzw. 31 kDa die korrekte Größe auf, und waren, wie erwartet, nur in den Membranfraktionen zu detektieren. Anders verhielt sich das membranassoziierte Protein p115. Dieses konnte nur in der Zytosolfraktion nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis zeigt, dass nach dieser Zytosol-Membranfraktionierung nur in die Membran integrierte Proteine in der Membranfraktion zu

finden sind. Membranassoziierte Proteine scheinen dagegen durch die Fraktionierung von der Membran abgetrennt zu werden. Dieses legt die Vermutung nahe, dass es sich bei PRA1 (Ratte) um ein membrangebundenes Protein handelt. Das Signal in der Zytosolfraktion könnte auf die Überexpression des rekombinanten Proteins zurückzuführen sein.

5.4.4 Immunfluoreszenzanalysen zur intrazellulären Lokalisation von PRA1

Mit dem Konstrukt pEGFP PRA1 sollte die Lokalisation des rekombinanten PRA1 in der Zelle überprüft werden. Da auch für das PRA1 Protein eine Lokalisation im Golgi-Apparat postuliert wird, wurde auch hier als Marker des Golgi-Apparates zusätzlich das Golgi Protein Giantin nachgewiesen. Für die Immunfluoreszenzanalysen wurden HeLa SS6-Zellen transient mit pEGFP PRA1 transfiziert. Nach 24 Stunden erfolgte die Fixierung und die Immunfärbung (vgl. 4.6.3). Die Auswertung erfolgte mit dem konfokalen Fluoreszenz-Mikroskop. Die Ergebnisse sind in Abbildung 5.12 dargestellt.

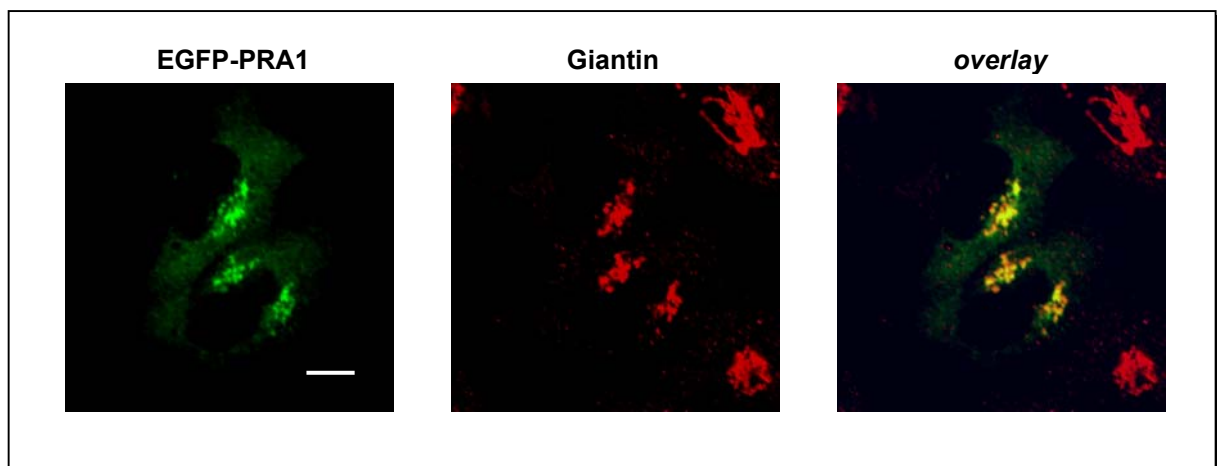


Abb. 5.12: Intrazelluläre Lokalisation des Fusionsproteins EGFP-PRA1

Für die Immunfluoreszenzanalyse wurde HeLa SS6-Zellen transient mit pEGFP PRA1 transfiziert (links). Zum Nachweis des Golgi Proteins Giantin wurde der polyklonale Giantin-Antikörper (1:1000) und als sekundärer Antikörper Alexa 568 gekoppeltes anti-Kaninchen IgG (1:1000) eingesetzt (Mitte). In der rechten Spalte ist ein *overlay* der beiden Immunfluoreszenzen abgebildet. Der Balken entspricht 5 µm.

Das Fusionsprotein EGFP-PRA1 zeigte beim Vergleich mit dem endogenen Giantin eine starke Kolokalisation mit dem Golgi-Marker. Dieses deutet darauf hin, dass EGFP-PRA1 hauptsächlich im Golgi-Apparat lokalisiert ist. Außerdem ist schwach eine diffuse Verteilung des PRA1 Proteins in der Zelle zu erkennen. Dieses könnte für eine Lokalisation des PRA1 nicht nur im Golgi-Apparat sprechen, sondern darauf hindeuten, dass PRA1 auch mit anderen Proteinen

interagiert. Deshalb sollte im nächsten Schritt die Rab-Spezifität dieses Proteins überprüft werden.

5.4.5 Analyse der Rab-Spezifität von PRA1

Zur Spezifität von PRA1 liegen widersprüchliche Aussagen vor (Bucci et al., 1999; Abdul-Ghani et al., 2001; Figueroa et al., 2001). Es konnte nicht eindeutig geklärt werden, ob das PRA1 Protein spezifisch mit rab Proteinen interagiert, oder ob es ein Interaktionspartner für alle kleinen GTPasen ist. Auch ist nicht bekannt, ob es, wie die Regulatorproteine REP oder GDI, mit allen rab Proteinen interagiert oder, wie das MSS4, nur mit Subfamilien der rab Proteine. Daher sollte mit Hilfe des *yeast two-hybrid*-Systems die Interaktion des PRA1 mit verschiedenen kleinen GTPasen untersucht werden.

Dazu wurden Kotransformationen des Hefestammes Y190 durchgeführt, in denen das im Rahmen dieser Arbeit hergestellte pGADT7 PRA1 als *prey* Plasmid eingesetzt wurde. Als *bait* Plasmide wurden pAS Konstrukte eingesetzt, die für den Wildtyp verschiedener rab Proteine (rab1a, rab1b, rab2a, rab3d, rab4a, rab5a, rab6a) kodieren, um diese auf eine Interaktion mit PRA1 zu überprüfen. Außerdem wurde ein *bait* Konstrukt verwendet, das für den Wildtyp des Proteins ypt1 aus *Saccharomyces cerevisiae* kodiert und homolog zum rab1b Protein ist. Um zu testen, ob es sich bei PRA1 um einen spezifischen Interaktionspartner für rab Proteine handelt, wurden zusätzlich zwei rho Konstrukte eingesetzt, die zum einen den Wildtyp der humanen rhoA cDNA und zum anderen den Wildtyp der aus *Aplysia californica* isolierten rho cDNA enthalten. Der eingesetzte Leervektor pAS 2-1 diente als Negativ-Kontrolle der Kotransformation.

Die Kotransformationen erfolgten, wie unter Abschnitt 4.3 beschrieben. Nach einer Inkubation von 7 Tagen bei 30°C wurde das Wachstum der transformierten Hefen auf den Kontroll- und Selektionsplatten überprüft. Zusätzlich wurde mit den Selektionsplatten ein β -Galaktosidase-Filtertest (vgl. 4.3) durchgeführt, der die Aktivität des lacZ-Reportergens nachweist. Durch die Blaufärbung der Hefekolonien sollten die Daten der Selektionsplatten verifiziert werden. Die Ergebnisse dieser Kotransformation des Hefestammes Y190 sind in Tabelle 5.5 zusammengefasst.

Tab. 5.5: Kotransformation des Hefestammes Y190 zur Überprüfung der Rab-Spezifität von PRA1

Die Kotransformationen des Hefestammes Y190 wurden mit dem *prey* Plasmid pGADT7 PRA1 und verschiedenen *bait* Plasmiden (siehe linke Spalte) durchgeführt. Das Wachstumsverhalten der transformierten Hefekolonien auf den Kontrollplatten (+His3) bzw. Selektionsplatten (-His3) wurde in folgenden Kategorien ausgewertet: +++: sehr gutes Wachstum; ++: gutes Wachstum; +/-: Hintergrundwachstum. Die β -Galaktosidase-Aktivität (*lacZ*) der untersuchten transformierten Hefen wurde, wie folgt, ausgewertet: +++: schnelle und starke Blaufärbung (innerhalb von 3 Std.); +: Blaufärbung (innerhalb von 5 Std.); +/-: sehr schwache Blaufärbung (über Nacht); -: keine Blaufärbung

<i>bait</i> Plasmid	<i>prey</i> Plasmid pGADT7 PRA1		
	+ His3	- His3	<i>lacZ</i>
pAS 2-1	+++	+/-	-
pAS <i>rab1a</i> wt	+++	+++	+++
pAS <i>rab1b</i> wt	+++	+++	+++
pAS <i>rab2</i> wt	+++	+/-	-
pAS <i>rab3d</i> wt	+++	+/-	-
pAS <i>rab4a</i> wt	+++	+/-	+/-
pAS <i>rab5a</i> wt	+++	+++	+++
pAS <i>rab6a</i> wt	+++	+/-	+/-
pAS <i>ypt1</i> wt	+++	+++	+++
pAS <i>rho</i> wt (<i>Aplysia californica</i>)	+++	+/-	-
pAS <i>rhoA</i> wt (human)	+++	++	+

Wie der Tabelle 5.5 zu entnehmen ist, zeigte sich auf allen Kontrollplatten ein starkes Wachstum von Hefekolonien. Dieses bestätigt, dass in der jeweiligen Kotransformation beide Plasmide aufgenommen wurden. Durch das sehr gute Wachstum auf den Selektionsplatten konnte für den Wildtyp der Proteine *rab1a*, *rab1b*, *ypt1* sowie für den Wildtyp des Proteins *rab5* eine Interaktion mit dem Protein PRA1 nachgewiesen werden. Dieses bestätigte sich im β -Galaktosidase-Filtertest durch eine schnelle und starke Blaufärbung der Kolonien innerhalb von 3 Stunden.

Die Kotransformationen mit dem Wildtyp der Proteine *rab4a* und *rab6a* zeigten ein sehr schwaches Wachstum auf den Selektionsplatten, die dem Hintergrund der Kotransformation des pGADT7 PRA1 mit dem Leervektor pAS 2-1 entsprach. Doch der anschließende β -Galaktosidase-Filtertest zeigte über Nacht eine schwache Blaufärbung der transformierten Hefekolonien beider Ansätze. Dieses könnte auf eine sehr schwache Interaktion des Proteins PRA1 mit dem Wildtyp der Proteine *rab4a* und *rab6a* hindeuten.

Interessant war das Ergebnis für die beiden rho Proteine, denn der Wildtyp des humanen rhoA zeigte im Gegensatz zum Wildtyp des rho Proteins aus *Aplysia californica* ein gutes Wachstum auf den Selektionsplatten und die Kolonien wurden im β -Galaktosidase-Filtertest innerhalb von 5 Stunden schwach blau. Somit konnte für den Wildtyp des humanen rhoA Proteins eine schwache Interaktion mit PRA1 nachgewiesen werden, wohingegen der Wildtyp des rho aus *Aplysia californica* scheinbar nicht mit dem Protein PRA1 interagieren kann.

Auch für den Wildtyp der Proteine rab2 und rab3d konnte keine Interaktion mit dem Protein PRA1 detektiert werden.

Anhand dieser Ergebnisse lässt sich vermuten, dass PRA1 zum einen nicht mit allen rab Proteinen interagieren kann, zum anderen scheint PRA1 aber auch nicht nur spezifisch mit rab GTPasen zu interagieren.

5.4.6 Analyse der Nukleotid-Spezifität von PRA1

Neben der Rab-Spezifität liegen auch zur Nukleotid-Spezifität von PRA1 unterschiedliche Aussagen vor (Martincic et al., 1997; Bucci et al., 1999; Abdul-Ghani et al., 2001). Auch dieses sollte mit Hilfe des *yeast two-hybrid*-Systems überprüft werden.

Für die Analyse der Nukleotid-Spezifität wurden Punktmutationen in die kleinen GTPasen eingebracht, die den Austausch von GDP durch GTP oder die Hydrolyse von GTP zu GDP und Phosphat verhindern. Diese Proteine „verharren“ daraufhin in ihrer inaktiven bzw. aktiven Konformation. Außerdem existiert eine Mutante, für die eine hohe Nukleotidaustauschrate beschrieben wurde, und von der angenommen wird, dass sie weder GTP noch GDP binden kann. Sie ist somit phänotypisch nukleotidfrei.

Es wurden Kotransformationen des Hefestammes Y190 durchgeführt, indem als *prey* Plasmid das pGADT7 PRA1 und als *bait* Plasmide verschiedene inaktive und daueraktive Mutanten von rab1a, rab1b und dem homologen ypt1 verwendet wurden.

Auch Mutanten der Proteine rab6a sowie rho aus *Aplysia californica*, deren Wildtypen zuvor keine (rho aus *A. californica*) oder eine nur schwache (rab6a) Interaktion mit PRA1 zeigten, wurden eingesetzt, da für andere Proteine wie z.B. GM130 eine Interaktion nur mit der daueraktiven Mutante rab1bQ67R gezeigt werden konnte (Weide et al., 2001).

In der folgenden Tabelle 5.6 sind die in der Kotransformation eingesetzten inaktiven und aktiven Mutanten der Proteine rab1a, rab1b, ypt1, rab6a und rho (*Aplysia californica*) sowie ihre Konformation zusammengefasst.

Tab. 5.6: Punktmutationen der Proteine rab1a, rab1b, ypt1, rab6a und rho

In dieser Tabelle sind die in die Kotransformation eingesetzten inaktiven und aktiven Mutanten dargestellt. Durch eine Substitution bestimmter Aminosäuren liegen sie entweder in der GTP-gebundenen (aktiv) bzw. GDP-gebundenen (inaktiv) Konformation vor oder sie sind nukleotidfrei (inaktiv).

Mutante	Aminosäure-Substitution	Konformation
rab1a S25N	Serin zu Asparagin	inaktiv
rab1a Q70L	Glutamin zu Leucin	aktiv
rab1b N121I	Asparagin zu Isoleucin	inaktiv
rab1b S22N	Serin zu Asparagin	inaktiv
rab1b Q67L	Glutamin zu Leucin	aktiv
rab1b Q67R	Glutamin zu Arginin	aktiv
ypt1 N121I	Asparagin zu Isoleucin	inaktiv
ypt1 Q67L	Glutamin zu Leucin	aktiv
rab6a N126I	Asparagin zu Isoleucin	inaktiv
rab6a T27N	Threonin zu Asparagin	inaktiv
rab6a Q72R	Glutamin zu Arginin	aktiv
rho N117I (<i>Aplysia californica</i>)	Asparagin zu Isoleucin	inaktiv
rho G14V (<i>Aplysia californica</i>)	Glycin zu Valin	aktiv
rho Q63L (<i>Aplysia californica</i>)	Glutamin zu Leucin	aktiv

Als Negativ-Kontrolle wurde wiederum der Leervektor pAS 2-1 in die Kotransformationen mit pGADT7 PRA1 eingesetzt.

Nach einer Inkubation von 7 Tagen bei 30°C wurde das Wachstum der transformierten Hefekolonien auf den Kontroll- und Selektionsplatten überprüft. Zum Nachweis der lacZ Aktivität wurde anschließend ein β -Galaktosidase-Filtertest mit den Selektionsplatten durchgeführt, um die Daten der Selektionsplatten zu verifizieren. Die Ergebnisse dieser Kotransformation des Hefestammes Y190 sind in der Tabelle 5.7 zusammengefasst.

Tab. 5.7: Kotransformation des Hefestammes Y190 zur Überprüfung der Nukleotid-Spezifität von PRA1

Es wurden Kotransformationen des Hefestammes Y190 mit dem *prey* Plasmid pGADT7 PRA1 und verschiedenen *bait* Plasmiden (siehe linke Spalte) durchgeführt. Das Wachstumsverhalten der Hefekolonien auf den Kontrollplatten (+His3) bzw. Selektionsplatten (-His3) wurde in folgenden Kategorien ausgewertet: +++: sehr gutes Wachstum; ++: gutes Wachstum; +/-: Hintergrundwachstum. Die β -Galaktosidase-Aktivität (*lacZ*) der transformierten Hefekolonien wurde, wie folgt, ausgewertet: +++: schnelle und starke Blaufärbung (innerhalb von 3 Std.); -: keine Blaufärbung

<i>bait</i> Plasmid	<i>prey</i> Plasmid pGADT7 PRA1		
	+ His3	- His3	<i>lacZ</i>
pAS 2-1	+++	+/-	-
pAS rab1a S25N	+++	+/-	-
pAS rab1a Q70L	+++	++	+++
pAS rab1b N121I	+++	+/-	-
pAS rab1b S22N	+++	+/-	-
pAS rab1b Q67L	+++	++	+++
pAS rab1b Q67R	+++	+/-	-
pAS ypt1 N121I	+++	+/-	-
pAS ypt1 Q67L	+++	++	+++
pAS rab6a N126I	+++	+/-	-
pAS rab6a T27N	+++	+/-	-
pAS rab6a Q72R	+++	+/-	-
pAS rho N117I (<i>Aplysia californica</i>)	+++	+/-	-
pAS rho G14V (<i>Aplysia californica</i>)	+++	+/-	-
pAS rho Q63L (<i>Aplysia californica</i>)	+++	+/-	-

Der Tabelle 5.7 ist zu entnehmen, dass aufgrund des sehr guten Wachstums der transformierten Hefen auf den Kontrollplatten beide Plasmide aufgenommen wurden. In Bezug auf die Nukleotid-Spezifität konnte ein gutes Wachstum auf den Selektionsplatten nur bei den aktiven Mutanten rab1a Q70L, rab1b Q67L und ypt1 Q67L festgestellt werden. Alle anderen eingesetzten Mutanten zeigten nur ein schwaches Wachstum auf den Selektionsplatten, das dem Hintergrund des Leervektors pAS 2-1 gleichzusetzen war. Der anschließend durchgeführte β -

Galaktosidase-Filtertest bestätigte die Ergebnisse der Selektion durch eine starke Blaufärbung dieser drei daueraktiven Mutanten innerhalb von 3 Stunden.

Für die inaktiven und aktiven Mutanten der Proteine rab6a und rho aus *Aplysia californica* konnte keine Interaktion nachgewiesen werden. Da auch für den Wildtyp des rho Proteins keine Interaktion mit PRA1 gezeigt werden konnte, scheint sich zu bestätigen, dass dieses Protein nicht mit PRA1 interagiert.

Für den Wildtyp des rab6a Proteins konnte eine schwache Interaktion nachgewiesen werden. Doch die Mutanten, insbesondere die daueraktive Mutante rab6a Q72R, zeigten auch bei einer längeren Inkubation der Selektionsplatten nur ein Hintergrundwachstum. Im β -Galaktosidase-Filtertest konnte auch über Nacht keine lacZ Aktivität nachgewiesen werden. Somit zeigten die rab6a Mutanten keine Interaktion mit PRA1.

Es konnte gezeigt werden, dass PRA1 nur mit den daueraktiven Mutanten rab1a Q70L, rab1b Q67L und dem homologen ypt1 Q67L interagiert.

Auffällig ist, dass PRA1 eine Interaktion mit den daueraktiven Q→L Mutanten der Proteine rab1a, rab1b und ypt1, jedoch nicht mit den daueraktiven Q→R Mutanten der Proteine rab1b und rab6a aufweist. Dieses deutet darauf hin, dass es zwischen den beiden Formen Q→L und Q→R der daueraktiven Mutanten einen Unterschied geben könnte.

Um die Ergebnisse dieser Kotransformation des Hefestammes Y190 zu überprüfen, sollte die Methode der GST-pulldowns durchgeführt werden. Damit kann die Interaktion von PRA1 mit den inaktiven und aktiven Mutanten des rab1b Proteins *in vitro* analysiert werden.

Für diese Bindungsanalysen musste zunächst das PRA1 als GST-Fusionsprotein exprimiert werden. Dazu wurden der im Rahmen dieser Arbeit hergestellte Vektor pGEX42 PRA1 und der Leervektor pGEX KG im *E. coli* Bakterienstamm BL21, wie unter Abschnitt 4.5.1 beschrieben, exprimiert und anschließend Bakterienlysate hergestellt, die auf die Proteinexpression hin überprüft wurden (vgl. 4.5.2 u. 4.5.3).

Der Wildtyp sowie die Mutanten des rab1b Proteins mussten in Säugerzellen exprimiert werden, da auf diese Weise die posttranslationale Modifikation der Proteine gewährleistet wurde. Für diese Expression wurden BHK-21-Zellen verwendet, da sich diese durch eine hohe Transfektionsrate auszeichnen.

Zunächst musste die in einem pAS Konstrukt vorliegende cDNA der rab1b Q67L Mutante in den HA-getagten Expressionsvektor pSV42HA inkloniert werden. Dieses erfolgte über die Schnittstellen *NdeI* und *BamHI* (vgl. 4.2).

Für die transiente Transfektion wurde eine *semi*-konfluent mit BHK-21-Zellen bewachsene Gewebekulturschale mit Hilfe der Calcium-Phosphat-DNA-Präzipitationsmethode mit den Plasmiden pSV42HA rab1b wt, pSV42HA rab1b S22N, pSV42HA rab1b Q67L und pSV42HA rab1b Q67R transient transfiziert (vgl. 4.4.1.1). Nach 24 Stunden wurden aus den transfizierten Zellen Gesamtextrakte für die GST-*pulldowns* hergestellt (vgl. 4.4.2.2). Für diese *in vitro* Bindungsanalysen ist es wichtig, dass gleiche Mengen an rekombinanten Proteinen eingesetzt werden. Dazu wurden mehrere *Western Blot* Analysen durchgeführt, bis die Signalstärke der rekombinanten Proteine vergleichbar war. Der *Western Blot* in Abbildung 5.13 zeigt den Vergleich der Ausgangsextrakte, die in den GST-*pulldown* eingesetzt wurden.

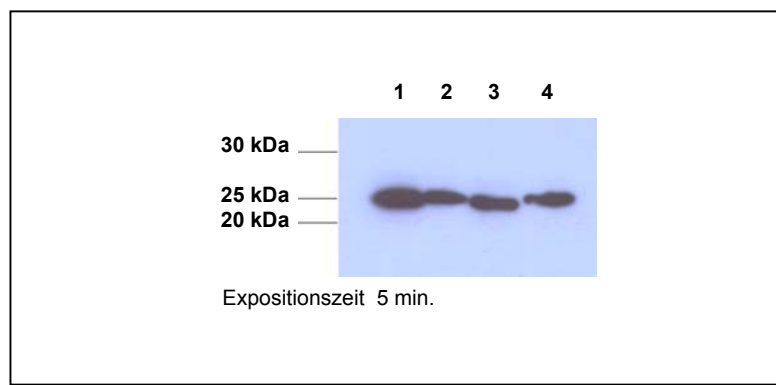


Abb. 5.13: Gesamtextrakte der transfizierten BHK-21-Zellen

Verschiedene Volumina der Gesamtextrakte aus transient mit den pSV42HA Plasmidkonstrukten des rab1b Wildtyps und der Mutanten transfizierten BHK-21-Zellen wurden auf einem 13 %igen SDS PAA-Gel aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. In der *Western Blot* Analyse wurden zur Detektion der monoklonale Antikörper 16B12 (1:1000) und als sekundärer Antikörper HRP-gekoppeltes anti-Maus IgG (1:1000) eingesetzt. Die Chemilumineszenz-Reaktion erfolgte mit dem „*Super Signal Chemiluminescent Substrate*“.

Spur 1: Gesamtextrakt HA rab1b wt (Wildtyp); **Spur 2:** Gesamtextrakt HA rab1b S22N; **Spur 3:** Gesamtextrakt HA rab1b Q67L; **Spur 4:** Gesamtextrakt HA rab1b Q67R

Die Abbildung 5.13 zeigt, dass der Wildtyp des Proteins rab1b, die inaktive Mutante rab1b S22N sowie die aktiven Mutanten rab1b Q67L und rab1b Q67R eine relativ vergleichbare Signalstärke aufwiesen.

Für die GST-*pulldowns* wurden jeweils ca. 10 µg GST-PRA1-Fusionsprotein und ca. 15 µg GST-Protein an Glutathion-Sepharose *beads* gekoppelt (vgl. 4.5.4) und anschließend mit dem 15-fachen Volumen der in Abbildung 5.13 dargestellten Gesamtextrakte versetzt. Je 13 µl dieser Ansätze wurden in einem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und in einer *Western Blot* Analyse die rekombinanten rab1b Proteine (Wildtyp und Mutanten) nachgewiesen. Das Ergebnis ist in Abbildung 5.14 dargestellt.



Abb. 5.14: *In vitro* Bindungsanalyse von GST-PRA1 und GST mit den rekombinanten rab1b Proteinen (Wildtyp und Mutanten)

Auf einem 13 %igen SDS PAA-Gel wurden je 13 μ l der GST-*pulldowns* aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. In der *Western Blot* Analyse wurden der monoklonale Antikörper 16B12 (1:1000) und als sekundärer Antikörper HRP-gekoppeltes anti-Maus IgG (1:1000) eingesetzt. Die Chemilumineszenz-Reaktion erfolgte mit dem „*Super Signal Chemiluminescent Substrate*“.

