

---

**- Kommunikation zwischen Signalwegen -  
Regulatoren und Effektoren  
von G Proteinen der Ras-Superfamilie**

---

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades eines  
Doktors der Naturwissenschaften  
der Fakultät für Chemie  
der Technischen Universität Dortmund

durchgeführt am  
Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie  
Abteilung für Strukturelle Biologie

vorgelegt von  
Raphael Gasper-Schönenbrücher  
aus Neunkirchen-Seelscheid

Oktober 2009

Diese Arbeit wurde von Juni 2005 bis Juni 2009 in der Abteilung für Strukturelle Biologie des Max-Planck-Instituts für molekulare Physiologie unter der Leitung von Prof. Dr. A. Wittinghofer durchgeführt.

Gutachter: Prof. Dr. Alfred Wittinghofer  
Prof. Dr. Roland Winter

Tag der mündlichen Prüfung: 05. Oktober 2009

Die Wissenschaft nötigt uns, den Glauben an einfache Kausalitäten aufzugeben

*Friedrich Nietzsche*

# Inhaltsverzeichnis

<b>1 Einleitung</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1 Guaninnukleotid-bindende Proteine (G Proteine)</b> .....	<b>1</b>
1.1.1 Klassifikation der G Proteine.....	1
1.1.2 Ras-Superfamilie.....	4
1.1.3 Ras-Subfamilie.....	11
<b>1.2 Regulatoren von G Proteinen</b> .....	<b>15</b>
1.2.1 Guanin-Nukleotid-Austauschfaktoren.....	15
1.2.2 GTPase-aktivierende Proteine.....	19
<b>1.3 Effektorproteine</b> .....	<b>25</b>
1.3.1 Allosterische Regulation: Effektoren der Rho-Familie.....	25
1.3.2 Vesikel-Kodierung und Bildung von Ankerpunkten: Rab-Effektoren.....	28
1.3.3 Arf-Effektoren: Bildung von Vesikeln.....	31
1.3.4 Ran-Effektoren: Proteine mit spezifischer Funktion.....	34
<b>1.4 Effektoren der Ras-Familie</b> .....	<b>36</b>
1.4.1 Effektoren der Ras-Superfamilie.....	36
1.4.2 Effektoren mit RA-/RB-Domäne: Rekrutierung von G Proteinen.....	37
1.4.3 spezifische Effektoren.....	42
<b>2 Zielsetzung</b> .....	<b>51</b>
<b>3 Ergebnisse</b> .....	<b>52</b>
<b>3.1 Funktion des konservierten Glutamats in der GEF Reaktion</b> .....	<b>52</b>
3.1.1 Sequenzvergleich.....	52
3.1.2 Einfluss des konservierten Glutamats auf die GEF-Reaktion.....	52
3.1.3 Komplexbildung von G Proteinen und GEFs.....	56
3.1.4 Verringerung der Nukleotidaffinität im trimeren Komplex.....	58
<b>3.2 <i>Regulator of Adhesion and Polarisation enriched in Lymphocytes, RapL</i></b> .....	<b>60</b>
3.2.1 Sequenzvergleich.....	60
3.2.2 Aufreinigung von RapL.....	61
3.2.3 Interaktion mit Rap1B.....	63
3.2.4 Aufreinigung des zytoplasmatischen Teils von Integrinen.....	65
3.2.5 Interaktion von RapL und Integrin.....	66
<b>3.3 Arap-Proteine</b> .....	<b>71</b>
3.3.1 Sequenzvergleich.....	71
3.3.2 Aufreinigung von Arap1.....	73
3.3.3 Aufreinigung Arap3.....	76
3.3.4 Interaktion mit G Proteinen der Ras-Familie.....	79
3.3.5 Interaktion mit Proteinen der Rho-Familie.....	83
3.3.6 Hydrolyse-Aktivität der Arap Proteine.....	85
3.3.7 Bindungspartner der PH-Domänen.....	92
3.3.8 Kristallisation von Arap.....	93
<b>3.4 ARHGAP20</b> .....	<b>95</b>
3.4.1 Sequenzvergleich.....	95



3.4.2	Aufreinigung von ARHGAP20.....	96
3.4.3	Interaktion mit Ras und Rap.....	98
3.4.4	Hydrolyse-Aktivität von ARHGAP20.....	98
3.4.5	Kristallisation von ARHGAP20.....	99
<b>3.5</b>	<b>Ras interference, Rin.....</b>	<b>101</b>
3.5.1	Sequenzvergleich.....	101
3.5.2	Aufreinigung von Rin.....	103
3.5.3	Charakterisierung von Rin1.....	105
3.5.4	Kristallisation von Rin1.....	107
<b>3.6</b>	<b>Shoc2-PP1c.....</b>	<b>108</b>
3.6.1	Sequenzvergleich.....	108
3.6.2	Reinigung von PP1c und Shoc2.....	110
<b>4</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>114</b>
<b>4.1</b>	<b>Mechanismen der GEF-Katalyse.....</b>	<b>114</b>
4.1.1	Das konservierte Glutamat ist essenziell für die GEF-Katalyse.....	114
4.1.2	Die Funktion des Glutamats der Rab-Proteine.....	115
<b>4.2</b>	<b>RapL und die Rap-abhängige Aktivierung von Integrinen.....</b>	<b>117</b>
4.2.1	RapL bindet direkt an Integrine unterschiedlicher Klassen.....	117
4.2.2	Einfluss der Rap-Bindung.....	119
4.2.3	Bedeutung der Integrin-Bindung.....	120
4.2.4	Ausblick.....	123
<b>4.3</b>	<b>Arap1 und Arap3: Regulation von Multidomänen-Proteinen.....</b>	<b>124</b>
4.3.1	Spezifität der RhoGAP-Aktivität von Arap1 und Arap3.....	124
4.3.2	Die RA-Domäne als regulierendes Element.....	128
4.3.3	Regulation der RhoGAP-Aktivität durch andere Effekte.....	130
4.3.4	Ausblick.....	133
<b>4.4</b>	<b>ARHGAP20.....</b>	<b>133</b>
4.4.1	ARHGAP20 ist ein RhoA- und CDC42-GAP.....	133
4.4.2	Interaktion mit G Proteinen und der Einfluss auf die Hydrolyse.....	134
4.4.3	Die N-terminale PH-Domäne bindet mehrere PIPs.....	135
4.4.4	Ausblick.....	136
<b>4.5</b>	<b>RabGEF-Aktivität von Rin.....</b>	<b>136</b>
4.5.1	Rekombinante Aufreinigung von Rin.....	136
4.5.2	GEF-Aktivität von Rin1.....	137
4.5.3	Homologie zu Rabex-5 und der Einfluss der RA-Domäne von Rin1.....	137
4.5.4	Rin1 bindet an Rab5, ist jedoch katalytisch inaktiv.....	138
4.5.5	Ausblick:.....	138
<b>4.6</b>	<b>Shoc2: Effektor und PP1-regulatorisches Protein.....</b>	<b>139</b>
4.6.1	Modell der LRR-Domäne von Shoc2.....	139
4.6.2	Bindung von M-Ras an Shoc2.....	140
4.6.3	Shoc2 als PP1-regulatorisches Protein.....	142
4.6.4	Ausblick.....	143
<b>4.7</b>	<b>Kurze methodische Diskussion.....</b>	<b>144</b>
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>147</b>

<b>6</b>	<b>Material und Methoden.....</b>	<b>148</b>
<b>6.1</b>	<b>Material.....</b>	<b>148</b>
6.1.1	Bakterienstämme.....	148
6.1.2	Nährmedien und Antibiotika.....	148
6.1.3	Plasmide und Oligonukleotide.....	149
6.1.4	Chemikalien.....	150
6.1.5	Proteine und Enzyme.....	151
6.1.6	Verwendete Antikörper.....	152
6.1.7	Kit-Systeme.....	152
6.1.8	Puffer und Lösungen.....	152
6.1.9	Verwendete Materialien und Geräte.....	154
6.1.10	Kristallografische Screens.....	155
<b>6.2</b>	<b>Molekularbiologische Methoden.....</b>	<b>155</b>
6.2.1	Polymerasekettenreaktion (PCR).....	155
6.2.2	Weitere molekularbiologische Methoden.....	157
<b>6.3</b>	<b>Proteinchemische Methoden.....</b>	<b>159</b>
6.3.1	Expression rekombinanter Proteine.....	159
6.3.2	Präparation der G Proteine (Ras und Rap).....	160
6.3.3	Standard-Protokolle der Protein-Präparation.....	160
6.3.4	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	162
6.3.5	Western-Blot.....	162
6.3.6	Bestimmung der Phosphoinositol-Spezifität ( <i>PIP-Strip</i> ).....	163
6.3.7	Proteinkonzentrationsbestimmung.....	163
6.3.8	Konzentrierung von Proteinen durch Ultrafiltration.....	164
6.3.9	Analytische Ultrafiltration.....	164
6.3.10	Fluoreszenzmarkierung von Proteinen mit Iaedans.....	165
6.3.11	Nukleotidaustausch und -Befreiung von G Proteinen.....	165
6.3.12	Affinitätspräzipitation ( <i>Pull-down</i> ).....	167
6.3.13	Analytische Protease-Spaltung.....	168
<b>6.4</b>	<b>Biophysikalische Methoden.....</b>	<b>168</b>
6.4.1	Bestimmung der Nukleotidbeladung über Umkehrphasen-HPLC.....	168
6.4.2	ESI-MS.....	169
6.4.3	Fluoreszenzspektroskopie.....	169
6.4.4	Isotherme Titrationskalorimetrie.....	173
<b>6.5</b>	<b>Kristallisation.....</b>	<b>173</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>175</b>
<b>8</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>204</b>
8.1	<i>Krev interaction trapped protein</i> , Krit1.....	204
8.2	Die Funktion des essenziellen Glutamats in der GEF-Katalyse.....	206
8.3	Sequenzalignment Arap-Proteine.....	209
8.4	Sequenzalignment Rin-Proteine.....	212
8.5	Sequenzalignment Ras-Proteine.....	214
8.6	Posttranslationale Modifikation von Proteinen der Ras-Subfamilie.....	217

<b>8.7 Substrat-Spezifität der RhoGAP-Proteine.....</b>	<b>218</b>
<b>8.8 Die Familie der RA-/RB-Domänen Proteine.....</b>	<b>219</b>
<b>8.9 Aufreinigungsbedingungen.....</b>	<b>220</b>
<b>8.10 Abbildungsverzeichnis.....</b>	<b>225</b>
<b>8.11 Tabellenverzeichnis.....</b>	<b>226</b>
<b>8.12 Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>227</b>
<b>8.13 Publikationen von Ergebnissen dieser Arbeit.....</b>	<b>228</b>
<b>9 Danksagung.....</b>	<b>229</b>
<b>10 Lebenslauf.....</b>	<b>230</b>
<b>11 Eidesstattliche Erklärung.....</b>	<b>232</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Guaninnukleotid-bindende Proteine (G Proteine)

Die am häufigsten verwendeten organischen Cofaktoren einer Zelle sind Nukleotide. Besonders die Adenosin- und Guanosin-basierenden Mono- und Dinukleotide finden Verwendung in einer Vielzahl von zellulären Prozessen, wodurch Nukleotid-bindende Proteine (NBPs) die umfassendste Proteinklasse der zellulären Organismen bilden<sup>(1)</sup>. Strukturell werden die NBPs den  $\alpha/\beta$ -Proteinen zugeordnet, die neben anderen Untergruppen in die Nukleotid-bindenden *P-loop* Proteine und die Rossmann-Faltungs-Proteine eingeteilt werden (*Scop* Datenbank).

Die *P-loop* Proteine bilden die häufigste Faltungsklasse der zellulären Organismen, die wichtige Proteine wie Nukleinsäure-abhängige ATPasen (Helikasen, u. a.), AAA+ ATPasen, ABC ATPasen, Nukleotid-Kinasen und Guaninnukleotid-bindende Proteine (G Proteine) umfassen<sup>(2,3)</sup>.

Während ATPasen eher am Energiestoffwechsel beteiligt sind und die Hydrolyse des Nukleotids zur Energiegewinnung nutzen, übernehmen G Proteine regulatorische Funktionen, mit wenigen Ausnahmen (Dynamamin, EF-G oder Tubulin)<sup>(4)</sup>. Hierbei wechseln sie von der GTP-gebundenen Form in die GDP-gebundene, wobei die Hydrolysefunktion für die Direktionalität dieses Zyklus, einem molekularen Schalter gleich, eingesetzt wird<sup>(5)</sup>.

### 1.1.1 Klassifikation der G Proteine

Eine Einteilung der G Proteine kann sowohl strukturell als auch funktionell erfolgen.

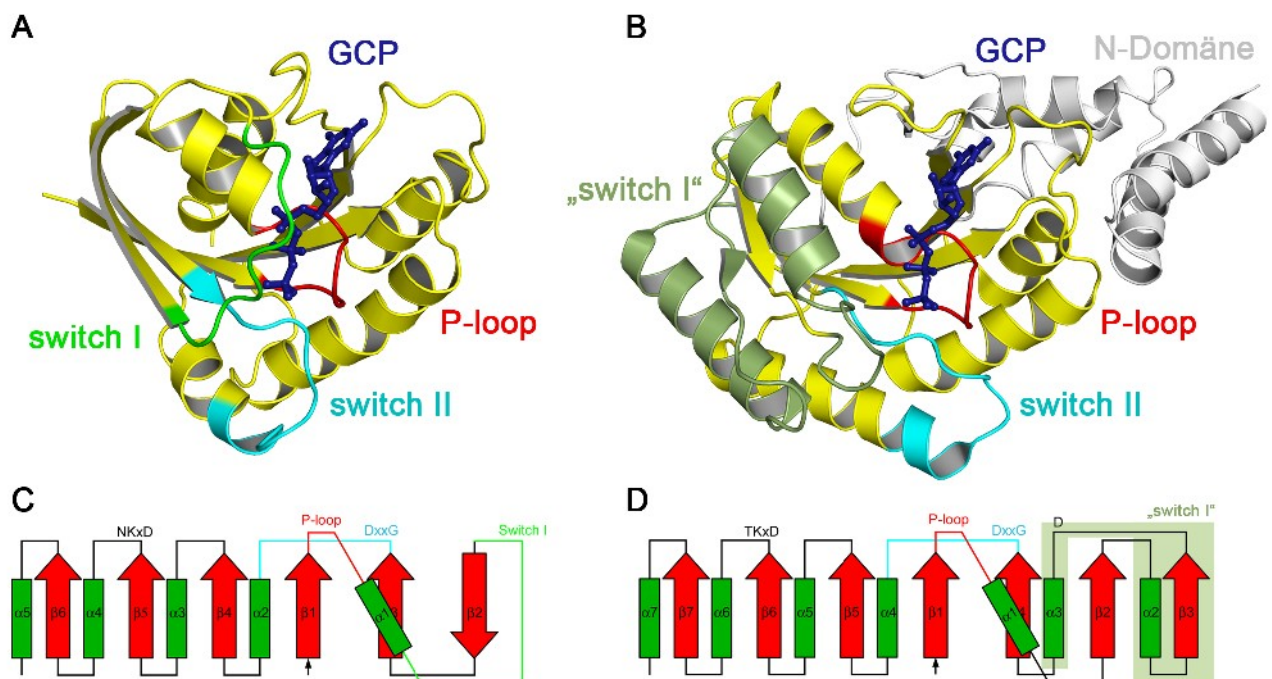
#### ***Strukturelle Elemente Guaninnukleotid-bindender Proteine***

*P-loop* NTPasen, als  $\alpha/\beta$ -Proteine, besitzen ein zentrales  $\beta$ -Faltblatt, welches auf beiden Seiten von  $\alpha$ -Helices flankiert wird und werden strukturell in zwei Klassen eingeteilt<sup>(2)</sup>. Die TRAFAC (**t**ranslation **f**actors) Klasse beinhaltet bekannte G Proteine wie die Ras-Superfamilie, heterotrimere G Proteine, die Translationsfaktoren oder die Myosin-Kinesin Superfamilie, welche ein sechssträngiges  $\beta$ -Faltblatt mit einem antiparallel verlaufenden Strang besitzen (Abb. 1A,C). Die zweite Klasse der G Proteine, SIMIBI (**s**ignal **r**ecognition **p**article, **MinD**, **BioD**), setzt sich aus den SRP-G Proteinen, den MinD-ähnlichen ATPasen, der G3E-Familie und einer metabolischen Enzymkinase-Gruppe zusammen, welche ein ausschließlich paralleles siebensträngiges Faltblatt als zentrales Element zeigen<sup>(2)</sup> (Abb. 1B,D).

N-terminal liegt auf einer flexiblen Schleife zwischen  $\beta 1$  und  $\alpha 1$  der sog. *P-loop* auch G1/Walker

A-Motiv (GxxxxGK(S/T)) genannt<sup>(6,7)</sup>, das die Phosphate des Nukleotids korrekt positioniert und das assoziierte Magnesium-Ion stabilisiert. Distal von diesem Motiv liegt das Walker B oder G3-Motiv (DxxG(Q/H/T)) am Ende des  $\beta$ 4-Strangs<sup>(7)</sup>. Dessen Aspartat stabilisiert ebenfalls das Magnesium über ein koordinierendes Wassermolekül. In Richtung des C-Terminus befindet sich das NKxD-Motiv (G4), welches für die Erkennung der Guanin-Base – bei einigen Ausnahmen<sup>(8)</sup> – verantwortlich ist.

Weiterhin koordiniert ein konserviertes Threonin (T35 bei Ras) das Magnesiumion des aktiven Zentrums (G2)<sup>(7)</sup>. Bei den SIMIBI-G Proteinen wird diese Rolle von einem konservierten Aspartat übernommen<sup>(9)</sup> (Abb. 1D). Als weiteres typisches Motiv besitzen die Proteine der SIMIBI-Klasse ein konserviertes Aspartat in der Nähe des Walker B-Motivs, dessen Funktion unbekannt ist.



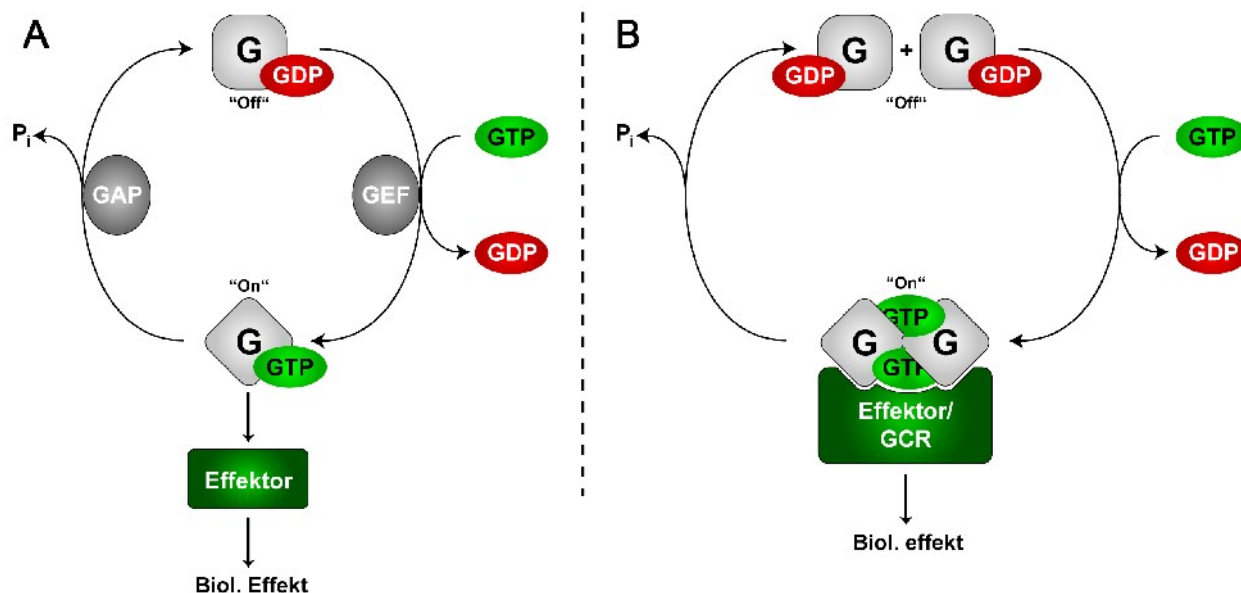
**Abbildung 1: Vergleich von TRAFAC- und SIMIBI-G Proteinen**

**A:** Struktur des TRAFAC-Proteins Ras in der GppCp gebundenen Form (pdb: 121p). Die Nukleotid-abhängigen Elemente sind dargestellt. **B:** Struktur des SIMIBI-Proteins SRP in der GppCp-gebundenen Form (pdb: 1rj9). SR ist nicht gezeigt. Im Gegensatz zu den TRAFAC-Proteinen existiert kein *switch I* (grün). *P-loop* (rot) und *switch II* (cyan) sind mit TRAFAC-G Proteinen vergleichbar. Die N-Domäne von SRP ist in grau gezeigt. **C:** Sekundärstrukturelemente der TRAFAC-G Proteinen. Dunkelgrün, Helices, Rot,  $\beta$ -Faltblatt. **D:** minimale Sekundärstruktur der SIMIBI G Proteine. Farbcodierung gemäß C.

### ***Funktionelle Einteilung der G Proteine***

Durch die zunehmende Charakterisierung von G Proteinen erwies sich eine funktionelle Einteilung gemäß der Durchführung ihrer biologischen Funktion als sinnvoll<sup>(10)</sup>. Demnach existieren zwei

Proteinklassen, die monomeren Ras-ähnlichen G Proteine und die GADs (*G Proteins activated by dimerization*), die in ihrer biologisch aktiven Form als Dimer auftreten (Abb. 2).



**Abbildung 2: Vergleich von Ras-ähnlichen G Proteinen, und GADs**

**A:** Ras-ähnliche G Proteine folgen einem Zyklus durch GEF-beschleunigten Nukleotidaustausch und irreversibler Hydrolyse von GTP, katalysiert durch GAPs. Die GTP-gebundene „aktive“ Form bindet an Effektormoleküle und vermittelt den biologischen Effekt. **B:** *G Proteins activated by dimerization* (GADs) folgen einem anderen Zyklus als die Ras-Proteine. Der intrinsische Nukleotidaustausch ist hoch, die aktive Form entsteht durch GTP-abhängige Dimerisierung. Dies vermittelt einerseits den biologischen Effekt, andererseits wird die Hydrolyse initiiert und die GADs wieder inaktiviert. Diese konzertierte Funktion erfolgt möglicherweise durch *GTPase Co-Regulators* (GCRs). (aus Gasper *et al.*<sup>(10)</sup>)

Folgende Proteine werden zu den monomeren Ras-ähnlichen Proteine gezählt:

- Ras-Superfamilie
- heterotrimere G Proteine
- Translationsfaktoren

Zu den GAD-Proteinen werden folgende G Proteine zugeordnet:

- SRP/SR
- Roco-Proteine
- Toc-Proteine
- Dynamin und GBP1
- Septine
- EngA / MnmE - Familie

- G3E / HypB - Familie
- MinD-, BioD-, NifH-ATPase-Familien

Funktionell zeigt sich, dass die GAD-Proteine ausschließlich in der dimeren Form eine biologisch sinnvolle Beschleunigung der Hydrolyse zeigen<sup>(11-15)</sup>, die an die biologische Funktion gekoppelt ist. Die Interaktion mit sog. GTPase Co-Regulatorischen Proteinen (GCRs) führt zur Ausübung der Funktion und Induzierung der Hydrolyse. Der Nukleotidaustausch erfolgt intrinsisch, da er aufgrund einer geringen Nukleotidaffinität im  $\mu\text{M}$ -Bereich ausreichend schnell erfolgt<sup>(13;14;16)</sup> (Abb. 2B).

Proteine der Ras-Familie hingegen benötigen aufgrund der nano- bis picomolaren Nukleotidaffinität Guaninnukleotid-Austauschfaktoren (GEFs) für den Nukleotidaustausch<sup>(17)</sup>. Die intrinsische GTPase dieser G Proteine ist ebenfalls unvollständig und unzureichend, wodurch die Interaktion mit GTPase aktivierenden Proteinen (GAPs) das aktive Zentrum vervollständigt und eine schnelle Hydrolyse gewährleistet<sup>(17;18)</sup> (Abb. 2A).

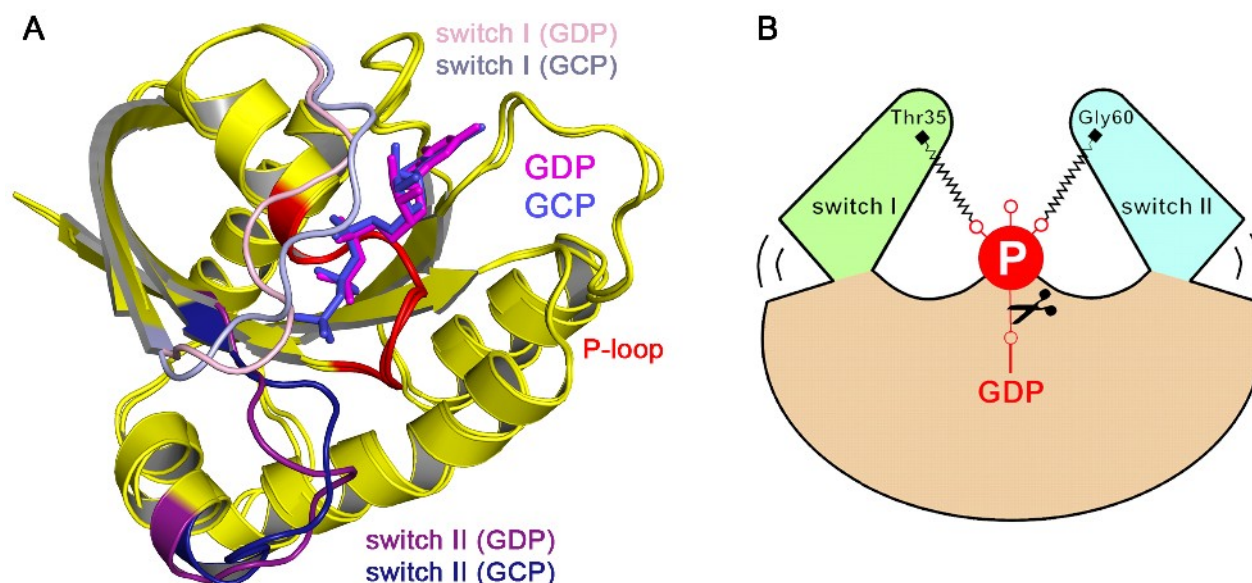
### 1.1.2 Ras-Superfamilie

Als erstes Protein der Ras-Superfamilie wurde v-Ras identifiziert; ein retroviraler Auslöser für Sarkome in Ratten (Ras, *Rat sarcoma*)<sup>(19;20)</sup>. Später wurde ein zelluläres Pendant entdeckt<sup>(21)</sup>, c-Ras, welches als Protoonkoprotein bezeichnet wurde, da es nur in mutierter Form onkogen wirkt. Onkogene Mutationen der Isoformen H-(Harvey), K-(Kirsten) und seltener N-Ras tragen so zu etwa 30% aller soliden Tumore bei<sup>(22;23)</sup>, mit besonders hoher Inzidenz in den schlecht therapierbaren Pankreas-Adenokarzinomen (90%)<sup>(24;25)</sup>.

#### ***Ras-Proteine als molekularer Schalter***

Die Struktur der Ras-Proteine ist optimal geeignet, um Ras als sogenannten molekularen Schalter einzusetzen. Die G-Domäne bleibt als Kernbereich in seiner Struktur konstant und vermittelt die Nukleotidaffinität über Magnesium, den *P-loop* und das NKxD-Motiv. Die sogenannten *switch I* (G2) und *switch II* (G4)-Regionen ändern Nukleotid- und  $\text{Mg}^{2+}$ -abhängig ihre Position<sup>(26)</sup>, was als sog. „loaded spring“ bezeichnet wird<sup>(5)</sup> (Abb. 3B). Die *switch*-Bereiche sind dabei unter Energieaufwand an das Nukleotid gebunden und werden durch die Hydrolyse „entspannt“, was sich in einer hohen Flexibilität insbes. von *switch I* aber auch von *switch II* in vielen Proteinstrukturen darstellt. Damit eignen sich die *switch*-Regionen in besonderem Maße als „Phosphat-Sensor“ indem

Effektoren an diese Bereiche binden und zwischen der GTP- und der GDP-gebundenen Form diskriminieren können (siehe 1.3 ).