Spur 1: GST-PRA1 / HA rab1b wt (Wildtyp); **Spur 2:** GST-PRA1 / HA rab1b S22N (inaktiv); **Spur 3:** GST-PRA1 / HA rab1b Q67L (aktiv); **Spur 4:** GST-PRA1 / HA rab1b Q67R (aktiv); **Spur 5:** GST / HA rab1b wt (Wildtyp); **Spur 6:** GST / HA rab1b S22N (inaktiv); **Spur 7:** GST / HA rab1b Q67L (aktiv); **Spur 8:** GST / HA rab1b Q67R (aktiv)

In der *Western Blot* Analyse der GST-*pulldowns* ließ sich für das Protein PRA1 eine *in vitro* Bindung mit dem Wildtyp des rab1b Proteins sowie den beiden daueraktiven Mutanten rab1b Q67L und rab1b Q67R nachweisen. Dieses Ergebnis unterstützt die Daten der Kotransformation in der Hefe, dass das PRA1 nur mit dem Wildtyp und der aktiven, GTP-gebundenen Form des rab Proteins interagiert. Die Interaktion von PRA1 mit rab scheint folglich nukleotidspezifisch zu sein.

Hierbei fällt jedoch auf, dass die daueraktive Mutante rab1b Q67R das stärkste Signal aufwies. Die Kontrolle mit dem GST-Protein zeigte für diese Mutante ebenfalls ein schwaches Signal. Diese Mutante war im GST-*pulldown*, im Gegensatz zur Kotransformation in der Hefe, positiv, wobei sie jedoch auch eine schwache Bindung an das GST Protein aufwies.

Deshalb sollten in einem nächsten Schritt die beiden daueraktiven Mutanten des rab1b Proteins untersucht werden.

5.5. Analyse der daueraktiven Mutanten rab1b Q67R und rab1b Q67L

Die Prenylierung der rab Proteine ist eine Voraussetzung für die Interaktion mit dem Protein PRA1. Um zu überprüfen, ob sich die beiden aktiven Mutanten rab1b Q67L und rab1b Q67R in ihrer Membranassoziation unterscheiden, sollten Zytosol-Membranfraktionierungen durchgeführt werden.

5.5.1 Expression der daueraktiven rab1b Mutanten in HeLa SS6-Zellen

Zunächst sollten die daueraktiven Mutanten rab1bQ67L und rab1bQ67R in HeLa SS6-Zellen exprimiert werden, um die Zellextrakte anschließend in einer Zytosol-Membranfraktionierung einsetzen zu können.

Für die transiente Transfektion wurden *semi*-konfluent mit HeLa SS6-Zellen bewachsene Gewebekulturschalen mit Hilfe der Calcium-Phosphat-DNA-Präzipitationsmethode mit den Plasmidkonstrukten pSV42HA rab1b Q67L und pSV42HA rab1b Q67R transient transfiziert (vgl. 4.4.1.1). Nach 26 Stunden wurden aus den transfizierten Zellen PNS-Zellextrakte hergestellt (vgl. 4.2.2.1) und die Expression der Proteine in einer *Western Blot* Analyse nachgewiesen. Das Ergebnis ist in Abbildung 5.15 dargestellt.

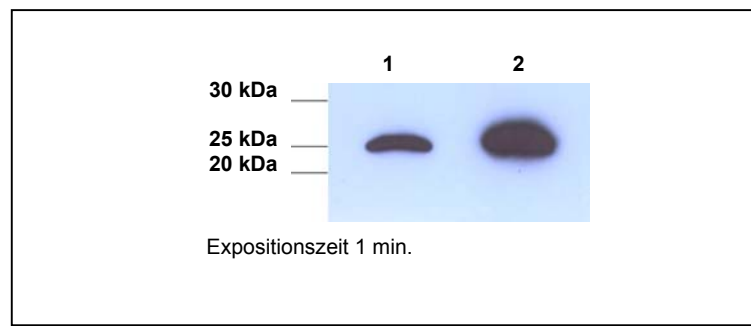


Abb. 5.15: Expression der rekombinanten Proteine rab1b Q67L und rab1b Q67R

Je 10 μ l PNS-Zellextrakt der transient mit den pSV42HA Plasmidkonstrukten rab1b Q67L bzw. rab1b Q67R transfizierten HeLa SS6-Zellen wurde auf einem 13 %igen SDS PAA-Gel aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. In der *Western Blot* Analyse wurden der monoklonale Antikörper 16B12 (1:1000) und als sekundärer Antikörper HRP-gekoppeltes anti-Maus IgG (1:1000) eingesetzt. Die Chemilumineszenz-Reaktion erfolgte mit dem „*Super Signal Chemiluminescent Substrate*“.

Spur 1: PNS-Extrakt HA rab1b Q67L; **Spur 2:** PNS-Extrakt HA rab1b Q67R

Wie die Abbildung 5.15 zeigt, konnten die aktiven Mutanten rab1b Q67L und rab1b Q67R in den HeLa SS6-Zellen exprimiert werden. Beide Mutanten wiesen bereits nach einer Minute ein starkes Signal auf. Daher sollten sie im nächsten Schritt in eine Zellfraktionierung eingesetzt werden.

5.5.2 Analyse der Membranassoziation der daueraktiven rab1b Mutanten

Um zu überprüfen, ob sich diese beiden aktiven Mutanten in ihrer Membranassoziation voneinander unterscheiden, sollte eine Zytosol-Membranfraktionierung durchgeführt werden.

Für die Zytosol-Membranfraktionierung wurden die PNS-Extrakte aus den transienten Transfektionen von HeLa SS6-Zellen eingesetzt (vgl. 4.4.3). Die einzelnen Fraktionen (S100, P14, P100) wurden in einem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Dabei wurde die 4-fache Proteinmenge der Membranfraktionen aufgetragen. Anschließend wurden die rekombinanten rab1b Mutanten in einer *Western Blot* Analyse mit dem HA-Antikörper 16B12 nachgewiesen und zur Kontrolle der Membranfraktionen wurde wiederum das endogene Calnexin detektiert (vgl. 5.3.2). Das Ergebnis der *Western Blot* Analyse ist in Abbildung 5.16 dargestellt.

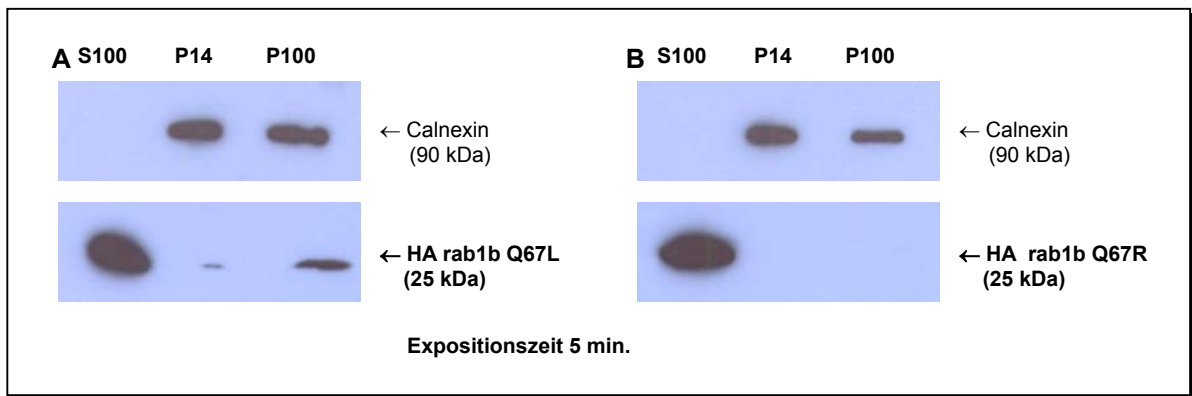


Abb. 5.16: Zytosol-Membranfraktionierung der rekombinanten Proteine rab1b Q67L und rab1b Q67R
 Mit PNS-Zellextrakten der transient mit den pSV42HA Plasmidkonstrukten der daueraktiven rab1b Mutanten transfizierten HeLa SS6 wurde eine Zytosol-Membranfraktionierung durchgeführt. Die Fraktionen wurden in einem 13 %igen SDS PAA-Gel aufgetrennt, wobei jeweils das 4-fache Volumen der Membranfraktionen aufgetragen wurde. In der *Western Blot* Analyse wurden der gegen das HA-Epitop gerichtete Antikörper 16B12 (1:1000) sowie der Calnexin Antikörper (1:500) und als sekundärer Antikörper HRP-gekoppeltes anti-Maus IgG (1:1000) eingesetzt. Die Chemilumineszenz-Reaktion erfolgte mit dem „*Super Signal Chemiluminescent Substrate*“.

S100: Zytosolfraktion; **P14:** Fraktion der großen Membranen; **P100:** Fraktion der kleinen Membranen;
A: HA rab1b Q67L; **B:** HA rab1b Q67R

Wie in Abbildung 5.16 zu sehen ist, konnte das endogene Membranprotein Calnexin, das zur Kontrolle der Membranfraktionen eingesetzt wurde, in jeder Membranfraktion nachgewiesen werden. Daher kann davon ausgegangen werden, dass die Aufarbeitung der Membranfraktionen korrekt verlaufen ist.

Die daueraktive Mutante rab1bQ67L zeigte nach einer Exposition des Röntgenfilms von 5 min. ein starkes Signal in der Zytosolfraktion und auch schwächere Signale in den Membranfraktionen. Für die daueraktive Mutante rab1b Q67R konnte nach 5 min. ebenfalls ein starkes Signal in der Zytosolfraktion detektiert werden. Jedoch in den beiden Membranfraktionen konnte kein Signal nachgewiesen werden. Für diese *Western Blot* Analyse wurde auf dem SDS Polyacrylamidgel von den Membranfraktionen das vierfache Volumen aufgetragen. Bei einem einfachen Volumen der Membranfraktionen konnte für beide Mutanten

kein Signal in den Membranfraktionen nachgewiesen werden. Dieses könnte auf einen Unterschied in der Isoprenylierung der beiden daueraktiven Mutanten hinweisen.

5.6 Charakterisierung der Interaktion des rab1b Proteins mit PRA1

Bisher ist nicht bekannt, welche Strukturbereiche des rab1b Proteins die Interaktion mit dem Protein PRA1 beeinflussen. Daher sollte dieses im Folgenden überprüft werden. In diesen Analysen sollten wiederum die Deletionsmutanten und Chimären des rab1b Proteins eingesetzt werden, um die Bereiche eingrenzen zu können, die für die Interaktion des Proteins rab1b mit PRA1 essentiell sind.

5.6.1 Kotransformation des Hefestammes Y190 mit den Deletionsmutanten und Chimären des rab1b Proteins

Um für die Interaktion mit PRA1 wichtige Strukturbereiche eingrenzen zu können, wurden Kotransformationen des Hefestammes Y190 durchgeführt. Als *prey* Plasmid wurde pGADT7 PRA1 und als *bait* Plasmide alle vorliegenden Deletionsmutanten und Chimären des Proteins rab1b eingesetzt. Zusätzlich wurden mir von M. Rosing freundlicherweise die daueraktiven Chimären pAS rab1bQ67L-2-rab6a und pAS rab6aQ72L-2-rab1b zur Verfügung gestellt.

Die Kotransformation erfolgte, wie unter Abschnitt 4.3 beschrieben, wobei, wie zuvor, als Negativ-Kontrolle der Leervektor pAS 2-1 eingesetzt wurde. Nach einer Inkubation von 7 Tagen bei 30°C wurde das Wachstum der transformierten Hefekolonien auf den Kontroll- und Selektionsplatten überprüft. Zum Nachweise der lacZ Aktivität wurde anschließend ein β -Galaktosidase-Filtertest mit den Selektionsplatten durchgeführt, um die Daten der Selektionsplatten zu verifizieren. Die Ergebnisse dieser Kotransformation des Hefestammes Y190 sind in der Tabelle 5.8 zusammengefasst.

Wie in der Tabelle zu sehen ist, zeigten alle Kontrollplatten nach 7 Tagen ein sehr gutes Wachstum. Daher kann davon ausgegangen werden, dass jeweils beide Plasmide aufgenommen wurden. Der Wildtyp des rab1b Proteins wurde als Positiv-Kontrolle eingesetzt und das gute Wachstum auf den Selektionsplatten sowie der positive β -Galaktosidase-Filtertest entspricht den Erwartungen.

Die Deletionsmutanten rab1b wt Δ C1 und rab1b wt Δ C2 dienten hier als Negativ-Kontrollen, da diese beiden Proteine aufgrund ihres fehlenden Isoprenylierungsmotivs keine Interaktion mit PRA1 zeigen dürfen. Für beide Deletionsmutanten konnte weder ein Wachstum auf den

Selektionsplatten noch konnte für sie eine lacZ Aktivität nachgewiesen werden. Somit entspricht auch dieses Ergebnis den Erwartungen.

Tab. 5.8: Kotransformation des Hefestammes Y190 zur Überprüfung der Interaktion von rab1b mit PRA1

Es wurden Kotransformationen des Hefestammes Y190 mit dem *prey* Plasmid pGADT7 PRA1 und den im *bait* Vektor vorliegenden Deletionsmutanten und Chimären von rab1b (siehe linke Spalte) durchgeführt. Das Wachstumsverhalten der Hefekolonien auf den Kontrollplatten (+His3) bzw. Selektionsplatten (-His3) wurde in folgenden Kategorien ausgewertet: +++: sehr gutes Wachstum; ++: gutes Wachstum; +/-: Hintergrundwachstum; -: kein Wachstum. Die β -Galaktosidase-Aktivität (*lacZ*) der transformierten Hefekolonien wurde, wie folgt, ausgewertet: +++: schnelle und starke Blaufärbung (innerhalb 3 Std.); -: keine Blaufärbung

<i>bait</i> Plasmid	<i>prey</i> Plasmid pGADT7 PRA1		
	+ His3	- His3	<i>lacZ</i>
pAS 2-1	+++	+/-	-
pAS rab1b wt	+++	++	+++
pAS rab1b wt Δ C1	+++	-	-
pAS rab1b wt Δ C2	+++	-	-
pAS rab1b wt Δ C3	+++	-	-
pAS rab1b wt Δ N1	+++	+++	+++
pAS rab1b wt Δ N1 Δ C3	+++	-	-
pAS rab1b-2-rhoA	+++	+/-	-
pAS rab1b-3-rhoA	+++	+/-	-
pAS rab1b-2-rab6a	+++	+/-	-
pAS rab6a-2-rab1b	+++	+/-	-
pAS rab1bQ67L-2-rab6a	+++	+/-	-
pAS rab6aQ72L-2-rab1b	+++	+/-	-

Von den Deletionsmutanten rab1b wt Δ N1 , rab1b wt Δ C3 und rab1b wt Δ N1 Δ C3 konnte nur für die Deletionsmutante rab1b wt Δ N1 ein sehr starkes Wachstum auf den Selektionsplatten und eine starke lacZ Aktivität nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis legt die Vermutung nahe, dass der N-terminale hypervariable Bereich mit dem Strukturmotiv RabSF1 keinen Einfluss auf die Interaktion des Proteins rab1b mit PRA1 hat.

Alle eingesetzten Chimären zeigten auf den Selektionsplatten nur ein dem Leervektor pAS 2-1 entsprechendes Hintergrundwachstum. Dieses Ergebnis legt die Vermutung nahe, dass sowohl N-terminale als auch C-terminale Struktur motive des Proteins rab1b die Interaktion mit dem Protein PRA1 beeinflussen.

Um ausschließen zu können, dass die Chimären im *yeast two-hybrid*-System nicht funktionsfähig sind, sollten in einem nächsten Schritt die Chimären mit einem anderen Interaktionspartner von rab1b auf ihre Funktionsfähigkeit überprüft werden.

5.6.2 Kotransformation des Hefestammes Y190 mit dem Protein MSS4

Das Protein MSS4 wurde bereits in der Einleitung kurz angesprochen. Es handelt sich hierbei um ein molekulares Chaperon, das die nukleotidfreie Konformation der rab Proteine stabilisiert (Feig, 1994; Nuoffer et al., 1997; Esters et al., 2001). Da dieses Protein neben der inaktiven Konformation auch mit dem Wildtyp des rab1b Proteins interagiert, sollte im *yeast two-hybrid*-System die Interaktion von MSS4 mit den Chimären (rab1b-2-rhoA, rab1b-3-rhoA, rab1b-2-rab6a und rab6a-2-rab1b) und somit deren Funktionsfähigkeit im Hefesystem überprüft werden. Dazu wurden Kotransformationen des Hefestammes Y190 durchgeführt, in denen als *prey* Plasmid pACT MSS4 eingesetzt wurde. Als *bait* Plasmide wurden die obengenannten vier Chimären sowie zur Kontrolle der Kotransformation der Wildtyp der Proteine rab1b, rab6a und rhoA sowie die inaktive Mutante rab1b S22N eingesetzt.

Tab. 5.9: Kotransformation des Hefestammes Y190 zur Überprüfung der Interaktion der Chimären mit MSS4

Es wurden Kotransformationen des Hefestammes Y190 mit dem *prey* Plasmid pACT MSS4 und den im *bait* Vektor vorliegenden Chimären des rab1b Proteins sowie verschiedenen Kontrollplasmiden (siehe linke Spalte) durchgeführt. Das Wachstumsverhalten der Hefekolonien auf den Kontrollplatten (+His3) bzw. Selektionsplatten (-His3) wurde, wie folgt ausgewertet: +++: sehr gutes Wachstum; ++: gutes Wachstum; +: Wachstum; +/-: Hintergrundwachstum. Die lacZ Aktivität (lacZ) der transformierten Hefekolonien wurde in folgenden Kategorien ausgewertet: +++: schnelle und starke Blaufärbung (innerhalb von 2 Std.); ++: schwächere Blaufärbung (innerhalb von 5 Std.); +: Blaufärbung (innerhalb von 12 Std.); -: keine Blaufärbung

<i>bait</i> Plasmid	<i>prey</i> Plasmid pACT MSS4		
	+ His3	- His3	lacZ
pAS 2-1	+++	+/-	-
pAS rab1b wt	+++	+	+
pAS rab1b S22N	+++	+++	+++
pAS rab6a wt	+++	+	-
pAS rhoA wt (human)	+++	++	++
pAS rab1b-2-rhoA	+++	+++	+++
pAS rab1b-3-rhoA	+++	+++	+++
pAS rab1b-2-rab6a	+++	+++	+++
pAS rab6a-2-rab1b	+++	+/-	-

Die Kotransformation wurde, wie in Abschnitt 4.3 beschrieben, durchgeführt. Nach einer Inkubation von 7 Tagen bei 30°C wurden die Kulturplatten auf das Wachstum von transformierten Hefekolonien überprüft und die Selektionsplatten anschließend einem β -Galaktosidase-Filtertest unterzogen. Die Ergebnisse dieser Kotransformation des Hefestammes Y190 sind in der Tabelle 5.9 zusammengefasst.

Der Tabelle ist zu entnehmen, dass alle Kontrollplatten nach 7 Tagen ein sehr gutes Wachstum zeigten. Dieses spricht für eine Aufnahme beider Plasmide.

Wie erwartet, konnte anhand des starken Wachstums der transformierten Hefekolonien auf den Selektionsplatten für die inaktive Mutante rab1bS22N eine starke Interaktion mit MSS4 gezeigt werden. Dieses konnte auch im β -Galaktosidase-Filtertest bestätigt werden.

Auch der Wildtyp der Proteine rab1b, rab6a und rhoA (human) zeigte ein Wachstum auf den Selektionsplatten. Für die Proteine rab1b und rhoA (human) konnte außerdem eine lacZ Aktivität im β -Galaktosidase-Filtertest nachgewiesen werden. Diese Proteine scheinen mit MSS4 zu interagieren. Für den Wildtyp des Proteins rab6a konnte dagegen, wie erwartet, im β -Galaktosidase-Filtertest keine Blaufärbung detektiert werden.

Die Chimären rab1b-2-rhoA, rab1b-3-rhoA und rab1b-2-rab6a zeigten auf den Selektionsplatten ein starkes Wachstum und eine starke lacZ Aktivität. Daher kann davon ausgegangen werden, dass diese drei Chimären im *yeast two-hybrid*-System funktionsfähig sind.

Die Chimäre rab6a-2-rab1b zeigte dagegen nur ein dem Leervektor pAS 2-1 entsprechendes Hintergrundwachstum und keine Blaufärbung im β -Galaktosidase-Filtertest. Somit kann für diese Chimäre keine Aussage zur Funktionsfähigkeit im *yeast two-hybrid*-System gemacht werden.

Alle in dieser Arbeit durchgeführten *Western Blot* Analysen und Kotransformationen des Hefestammes Y190 wurden mindestens zweimal wiederholt, um die hier aufgeführten Ergebnisse zu bestätigen.

6. Diskussion

Zur Zeit sind in menschlichen Geweben etwa 60 verschiedene rab Proteine bekannt, die meist ubiquitär exprimiert werden (Pereira-Leal et al., 2001). Die rab Proteine weisen eine distinkte intrazelluläre Lokalisation auf und sind in Transportprozesse zwischen verschiedenen Membrankompartimenten involviert. Zudem interagieren sie mit verschiedenen Regulator- bzw. Effektorproteinen (Segev, 2001; Zerial & McBride, 2001).

Die korrekte Lokalisation der rab Proteine sowie deren spezifische Interaktion mit anderen Proteinen ist eng mit ihrer Funktion als molekularer Schalter in der Zelle verbunden. Dieses wirft die Frage auf, wie die Spezifität der Lokalisation und die spezifische Bindung der rab Proteine an individuelle bzw. verschiedene Interaktionspartner gewährleistet wird. Es scheint, dass verschiedene Struktur motive, die in der Einleitung (vgl. 1.3) näher beschrieben wurden, diese Spezifität vermitteln. Daher sollte im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden, welche Struktur motive der rab1b Isoform die korrekte Membranassoziation und Lokalisation dieses Proteins beeinflussen und welche Struktur motive für die Bindung an Interaktionspartner wie zum Beispiel das wenig untersuchte Proteins PRA1 essentiell sind.

6.1 Deletionsmutanten und Chimären des rab1b Proteins

Bereits in früheren Studien zur Lokalisation und Interaktion der rab Proteine wurden Deletionsmutanten und Chimären eingesetzt. So haben zum Beispiel Chavrier et al. durch den Einsatz von Chimären aus rab2, rab5 und rab7 GTPasen zeigen können, dass die C-terminalen hypervariablen Bereiche dieser drei rab Proteine strukturelle Elemente enthalten, die für das subzelluläre *targeting* des jeweiligen Proteins verantwortlich sind (Chavrier et al., 1991). In Bezug auf die Interaktion mit GDI ist von Beranger et al. durch den Einsatz verschiedener rab6/ras Chimären gezeigt worden, dass die hypervariable Region am C-Terminus und die Effektordomäne des rab6 Proteins wesentlich für die Interaktion mit diesem Regulatorprotein sind (Beranger et al., 1994b).

Auch Deletionsmutanten wurden eingesetzt, um zum Beispiel zu überprüfen, ob ein fehlendes Isoprenylierungsmotiv oder ein fehlender N-Terminus Einfluss auf die Lokalisation oder die Bindung eines rab Proteins an ein interagierendes Protein haben (Sanford et al, 1995; Martincic et al., 1997). Außerdem wurden sie im *mapping* von rab Proteinen und ihren Interaktionspartnern genutzt, um Bindungsmotive definieren zu können, die für eine Interaktion essentiell sind (Vitale et al., 1998). In früheren Studien unserer Arbeitsgruppe wurden daueraktive Deletionsmutanten

zum Beispiel zur Analyse der rab1b/GM130, rab1/MICAL-1 und rab6/Bicaudal-D Interaktionen eingesetzt (Weide et al., 2001; Matanis et al., 2002; Weide et al., 2003).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden für die Analysen zur intrazellulären Lokalisation des Proteins rab1b und zur Interaktion mit dem Protein PRA1 ebenfalls verschiedene Mutanten eingesetzt (vgl. Abb. 5.1 / 5.3). Zum einen wurden die im Abschnitt 5.1 beschriebenen Deletionsmutanten hergestellt, denen definierte Strukturbereiche wie das Isoprenylierungsmotiv und / oder die hypervariablen Bereiche am N- bzw. C-Terminus entfernt wurden. Zum anderen wurden die im Abschnitt 5.2 beschriebenen Chimären hergestellt, bei denen Bereiche des rab1b Proteins durch äquivalente Strukturbereiche der kleinen GTPase rhoA bzw. rab6a ersetzt wurden.

Für die Analysen mussten die Mutanten unter anderem in Säugerzellen exprimiert werden. Daher wurden HeLa SS6-Zellen transient mit den pSV42HA-Plasmidkonstrukten der Deletionsmutanten und Chimären transfiziert (vgl. Abb. 5.5). Die Deletionsmutanten rab1b wt Δ C1 und rab1b wt Δ N1 zeichneten sich durch eine sehr gute Expressionsrate in den HeLa SS6-Zellen aus. Die Deletion der 6 bis 8 Aminosäuren am N- bzw. C-Terminus scheint die Stabilität des Proteins keinesfalls zu beeinflussen.

Die Deletionsmutante rab1b wt Δ C3 zeigte dagegen nur eine schwache Expressionsrate. Die beiden Deletionsmutanten rab1b wt Δ C2 und rab1b wt Δ N1 Δ C3 konnten trotz des Einsatzes verschiedener Transfektionsmethoden weder in HeLa SS6- und CHO- noch in BHK-21-Zellen exprimiert werden. Die Deletion von mehr als 33 Aminosäuren scheint zu einer Instabilität dieser rekombinanten Proteine in den obengenannten Zelllinien zu führen. Daher konnten die Deletionsmutanten rab1b wt Δ C2 und rab1b wt Δ N1 Δ C3 in den Analysen zur Lokalisation des rab1b Proteins nicht eingesetzt werden.

Wegen der erwarteten Instabilität einiger Deletionsmutanten waren zusätzlich Chimären hergestellt worden. Durch eine gute Expression in HeLa SS6-Zellen zeichneten sich die Chimären rab1b-2-rhoA, rab1b-3-rhoA und rab1b-2-rab6a aus. Allerdings zeigte entgegen der Erwartung die Chimäre rab6a-2-rab1b eine sehr schwache Expression. Es besteht die Möglichkeit, dass dieses Protein nicht korrekt gefaltet und in Folge dessen instabil ist.

6.2 Analysen zur Lokalisation des Proteins rab1b

Zur Analyse der Membranassoziation und Isoprenylierung wurden die Deletionsmutanten und Chimären zunächst in Zytosol-Membranfraktionierungen (vgl. Abb. 5.6) und Triton X-114-Extraktionen (vgl. Abb. 5.7) eingesetzt. Dazu wurden HeLa SS6-Zellen mit den verschiedenen pSV42HA Plasmidkonstrukten transient transfiziert und PNS-Zellextrakte hergestellt. Um den

Einfluss der fehlenden Strukturbereiche (Isoprenylierungsmotiv, hypervariabler Bereich am N- bzw. C-Terminus) auf die Fähigkeit zur Membranassoziation und die posttranslationale Modifikation des rab1b Proteins zeigen zu können, wurde zum Vergleich der rekombinante Wildtyp des rab1b Proteins eingesetzt. Um die intrazelluläre Lokalisation des rab1b Wildtyps sowie der Deletionsmutanten und Chimären analysieren zu können, wurden anschließend Immunfluoreszenzstudien durchgeführt.

Der Wildtyp des rab1b Proteins war nach der Zellfraktionierung sowohl im Zytosol als auch in beiden Membranfraktionen zu finden (vgl. Abb. 5.6 A). In der anschließenden Triton X-114-Extraktion konnte eine Prenylierung dieses Proteins in HeLa SS6-Zellen nachgewiesen werden (vgl. Abb. 5.7 A). In früheren Studien wurde gezeigt, dass sich die inaktive, GDP-gebundene Form mit GDI komplexiert im Zytosol befindet, während die aktive, GTP-gebundene Form an der Membran zu finden ist. Da von einem Membranassoziations-Dissoziationszyklus ausgegangen wird, zeigte sich, dass der rekombinante Wildtyp des rab1b Proteins zum GDP/GTP Austausch fähig ist (Fischer von Mollard et al., 1991 und 1994; Ullrich et al., 1994). Es wird in der GDP-gebundenen Form durch die Komplexbildung mit dem REP modifiziert und zur Membran gebracht, so dass der komplette GTPase-Zyklus (vgl. Abb.1.4) durchlaufen werden kann.

In der Immunfluoreszenzanalyse zur intrazellulären Lokalisation konnte gezeigt werden, dass der rekombinante Wildtyp des rab1b Proteins im Golgi-Apparat mit dem Golgi-Marker Giantin kolokalisiert ist (Abb. 5.8 A). Dieses bestätigt frühere Immunfluoreszenzstudien, in denen gezeigt wurde, dass das rab1b Protein an den Membranen des glatten ER und des *cis*-Golgi-Apparates lokalisiert ist (Saraste et al, 1995). Es konnte außerdem eine diffuse Anfärbung der gesamten Zelle festgestellt werden. Dieses könnte auf die Überexpression des rekombinanten Proteins zurückzuführen sein, in Folge dessen sich das rekombinante Protein wahrscheinlich im Zytosol anreichert, wenn alle Membran-Bindungsstellen „besetzt“ sind.

Der Deletionsmutante rab1b wt Δ C1 wurde das Isoprenylierungsmotiv SGGCC am C-Terminus entfernt. Die posttranslationale Modifikation in Form einer Anbindung von zwei C₂₀-Isoprenresten (Geranylgeranylresten) an die zwei Cysteine ist für die korrekte Membranassoziation und somit auch für die einwandfreie Funktion des rab Proteins in der Zelle unerlässlich (Peter et al, 1992; Seabra, 1996; Calero et al., 2003). Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass für diese Deletionsmutante weder eine Membranbindung noch eine Prenylierung nachgewiesen werden konnte (vgl. Abb. 5.6 / 5.7). Dieses wird durch die Ergebnisse der Immunfluoreszenzanalyse unterstützt. Die Deletionsmutante rab1b wt Δ C1 zeigte keine Kolokalisation mit dem Golgi-Marker Giantin, sondern war in den peripheren Bereichen der

HeLa SS6-Zellen lokalisiert (vgl. Abb. 5.8 B). Dadurch konnte auch für dieses System bestätigt werden, dass das Isoprenylierungsmotiv für die Membranassoziation und die Lokalisation des rab1b Proteins essentiell ist.

Der Deletionsmutante rab1b wt Δ N1 hingegen fehlen die ersten acht Aminosäuren am N-Terminus (MNPEYDYL). Dieses schließt den N-terminalen hypervariablen Bereich und Teile des rab *subfamily* Strukturmotiv RabSF1 mit der Aminosäuresequenz YDYL des rab1b Proteins ein. Für die Deletionsmutante rab1b wt Δ N1 konnte in HeLa SS6-Zellen sowohl eine Prenylierung als auch eine Membranbindung nachgewiesen werden (vgl. Abb. 5.6 / 5.7). Sanford et al. haben für das Protein rab5 gezeigt, dass die Deletion des sogenannten YxYLFK Motivs, welches hochkonserviert in vielen Proteinen der rab Familie zu finden ist und dem RabSF1 Motiv YDYLFK des rab1b Proteins entspricht, zu einer fehlenden Prenylierung des rab5 Proteins führt. Durch das Anfügen der Aminosäuren MAYDYLFK konnte jedoch eine Prenylierung dieses Proteins nachgewiesen werden. Es wurde vermutet, dass das N-terminale Motiv YxYLFK mit der konservierten Aminosäure Lysin (K) ein „Schlüssel-Element“ für die tertiäre Struktur des rab Proteins und dessen Prenylierung ist (Sanford et al., 1995). Die Deletionsmutante rab1b wt Δ N1 enthält die von Sanford et al. angesprochene „kritische“ Aminosäure Lysin und zeigte im Vergleich zum Wildtyp keinen Unterschied in Bezug auf die Prenylierung und die Membranbindung. Somit scheint nicht das ganze Motiv, sondern in diesem Zusammenhang nur das Lysin zusammen mit dem Phenylalanin die wichtige Aminosäure für den Mechanismus der Geranylgeranylierung der Proteine zu sein, da die Entfernung des N-terminalen hypervariablen Bereiches die Membranassoziation und Prenylierung des Proteins rab1b nicht beeinflusst hat.

Für das Protein rab5 ist von Steele-Mortimer et al. außerdem gezeigt worden, dass die N-terminale Domäne im Prozess der Membran-Erkennung und auch der Fusion des rab5 Proteins mit den frühen Endosomen eine wichtige Rolle spielt (Steele-Mortimer et al., 1994). In der Immunfluoreszenzanalyse zeigte die Mutante rab1b wt Δ N1 eine ähnliche Lokalisation wie die Deletionsmutante rab1b wt Δ C1. Auch hier konnte keine Lokalisation im Golgi-Apparat nachgewiesen werden (vgl. Abb.5.8 C). Diese Ergebnisse zeigen, dass der hypervariable N-terminale Bereich mit dem Strukturmotiv RabSF1 zwar nicht die Prenylierung und Membranassoziation des rab1b Proteins wohl aber dessen korrekte Lokalisation und somit wahrscheinlich auch die Funktion beeinflusst. Dieses Ergebnis untermauert die Daten von Stenmark et al., die gezeigt haben, dass der N-Terminus mit dem RabSF1 Motiv und das RabF4 Motiv essentiell für die Funktion von rab5/rab6 Chimären waren (Stenmark et al., 1994).

Bei der Deletionsmutante rab1b wt Δ C3 wurde der hypervariable C-Terminus (MTMAAEIKKRMGPGAASGGERP NLKIDSTPVKSA) mit dem Strukturmotiv RabSF4 entfernt, das Isoprenylierungsmotiv blieb jedoch erhalten. Für die hypervariable Region am C-Terminus sind bisher zwei Funktionen bekannt. Auf der einen Seite scheint dieser Bereich eine wichtige Rolle in der Lokalisation und bei der Interaktion mit anderen Proteinen einzunehmen (Chavrier et al., 1991; Beranger et al., 1994). Auf der anderen Seite scheint dieser Bereich zusammen mit der Effektor-domäne auch für die Interaktion mit spezifischen Effektor-Proteinen verantwortlich zu sein (Novick & Brennwald, 1993; Stenmark et al., 1994; Moore et al., 1995; Burton et al., 1997).

Für die Deletionsmutante rab1b wt Δ C3 konnte in HeLa SS6-Zellen nach einer langen Expositionszeit eine Prenylierung des Proteins, jedoch keine Membranassoziation nachgewiesen werden (vgl. Abb. 5.6 / 5.7). In den Immunfluoreszenzanalysen zeigte sich, dass dieses rekombinante Protein in den HeLa SS6-Zellen teilweise mit dem Golgi-Marker Giantin kolokalisiert ist (vgl. Abb. 5.8 D). Zum einen besteht die Möglichkeit, dass in der *Western Blot* Analyse aufgrund der geringen Expressionsrate des rekombinanten Proteins die Proteinmenge unter der Nachweisgrenze gelegen hat. Zum anderen könnte dieses Ergebnis jedoch auch ein Hinweis darauf sein, dass dieser C-terminale Bereich mit dem *rab subfamily* Strukturmotiv RabSF4 die Membranassoziation des rab1b Proteins beeinflusst. Aufgrund der schwachen Expressionsrate dieser Deletionsmutante müssen hier die Ergebnisse der Chimären betrachtet werden.

Die Chimäre rab1b-2-rab6a besteht aus dem N-Terminus des rab1b Proteins und geht ab der G2 Box in den C-Terminus des Proteins rab6a über. Die Chimäre rab6a-2-rab1b enthält analog dazu den N-Terminus des Proteins rab6a und den C-Terminus des rab1b Proteins. In der *Western Blot* Analyse konnte für die Chimäre rab1b-2-rab6a eine Prenylierung und die Membranassoziation nachgewiesen werden (vgl. Abb. 5.6 / 5.7). Trotz der geringen Expressionsrate in HeLa SS6-Zellen konnte auch für die Chimäre rab6a-2-rab1b eine Prenylierung des Proteins und eine, wenn auch sehr schwache, Membranbindung nachgewiesen werden (Abb. 5.6/ 5.7). Es wird vermutet, dass in den Membranfraktionen die Proteinmenge aufgrund der schwachen Expression dieser Chimäre unter der Nachweisgrenze gelegen hat.

Die Chimären rab1b-2-rhoA und rab1b-3-rhoA weisen ab der konservierten Box G2 bzw. G3 den C-Terminus der humanen GTPase rhoA auf. Diese Chimären wurden in HeLa SS6-Zellen stabil exprimiert und korrekt prenyliert (vgl. Abb. 5.7). Aufgrund des C-Terminus des rhoA Proteins mit dem Isoprenylierungsmotiv SGCLVL werden diese Chimären prenyliert, indem ein C₁₇-Isoprenrest kovalent an das Cystein angebunden wird (Palmitylierung). Die Ergebnisse der

Zellfraktionierungen zeigen, dass die rab1b/rhoA Chimären, wie der Wildtyp des rekombinanten rab1b Proteins, in die Membran integriert werden konnten (vgl. Abb.5.6).

Die Ergebnisse dieser Chimären sprechen dafür, dass ein Austausch des hypervariablen N- bzw. C-Terminus gegen einen äquivalenten Strukturbereich der GTPase rab6a oder rhoA keinen Einfluss auf die Prenylierung oder die Membranassoziation des rab1b Proteins hat.

In den Immunfluoreszenzanalysen zeigten die Chimären rab6a-2-rab1b und rab1b-2-rhoA im Vergleich zum Wildtyp des rab1b Proteins eine kaum detektierbare Kolo-kalisation mit dem Golgi-Marker Giantin. Die gesamte Zelle war bis auf den Zellkern diffus angefärbt und es konnte keine verstärkte Lokalisation im Golgi-Apparat festgestellt werden (vgl. Abb. 5.8 E/F).

Daher lässt sich vermuten, dass weder der N-terminale noch der C-terminale hypervariable Bereich alleine für die korrekte Lokalisation des Proteins verantwortlich ist.

Beranger et al. konnten zeigen, dass die Sequenz der C-terminalen hypervariablen Region des Proteins H-ras für das *targeting* zur Plasmamembran verantwortlich ist. Sie konstruierten ähnliche rab6/H-ras Chimären und konnten mit einer Chimäre, die den N-Terminus des rab6 Proteins und den C-Terminus der GTPase H-ras aufweist, eine schwächere Lokalisation des Proteins im Golgi-Apparat nachweisen. Durch den Einsatz weiterer Chimären bestätigten sie, dass die C-terminale hypervariable Region des rab6 Proteins keinen direkten Einfluss auf die korrekte Lokalisation hat, sondern dass die Effektor-Region PM2 für das *targeting* an die Golgi-Membran unerlässlich ist. Die C-terminale Region ist jedoch im Hinblick auf die posttranslationale Modifikation des Proteins wichtig (Beranger et al., 1994a). Chavrier et al. konnten mit Hilfe verschiedener Chimären (rab5/rab7, rab2/rab5, rab2/rab7) zeigen, dass diese C-terminale Domäne strukturelle Elemente enthält, die für das subzelluläre *targeting* verantwortlich sind (Chavrier et al., 1991).

Die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigen, dass das Isoprenylierungsmotiv mit der Prenylierung die Voraussetzung für die Membranassoziation und somit die korrekte Funktion des rab1b Proteins ist (Peter et al., 1992). Der hypervariable N-Terminus mit dem RabSF1 Motiv ist nicht essentiell für die Prenylierung und die Membranassoziation, scheint jedoch einen großen Einfluss auf die korrekte Lokalisation des rab1b Proteins zu haben. Anhand der Ergebnisse der Chimäre rab1b-2-rhoA und der Daten von Beranger et al. zeigt sich, dass dieses Strukturmotiv nicht alleine für eine korrekte Lokalisation des Proteins verantwortlich sein kann. Beranger et al. konnten für rab6a zeigen, dass die Effektordomäne PM2 unerlässlich ist (Beranger et al., 1994a). Die Chimäre rab1b-2-rhoA besitzt diese Region des rab1b Proteins, dennoch konnte keine verstärkte Golgi Lokalisation nachgewiesen werden. Daher wird vermutet, dass der C-terminale

hypervariable Bereich in der subzellulären Lokalisation des rab1b Proteins mehrere Funktionen übernimmt.

Er scheint zum einen die Prenylierung und die damit verbundene Membrananbindung des rab1b Proteins zu verstärken, da sich für die Deletionsmutante rab1b wt Δ C3 eine wesentlich schwächere Prenylierung als der Wildtyp des rab1b Proteins und keine detektierbare Membranassoziation nachweisen ließ. Die Chimären zeigten, dass das Vorhandensein dieses Bereiches, auch wenn es sich um den C-Terminus einer anderen GTPase handelt, zu einer Prenylierung und Membranassoziation des Proteins führt, die dem Wildtyp des rab1b Proteins vergleichbar ist. Trotzdem konnte für diese Mutanten keine stärkere, dem Wildtyp des rab1b Proteins entsprechende Kolokalisation mit dem Golgi-Marker Giantin nachgewiesen werden. Daraus lässt sich schließen, dass dieser Bereich zum anderen auch die korrekte Lokalisation des rab1b Proteins verstärkt.

6.3 Das Protein PRA1 – Interaktionspartner von rab1b

Wie in der Einleitung beschrieben, wurde das aus der Ratte isolierte PRA1 von Martincic et al. 1997 als Interaktionspartner des Proteins rab3a Q81L gefunden (Martincic et al., 1997). Mittlerweile konnten auch das humane sowie das murine PRA1 isoliert werden (Bucci et al., 1999; Liang & Li, 2000). Es wurde gezeigt, dass PRA1 nur prenylierte rab GTPasen bindet. Die Art der Isoprenylierung ist jedoch unerheblich, da mit dem Einsatz verschiedener Mutanten wie zum Beispiel farnesylierten rab Proteinen ebenfalls eine Interaktion nachgewiesen werden konnte (Martincic et al., 1997).

6.3.1 Analysen zur Membranassoziation des Proteins PRA1

Die Membranassoziation des Proteins PRA1 konnte bisher nicht eindeutig geklärt werden. In biochemischen Assays konnte gezeigt werden, dass das Protein PRA1 sowohl zytosolisch als auch membrangebunden vorliegt (Bucci et al., 1999; Hutt et al., 2000; Abdul-Ghani et al., 2001). Lin et al. konnten im Jahr 2001 zeigen, dass es sich bei dem aus der Maus isolierten PRA1 Protein um ein integrales Membranprotein handelt, das vier Transmembran-Segmente besitzt, so dass die hydrophilen Domänen des N- und des C-Terminus sowie die Linker-Region zwischen den hydrophoben Domänen in das Zytoplasma hineinragen (Lin et al., 2001). Trotzdem bleibt die Frage offen, ob das Protein nur membrangebunden vorliegt. Alle Tests beruhen darauf, dass das Protein PRA1 auch zytosolisch vorliegen kann. So funktioniert das *yeast two-hybrid*-System

nur, wenn ein Protein löslich ist. Auch die bakterielle Expression ohne *inclusion bodies* spricht für die Löslichkeit dieses Proteins.

Das im Rahmen dieser Arbeit detektierte rekombinierte myc PRA1 (Ratte) war sowohl in der Zytosol- als auch in beiden Membranfraktionen nachzuweisen (Abb. 5.11). Daher scheint es sich weder um ein rein zytosolisches noch um ein membranassoziertes Protein zu handeln, da das zur Kontrolle nachgewiesene membranassozierte Protein p115 nur in der Zytosolfraktion detektiert werden konnte. Das Ergebnis spricht dafür, dass es sich bei dem eingesetzten PRA1 (Ratte) um ein Protein handelt, das sowohl membrangebunden als auch zytosolisch vorliegt. Das Signal in der zytosolischen Fraktion könnte auch eine Folge der Überexpression des myc PRA1 sein. Dieses Problem könnte durch den Nachweis des endogenen PRA1 Proteins gelöst werden. Dazu müsste jedoch zunächst ein polyklonaler Antikörper hergestellt werden.

Außerdem zeigt dieses Ergebnis, dass die Überexpression von rekombinantem myc PRA1 keinen Einfluss auf die Zytosol/Membran-Verteilung des endogenen Proteins rab1b hat (vgl. 5.6 /5.11). Die Immunfluoreszenzanalyse mit dem Fusionsprotein EGFP-PRA1 (vgl. Abb. 5.12) bestätigte die Daten von Abdul-Ghani et al., dass es sich bei PRA1 um ein, hauptsächlich im Golgi-Apparat lokalisiertes Protein handelt (Abdul-Ghani et al., 2001).

6.3.2 Analysen zur Rab-Spezifität des Proteins PRA1

In Bezug auf die Rab-Spezifität des Proteins PRA1 liegen widersprüchliche Aussagen vor. Experimente sowohl von Martincic et al. als auch von Bucci et al. lassen vermuten, dass PRA1 spezifisch mit verschiedenen rab Proteinen interagiert. Martincic et al. konnten für das PRA1 (Ratte) eine Interaktion mit rab1 und rab3a nachweisen. Sie konnten dagegen im *yeast two-hybrid*-System keine Interaktion mit dem Protein rac1 und der daueraktiven Mutante rhoA (G14V) aufzeigen, weshalb sie dieses Protein als *prenylated rab acceptor* (PRA) bezeichneten (Martincic et al., 1997). Auch Bucci et al. konnten für das humane PRA1 zeigen, dass nur verschiedene rab GTPasen ein Substrat für das Protein PRA1 darstellen. Für das zur Kontrolle eingesetzte ras Protein konnten sie im *yeast two-hybrid*-System ebenfalls keine Interaktion mit PRA1 zeigen (Bucci et al., 1999). In Studien von Figueroa et al. konnte dagegen für das murine PRA1 im *yeast two-hybrid*-System eine Interaktion mit den Proteinen H-ras, rhoA, TC21 und rap1a nachgewiesen werden. Auch das PRA1 ähnliche Protein Yip3p in Hefe interagiert mit H-ras und rhoA (Figueroa et al., 2001).

Daher wurden im Rahmen dieser Arbeit die Proteine rab1a (human), rab1b (Ratte), rab2 (human), rab3d (Ratte), rab4a (human), rab5a (human) und rab6a (human), das Hefeprotein ypt1 sowie zur Kontrolle zwei rho Proteine im *yeast two-hybrid*-System eingesetzt, um sie auf eine

Interaktion mit dem Protein PRA1 (Ratte) zu überprüfen (vgl. Tab. 5.5). Bei den rho Proteinen handelt es sich um das humane rhoA und das rho aus *Aplysia californica* (Madaule & Axel, 1985; Hall, 1992).

Es konnte eine starke Interaktion mit den Proteinen rab1a, rab1b und rab5a sowie eine schwache Interaktion mit den Proteinen rab4a und rab6a nachgewiesen werden. Dieses bestätigt die Daten des PRA1 (Ratte) von Martincic et al. und des humanen PRA1 von Bucci et al., dass dieses Protein mit mehreren rab Proteinen interagieren kann (Martincic et al., 1997; Bucci et al., 1999). Die Proteine rab2 und rab3d zeigten im *yeast two-hybrid*-System keine Interaktion mit PRA1. Das rab2 Protein ist im *intermediate compartment* sowie im *cis*-Golgi lokalisiert und am anterograden Transport wie das Protein rab1 beteiligt (Chavrier et al., 1990; Tisdale et al., 1992). Da PRA1 mit vielen rab Proteinen sowohl der Endo- als auch der Exozytose interagiert, ist es überraschend, dass PRA1 im Rahmen dieser Arbeit keine Interaktion mit rab2 zeigt. Es besteht jedoch die Möglichkeit, dass die Interaktion von rab2 mit PRA1 zu schwach ist, um sie mit dem hier eingesetzten System nachweisen zu können.

Bei rab3d handelt es sich um eine Isoform des Proteins rab3a, mit dessen daueraktiver Mutante rab3a Q81L das Protein PRA1 isoliert werden konnte. Alle vier Isoformen rab3a, rab3b, rab3c und rab3d werden im Gehirn und in endokrinen Geweben in verschiedenen Mengen exprimiert, wobei die Isoformen rab3a-c hauptsächlich mit synaptischen und sekretorischen Vesikeln kolokalisieren (Schlüter et al., 2002). Studien von Fenster et al. legen die Vermutung, dass auch PRA1 eine Komponente von synaptischen Vesikeln darstellt (Fenster et al., 2000). Rab3d wird dagegen hauptsächlich in der Hirnanhangdrüse, in exokrinen Drüsen und im Fettgewebe exprimiert (Schlüter et al., 2002). In diesen Geweben konnte bisher keine Expression von PRA1 nachgewiesen werden. Dieses müsste in weiteren Untersuchungen zum Beispiel anhand des endogenen Nachweises von PRA1 in Adipozyten überprüft werden.

Für das Yip3p in Hefe konnte gezeigt werden, dass dieses Hefeprotein mit dem Protein rab1 interagiert (Calero & Collins, 2002). Die nachgewiesene Interaktion des Proteins ypt1 mit dem PRA1 Protein bestätigt, dass es sich hier um eine in der Evolution konservierte Interaktion handelt.

Interessanterweise konnte in Bezug auf die rho GTPasen nur für das humane rhoA eine schwache Interaktion mit PRA1 nachgewiesen werden. Da das PRA1 jedoch von der Hefe bis hin zum Menschen konserviert zu sein scheint, kann dieses Ergebnis nicht interpretiert werden. Zum einen müsste überprüft werden, ob PRA1 in *Aplysia californica* exprimiert wird. Zum anderen besteht die Möglichkeit, dass die Interaktion von PRA1 mit dem rho aus *Aplysia californica* so schwach ist, dass sie im verwendeten *yeast two-hybrid*-System nicht nachweisbar

ist. Der Nachweis der Interaktion mit dem humanen rhoA untermauert jedoch die Vermutung von Figueroa et al., dass PRA1 ein Interaktionspartner für die meisten, wenn nicht alle prenylierten GTPasen ist (Figueroa et al., 2001).