**Abbildung 3: Nukleotid-abhängige Konformationsänderungen von Ras-ähnlichen G Proteinen**

**A:** Überlagerung von Ras\*GDP (pdb: 2cld) und Ras\*GCP (pdb: 121p). Strukturelle Änderungen erfolgen hauptsächlich in die *switch*-Regionen. Die GDP-Konformation ist in magenta-Farben gezeigt; die GppCp-Konformation in blauen Farben. Der invariable *P-loop* ist in rot dargestellt. **B:** „loaded-spring“-Modell der *switch*-Regionen. Durch die Präsenz des  $\gamma$ -Phosphats werden *switch I* und *switch II* in einer energiereichen Konformation fixiert. Durch Hydrolyse (Schere) wird diese Energie freigesetzt und *switch I* und *switch II* relaxieren in die variabelere GDP-Konformationen. (aus Vetter & Wittinghofer<sup>(5)</sup>)

### Die Ras-Superfamilie

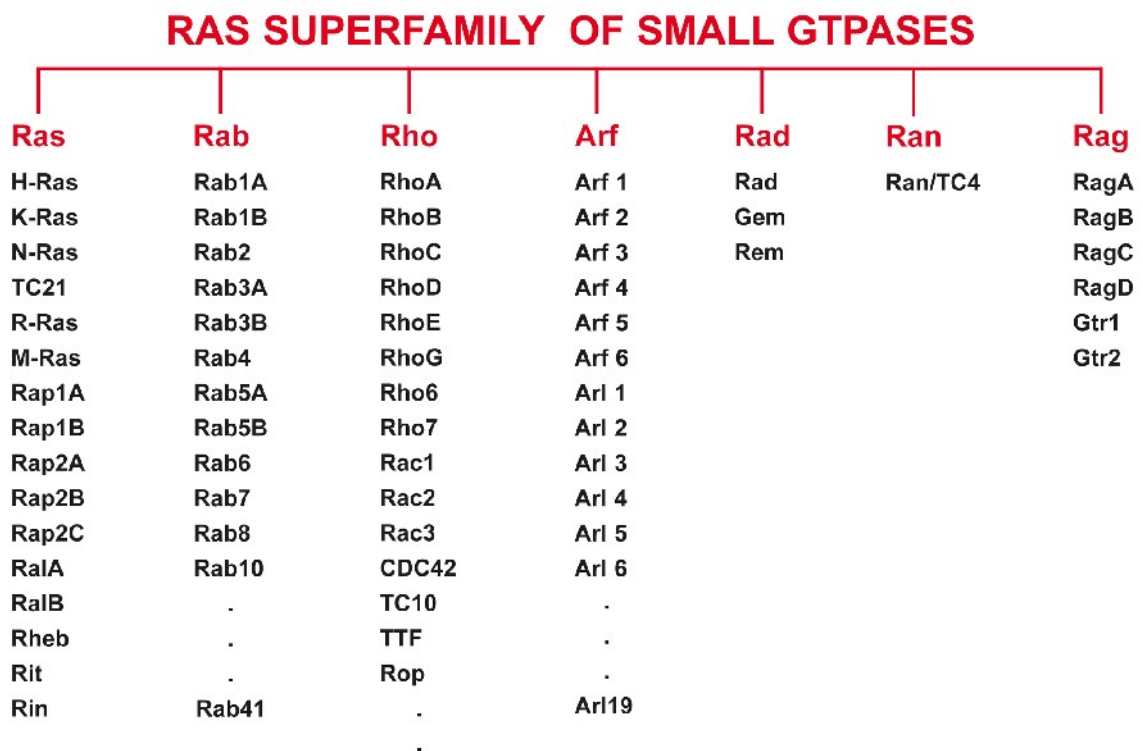
In den Jahren nach der Entdeckung von Ras wurden zunehmend G Proteine dieser Protein-Superfamilie zugeordnet, die inzwischen mehr als 150 Mitglieder umfasst<sup>(27;28)</sup>. Eine Einteilung gemäß ihrer Sequenz erfolgt in etwa sieben Subfamilien, deren Übergänge je nach Publikation variieren (Abb. 4). Colicelli beispielsweise schlägt fünf Gruppen vor, wobei er die heterotrimeren  $G_{\alpha}$ -Proteine als Arf-ähnlich der Ras-Superfamilie zuordnet und Ran als Rab-ähnliches Protein klassifiziert<sup>(28)</sup>.

Die Ras-Subfamilie ist die funktionell heterogenste Gruppe mit 35 Mitgliedern, die in 1.1.3 detailliert besprochen wird.

### Rab-Proteine

Die Rab-Familie (*Ras-like in brain*) bildet die größte Subfamilie, mit 70 humanen und 11 *S. cerevisiae* Proteinen, die den vesikulären Transport regulieren<sup>(28-30)</sup>.





**Abbildung 4: Einteilung der Ras-Superfamilie**

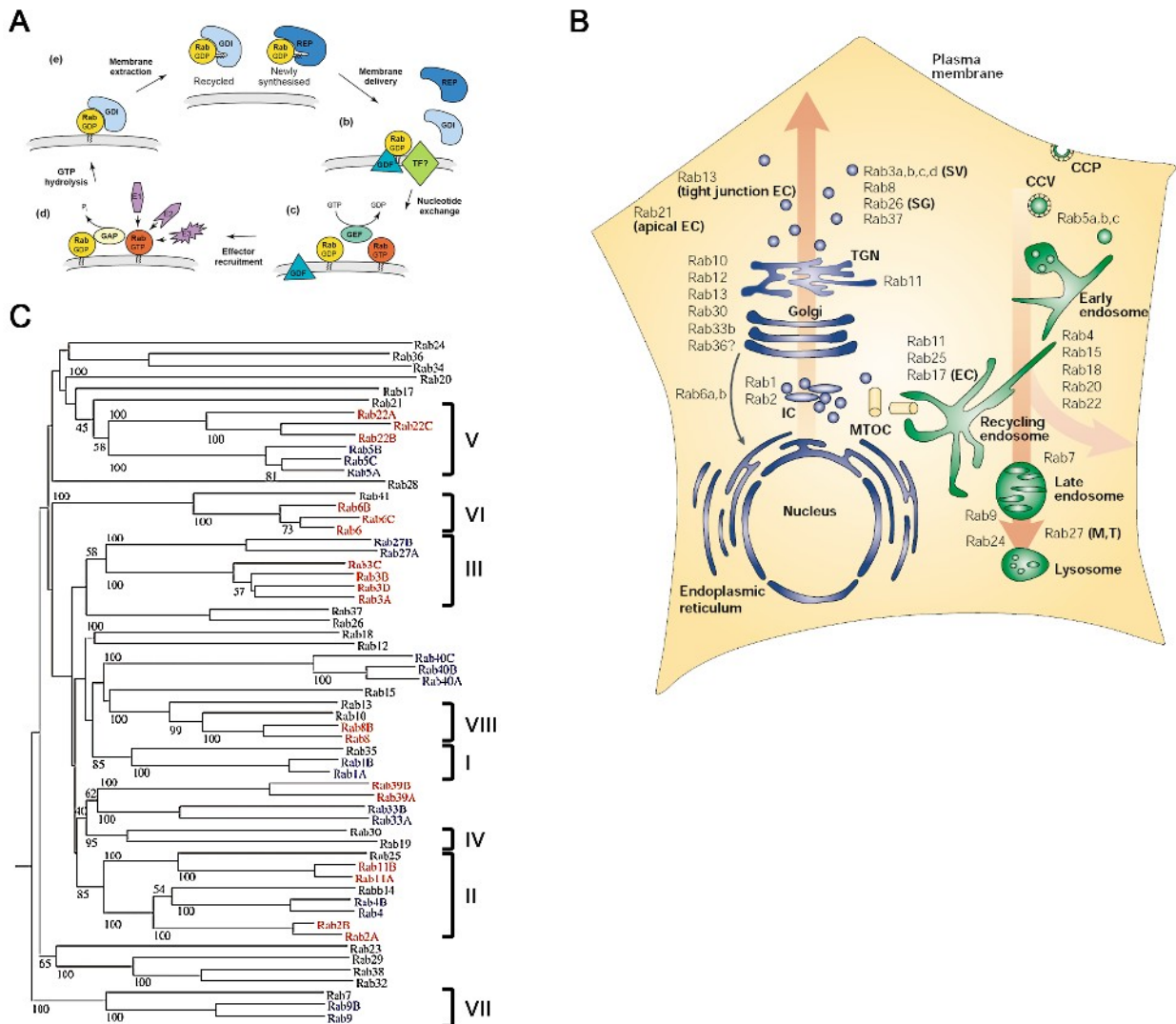
Basierend auf Funktion und Sequenz wird die Ras-Familie in sieben Subfamilien eingeteilt: Die Ras-, Rab-, Rho-, Arf-, Rad- und Rag-Familie. Ran wird als eigenständiges Protein klassifiziert. (Quelle: A. Wittinghofer)

Rab-spezifische Sequenzmotive, sog. RabF (*Rab family*), unterscheiden die Rab G Proteine von anderen Ras-Familien. Die RabSF-Motive (*Rab subfamily*) unterscheiden verschiedene Rab Unterfamilien<sup>(31;32)</sup>. Anhand dieser Motive kann eine Einteilung der Rab-Proteine in acht Gruppen vorgenommen werden<sup>(32)</sup> (Abb. 5C), die interessanterweise den funktionellen Eigenschaften und der subzellulären Lokalisation recht gut entsprechen<sup>(29;32)</sup>.

So ist Rab5 einschließlich der nahe verwandten Proteine Rab21 und Rab22 an Endosomen lokalisiert wo sie die Endozytose während der Endosombildung regulieren<sup>(33-36)</sup> (Abb. 5B). Ebenfalls Endosom-lokalisierte Proteine, Rab17<sup>(37)</sup> und Rab20, zeigen eine starke Homologie zu Rab5, werden jedoch nicht dessen Gruppe zugeordnet<sup>(32)</sup>.

Die unterschiedliche Lokalisation der Rab-Proteine wird durch die 30 Aminosäuren umfassende C-terminale hypervariable Region vermittelt<sup>(39)</sup>, in der auch die Geranylgeranylierung der Rab-Proteine vorgenommen wird (s.u.) über die der G Proteinzyklus dieser Familie reguliert wird (Abb. 5A). Der Lipidrest wird von Rep1 (*Rap escort protein 1*)<sup>(40-42)</sup> oder RabGDI<sup>(43-45)</sup> im GDP-Zustand von Rab erkannt und maskiert, wodurch das G Protein im Komplex zur Zielmembran transportiert werden kann<sup>(46)</sup>. Insbesondere der Nukleotidaustausch durch spezifische GEFs zu GTP-gebundenem

Rab verringert die Affinität zum GDI und ermöglicht die Aktivierung<sup>(47-50)</sup> und Effektorbindung<sup>(51)</sup>.



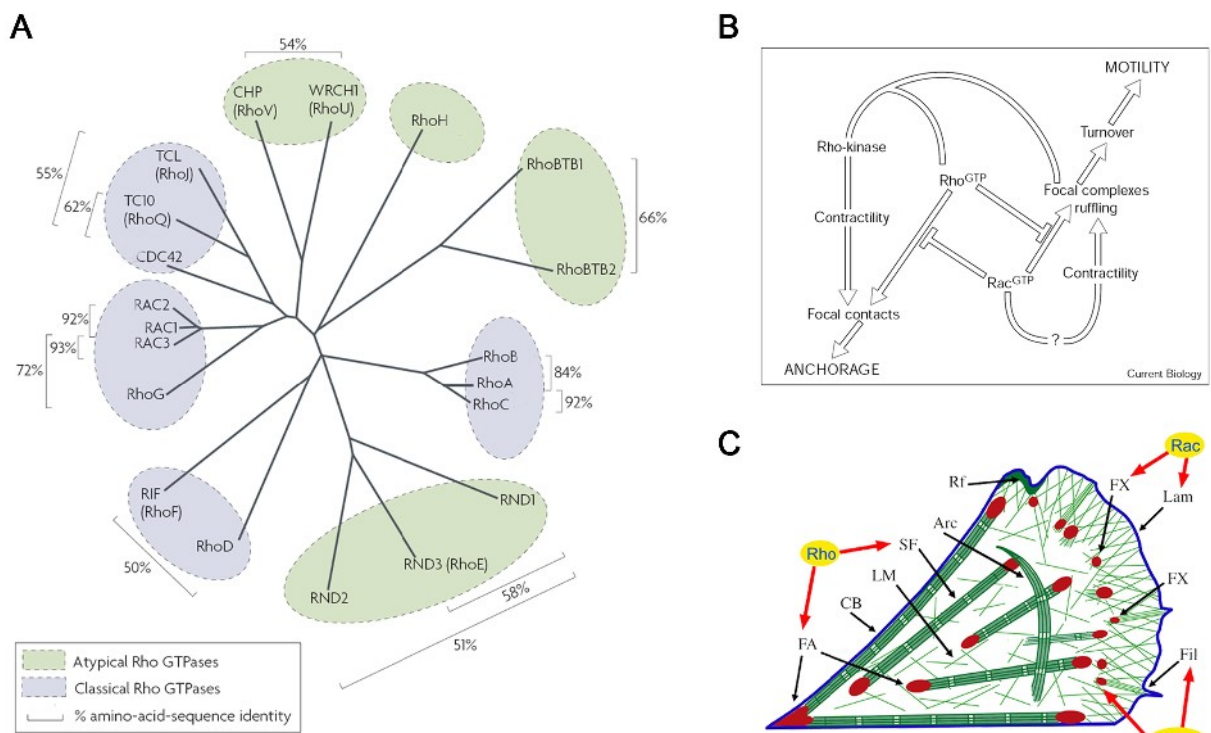
**Abbildung 5: Die Rab-Familie**

**A:** Funktioneller GTPase-Zyklus der Rab-Proteine. An der Donormembran wird Rab prenyliert und vorher/nachher von Rep1 und RabGDI gebunden, und durch das Zytosol an die Akzeptormembran transloziert. Die Dissoziation von RabGDI ist sehr wahrscheinlich mit der Aktivierung von Rab durch GEFs verbunden. Anschließende Rekrutierung von Effektormolekülen (E1, E2, E3) vermittelt die biologische Funktion. GTP-Hydrolyse inaktiviert Rab, welches durch Bindung von RabGDI aus der Membran extrahiert und anschließend recycled wird. (aus (38)) **B:** Subzelluläre Lokalisation von Rab-Proteinen. (aus (29)) **C:** Klassifikation von Rab-Proteinen in acht Gruppen. Nicht eingeteilte Proteine können keiner Gruppe eindeutig zugeordnet werden. Zur Übersichtlichkeit sind einzelne Unterfamilien farbig dargestellt. (aus (32))

Umgekehrt ermöglicht die Inaktivierung durch GAPs<sup>(52;53)</sup> die Bindung von RabGDI und führt zur Membranextraktion; eine Funktion die nicht von Rep1 übernommen werden kann, da es prenyliertes und unprenyliertes Rab mit gleicher Affinität bindet<sup>(54-57)</sup>. Rab-GDFs (*GDI displacement factor*) recyceln Rab und sind vermutlich an der spezifischen Organellenlokalisierung von inaktiven Rab-Proteinen beteiligt<sup>(58;59)</sup>.

**Rho-Proteine**

Die Rho-Familie (*Ras homologous*) wird in die klassischen und die atypischen Rho-Proteine (Rnd, RhoBTB u.a.) unterteilt (Abb 6A). Als Vertreter der atypischen Rho-Familie zeichnen sich die Rnd Proteine durch das Fehlen des für die Hydrolyse notwendigen Glutamins (Walker B) aus. Deshalb wird angenommen, dass sich die Proteine in der Zelle ausschließlich in der GTP-Form befinden (Eine Eigenschaft, die für Rap und Rheb bis zur Identifikation der GAPs auch angenommen wurde) und sie auf der Ebene der Proteinexpression reguliert werden<sup>(60;61)</sup>.



**Abbildung 6: Rho-Proteine**

**A:** Phylogenetische Analyse der Rho G Proteine. Klassische Rho-Proteine sind blau unterlegt, atypische Rho-Proteine igrün (aus Heasman *et al.*<sup>(67)</sup>). **B:** Antagonistischer Effekt von Rho und Rac G Proteinen. Hierdurch werden Zellmotilität und Zellverankerung reguliert. (aus Rottner *et al.*<sup>(68)</sup>). **C:** Vereinfachte Darstellung des Einflusses der klassischen Rho-Proteine auf die Zellmotilität. FA: *Focal adhesions*; FX, *Focal complexes*; Lam, *Lamellipodium*; Fil, *Filopodium*; SF, *Stressfaser-Bündel*; CB, *Concaves Bündel* (Stressfasern an nicht bewegten Rändern); Arc, *Bogenförmige Bündel* (Häufig am dorsalen Ende); LM, *Freie Actinfilamente* (*loose meshwork*); Rf, *Membraneinstülpungen* (*membrane ruffle*) ([http://www.mit.edu/~kardar/research/seminars/motility/Videotour/video\\_tour.html](http://www.mit.edu/~kardar/research/seminars/motility/Videotour/video_tour.html))

Zu den klassischen Rho-Proteinen gehören die Rho-Proteine selbst, CDC42 und Rac, die an der Regulation des Zytoskeletts beteiligt sind<sup>(62)</sup> und die typische Schalterfunktion ausüben<sup>(63)</sup>. Das spezifische strukturelle Merkmal der Rho-Proteine ist eine Insertion hinter  $\beta$ -Faltblatt 5, die sogenannte *Rho-insert-Helix*<sup>(64)</sup>, deren Funktion nicht eindeutig geklärt ist. Es mehren sich jedoch Hinweise, dass hierüber zusätzliche Effektor<sup>(65)</sup>- und Regulatorbindungen<sup>(66)</sup> vermittelt werden.

Durch ihren Einfluss auf das Zytoskelett sind die Funktionen der Rho-Proteine sehr weitgefächert und waren Gegenstand intensiver Forschung in den letzten Jahren<sup>(67)</sup>. Das zentrale Experiment zur Aufklärung der Funktion war die Mikroinjektion konstitutiv aktiver Formen der Rho-Proteine, die zeigten, dass RhoA Stressfasern aus F-Actin induziert, während Rac1 Lamellipodien und CDC42 Filopodien induziert<sup>(69)</sup>. Aufgrund dieser unterschiedlichen Effekte wurde angenommen, dass CDC42 und Rac1 antagonistisch zu RhoA wirken<sup>(68)</sup> (Abb 6B). Besonders komplex und aufschlussreich ist die Untersuchung des Einflusses der Rho-Proteine auf die Zellmotilität<sup>(70)</sup>. Während RhoA im zentralen Zellbereich lokalisiert ist und dort die Polymerisation von Actinbündeln mit assoziierten *Focal Adhesion sites* induziert<sup>(68;71)</sup>, befinden sich Rac und CDC42 im Bereich des Lamellipodiums, in dem sich die kleineren *Focal complexes* ausbilden<sup>(71)</sup> (Abb 6C). Rac1 vermittelt hier die Polymerisation von Actin in verzweigte Strukturen, während Filopodien wiederum durch CDC42-induzierte, geradlinige Actin-Fasern aufweisen, die sich von den RhoA-induzierten Fasern unterscheiden<sup>(72)</sup>. Es stellte sich heraus, dass der unterschiedliche Effekt der Rho-Proteine auf die Actinpolymerisation durch unterschiedliche Effektoren vermittelt werden, die entweder die Verzweigung (Arp2/3) oder die lineare Formation (Formine) von Actin induzieren<sup>(67;72)</sup>. Die hohe Dynamik eines Prozesses wie der Zellmigration erfordert eine intensive Kreuzregulation der verschiedenen Rho-Signalwege, die die Aufklärung der Funktionen einzelner Proteine erschwert und dementsprechend noch nicht vollständig verstanden ist<sup>(73)</sup>.

Pflanzliche Zellen besitzen ebenfalls spezifische Rho-Proteine (Rops)<sup>(74;75)</sup>, deren Funktion nicht nur auf die Regulation des pflanzlichen Zytoskeletts beschränkt ist. Pflanzen besitzen keine Ras-Proteine, so dass angenommen wird, dass diese Rolle von Rop übernommen wurde<sup>(74;76;77)</sup>.

### ***Arf/Arl***

Die Arf-Familie (*ADP-ribosylation factor*) lässt sich funktionell in die Arf- und die Arl-Proteine einteilen. Die Arf-Proteine werden in Klasse I (Arf1-3), Klasse II (Arf4,5) und Klasse III (Arf6) eingeteilt<sup>(78)</sup>, die an der Regulation der Vesikelbildung beteiligt sind<sup>(79)</sup>.

Die biologische Funktion von Arl-Proteinen (*Arf-like*) unterscheidet sich von der der Arfs. Arl1, das den Arf-Proteinen ähnlichste Protein, ist an Membrantransportprozessen beteiligt<sup>(80)</sup>. Arl2/Arl3, Arl4 und Arl6 werden eine wichtige Funktionen in ciliären Strukturen zugesprochen<sup>(81-83)</sup>. So reguliert Arl2 die Mikrotubuli-Assoziation<sup>(84)</sup>.

Arf und Arl Proteinen ist gemein<sup>(85;86)</sup>, dass sie über eine N-terminal von der G-Domäne liegende zusätzliche amphipatische Helix verfügen, die durch eine Bewegung der *Interswitch*-Region ihre

Position verändern kann<sup>(87-89)</sup>. Bei den Arf-Proteinen wird diese am N-Terminus nach Abspaltung des Methionins myristoyliert<sup>(90;91)</sup> und reguliert durch ihre Bewegung die Membraninsertion.

### **Ran**

Das Ran-Protein (*Ras-related nuclear protein*) wird als eigenständiges Protein klassifiziert, da es eine einzigartige Funktion ausübt. Als einziges Protein besitzt es eine C-terminale Helix, die nicht posttranslational modifiziert wird. Ran befindet sich im Nukleus und reguliert den Transport von Proteinen durch die Kernporen<sup>(92)</sup>. Dabei befindet sich RCC1, das einzig bekannte GEF von Ran im Nukleus, während sich RanGAP ausschließlich im Zytoplasma befindet. Dadurch entstehen unterschiedlich lokalisierte Pools von GDP- und GTP-gebundenem Ran<sup>(93)</sup>, welches gemeinsam mit Cargo-Proteinen die Kernporen entlang des Konzentrationsgefälles passiert<sup>(94)</sup>.

### **Posttranslationale Modifikation von Ras-Proteinen**

Ein Großteil der Signaltransduktionsprozesse findet an der Membran statt, um einerseits lokal höhere Konzentrationen zu erzeugen und andererseits eine zusätzliche Regulationsmöglichkeit einzuführen<sup>(95;96)</sup>.

Die posttranslationale Modifikation von Proteinen der Ras-Subfamilie findet am C-terminalen Cystein in der sogenannten CaaX-Box statt, deren Sequenz von Farnesyltransferasen (FTasen) und Geranylgeranyltransferasen (GGTasen) erkannt wird<sup>(97)</sup>. Die letzte Aminosäure entscheidet über Farnesylierung (X=S, oder andere) und Geranylgeranylierung (X=L,(M))<sup>(98)</sup>. Weitergehende Prozessierung von CaaX-Box Proteinen beinhaltet die Abspaltung des aaX-Restes mit anschließender Methylierung des Cysteins.

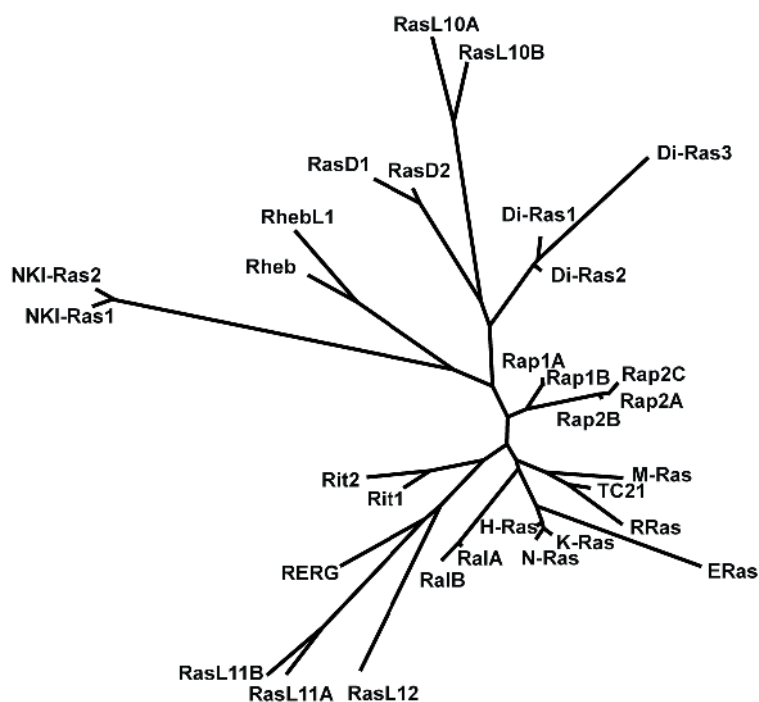
H-Ras, K-Ras und N-Ras werden farnesyliert; N- und K-Ras können auch (in Gegenwart von FTase-Inhibitoren) geranylgeranyliert werden<sup>(98;99)</sup>. Die Rap-Isoformen werden geranylgeranyliert (Rap1A, Rap1B, Rap2b)<sup>(100)</sup> oder farnesyliert (Rap2A, Rap2C). Zusätzlich werden Proteine, die wie bsp. H-Ras weitere Cysteine in dieser Region aufweisen, palmitoyliert<sup>(101)</sup>. Im Gegensatz zur Prenylierung ist die Palmitoylierung reversibel<sup>(102;103)</sup>; ein hochdynamischer Prozess, der die zelluläre Lokalisation der Proteine reguliert<sup>(104;105)</sup>. Durch Palmitoylierung von N- und H-Ras am Golgi werden diese Proteine zur Plasmamembran transferiert und verweilen dort bis zur Depalmitoylierung und Membranextraktion<sup>(106)</sup>.

K-Ras wird nicht palmitoyliert, sondern besitzt eine polybasische Sequenz am C-Terminus, die sich an die negativ-geladenen Phospholipide anlagert, weshalb K-Ras nicht der Palmitoyl-Regulation

unterliegt<sup>(101)</sup>. Die Modifikation der weiteren Proteine der Ras-Subfamilie ist weniger ausführlich untersucht (siehe Anhang S. 217).

Proteine der Rho-Subfamilie besitzen wie die Ras-Proteine eine CaaX-Box und werden geranylgeranyliert<sup>(107)</sup>. Die Rab-Familie weist, bis auf wenige Ausnahmen, ein CC- oder ein CxC-Motiv auf, an dem sie zweifach geranylgeranyliert werden (GGTase II)<sup>(108-110)</sup>. Die Prenylierung von Rab-Proteinen wird durch Bindung an Rep1 katalysiert, welches GGTasen rekrutiert<sup>(41)</sup> und nach der Modifikation von Rab den Prenylrest in einer hydrophoben Tasche binden<sup>(42)</sup>. Die Arf-Proteine werden, nach Abspaltung des Methionins, N-terminal am ersten Glycin der amphipatischen Helix myristoyliert<sup>(90;91)</sup>.

### 1.1.3 Ras-Subfamilie



**Abbildung 7: Phylogenetischer Baum der Ras-Subfamilie**

Phylogenetische Analyse der Ras-Subfamilie, basierend auf dem Vergleich der Proteinsequenzen (ClustalW). Die Abbildung wurde mit Hilfe des *Bosque*-Programms<sup>(118)</sup> erstellt.

Die Ras-Subfamilie ist sehr heterogen (Abb. 7), da einzelne Mitglieder von nur 30% Homologie bis zu 70% Homologie zu H-/N-/K-Ras aufweisen und dementsprechend auch funktional unterschiedlich sind. Die klassischen Ras-Proteine, H-/N-/K-Ras, sind u.a. an Proliferations- und Differenzationsprozessen beteiligt, die durch Transmembranrezeptoren aktiviert werden<sup>(17;111;112)</sup>. Somatische Mutationen der klassischen Ras-Proteine, die die Hydrolysefunktion vermindern (Q61x,

G12x, G13x) führen zu onkogenen Veränderungen der Zelle aufgrund der konstitutiven Aktivität von Ras<sup>(113-115)</sup>. Weitere Mutationen, die familiär vererbbar sind, besitzen multiple Effekte, von denen einige keinen Einfluss auf die Hydrolyse zeigen. Sie führen zu Krankheitsbildern wie dem Costello- oder dem Noonan-Syndrom<sup>(116;117)</sup>.

Die nächsten Verwandten sind die R-Ras-Proteine, R-Ras, M-Ras und TC21, deren Funktion nur sehr schwer von der Funktion der klassischen Ras-Proteine zu unterscheiden ist (Tabelle 1). Dies liegt vor allem an der hohen Homologie der Effektorregion, die die Zuordnung zu einzelnen Effektoren erschwert.

Ein Versuch, eine Übersicht über die jeweilige Funktion der Ras-Proteine darzustellen ist in Tabelle 1 gegeben. Diese wird hauptsächlich über die Interaktion mit Effektoren und die subzelluläre Funktion bestimmt. Eine weitere Schwierigkeit hierbei ist durch die exzessive Quervernetzung der Signaltransduktionsprozesse gegeben (im engl. *Crosstalk*), die die Zuordnung eines Phänotyps zu einem bestimmten Ras-Protein erschwert<sup>(119;120)</sup>.

Beispielsweise besteht eine klare Interaktion zwischen Proliferation und Zelladhäsion, die dazu führte, dass die Rap-Proteine zunächst als Proteine identifiziert wurden, die den Ras-Phänotyp invertieren, sozusagen als Antagonisten wirken<sup>(121)</sup>. In den letzten Jahren wird zunehmend deutlicher, dass die Rap-Proteine eigenständige Funktionen ausüben, die insbesondere die Zelladhäsion regulieren<sup>(122;123)</sup>. Zusätzlich werden Unterschiede zwischen Rap1 und Rap2 deutlich, die ein Verständnis der biologischen Funktion der Proteine zunehmend erschweren<sup>(124)</sup> (Yaman *et al.*, *eingereicht*).

**Tabelle 1: Biologische Funktion der Ras-Proteine**

G Protein	Funktion	Ref.
H-/N-/K-Ras	<b><i>Rat sarkoma</i></b>	(125)
		(126)
	Zellproliferation	(117)
	Zelldifferentiation	(127)
	Zelladhäsion Genregulation	(111)*
R-Ras	<b><i>Ras-related Protein</i></b>	(128)
		(129)
	Zelladhäsion (Integrin-Aktivierung), Neurit-Bildung (Plexin als GAP für R-Ras)	(130) (131)
	Abgrenzung von klassischen Ras-Proteinen schwierig	
M-Ras (R-Ras3)	<b><i>Muscle Ras oncogene homolog</i></b>	(132)
		(133)
	Neuronale Differenzierung	(134)

	Aktivierung durch NGF und EGF in neuronalen Zellen	(135)
	Phänotyp von M-Ras <sup>(-/-)</sup> -Mäusen unauffällig.	(136)
	Regulation des Actin-Zytoskeletts	
	Abgrenzung von Ras schwierig, da MAPK/ERK-Signalweg ebenfalls aktiviert wird (evtl. über Regulation von PP1c).	
TC21 (R-Ras2)	<b><i>Teratocarcinoma oncogene 21</i></b>	(137)
	Hohes Tumor-induzierendes Potential.	(138)
	Induktion von mTor ohne Aktivierung von PKB	(139)
	Morphogenese (Embryonalentwicklung)	
	Abgrenzung von Ras und R-Ras schwierig.	
Rap1	<b><i>Ras-proximate 1</i></b>	(140)
		(141)
	Adhäsionsprozesse (Integrin-Aktivierung):	(142)
	Morphogenese	(143)
	Phagozytose	(144)
	Zelladhäsion	(145)
	Zellmigration	(146)*
	<i>Cell-spreading</i>	
	Neuronale Polarität	
Rap2	<b><i>Ras-proximate 2</i></b>	(147)
		(124)
	Adhäsionsprozesse (Integrin-Aktivierung)	(148)
	Neuronale Polarität und Funktionalität ( <i>LTP</i> )	(149)
	Die Abgrenzung von Rap1 ist schwierig; Rap2 interagiert mit spezifischen Effektormolekülen	
RalA	<b><i>Ras-like A</i></b>	(150)
		(151)
	Exozytose (Interaktion mit dem Exocyst-Komplex)	(152)
	Endozytose	(153)
	Vesikeltransport (inkl. Neurotransmitter-Freisetzung) Morphogenese	(154)
	Transkription	
RalB	<b><i>Ras-like B</i></b>	(152)
		(155)
	Abgrenzung von RalA schwierig. Eventuell sogar Antagonist von RalA	(156)
Rheb	<b><i>Ras homolog enriched in brain</i></b>	(157)
		(158)
	Regulation von:	(159)
	Zellproliferation	(160)
	Zellgröße	(161)
	Energiestatus der Zelle ( <i>nutrient sensing</i> )	(162)
	Ribosombiogenese	(163)
	Metabolismus	(164)*
	Neuronale Polarität	
	Inhibition der Raf-Kinasen	
	Aktivierung des mTOR-Komplexes	



## Einleitung

RhebL (Rheb2)	<b><i>Ras homolog enriched in brain like 1</i></b> Vgl. mit Rheb, Aktivierung von mTor	(165) (166) (167)
Di-Ras1 (Rig)	<b><i>Distinct subgroup of the Ras family 1</i></b> Tumorsuppressor Antagonistischer Effekt zu H-Ras Überexpression in HEK293T führt zu vakuolären Strukturen Hoher intr. Nt-Austausch	(168) (169) (170)
Di-Ras2	Siehe Di-Ras1.	
Di-Ras3 (ARHI, Noey2)	<b><i>Aplysia Ras homolog 1</i></b> Potentieller Tumorsuppressor Funktion unbekannt	(169) (171)
Rit1	<b><i>Ras-like expressed in many tissues 1</i></b> Ubiquitäre Expression Neuronale Differenzierung Transformationspotenzial Diskriminiert zw. Raf1 und B-Raf Ternärer Komplex: Rit1/Par6/CDC42 Hoher intr. NT-Austausch	(172) (173) (174) (175)
Rit2 (Rin)	<b><i>Ras-like expressed in neuronal tissues</i></b> Spezifisch für neuronales Gewebe siehe Rit1	
RasD1 (AGS1)	<b><i>Dexamethasone-induced Ras-related protein 1</i></b> Aktivierung von G <sub>ai</sub> /G <sub>o</sub> -Proteinen Regulation der Peptidhormon-Sekretion (Regulation der Adenylatzyklase) NMDA-signalling ... ERK-Aktivierung	(176) (177) (178)
RasD2 (Rhes)	<b><i>Dexamethasone-induced Ras-related protein 2</i></b> Aktivierung von G <sub>as</sub> /G <sub>ai</sub> -Proteinen Regulation des Dopamin-Signalwegs	(179) (180) (178)
RasL10A, B (RRP22)	<b><i>Ras-like protein 10</i></b> <b><i>Ras-related protein of chromosome 22</i></b> Potentielle Tumorsuppressoren Expression ausschließlich im ZNS Funktion unbekannt	(181) (182) (183)
RasL11A	<b><i>Ras-like protein 11A</i></b> Potentieller Tumorsuppressor	(184)

	Funktion unbekannt	
RasL11B	<b><i>Ras-like protein 11B</i></b>	(185)
	Potentiell Onkoprotein Funktion unbekannt	
NKI-Ras1	<b><i>NFκB-inhibitor-interacting Ras-like Protein 1</i></b>	(186) (187)
	Nukleotid-unabhängige Interaktion mit IκB und Inhibition des Abbaus von IκBβ	(188)
NKI-Ras2	Siehe NKI-Ras1	
ERas (Hras2, HRASP)	<b><i>Embryonic stem cell-expressed Ras</i></b> Expression in Embryonalzellen vor Beginn der Differenzierung Starker Transformations-Phänotyp ERas interagiert mit PI3K und nicht mit Raf	(189) (190)
RERG	<b><i>Ras-related and estrogen-regulated growth inhibitor</i></b>	(191)
	Potentieller Tumorsuppressor Expression in Tumorgewebe ist geschlechtsspezifisch	

Die Literaturangaben bleiben unvollständig.

\* Aufgrund der Größe der Primärliteratur wurden vermehrt Übersichtsartikel angegeben.

## 1.2 Regulatoren von G Proteinen

### 1.2.1 Guanin-Nukleotid-Austauschfaktoren

G Proteine besitzen eine geringe intrinsische Austauschaktivität – von wenigen Ausnahmen wie Di-Ras1/2 (oder auch EF-Tu) abgesehen – die durch GEF-Proteine um das  $10^2$ - bis  $10^5/10^6$ -fache<sup>(192-194)</sup> erhöht wird.

#### **GEF-Klassen**

Die hohe Zahl unterschiedlicher G Proteine der Ras-Familie erfordert spezifische GEF-Proteine, die maximal den Nukleotidaustausch einiger weniger Mitglieder einer Unterfamilie katalysieren können (Abb. 8).

Die GEFs der Ras-Familie weisen eine CDC25 Domäne auf, die stets in Tandem mit der REM (*Ras exchanger motif*) auftreten<sup>(195)</sup>. Die Rab-Familie besitzt verschiedene GEF-Klassen, die nur bedingt in Untergruppen eingeteilt werden können. Ein weit verbreitetes Motiv ist die VPS9-Domäne; andere GEFs sind MSS4/DSS4, Sec2<sup>(17)</sup> und große makromolekulare Komplexe wie TRAPP<sup>(196)</sup> und HOPS<sup>(197)</sup>, die GEF-Aktivität auf *S. cerevisiae* Rab-Proteine besitzen. Rho-Proteine assoziieren mit GEFs der DH-PH-Klasse<sup>(198)</sup> und der CDM/DOCK-Klasse<sup>(199)</sup>. GEFs der Arf-Familie weisen eine

## Einleitung

Sec7-Domäne auf<sup>(200)</sup>. Für die Arl-Proteine ist noch kein GEF identifiziert worden, die Notwendigkeit hierfür besteht jedoch, da verschiedene Arl-Proteine eine sehr hohe Affinität zu Nukleotiden besitzen<sup>(86)</sup>(S. Veltel, Promotion). Ran besitzt RCC1 als einziges, bekanntes GEF<sup>(201)</sup>.

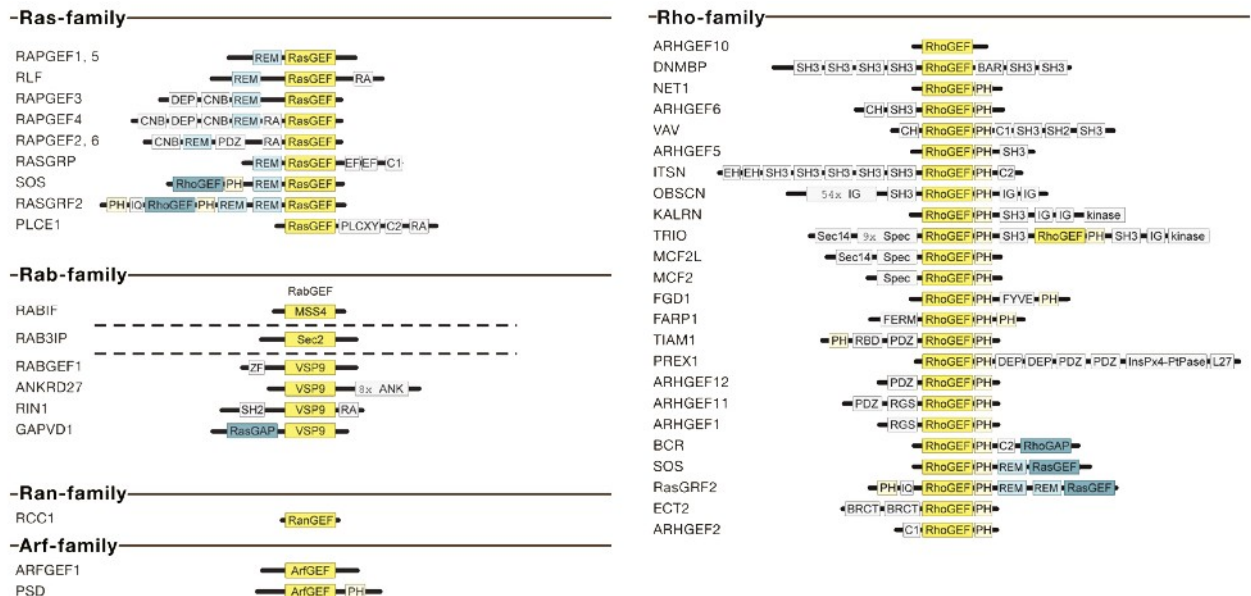


Abbildung 8: Ausgewählte Beispiele von GEF-Proteinen von Mitgliedern der Ras-Superfamilie Domänenstruktur einiger GEF-Proteine (aus Bos *et al.*<sup>(17)</sup>)

## Regulation von GEFs

GEF-Proteine der Ras-Superfamilie sind, bis auf wenige Ausnahmen, Multidomänen-Proteine, die durch unterschiedliche Signaltransduktionsprozesse aktiviert werden. Die Einteilung kann in drei Gruppen erfolgen (Abb. 8):

- Aktivierung durch Translokation
- Allosterische Aktivierung
- Kompetitive Regulation

Eines der am besten untersuchten Beispiele ist das Ras-GEF Sos. Der klassische Aktivierungsweg erfolgt über die Interaktion mit Adapterproteinen (Grb2), die ihrerseits an autophosphorylierte und damit aktive Rezeptortyrosinkinasen binden<sup>(202)</sup>. Die hierdurch erfolgte Membranlokalisation des GEFs führt zur Aktivierung des ebenfalls membranständigen Ras. Interessanterweise zeigt Sos *in vitro* eine nur geringe katalytische Aktivität auf Ras\*GDP<sup>(203)</sup>. Untersuchungen ergaben, dass es eine weitere Bindungsstelle für aktiviertes, GTP-gebundenes Ras (distale Bindungsstelle) existiert, die allosterisch die Aktivität von Sos reguliert und eine positive *Feedback*-Schleife induziert<sup>(204)</sup>.

Ein weiteres Beispiel ist die allosterische Regulation des Rap-GEFs Epac1/2 durch cAMP<sup>(205;206)</sup>, dessen katalytische Domäne von der regulatorischen Domäne maskiert ist. Nach cAMP-Bindung erfolgt eine starke Konformationsänderung und die Bindestelle für Rap wird freigegeben<sup>(207)</sup>. Rap-GEFs der CalDAG-Familie unterliegen der Regulation durch Calcium und DAG<sup>(208)</sup>, während C3G, wie Sos, über das Adapterprotein Crk an Rezeptortyrosinkinasen bindet<sup>(209)</sup>.

Andere Proteine, wie bsp. das RhoGEF Tiam1 oder RalGDS, besitzen eine RA-Domäne (s.u.), die spezifisch mit Rap/Ras interagieren und so an seinen Wirkungsort an der Membran transloziert werden<sup>(210-213)</sup>.

Rabex-5, als Beispiel für die Regulation eines RabGEFs, unterliegt der Aktivierung durch Rabaptin-5, einem Rab-Effektor<sup>(214)</sup>. Beide Proteine bilden einen dimeren Komplex, der eine höhere katalytische Aktivität auf Rab5 und Rab21 ausübt als Rabex-5 alleine. Rabaptin-5 bindet an eine C-terminal von der VPS9-Domäne gelegene Helix, die ohne Rabaptin-5 inhibitorisch auf die GEF-Aktivität wirkt<sup>(214)</sup>.

Zusammenfassend ergibt sich durch die vielfältigen Regulationsmöglichkeiten der GEFs die hohe Komplexität zwischen verschiedenen Signalwegen der Zelle.

### ***Mechanismen der GEF-Katalyse***

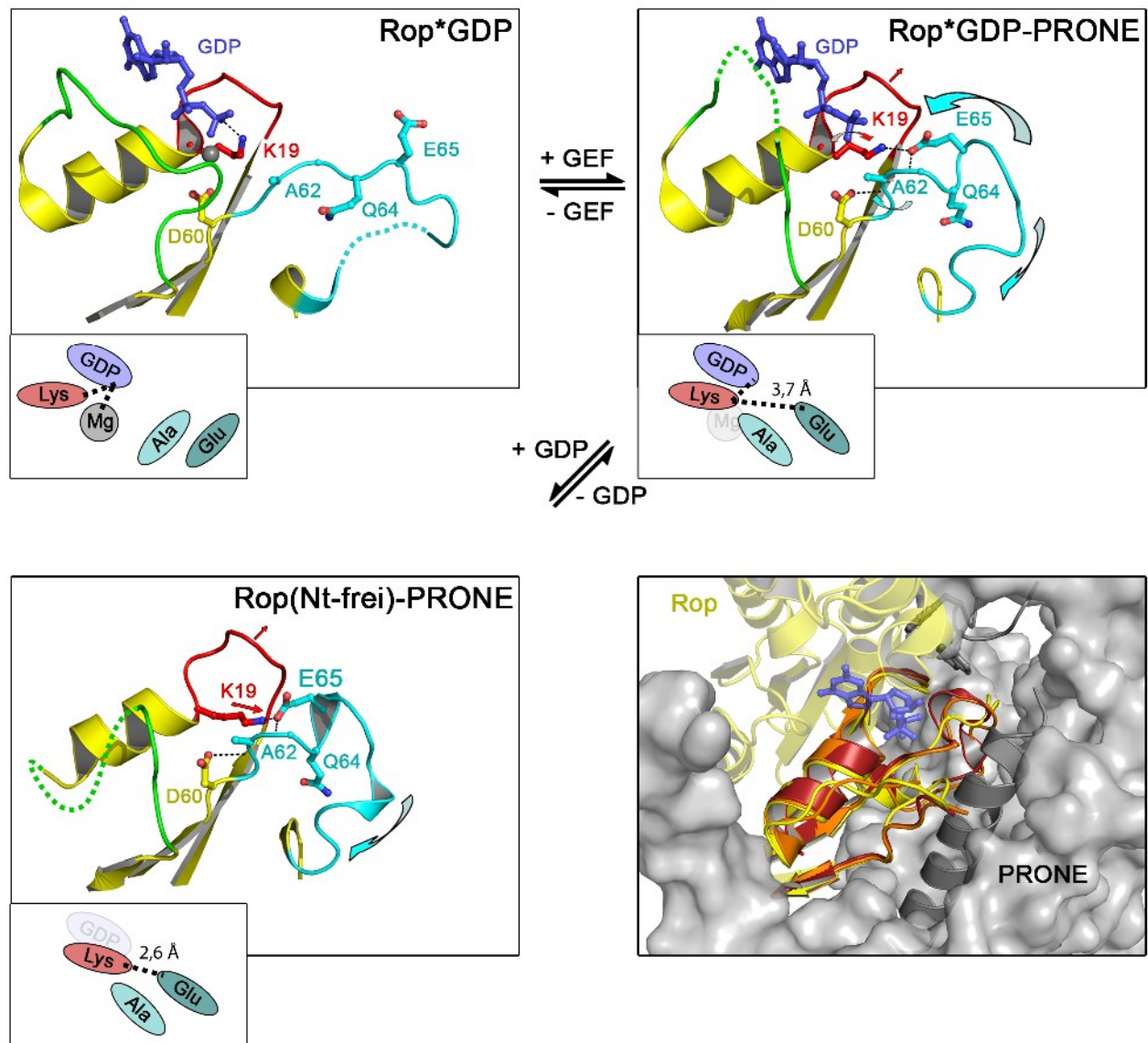
Der GEF-katalysierte Nukleotidaustausch eines G Proteins erfolgt über mehrere Schritte<sup>(17)</sup>. Beginnend mit dem dimeren G Protein\*Nukleotid Komplex entsteht zunächst ein trimerer Komplex mit dem Austauschfaktor. Im trimeren Komplex ist die Nukleotidaffinität deutlich verringert<sup>(215)</sup> und bildet dementsprechend ein Intermediat der GEF-Reaktion. Nach Freisetzung des Nukleotids liegt ein Dimer aus GEF und G Protein vor. Die anschließende Bindung eines Nukleotids kehrt die Reaktionsfolge wieder um. Da in der Zelle GTP im deutlichen Überschuss vorliegt, erfolgt so ein Austausch von GDP zu GTP<sup>(5;216)</sup>.

Eine Vielzahl von Komplexstrukturen aus GEF und G Protein, Ras-Sos<sup>(217)</sup>, Ran-RCC1<sup>(201)</sup>, Rac-Tiam1<sup>(218)</sup>, CDC42-Dbs<sup>(219)</sup>, Arf1-Sec7<sup>(88)</sup>, Rac-SopE<sup>(220)</sup>, Rab21-Rabex-5<sup>(214)</sup>, Rab8-MSS4<sup>(50)</sup>, Sec4-Sec2<sup>(221;222)</sup>, erlaubten eine mechanistische Untersuchung der Katalyse. Sie zeigten in der Regel den dimeren GEF-G Protein-Komplex nach der Nukleotidfreisetzung. Mehrere Strukturen, bsp. Ran-RCC1, weisen negativ geladene Ionen ( $\text{PO}_4^{3-}$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ ) in der Nukleotidbindungstasche auf, welche als repräsentativ für ein Intermediat der Reaktion angesehen wurden.

Die Strukturen zeigen, dass GEF-Proteine hauptsächlich im Bereich von *switch I*, *switch II* und des *P-loops* eine Verringerung der Nukleotidaffinität bewirken, während die Bereiche der Ribose und

## Einleitung

der Base, mit Ausnahme von Ran-RCC1<sup>(201)</sup>, nicht Ziel der GEF-Reaktion sind<sup>(17)</sup>. Dies gewährleistet eine ausreichend hohe Nukleotidaffinität und Assoziationsrate, um die Nukleotidbindung im dimeren GEF-G Protein-Komplex wieder zu ermöglichen<sup>(17)</sup>.



**Abbildung 9: Darstellung des GEF-Mechanismus anhand von Rop und PRONE**

Strukturelle Umlagerungen beim Übergang von Rop5\*GDP (pdb: 3bwd) über PRONE-Rop5\*GDP (pdb: 2nty) bis zu PRONE-Rop4(Nt-frei) (pdb: 2wbl). Dargestellt sind nur der Bereich von *P-loop*, *switch I* und *switch II*. Die letzte Abb. zeigt eine Überlagerung dieser drei Zustände (gelb → orange → rot) im Komplex mit PRONE.

Die kürzlich erfolgte Strukturaufklärung eines Nukleotid-gebundenen<sup>(66)</sup> und Nukleotid-freien Komplexes<sup>(215)</sup> von Rop mit dem GEF Prone erlaubt erstmalig eine detaillierte und, aufgrund der hohen Homologie der GEF-Reaktion, allgemeine Betrachtung der GEF-Katalyse (Abb. 9).

Demnach finden die stärksten Konformationsänderungen bereits im Nukleotid-gebundenen Zustand

statt (zumindest im Rop-PRONE-System<sup>(215)</sup>), wobei *switch I* vom Nukleotid entfernt und nach außen „geklappt“ wird. Dies erfolgt durch das Einbringen einer Helix des GEFs, die *switch I* jedoch nicht bindet und für dessen hohe Flexibilität im GEF-gebundenen Zustand verantwortlich ist<sup>(66;207)</sup>. *Switch II* vermittelt aufgrund der starken Interaktion mit den GEFs die Affinität zwischen GEF und G Protein, erfährt seinerseits jedoch ebenfalls eine deutliche Konformationsänderung. Hierbei wird das Alanin des Walker B Motivs an die Stelle des für die Nukleotidaffinität essenziellen Magnesiums repositioniert, welches dadurch verdrängt wird<sup>(17)</sup>. Ein konserviertes Glutamat hinter dem Walker B Motiv unterliegt in den meisten Strukturen einer Drehung um 180°, die eine Interaktion mit dem invarianten *P-loop*-Lysin ermöglicht. Im GDP-gebundenen Zustand des Rop-Prone Komplexes, ist diese Interaktion jedoch gering, mit einem Abstand von 3,7 Å (Abb. 9). Nach der Freisetzung des Nukleotids verringert sich der Abstand dieser beiden Reste auf 2.6 Å, während ansonsten nur noch geringe Konformationsänderungen auftreten<sup>(215)</sup>. Im Gegensatz zu anderen GEF-G Protein-Strukturen<sup>(221)</sup> bleibt im Falle von Rop und Prone der *P-loop* intakt und ändert nur geringfügig die Position (Abb. 9), wird jedoch vom essenziellen, invarianten WW-Motiv gebunden.

Arf-GEFs (Sec7-Domäne) und Rab-GEFs (Vps9-Domäne) zeigen einen vergleichbaren Mechanismus, jedoch wird der negativ geladene Rest für die Interaktion mit dem *P-loop* Lysin *in trans* vom GEF eingebracht<sup>(214;223)</sup>.

### 1.2.2 GTPase-aktivierende Proteine

Die biologische Inaktivierung von G Proteinen erfolgt durch die Hydrolyse von GTP zu GDP und  $\text{PO}_4^{3-}$ . Wie in Lösung, erfolgt die Reaktion durch einen nukleophilen Angriff mit Wasser, welches in der GAP-katalysierten Reaktion durch Aminosäure-Reste polarisiert wird, um die Nukleophilie zu erhöhen<sup>(17)</sup>. Dabei unterscheidet man theoretisch zwischen einem assoziativen und einem dissoziativen Übergangszustand, die sich in unterschiedlichen Bindungslängen von Nukleophil und Abgangsgruppe zum zentralen Phosphor-Atom und damit einer unterschiedlichen Nettoladung und Valenzzahl des Übergangszustands unterscheiden<sup>(224;225)</sup>. Die Art der Hydrolyse von G Proteinen wird kontrovers diskutiert, und es gibt Hinweise für die Existenz beider Übergangszustände<sup>(226)</sup>. Die GAP-katalysierte Reaktion unterscheidet sich wiederum durch die Bereitstellung katalytischer Reste<sup>(226-228)</sup>. Es ist deshalb anzunehmen, dass ein Kontinuum beider Übergangszustände existiert, da der Hydrolyse-Mechanismus der verschiedenen G Protein-GAP-Systeme sehr unterschiedlich ist<sup>(229-231)</sup>.