Zusammengefasst lässt sich aus diesen Ergebnisse schließen, dass PRA1 mit vielen verschiedenen rab Proteinen der Exozytose (rab1a, rab1b, rab6a), der Endozytose (rab4a, rab4b, rab5a, rab5c, rab7, rab22) sowie der regulierten (rab3a) und polarisierten Sekretion (rab17) interagiert. Es zeigt sich außerdem, dass diese Interaktion spezieübergreifend ist. Dieses spricht für eine starke Konservierung der rab/PRA1 Interaktion in der Evolution. Um diese Aussage zu stützen, sollten weitere rab Proteine wie zum Beispiel rab3b, rab3c, rab9 und rab11 in die Analysen eingesetzt werden. Die Interaktionen mit anderen Mitgliedern der Familie der kleinen GTPasen konnten bisher nicht oft bestätigt werden (Martincic et al., 1997; Bucci et al., 1999; Figueroa et al., 2001). Durch den Einsatz weiterer GTPasen anderer Familien müssen mehr Daten gesammelt werden, auch im Hinblick auf die *in vivo* Funktion dieser möglichen Interaktion.

6.3.3 Analysen zur Nukleotid-Spezifität des Proteins PRA1

Die Aussagen zur Nukleotid-Spezifität des Proteins PRA1 sind ebenfalls widersprüchlich. Von Bucci et al. wurde gezeigt, dass das humane PRA1 hauptsächlich das aktive GTP-gebundene rab Protein bindet (Bucci et al., 1999). Martincic et al. konnten dagegen für das aus der Ratte isolierte PRA1 eine Interaktion unabhängig vom Nukleotid nachweisen (Martincic et al., 1997). Dieses wurde durch die Studien von Abdul-Ghani et al. unterstützt, die zeigten, dass das PRA1 Protein hauptsächlich mit der aktiven GTP-gebundenen Konformation interagiert, aber auch an rab1a und rab3a in der GDP-gebundenen und in der nukleotidfreien Konformation bindet (Abdul-Ghani et al., 2001).

Daher wurden im Rahmen dieser Arbeit inaktive und aktive Mutanten diverser rab Proteine eingesetzt, um zu überprüfen, ob die Interaktion von PRA1 konformations- bzw. nukleotidabhängig ist. Für die Analysen wurden rab Proteine verwendet, die durch Punktmutationen so verändert waren, dass sie die Fähigkeit zum Nukleotidaustausch verloren haben (vgl. Tab. 5.6). Die daueraktiven Mutanten weisen eine geringe GTPase-Aktivität auf, während die inaktiven Mutanten eine normale Affinität zu GDP, aber eine geringe zu GTP besitzen, und daher GDP-gebunden vorliegen. Außerdem wurden inaktive Mutanten wie zum Beispiel rab1b N121I eingesetzt, bei denen ein Asparagin (N) gegen Isoleucin (I) ausgetauscht wurde. Diese Mutanten besitzen eine geringe Affinität zu beiden Nukleotiden, so dass sie im

Allgemeines als nukleotidfrei bezeichnet werden (Tisdale et al., 1992; Nuoffer et al., 1994; Pind et al., 1994; Alvarez et al., 2003).

Mit diesen inaktiven und aktiven Mutanten konnte schon früher gezeigt werden, dass die Funktion des rab1 Proteins im vesikulären Transport eng mit der Integrität des Golgi-Apparates verknüpft ist. Analysen mit der GDP-gebundenen Mutante rab1a S25N zeigten, dass diese den Transport zwischen den Golgi-Kompartimenten hemmt und zu einem Schaden am Golgi-Apparat führt (Nuoffer et al., 1994). Neue Studien von Alvarez et al. belegen dieses auch für die inaktive Mutante rab1b N121I und die zu rab1a S25N analoge inaktive Mutante rab1b S22N. Das inaktive Protein rab1b S22N führt zu einem partiellen und rab1b N121I zu einem kompletten Zusammenbruch des Golgi-Apparates. Die aktive Mutante rab1b Q67L zeigt dagegen keinen nachweisbaren Effekt (Alvarez et al., 1999). Neben den rab1b Mutanten wurden analoge Mutanten des Proteins rab1a, rab6a und des Hefeproteins ypt1 eingesetzt. Da für einige potentielle Effektorproteine eine Interaktion nur mit daueraktiven Mutanten nachgewiesen werden konnte, wurden hier zusätzlich die inaktive Mutante und die beiden aktiven Mutanten des rho Proteins aus *Aplysia californica* eingesetzt, für dessen Wildtyp keine Interaktion mit PRA1 nachgewiesen werden konnte.

Die Ergebnisse des *yeast two-hybrid*-Systems zeigten, dass PRA1 nur die aktiven, GTP-gebundenen Mutanten rab1a Q70L, rab1b Q67L und ypt1 Q67L bindet (vgl. Tab. 5.7). Es konnte keine Interaktion mit einer inaktiven Mutante nachgewiesen werden. Dieses unterstützt die These von Bucci et al. für das humane PRA1, da auch das aus der Ratte isolierte PRA1 die GTP-gebundene Konformation zu bevorzugen scheint (Bucci et al., 1999). Das PRA1 Protein unterscheidet sich aufgrund dieser Ergebnisse von den Interaktionspartnern GM130 und MICAL-1 des Proteins rab1b. Für das Protein GM130 konnte eine Interaktion mit der daueraktiven Mutante rab1b Q67R und nicht mit dem Wildtyp des rab1b Proteins nachgewiesen werden. Durch die Deletionsmutante rab1b Q67R Δ C197 konnte außerdem gezeigt werden, dass für diese Interaktion das Isoprenylierungsmotiv nicht essentiell ist (Weide et al., 2001). Auch für den rab1b Interaktionspartner MICAL-1 konnte eine Interaktion nur mit den daueraktiven Mutanten rab1b Q67R und rab1b Q67L nachgewiesen werden, die ebenfalls unabhängig von einer Prenylierung ist (Weide et al., 2003). Für PRA1 konnte dagegen eine Interaktion sowohl mit dem Wildtyp als auch mit den daueraktiven Mutanten Q \rightarrow L gezeigt werden.

Überraschend war in dieser Untersuchung das Ergebnis, dass sich für PRA1 nur Interaktionen mit der aktiven Q \rightarrow L Mutante und nicht mit der aktiven Q \rightarrow R Mutante wie zum Beispiel rab6a Q72R nachweisen ließen (vgl. Tab. 5.7). Dieses wird von den Daten von Bucci et al. gestützt, da

auch sie eine Interaktion des humanen Proteins PRA1 mit den daueraktiven Mutanten rab5a Q79L, rab6 Q72L und rab7 Q67L nachgewiesen haben.

Da die Isoprenylierung essentiell für eine Interaktion von PRA1 mit den rab Proteinen ist, könnte dieses ein Hinweis darauf sein, dass sich diese beiden Mutanten in ihrer Isoprenylierung unterscheiden. Für die inaktiven Mutanten rab1a S25N und rab6a T27N konnte eine Prenylierung nachgewiesen werden (Nuoffer et al., 1994; Schiedel et al., 1995). Da die Mutante rab1b S22N analog zur Mutante rab1a S25N ist, kann davon ausgegangen werden, dass auch sie prenyliert wird. Aber schon früher wurde über die Prenylierung der daueraktiven Mutanten diskutiert. Für die daueraktive Mutante rab5 Q79L konnte in einem zellfreien Test eine Geranylgeranylierung nachgewiesen werden, die keine großen Abweichungen vom Wildtyp des rab5 Proteins zeigte (Hoffenberg et al., 1995). Auch für die im Rahmen dieser Arbeit eingesetzte daueraktive Mutante rab1b Q67L konnte von Wilson et al. eine, dem Wildtyp des rab1b Proteins vergleichbare Prenylierung in HEK 293-Zellen nachgewiesen werden (Wilson et al., 1996b). Für die daueraktive Mutante rab6a Q72R konnte dagegen eine Prenylierung dieser Mutante weder im zellfreien Test noch in Sf9-Zellen detektiert werden (Schiedel et al., 1995). Auch diese Daten unterstützen die Vermutung, dass sich die Isoprenylierung der Q→R von der Q→L Mutante unterscheidet.

Daher wurden die beiden Mutanten rab1b Q67R und rab1b Q67L in eine Zellfraktionierung eingesetzt, um die Membranassoziation dieser Proteine zu überprüfen, da im Fall einer Membranassoziation das Protein eine Prenylierung aufweisen muss. In der *Western Blot* Analyse wiesen beide Mutanten starke Signale in der jeweiligen Zytosolfraktion auf. In den Membranfraktionen konnten jedoch erst bei dem vierfachen Volumen des Zellextraktes nur für die Mutante rab1b Q67L schwache Signale in den Membranfraktionen nachgewiesen werden (vgl. Abb. 5.16). Dieses ist ein erster Anhaltspunkt, dass die daueraktive Mutante rab1b Q67R eventuell nicht korrekt modifiziert wird. Um dieses Problem zu klären, müsste die Prenylierung direkt durch eine radioaktive Markierung überprüft werden (Schiedel et al., 1995).

Die Daten aus der Hefe sollten zusätzlich mit Hilfe eines *GST-pulldowns* überprüft werden. Dazu wurden der Wildtyp des rab1b Proteins, die inaktive Mutante rab1bS22N sowie die beiden daueraktiven Mutanten rab1b Q67R und rab1b Q67L eingesetzt. Das PRA1 wurde als GST-Fusionsprotein bakteriell exprimiert und die Mutanten wurden in BHK-21-Zellen exprimiert, um die korrekte Modifikation dieser Proteine zu gewährleisten (vgl. Abb. 5.13).

In diesem *pulldown* bestätigte sich die Interaktion des PRA1 mit dem Wildtyp und der daueraktiven, GTP-gebundenen Mutante rab1b Q67L (vgl. Abb. 5.14). Interessanterweise war jedoch im *GST-pulldown* auch die zuvor negative daueraktive Mutante rab1b Q67R positiv. Sie

wies sogar das stärkste Signal auf, wobei jedoch auch die Negativkontrolle mit dem GST-Protein leicht positiv war. Dieses Ergebnis könnte darauf hindeuten, dass die daueraktive Mutante rab1 Q67R unspezifisch an das GST-Protein bzw. an das GST-PRA1 Fusionsprotein bindet.

Zusammenfassend scheint es sich bei PRA1 um ein membrangebundenes Protein zu handeln, dass sowohl mit dem Wildtyp als auch mit der GTP-gebundenen Konformation vieler verschiedener rab Proteine der Endo- und Exozytose sowie der regulierten und polarisierten Sekretion interagiert. Außerdem konnte für PRA1 auch eine Interaktion mit anderen GTPasen wie H-ras und rhoA nachgewiesen werden. Dabei ist jedoch die Prenylierung der GTPasen eine essentielle Voraussetzung für die Interaktion.

6.4. Charakterisierung der Interaktion des rab1b Proteins mit PRA1

Bisher ist nicht bekannt, welche Struktur motive der rab Proteine für die Interaktion mit PRA1 notwendig sind. Figueroa et al. postulieren, dass die Prenylierung des rab Proteins das Schlüsselsignal für die Interaktion mit PRA1 ist (Figueroa et al., 2001). Experimente von Martincic et al. zeigen dagegen, dass das Erkennungssignal für die Interaktion von PRA1 mit den rab Proteinen nicht auf die Prenylierung limitiert ist (Martincic et al., 1997). Dieses sollte im Rahmen dieser Arbeit am Beispiel von rab1b überprüft werden. Dazu wurden pAS Plasmidkonstrukte der Deletionsmutanten und Chimären des rab1b Proteins, die bereits in der Analyse zur Lokalisation verwendet wurden, zusammen mit dem pGADT7 PRA1 im *yeast two-hybrid*-System eingesetzt. Damit sollte untersucht werden, wie sich die Deletion bzw. der Austausch einzelner Struktur motive auf die Interaktion des rab1b Proteins mit PRA1 auswirken. Hier wurden auch die Deletionsmutanten rab1b wt $\Delta C2$ und rab1b wt $\Delta N1\Delta C3$ eingesetzt, die in den Säugerzellen nicht exprimiert und somit nicht für die Analysen zur Lokalisation genutzt werden konnten. Zusätzlich wurden mir die daueraktiven Chimären rab1bQ67L-2-rab6a und rab6aQ72L-2-rab1b zur Verfügung gestellt (vgl. Tab. 5.8).

Die Deletionsmutanten rab1b wt $\Delta C1$ und rab1b wt $\Delta C2$, die nicht prenyliert werden können, dienten als Negativ-Kontrolle. Da sie keine Interaktion mit PRA1 zeigten, bestätigt das Ergebnis die Aussage von Martincic et al., dass die Prenylierung des rab Proteins eine essentielle Voraussetzung für die Interaktion mit PRA1 ist (Martincic et al., 1997).

Nur für die Deletionsmutante rab1b wt $\Delta N1$ konnte eine Interaktion mit dem Protein PRA1 im *yeast two-hybrid*-System nachgewiesen werden. Somit scheint der hypervariable N-Terminus mit dem Strukturmotiv RabSF1 die Interaktion mit PRA1 nicht zu beeinflussen.

Die Deletionsmutante *rab1b wt ΔC3*, deren hypervariabler C-Terminus mit dem Strukturmotiv RabSF4 fehlt sowie die Mutante *rab1b wt ΔN1ΔC3*, die keinen hypervariablen Bereich aufweist, zeigten dagegen keine Interaktion mit PRA1. Dieses deutet darauf hin, dass das RabSF4 Strukturmotiv einen Einfluss auf die Interaktion mit PRA1 besitzt. Daher kann die Aussage von Figueroa et al., dass es sich bei der Prenylierung um das einzige Schlüsselsignal für die Interaktion einer GTPase mit dem Interaktionspartner PRA1 handelt, im Rahmen dieser Arbeit nicht bestätigt werden (Figueroa et al., 2001).

Interessant sind die Ergebnisse der eingesetzten Chimären *rab1b-2-rhoA*, *rab1b-3-rhoA*, *rab1b-2-rab6a* und *rab6a-2-rab1b* sowie der daueraktiven Chimären *rab1bQ67L-2-rab6a* und *rab6a Q72L-2-rab1b*. Für keine dieser Chimären konnte eine Interaktion im *yeast two-hybrid*-System nachgewiesen werden, obwohl sie aus jeweils einem stark und einem schwach mit PRA1 interagierenden Protein zusammengesetzt wurden. Es stellte sich die Frage, ob die Chimären in diesem Hefesystem eventuell nicht funktionsfähig sind. Daher wurden sie mit dem Protein MSS4 getestet.

Von Vorteil war hier die Tatsache, dass im *yeast two-hybrid*-System für dieses Protein eine Interaktion nicht nur mit der inaktiven, GDP-gebundenen Mutante, sondern auch mit dem Wildtyp des Proteins *rab1b* nachgewiesen werden konnte (Weide, 1998). In der Kotransformation wurden neben dem Wildtyp des *rab1b* Proteins und der inaktiven Mutante *rab1b S22N* zur Kontrolle auch der Wildtyp der Proteine *rab6a* und *rhoA* eingesetzt (vgl. Tab. 5.9). Es konnte, wie erwartet, sowohl für den Wildtyp als auch für die inaktive Mutante des *rab1b* Proteins eine Interaktion mit MSS4 nachgewiesen werden.

Auch für das humane *rhoA* konnte eine Interaktion mit diesem Protein nachgewiesen werden. Es wurden für MSS4 bisher nur Interaktionen mit einer Subgruppe der *rab* Proteine nachgewiesen, weshalb es sich nicht wie ein generelles Regulatorprotein verhält (Burton et al., 1994). Das Ergebnis aus dem *yeast two-hybrid*-System deutet jedoch darauf hin, dass es sich bei MSS4 um ein Protein handelt, das nicht nur spezifisch mit *rab* Proteinen, sondern eventuell auch mit anderen GTPasen interagiert.

Für die eingesetzten Chimären *rab1b-2-rhoA*, *rab1b-3-rhoA* und *rab1b-2-rab6a* konnte eine Interaktion mit dem Protein MSS4 nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis zeigt, dass diese Chimären im eingesetzten Hefesystem funktionsfähig sind. Nur für die Chimäre *rab6a-2-rab1b* konnte keine Bindung an das MSS4 nachgewiesen werden, wobei dieses Ergebnis jedoch kein Beweis für deren fehlende Funktionsfähigkeit im Hefesystem ist.

Es wird postuliert, dass das Erkennungssignal für MSS4 in oder nahe der *switch I* und *switch II* Regionen liegt (Zhu et al., 2001). Die drei positiven Chimären weisen die *switch* Regionen des

rab1b Proteins auf. Die negative Chimäre rab6a-2-rab1b enthält den N-Terminus und damit verbunden die *switch* Regionen des Proteins rab6a. Für dieses Protein konnte bisher keine Interaktion mit MSS4 nachgewiesen werden.

Es stellt sich die Frage, warum die drei anderen Chimären nicht mit PRA1 interagieren?

Es wird postuliert, dass die Interaktion der rab Proteine mit ihren Regulator- und Effektorproteinen auf der Bindung verschiedener RabF und RabSF Motive beruht. Dabei sind die unterschiedlichen Kombinationen der Bindungsmotive ausschlaggebend (Pereira-Leal & Seabra, 2000). Die Bindung von generellen Regulatoren wie REP und GDI ist nukleotidsensitiv. Da die Konformationsänderung hauptsächlich die *switch I* und *switch II* Regionen betrifft, sind hier die RabF Motive wichtig (Overmeyer et al., 1998). Beranger et al. konnten zeigen, dass das Regulatorprotein GDI die Effektordomäne (RabF1), das RabF2 Motiv sowie die hypervariable Region am C-Terminus des rab6 Proteins für eine Bindung benötigt. Das Strukturmotiv RabF2 und die hypervariable Region, aber nicht die Effektordomäne sind außerdem wichtig für die Rab-Geranylgeranyltransferase (Beranger et al., 1994b). Für das Regulatorprotein REP, das wie GDI die inaktive, GDP-gebundene Konformation bindet, ist die *switch II* Domäne eine „Schlüsselregion“ für die Bindung. Veränderungen dieser Region machen es möglich, dass REP die GDP-gebundene Konformation erkennt und das rab Protein bindet (Overmeyer et al., 1998). Von Pereira-Leal et al. wurde dieses bestätigt, indem sie zeigen konnten, dass nur die Struktur motive RabF1, RabF3 und RabF4, die Teile der *switch* Regionen beinhalten, für die Bindung des REP verantwortlich sind (Pereira-Leal et al., 2003). Auch für die Bindung von Regulatoren wie GEFs und GAPs sind die beiden *switch* Region und zusätzlich das Strukturmotiv RabSF3 essentiell (Becker et al., 1991; Burstein et al., 1992; Brondyk et al., 1993; McKiernan et al., 1993; Day et al., 1998). Wahrscheinlich wird durch das RabSF3 Motiv eine gewisse Spezifität der Bindung erreicht, denn auch für die Interaktion von rab Proteinen mit ihren spezifischen Interaktionspartnern spielen die RabSF Motive eine bedeutende Rolle. So konnte gezeigt werden, dass für die Bindung von Rabphilin-3a an das Protein rab3a neben den beiden *switch* Regionen die Struktur motive RabSF1, RabSF3 und RabSF4 notwendig sind (Ostermeier & Brunger, 1999). Es wird postuliert, dass es zwei *subfamily*-spezifische Oberflächen für die Interaktion mit Effektorproteinen gibt. Die eine spezifische Oberfläche wird durch die Struktur motive RabSF1, RabSF3 und RabSF4 geformt, die auch die Interaktion des Rabphilin-3a an das rab3a vermittelt. Auf der entgegengesetzten Seite formt das RabSF2 Motiv eine zweite *subfamily*-spezifische Oberfläche nahe der *switch I* Region. Es kann davon ausgegangen werden, dass sich die gleichzeitige Bindung von generellen Regulatorproteinen und spezifischen Regulator- bzw. Effektorproteinen gegenseitig ausschließt. Da die Interaktion

beider Proteingruppen nukleotidsensitiv ist, erfordern beide eine Bindung an die *switch* Regionen (Pereira-Leal & Seabra, 2000).

Da PRA1 das rab Protein in der aktiven, GTP-gebundenen Konformation bindet, liegt die Vermutung nahe, dass die beiden *switch* Regionen auch für diese Bindung essentiell sind.

Für PRA1 konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass ein Fehlen des hypervariablen C-Terminus mit dem RabSF4 Motiv eine Interaktion von PRA1 mit rab1b unterbindet. Dieses würde auf der einen Seite für eine Bindung an die *subfamily*-spezifische Oberfläche RabSF1, RabSF3 und RabSF4 sprechen. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass eine Deletion des hypervariablen Bereiches mit dem Strukturmotiv RabSF1 keinen Einfluss auf die Interaktion hat. Auf der anderen Seite interagiert PRA1 jedoch mit sehr vielen rab Proteinen, so dass diese Interaktion eventuell nicht nur an das RabSF4 Motiv bzw. mehrere RabSF Motive gebunden ist.

Die Ergebnisse der Chimären weisen darauf hin, dass auf jeden Fall eine Kombination der Struktur motive des N- und des C-Terminus wichtig für die Interaktion mit PRA1 ist. Nur beide Bereiche eines Proteins zusammen scheinen eine funktionelle Oberfläche für die Bindung des PRA1 Proteins zu bilden.

Die Hefedaten sollten mit Hilfe von GST-*pulldowns* bestätigt werden. Zunächst wurden die Deletionsmutanten rab1b wt Δ N1 als Positiv-Kontrolle und rab1b wt Δ C1 als Negativ-Kontrolle der Interaktion eingesetzt. Das PRA1 wurde wie zuvor als GST-Fusionsprotein bakteriell exprimiert und BHK-Zellen wurden transient mit den pSV42HA Plasmidkonstrukten der Mutanten transfiziert, um die posttranslationale Modifikation zu gewährleisten. Es zeigte sich jedoch, dass sowohl die Positiv- als auch die Negativkontrolle in der *Western Blot* Analyse vergleichbare Signale mit dem Fusionsprotein GST-PRA1 und zum Teil auch mit dem GST Protein aufwiesen. Selbst eine Erhöhung der Stringenz beim Waschen der Sepharose *beads* konnte diese Bindung nicht lösen. Dabei muss es sich um eine unspezifische Bindung handeln, da zum einen das GST Protein allein ein positives Signal aufwies und zum anderen schon mehrfach gezeigt wurde, dass das PRA1 Protein nur prenylierte rab Proteine, also nicht rab1b wt Δ C1 binden kann. Aufgrund dieser unspezifischen Bindung konnten die Ergebnisse des *yeast two-hybrid*-Systems bisher nicht mit einer zusätzlichen Methode bestätigt werden.

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass PRA1 mit dem rab1b Protein interagiert, wobei diese Bindung jedoch abhängig von der Isoprenylierung der GTPase ist. Interessant ist, dass sich das Protein PRA1 nicht in eine Kategorie der bisher bekannten Interaktionspartner von rab1b einordnen lässt. Es ist nicht rab1b spezifisch und scheint außerdem auch nicht, wie zum Beispiel MSS4, nur mit Subgruppen der rab Proteine zu interagieren (Burton et al., 1997). Dass das

Protein PRA1 viele rab Proteine bindet, spricht für eine Funktion in der Zelle als Regulatorprotein (Martincic et al., 1997, Bucci et al., 1999). Im Gegensatz zu anderen Regulatorproteinen wie REP oder GDI bevorzugt das PRA1 jedoch, wie die Effektorproteine, die aktive, GTP-gebundene Konformation der rab Proteine (Stenmark & Olkkonen, 2001). Allerdings unterscheidet sich das PRA1 auch von den bekannten rab1b Interaktionspartnern GM130, Golgin-84 und MICAL-1. Im Gegensatz zu diesen Proteinen interagiert es sowohl mit dem Wildtyp als auch mit der aktiven, GTP-gebundenen Form des rab1b Proteins. Außerdem besitzt PRA1 nicht die charakteristischen *coiled-coil* Regionen wie GM130, MICAL-1 und Golgin-84. Gemeinsam ist diesen Proteinen jedoch eine Membranbindung und eine vorherrschende Lokalisation im Golgi-Apparat (Weide et al., 2001; Weide et al., 2003; Diao et al., 2003).

6.5 Ausblick

Aufgrund dieser Ergebnisse wäre eine weitere Charakterisierung des Proteins PRA1 und seiner Interaktion mit den kleinen GTPasen sehr interessant.

Da das Protein PRA1 bislang nur als rekombinantes, *myc-getagtes* Protein in den Zellen analysiert werden konnte, würde sich die Herstellung eines polyklonalen Antikörpers anbieten, mit dem das endogene PRA1 in der Zelle analysiert werden könnte. Somit könnten zum einen der Effekt der Überexpression vermieden und zum anderen die Ergebnisse mit dem rekombinanten myc PRA1 überprüft werden.

In Bezug auf die Rab-Spezifität konnte für PRA1 bisher eine Interaktion mit vielen rab Proteinen und auch der GTPase rhoA nachgewiesen werden. Um zu überprüfen, mit welchen rab Proteinen das PRA1 außerdem interagiert, sollten noch weitere rab Proteine wie rab2 (Ratte), rab 3b, rab3c, rab9 und rab11 in die Analysen zur Rab-Spezifität von PRA1 eingesetzt werden. Auch sollte die Interaktion des PRA1 mit anderen GTPasen wie zum Beispiel H-ras überprüft werden, damit weitere Daten zu der Fragestellung gewonnen werden können, ob PRA1 ein Interaktionspartner für alle rab Proteine bzw. alle kleinen GTPasen ist.

Im *yeast two-hybrid*-System konnte in den vorliegenden Analysen für PRA1 keine Interaktion mit den Proteinen rab3d, das zum Beispiel in Adipozyten exprimiert wird, und rho aus *Aplysia californica* nachgewiesen werden. Mit einem polyklonalen Antikörper gegen das endogene PRA1 könnte auch untersucht werden, ob PRA1 zum einen in der Spezies *Aplysia californica* und zum anderen in Adipozyten exprimiert wird.

In den Analysen zur Nukleotid-Spezifität von PRA1 konnte eine Interaktion nur mit dem Wildtyp der rab Proteine und den daueraktiven Mutanten Q→L nachgewiesen werden. Die daueraktiven Mutanten Q→R und auch die von Martincic et al. eingesetzte daueraktive Mutante rhoA (G14V) waren negativ (Martincic et al., 1997). Da eine Prenylierung des rab Proteins für die Interaktion mit PRA1 essentiell ist, wäre es des Weiteren notwendig, die Prenylierung des rho aus *Aplysia californica* sowie der daueraktiven Mutanten rab1b Q67R, rab6a Q72R und rho G14V mit Hilfe einer radioaktiven Markierung zu überprüfen (Schiedel et al., 1995; Wilson et al., 1996b). Zum Beispiel kann der Mevalonatstoffwechsel auf einer frühen Stufe gehemmt werden, so dass die Neubildung von Isoprenderivaten und somit die Geranylgeranylsynthese nicht stattfinden kann. Durch die Zugabe von radioaktiv markiertem Mevalonolacton kann diese Hemmung aufgehoben werden, und es erfolgt die Synthese von Geranylgeranyl, das kovalent an das rab Protein gebunden wird. Mit Hilfe einer Fluorographie können anschließend die Isoprenreste sichtbar gemacht und das Protein auf seine Prenylierung überprüft werden. Dieses wäre auch für weitere Untersuchungen, in die diese Mutanten eingesetzt werden, wichtig.

Um zu überprüfen, welche Struktur motive des rab1b Proteins die korrekte Lokalisation und die Protein/Proteininteraktion mit PRA1 beeinflussen, wurden in dieser Arbeit rab/rhoA Chimären eingesetzt, bei denen der C-Terminus des rab1b Proteins durch einen äquivalenten Strukturbereich der GTPase rhoA ersetzt wurde. Für diese Chimären konnte keine Interaktion mit PRA1 nachgewiesen werden. Um die Untersuchungen zu diesen Aspekten fortzuführen, sollten weitere Chimären hergestellt werden, bei denen der N-Terminus mit dem Strukturmotiv RabSF1 durch rho ersetzt wird. Hier würde sich das in dieser Arbeit eingesetzte rho aus *Aplysia californica* anbieten, da dieses keine Interaktion mit dem PRA1 aufwies. Auch Chimären, bei denen einzelne Bereiche zwischen den konservierten PM bzw. G-Boxen des rab1b Proteins ausgetauscht würden, wären von großem Nutzen. Außerdem wäre es für die Analyse von Interaktionspartnern, die nur mit der daueraktiven Mutante des rab1b Proteins interagieren, empfehlenswert, diese Chimären auch mit der daueraktiven Mutante rab1b Q67L herzustellen.

In den letzten Jahren konnten viele rab Proteine sowie Regulator- bzw. Effektorproteine isoliert werden. Dennoch ist die Rolle der rab Proteine im intrazellulären Vesikel- und Membrantransport sowie der genaue Mechanismus ihrer Funktion bisher nicht zufriedenstellend aufgeklärt worden. Es benötigt intensive Forschungsarbeit und wird noch viel Zeit in Anspruch nehmen, um den Wirkmechanismus dieser interessanten rab GTPasen und ihrer Interaktionspartner genau zu verstehen.

7. Zusammenfassung

Die rab Proteine gehören zur Familie der kleinen GTPasen und stellen molekulare Schalter in der Zelle dar, die in den intrazellulären Vesikel- und Membrantransport involviert sind. Für ihre Funktion ist neben ihrer korrekten Lokalisation auch die Interaktion mit anderen Proteinen wichtig. Deshalb sollte im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden, welchen Einfluss einzelne Struktur motive des rab1b Proteins auf dessen Lokalisation und seine Interaktion mit dem Protein PRA1 haben. Dazu wurden Deletionsmutanten und Chimären hergestellt, die anschließend in verschiedene Untersuchungen eingesetzt wurden. In Bezug auf die Lokalisation zeigten fast alle Deletionsmutanten und Chimären bis auf die Mutante rab1b wt Δ C1, die kein Isoprenylierungsmotiv besitzt, eine dem rab1b Wildtyp vergleichbare Zytosol/Membran-Verteilung und Prenylierung. Für die beiden Mutanten rab1b wt Δ C3 und rab6a-2-rab1b konnte zwar eine Prenylierung, aber keine Membranassoziation nachgewiesen werden. In der Immunfluoreszenzanalyse zeigte keine der eingesetzten Mutanten eine starke Lokalisation im Golgi-Apparat. In den Analysen zur Charakterisierung von PRA1 konnte in Bezug auf die Membranassoziation eine gleichmäßige Zytosol/Membran-Verteilung nachgewiesen werden. Im *yeast two-hybrid*-System interagierte es nukleotidabhängig mit mehreren rab Proteinen und auch einer rhoA GTPase. Bei dem Einsatz der Mutanten von rab1b im *yeast two-hybrid*-System zeigte nur die Entfernung des hypervariablen N-Terminus des rab1b keinen Einfluss auf die Interaktion mit PRA1. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass es sich bei PRA1 um ein membrangebundenes Protein handelt, das bevorzugt mit GTPasen in der aktiven, GTP-gebundenen Konformation interagiert. Aus den Ergebnissen zur Lokalisation und Interaktion des Proteins rab1b lässt sich schließen, dass der N-terminale Bereich des rab1b Proteins wichtig für die korrekte Lokalisation des Proteins ist, jedoch die Interaktion mit PRA1 nicht beeinflusst. Das Isoprenylierungsmotiv des rab1b Proteins ist dagegen sowohl für dessen korrekte Lokalisation als auch für die Interaktion mit PRA1 essentiell. Der hypervariable Bereich am C-Terminus dieser GTPase scheint die korrekte Lokalisation sowie die Membranassoziation des Proteins zu verstärken. Zudem scheint dieser Bereich auch in der Interaktion mit PRA1 eine wichtige Rolle zu spielen. Der N-Terminus des rab1b Proteins scheint nur zusammen mit dem C-Terminus desselben Proteins eine funktionelle Oberfläche für die Bindung des Interaktionspartners PRA1 zu bilden. Da PRA1 in seinen Eigenschaften mit keinem bisher bekannten Interaktionspartner des rab1b Proteins vergleichbar ist, sollten weitere Untersuchungen zur Charakterisierung dieses Proteins und der Interaktion mit den GTPasen durchgeführt werden.

8. Literaturverzeichnis

A

Abdul-Ghani, M., Gougeon, P. Y., Prosser, D. C., Da Silva, L. F., Ngsee, J. K. (2001): PRA isoforms are targeted to distinct membrane compartments. *J.Biol.Chem.* **276**: 6225-6233

Alexandrov, K., Horiuchi, H., Steele-Mortimer, O., Seabra, M. C., Zerial, M. (1994): Rab escort protein-1 is a multifunctional protein that accompanies newly prenylated rab proteins to their target membranes. *EMBO J.* **13**: 5262-5273

Allan, B. B., Moyer, B. D., Balch, W. E. (2000): Rab1 recruitment of p115 into a cis-SNARE complex: programming budding COPII vesicles for fusion. *Science* **289**: 444-448

Alvarez, C., Fujita, H., Hubbard, A., Sztul, E. (1999): ER to Golgi transport: Requirement for p115 at a pre-Golgi VTC stage. *J.Cell Biol.* **147**: 1205-1222

Alvarez, C., Garcia-Mata, R., Brandon, E., Sztul, E. (2003): COPI Recruitment Is Modulated by a Rab1b-dependent Mechanism. *Mol.Biol.Cell* **14**: 2116-2127

Anant, J. S., Desnoyers, L., Machius, M., Demeler, B., Hansen, J. C., Westover, K. D., Deisenhofer, J., Seabra, M. C. (1998): Mechanism of Rab geranylgeranylation: formation of the catalytic ternary complex. *Biochemistry* **37**: 12559-12568

Andres, D. A., Seabra, M. C., Brown, M. S., Armstrong, S. A., Smeland, T. E., Cremers, F. P., Goldstein, J. L. (1993): cDNA cloning of component A of Rab geranylgeranyl transferase and demonstration of its role as a Rab escort protein. *Cell* **73**: 1091-1099

Araki, K., Nakanishi, H., Hirano, H., Kato, M., Sasaki, T., Takai, Y. (1995): Purification and characterization of Rab GDI beta from rat brain. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* **211**: 296-305

B

Bahadoran, P., Busca, R., Chiaverini, C., Westbroek, W., Lambert, J., Bille, K., Valony, G., Fukuda, M., Naeyaert, J. M., Ortonne, J. P., Ballotti, R. (2003): Characterization of the molecular defects in Rab27a, caused by RAB27A missense mutations found in patients with Griscelli syndrome. *J.Biol.Chem.* **278**: 11386-11392

Baker, D., Wuestehube, L., Schekman, R., Botstein, D., Segev, N. (1990): GTP-binding Ypt1 protein and Ca²⁺ function independently in a cell-free protein transport reaction. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **87**: 355-359

Barbacid, M. (1987): Ras genes. *Annu.Rev.Biochem.* **56**: 779-827

Barlowe, C. (2002): COPII-dependent transport from the endoplasmic reticulum. *Curr.Opin.Cell Biol.* **14**: 417-422

Barr, F. A., Puype, M., Vandekerckhove, J., Warren, G. (1997): GRASP65, a protein involved in the stacking of Golgi cisternae. *Cell* **91**: 253-262

Barroso, M., Nelson, D. S., Sztul, E. (1995): Transcytosis-associated protein (TAP)/p115 is a general fusion factor required for binding of vesicles to acceptor membranes. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **92**: 527-531

Bascom, R. A., Srinivasan, S., Nussbaum, R. L. (1999): Identification and characterization of golgin-84, a novel Golgi integral membrane protein with a cytoplasmic coiled-coil domain. *J.Biol.Chem.* **274**: 2953-2962

- Bayer, M. (1999): Identifizierung und Charakterisierung zellulärer Interaktionspartner exocytotischer kleiner GTPasen. *Diplomarbeit WWU Münster*
- Becker, J., Tan, T. J., Trepte, H. H., Gallwitz, D. (1991): Mutational analysis of the putative effector domain of the GTP-binding Ypt1 protein in yeast suggests specific regulation by a novel GAP activity. *EMBO J.* **10**: 785-792
- Beranger, F., Paterson, H., Powers, S., De Gunzburg, J., Hancock, J. F. (1994a): The effector domain of Rab6, plus a highly hydrophobic C terminus, is required for Golgi apparatus localization. *Mol. Cell Biol.* **14**: 744-758
- Beranger, F., Cadwallader, K., Porfiri, E., Powers, S., Evans, T., De Gunzburg, J., Hancock, J. F. (1994b): Determination of structural requirements for the interaction of Rab6 with RabGDI and Rab geranylgeranyltransferase. *J. Biol. Chem.* **269**: 13637-13643
- Bilbilis, K. (2002): Studien zur Funktion und Interaktion ER/Golgi lokalisierter Rab GTPasen. *Diplomarbeit WWU Münster*
- Birnboim, H. C., Doly, J. (1979): A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* **7**: 1513-1523
- Bock, J. B., Klumperman, J., Davanger, S., Scheller, R. H. (1997): Syntaxin 6 functions in trans-Golgi network vesicle trafficking. *Mol. Biol. Cell* **8**: 1261-1271
- Bordier, C. (1981): Phase separation of integral membrane proteins in Triton X-114 solution. *J. Biol. Chem.* **256**: 1604-1607
- 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
- Brondyk, W. H., McKiernan, C. J., Burstein, E. S., Macara, I. G. (1993): Mutants of Rab3A analogous to oncogenic Ras mutants. Sensitivity to Rab3A-GTPase activating protein and Rab3A-guanine nucleotide releasing factor. *J. Biol. Chem.* **268**: 9410-9415
- Brüggemann, I. (2002): Molekulare Charakterisierung der Interaktion postsynaptischer Proteine. *Diplomarbeit WWU Münster*
- Bryant, N. J., James, D. E. (2003): The Sec1p/Munc18 (SM) protein, Vps45p, cycles on and off membranes during vesicle transport. *J. Cell Biol.* **161**: 691-696
- Bucci, C., Parton, R. G., Mather, I. H., Stunnenberg, H., Simons, K., Hoflack, B., Zerial, M. (1992): The small GTPase rab5 functions as a regulatory factor in the early endocytic pathway. *Cell* **70**: 715-728
- Bucci, C., Chiariello, M., Lattero, D., Maiorano, M., Bruni, C. B. (1999): Interaction cloning and characterization of the cDNA encoding the human prenylated rab acceptor (PRA1). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **258**: 657-662
- Burstein, E. S., Brondyk, W. H., Macara, I. G. (1992): Amino acid residues in the Ras-like GTPase Rab3A that specify sensitivity to factors that regulate the GTP/GDP cycling of Rab3A. *J. Biol. Chem.* **267**: 22715-22718
- Burton, J., Roberts, D., Montaldi, M., Novick, P., De Camilli, P. (1993): A mammalian guanine-nucleotide-releasing protein enhances function of yeast secretory protein Sec4. *Nature* **361**: 464-467
- Burton, J., De Camilli, P. (1994a): A novel mammalian guanine nucleotide exchange factor (GEF) specific for rab proteins. *Adv. Second Messenger Phosphoprotein Res.* **29**: 109-119

Burton, J. L., Burns, M. E., Gatti, E., Augustine, G. J., De Camilli, P. (1994b): Specific interactions of Mss4 with members of the Rab GTPase subfamily. *EMBO J.* **13**: 5547-5558

Burton, J. L., Slepnev, V., De Camilli, P. V. (1997): An evolutionarily conserved domain in a subfamily of Rabs is crucial for the interaction with the guanyl nucleotide exchange factor Mss4. *J.Biol.Chem.* **272**: 3663-3668

C

Calero, M., Collins, R. N. (2002): *Saccharomyces cerevisiae* Pra1p/Yip3p interacts with Yip1p and Rab proteins. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* **290**: 676-681

Calero, M., Chen, C. Z., Zhu, W., Winand, N., Havas, K. A., Gilbert, P. M., Burd, C. G., Collins, R. N. (2003): Dual prenylation is required for rab protein localization and function. *Mol.Biol.Cell* **14**: 1852-1867

Cantalupo, G., Alifano, P., Roberti, V., Bruni, C. B., Bucci, C. (2001): Rab-interacting lysosomal protein (RILP): the Rab7 effector required for transport to lysosomes. *EMBO J.* **20**: 683-693

Cao, X., Ballew, N., Barlowe, C. (1998): Initial docking of ER-derived vesicles requires Usolp and Ypt1p but is independent of SNARE proteins. *EMBO J.* **17**: 2156-2165

Cao, X., Barlowe, C. (2000): Asymmetric requirements for a Rab GTPase and SNARE proteins in fusion of COPII vesicles with acceptor membranes. *J.Cell Biol.* **149**: 55-66

Chavrier, P., Parton, R. G., Hauri, H. P., Simons, K., Zerial, M. (1990): Localization of low molecular weight GTP binding proteins to exocytic and endocytic compartments. *Cell* **62**: 317-329

Chavrier, P., Gorvel, J. P., Stelzer, E., Simons, K., Gruenberg, J., Zerial, M. (1991): Hypervariable C-terminal domain of rab proteins acts as a targeting signal. *Nature* **353**: 769-772

Chavrier, P., Goud, B. (1999): The role of ARF and Rab GTPases in membrane transport. *Curr.Opin.Cell Biol.* **11**: 466-475

Chen, W., Feng, Y., Chen, D., Wandinger-Ness, A. (1998): Rab11 is required for trans-golgi network-to-plasma membrane transport and a preferential target for GDP dissociation inhibitor. *Mol.Biol.Cell* **9**: 3241-3257

Chen, Y. A., Scheller, R. H. (2001): SNARE-mediated membrane fusion. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* **2**: 98-106

Chen, Y. T., Holcomb, C., Moore, H. P. (1993): Expression and localization of two low molecular weight GTP-binding proteins, Rab8 and Rab10, by epitope tag. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **90**: 6508-6512

Chien, C. T., Bartel, P. L., Sternglanz, R., Fields, S. (1991): The two-hybrid system: a method to identify and clone genes for proteins that interact with a protein of interest. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **88**: 9578-9582

Cremers, F. P., Armstrong, S. A., Seabra, M. C., Brown, M. S., Goldstein, J. L. (1994): REP-2, a Rab escort protein encoded by the choroideremia-like gene. *J.Biol.Chem.* **269**: 2111-2117

Cuif, M. H., Possmayer, F., Zander, H., Bordes, N., Jollivet, F., Couedel-Court, Janoueix-Lerosey, I., Langsley, G., Bornens, M., Goud, B. (1999): Characterization of GAPCenA, a GTPase activating protein for Rab6, part of which associates with the centrosome. *EMBO J.* **18**: 1772-1782

D

Dagert, M., Ehrlich, S. D. (1979): Prolonged incubation in calcium chloride improves the competence of *Escherichia coli* cells. *Gene* **6**: 23-28

Day, G. J., Mosteller, R. D., Broek, D. (1998): Distinct subclasses of small GTPases interact with guanine nucleotide exchange factors in a similar manner. *Mol.Cell Biol.* **18**: 7444-7454

de Leeuw, H. P., Koster, P. M., Calafat, J., Janssen, H., van Zonneveld, A. J., van Mourik, J. A., Voorberg, J. (1998): Small GTP-binding proteins in human endothelial cells. *Br.J.Haematol.* **103**: 15-19

de Renzis, S., Sönnichsen, B., Zerial, M. (2002): Divalent Rab effectors regulate the sub-compartmental organization and sorting of early endosomes. *Nat.Cell Biol.* **4**: 124-133

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.U.S.A* **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

Diao, A., Rahman, D., Pappin, D. J., Lucocq, J., Lowe, M. (2003): The coiled-coil membrane protein golgin-84 is a novel rab effector required for Golgi ribbon formation. *J.Cell Biol.* **160**: 201-212

Diaz, E., Schimmöller, F., Pfeffer, S. R. (1997): A novel Rab9 effector required for endosome-to-TGN transport. *J.Cell Biol.* **138**: 283-290

Dirac-Svejstrup, A. B., Sumizawa, T., Pfeffer, S. R. (1997): Identification of a GDI displacement factor that releases endosomal Rab GTPases from Rab-GDI. *EMBO J.* **16**: 465-472

E

Elazar, Z., Mayer, T., Rothman, J. E. (1994): Removal of Rab GTP-binding proteins from Golgi membranes by GDP dissociation inhibitor inhibits inter-cisternal transport in the Golgi stacks. *J.Biol.Chem.* **269**: 794-797

Enouf, V., Chwetzoff, S., Trugnan, G., Cohen, J. (2003): Interactions of rotavirus VP4 spike protein with the endosomal protein Rab5 and the prenylated Rab acceptor PRA1. *J.Virol.* **77**: 7041-7047

Esters, H., Alexandrov, K., Iakovenko, A., Ivanova, T., Thoma, N., Rybin, V., Zerial, M., Scheidig, A. J., Goody, R. S. (2001): Vps9, Rabex-5 and DSS4: proteins with weak but distinct nucleotide- exchange activities for Rab proteins. *J.Mol.Biol.* **310**: 141-156

Evan, G. I., Lewis, G. K., Ramsay, G., Bishop, J. M. (1985): Isolation of monoclonal antibodies specific for human c-myc proto-oncogene product. *Mol.Cell Biol.* **5**: 3610-3616

Evans, D. T., Tillman, K. C., Desrosiers, R. C. (2002): Envelope glycoprotein cytoplasmic domains from diverse lentiviruses interact with the prenylated Rab acceptor. *J.Virol.* **76**: 327-337

F

Fasshauer, D., Sutton, R. B., Brunger, A. T., Jahn, R. (1998): Conserved structural features of the synaptic fusion complex: SNARE proteins reclassified as Q- and R-SNAREs. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **95**: 15781-15786

Feig, L. A. (1994): Guanine-nucleotide exchange factors: a family of positive regulators of Ras and related GTPases. *Curr.Opin.Cell Biol.* **6**: 204-211

Feng, Y., Press, B., Wandinger-Ness, A. (1995): Rab 7: an important regulator of late endocytic membrane traffic. *J.Cell Biol.* **131**: 1435-1452

Fenster, S. D., Chung, W. J., Zhai, R., Cases-Langhoff, C., Voss, B., Garner, A. M., Kaempf, U., Kindler, S., Gundelfinger, E. D., Garner, C. C. (2000): Piccolo, a presynaptic zinc finger protein structurally related to bassoon. *Neuron* **25**: 203-214

Fields, S., Song, O. (1989): A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* **340**: 245-246

Figueroa, C., Taylor, J., Vojtek, A. B. (2001): Prenylated Rab acceptor protein is a receptor for prenylated small GTPases. *J.Biol.Chem.* **276**: 28219-28225

Fischer von Mollard, G., Südhof, T. C., Jahn, R. (1991): A small GTP-binding protein dissociates from synaptic vesicles during exocytosis. *Nature* **349**: 79-81

Fischer von Mollard, G., Stahl, B., Li, C., Südhof, T. C., Jahn, R. (1994): Rab proteins in regulated exocytosis. *Trends Biochem.Sci.* **19**: 164-168

Flick, J. S. Johnston, M. (1990): Two systems of glucose repression of the GAL1 promoter in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol.Cell Biol.* **10**: 4757-4769

Fukui, K., Sasaki, T., Imazumi, K., Matsuura, Y., Nakanishi, H., Takai, Y. (1997): Isolation and characterization of a GTPase activating protein specific for the Rab3 subfamily of small G proteins. *J.Biol.Chem.* **272**: 4655-4658

G

Gallwitz, D., Donath, C., Sander, C. (1983): A yeast gene encoding a protein homologous to the human c-has/bas proto-oncogene product. *Nature* **306**: 704-707

Garcia-Mata, R., Szul, T., Alvarez, C., Sztul, E. (2003): ADP-ribosylation factor/COPI-dependent events at the endoplasmic reticulum-Golgi interface are regulated by the guanine nucleotide exchange factor GBF1. *Mol.Biol.Cell* **14**: 2250-2261

Geppert, M., Goda, Y., Stevens, C. F., Südhof, T. C. (1997): The small GTP-binding protein Rab3A regulates a late step in synaptic vesicle fusion. *Nature* **387**: 810-814

Gey, G. O., Coffman, W. D., Kubicek, M. T. (1951) *Cancer Res.* **12**: 264

Gomes, A. Q., Ali, B. R., Ramalho, J. S., Godfrey, R. F., Barral, D. C., Hume, A. N., Seabra, M. C. (2003): Membrane targeting of rab GTPases is influenced by the prenylation motif. *Mol.Biol.Cell* **14**: 1882-1899

Görlich, D. (1997): Nuclear protein import. *Curr.Opin.Cell Biol.* **9**: 412-419

Gorvel, J. P., Chavrier, P., Zerial, M., Gruenberg, J. (1991): Rab5 controls early endosome fusion in vitro. *Cell* **64**: 915-925

Goud, B., Zahraoui, A., Tavitian, A., Saraste, J. (1990): Small GTP-binding protein associated with Golgi cisternae. *Nature* **345**: 553-556

Gougeon, P. Y., Prosser, D. C., Da Silva, L. F., Ngsee, J. K. (2002): Disruption of Golgi morphology and trafficking in cells expressing mutant prenylated rab acceptor-1. *J.Biol.Chem.* **277**: 36408-36414

Graham, F. L., van der Eb, A. J. (1973): A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. *Virology* **52**: 456-467

Guan, K. L., Dixon, J. E. (1991): Eukaryotic proteins expressed in *Escherichia coli*: an improved thrombin cleavage and purification procedure of fusion proteins with glutathione S-transferase. *Anal.Biochem.* **192**: 262-267

Guo, W., Roth, D., Walch-Solimena, C., Novick, P. (1999): The exocyst is an effector for Sec4p, targeting secretory vesicles to sites of exocytosis. *EMBO J.* **18**: 1071-1080

H

Hall, A., Marshall, C. J., Spurr, N. K., and Weiss, R. A. (1983): Identification of transforming gene in two human sarcoma cell lines as a new member of the ras gene family located on chromosome 1. *Nature* **303**: 396-400

Hall, A. (1990): The cellular functions of small GTP-binding proteins. *Science* **249**: 635-640