*Der GAP-katalysierte Hydrolyse-Mechanismus*

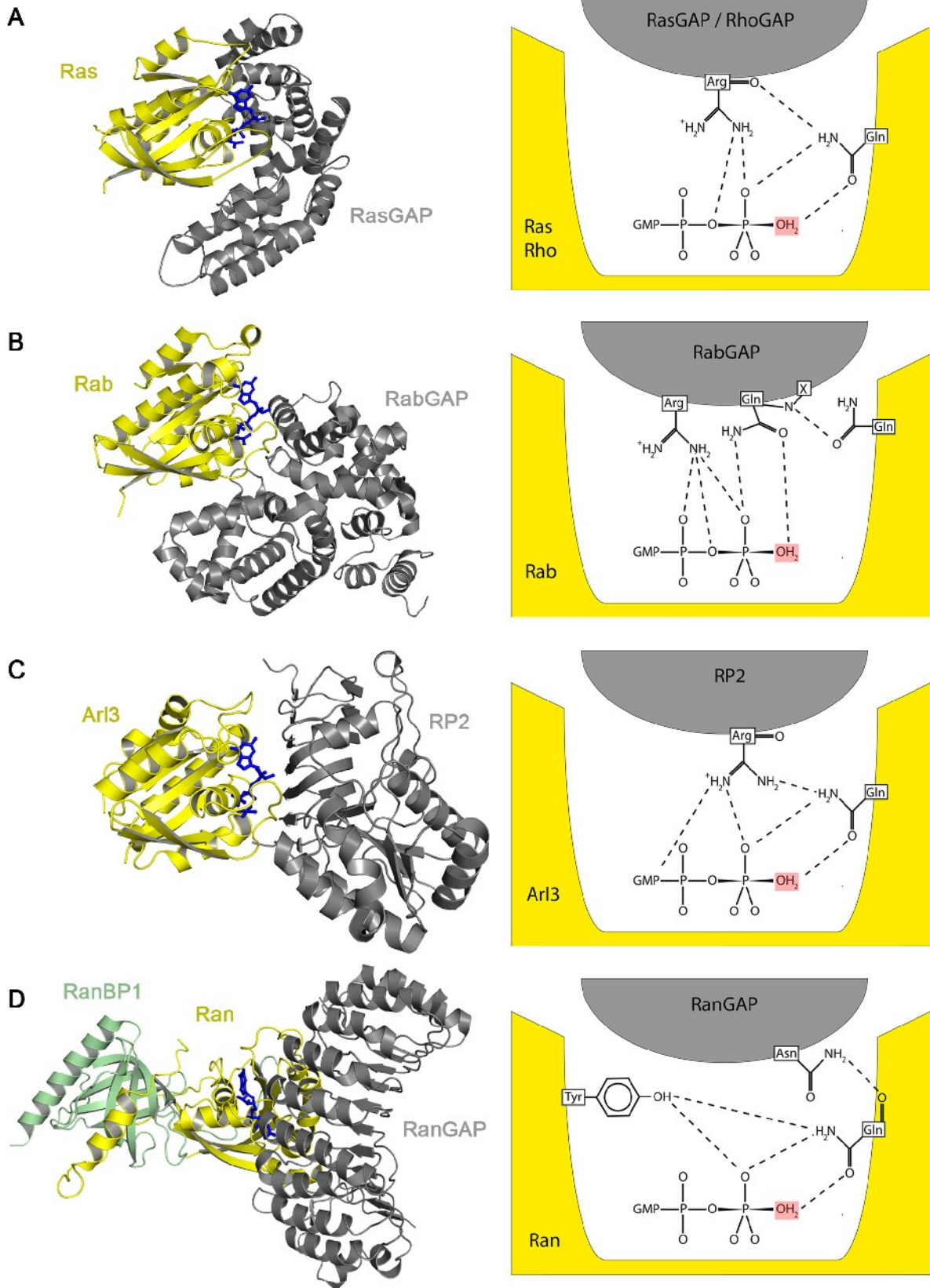
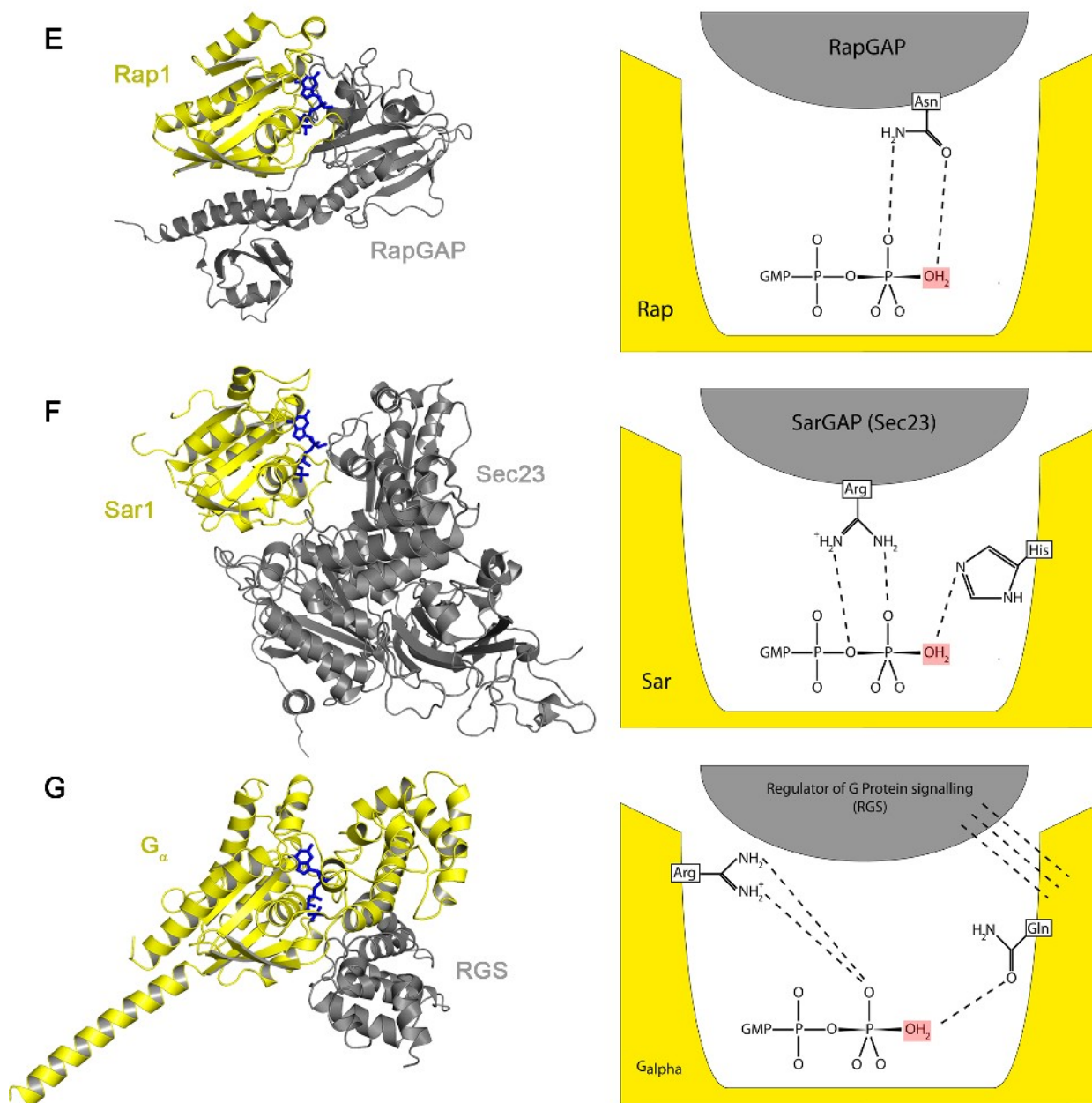


Abbildung 10, Teil 1





**Abbildung 10: Katalytische Mechanismen von verschiedenen GAPs**

Verschiedene GAP-GNBP-Systeme nutzen unterschiedliche Mechanismen zur Aktivierung der Hydrolyse. G Protein ist in gelb gezeigt, das GAP in grau. **A:** Ras-p120GAP (pdb: 1wq1), **B:** Rab33-Gyp1 (pdb: 2g77), **C:** Arl3-RP2 (pdb: 3bh7), **D:** Ran-RanGAP-RanBP1 (pdb: 1k5d), **E:** Rap-Rap1GAP (pdb: 3brw), **F:** Sar1-Sec23 (pdb: 1m2o). (Modifiziert nach S. Veltel, Dissertation)

Die Interaktion von G Proteinen mit GAPs vervollständigt das aktive Zentrum und erhöht die Hydrolyserate um mehrere Größenordnungen<sup>(5;17)</sup>.

Die strukturelle Aufklärung des GAP-Mechanismus begann mit der Entdeckung, dass heterotrimere G Proteine GDP und Aluminiumfluorid (AlF<sub>x</sub>) binden können. Dies repräsentiert den Übergangs-



zustand der Hydrolyse, da sich  $\text{AlF}_x$  an der Position des  $\gamma$ -Phosphats befand<sup>(232;233)</sup>. Die Verwendung von  $\text{GDP-AlF}_x$  als Imitator des Übergangszustands hat dazu beigetragen, den Hydrolysemechanismus verschiedener G-Proteine (Ras-ähnlich und GADs) und ATPasen aufzuklären<sup>(10;234)</sup>.

Der „klassische“ Aktivierungsmechanismus, durchgeführt von Ras- und Rho-GAPs<sup>(115;235)</sup>, beinhaltet die Stabilisierung des Übergangszustands durch Einbringen einer positiven Ladung (Arg-Finger) und die Fixierung des katalytischen Restes (Gln61 in Ras, Gln63 in Rho). Der Arginin-Finger positioniert sich an den  $\beta$ - und  $\gamma$ -Phosphaten und reduziert die stark negative Ladung des assoziativen Übergangszustands. Gleichzeitig wird Gln61 (Ras) durch die Interaktion mit dem Carbonylsauerstoff der Hauptkette des Arginins optimal positioniert, um den nukleophilen Angriff des Wassers zu ermöglichen (Abb. 10A).

Lange Zeit wurde davon ausgegangen, dass Rab und RabGAP einen ähnlichen Mechanismus nutzen. Die Struktur von Rab mit Gyp1 (TBC-Domänen GAP) zeigte, dass das Gln des G Proteins zur Seite „klappt“ und stattdessen ein Gln der GAP-Domäne die Koordination des angreifenden Wassers übernimmt<sup>(236)</sup>. Gleichzeitig wird auch ein Arg in das aktive Zentrum eingebracht mit gleicher Funktion wie bei den Ras- und RhoGAPs (Abb. 10B).

Die kürzlich gelungene Strukturlösung eines Arl-GAPs (RP2, welches zunächst als Effektor klassifiziert wurde) zeigt die Konservierung des Arginin-Finger-Mechanismus<sup>(237)</sup>, wodurch der Übergangszustand stabilisiert wird. Im Unterschied zu den Ras- und RhoGAPs trägt dieser Rest zur ungewöhnlich hohen Affinität zwischen GAP und G Protein bei<sup>(238)</sup>. Die Koordination des Glns durch Arg118 von RP2 verläuft über die Guanidinogruppe, die zusätzlich auch das  $\alpha$ -Phosphat koordiniert, und nicht über die Hauptkette (Abb. 10C).

Im RanGAP-System wird kein funktionelles Arginin eingesetzt<sup>(239)</sup>. Die katalytische Funktion des Proteins verläuft über die Stabilisierung des Gln von Ran durch ein Asn von RanGAP und durch ein Tyr von Ran; ein Prozess, der zusätzlich das Protein RanBP1 (*Ran binding protein*) benötigt, welches die Affinität zwischen Ran und RanGAP erhöht (Abb. 10D).

Auch Rap und RapGAP nutzen kein katalytisches Arginin<sup>(240)</sup>, sondern Asn290, das das in Rap fehlende Gln kompensiert und dessen korrekte Positionierung *in trans* für die hohe katalytische Aktivität ausreicht<sup>(241)</sup> (Abb. 10E).

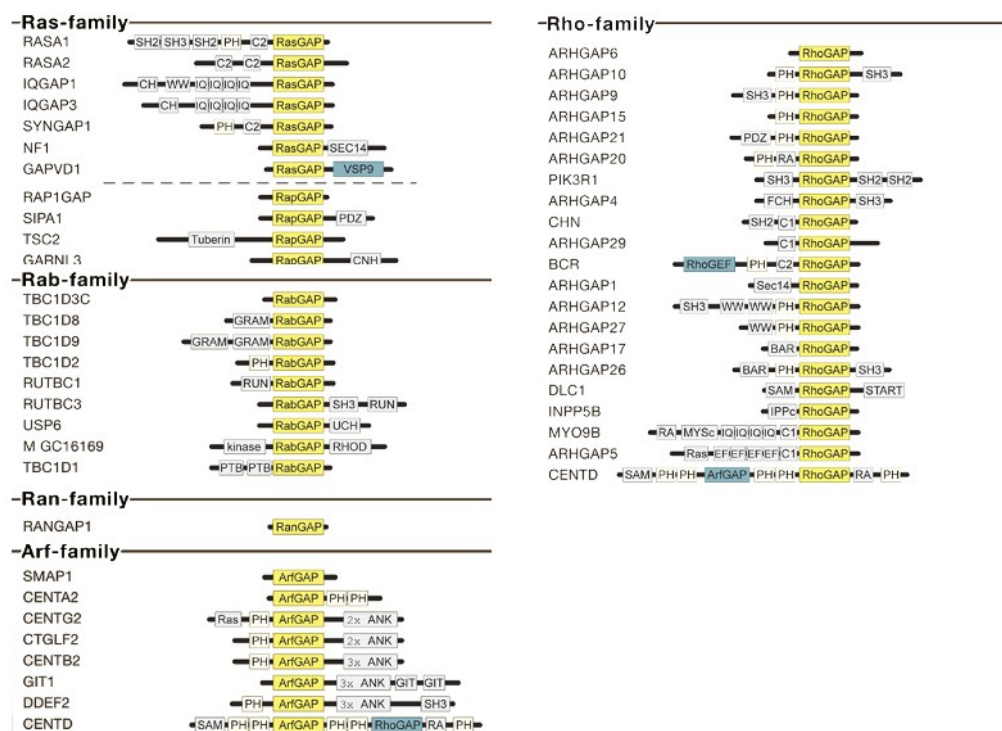
Sar1 besitzt kein katalytisches Gln, sondern nutzt ein Histidin<sup>(242)</sup>, dessen katalytische Funktion von einem Arg des Sar1GAPs (Sec23) unterstützt wird. Andere Vertreter der Arf-Familie besitzen sowohl das katalytische Gln, als auch deren ArfGAPs einen konservierten Arg-Rest, dessen Funktion als Arg-Finger jedoch kontrovers diskutiert wird<sup>(243;244)</sup> (Abb. 10F).

### Regulation von GAP-Proteinen

Ähnlich wie die GEF-Proteine unterliegen auch die GAPs einer starken Regulation, die größtenteils durch ihren modularen Aufbau vermittelt wird (Abb. 11). Hierbei konnten folgende Regulationsmechanismen identifiziert werden<sup>(17;245)</sup>:

- Protein-Protein-Interaktion
- Protein-Lipid-Interaktion
- Regulation durch Botenstoffe
- Posttranslationale Modifikation

p120RasGAP wurde als erstes GAP-Protein identifiziert<sup>(246)</sup>, mit einem stark modularen Aufbau aus mehreren SH2 und SH3-Domänen, deren Einfluss auf die GAP-Domäne jedoch noch ungeklärt ist<sup>(245)</sup>. Mehrere Proteine der RasGAP-Familie besitzen eine der GAP-Domäne benachbarte C2-Domäne, deren Regulation durch Ca<sup>2+</sup> im Falle von CAPRI und RASAL bereits nachgewiesen werden konnte<sup>(247;248)</sup>.



**Abbildung 11: Modularer Aufbau ausgewählter GAP-Proteine der Ras-Superfamilie**  
 Domänenstruktur einiger GEF-Proteine (aus Bos *et al.*<sup>(17)</sup>)

Die Regulation durch sekundäre Botenstoffe ist auch zentraler Bestandteil der ArfGAPs<sup>(79;249;250)</sup>. Diese besitzen in der Regel eine PH-Domäne in der Nähe der GAP-Domäne, die mit Phosphoinositolen interagiert und bei Anwesenheit von Vesikeln die GAP-Aktivität deutlich steigert. Zusätzlich

werden ArfGAPs von der Membranbeugung reguliert<sup>(251)</sup>, indem sie entweder über BAR-Domänen mit bestimmter Beugung an die Membran binden oder über hydrophobe Interkalation (ArfGAP1) mit Membranen deren Beugung bestimmen<sup>(252;253)</sup>.

Posttranslationale Modifikation von GAPs beinhaltet hauptsächlich die Phosphorylierung durch Kinasen, wie das Beispiel von TSC1/2, einem Rheb-GAP, zeigt, welches durch unterschiedliche Kinasen phosphoryliert und in seiner GAP-Aktivität reguliert wird<sup>(164;254)</sup>.

### Spezifität der GAP-Proteine

Ähnlich wie bei GEF-Proteinen ist die Spezifität der GAP-Proteine nicht eindeutig geklärt. NF1, p120GAP und GAP1(m) sind GAPs der klassischen Ras-Proteine einschließlich der R-Ras Familie<sup>(255;256)</sup>. R-Ras selbst besitzt ein spezifisches GAP, R-RasGAP, welches zusätzlich die GTPase von TC21 aber nicht von M-Ras stimuliert<sup>(256)</sup>. Aufgrund der unterschiedlichen GAP-Mechanismen von Rap, sind die GAPs dieser Familie eigenständig und spezifisch. Überraschenderweise zeigen die Proteine Rasal, GAIIP4BP und CAPRI duale GAP-Spezifität auf Ras/R-Ras und Rap, die in allen Fällen über den Arg-Finger ihrer RasGAP-ähnlichen Domänen vermittelt wird. Die mechanistische Ursache ist noch ungeklärt<sup>(257;258)</sup>. Der Einfluss der Ras- und RapGAPs auf weitere Mitglieder der Ras-Subfamilie ist noch nicht eingehender untersucht.

Name	Organism	Specificity	
		<i>In vitro</i>	<i>In vivo</i>
p50RhoGAP	<i>H. sapiens</i>	<b>Cdc42</b> , Rac1, RhoA	RhoA
BPGAP1	<i>H. sapiens</i>	<b>Cdc42</b> , RhoA	RhoA
Bcr	<i>H. sapiens</i>	Cdc42, <b>Rac1</b> , Rac2	Rac1
Abr	<i>H. sapiens</i>	Cdc42, Rac1, Rac2	ND
mCdkGAP	<i>M. musculus</i>	Cdc42, Rac1	Cdc42, Rac1
TCGAP	<i>M. musculus</i>	<b>Cdc42</b> , <b>Rac1</b> , RhoA	No activity
GRIT	<i>H. sapiens</i>	<b>Cdc42</b> , Rac1, <b>RhoA</b>	<b>Cdc42</b> , Rac1, <b>RhoA</b>
hCdkGAP	<i>H. sapiens</i>	Cdc42, Rac1	Cdc42, Rac1
cl-CdkGAPr	<i>D. melanogaster</i>	ND	ND
ARAP1	<i>H. sapiens</i>	Cdc42, Rac1, <b>RhoA</b>	RhoA
ARAP2	<i>H. sapiens</i>	ND	ND
ARAP3	<i>H. sapiens</i>	Cdc42, Rac1, <b>RhoA</b>	RhoA
ARAP3	<i>M. musculus</i>	RhoA	RhoA
Oligophrenin-1	<i>H. sapiens</i>	Cdc42, Rac1, RhoA	RhoA, Cdc42
Graf	<i>G. gallus</i>	Cdc42, RhoA	<b>RhoA</b>
Graf-2	<i>H. sapiens</i>	Cdc42, RhoA	ND
PSGAP	<i>M. musculus</i>	<b>RhoA</b> , Cdc42	RhoA, <b>Cdc42</b>
RARhoGAP	<i>R. norvegicus</i>	RhoA	RhoA
tGAP1	<i>R. norvegicus</i>	No activity	ND

**Abbildung 12: Substratspezifität der RhoGAP-Proteine**

entnommen aus Tcherkezian & Lamarche-Vane<sup>(259)</sup>. Für eine genauere Aufstellung siehe Anhang (S. 218)

Auch die RhoGAP Proteine zeigen eine breit gefächerte Aktivität, deren Spezifität nicht durch Primärsequenzmerkmale festgelegt werden kann<sup>(259;260)</sup>. Auch hier kann nur über die Aktivitäts-

bestimmung *in vivo* und *in vitro* eine genaue Aussage gegeben werden, insbesondere, da die Anzahl der GAP-Proteine etwa 2-3-fach höher ist als die Anzahl der Rho-Proteine. Eine Übersicht für die klassischen Rho-Proteine ist in Abb. 12 gegeben.

Die ArfGAP-Familie ist ebenfalls sehr unspezifisch und eine eindeutige Spezifitätsbestimmung wird durch die Regulationsmechanismen erschwert<sup>(252;253)</sup>. So zeigen sich bereits unterschiedliche Spezifitäten für ein einzelnes GAP, wenn die GAP-Domäne alleine, gemeinsam mit der PH-Domäne, in Anwesenheit von löslichen Lipiden und Vesikeln eingesetzt wird. Primär wird dies durch die sehr geringe Affinität zwischen Arf und GAPs vermittelt<sup>(253)</sup>(S. Ismail, *unveröffentlicht*).

### 1.3 Effektorproteine

Die biologische Aktivität der G Proteine wird über Effektormoleküle vermittelt, die im Fall der GAD-Proteine mit der Hydrolyse von GTP einhergeht, bei den Ras-ähnlichen G Proteinen jedoch vom GTPase-Schritt losgelöst ist.

#### 1.3.1 Allosterische Regulation: Effektoren der Rho-Familie

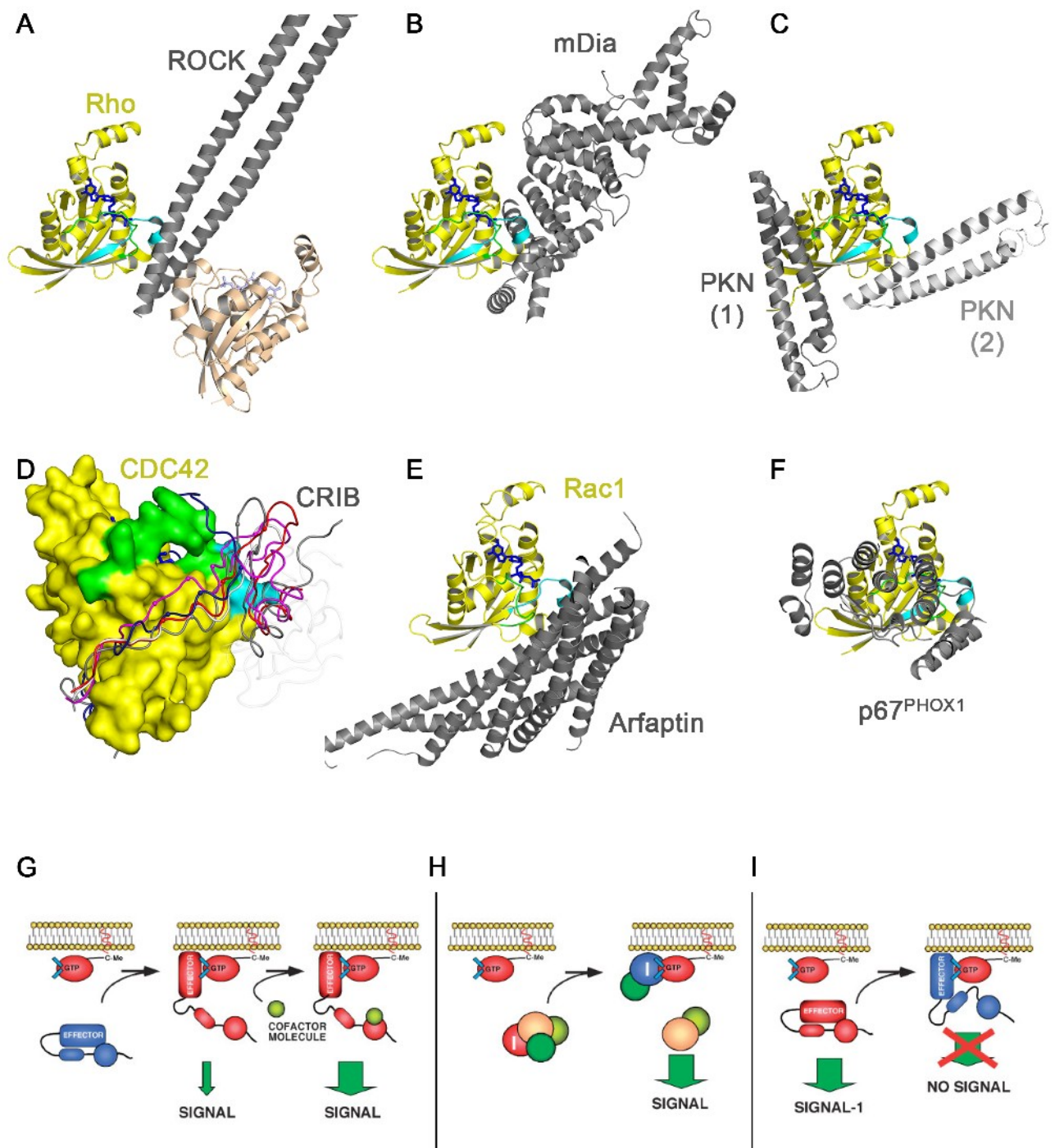
##### *Rho-Proteine*

Im Jahr 2000 waren etwa 30 Rho-Effektorproteine bekannt, die die biologische Funktion der Rho-Proteine vermitteln<sup>(261)</sup>. Inzwischen sind bereits über 70 Effektoren nur der klassischen Rho-Proteine Rho, Rac und CDC42 identifiziert, die zunehmend klassifiziert und charakterisiert werden<sup>(262)</sup>.

**Tabelle 2: Rho-Effektoren**

Effektorklasse	Strukturmerkmal	Beispiele	Rho-Protein	Ref.*
REM (Rho-Effektor, Klasse 1)	<i>Coiled-coil</i>	PKN Rhopilin	RhoA	(265) (266)
RKH (Rho-Effektor, Klasse 2)	<i>Coiled-coil</i>	ROCK Kinectin	RhoA	(267) (263)
Sonstige, Rho	-	Citron mDia	RhoA Rac/CDC42	(268)
CRIB-Effektoren	Unstrukturiert / Interprotein- β-Faltblatt	WASP, BORG, PAK, Ack, PI3K	Rac, CDC42	(269) (270) etc.
Sonstige, Rac1/CDC42	-	IQGAP S6-Kinase	Rac, CDC42	(271) (272)

\* nach Möglichkeit wurde die Veröffentlichung über die Komplex-Struktur zitiert



**Abbildung 13: G Protein-Effektor Interaktionen der Rho-Familie**

Interaktion von Rho-Protein (gelb) und Effektor (grau). Die Bindung erfolgt i.d.R. über *switch I* (grün) und *switch II* (cyan). **A:** RhoA-ROCK (pdb: 1s1c). **B:** RhoC-mDia (pdb: 1z2c). **C:** RhoA-PKN (pdb: 1cxz) mit dem symmetrie-verwandten Molekül von PKN in hellgrau. **D:** Interaktionen von CDC42 mit CRIB-Peptiden (pdb: 1cf4, 2odb, 1e0a, 1ees, 1nf3, 1cee) **E:** Rac1(GppNHp)-Arfaptin (pdb: 1i4t). **F:** Rac1-p67<sup>PHOX1</sup> (pdb: 1e96). **G,H,I:** Postulierte Regulationsmechanismen von Rho-Effektoren durch die Bindung der G Proteinen (aus Bustelo *et al.*<sup>(262)</sup>)

Zunächst wurde angenommen, dass einerseits Rho-Effektoren und andererseits Rac/CDC42-Effektoren existieren, was sich, bis auf wenige Ausnahmen<sup>(263;264)</sup>, auch weitgehend bestätigt hat<sup>(262)</sup>.

Diese klare Einteilung ist möglich, da sich die G Protein-bindenden Domänen der Effektoren strukturell unterscheiden (Tabelle 2).

Alle bisher aufgeklärten Strukturen von RhoA/B/C mit Effektoren zeigen, dass Rho über die *switch*-Regionen, insbesondere *switch II* an  $\alpha$ -helicale Strukturen bindet<sup>(262;273)</sup> (Abb. 13A-C). Beispiele hierfür sind die *coiled-coil*-ähnliche Struktur des RhoA-Effektors ROCK<sup>(267)</sup> und die helicale *Armadillo-Repeat*-Struktur der GBD (*G Protein binding domain*) des Rho-Effektors mDia<sup>(268)</sup>. Die Struktur von RhoA mit PKN zeigt eine Variation, nach der zwei Bindestellen für PKN bestimmt werden konnten<sup>(265)</sup>; eine nukleotid-unabhängige, nicht über die *switch*-Regionen vermittelte Interaktion und eine klassische Bindung, ähnlich der von ROCK. Die Autoren legen sich jedoch auf die nicht-nukleotidabhängige Interaktion fest<sup>(265)</sup>, während die Struktur von Rac1 mit PRK, einem zu PNK homologen Protein, exakt die zweite Konformation über die *switch*-Regionen zeigt<sup>(274)</sup>. Auch andere Strukturen von Rac1 mit Effektoren zeigen eine Interaktion über  $\alpha$ -Helices (Abb. 13E,F).