Hall, A. (1992): Ras-related GTPases and the cytoskeleton. *Mol.Biol.Cell* **3**: 475-479

Hanahan, D. (1983): Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J.Mol.Biol.* **166**: 557-580

Harper, J. W., Adami, G. R., Wei, N., Keyomarsi, K., Elledge, S. J. (1993): The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin- dependent kinases. *Cell* **75**: 805-816

Harvey, J. J. (1964): An unidentified virus which causes the rapid production of tumors in mice. *Nature* **204**: 1104-1105

Haubruck, H., Prange, R., Vorgias, C., Gallwitz, D. (1989): The ras-related mouse ypt1 protein can functionally replace the YPT1 gene product in yeast. *EMBO J.* **8**: 1427-1432

Hoffenberg, S., Sanford, J. C., Liu, S., Daniel, D. S., Tuvin, M., Knoll, B. J., Wessling-Resnick, M., Dickey, B. F. (1995): Biochemical and functional characterization of a recombinant GTPase, Rab5, and two of its mutants. *J.Biol.Chem.* **270**: 5048-5056

Horiuchi, H., Lippe, R., McBride, H. M., Rubino, M., Woodman, P., Stenmark, H., Rybin, V., Wilm, M., Ashman, K., Mann, M., Zerial, M. (1997): A novel Rab5 GDP/GTP exchange factor complexed to Rabaptin-5 links nucleotide exchange to effector recruitment and function. *Cell* **90**: 1149-1159

Hutt, D. M., Da Silva, L. F., Chang, L. H., Prosser, D. C., Ngsee, J. K. (2000): PRA1 inhibits the extraction of membrane-bound rab GTPase by GDI1. *J.Biol.Chem.* **275**: 18511-18519

I

Imamura, H., Tanaka, K., Hihara, T., Umikawa, M., Kamei, T., Takahashi, K., Sasaki, T., Takai, Y. (1997): Bni1p and Bnr1p: downstream targets of the Rho family small G-proteins which interact with profilin and regulate actin cytoskeleton in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* **16**: 2745-2755

J

Jahn, R., Lang, T., Südhof, T. C. (2003): Membrane fusion. *Cell* **112**: 519-533

Janoueix-Lerosey, I., Jollivet, F., Camonis, J., Marche, P. N., Goud, B. (1995): Two-hybrid system screen with the small GTP-binding protein Rab6. Identification of a novel mouse GDP dissociation inhibitor isoform and two other potential partners of Rab6. *J.Biol.Chem.* **270**: 14801-14808

K

Kalab, P., Pu, R. T., Dasso, M. (1999): The ran GTPase regulates mitotic spindle assembly. *Curr.Biol.* **9**: 481-484

Kauffmann-Zeh, A., Rodriguez-Viciano, P., Ulrich, E., Gilbert, C., Coffey, P., Downward, J., Evan, G. (1997): Suppression of c-Myc-induced apoptosis by Ras signalling through PI(3)K and PKB. *Nature* **385**: 544-548

Khosravi-Far, R., Lutz, R. J., Cox, A. D., Conroy, L., Bourne, J. R., Sinensky, M., Balch, W. E., Buss, J. E., Der, C. J. (1991): Isoprenoid modification of rab proteins terminating in CC or CXC motifs. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **88**: 6264-6268

Khosravi-Far, R., Solski, P. A., Clark, G. J., Kinch, M. S., Der, C. J. (1995): Activation of Rac1, RhoA, and mitogen-activated protein kinases is required for Ras transformation. *Mol.Cell Biol.* **15**: 6443-6453

Köster, M. (1999): Analyse der Interaktion von rab1b Proteinen mit ihren Regulationspartnern. *Diplomarbeit WWU Münster*

Kyshe, L., Anderson, J. (1984): Electroblothing of multiple gels. A simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from acrylamid to nitrocellulose. *J. Biochem. Biophys. Methods* **10**: 203-209

L

Laemmli, U. K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685

Lazar, T., Gotte, M., Gallwitz, D. (1997): Vesicular transport: how many Ypt/Rab-GTPases make a eukaryotic cell? *Trends Biochem.Sci.* **22**: 468-472

Li, B., Fields, S. (1993): Identification of mutations in p53 that affect its binding to SV40 large T antigen by using the yeast two-hybrid system. *FASEB J.* **7**: 957-963

Li, G., D'Souza-Schorey, C., Barbieri, M. A., Cooper, J. A., Stahl, P. D. (1997): Uncoupling of membrane ruffling and pinocytosis during Ras signal transduction. *J.Biol.Chem.* **272**: 10337-10340

Li, L. Y., Shih, H. M., Liu, M. Y., Chen, J. Y. (2001): The cellular protein PRA1 modulates the anti-apoptotic activity of Epstein-Barr virus BHRF1, a homologue of Bcl-2, through direct interaction. *J.Biol.Chem.* **276**: 27354-27362

Liang, G., Li, G. (2000): Mouse prenylated rab acceptor is a novel Golgi membran protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **275**: 509-516

Lin, J., Liang, Z., Zhang, Z., Li, G. (2001): Membrane topography and topogenesis of prenylated Rab acceptor (PRA1). *J.Biol.Chem.* **276**: 41733-41741

Linstedt, A. D., Hauri, H. P. (1993): Giantin, a novel conserved Golgi membrane protein containing a cytoplasmic domain of at least 350 kDa. *Mol.Biol.Cell* **4**: 679-693

Linstedt, A. D., Foguet, M., Renz, M., Seelig, H. P., Glick, B. S., Hauri, H. P. (1995): A C-terminally-anchored Golgi protein is inserted into the endoplasmic reticulum and then transported to the Golgi apparatus. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **92**: 5102-5105

Linstedt, A. D., Jesch, S. A., Mehta, A., Lee, T. H., Garcia-Mata, R., Nelson, D. S., Sztul, E. (2000): Binding relationships of membrane tethering components. The giantin N terminus and the GM130 N terminus compete for binding to the p115 C terminus. *J.Biol.Chem.* **275**: 10196-10201

Lütcke, A., Jansson, S., Parton, R. G., Chavrier, P., Valencia, A., Huber, L. A., Lehtonen, E., Zerial, M. (1993): Rab17, a novel small GTPase, is specific for epithelial cells and is induced during cell polarization. *J.Cell Biol.* **121**: 553-564

M

McPherson, I. A., Stoker, M. G. P. (1962): *Virology* **16**: 147

Madaule, P.; Axel, R. (1985): A novel ras-related gene family. *Cell* **41**: 31-40

Mallard, F., Tang, B. L., Galli, T., Tenza, D., Saint-Pol, A., Yue, X., Antony, C., Hong, W., Goud, B., Johannes, L. (2002): Early/recycling endosomes-to-TGN transport involves two SNARE complexes and a Rab6 isoform. *J.Cell Biol.* **156**: 653-664

Martincic, I., Peralta, M. E., Ngsee, J. K. (1997): Isolation and characterization of a dual prenylated Rab and VAMP2 receptor. *J.Biol.Chem.* **272**: 26991-26998

Martinez, O., Schmidt, A., Salamero, J., Hoflack, B., Roa, M., Goud, B. (1994): The small GTP-binding protein rab6 functions in intra-Golgi transport. *J.Cell Biol.* **127**: 1575-1588

Martinez, O., Antony, C., Pehau-Arnaudet, G., Berger, E. G., Salamero, J., Goud, B. (1997): GTP-bound forms of rab6 induce the redistribution of Golgi proteins into the endoplasmic reticulum. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **94**: 1828-1833

Martinez, O., Goud, B. (1998): Rab proteins. *Biochim.Biophys.Acta* **1404**: 101-112

Matanis, T., Akhmanova, A., Wulf, P., Del Nery, E., Weide, T., Stepanova, T., Galjart, N., Grosveld, F., Goud, B., De Zeeuw, C. I., Barnekow, A., Hoogenraad, C. C. (2002): Bicaudal-D regulates COPI-independent Golgi-ER transport by recruiting the dynein-dynactin motor complex. *Nat.Cell Biol.* **4**: 986-992

Mayer, A., Wickner, W., Haas, A. (1996): Sec18p (NSF)-driven release of Sec17p (alpha-SNAP) can precede docking and fusion of yeast vacuoles. *Cell* **85**: 83-94

Mayer, T., Touchot, N., Elazar, Z. (1996): Transport between cis and medial Golgi cisternae requires the function of the Ras-related protein Rab6. *J.Biol.Chem.* **271**: 16097-16103

McKiernan, C. J., Brondyk, W. H., Macara, I. G. (1993): The Rab3A GTPase interacts with multiple factors through the same effector domain. Mutational analysis of cross-linking of Rab3A to a putative target protein. *J.Biol.Chem.* **268**: 24449-24452

Ménasché, G., Pastural, E., Feldmann, J., Certain, S., Ersoy, F., Dupuis, S., Wulffraat, N., Bianchi, D., Fischer, A., Le Deist, F., de Saint, B. G. (2000): Mutations in RAB27A cause Griscelli syndrome associated with haemophagocytic syndrome. *Nat.Genet.* **25**: 173-176

Ménasché, G., Feldmann, J., Houdusse, A., Desaymard, C., Fischer, A., Goud, B., de Saint, B. G. (2003): Biochemical and functional characterization of Rab27a mutations occurring in Griscelli syndrome patients. *Blood* **101**: 2736-2742

Mohrmann, K., van der Sluijs, P. (1999): Regulation of membrane transport through the endocytic pathway by rabGTPases. *Mol.Membr.Biol.* **16**: 81-87

Mohrmann, K., Gerez, L., Oorschot, V., Klumperman, J., van der Sluijs, P. (2002): Rab4 function in membrane recycling from early endosomes depends on a membrane to cytoplasm cycle. *J.Biol.Chem.* **277**: 32029-32035

Moore, I., Schell, J., Palme, K. (1995): Subclass-specific sequence motifs identified in Rab GTPases. *Trends Biochem.Sci.* **20**: 10-12

Moore, M. S., Blobel, G. (1993): The GTP-binding protein Ran/TC4 is required for protein import into the nucleus. *Nature* **365**: 661-663

Moss, J., Vaughan, M. (1995): Structure and function of ARF proteins: activators of cholera toxin and critical components of intracellular vesicular transport processes. *J.Biol.Chem.* **270**: 12327-12330

Moss, J., Vaughan, M. (1998): Molecules in the ARF orbit. *J.Biol.Chem.* **273**: 21431-21434

Moya, M., Roberts, D., Novick, P. (1993): DSS4-1 is a dominant suppressor of sec4-8 that encodes a nucleotide exchange protein that aids Sec4p function. *Nature* **361**: 460-463

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

N

Nagano, F., Sasaki, T., Fukui, K., Asakura, T., Imazumi, K., Takai, Y. (1998): Molecular cloning and characterization of the noncatalytic subunit of the Rab3 subfamily-specific GTPase-activating protein. *J.Biol.Chem.* **273**: 24781-24785

Nakajima, H., Hirata, A., Ogawa, Y., Yonehara, T., Yoda, K., Yamasaki, M. (1991): A cytoskeleton-related gene, *uso1*, is required for intracellular protein transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *J.Cell Biol.* **113**: 245-260

Nakamura, M., Masuda, H., Horii, J., Kuma, K., Yokoyama, N., Ohba, T., Nishitani, H., Miyata, T., Tanaka, M., Nishimoto, T. (1998): When overexpressed, a novel centrosomal protein, RanBPM, causes ectopic microtubule nucleation similar to gamma-tubulin. *J.Cell Biol.* **143**: 1041-1052

Nakamura, N., Rabouille, C., Watson, R., Nilsson, T., Hui, N., Slusarewicz, P., Kreis, T. E., Warren, G. (1995): Characterization of a cis-Golgi matrix protein, GM130. *J.Cell Biol.* **131**: 1715-1726

Nakamura, N., Lowe, M., Levine, T. P., Rabouille, C., Warren, G. (1997): The vesicle docking protein p115 binds GM130, a cis-Golgi matrix protein, in a mitotically regulated manner. *Cell* **89**: 445-455

Nelson, D. S., Alvarez, C., Gao, Y. S., Garcia-Mata, R., Fialkowski, E., Sztul, E. (1998): The membrane transport factor TAP/p115 cycles between the Golgi and earlier secretory compartments and contains distinct domains required for its localization and function. *J.Cell Biol.* **143**: 319-331

Nickel, W., Brugger, B., Wieland, F. T. (2002): Vesicular transport: the core machinery of COPI recruitment and budding. *J.Cell Sci.* **115**: 3235-3240

Nishimura, N., Nakamura, H., Takai, Y., Sano, K. (1994): Molecular cloning and characterization of two rab GDI species from rat brain: brain-specific and ubiquitous types. *J.Biol.Chem.* **269**: 14191-14198

Novick, P., Field, C., Schekman, R. (1980): Identification of 23 complementation groups required for post-translational events in the yeast secretory pathway. *Cell* **21**: 205-215

Novick, P., Brennwald, P. (1993): Friends and family: the role of the Rab GTPases in vesicular traffic. *Cell* **75**: 597-601

Novick, P., Zerial, M. (1997): The diversity of Rab proteins in vesicle transport. *Curr.Opin.Cell Biol.* **9**: 496-504

Nuoffer, C., Davidson, H. W., Matteson, J., Meinkoth, J., Balch, W. E. (1994): A GDP-bound of rab1 inhibits protein export from the endoplasmic reticulum and transport between Golgi compartments. *J.Cell Biol.* **125**: 225-237

Nuoffer, C., Balch, W. E. (1994): GTPases: multifunctional molecular switches regulating vesicular traffic. *Annu.Rev.Biochem.* **63**: 949-990

Nuoffer, C., Wu, S. K., Dascher, C., Balch, W. E. (1997): Mss4 does not function as an exchange factor for Rab in endoplasmic reticulum to Golgi transport. *Mol.Biol.Cell* **8**: 1305-1316

O

Olkkonen, V. M., Dupree, P., Killisch, I., Lütcke, A., Zerial, M., Simons, K. (1993): Molecular cloning and subcellular localization of three GTP-binding proteins of the rab subfamily. *J.Cell Sci.* **106**: 1249-1261

Olkkonen, V. M., Stenmark, H. (1997): Role of Rab GTPases in membrane traffic. *Int.Rev.Cytol.* **176**: 1-85

Ostermeier, C., Brunger, A. T. (1999): Structural basis of Rab effector specificity: crystal structure of the small G protein Rab3A complexed with the effector domain of rabphilin-3A. *Cell* **96**: 363-374

Overmeyer, J. H., Wilson, A. L., Erdman, R. A., Maltese, W. A. (1998): The putative "switch 2" domain of the Ras-related GTPase, Rab1B, plays an essential role in the interaction with Rab escort protein. *Mol.Biol.Cell* **9**: 223-235

Overmeyer, J. H., Wilson, A. L., Maltese, W. A. (2001): Membrane targeting of a Rab GTPase that fails to associate with Rab escort protein (REP) or guanine nucleotide dissociation inhibitor (GDI). *J.Biol.Chem.* **276**: 20379-20386

P

Pai, E. F., Kabsch, W., Krengel, U., Holmes, K. C., John, J., Wittinghofer, A. (1989): Structure of the guanine-nucleotide-binding domain of the Ha-ras oncogene product p21 in the triphosphate conformation. *Nature* **341**: 209-214

Parker, B. A., Stark, G. R. (1979): Regulation of simian virus 40 transcription: sensitive analysis of the RNA species present early in infections by virus or viral DNA. *J.Virol.* **31**: 360-369

Peränen, J., Auvinen, P., Virta, H., Wepf, R., Simons, K. (1996): Rab8 promotes polarized membrane transport through reorganization of actin and microtubules in fibroblasts. *J.Cell Biol.* **135**: 153-167

Pereira-Leal, J. B., Seabra, M. C. (2000): The mammalian Rab family of small GTPases: definition of family and subfamily sequence motifs suggests a mechanism for functional specificity in the Ras superfamily. *J.Mol.Biol.* **301**: 1077-1087

Pereira-Leal, J. B., Seabra, M. C. (2001): Evolution of the Rab family of small GTP-binding proteins. *J.Mol.Biol.* **313**: 889-901

Pereira-Leal, J. B., Strom, M., Godfrey, R. F., Seabra, M. C. (2003): Structural determinants of Rab and Rab Escort Protein interaction: Rab family motifs define a conserved binding surface. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **301**: 92-97

Peter, M., Chavrier, P., Nigg, E. A., Zerial, M. (1992): Isoprenylation of rab proteins on structurally distinct cysteine motifs. *J.Cell Sci.* **102**: 857-865

Pfeffer, S. R., Soldati, T., Geissler, H., Rancano, C., Dirac-Svejstrup, B. (1995): Selective membrane recruitment of Rab GTPases. *Cold Spring Harb.Symp.Quant.Biol.* **60**: 221-227

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

Pfeffer, S. R. (2001): Rab GTPases: specifying and deciphering organelle identity and function. *Trends Cell Biol.* **11**: 487-491

Pfeffer, S. (2003): Membrane domains in the secretory and endocytic pathways. *Cell* **112**: 507-517

Pind, S. N., Nuoffer, C., McCaffery, J. M., Plutner, H., Davidson, H. W., Farquhar, M. G., Balch, W. E. (1994): Rab1 and Ca²⁺ are required for the fusion of carrier vesicles mediating endoplasmic reticulum to Golgi transport. *J.Cell Biol.* **125**: 239-252

Plutner, H., Cox, A. D., Pind, S., Khosravi-Far, R., Bourne, J. R., Schwaninger, R., Der, C. J., Balch, W. E. (1991): Rab1b regulates vesicular transport between the endoplasmic reticulum and successive Golgi compartments. *J.Cell Biol.* **115**: 31-43

Prasher, D. C., Eckenrode, V. K., Ward, W. W., Prendergast, F. G., Cormier, M. J. (1992): Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein. *Gene* **111**: 229-233

Puthenveedu, M. A., Linstedt, A. D. (2001): Evidence that Golgi structure depends on a p115 activity that is independent of the vesicle tether components giantin and GM130. *J.Cell Biol.* **155**: 227-238

Pylypenko, O., Rak, A., Reents, R., Niculae, A., Sidorovitch, V., Cioaca, M. D., Bessolitsyna, E., Thoma, N. H., Waldmann, H., Schlichting, I., Goody, R. S., Alexandrov, K. (2003): Structure of Rab escort protein-1 in complex with Rab geranylgeranyltransferase. *Mol.Cell* **11**: 483-494

R

Riederer, M. A., Soldati, T., Shapiro, A. D., Lin, J., Pfeffer, S. R. (1994): Lysosome biogenesis requires Rab9 function and receptor recycling from endosomes to the trans-Golgi network. *J.Cell Biol.* **125**: 573-582

Roosterman, D., Schmidlin, F., Bunnett, N. W. (2003): Rab5a and rab11a mediate agonist-induced trafficking of protease-activated receptor. *Am.J.Physiol Cell Physiol* **284**: C1319-C1329

Rothman, J. E. (1994): Mechanisms of intracellular protein transport. *Nature* **372**: 55-63

Rothman, J. E., Wieland, F. T. (1996): Protein sorting by transport vesicles. *Science* **272**: 227-234

S

- Sacher, M., Jiang, Y., Barrowman, J., Scarpa, A., Burston, J., Zhang, L., Schieltz, D., Yates, J. R., III, Abeliovich, H., Ferro-Novick, S. (1998): TRAPP, a highly conserved novel complex on the cis-Golgi that mediates vesicle docking and fusion. *EMBO J.* **17**: 2494-2503
- Sacher, M., Barrowman, J., Schieltz, D., Yates, J. R., III, Ferro-Novick, S. (2000): Identification and characterization of five new subunits of TRAPP. *Eur.J.Cell Biol.* **79**: 71-80
- Saiki, R. K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K. B., Horn, G. T., Erlich, H. A., Arnheim, N. (1985): Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* **230**: 1350-1354
- Salminen, A., Novick, P. J. (1987): A ras-like protein is required for a post-Golgi event in yeast secretion. *Cell* **49**: 527-538
- Sanford, J. C., Pan, Y., Wessling-Resnick, M. (1995): Properties of Rab5 N-terminal domain dictate prenylation of C-terminal cysteines. *Mol.Biol.Cell* **6**: 71-85
- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A. R. (1977): DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **74**: 5463-5467
- Sapperstein, S. K., Walter, D. M., Grosvenor, A. R., Heuser, J. E., Waters, M. G. (1995): p115 is a general vesicular transport factor related to the yeast endoplasmic reticulum to Golgi transport factor Uso1p. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **92**: 522-526
- Saraste, J., Lahtinen, U., Goud, B. (1995): Localization of the small GTP-binding protein rab1p to early compartments of the secretory pathway. *J.Cell Sci.* **108**: 1541-1552
- Satoh, A., Wang, Y., Malsam, J., Beard, M. B., Warren, G. (2003): Golgin-84 is a rab1 Binding Partner Involved in Golgi Structure. *Traffic.* **4**: 153-161
- Schalk, I., Zeng, K., Wu, S. K., Stura, E. A., Matteson, J., Huang, M., Tandon, A., Wilson, I. A., Balch, W. E. (1996): Structure and mutational analysis of Rab GDP-dissociation inhibitor. *Nature* **381**: 42-48
- Schiedel, A. C., Barnekow, A., Mayer, T. (1995): Nucleotide induced conformation determines posttranslational isoprenylation of the ras related rab6 protein in insect cells. *FEBS Lett.* **376**: 113-119
- Schimmöller, F., Simon, I., Pfeffer, S. R. (1998): Rab GTPases, directors of vesicle docking. *J.Biol.Chem.* **273**: 22161-22164
- Schlüter, O. M., Khvotchev, M., Jahn, R., Südhof, T. C. (2002): Localization versus function of Rab3 proteins. Evidence for a common regulatory role in controlling fusion. *J.Biol.Chem.* **277**: 40919-40929
- Schmitt, H. D., Puzicha, M., Gallwitz, D. (1988): Study of a temperature-sensitive mutant of the ras-related YPT1 gene product in yeast suggests a role in the regulation of intracellular calcium. *Cell* **53**: 635-647
- Seabra, M. C., Goldstein, J. L., Südhof, T. C., Brown, M. S. (1992): Rab geranylgeranyl transferase. A multisubunit enzyme that prenylates GTP-binding proteins terminating in Cys-X-Cys or Cys-Cys. *J.Biol.Chem.* **267**: 14497-14503
- Seabra, M. C., Ho, Y. K., Anant, J. S. (1995): Deficient geranylgeranylation of Ram/Rab27 in choroideremia. *J.Biol.Chem.* **270**: 24420-24427
- Seabra, M. C. (1996): Nucleotide dependence of Rab geranylgeranylation. Rab escort protein interacts preferentially with GDP-bound Rab. *J.Biol.Chem.* **271**: 14398-14404

- Seabra, M. C., Mules, E. H., Hume, A. N. (2002): Rab GTPases, intracellular traffic and disease. *Trends Mol.Med.* **8**: 23-30
- Segev, N., Mulholland, J., Botstein, D. (1988): The yeast GTP-binding YPT1 protein and a mammalian counterpart are associated with the secretion machinery. *Cell* **52**: 915-924
- Segev, N. (2001): Ypt and Rab GTPases: insight into functions through novel interactions. *Curr.Opin.Cell Biol.* **13**: 500-511
- Segev, N. (2001): Ypt/rab gtpases: regulators of protein trafficking. *Sci.STKE*. **2001**: RE11
- Shen, F., Seabra, M. C. (1996): Mechanism of digeranylgeranylation of Rab proteins. Formation of a complex between monogeranylgeranyl-Rab and Rab escort protein. *J.Biol.Chem.* **271**: 3692-3698
- Shih, T. Y., Williams, D. R., Weeks, M. O., Maryak, J. M., Vass, W. C., Scolnick, E. M. (1978): Comparison of the genomic organization of Kirsten and Harvey sarcoma viruses. *J.Virol.* **27**: 45-55
- Short, B., Barr, F. A. (2003): Membrane traffic: a glitch in the Golgi matrix. *Curr.Biol.* **13**: 311-313
- Shorter, J., Warren, G. (1999): A role for the vesicle tethering protein, p115, in the post-mitotic stacking of reassembling Golgi cisternae in a cell-free system. *J.Cell Biol.* **146**: 57-70
- Soldati, T., Riederer, M. A., Pfeffer, S. R. (1993): Rab GDI: a solubilizing and recycling factor for rab9 protein. *Mol.Biol.Cell* **4**: 425-434
- Soldati, T., Shapiro, A. D., Svejstrup, A. B., Pfeffer, S. R. (1994): Membrane targeting of the small GTPase Rab9 is accompanied by nucleotide exchange. *Nature* **369**: 76-78
- Söllner, T., Whiteheart, S. W., Brunner, M., Erdjument-Bromage, H., Geromanos, S., Tempst, P., Rothman, J. E. (1993): SNAP receptors implicated in vesicle targeting and fusion. *Nature* **362**: 318-324
- Sönnichsen, B., Lowe, M., Levine, T., Jamsa, E., Dirac-Svejstrup, B., Warren, G. (1998): A role for giantin in docking COPI vesicles to Golgi membranes. *J.Cell Biol.* **140**: 1013-1021
- Sönnichsen, B., de Renzis, S., Nielsen, E., Rietdorf, J., Zerial, M. (2000): Distinct membrane domains on endosomes in the recycling pathway visualized by multicolor imaging of Rab4, Rab5, and Rab11. *J.Cell Biol.* **149**: 901-914
- Steele-Mortimer, O., Clague, M. J., Huber, L. A., Chavrier, P., Gruenberg, J., Gorvel, J. P. (1994): The N-terminal domain of a rab protein is involved in membrane-membrane recognition and/or fusion. *EMBO J.* **13**: 34-41
- Stenmark, H., Parton, R. G., Steele-Mortimer, O., Lütcke, A., Gruenberg, J., Zerial, M. (1994): Inhibition of rab5 GTPase activity stimulates membrane fusion in endocytosis. *EMBO J.* **13**: 1287-1296
- Stenmark, H., Olkkonen, V. M. (2001): The Rab GTPase family. *Genome Biol.* **2**: REVIEWS3007
- Stephens, D. J., Pepperkok, R. (2002): Imaging of procollagen transport reveals COPI-dependent cargo sorting during ER-to-Golgi transport in mammalian cells. *J.Cell Sci.* **115**: 1149-1160
- Stinchcombe, J. C., Barral, D. C., Mules, E. H., Booth, S., Hume, A. N., Machesky, L. M., Seabra, M. C., Griffiths, G. M. (2001): Rab27a is required for regulated secretion in cytotoxic T lymphocytes. *J.Cell Biol.* **152**: 825-834

Studier, F. W., Moffatt, B. A. (1986): Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J.Mol.Biol.* **189**: 113-130

Sutton, R. B., Fasshauer, D., Jahn, R., Brunger, A. T. (1998): Crystal structure of a SNARE complex involved in synaptic exocytosis at 2.4 Å resolution. *Nature* **395**: 347-353

Suzuki, T., Nakamoto, T., Ogawa, S., Seo, S., Matsumura, T., Tachibana, K., Morimoto, C., Hirai, H. (2002): MICAL, a novel CasL interacting molecule, associates with vimentin. *J.Biol.Chem.* **277**: 14933-14941

T

Takai, Y., Kaibuchi, K., Kikuchi, A., Kawata, M. (1992): Small GTP-binding proteins. *Int.Rev.Cytol.* **133**: 187-230

Takai, Y., Sasaki, T., Tanaka, K., Nakanishi, H. (1995): Rho as a regulator of the cytoskeleton. *Trends Biochem.Sci.* **20**: 227-231

Takai, Y., Sasaki, T., Matozaki, T. (2001): Small GTP-binding proteins. *Physiol Rev.* **81**: 153-208

Tan, Y., Hong, J., Doan, T., McConlogue, L., Maltese, W. A. (1998): Presenilin-1 mutations associated with familial Alzheimer's disease do not disrupt protein transport from the endoplasmic reticulum to the Golgi apparatus. *Biochim.Biophys.Acta* **1407**: 69-78

Tapon, N., Hall, A. (1997): Rho, Rac and Cdc42 GTPases regulate the organization of the actin cytoskeleton. *Curr.Opin.Cell Biol.* **9**: 86-92

Terman, J. R., Mao, T., Pasterkamp, R. J., Yu, H. H., Kolodkin, A. L. (2002): MICALs, a family of conserved flavoprotein oxidoreductases, function in plexin-mediated axonal repulsion. *Cell* **109**: 887-900

Tisdale, E. J., Bourne, J. R., Khosravi-Far, R., Der, C. J., Balch, W. E. (1992): GTP-binding mutants of rab1 and rab2 are potent inhibitors of vesicular transport from the endoplasmic reticulum to the Golgi complex. *J.Cell Biol.* **119**: 749-761

Tisdale, E. J. (1999): A Rab2 mutant with impaired GTPase activity stimulates vesicle formation from pre-Golgi intermediates. *Mol.Biol.Cell* **10**: 1837-1849

Tjoelker, L. W., Seyfried, C. E., Eddy, R. L., Jr., Byers, M. G., Shows, T. B., Calderon, J., Schreiber, R. B., Gray, P. W. (1994): Human, mouse, and rat calnexin cDNA cloning: identification of potential calcium binding motifs and gene localization to human chromosome 5. *Biochemistry* **33**: 3229-3236

Touchot, N., Chardin, P., Tavitian, A. (1987): Four additional members of the ras gene superfamily isolated by an oligonucleotide strategy: molecular cloning of YPT-related cDNAs from a rat brain library. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **84**: 8210-8214

Touchot, N., Zahraoui, A., Vielh, E., Tavitian, A. (1989): Biochemical properties of the YPT-related rab1B protein. Comparison with rab1A. *FEBS Lett.* **256**: 79-84

Tuvim, M. J., Adachi, R., Hoffenberg, S., Dickey, B. F. (2001): Traffic control: Rab GTPases and the regulation of interorganellar transport. *News Physiol Sci.* **16**: 56-61

U

Ullrich, O., Stenmark, H., Alexandrov, K., Huber, L. A., Kaibuchi, K., Sasaki, T., Takai, Y., Zerial, M. (1993): Rab GDP dissociation inhibitor as a general regulator for the membrane association of rab proteins. *J.Biol.Chem.* **268**: 18143-18150

Ullrich, O., Horiuchi, H., Bucci, C., Zerial, M. (1994): Membrane association of Rab5 mediated by GDP-dissociation inhibitor and accompanied by GDP/GTP exchange. *Nature* **368**: 157-160

Ullrich, O., Reinsch, S., Urbe, S., Zerial, M., Parton, R. G. (1996): Rab11 regulates recycling through the pericentriolar recycling endosome. *J.Cell Biol.* **135**: 913-924

V

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

van der Sluijs, P., Hull, M., Webster, P., Male, P., Goud, B., and Mellman, I. (1992): The small GTP-binding protein rab4 controls an early sorting event on the endocytic pathway. *Cell* **70**: 729-740

Verhoeven, K., De Jonghe, P., Coen, K., Verpoorten, N., Auer-Grumbach, M., Kwon, J. M., FitzPatrick, D., Schmedding, E., De Vriendt, E., Jacobs, A., Van, G., V, Wagner, K., Hartung, H. P., Timmerman, V. (2003): Mutations in the small GTP-ase late endosomal protein RAB7 cause Charcot-Marie-Tooth type 2B neuropathy. *Am.J.Hum.Genet.* **72**: 722-727

Vieira, O. V., Bucci, C., Harrison, R. E., Trimble, W. S., Lanzetti, L., Gruenberg, J., Schreiber, A. D., Stahl, P. D., Grinstein, S. (2003): Modulation of Rab5 and Rab7 recruitment to phagosomes by phosphatidylinositol 3-kinase. *Mol.Cell Biol.* **23**: 2501-2514

Vielh, E., Touchot, N., Zahraoui, A., Tavitian, A. (1989): Nucleotide sequence of a rat cDNA: rab1B, encoding a rab1-YPT related protein. *Nucleic Acids Res.* **17**: 1770

Vitale, G., Rybin, V., Christoforidis, S., Thornqvist, P., McCaffrey, M., Stenmark, H., Zerial, M. (1998): Distinct Rab-binding domains mediate the interaction of Rabaptin-5 with GTP-bound Rab4 and Rab5. *EMBO J.* **17**: 1941-1951

Vitelli, R., Santillo, M., Lattero, D., Chiariello, M., Bifulco, M., Bruni, C. B., Bucci, C. (1997): Role of the small GTPase Rab7 in the late endocytic pathway. *J.Biol.Chem.* **272**: 4391-4397

W

Wada, M., Nakanishi, H., Satoh, A., Hirano, H., Obaishi, H., Matsuura, Y., Takai, Y. (1997): Isolation and characterization of a GDP/GTP exchange protein specific for the Rab3 subfamily small G proteins. *J.Biol.Chem.* **272**: 3875-3878

Walch-Solimena, C., Collins, R. N., Novick, P. J. (1997): Sec2p mediates nucleotide exchange on Sec4p and is involved in polarized delivery of post-Golgi vesicles. *J.Cell Biol.* **137**: 1495-1509

Waters, M. G., Clary, D. O., Rothman, J. E. (1992): A novel 115-kD peripheral membrane protein is required for intercisternal transport in the Golgi stack. *J.Cell Biol.* **118**: 1015-1026

Weide, T. (1998): Lokalisation und Protein/Proteininteraktionen der kleinen GTPase rab1b. *Dissertation WWU Münster*

Weide, T., Köster, M., Barnekow, A. (1999): Inactive and active mutants of rab1b are not tightly integrated into target membranes. *Int.J.Oncol.* **15**: 727-736

Weide, T., Bayer, M., Köster, M., Siebrasse, J. P., Peters, R., Barnekow, A. (2001): The Golgi matrix protein GM130: a specific interacting partner of the small GTPase rab1b. *EMBO Rep.* **2**: 336-341

Weide, T., Teuber, J., Bayer, M., Barnekow, A. (2003): MICAL-1 isoforms, novel rab1 interacting proteins. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **306**: 79-86

Whitman, M., Melton, D. A. (1992): Involvement of p21ras in *Xenopus* mesoderm induction. *Nature* **357**: 252-254

Whyte, J. R., Munro, S. (2001): The Sec34/35 Golgi transport complex is related to the exocyst, defining a family of complexes involved in multiple steps of membrane traffic. *Dev.Cell* **1**: 527-537

Whyte, J. R., Munro, S. (2002): Vesicle tethering complexes in membrane traffic. *J.Cell Sci.* **115**: 2627-2637

Wieland, F., Harter, C. (1999): Mechanisms of vesicle formation: insights from the COP system. *Curr.Opin.Cell Biol.* **11**: 440-446

Wilson, A. L., Erdman, R. A., Maltese, W. A. (1996a): Association of Rab1B with GDP-dissociation inhibitor (GDI) is required for recycling but not initial membrane targeting of the Rab protein. *J.Biol.Chem.* **271**: 10932-10940

Wilson, A. L., Sheridan, K. M., Erdman, R. A., Maltese, W. A. (1996b): Prenylation of a Rab1B mutant with altered GTPase activity is impaired in cell-free systems but not in intact mammalian cells. *Biochem.J.* **318**: 1007-1014

Woodcock, D. M., Crowther, P. J., Doherty, J., Jefferson, S., DeCruz, E., Noyer-Weidner, M., Smith, S. S., Michael, M. Z., Graham, M. W. (1989): Quantitative evaluation of *Escherichia coli* host strains for tolerance to cytosine methylation in plasmid and phage recombinants. *Nucleic Acids Res.* **17**: 3469-3478

X

Xiao, G. H., Shoarinejad, F., Jin, F., Golemis, E. A., Yeung, R. S. (1997): The tuberous sclerosis 2 gene product, tuberin, functions as a Rab5 GTPase activating protein (GAP) in modulating endocytosis. *J.Biol.Chem.* **272**: 6097-6100

Y

Yamakawa, H., Seog, D. H., Yoda, K., Yamasaki, M., Wakabayashi, T. (1996): Uso1 protein is a dimer with two globular heads and a long coiled-coil tail. *J.Struct.Biol.* **116**: 356-365

Z

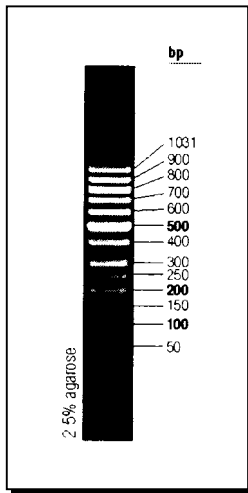
Zerial, M., McBride, H. (2001): Rab proteins as membrane organizers. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* **2**: 107-117

Zhu, Z., Delprato, A., Merithew, E., Lambright, D. G. (2001): Determinants of the broad recognition of exocytic Rab GTPases by Mss4. *Biochemistry* **40**: 15699-15706

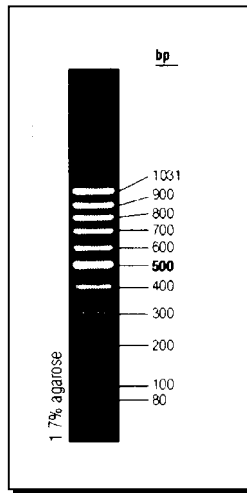
9. Anhang

DNA- und Protein-Marker

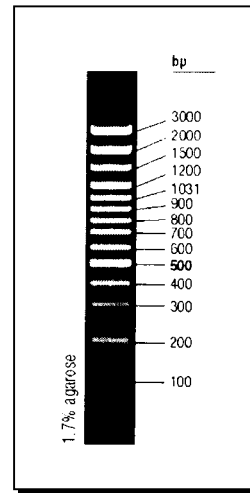
50 bp DNA Leiter
(GeneRuler™
50 bp DNA Ladder)



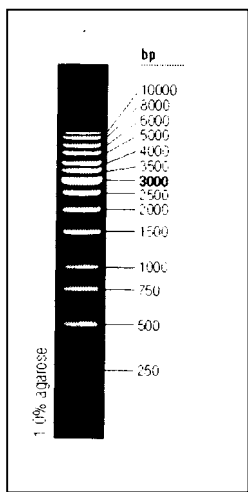
100 bp DNA Leiter
(GeneRuler™
100 bp DNA Ladder)



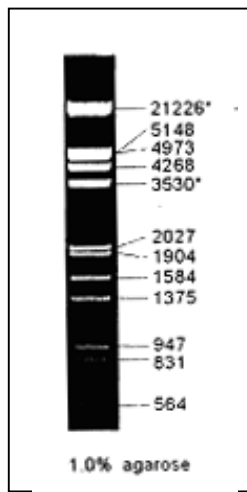
100 bp DNA Leiter plus
(GeneRuler™
100 bp DNA Ladder Plus)



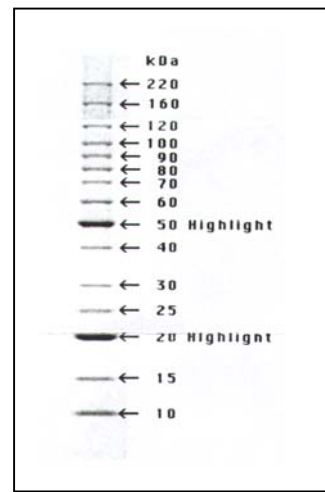
1 kB DNA Leiter
(GeneRuler™
1 kB DNA Ladder)

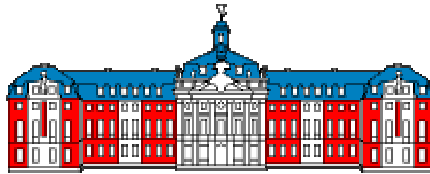


λ EcoRI/HindIII Marker



BenchMark™ Proteinleiter





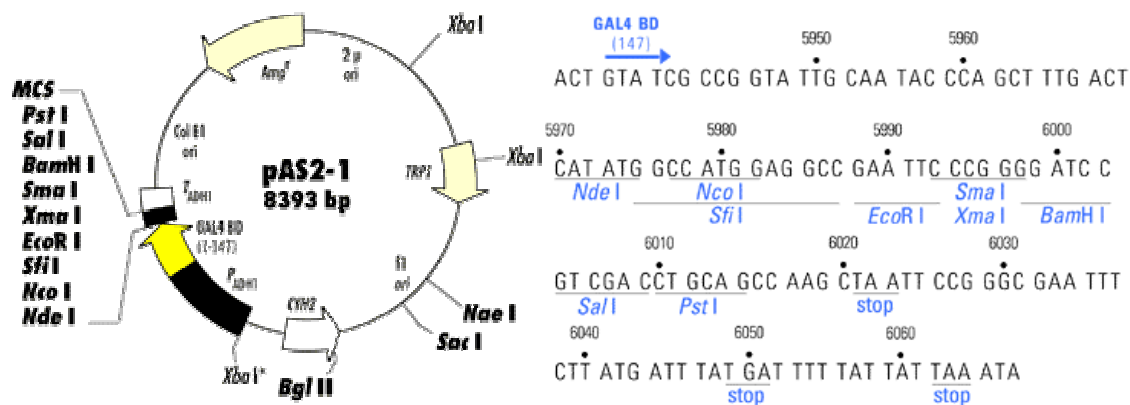
Westfälische-Wilhelms-Universität Münster

Abt. für Exp. Tumorbilogie
 Badestr. 9, 48149 Münster
 Leiterin: Prof. Dr. A. Barnekow

Erzeuger/Datum: Miriam Köster 1 / 2001

Plasmid: pAS rab1b wt Δ C1

Ausgangsvektor: pAS 2-1 (Clontech/Heidelberg)



Insert:

rab1b wt Δ C1 cDNA Insert (Ratte); 588 bp groß (AS 1 – 196);

Insertion über *NdeI/BamHI*

Der rab1b wt Δ C1-Mutante fehlt das Isoprenylierungsmotiv am C-Terminus.

Deletion folgender carboxyterminalen Aminosäuren: SGGCC

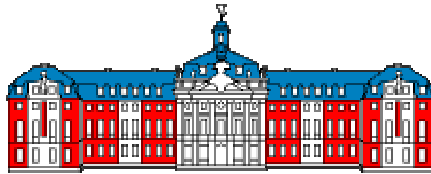
E. coli Stamm: DH5 α

Sicherheitsstufe: S1

Antibiotika Resistenz: Amp^R

Lagerung: Box: 6
 Glycerinkultur: 76

Referenz: Miriam Köster / Laborjournal



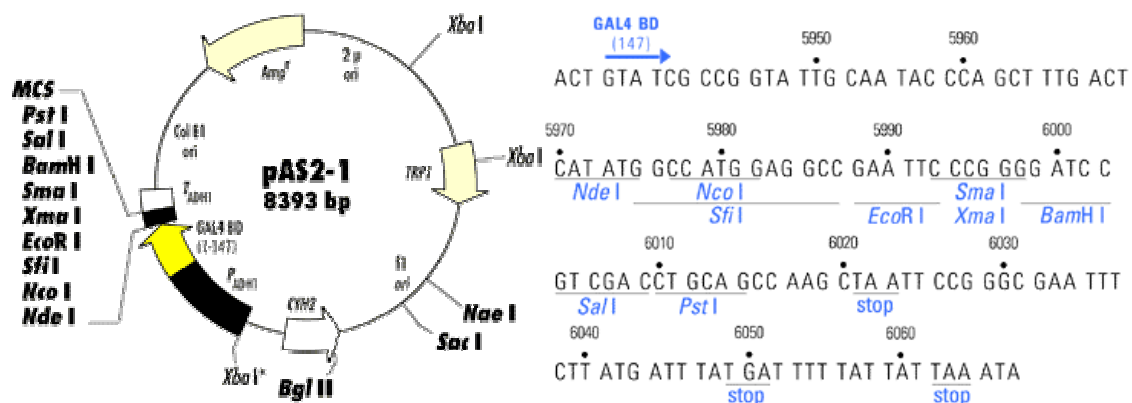
Westfälische-Wilhelms-Universität Münster

Abt. für Exp. Tumorbilogie
 Badestr. 9, 48149 Münster
 Leiterin: Prof. Dr. A. Barnekow

Erzeuger / Datum: Miriam Köster 1 / 2001

Plasmid: pAS rab1b wt Δ C2

Ausgangsvektor: pAS 2-1 (Clontech/Heidelberg)



Insert:

rab1b wt Δ C2 cDNA Insert (Ratte); 486 bp groß (AS 1 – 162);

Insertion über **NdeI/BamHI**

Der rab1b wt Δ C2-Mutante fehlt das Isoprenylierungsmotiv sowie die hypervariable Region am C-Terminus.

Deletion folgender carboxyterminalen Aminosäuren:

MTMAAEIKKRMGPGAASGGERP NLKIDSTPVKSASGGCC

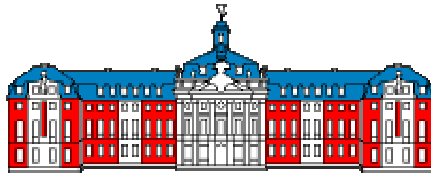
E. coli Stamm: DH5 α

Sicherheitsstufe: S1

Antibiotika Resistenz: Amp^R

Lagerung: Box: 6
 Glycerinkultur: 77

Referenz: Miriam Köster / Laborjournal



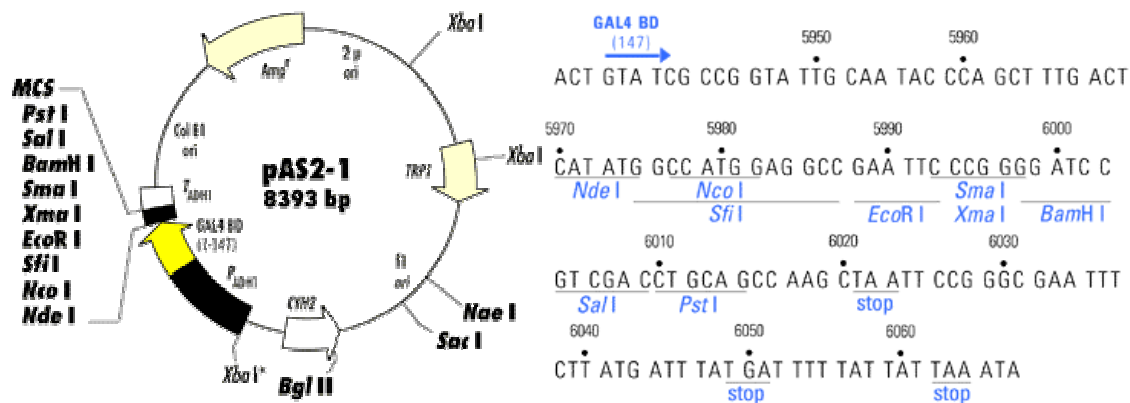
Westfälische-Wilhelms-Universität Münster

Abt. für Exp. Tumorbioogie
 Badestr. 9, 48149 Münster
 Leiterin: Prof. Dr. A. Barnekow

Erzeuger / Datum: Miriam Köster 1 / 2001

Plasmid: pAS rab1b wt ΔC3

Ausgangsvektor: pAS 2-1 (Clontech/Heidelberg)



Insert:

rab1b wt ΔC3 cDNA Insert (Ratte); ca. 504 bp groß (AS 1 – 162; AS 197 – 202);

Insertion über *NdeI/BamHI*

Der rab1b wt ΔC3-Mutante fehlt die hypervariable Region am C-Terminus, besitzt aber das Isoprenylierungsmotiv.

Deletion folgender carboxyterminalen Aminosäuren:

MTMAAEIKKRMGPGAASGGERP~~NLKIDSTPVKSA~~

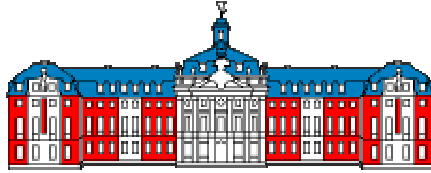
E. coli Stamm: DH5α

Sicherheitsstufe: S1

Antibiotika Resistenz: Amp^R

Lagerung: Box: 6
 Glycerinkultur: 78

Referenz: Miriam Köster / Laborjournal



Westfälische-Wilhelms-Universität Münster

Abt. für Exp. Tumorbiologie
Badestr. 9, 48149 Münster
Leiterin: Prof. Dr. A. Barnekow

Erzeuger / Datum: Miriam Köster 10 / 2001

Plasmid: pSV42HA rab1b-2-rhoA

Ausgangsvektor: pSVSport-1
modifiziert zu pSV42HA (Bode)

Insert:

ca. 594 bp groß;
Chimäre aus dem N-Terminus (ca. 369 bp) von rab1b (Ratte) und dem C-Terminus (ca. 225 bp) von rhoA (human);
Insertion über *NdeI* und *BamHI*,
Übergang in der konservierten Box G2 beider Proteine;
Details zur Klonierung siehe nächste Seite

***E. coli* Stamm:** DH5 α

Sicherheitsstufe: S1

Antibiotika Resistenz: Amp^R

Lagerung: Box: 4b
Glycerinkultur:59

Referenz: Miriam Köster / Laborjournal

Chimäre rab1b-2-rhoA

Der Übergang der beiden Sequenzen findet in der konservierten Box **G2** statt.

rab1b Motiv:	G	N	K	S	D	L
rhoA Motiv:	G	N	K	K	D	L

Diese Chimäre wurde in zwei Schritten hergestellt.

Dafür wurden zunächst beide Fragmente in einer PCR amplifiziert.

Hierbei wurde das aminoternale **rab1b** Fragment am N-Terminus mit einer **NdeI** Schnittstelle und am C-Terminus mit einer **BglII** Schnittstelle gefolgt von einer **BamHI** Schnittstelle versehen.