Die zweite große Klasse der Rho-Effektoren sind die CRIB-Motiv (*CDC42/Rac interactive binding*) enthaltenden Proteine<sup>(261)</sup>, die ausschließlich mit Rac und CDC42 in einer zu den Rho-Effektoren deutlich unterschiedlichen Art interagieren (Abb. 13D). Das CRIB-Motiv ist in Lösung unstrukturiert, während es zur Interaktion mit dem G Protein ein inter-Protein- $\beta$ -Faltblatt mit diesem ausbildet<sup>(269;270)</sup>(u.a.). Die Spezifität, abgesehen vom Unterschied zwischen CRIB- und  $\alpha$ -helicalem Effektor, wird durch geringe Aminosäure-Sequenzunterschiede der *switch*-Regionen und zusätzlich durch weitere Bindungsstellen an den G Proteinen, die sich deutlicher zwischen den Rho-Proteinen unterscheiden, vermittelt<sup>(261;273)</sup>.

Trotz der unterschiedlichen Tertiärstrukturen besitzen alle Rho-Effektoren die Gemeinsamkeit direkt durch Rho-Proteine reguliert zu werden, indem i.d.R. eine intra- oder intermolekulare (Auto-) Inhibition aufgelöst wird<sup>(261)</sup>.

Beispiele, Mechanismus 1, Autoinhibition (Abb. 13G):

- PAK (und andere Kinasen dieser Gruppe), liegt autoinhibiert als Dimer vor, dessen CRIB-Motiv das aktive Zentrum verdeckt<sup>(275;276)</sup> und durch Bindung von Rac1 gelöst wird, was die Autophosphorylierung und Aktivierung der Kinase ermöglicht<sup>(277)</sup>.
- WASP weist in der inaktiven Form eine Wechselwirkung zwischen CRIB-Motiv und der sog. VCA-Domäne auf<sup>(278)</sup>, die durch Interaktion von CDC42 und CRIB (über vorheriges „Einfangen“ über eine Polybasische Sequenz) freigesetzt wird und die Actin-Polymerisation über Interaktion mit dem ARP2/3-Komplex induziert<sup>(269;279;280)</sup>.

- Das Formin mDia zeigt eine Autoinhibition durch Interaktion des N-Terminus mit der C-terminalen DAD. Bindung von RhoA löst die Autoinhibition<sup>(268)</sup>, wobei das DAD-Fragment teilweise an die Rho-Bindestelle (GBD) und hauptsächlich an die Armadillo-Repeats von mDia<sup>(65;268)</sup> bindet.

Mechanismus 2, Inhibition durch weitere Proteine (Abb. 13H):

- WAVE-Proteine sind durch Interaktion mit PIR121, Nap125, HSPC300 inhibiert, die durch die Bindung eines Rho-Proteins unterbrochen wird<sup>(281)</sup>. Freies WAVE1 ist konstitutiv aktiv.

Mechanismus 3, Inaktivierung durch G Protein-Bindung (Abb. 13I):

- Borg-Proteine regulieren die Septin-Polymerisation<sup>(282)</sup> und werden durch die Bindung an CDC42 inaktiviert<sup>(283)</sup>.

### ***Rop, pflanzliche Rho-Proteine***

Die pflanzlichen Rho-Proteine, Rop, zeigen höchste Homologie zu den Rac-Proteinen. Interessanterweise besitzen einige der bisher bekannten Effektoren der Rops ebenfalls ein CRIB-Motiv, wodurch Rop-Effektoren grob in die CRIB-Motiv-enthaltenden Proteine und andere Rop-Effektoren eingeteilt werden können<sup>(75)</sup>, über die nur wenig bekannt ist<sup>(284;285)</sup>.

Die CRIB-Motiv-Effektoren unterscheiden sich von den tierischen Proteinen. Sie können in zwei Klassen, die RIC-Proteine und die RopGAPs, eingeteilt werden. Die RIC-Proteine sind kleine Proteine, die wahrscheinlich nur als Adapterproteine für weitere, noch nicht identifizierte Effektoren von Pflanzen eingesetzt werden<sup>(286-288)</sup>. Die zweite, ungewöhnliche Klasse aus sechs Proteinen, zeigt ein Tandem aus CRIB-Motiv und GAP-Domäne, die durch eine Prolin-reiche Sequenz voneinander getrennt sind<sup>(289;290)</sup>. Das CRIB-Motiv reguliert dabei die GAP-Aktivität direkt (A. Schaefer *unveröffentlicht*) und über die subzelluläre Lokalisation des Proteins<sup>(289;290)</sup>. Dabei ist unklar, ob CRIB-Motiv und GAP-Domäne im Zuge des *Crosstalks* verschiedener Signalwege unterschiedliche Rop-Proteine binden oder ob beide gemeinsam die GAP-Aktivität auf ein G Protein vermitteln. Sie ähneln damit sehr den hier untersuchten Arap-Proteinen, die ebenfalls eine Ras-Bindung (Ras ist in Pflanzen nicht vorhanden) und eine RhoGAP-Domäne aufweisen (siehe 1.4.3 )

### **1.3.2 Vesikel-Kodierung und Bildung von Ankerpunkten: Rab-Effektoren**

Rab Proteine regulieren den Vesikeltransport: Sie übernehmen Funktionen in der Vesikel-Verteilung (*targeting and sorting*), in der Vesikelbildung (*budding*) und in der Interaktion von Vesikeln und Zytoskelett<sup>(29;51)</sup>.



Die Größe der Rab-Familie mit bis zu 70 Mitgliedern lässt eine noch größere Anzahl an Effektor-Proteinen vermuten. Ganz im Gegensatz zu den Rho-Proteinen, bei denen ein einzelnes Protein mit einer Großzahl von Effektoren interagiert, verhält es sich bei den Rab-Proteinen anders. Es sind pro Rab-Protein wenige Effektoren bekannt, die entweder eine hohe Promiskuität aufweisen oder sehr spezifisch sind<sup>(51)</sup>.

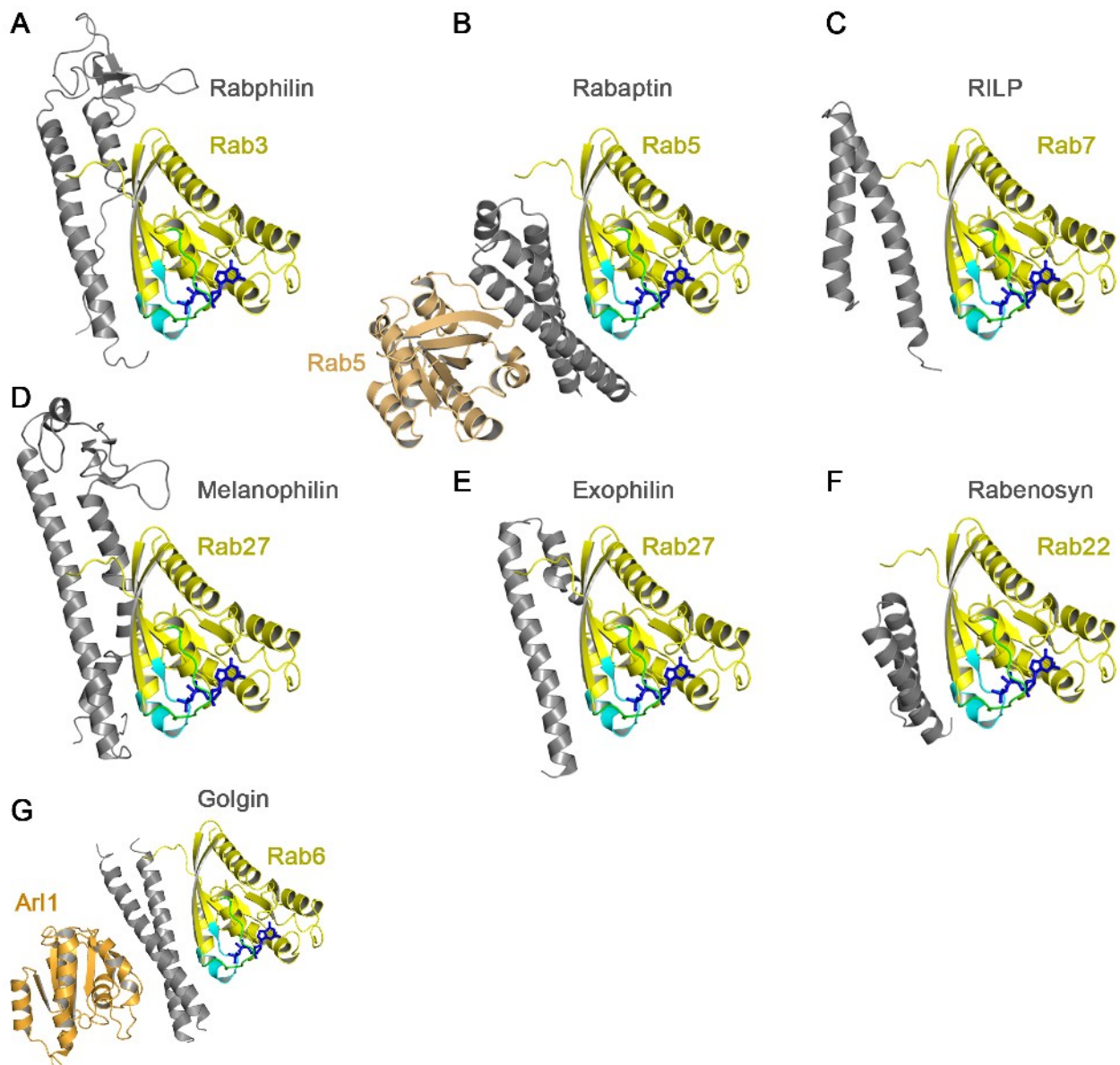
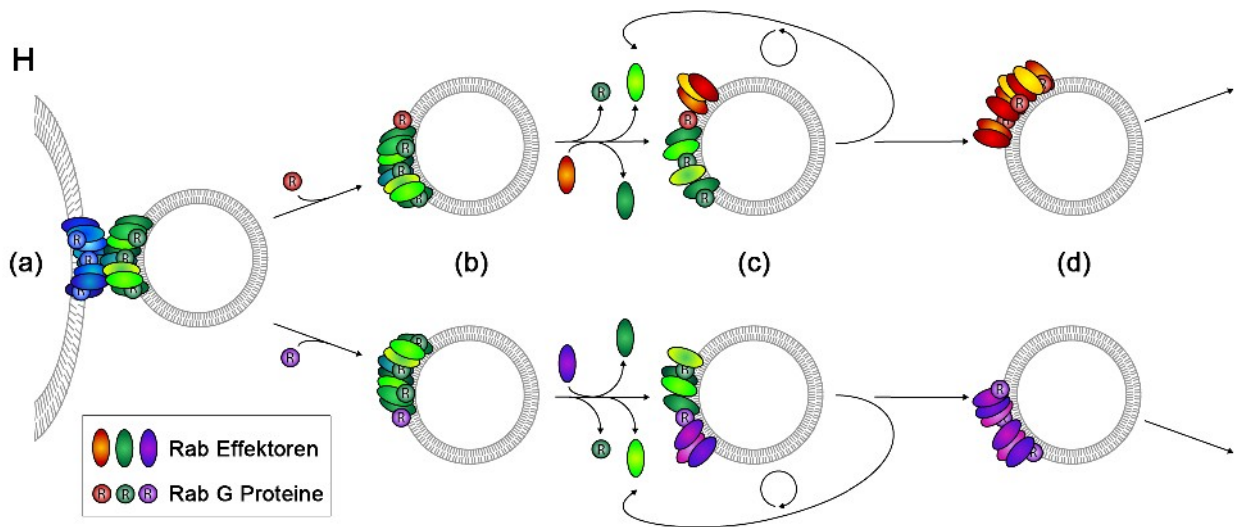


Abbildung 14 Teil 1





**Abbildung 14: Rab-Effektoren**

Rab (gelb) – Effektor (grau) Interaktionen. *Switch I* ist in grün, *switch II* in cyan gezeigt. **A:** Rab3-Rabphilin (pdb: 1zbd). **B:** Rab5-Rabaptin (pdb: 1tu3). **C:** Rab7-RILP (pdb: 1yhn). **D:** Rab27-Melanophilin (pdb: 2zet). **E:** Rab27-Exophilin (pdb: 3bc1). **F:** Rab22-Rabenosyn (pdb: 1z0j). **G:** Rab6-Golgin-Arl1 (pdb: 3bbp). **H:** Vereinfachte Darstellung der Funktion der Rab-Effektoren. (a) Interaktion von Rab-Domänen zweier verschiedener Kompartimente (*tethering*). (b) Dissoziation, Anlagerung anderer Rab-G Proteine. (c) positiver *Feedback*-Mechanismus, Austausch von Effektoren und Rab-G Proteinen. (d) Vesikel mit anderem Lokalisationssignal (*targeting*), aufgrund anderer Zusammensetzung der Rab-Domänen.

Dies lässt vermuten, dass die Interaktion von Rab-Proteinen mit ihren Effektoren eine andere Funktion erfüllt als die der Rho - Rho-Effektor-Bindung. In der Tat bilden die Rab-Effektoren größtenteils eine Gruppe von Struktur- und Gerüst (*scaffold*)-Proteinen, die durch die Interaktion mit Rab gezielt an Membranen bestimmter Kompartimente translozieren<sup>(291;292)</sup>; bzw. umgekehrt, nach der Membran-Bindung spezifische Rab-Proteine rekrutieren<sup>(293)</sup>. So bilden die Rab-Bindungsstellen zumeist helicale und *coiled-coil*-Domänen<sup>(294;295)</sup> (Abb. 14A-G), wie sie häufig in typischen Protein-Protein-Interaktionsmodulen von größeren Proteinen vorkommen. Über diese werden dann nicht nur Rab-Proteine gebunden, sondern ebenfalls weitere Strukturproteine<sup>(296)</sup>, Regulatoren von G Proteinen (GEFs/GAPs für Rab und andere Familien) und sonstige Proteine.

Die Interaktion von Rab-Proteinen mit ihren Effektoren verläuft über die *switch*-Regionen, einem Bereich mit sehr hoher Homologie zwischen verschiedenen Rab-Proteinen und zusätzlich häufig über den C-terminalen, hypervariablen Bereich<sup>(294;297)</sup>.

Damit zeigt sich die Funktion von Rab und seinen Effektoren: Die Bildung von flächigen Proteinmodulen an spezifischen Membranen, die zur Erkennung eines Vesikels o.ä. dienen und treffend als „Rab-Domänen“<sup>(29)</sup> bezeichnet wurden (Abb. 14H). Die Lokalisation der Rab-Domänen unterscheidet sich von den sog. *Lipid-Rafts*, in denen z.B. Ras-Proteine angereichert werden dadurch,

dass u.a. kein hoher Cholesterin-Gehalt festgestellt werden kann, so dass die Ursache für die Bildung der Rab-Domänen noch weitestgehend ungeklärt ist. Eventuell binden Effektorproteine an vorhandene Signal-Moleküle, z.B. PIPs<sup>(298)</sup>, und rekrutieren weitere Rab-Proteine; zumeist beschleunigt durch positive *Feedback*-Mechanismen<sup>(299;300)</sup>. Die Existenzdauer der Rab-Domänen wird dabei von der GTPase-Aktivität der beteiligten Rab-Proteine bestimmt<sup>(301)</sup>.

Dieser Assemblierungsmechanismus hat zur Folge, dass viele der Rab-Effektoren nicht spezifisch nur ein G Protein binden. Hierdurch ist es möglich, bsp. im Laufe der Wanderung eines Vesikels unterschiedliche Rab-Proteine zu rekrutieren, die die „Kodierung“ des Vesikels ändern (z.B.: Endosomen und Rab5, Rab4)<sup>(302)</sup>. Ziel der Ausbildung der Rab-Domänen ist die Interaktion mit Zielproteinen. So führt die Assoziation mit SNARE-Komplexen zu einer Rekrutierung dieser an den gewünschten Ort der Fusion<sup>(303;304)</sup>. Die Interaktion mit dem Zytoskelett wird bsp. über Rab6 und seinem Effektor Rabkinesin-6 vermittelt<sup>(305)</sup>. Die kürzlich gelöste Struktur eines Golgins (*coiled-coil*) zeigt die Interkonnektivität von Rab und Arl, da Arl1 nur dann mit hoher Affinität an das Golgin bindet, wenn Rab6 ebenfalls assoziiert ist<sup>(306)</sup>.

In stärkerem Maße als bei anderen G Protein-Effektor-Systemen ist die Bestimmung der Spezifität zwischen Effektor und Rab-G Protein notwendig<sup>(294)</sup>, um die Funktion der Rab-Proteine zu bestimmen. Insbesondere, da die Effektoren Migrationsbewegungen von einem Rab-Protein zum nächsten durchführen<sup>(294)</sup>, bzw. *vice versa*.

### 1.3.3 Arf-Effektoren: Bildung von Vesikeln

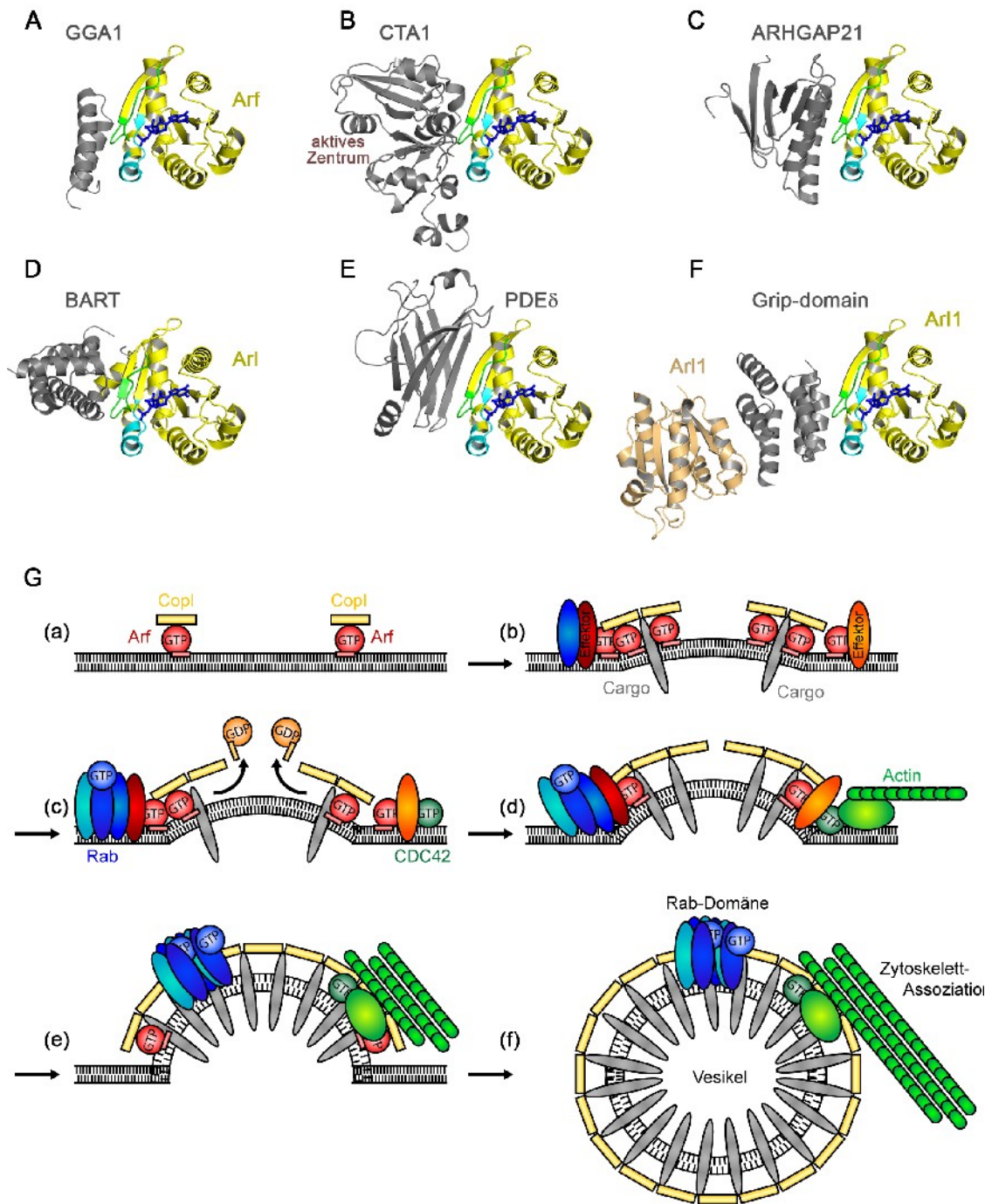
#### *Arf*

Arf-Proteine sind, wie die Rab-Proteine, an der Regulation des vesikulären Transports beteiligt. Die Tatsache, dass nur 6 Arf-Proteine und Sar1 existieren, weist jedoch auf eine von der großen Rab-Familie unterschiedliche Funktion hin. Arf-Proteine regulieren die Vesikel-Bildung, Vesikel-Anlagerung an andere Membranen und zum Teil die Zielerkennung.

Die Funktion und somit auch die Effektoren der Arf-Proteine sind strukturell heterogener als in der Rab-Familie (Abb. 15). Die am besten untersuchten Arf-Proteine sind Arf1 und Arf6, während die Arf-Proteine der Klasse II noch nicht ausreichend charakterisiert sind<sup>(79)</sup>.

Arf1 ist über die Bindung von COPI direkt an der Vesikelbildung beteiligt<sup>(79;307-309)</sup> und transloziert dieses an die Membran von Vesikeln, was die Bildung von Vesikeln induziert (Abb. 15G). Eine vergleichbare Funktion übernimmt Arf1 in der Bildung von *Clathrin coated vesicles* (CCVs), hier bilden die zwischengeschalteten Adapter-Proteine AP-1, AP-3 und AP-4 die Effektormoleküle von

Arf<sup>(310;311)</sup>.



**Abbildung 15: Effektoren der Arf- und Arl-Familie**

Strukturen der Arf- und Arl-G Proteine (gelb) mit ihren Effektoren (grau). **A:** Arf1-GGA1 (pdb: 1j2j). **B:** Arf6-CTA (pdb: 2a5d). **C:** Arf1-ARHGAP21 (pdb: 2j59). **D:** Arl2-BART (pdb: 2doe). **E:** Arl2-PDE $\delta$  (pdb: 1ksg). **F:** Arl1-Grip-Domäne (pdb: 1u1t). **G:** Exemplarische Funktionen von Arf-Proteinen: (a) Membran-Assoziation von Arf (hellrot) nach Aktivierung durch GEFs. Bindung von CopI (gelb). (b) Assoziation von Arf mit weiteren Effektoren (oval, dunkelrot) und Einlagerung von Cargo. (c) Membranbeugung-induzierte Hydrolyse von Arf-GTP durch ArfGAPs (nicht gezeigt). Zusätzlich Interaktion der Arf-Effektoren mit weiteren Proteinen (Rab-Domänen (blau), Rho-Proteine (grün)). (d) Actin-Polymerisation durch Wasp (hellgrün), welches durch membranständige Rho-Proteine aktiviert wird. (e) Zunehmende Wölbung bis zur finalen Abschnürung des Vesikels (e). (f) Finaler Zustand des Vesikels mit Rab-Domänen und Zytoskelett-Assoziation.

Neben diesen direkten Funktionen von Arf, werden weitere, mehr regulatorische Funktionen beschrieben. So bilden Phospholipase D und PI5-Kinase ebenfalls Effektormoleküle von Arf1, 5 und 6<sup>(312-314)</sup>, die durch die Interaktion mit Arf an den Entstehungsort von Vesikeln transferiert werden und dort die Membranzusammensetzung verändern. Dies geschieht durch einen positiven *Feedback*-Mechanismus, bei dem die Bindung von PLD an Arf die Bildung von PA induziert, welches anschließend die PI5-Kinase rekrutiert, die ebenfalls von Arf aktiviert wird. Die Folge ist ein starker Anstieg von PI(4,5)P<sub>2</sub><sup>(315)</sup>. Wie oben beschrieben binden hieran Rab-Effektoren, die dann Rab-Proteine rekrutieren, um dem Vesikel das „*sorting signal*“ zu geben.

Diese Regulation von G Proteinen anderer Klassen durch Arf-Proteine wird anhand vieler Beispiele deutlich<sup>(316)</sup>:

- Der Arf-Effektor GGA (Abb. 15A) interagiert mit dem Rab5-Effektor Rabaptin-5<sup>(317)</sup>, beides Struktur-Proteine mit hohem helicalen Anteil.
- Arfophilin bindet an die *switch*-Regionen und den N-Terminus von Arf6-GTP<sup>(318)</sup>; ein Strukturprotein, welches ebenfalls an Rab11 bindet<sup>(318;319)</sup> und über die Bindung des Exocyst-Komplexes die Exozytose reguliert<sup>(318;320)</sup>.
- Der nukleotid-unabhängig bindende Arf-Effektor Arfaptin2 ist ebenfalls ein Effektor von Rac1<sup>(321)</sup>.
- ARHGAP21, ein CDC42- und Rho-GAP, wird über die Arf-BD (PH-Domäne+Helix) von Arf1 gebunden (Abb. 15C) und an Membranen transloziert<sup>(322;323)</sup>.
- Ein weiterer Effektor von Arf1, Abp1, bindet Actin und induziert die CDC42-WASP-Arp2/3-Komplex vermittelte Actin-Polymerisation<sup>(79;324;325)</sup>.

Die einzig bekannte allosterische Regulation, die durch Arf-Proteine ausgeführt wird, ist die Interaktion des Cholera-Toxins 1 (CTA1), dessen aktives Zentrum durch die Interaktion mit Arf6-GTP geöffnet wird<sup>(326;327)</sup> (Abb. 15B).

Alle bisher beschriebenen Effektoren werden von Arf über die *switch*-Regionen gebunden<sup>(328)</sup>. Entsprechend seiner Rolle in der Rekrutierung von Strukturproteinen ist Arf ebenfalls in der Lage, Proteine (und nicht Nt-abhängige Effektoren) über den N-Terminus oder den C-Terminus zu binden, die wahrscheinlich eine rekrutierende Funktion übernehmen<sup>(329;330)</sup>.

### ***Arl***

Die Effektoren der strukturell den Arf-Proteinen zugeordnete, aber funktionell deutlich unterschiedliche Klasse der Arl-Proteine, sind bisher nur unvollständig untersucht und bekannt. Das den

Arf-Proteinen ähnliche Arl1 reguliert Transportprozesse an der Golgi-Membran<sup>(331)</sup> über eine Gruppe von Effektoren, die als GRIP-Domänen Proteine bezeichnet werden<sup>(332;333)</sup> (Abb. 15F) und große *coiled-coil*-Domänen bilden<sup>(333)</sup>.

Arl2 und Arl3 besitzen von den Arf- und Arl1-Proteinen strukturell unterschiedliche Effektoren, die eher klassischen Effektoren entsprechen:

- Arl2 und Arl3 binden an PDE $\delta$ <sup>(85;334;335)</sup>, das als Löslichkeitsfaktor prenylierter, membran-gebundener Proteine identifiziert wurde<sup>(336-338)</sup>. Die Struktur von PDE $\delta$  ist der der RhoGDIs sehr ähnlich<sup>(85)</sup> (Abb. 15E).
- HRG4, ein zu PDE $\delta$  homologes Protein wurde als Arl2/Arl3-Effektor identifiziert<sup>(333)</sup>, das einen ternären Komplex mit Arl und seinem GAP RP2 eingehen kann<sup>(335)</sup>.
- BART bindet an Arl2 und Arl3 mit hoher Affinität<sup>(333;335;339;340)</sup> (Abb. 15D), die im Komplex die Kernlokalisierung des Transkriptionsfaktors STAT3 regulieren<sup>(341)</sup>.