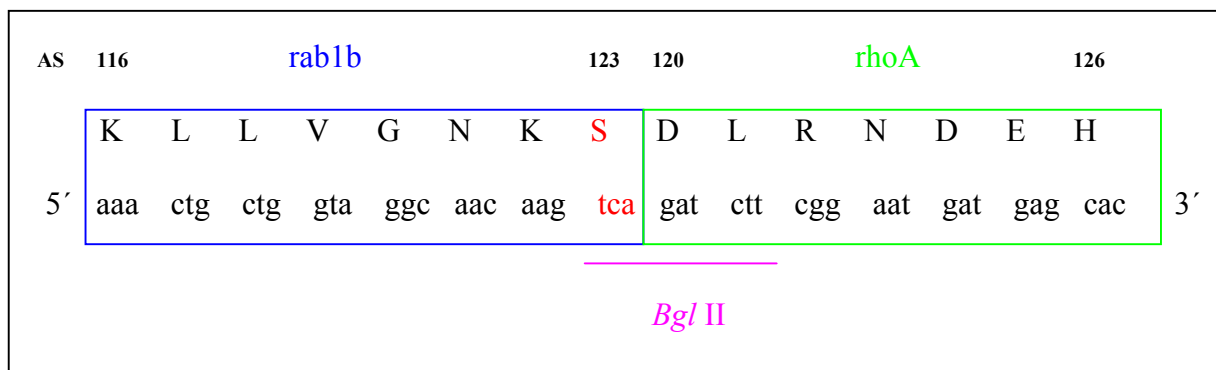
Um eine **BglII** Schnittstelle zu schaffen, musste das **Serin-Triplett (S) agt (5'3')** der **rab1b** Sequenz gegen das **Serin-Triplett (S) tca (5'3')** ausgetauscht werden.

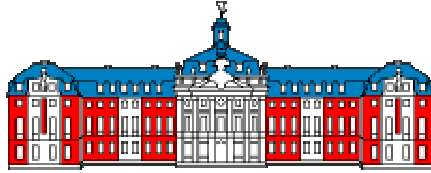
Das zweite, carboxyterminale **rhoA** Fragment wurde N-terminal mit einer **BglII** Schnittstelle und C-terminal mit einer **BamHI** Schnittstelle versehen.

Im ersten Schritt der Klonierung wurde zunächst das N-terminale rab1b Fragment über **NdeI/BamHI** in den pSV42HA-Vektor eingefügt.

Anschließend wurde der Vektor **BglII/BamHI** geschnitten und das rhoA Fragment eingefügt.

Sequenz der Chimäre rab1b-2-rhoA am Übergang (G2):





Westfälische-Wilhelms-Universität Münster

Abt. für Exp. Tumorbioogie
Badestr. 9, 48149 Münster
Leiterin: Prof. Dr. A. Barnekow

Erzeuger / Datum: Miriam Köster 10 / 2001

Plasmid: pSV42HA rab1b-3-rhoA

Ausgangsvektor: pSVSport-1
modifiziert zu pSV42HA (Bode)

Insert:

ca. 606 bp groß;
Chimäre aus dem N-Terminus (ca. 456 bp) von rab1b (Ratte) und dem C-Terminus (ca. 150 bp) von rhoA (human);
Insertion über *NdeI* und *BamHI*,
Übergang in der konservierten Box **G3** beider Proteine;
Details zur Klonierung siehe nächste Seite

***E. coli* Stamm:** DH5 α

Sicherheitsstufe: S1

Antibiotika Resistenz: Amp^R

Lagerung: Box: 4b
Glycerinkultur: 60

Referenz: Miriam Köster / Laborjournal

Chimäre rab1b-3-rhoA

Der Übergang der beiden Sequenzen findet in der konservierten Box **G3** statt.

rab1b Motiv:	E	T	S	A	K	N
rhoA Motiv:	P	E	E	G	R	D

Diese Chimäre wurde in zwei Schritten hergestellt.

Dafür wurden zunächst beide Fragmente in einer PCR amplifiziert.

Hierbei wurde das aminoternale rab1b Fragment am N-Terminus mit einer *NdeI* Schnittstelle und am C-Terminus mit einer *Bsp681* Schnittstelle gefolgt von einer *BamHI* Schnittstelle versehen.

Um eine *Bsp681* Schnittstelle zu schaffen, musste hier das **Alanin-Triplett (A) gcc (5'3')** der **rab1b** Sequenz gegen das **Alanin-Triplett (A) gct (5'3')** ausgetauscht werden.

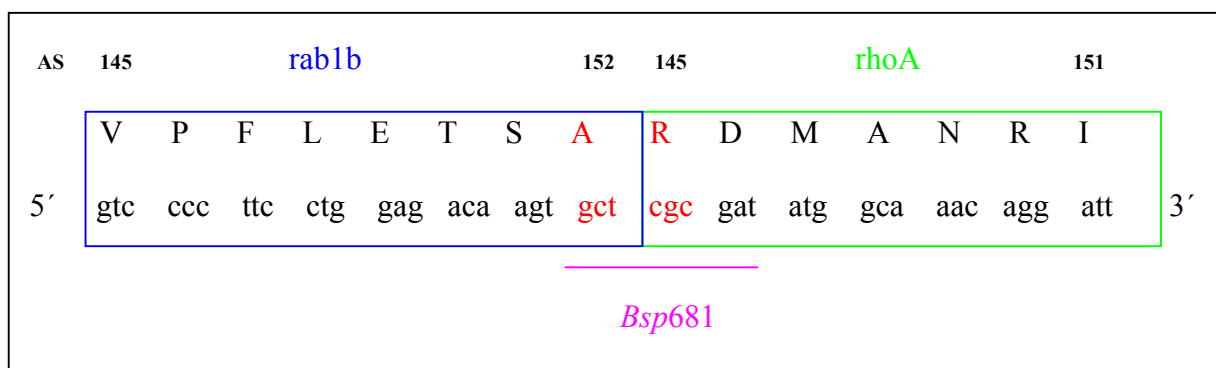
Das zweite, carboxyterminale rhoA Fragment wurde N-terminal mit einer *Bsp681* Schnittstelle und C-terminal mit einer *BamHI* Schnittstelle versehen.

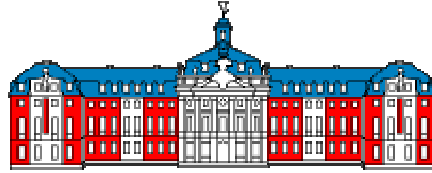
Auch bei der **rhoA Sequenz** musste für die *Bsp681* Schnittstelle das **Arginin-Triplett (R) aga (5'3')** gegen das **Arginin-Triplett (R) cgc (5'3')** ausgetauscht werden.

Im ersten Schritt der Klonierung wurde zunächst das N-terminale rab1b Fragment über *NdeI/BamHI* in den pSV42HA-Vektor eingefügt.

Anschließend wurde der Vektor *Bsp681/BamHI* geschnitten und das rhoA Fragment eingefügt.

Sequenz der Chimäre rab1b-3-rhoA am Übergang (G3):





Westfälische-Wilhelms-Universität Münster

Abt. für Exp. Tumorbiologie
Badestr.9, 48149 Münster
Leiterin: Prof. Dr. A. Barnekow

Erzeuger / Datum: Miriam Köster 10 / 2001

Plasmid: pSV42HA rab1b-2-rab6a

Ausgangsvektor: pSVSport-1
modifiziert zu pSV42HA (Bode)

Insert:

ca. 612 bp groß;
Chimäre aus dem N-Terminus (ca. 369 bp) von rab1b (Ratte) und dem C-Terminus (ca. 243 bp) von rab6a (human);
Insertion über *NdeI* und *BamHI*,
Übergang in der konservierten Box **G2** beider Proteine;
Details zur Klonierung siehe nächste Seite

***E. coli* Stamm:** DH5 α

Sicherheitsstufe: S1

Antibiotika Resistenz: Amp^R

Lagerung: Box: 4b
Glycerinkultur: 61

Referenz: Miriam Köster / Laborjournal

Chimäre rab1b-2-rab6a

Der Übergang der beiden Sequenzen findet in der konservierten Box **G2** statt.

rab1b Motiv:	G	N	K	S	D	L
rab6 Motiv:	G	N	K	T	D	L

Diese Chimäre wurde in zwei Schritten hergestellt.

Dafür wurden zunächst beide Fragmente in einer PCR amplifiziert.

Hierbei wurde das aminoternale **rab1b** Fragment am N-Terminus mit einer *NdeI* Schnittstelle und am C-Terminus mit einer *BglII* Schnittstelle gefolgt von einer *BamHI* Schnittstelle versehen.

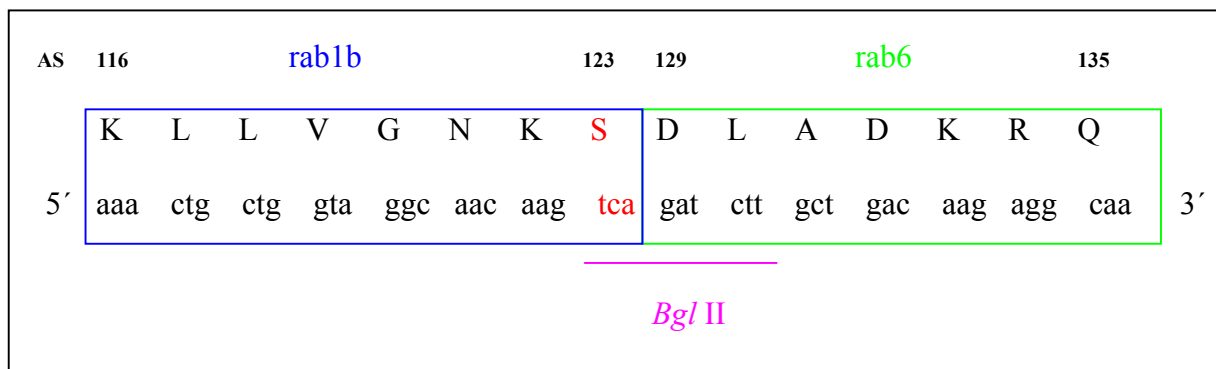
Um eine *BglII* Schnittstelle zu schaffen, musste das **Serin-Triplett (S) agt (5'3')** der **rab1b** Sequenz gegen das **Serin-Triplett (S) tca (5'3')** ausgetauscht werden.

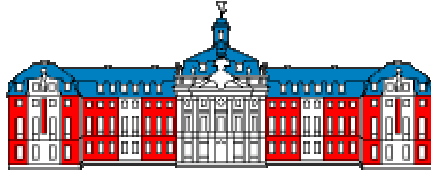
Das zweite, carboxyterminale **rab6a** Fragment wurde N-terminal mit einer *BglII* Schnittstelle und C-terminal mit einer *BamHI* Schnittstelle versehen.

Im ersten Schritt der Klonierung wurde zunächst das N-terminale rab1b Fragment über *NdeI/BamHI* in den pSV42HA-Vektor eingefügt.

Anschließend wurde der Vektor *BglII/BamHI* geschnitten und das rab6a Fragment eingefügt.

Sequenz der Chimäre rab1b-2-rab6a am Übergang (G2):





Westfälische-Wilhelms-Universität Münster

Abt. für Exp. Tumorbioogie
Badestr. 9, 48149 Münster
Leiterin: Prof. Dr. A. Barnekow

Erzeuger / Datum: Miriam Köster 10 / 2001

Plasmid: pSV42HA rab6a-2-rab1b

Ausgangsvektor: pSVSport-1
modifiziert zu pSV42HA (Bode)

Insert:

ca. 621 bp groß;
Chimäre aus dem N-Terminus (ca. 387 bp) von rab6a (human) und dem C-Terminus (ca. 234 bp) von rab1b (Ratte);
Insertion über *NdeI* und *BamHI*,
Übergang in der konservierten Box G2 beider Proteine;
Details zur Klonierung siehe nächste Seite

***E. coli* Stamm:** DH5 α

Sicherheitsstufe: S1

Antibiotika Resistenz: Amp^R

Lagerung: Box: 4b
Glycerinkultur: 62

Referenz: Miriam Köster / Laborjournal

Chimäre rab6a-2-rab1b

Der Übergang der beiden Sequenzen findet in der konservierten Box **G2** statt.

rab6 Motiv:	G N K T D	L
rab1b Motiv:	G N K S D	L

Diese Chimäre wurde in zwei Schritten hergestellt.

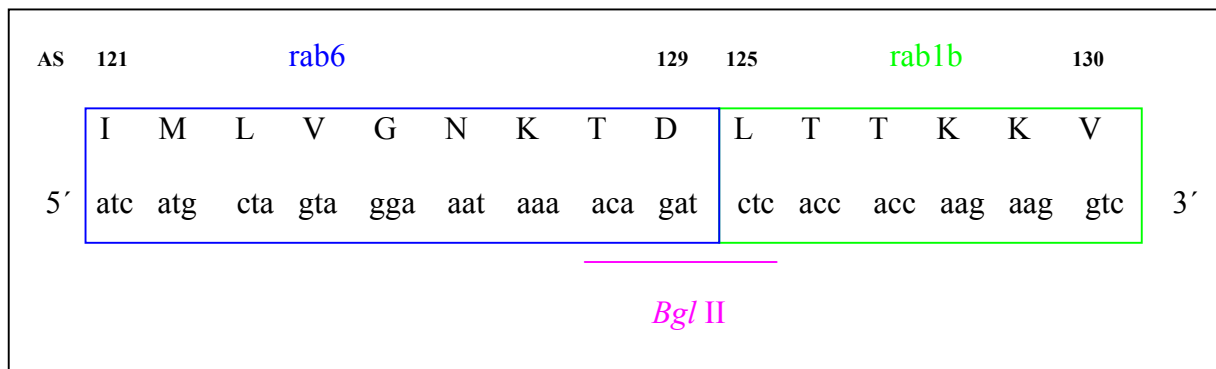
Dafür wurden zunächst beide Fragmente in einer PCR amplifiziert.

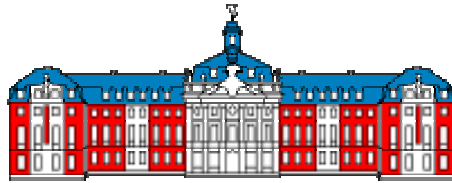
Hierbei wurde das aminoternale **rab6** Fragment am N-Terminus mit einer **NdeI** Schnittstelle und am C-Terminus mit einer **BglII** Schnittstelle gefolgt von einer **BamHI** Schnittstelle versehen.

Das zweite, carboxyterminale **rab1b** Fragment wurde N-terminal mit einer **BglII** Schnittstelle und C-terminal mit einer **BamHI** Schnittstelle versehen.

Im ersten Schritt der Klonierung wurde zunächst das N-terminale rab6a Fragment über **NdeI/BamHI** in den pSV42HA-Vektor eingefügt.

Anschließend wurde der Vektor **BglII/BamHI** geschnitten und das rab1b Fragment eingefügt.

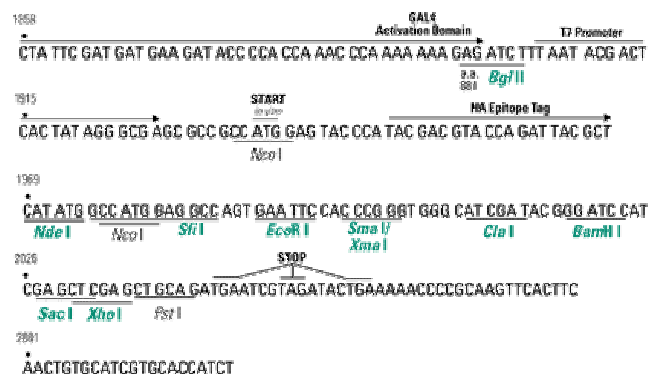
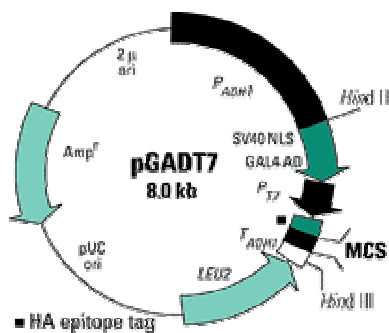
Sequenz der Chimäre rab6a-2-rab1b am Übergang (G2):



Westfälische-Wilhelms-Universität Münster

Abt. für Exp. Tumorbiologie
 Badestr. 9, 48149 Münster
 Leiterin: Prof. Dr. A. Barnekow

Erzeuger / Datum: Miriam Köster 04 / 2002
 Plasmid: pGADT7 PRA1
 Ausgangsvektor: pGADT7(Clontech / Heidelberg)

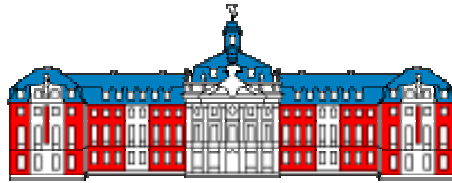


Insert:
 PRA1 cDNA Insert (Ratte); ca. 557 bp groß;
 Insertion über *NdeI/BamHI*

E. coli Stamm: DH5 α
 Sicherheitsstufe: S1
 Antibiotika Resistenz: Amp^R
 Lagerung: Glycerinbox: 6a
 Glycerinkultur: 28
 Referenz: Miriam Köster / Laborjournal

Anmerkung:

Der Vektor pGADT7 ist ideal für Kotransformationsstudien in Y190 oder AH109 Hefezellen. Außerdem ist über die T7 site eine *in vitro* Translation möglich.



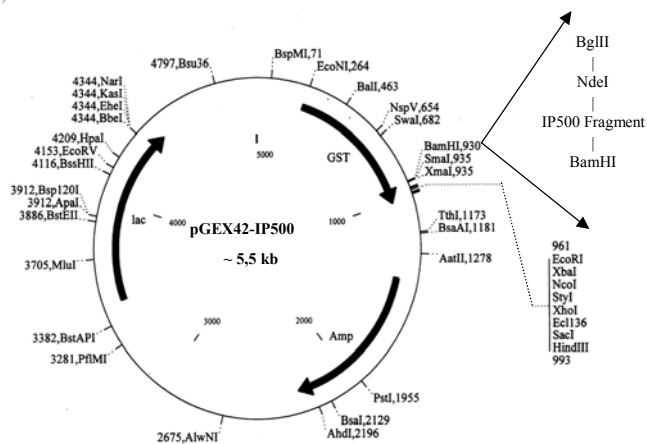
Westfälische-Wilhelms-Universität Münster

Abt. für Exp. Tumorbilogie
 Badestr. 9, 48149 Münster
 Leiterin: Prof. Dr. A. Barnekow

Erzeuger/Datum: Miriam Köster 04 / 2002

Plasmid: pGEX42-PRA1

Ausgangsvektor: pGEX42-IP500 (Bilbilis)



Insert:
 PRA1 cDNA Insert (Ratte); ca. 557 bp groß;
 Insertion über *NdeI/BamHI*

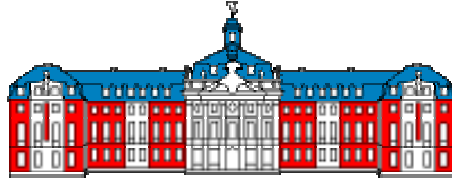
***E. coli* Stamm:** DH5 α

Sicherheitsstufe: S1

Antibiotika Resistenz: Amp^R

Lagerung: Glyzerinbox: 4b
 Glycerinkultur: 66 (DH5 α)

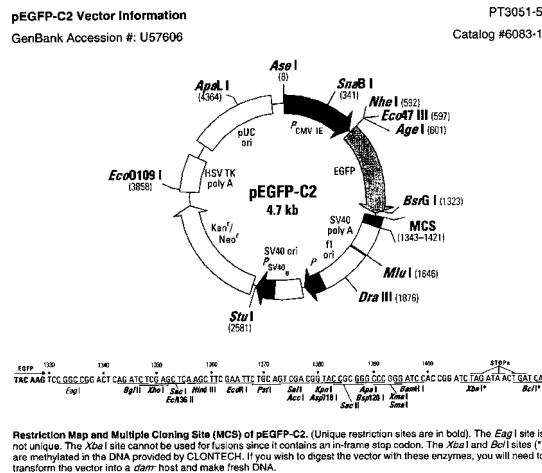
Referenz: Miriam Köster / Laborjournal



Westfälische-Wilhelms-Universität Münster

Abt. für Exp. Tumorbiologie
 Badestr.9, 48149 Münster
 Leiterin: Prof. Dr. A. Barnekow

Erzeuger/Datum: Miriam Köster
Plasmid: pEGFP PRA1
Ausgangsvektor: pEGFP-IJ Δ4 (Brüggemann)



Herstellung pEGFP-IJ Δ4: Zunächst wurde durch eine *fill in* Reaktion die interne *NdeI* Schnittstelle im pEGFP-C2 Vektor zerstört. Anschließend wurde der Vektor mit *BglIII* und *BamHI* geschnitten, um die ursprüngliche MCS zu entfernen. In den *gecipten* Vektor wurde das *BglIII* Insert aus pACT-X11L2Δ4 (ca. 1 kb) eingefügt und die richtige Orientierung durch einen *NdeI*- (in der neuen MCS) und *MluI*- (im pEGFP-C2 Vektor hinter der alten MCS) Verdau überprüft. Der Vektor hat nun folgende Sequenz hinter der EGFP-kodierenden Region:

BglIII – HA-Epitop-kodierende Sequenz-NdeI-NcoI-X11L2Δ4-Insert – SmaI – BamHI – EcoRI – SacI – XhoI – XbaI

Insert:

PRA1 cDNA Insert (Ratte); ca. 557 bp groß;
 Insertion über *NdeI/BamHI*

***E. coli* Stamm:** DH5α

Sicherheitsstufe: S1

Antibiotika Resistenz: Kanamycin^R

Referenz: Miriam Köster / Laborjournal

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich sehr herzlich bedanken bei...

... Frau Prof. Dr. A. Barnekow für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und des interessanten Themas, ihre hervorragende Betreuung sowie für die Begutachtung dieser Arbeit.

... Herrn Prof. Dr. V. Gerke für seine Bereitschaft, als Zweitgutachter tätig zu werden.

... Dr. Thomas Weide für die Betreuung zu Beginn der Promotion und das Korrekturlesen der Diskussion.

... Edith Ossendorf für die tolle Arbeitsatmosphäre in Labor 14 (Hab' ich mich wieder ausgebreitet?), für Tipps bei den biochemischen Analysen, für spannende Ergebnisdiskussionen und das Korrekturlesen dieser Arbeit.

... Mechthild Rosing für viele aufmunternde Worte, technische Tipps bei der Klonierung und das Korrekturlesen dieser Arbeit.

... Dr. Mark Kail für die Hilfe bei den Arbeiten am konfokalen Mikroskop.

... Magdalena Konczal, deren „literarische Werke“ ihre aufheiternde Wirkung nicht verfehlten.

... allen alten und neuen Kollegen der Abteilung für Exp. Tumorbologie, die durch ihre meist gute Laune für ein sehr angenehmes Arbeitsklima sorgten.

... den Förderern des Graduiertenkollegs „Membranproteine: Signalerkennung, Signaltransfer und Stofftransport“ für die Finanzierung zu Beginn dieser Arbeit.

... dem Evangelischen Studienwerk e.V. Villigst für das gewährte Stipendium der Promotionsförderung und die Promovierendentreffen mit ihren interessanten Themen.

... allen, die in letzter Zeit viel Geduld mit mir hatten und mich mit vielen aufmunternden Worten begleitet haben.

Zum Schluss möchte ich mich sehr herzlich bei meinen Eltern bedanken, die mir das Studium ermöglicht haben und mich während der gesamten Zeit immer liebevoll unterstützt haben. DANKE!!!!

Lebenslauf

Miriam Köster,

geboren am 10.12.1971 in Burgsteinfurt, Kreis Steinfurt

- Familienstand:** ledig
- Name des Vaters:** Hans Köster
Name der Mutter: Waltraud Köster, geb. Ziemann
- Schulbildung:** Grundschule: Bismarckschule von 1978 bis 1982 in Steinfurt-Burgsteinfurt

Gymnasium: Gymnasium Arnoldinum von 1982 bis 1991 in Steinfurt-Burgsteinfurt
- Hochschulreife (Abitur):** am 10. Juni 1991 in Steinfurt-Burgsteinfurt
- Berufsausbildung:** Gärtner (Fachrichtung Garten- und Landschaftsbau) vom 1. August 1991 bis 31. Juli 1993
- Studium:** Biologiestudium an der Westfälischen Wilhelms-Universität in Münster, von Oktober 1993 bis August 1999
- Prüfungen:** Vordiplom im Fach Biologie am 2. April 1996
Diplom im Fach Biologie am 5. August 1999
- Tätigkeiten:** studentische Hilfskraft in der Abt. f. Exp. Tumorbiologie vom 1. Oktober 1998 bis 31. Dezember 1998

wissenschaftliche Hilfskraft in der Abt. f. Exp. Tumorbiologie vom 1. September 1999 bis 31. Dezember 1999

wissenschaftliche Hilfskraft in der Abt. f. Exp. Tumorbiologie vom 1. Juli 2000 bis 30. September 2000
- Stipendium:** Stipendium des Graduiertenkollegs der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster: „Membranproteine: Signalerkennung, Signaltransfer und Stofftransport“ vom 1. Januar 2000 bis 30. Juni 2000

Stipendium der Promotionsförderung des Ev. Studienwerkes e.V. Villigst, Schwerte vom 1. Oktober 2000 bis 31. März 2003
- Beginn der Dissertation:** September 1999 im Institut für Neuro- und Verhaltensbiologie, Abt. für Experimentelle Tumorbiologie bei Frau Prof. Dr. A. Barnekow