Effektorproteine weiterer Arl-Proteine sind unbekannt und eine Identifizierung wäre aufgrund der Funktionsvielfalt dieser G Protein-Familie außerordentlich interessant.

### 1.3.4 Ran-Effektoren: Proteine mit spezifischer Funktion

Ran, als einziges Mitglied seiner Familie, besitzt Effektoren, die in drei Familien bzw. Faltungstypen eingeteilt werden können.

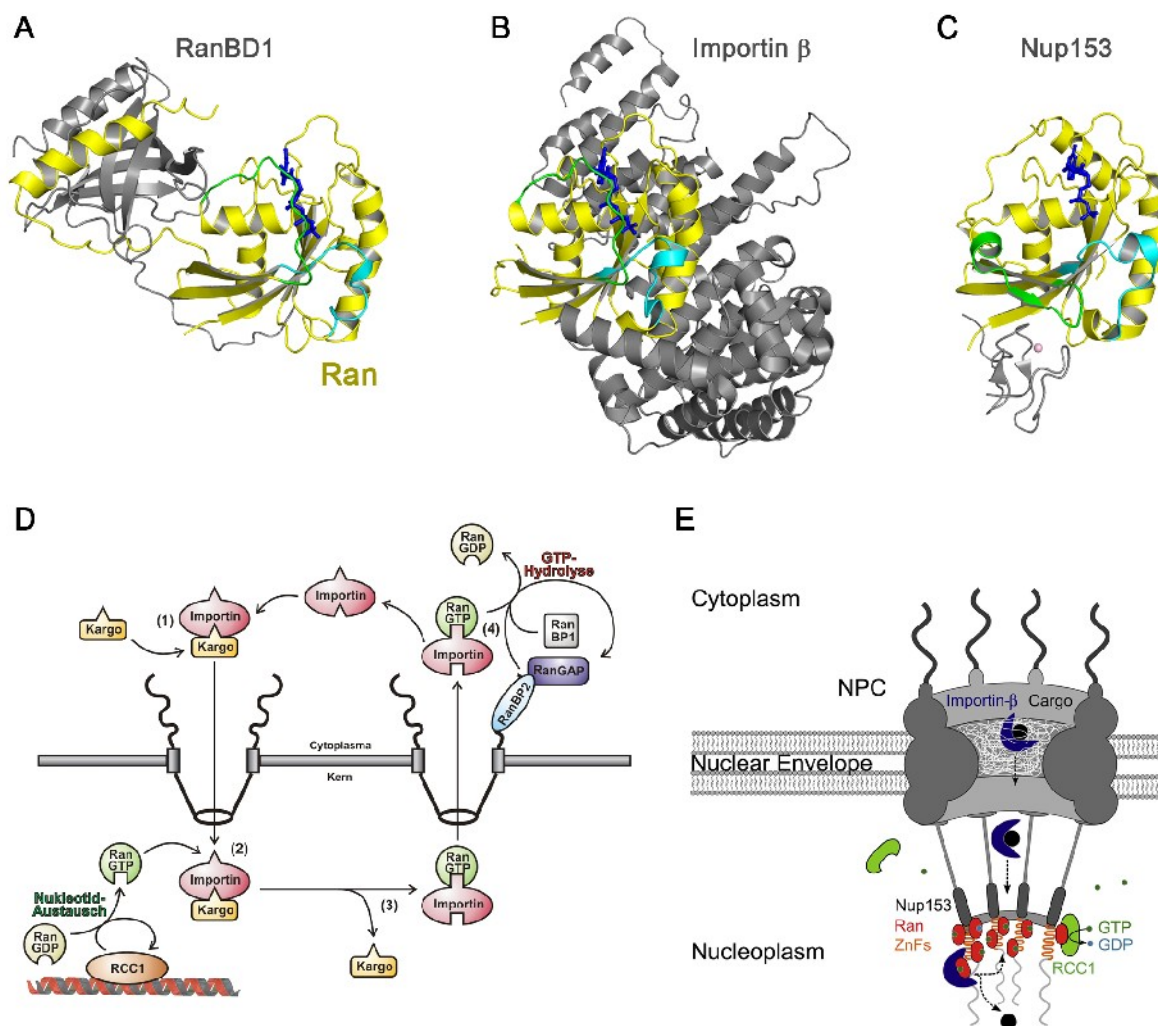
- Die RanBD besitzt eine PH-Domänen ähnliche Faltung und ist in RanBP1 (*Ran binding protein 1*) und RanBP2 zu finden<sup>(342)</sup>. Die Interaktion erfolgt über deren zentrales  $\beta$ -Faltblatt und über zusätzliche *loops* beider Proteine<sup>(343)</sup> (Abb. 16A).
- Die zweite „Effektor“-Art, ein Zink-Finger-Motiv, ist ebenfalls eine Domäne von RanBP2 und in weiteren Proteinen wie bsp. Nup153 zu finden<sup>(344)</sup> (Abb. 16C). Allerdings binden diese Effektoren nukleotidunabhängig an Ran, obwohl die Interaktion auch über *switch II* und den Ran-typischen *switch I* verläuft. *Switch I* verbleibt in der GDP-Konformation und nimmt nicht die Ras-typische Konformation wie in der RanBD1-Ran-GTP-Struktur ein<sup>(344)</sup>.
- Die dritte Effektorfamilie sind die Importin  $\beta$ -Proteine, die über *Armadillo-repeats* an Ran binden<sup>(345)</sup> (Abb. 16B).

Die Funktionen dieser Effektoren sind aufgrund der einzigartigen Funktion von Ran nicht mit denen der anderen G Protein-Familien zu vergleichen.

Die Proteine der Importin  $\beta$ -Familie sind sog. Transportrezeptoren, die den Transport von Cargo-Proteinen durch die Kernmembranen durch Komplexierung dieser Proteine ermöglichen<sup>(346;347)</sup> (Abb.

16D).

RanBP1 besitzt einen zweifachen Einfluss auf die Hydrolyse von Ran<sup>(239;348)</sup>. Einerseits ermöglicht die Verdrängung von Importin  $\beta$  die Bindung von RanGAP, andererseits bindet RanBP1 den C-Terminus von Ran, der mit der Bindung von RanGAP ebenfalls interferieren würde. Nup153 ist Bestandteil des Kernporenkomplexes und rekrutiert Ran an den *nuclear basket*<sup>(349)</sup> (Abb. 16E).



### Abbildung 16: Ran-Effektoren

Die drei Faltungstypen der Ran-Effektoren. G Protein in gelb, Effektor in grau. **A:** Ran-RanBD1 (pdb: 1rrp). *Switch I* (grün) in der GTP-, Ras-ähnlichen Form. **B:** Ran-Importin  $\beta$  (pdb: 1ibr). **C:** Ran-Nup153 (pdb: 3ch5). *Switch I* (grün) in der GDP-Form. **D:** Nukleärer Transport von Cargo-Proteinen über einen Ran-Gradienten. RanBP1 befindet sich löslich im Zytoplasma (aus: I. Berger, Promotion). **E:** Modell der Lokalisation von Nup153. Rekrutierung von Ran an den *nuclear basket* (aus Schrader *et al.* <sup>(344)</sup>).

Die Funktion von Ran in der Mitose, nach Auflösung der Kernmembran wird interessanterweise ebenfalls über die Importin  $\beta$ -Effektoren vermittelt und benötigt keine weiteren spezifischen Effektorproteine<sup>(350-352)</sup>. Die Existenz weiterer Effektorproteine, neben den drei bekannten Proteinen ist noch nicht gesichert.



## 1.4 Effektoren der Ras-Familie

### 1.4.1 Effektoren der Ras-Superfamilie

Die hohe Diversität der Ras-Superfamilie spiegelt sich auch in den Effektorproteinen wider. Die größte Klasse der Effektoren wird aus den *Ras-association* (RA) und *Ras-binding* (RB)-Domänen Proteinen (s.u.) mit mehr als 150 Proteinen gebildet (siehe 1.4.2 ).

#### *Effektoren ohne RA-/RB-Domäne*

Neben dieser Gruppe werden weitere Effektoren der Ras-Gruppe beschrieben, die keine identifizierbare RA- oder RB-Domäne aufweisen: *Impedes mitogenic signal propagation* (IMP, auch: *BRCA1-associated protein*, RNF52) ist ein Effektor der klassischen Ras-Proteine mit E3-Ubiquitin-Ligase-Aktivität (RING-Finger)<sup>(353)</sup>, welches Ras-ungebunden das MAPK-Scaffold-Protein KSR inaktiviert<sup>(354)</sup>. Die Bindung von Ras an das Zn-Finger Motiv von IMP verhindert dessen inhibitorische Funktion<sup>(353)</sup>.

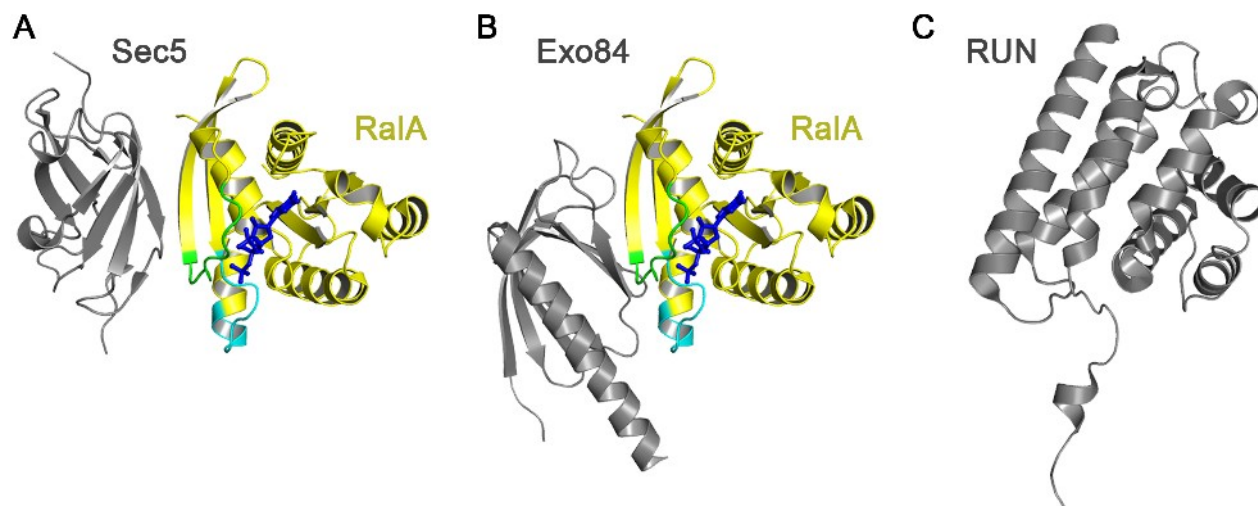
Shoc2 wurde als H-/K-/N-Ras- und M-Ras Effektor beschrieben (siehe 1.4.3 ), der ähnlich zur Ras-IMP-Interaktion eine aktivierende Funktion auf den MAPK-Weg ausübt<sup>(135;355;356)</sup>. R-Ras interagiert mit RalBP1, einem Effektor von Ral (s.u.).

Auch den Rap1-Proteinen werden RA- und RB-Domänen Effektoren zugeordnet, von denen einige auch über weitere Domänen, wie z.B. die PH-Domäne von Vav2 oder TIAM, an Rap1 binden<sup>(140)</sup>.

Dem zu Rap1 stark homologen G Protein Rap2 wurden zunächst gleiche Funktionen zugesprochen wie Rap1<sup>(357;358)</sup>. In den letzten Jahren wurde jedoch deutlich, dass beide Proteine, neben ihrer unterschiedlichen Lokalisation, unterschiedliche Funktionen ausüben<sup>(124;359;360)</sup>. Dementsprechend werden zunehmend Rap2 Effektoren identifiziert, die eine andere Struktur als die RAD-/RBD-Proteine besitzen. *Rap2 interacting protein 8* (RPIP8)<sup>(361)</sup>, RPIP9<sup>(362)</sup> und RPIPx<sup>(363)</sup> sind Rap2 Effektoren, deren RUN-Domäne mit dem G Protein interagiert, deren Funktion jedoch noch weitestgehend ungeklärt ist<sup>(364)</sup> (Abb. 17C). Neben diesen Proteinen sind TNIK<sup>(365)</sup>, MINK<sup>(359)</sup> und MAP4K4<sup>(366)</sup> als Effektoren von Rap2 identifiziert worden, die als MAP4Ks die c-Jun N-terminale Kinase (JNK) aktivieren und somit eine Rolle in einer MAPK-Kaskade übernehmen.

RalA und RalB interagieren nukleotidunabhängig über den N-Terminus mit PLD<sup>(367)</sup>, die außerdem durch Arf Proteine aktiviert werden kann. „Echte“, nukleotidabhängige Effektoren von Ral sind die Exocyst-Proteine Sec5 und Exo84<sup>(368)</sup> (Abb. 17), die nach Bindung an RalA den Exocyst-Komplex assemblieren<sup>(152;369)</sup>. Das Ral-bindende Protein RalBP1<sup>(370)</sup> (auch: RLIP76), vermittelt eine Vielzahl

der Ral-Effekte, bsp. die CDC42/Rac1-Inaktivierung durch die GAP-Domäne von RalBP1<sup>(371)</sup>, Regulation der Mitose über Interaktion mit Cyclin B<sup>(372)</sup> oder auch den ATP-abhängigen Transport von Chemikalien<sup>(373;374)</sup>.



**Abbildung 17: Effektoren der Ras-G Proteinen**

Bekannte Komplexstrukturen von Ras-Proteinen (gelb) mit ihren Effektoren (grau). **A:** RalA-Sec5-Komplex (pdb: 1uad). Die Interaktion verläuft über ein trans- $\beta$ -Faltblatt, sehr ähnlich zu den RA-/RB-Domänen-Effektoren. **B:** Die Interaktion von RalA und Exo84 verläuft ebenfalls über die Effektorregion und das  $\beta$ -Faltblatt (pdb: 1zc4). **C:** Struktur der Run-Domäne des Rap2-Effektors RPIPx (pdb: 2dwk).

Die Effektoren der weiteren Mitglieder der Ras-Unterfamilie sind nicht eindeutig bestimmt. Rheb Effektoren werden momentan stark diskutiert, so dass deren Funktion in der Aktivierung von mTor bisher nicht eindeutig aufgeklärt ist<sup>(375-378)</sup>. Effektoren für RasD1/2, neben ihrer Funktion als Austauschfaktoren für  $G_{\alpha}$ -Proteine sind nicht bekannt. Gleiches gilt für die Di-Ras Proteine. Rit-Proteine interagieren mit der RA-Domäne von RalGDS<sup>(379)</sup>. Sie zeigen transformierende Aktivität, die ein ähnliches Effektor-Spektrum wie bei den klassischen Ras-Proteinen vermuten lässt<sup>(174)</sup>. Zusätzlich wurde die Interaktion von Rit mit der PDZ-Domäne des CRIB-Proteins Par6 beschrieben<sup>(175)</sup>.

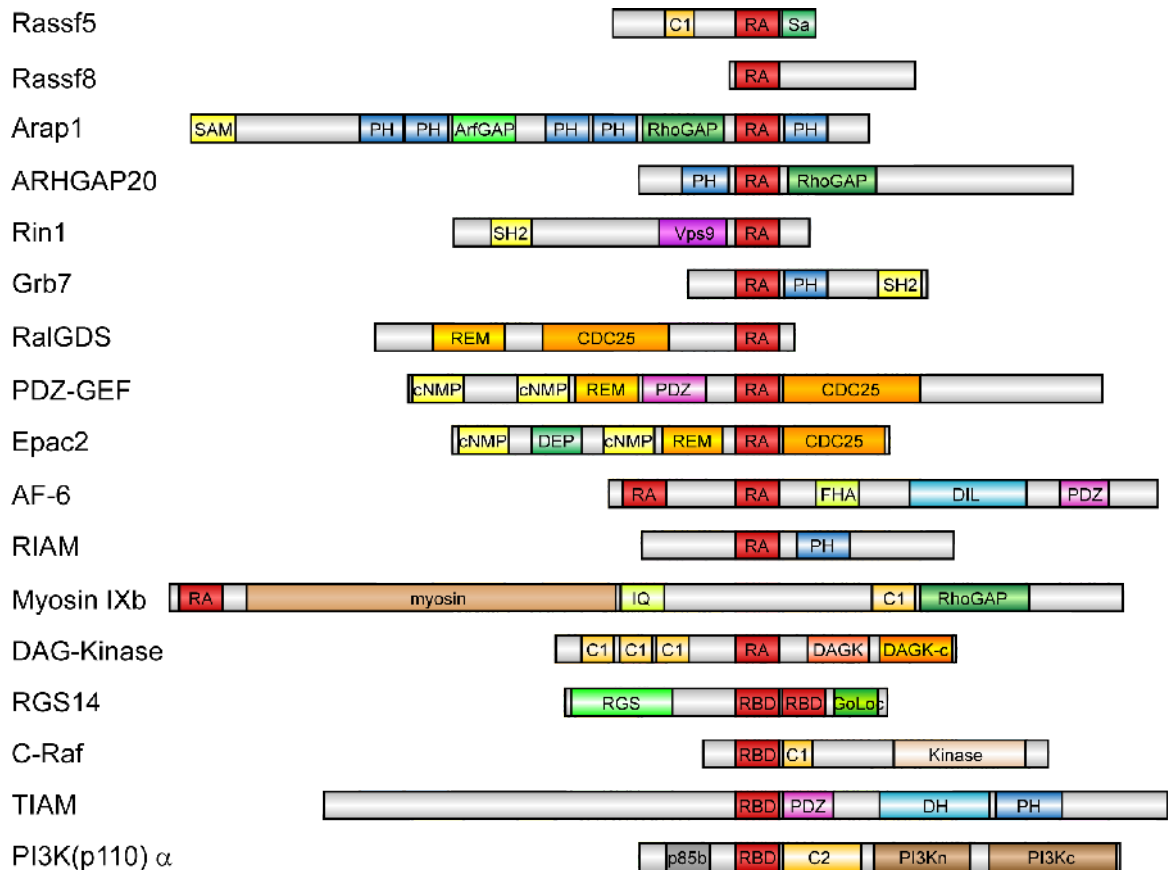
#### 1.4.2 Effektoren mit RA-/RB-Domäne: Rekrutierung von G Proteinen

Die wichtigste Effektorfamilie der Ras-Proteine sind RA- und RB-Domänen-Proteine, deren Sequenz gering, deren Struktur jedoch hoch konserviert der Ubiquitin-Faltung entspricht<sup>(380;381)</sup> (Abb. 18). Die Unterscheidung zwischen RA- und RB-Domäne erfolgte zunächst aufgrund geringfügig unterschiedlicher Sequenzmerkmale<sup>(382)</sup>.

RA-Domänen sind mit einer Größe von etwa 10 kDa sehr kleine Domänen, die bis auf wenige Ausnahmen stets im Verbund eines Multidomänen-Proteins vorhanden sind, wodurch ein hohes



Maß an Interaktion (*Crosstalk*) verschiedener Signalwege aller G Protein Familien ermöglicht wird. Typische Effektoren mit RB-Domäne sind die Raf-Kinasen<sup>(380;383)</sup> (Abb. 19A). Sie bilden den Anfangspunkt des MAP-Kinase Wegs, der zunächst als die einzige *downstream*-Signalkaskade der Ras-Proteine angesehen wurde<sup>(384)</sup>. Hierbei wird Raf von aktivem Ras an die Plasmamembran rekrutiert und phosphoryliert dort die MAP-Kinasen (MEK)<sup>(385;386)</sup>, was letztendlich zur Transkriptionsregulation und Zellproliferation und -Differenziation führt.



**Abbildung 18: Proteine mit RA-/RB-Domäne**

Quelle: *Smart*-Datenbank. Eine ausführlichere Auflistung findet sich im Anhang (S. 219)

Die Interaktion der RA-/RB-Domänen mit G Proteinen der Ras-Familie ist stets ähnlich. Über das  $\beta$ -Faltblatt der Ubiquitin-Faltung wird ein Inter-Protein- $\beta$ -Faltblatt ausgebildet<sup>(380;387;388)</sup>. Dabei treten Interaktionen zwischen  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  und  $\alpha_1$  der RA-/RB-Domänen zu den *switch*-Regionen der G Proteine auf, die hauptsächlich polaren Charakter haben (Abb. 19). Ein Vergleich der Komplexstrukturen von RalGDS und Raf (RBD) zeigt die hohe Variabilität der Interaktion trotz gleich bleibender Grundeigenschaften: Das Faltblatt der RA-Domäne von RalGDS ist im Vergleich zur RB-Domäne von Raf um „einige Register“ entlang des Faltblatts von Ras verschoben, was einerseits die Interaktionsfläche der Proteine ändert und andererseits eine Rotation von RalGDS im

Vergleich zu Raf hervorruft<sup>(387;389)</sup>. Ähnliche Unterschiede lassen sich in allen bisher gelösten RAD-/RBD-G Protein Komplexstrukturen feststellen, die deutlich zur Effektor-Spezifität beitragen und eine Vorhersage erschweren.

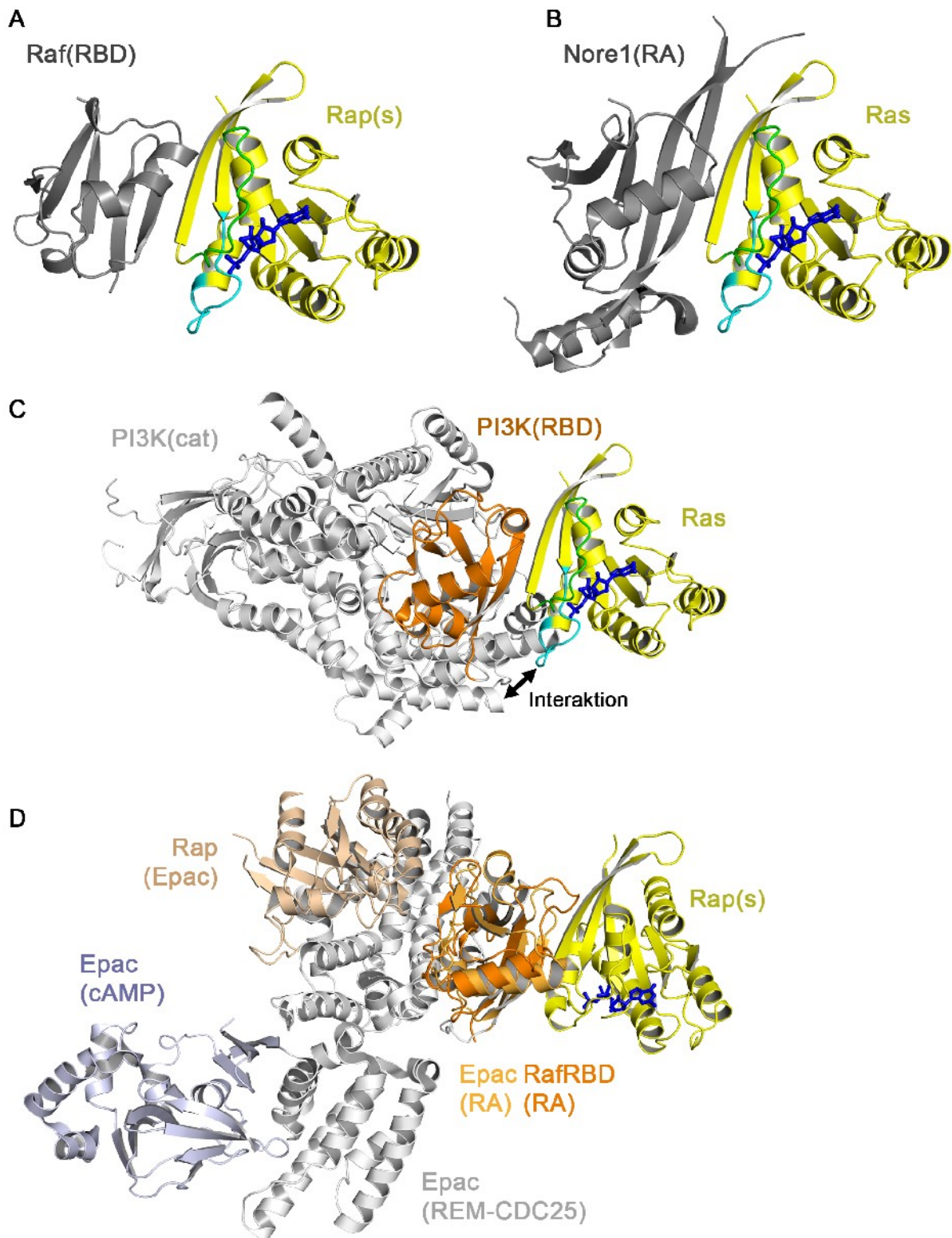
### ***Effektorspezifität***

RA-/RB-Domänen zeigen *in vitro* unterschiedliche Bindungsaffinitäten zu verschiedenen G Proteinen, trotz der hohen Homologie in der Effektorregion. So besitzt Raf(RBD) eine 67-fach höhere Affinität zu Ras-GTP als zu Rap-GTP<sup>(390)</sup>, während RalGDS beispielsweise 100-fach stärker an Rap bindet als an Ras<sup>(391)</sup>. Vermittelt werden diese Affinitätsunterschiede durch zwei Reste in *switch I*, die nicht zwischen Ras und Rap konserviert sind (Ras: E30/K31, Rap: D30/E31)<sup>(392)</sup>. Eine Ladungsumkehr in einem dieser Proteine zum jeweils anderen (sog. Raps) führt zu einer Umkehrung, bzw. Angleichung der Bindungsaffinität zu den RBDs<sup>(392)</sup>. Nur für wenige G Proteine der Ras-Familie sind genaue Analysen zur Bindungsaffinität vorhanden. Rheb bsp. zeigt keine Bindung an Raf(RBD) oder an die RA-Domäne von RalGDS, während dies für M-Ras wiederum bestätigt wurde. Die tatsächliche *in vivo* Spezifität bleibt fraglich<sup>(393)</sup>.

Ein hoher Einsatz verschiedener Methoden steigert zunehmend die Verwirrung um die Identifikation tatsächlicher Interaktionen<sup>(212;390;393-398)</sup>.

Die Gruppe von L. Serrano untersucht die Interaktionen von Proteinen der Ubiquitin-Faltung mit G Proteinen der Ras-Familie über *in silico* Methoden<sup>(399-402)</sup>, um letztendlich eine Vorhersage der Spezifität ermöglichen zu können. Die auf strukturellen Informationen basierende Methode konnte in der Tat erfolgreich die Interaktion von RA-/RB-Domänen mit Ras-Proteinen vorhersagen<sup>(381)</sup>. Allerdings wird dieser Ansatz durch unterschiedliche strukturelle Arrangements verschiedener RA-/RB-Domänen mit Ras-Proteinen erschwert<sup>(389;401)</sup>.

Ein weitergehender Ansatz ist die Untersuchung mittels biophysikalischer Untersuchungen oder *Pulldown*-Experimenten *in vitro*<sup>(390;391;403-405)</sup>. Die hierbei erhaltenen Dissoziationskonstanten (s.o.) liegen jedoch im Bereich typischer Protein-Protein-Interaktionen, insbesondere da die beteiligten Proteine *in vivo* membrangebunden vorliegen, so dass auch hier keine eindeutige Aussage zur „Wahrheit“ der Effektor-G Protein-Interaktion erhalten werden kann. RGS12 beispielsweise wird als Effektor für H-Ras beschrieben<sup>(406)</sup>; RGS14 zunächst als Effektor von Rap1 und Rap2<sup>(407)</sup>, dann zusätzlich von H-Ras<sup>(391)</sup>, während Willard *et al.* eine eindeutige H-Ras-Spezifität feststellen<sup>(408)</sup>.



**Abbildung 19: RAD-/RBD-Effektoren**

**A:** Komplexstruktur aus Raf(RBD) und Raps als Beispiel für alle RA-/RB-Domänen Effektoren (pdb: 1gua). **B:** Struktur der untypischen RA-Domäne von Nore1 im Komplex mit Ras. **C:** erste bekannte Struktur einer RA-Domäne (orange) im Verbund des Gesamtproteins (grau): PI3K im Komplex mit Ras (gelb). Die Interaktion von *switch II* mit der katalytischen Domäne ist angedeutet (pdb: 1he8). **D:** Überlagerung der RA-Domänen (hellorange) des Rap(cyan)-Epac(grau)-Komplexes mit RafRBD (orange) im Komplex mit Raps (gelb) (pdbs: 3cf6, 1lfd).

Letztendlich bleibt nur die *in vivo* Untersuchung der Interaktion von Effektorproteinen (in Volllänge) mit allen G Proteinen, um einen ausreichenden Überblick über die Effektorspezifität der Ras-Familie zu ermöglichen. Auch diese Experimente sind nicht eindeutig, was an der Kontroverse über die Rap-Interaktion mit Raf-Kinasen deutlich wird. So wurde zunächst ein inhibitorischer Effekt von Rap1 auf die Aktivität von Raf *in vivo* beschrieben<sup>(409;410)</sup>, was jedoch nie als direkte Interaktion etabliert werden konnte<sup>(140)</sup>. Spätere Publikationen zeigten eine Aktivierung von Raf durch Rap<sup>(411)</sup>. Diese Unterschiede resultieren möglicherweise aus der Verwendung unterschiedlicher Zelltypen und der Expression verschiedener Raf-Isoformen<sup>(412)</sup>. H-/K-/N-Ras wirkt ausschließlich aktivierend auf alle Raf-Isoformen<sup>(413)</sup>. In einer neueren Studie wird die EGF-vermittelte Aktivierung von Raf-1 über Ras und eine NGF-induzierte Aktivierung von B-Raf durch Rap postuliert<sup>(414;415)</sup>. *In vitro* binden alle Raf-Kinasen mit analogen Affinitäten an Ras G-Proteine. In einer weiteren Studie wird die Aktivierung von Raf-Kinasen durch Rap ausgeschlossen<sup>(413)</sup>.

Kolokalisationsstudien von Ras-G Proteinen und deren Effektoren<sup>(104;416;417)</sup> vermögen nur eine Assoziation mit Membranen in gleichen Bereichen zu zeigen, die keine direkte Aussage über die tatsächliche Interaktion geben. Zusätzlich wird dies durch die hohe Dynamik der subzellulären Lokalisation von G Proteinen erschwert<sup>(106)</sup>. Entsprechende Methoden, die die direkte Interaktion *in vivo* zeigen, werden zur Zeit entwickelt und durchgeführt (Promotion A. Chandra).

Für einige RAD-/RBD-Proteine sind noch keine interagierenden G Proteine identifiziert. Hierzu gehören bsp. die Grb10 und Grb14 (Grb7 bindet an N-/H-/K-Ras und M-Ras<sup>(413)</sup>) oder Arap1 (siehe unten).

Entsprechend ihrer universellen Struktur könnten G Proteine theoretisch mit jeder RA-/RB-Domäne interagieren, abhängig von der Sequenz der Proteine. So zeigt z.B. die RA-Domäne von FHOD1 Bindung an Rac1 und nicht an Ras-Proteine<sup>(418)</sup>. Die eindeutige Bestimmung der Effektorspezifität bleibt demnach schwierig.

### ***Rekrutierung vs. allosterische Regulation***

Die Funktion von Effektorproteinen äußert sich entweder in der Rekrutierung des Effektors an die Stelle der benötigten Funktion (vgl. Rab-Effektoren) oder in der allosterischen Aktivierung des Effektors durch das G Protein (vgl. Rho-Effektoren).

RA-/RB-Domänen Effektoren zeigen diesbezüglich keine eindeutigen Eigenschaften. Für die RBD der Raf-Kinasen wurde bisher eher eine rekrutierende Funktion postuliert<sup>(419;420)</sup>. Andere Studien postulieren eine direkte Aktivierung von B-Raf durch Rap1 aber nicht durch Ras *in vitro*<sup>(421)</sup>.

Epac, das zweite Protein (nach der PI3-Kinase) dessen RA-Domäne im Verbund mit weiteren Domänen des VL Proteins strukturell gelöst werden konnte<sup>(207;422)</sup> weist eher auf Rekrutierung hin, da die Interaktionsfläche der RA-Domäne von der katalytischen GEF-Domäne weg weist (unter der Voraussetzung, dass die Interaktion ähnlich zu Raf(RBD) und RalGDS(RA) verläuft) und eine Interaktion mit einem G Protein ungehindert möglich wäre (Abb. 19D). Auch für RalGDS konnte bisher keine allosterisch aktivierende Wirkung nachgewiesen werden<sup>(387;423)</sup>. Ähnliches wird für AF6, TIAM, RIAM, RGS12/14 und die PDZ-GEF-Proteine angenommen.

Die PI3-Kinase wird *in vitro* und membran-unabhängig allosterisch aktiviert, was mehrfach bestätigt werden konnte<sup>(424;425)</sup>. Dies ist die einzige Struktur einer RAD/RBD, die neben der Interaktion über *switch I* auch eine (geringfügige) Bindung an *switch II* aufweist (Abb. 19C). Die Interaktion reicht allerdings aus, um die Struktur der PIP-Bindungsstelle soweit zu ändern, dass eine Aktivierung stattfindet während die ATP-Bindetasche unverändert bleibt<sup>(424)</sup>. Die RA-Domäne von Nore1A/Rassf5 (s.u.) wird intramolekular durch eine C1-Domäne maskiert, deren Interaktion durch Bindung von Ras gelöst wird. Andere Rassf-Proteine besitzen ausschließlich eine RA-Domäne und unterliegen möglicherweise keiner allosterischen Regulation durch G Proteine. ARHGAP20, Arap3 sowie die Rin-Proteine wurden als Effektoren von Rap/Ras vorgeschlagen, welche durch Bindung an G Proteine allosterisch aktiviert werden sollen<sup>(250;426;427)</sup>. Die Hinweise hierauf sind allerdings nicht eindeutig und bedürfen weiterer Bestätigung.

### 1.4.3 spezifische Effektoren

#### ***RapL: Integrin-Aktivierung in Lymphozyten***

*Regulator for cell adhesion and polarization enriched in lymphocytes* (RapL) ist Mitglied der Adapterproteinfamilie der Rassf (*Ras association domain family*)-Proteine<sup>(428;429)</sup> und bildet die kleinere Spleißvariante von Nore1/Rassf5 (*Novel Ras effector*)<sup>(430)</sup>. RapL wird hauptsächlich in Lymphozyten exprimiert, während Nore1A ubiquitär vorkommt<sup>(430;431)</sup>. Der Domänenaufbau ist einfach, wie bei allen Rassf-Proteinen, und besteht nur aus einer RA-Domäne gefolgt von einer *coiled-coil* SARAH-Domäne. Als Interaktionspartner von RapL werden sowohl H-Ras und M-Ras (nM Affinität) als auch Rap1 ( $\mu$ M Affinität)<sup>(391)</sup> und Rap2<sup>(124)</sup> beschrieben, mit stärkerer *in vivo* Bindung zu Ras und Rap2<sup>(413)</sup>. Die RA-Domäne besitzt eine untypische Ubiquitin-Domäne mit einer deutlichen Verlängerung des zentralen  $\beta$ -Faltblatts<sup>(432)</sup> (Abb. 19B).

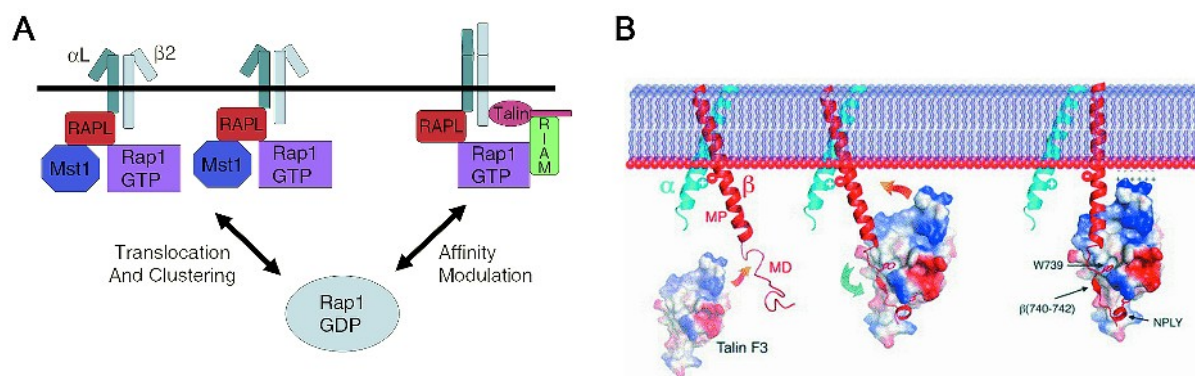
Die Funktion von RapL ist nicht eindeutig geklärt und verschiedene Ansätze, die sich ebenfalls in

der Namensgebung widerspiegeln, führen zu unterschiedlichen Ergebnissen:

- RapL: Rap1/Rap2-abhängige Regulation der *inside-out* Signaltransduktion über Integrine der Lymphozyten
- Nore1B: Effektor von Ras und Funktion als Tumorsuppressor

Die Rassf-Proteine werden generell als Tumorsuppressorproteine eingeordnet<sup>(428;429)</sup>; eine Eigenschaft, die ebenfalls für Nore1A gezeigt wurde, für Nore1B/RapL jedoch nicht vollständig geklärt ist.

Der Name RapL wurde von der Gruppe um T. Kinashi geprägt<sup>(431)</sup> und wurde als fehlendes Verbindungsprotein zwischen Rap und der Aktivierung von Integrinen vorgeschlagen<sup>(123;433-435)</sup>. So wurde für RapL eine Rap1-abhängige, direkte Bindung an die  $\alpha$ -Untereinheit von LFA1 ( $\alpha_L\beta_1$ ), dem Integrin der Lymphozyten, über Immunopräzipitation nachgewiesen<sup>(431)</sup>. Allerdings ist dies die einzige Studie, die eine direkte Interaktion beider Proteine postuliert und wird zunehmend in Frage gestellt. Insbesondere mehrt sich die Vermutung, dass Rap2 ebenfalls eine Rolle in der RapL-vermittelten Signalweiterleitung übernimmt; bsp. im Recycling von Integrinen<sup>(124)</sup>. Ein indirekter Einfluss von RapL auf die Integrin-Aktivierung wird auch von anderen Gruppen bestätigt<sup>(124;437)</sup>. So zeigen RapL *knockout*-Mäuse Defekte in der Lymphozyten Migration und der Gewebeinvasion<sup>(439)</sup>, die jedoch die Adhäsion nicht vollständig inhibiert<sup>(439;440)</sup>; ein Hinweis darauf, dass RapL eher modifizierenden Einfluss auf die Integrin-Aktivierung besitzt und nicht der essenzielle Aktivator ist.



**Abbildung 20: Integrin-Aktivierung**

**A:** Neues Modell der Rap-Effekte auf die Integrin-Aktivierung. RapL als Interaktionspartner der  $\alpha$ -Untereinheit, Talin als  $\beta$ -UE bindendes Protein. Der Rap-Effektor RIAM bindet an Talin. **B:** Mechanistisches Modell der Integrin-Aktivierung durch Talin (nach Cantor *et al.*<sup>(436)</sup>). Die Aktivierung von Talin benötigt die Aufhebung der Autoinhibition, wodurch der F3-Teil (Oberflächendarstellung) freigesetzt wird. Anschließend erfolgt die Bindung von Talin (F3) an den Membran-distalen Bereich der Integrin  $\beta$ -UE (rot). Bindung von F3 an den Membran-proximalen Bereich der  $\beta$ -UE: Auflösung der Salzbrücke zwischen  $\alpha$  und  $\beta$ , Stabilisierung der helicalen Struktur. Bindung von F3 an Phospholipide stabilisiert die Integrin-Konformation (nach Banno *et al.*<sup>(438)</sup>).

Die direkte Aktivierung von Integrinen erfolgt über Talin. Hierbei bindet die N-terminale FERM-

Domäne (F3-Teil) von Talin mit hoher Affinität (nM) an den distalen Bereich der zytoplasmatischen Domäne der  $\beta$ -UE<sup>(441)</sup> (Abb. 20B). Zusätzliche Bindung an den membran-proximalen Bereich über eine niedrig-affine Bindung führt zur Dissoziation der Integrin  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheit<sup>(442)</sup>, was eine Konformationsänderung in den extrazellulären Domänen hervorruft. Hierbei werden die extrazellulären  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten aufgerichtet, was die Affinität zu Liganden deutlich erhöht<sup>(443-445)</sup>. Der Einfluss von Rap1 in der Aktivierung von Integrinen ist unbestritten<sup>(122;142;446)</sup> und neben der noch ungesicherten Funktion von RapL wird vor allem RIAM als Integrin-aktivierendes Protein eingestuft<sup>(435)</sup> (Abb. 20A). Dabei wurde beobachtet, dass RIAM direkt an Talin bindet<sup>(447;448)</sup> und die Rap-abhängige Aktivierung von Integrinen zusätzlich über Talin und den  $\beta$ -Arm von Integrinen verläuft.

Im Zuge der Aufklärung der Nore1/RapL-Funktion wurden weitere Interaktionspartner identifiziert. Rassf-Proteine binden an MST1/2, proapoptotische Ser/Thr-Kinasen<sup>(449;450)</sup>, die wahrscheinlich die Tumorsuppressor-Funktion der Rassf-Proteine vermitteln und an die C-terminale *Coiled-coil*-Domäne von Nore1 binden<sup>(451-453)</sup>. Die Interaktion von RapL und MST1/2 in Lymphozyten wird kontrovers in Bezug auf Apoptose oder Vermittlung der Integrin-Aktivierung diskutiert<sup>(454;455)</sup>.

Zunehmend wird der Einfluss der Rassf-Proteine, insbes. auch Nore1/RapL, auf die Mikrotubuli-Dynamik untersucht. Rassf-Proteine binden Mikrotubuli über die RA-Domäne<sup>(456;457)</sup>, so dass ein Einfluss von Rap bzw. Ras auf Mikrotubuli vermutet werden kann<sup>(432)</sup>. Ein interessanter Ansatz in der Untersuchung der Integrin-Aktivierung, die stark von der Mikrotubuli-Dynamik (*Focal Adhesions*) abhängt.

### ***Arap-Proteine: Konnektivität von Ras-, Rho-, Arf- und PIP-Signalwegen***

Die Charakterisierung der Arap-Proteine startete 2002 mit zwei Veröffentlichungen in der gleichen Ausgabe von *Molecular Cell*, in denen die drei Arap-Proteine, Arap1, Arap2 und Arap3 erstmals biochemisch charakterisiert wurden<sup>(249;458)</sup>. Diese sind große Multidomänen-Proteine von 1210 (Arap1) bis 1545 (Arap3) Aminosäuren, von denen zusätzlich unterschiedliche Spleißvarianten existieren. Sie weisen eine SAM-Domäne, 5 PH-Domänen, eine ArfGAP-Domäne, eine RhoGAP-Domäne und eine RA-Domäne auf, die je nach konsultierter Datenbank (*Smart*, *Pfam*) in ihrer Zusammensetzung variieren können (Abb. 21).

Die biologische Funktion der Proteine ist trotz der intensiven Forschung der letzten Jahre noch immer uneindeutig und beschränkt sich hauptsächlich auf die Identifizierung der Interaktionspartner der einzelnen Domänen (Tabelle 3).

Tabelle 3: Interaktionspartner der Arap-Proteine

	Interaktionspartner	Ref.
<b>SAM</b>		
Arap1	<i>n.u., nicht in allen Isoformen vorhanden</i>	
Arap2	<i>n.u.</i>	
Arap3	<i>in vitro/in vivo: Ship2</i>	(459)
<b>ArfGAP</b>		
Arap1	<i>in vitro: Arf1 &gt; Arf5 &gt;&gt; Arf6</i>	(249)
	<i>in vivo: Arf6 &gt;&gt; Arf1, abhängig von der SAM-Domäne</i>	(460)
Arap2	<i>in vitro: Arf6 &gt; Arf5 &gt;&gt; Arf1</i>	(461)
Arap3	<i>in vitro: Arf6</i>	(458)
	<i>in vivo: Arf6</i>	
<b>RhoGAP</b>		
Arap1	<i>in vitro: RhoA, CDC42</i>	(249)
Arap2	Inaktiv, da das katalytische Arginin nicht vorhanden ist. Trotzdem Interaktion mit RhoA und Vorschlag als Effektor von Rho	(249) (461)
Arap3	<i>in vitro: RhoA &gt;&gt; Rac1 &gt; CDC42=ohne</i> (Verwendung von VL- oder PH3-end-Konstrukten)	(250) (462)
	<i>in vivo: RhoA &gt;&gt; Rac1 (CDC42 n.u.)</i>	
<b>PH1</b>		
Arap1	Messung der ArfGAP-Aktivität: PI(3,4,5)P <sub>3</sub> >> PI(3,4)P <sub>2</sub> > PI(4,5)P <sub>2</sub> =PI(3,5)P <sub>2</sub> > PI(3)P=PI(4)P	(249)
Arap2	Messung der ArfGAP-Aktivität: PI(3,4,5)P <sub>3</sub> =PI(4,5)P <sub>2</sub> >> PI(3,5)P <sub>2</sub> =PI(4,5)P <sub>2</sub> =PI(3)P=ohne	(461)
Arap3	Messung der ArfGAP-Aktivität: PI(3,4,5)P <sub>3</sub> > PI(3,4)P <sub>2</sub> >> PI(4,5)P <sub>2</sub> =ohne	(458)
<b>Restl. PH</b>		
Arap1	Analyse durch PIP-Strips zeigt Bindung an: PI(3)P=PI(4)P=PI(5)P > PIP <sub>2</sub> und PIP <sub>3</sub> . Das gilt für jede einzelne PH-Domäne (PH3 nur PI(4,5)P <sub>2</sub> )	(463)
Arap2	<i>n.u.</i>	
Arap3	<i>n.u.</i>	
<b>RA</b>		
Arap1	<i>n.u.</i>	
Arap2	<i>n.u.</i>	



## Einleitung

---

Arap3	<i>in vitro</i> : Rap1B, Rap2b, Rheb <i>in vivo</i> : Rap1A (Rap2b, Rheb <i>n.u.</i> )	(250)
-------	---	-------

---

*n.u.*: bisher nicht untersucht

*In vivo* Experimente besitzen häufig den Ansatz, einen Phänotyp durch *loss-of-function* Mutationen bestimmten Domänen von Arap zuzuordnen, die jedoch aufgrund des starken *Crosstalks* der Signalwege insbes. der Rho- und Arf-Signaltransduktion unzureichend und schwierig erklärbar bleiben.

In grober Näherung kann man Arap1 eine Funktion in Endosomen<sup>(463;464)</sup> und dem Golgi-Apparat<sup>(249)</sup> zusprechen, beides Kompartimente - neben begrenzten Bereichen an der Plasmamembran (*cell edge*) - an denen Arap1 bisher identifiziert wurde. Überexpression induziert ein Abrunden der Zellen (vermindertes *Cell-spreading*), einen Verlust der Stressfasern und in geringem Maße die Ausbildung von Filopodien<sup>(249)</sup>. Neuere Studien belegen die Beteiligung von Arap1 in der Endozytose von EGFR<sup>(463;464)</sup>, wobei es mit Rab5 in späten Endosomen kolokalisiert<sup>(464)</sup>.

Die Funktion von Arap2 ist weitgehend unbekannt. Als vorgeschlagener Effektor von RhoA, da es keine RhoA-GAP-Aktivität besitzt und trotzdem RhoA bindet, induziert es Stressfasern und die Bildung von *Focal Adhesions*<sup>(461)</sup>.

Arap3-Überexpression ruft widersprüchliche Effekte hervor. Während eine Gruppe die Abrundung von Zellen mit vermindertem *Cell spreading* beobachtet, bei vermindertem RhoA-GTP und Rac1-GTP Level<sup>(462)</sup>, beschreiben andere drastische Membraneinstülpungen, nach PDGF-vermittelter Rekrutierung von Arap3 an die Plasmamembran<sup>(458)</sup>. Weiterhin wird eine Verminderung von Lamellipodien bei Depletion von Arap3 durch RNAi beschrieben<sup>(465)</sup>, die mit höherer Arf6-GTP Konzentration einhergeht. Analog zu Arap1 wird auch Arap3 ein Einfluss auf die Endozytose von EGFR zugesprochen, da es mit dem *scaffold protein* CIN85 interagiert, welches an diesem Prozess beteiligt ist<sup>(466)</sup>.

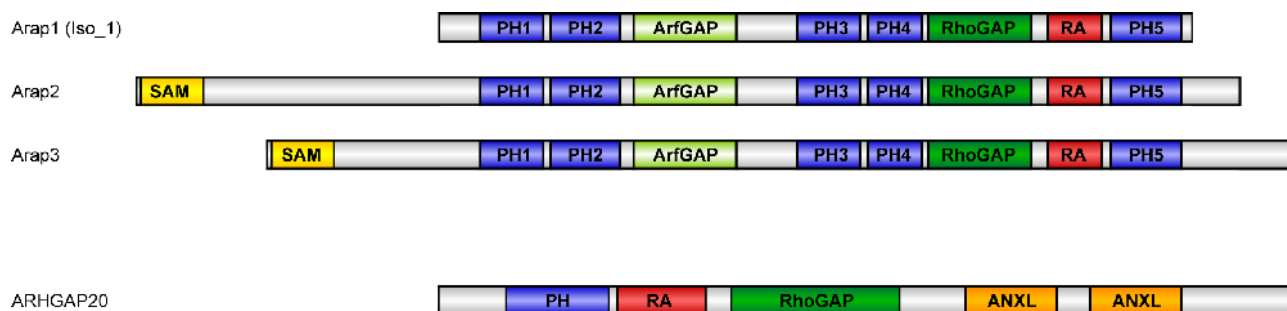
Eine weitere Ebene der Regulation erfolgt durch transiente Phosphorylierungen der Arap-Proteine, was bsp. für Arap3 beschrieben wurde, welches nach erfolgter Zelladhäsion an Fibronectin durch Src-Kinasen polyphosphoryliert wird<sup>(462)</sup>.

Aufgrund der unterschiedlichen Domänen, kann man die Arap-Proteine als Signalintegratoren bezeichnen, die Signaltransduktionswege der Phosphoinositole, der Arf-Proteine, der Rho-Proteine und der Ras-Proteine vereinigen. Die interessante Frage ist nun, ob die unterschiedlichen Domänen einander allosterisch regulieren oder ob sie zur reinen Rekrutierung weiterer Proteine am gleichen Wirkungsort dienen.

Typisch für die Regulation der ArfGAPs konnte auch für Arap1,2,3 gezeigt werden, dass die

ArfGAP-Domäne durch die Interaktion der ersten PH-Domäne mit Phosphoinositolen *in vitro* und *in vivo* aktiviert werden kann<sup>(249;458;461)</sup>. Im Gegensatz dazu findet sich keine Regulation der RhoGAP-Domäne durch PIPs *in vitro*, während *in vivo* die Translokation von Arap3 an die Membran die RhoGAP-Aktivität ermöglicht<sup>(458)</sup>.

Die Funktion der RA-Domänen ist nur im Falle von Arap3 näher charakterisiert. Krugmann *et al.*<sup>(250)</sup> beschreiben eine Interaktion von Arap3 (VL) mit Rap1, Rap2 und Rheb, die sie über Filterbindungs-Versuche durchführen (wobei sie eine – eigentlich nicht mögliche – Interaktion von Raf (RBD) mit Rheb als Positivkontrolle einsetzen). Dabei beobachten sie *in vitro* eine geringfügige Aktivierung der RhoGAP-Aktivität auf RhoA bei Anwesenheit von Rap1B\*GTP $\gamma$ S, die *in vivo*, wahrscheinlich aufgrund der Translokation von Arap3 an die Membran, deutlicher ausfällt. Für Arap1 oder Arap2 gibt es entsprechende Versuche zur Funktion der RA-Domäne bislang nicht.



**Abbildung 21: Arap-Proteine und ARHGAP20**

Quelle: *Smart*-Datenbank, *Pfam*-Datenbank

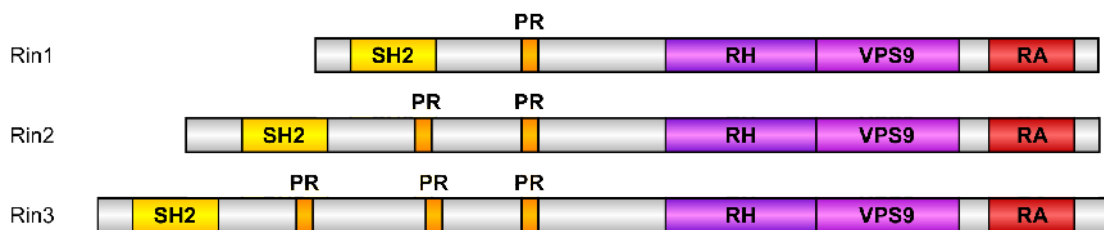
### ***ARHGAP: Rap-abhängige Aktivierung der RhoGAP-Domäne***

ARHGAP20 (auch: RA-RhoGAP), ein Protein, welches ausschließlich in Testis, Leber und Hirn exprimiert wird, weist ebenfalls eine PH-Domäne, eine RA-Domäne und eine RhoGAP-Domäne auf; allerdings in umgekehrter Reihenfolge als die Arap-Proteine (*Smart*, *Pfam*). Neben diesen drei Domänen findet sich noch ein großer Bereich, dessen Sequenz, abgesehen von einem Bereich mit vorhergesagten *Annexin-like repeats*, keine eindeutige Domänenstruktur aufweist<sup>(467)</sup> (Abb. 21).

Im Gegensatz zu Arap3 konnte für ARHGAP20 eine eindeutige Aktivierung der RhoA-GAP-Funktion durch die Bindung von Rap1 gezeigt werden<sup>(426)</sup>. Für Rac1 oder CDC42 konnte keine Aktivität nachgewiesen werden. *In vivo* bestätigte sich eindeutig, dass ARHGAP20 *downstream* von Rap1 liegt und Rap1- und RhoA(GAP)-vermittelt die Bildung von Neuriten aus NG108-Nervenzellen sowohl in Länge als auch in Anzahl hervorruft<sup>(426)</sup>. Zusätzlich zu dieser Funktion wurde für ARHGAP20 ein Einfluss auf die chronische B-Zell-Leukämie beschrieben, da bei einer Subgruppe von Patienten mit dieser Erkrankung eine Veränderung im Gen für ARHGAP20 nachgewiesen wurde<sup>(468)</sup>.

### ***Rin-Proteine: Regulation der Rab-Familie durch Ras***

Rin-Proteine wurden als *Ras interaction/interference* Proteine beschrieben, deren Überexpression die Bindung von Raf an Ras unterbindet<sup>(469)</sup>. Die drei Isoformen von Rin besitzen eine SH2-Domäne, eine Rin-Homologie-Domäne (RH) eine Vps9-Domäne (RabGEF) und eine RA-Domäne und unterscheiden sich in der Anzahl der Prolinreichen Bereiche zwischen SH2 und RH (*Smart, Pfam*, Abb. 22).



**Abbildung 22: Rin-Proteine**

Quelle: *Smart*-Datenbank

Die biologische Funktion von Rin liegt einerseits in der Aktivierung von Tyrosinkinase (Abl) über die N-terminale SH2-Domäne<sup>(470)</sup> und in der Regulation der Endozytose verschiedener Membranrezeptoren über den C-terminalen RabGEF/RA-Bereich<sup>(427;471-473)</sup>.

Die RA-Domäne ist ein klassischer Effektor von G Proteinen der Ras-Familie, der in mehreren Studien als Bindungspartner von nahezu allen Ras-Proteinen mit ausreichend hoher Affinität gebunden werden kann<sup>(391;413)</sup>. Rin1 besitzt Präferenz für Rap2, N-/K-Ras und TC21, Rin2 für R-Ras und TC21, während Rin3 an N-/K-Ras und M-Ras bindet<sup>(413)</sup>.

Alle drei Proteine werden als Rab5-GEFs eingestuft. Die Spezifität von Rin1 für Rab5 wurde *in vitro* in einem Vergleich mit Vps21, Ypt7, Rab4 und Rab11 untersucht, deren Austausch nicht durch Rin1 katalysiert wurde<sup>(427)</sup>. *In vivo* lokalisiert Rin1 an Rab5-Endosomen<sup>(471)</sup> und ist in der Lage, Rab5-abhängig die Fusion von Endosomen zu stimulieren<sup>(427)</sup>. Rin2 und Rin3 wurden *in vitro* nur auf Rab5 getestet; auch *in vivo* konnte Rab5 als Substrat für diese beiden Proteine bestätigt werden<sup>(474;475)</sup>.

Für Rin1 wurde eine allosterische Regulation der Rab5-GEF-Aktivität durch Bindung von Ras an die RA-Domäne *in vitro* postuliert<sup>(427)</sup>, die jedoch nur geringfügige Aktivitätsänderungen ausmacht, die zudem nicht quantifiziert wurden. *In vivo* bestätigte sich die Ras-Abhängigkeit der Rin-vermittelten Endozytose mehrfach<sup>(427;472)</sup>, während andere Gruppen Ras-unabhängige Funktionen von Rin1 in der Endozytose beobachten, bzw. nicht auf die Funktion von Ras eingehen<sup>(473;476;477)</sup>.

Die Rin-Proteine gelangen zunehmend in den Fokus der Tumorforschung, da mehrere Studien von einer Reduktion des Rin1-Proteinlevels und von einer schlechteren Überlebensrate bei Rin1-Überexpression berichten<sup>(477-479)</sup>.

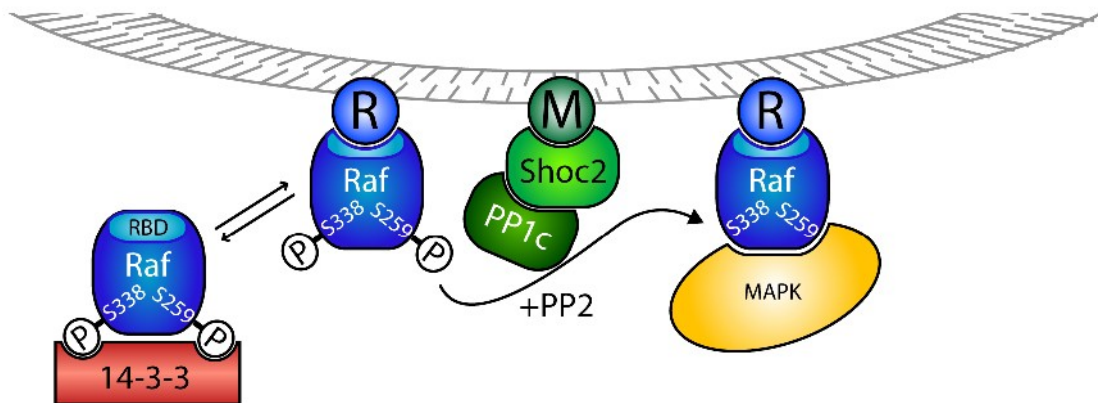
### ***Shoc2***

Shoc2 ist ein Protein, das 1998 gleichzeitig von zwei Gruppen erstmals charakterisiert wurde und entsprechend mehrere Namen besitzt: Als *Suppressor of Ras* (Sur-8) wurde es als Gen in *C. elegans* identifiziert<sup>(355)</sup>, welches in mutierter Form die Aktivität von Let-60 (Ras) unterdrückt. Als *Suppressor of Clear* (Soc-2) wurde es bezeichnet<sup>(480)</sup>, da Mutationen in diesem Gen den *Clear*-Phänotyp in *C. elegans* unterdrücken, der durch konstitutiv-aktiven FGFR entsteht. Die Bezeichnung Shoc2 gibt die humane Variante von Soc-2 wieder<sup>(480)</sup>.

Shoc2/Soc-2/Sur-8 ist ein *Leucine rich repeat* (LRR) Protein mit schätzungsweise 19 LRRs und einer vorangestellten N-terminalen Domäne von ca. 80 Aminosäuren, deren Struktur unbekannt ist<sup>(480)</sup>. Von beiden Gruppen wurde es als Ras-Effektor beschrieben, der an N-/H-/K-Ras bindet, was über *Y2H*-Experimente und *in vitro* Studien mit Zell-Extrakten untersucht wurde<sup>(355;480)</sup>. Hierbei zeigte sich, dass sowohl die N-terminale Domäne (die nicht zwischen Säugern und *C. elegans* konserviert ist) als auch der C-terminale Bereich von Sur-8 für die Interaktion mit Ras benötigt werden<sup>(355)</sup>. Diesen Studien zufolge besitzt Sur-8, ähnlich wie KSR eine aktivierende Funktion auf Raf. Später wurde durch Coimmunopräzipitationen und *Pulldown*-Experimente mit GST-Ras und Zelllysaten postuliert, dass Ras, Raf und Shoc2 einen trimeren Komplex eingehen<sup>(356)</sup>.

In einer Veröffentlichung von 2006 wurden von der McCormick Gruppe die bisherigen Ergebnisse in Frage gestellt<sup>(135)</sup>. Ihren Untersuchungen zufolge ist Shoc2 ein Effektor von M-Ras, wobei sie eine Interaktion mit anderen Ras-Proteinen vollständig ausschließen. Zusätzlich können sie keinen Komplex aus (M-)Ras, Raf und Shoc2 *in vivo* oder *in vitro* nachweisen.

Vielmehr beschreiben sie Shoc2 als regulatorisches Protein von PP1c, einer Ser-/Thr-Phosphatase, deren Spezifität durch regulatorische Proteine definiert wird. Allerdings bleibt unklar, welche der drei Isoformen von PP1c mit Shoc2 interagiert, da sie sowohl PP1ca ( $\alpha$ ), PP1cb ( $\beta$ ) als auch PP1cc ( $\gamma$ ) mit der TAP-Technik als Effektor von M-Ras identifizieren konnten. Die weitergehenden Experimente wurden mit PP1ca durchgeführt.



**Abbildung 23: Modell der Shoc2-Funktion**

Modell der Shoc2-Funktion nach den Ergebnissen von Rodriguez-Viciana *et al.*<sup>(135)</sup>. Raf liegt inaktiv an 14-3-3-Proteine gebunden vor. Die Bindung an Ras (R) vermindert die Interaktion zwischen 14-3-3 und Raf, eine Voraussetzung für die Bindung des M-Ras (M)-Shoc2-PP1c-Komplexes, der Raf an S259 dephosphoryliert. Dies aktiviert Raf dauerhaft und kann, an Ras gebunden, *downstream*-Effektoren phosphorylieren (gelb).

Über Coimmunopräzipitationen und *in vivo/in vitro* *Pulldown*-Experimenten konnten sie einen ternären Komplex aus M-Ras, Shoc2 und PP1c beobachten, der M-Ras\*GTP-abhängig die Raf-Kinase an S259 dephosphoryliert und somit aktiviert. Damit konnten Experimente bestätigt werden, die einen starken Einfluss von Shoc2 auf die Aktivität der Raf-Kinase und damit die MAPK-Kaskade beobachteten (Abb. 23).

## 2 Zielsetzung

Die Familie der RA- und RB-Domänen enthaltenden Ras-Effektoren wächst beständig mit zunehmender bioinformatischer Analyse der Genomsequenzen. Während die klassischen Effektoren Raf-Kinase, RalGDS und PI3-Kinase eingehend untersucht sind, ergeben sich für einen Großteil der anderen Effektoren erst in den letzten Jahren Einblicke in ihren Funktions- und Regulationsmechanismus. Ziel dieser Arbeit war die *in vitro* Analyse der weniger bekannten Ras-Effektoren RapL, Arap, ARHGAP20, Rin und Shoc2, die in einem weitgefächerten Ansatz untersucht werden sollten. Für Arap, ARHGAP20 und Rin werden allosterische Mechanismen der Aktivierung postuliert, die strukturell und funktionell aufgeklärt werden sollten, um erstmals ein detailliertes Verständnis der Funktion von RA-Domänen im Kontext großer Multidomänen-Proteine zu erhalten. Die Rap-abhängige Integrin-Aktivierung durch RapL ist mechanistisch noch nicht verstanden. Die Untersuchung der Rap-vermittelten Integrin-Bindung über *in vitro*-Methoden könnte einen Einblick in den Mechanismus der Regulation dieser für eine Vielzahl von zellulären Prozessen wichtigen Rezeptorfamilie ergeben.

Für die Multidomänenproteine Arap1 und Arap3 wurde eine ebenfalls Rap-abhängige allosterische Regulation der RhoGAP-Aktivierung postuliert. Die daraus resultierende Integrator-Funktion dieser Proteine und die mechanistische Aufklärung des Zusammenspiels seiner Domänen war zentraler Bestandteil dieser Arbeit, um komplexe intramolekulare Regulationsmechanismen besser verstehen zu können. In analoger Weise sollten die Rin-Proteine untersucht werden, welche durch ihre Funktion die Rab- und Ras-Signalwege einer Zelle verknüpft und Prozesse wie die Endozytose von Wachstumsfaktor-Rezeptoren regulieren.

Als Ras-Effektor ohne RA-Domäne sollte Shoc2 auf die Interaktion mit Ras-Proteinen untersucht werden, da es als bedeutsamer Regulator des MAPK-Signalwegs charakterisiert wurde. Das Ras-bindende Epitop und der Mechanismus der Ras-abhängigen Regulation der MAP-Kinasen waren unbekannt und sollten aufgeklärt werden.

Im Zuge von GEF-Messungen mit den Rin-Proteinen sollte die Funktion eines in nahezu allen G Proteinen der Ras-Superfamilie konservierten Glutamats untersucht werden, für das eine essenzielle Funktion in der GEF-Katalyse postuliert wurde. Hierbei sollten G Proteine aller Subfamilien miteinander verglichen und die Konservierung des GEF-Mechanismus überprüft werden.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Funktion des konservierten Glutamats in der GEF Reaktion

##### 3.1.1 Sequenzvergleich

HRAS	: -TCLLDLDTAGCEEYS--ARDQYMRGTGEG	: 77	ROP4	: -TVNLCIWDTAGCEDYNR--RPLSYRGADV	: 80
NRAS	: -TCLLDLDTAGCEEYS--ARDQYMRGTGEG	: 77	RAN	: -PIKFNWDTAGCEKFG--GRDGYIQAQC	: 85
KRAS	: -TCLLDLDTAGCEEYS--ARDQYMRGTGEG	: 77	ARF1	: --ISFTVWVGGCKIR--PWRHYFQNTQG	: 87
MRAS	: -WAILDMLDTAGCEEF--ARDQYMRGTGEG	: 87	ARL1	: --LKFQVWDLGGQISIR--PYWRCYYSNTDA	: 87
RRAS1	: -PARLDLDTAGCEEF--ARDQYMRAGHG	: 103	ARL4A	: -TVTFHFVWVGGCKLR--PWKSYTRCTDG	: 95
RRAS2	: -AARLDLDTAGCEEF--ARDQYMRGTGEG	: 88	ARL5A	: --TRFLWVWIGGCESLR--SSWNTYYTNTDF	: 86
DIRAS1	: -VCTIQVDTTTSHQFP--AQRLSISKGHA	: 81	ARL14	: -NFSLVWVWVGGCKMR--TWGVCYCENTDG	: 84
DIRAS2	: -ICTIQVDTTTSHQFP--AQRLSISKGHA	: 81	ARL15	: --AINVWVWVGGCKLR--KYWSRYQGSQG	: 102
ERAS	: -DCIINWVDTAGCAIHR--ARDQCLAVCDG	: 115	ARFRP	: --ARVWVWVWVGGCKLR--SWDKYYAECHG	: 95
RASD1	: -VYQLDLDTSNHPFP--ARRLSILTGDV	: 98	RAB1A	: -TIKQVWDTAGCEFR--TSSYYRGAHG	: 86
RHEB	: -EYHLQVDTAGCEYS--IFPQYISIDING	: 80	RAB3A	: -RIKQVWDTAGCEFR--TSSYYRGAHG	: 97
RIT1	: -PANLDLDTAGCAEFT--ARDQYMRAGEG	: 95	RAB5A	: -TVKFEVWDTAGCEFR--TSSYYRGAHG	: 95
RIT2	: -PAYLDLDTAGCAEFT--ARDQYMRAGEG	: 94	RAB28	: LNVTVWVWVGGCKLR--KMDKYIYGAQGV	: 89
RAP1A	: -QCMLELDTAGTEQFT--ARDLYMKNGQG	: 77	RAB40A	: -RVKQVWDTAGCEFR--TSSYYRGAHG	: 89
RAP2A	: -PSVLELDTAGTEQFA--SRDLYIKNGQG	: 77	RAB43	: ---QVWDTAGCEFR--TSSYYRGAHG	: 93
RALA	: -EVQIDLDTAGCEDYA--ARDNYFRSSEG	: 88	SEC4	: -KVKQVWDTAGCEFR--TSSYYRGAHG	: 95
RHOA	: -QVELALWDTAGCEDYDR--RPLSYPTDGV	: 79			
RHOBTB1	: -SVSLRLWDTFQDHHK---DRRFAYGRSDV	: 102			
RHOBTB2	: -SVSLRLWDTFQDHHK---DRRFAYGRSDV	: 102			
CDC42	: -PYTIGLEDTAGCEDYDR--RPLSYPTDGV	: 77			
RAC1	: -PVNIGLWDTAGCEDYDR--RPLSYPTDGV	: 77			
RND1	: -RVELSLWDTSSPYDN--RPLCYSDSDA	: 87			
Wrch-1	: -PVRLQVDTAGCEDYDK--RPLCYTNTDI	: 135			

G3 (switchII)

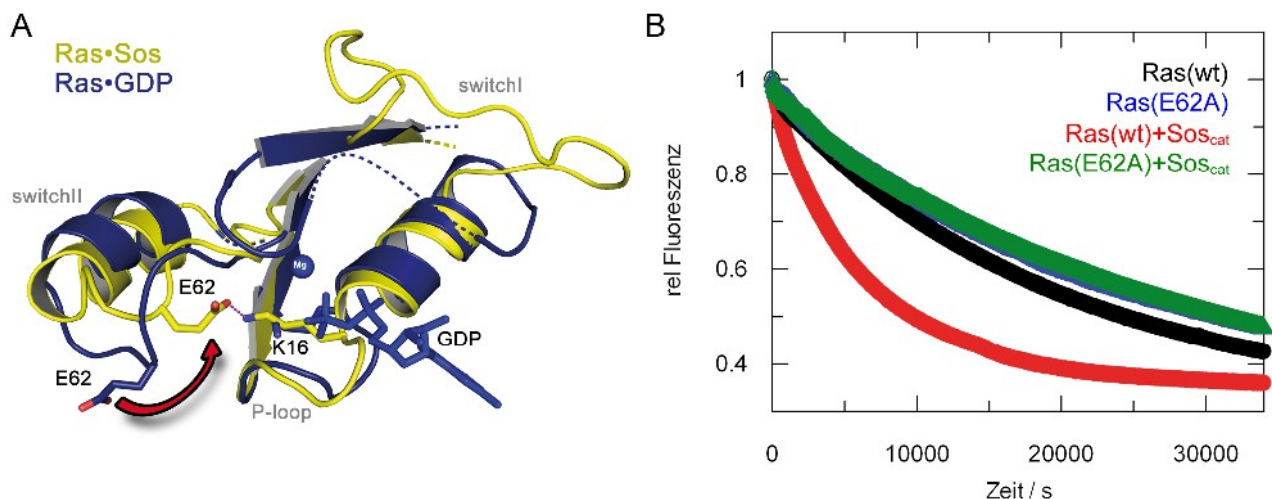
**Abbildung 24: Sequenzvergleich von G Proteinen**

Sequenzvergleich des G3 Motivs ausgewählter G Proteine. Das konservierte Glutamat ist in blau gezeigt. Ein vollständiger Vergleich aller G Proteine ist im Anhang zu finden.

Sequenzvergleiche von Proteinen der Ras Superfamilie zeigen, dass neben dem invarianten G3-Motiv (abgesehen von Gln 61) ein Glutamat hoch konserviert ist (Abb. 24, Anhang 8.2). Es ist in allen Subfamilien der Ras-Superfamilie zu identifizieren, außer in den Rag-Proteinen. In der Ras-Subfamilie besitzen die Di-Ras-Proteine, ERas, Rheb, Rit und RasD1 das Glutamat nicht. In der Rho-Familie weisen die Rnd-Proteine und Wrch1 als klassische Rho-Proteine einen anderen Rest auf; in der Rop-Familie ist es zu 100% konserviert. Die höchste Konservierung besitzt die Rab-Familie (Abb. 24, Anhang 8.2) mit Rab28 und Rab40 als einzigen Ausnahmen von 58 Proteinen. Eine geringe Konservierung findet sich in der Arf/Arl-Familie, bei denen nur Arl4, Arl5 und Arl14 ein Glutamat besitzen, während alle Arf-Proteine ein Aspartat aufweisen.

##### 3.1.2 Einfluss des konservierten Glutamats auf die GEF-Reaktion

Bereits in mehreren Kristallstrukturen von G Proteinen und ihren GEFs<sup>(217)</sup> zeigte sich die potenzielle Funktion des Glu62, so dass ein Einfluss des Glutamats auf die GEF-Aktivität mehrfach postuliert wurde<sup>(17;66;217)</sup> (Abb. 25A).



**Abbildung 25: Die Funktion des konservierten Glu62 in Ras**

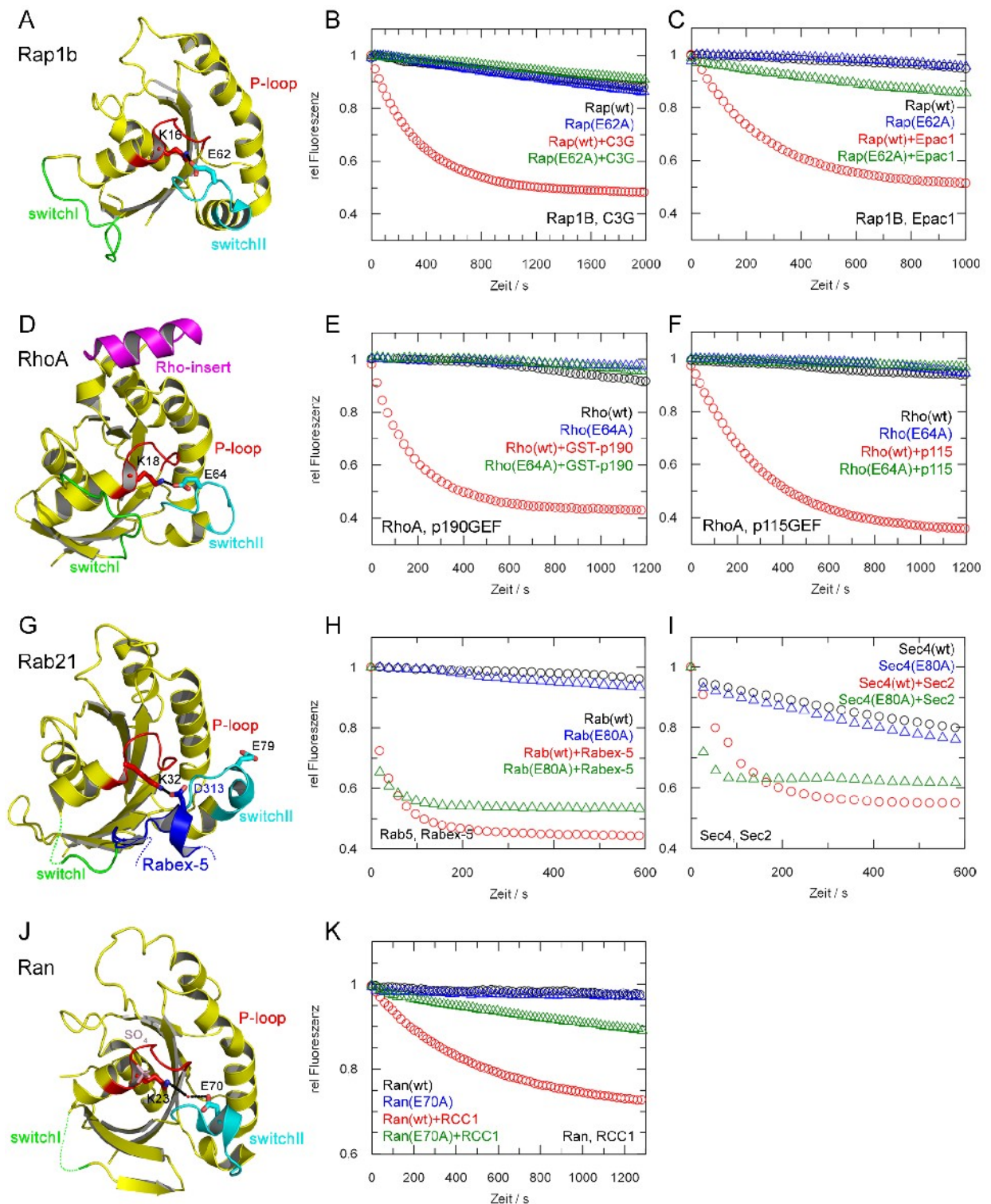
A: Struktureller Vergleich der Nukleotidbindestelle von Ras in der GDP-gebundenen Form (blau) und im Komplex mit Sos (gelb). Die Konformationsänderung von Glu62 ist durch den roten Pfeil angedeutet. B: GEF-Reaktion von Sos und Ras wt, bzw. Ras E62A (Methode nach Lenzen *et al.*<sup>(481)</sup>).

In der Tat zeigte die E62→A Mutation eine 5,4-fache Verringerung der GEF-Aktivität bei Zugabe von 100 nM Sos (Abb. 25B, Tabelle 4). Die Aktivität von 2  $\mu$ M Sos auf Ras E62A war 26-fach geringer als auf Ras wt (siehe Anhang 8.2, Tabelle 4).

Aufgrund der hohen Konservierung des Glutamats lag es nahe, die Funktion dieses Restes durch jeweilige Mutation von Glu zu Ala auch in den anderen Subfamilien der Ras-Superfamilie zu untersuchen.

Als nächster Verwandter von Ras wurde Rap mit Epac1, Epac2 und C3G gemessen (Abb. 26A, Anhang), dessen Rap1B-Epac2-Struktur (bei Anwesenheit von cAMP) ebenfalls die Salzbrücke zwischen *P-loop* Lysin und E62 aufwies (Abb. 26A). Wie erwartet führte die Mutation von Rap1 bei der Epac2-katalysierten Reaktion zu einer Rate von  $2,54 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ , im Vergleich zu  $169 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$  mit Rap1 wt (siehe Anhang). C3G zeigte auf Rap wt eine etwa 8-fache Beschleunigung des Nukleotidaustauschs unter den gewählten Bedingungen, die durch die E→A Mutation vollständig inhibiert wurde (Abb. 26B). Epac1 unterschied sich jedoch von beiden bisher getesteten Systemen, da es auch die Austauschreaktion von Rap1B E62A 14-fach beschleunigen konnte (Abb. 26C, Tabelle 4). Die GEF-katalysierte Austauschreaktion von p115 und p190 mit RhoA E64A war vollständig inhibiert (Abb. 26E,F), da die Raten mit  $1,39 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$  bzw.  $0,710 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$  denen des unkatalysierten Austauschs entsprachen (Tabelle 4). Die Struktur von RhoA mit der DH-PH-Domäne von Dbs konnte ebenfalls die Bindung von Glu64 an das *P-loop* Lysin zeigen (Abb. 26D).





**Abbildung 26: Der Einfluss des konservierten Glutamats auf die GEF-Reaktion von G Proteinen**

**A, D, G, J:** Strukturen von G Proteinen aus dem Komplex mit dem jeweiligen GEF (nicht gezeigt). Der *P-loop* ist in rot, *switch I* in grün und *switch II* in cyan markiert. **A:** Rap1B im Komplex mit Epac2. (3CF6). **B** GEF-Aktivität von C3G auf Rap1B. **C:** GEF-Aktivität von Epac1 auf Rap1B. **D:** RhoA im Komplex mit Dbs (1LB1). **E:** GEF-Aktivität von GST-p190 auf RhoA. **F:** GEF-Aktivität von p115 auf RhoA. **G:** Rab21 im Komplex mit Rabex-5 (2OT3). Teile von Rabex-5 sind in blau gezeigt. **H:** GEF-Aktivität von Rabex-5 auf Rab5A. **I:** GEF-Aktivität von Sec2 auf Sec4. **J:** Ran im Komplex mit RCC1 (1I2M). **K:** GEF-Aktivität von RCC1 auf Ran. (alle Messungen: Standardpuffer)

RCC1, das GEF für Ran, besaß im Vergleich zu den anderen getesteten GEFs die höchste Aktivität. Bereits bei einer Konzentration von 1 nM wurde mit  $17,2 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$  eine Austauschrate erreicht, die höher war als beispielsweise die von C3G in 100-fach höherer Konzentration auf Rap1 (Tabelle 4). Deshalb wurde die Austauschrate nur für 1 nM, bzw. 100 nM RCC1 gemessen. Die Aktivität auf die Glutamat-Mutante von Ran (E70A) war immer noch 20-fach schneller als der intrinsische Austausch, jedoch langsamer als mit Ran wt (150-fach im Vgl. zum intr. Austausch) (Abb. 26K). Damit zeigt RCC1 ein ähnliches Verhalten wie Epac1. Die Struktur von Ran mit RCC1 zeigte eine Interaktion von Glu und Lys über ein überbrückendes Wasser. Zusätzlich befand sich ein Sulfat-Ion im aktiven Zentrum, welches die Position der zwei Reste im Vergleich zum tatsächlichen Zustand verändert haben könnte (Abb. 26J).

Die Subfamilie mit der höchsten Konservierung waren die Rab-Proteine, von denen Rab5 mit dem Vps9-GEF Rabex-5 und Sec4 mit dem GEF Sec2 gemessen wurden, um Rab-Proteine mit GEFs unterschiedlicher Faltungen zu untersuchen. Im Gegensatz zu den bisher untersuchten G Protein-GEF-Interaktionen zeigten sowohl Rabex-5 als auch Sec2 eine hohe Beschleunigung der Glu-Mutante Rab E80A bzw. Sec4 E80A (Abb. 26H,I), die im Fall von Rab5 E80A und Rabex-5 sogar 1,5-fach schneller war als mit Rab5 wt (Tabelle 4). Die Struktur von Rab21 mit Rabex-5 zeigt das konservierte Glu in einer Solvenz-exponierten Konformation, während Asp313 von Rabex-5 in das aktive Zentrum von Rab ragt und seinerseits eine Interaktion *in trans* mit dem *P-loop* Lysin eingeht (Abb. 26G). Eine ähnliche Interaktion von Sec4 mit dem GEF Sec2 konnte jedoch nicht gefunden werden, obwohl auch hier das konservierte Glutamat vom aktiven Zentrum weg in die Lösung zeigt (siehe Anhang). Die beiden vorhandenen Strukturen von Sec4 und Sec2 zeigen unterschiedliche Konformationen des *P-loops*<sup>(221;222)</sup>. In einer der Strukturen ist der *P-loop* vollständig in seiner Konformation geändert und das Lysin weist in Richtung des G Domänen-Zentrums<sup>(222)</sup>. In der anderen Struktur wird es durch ein Phosphation gebunden, welches an Stelle der Phosphate des Nukleotids in der Nukleotidbindungstasche befindet<sup>(221)</sup>. Der *P-loop* dieser Struktur ist dementsprechend nicht deformiert.

Mutation des konservierten Glutamats zu Lysin bewirkt eine vollständige Ladungsumkehr, die einen noch stärkeren Einfluss auf die GEF-Aktivität besitzen sollte.

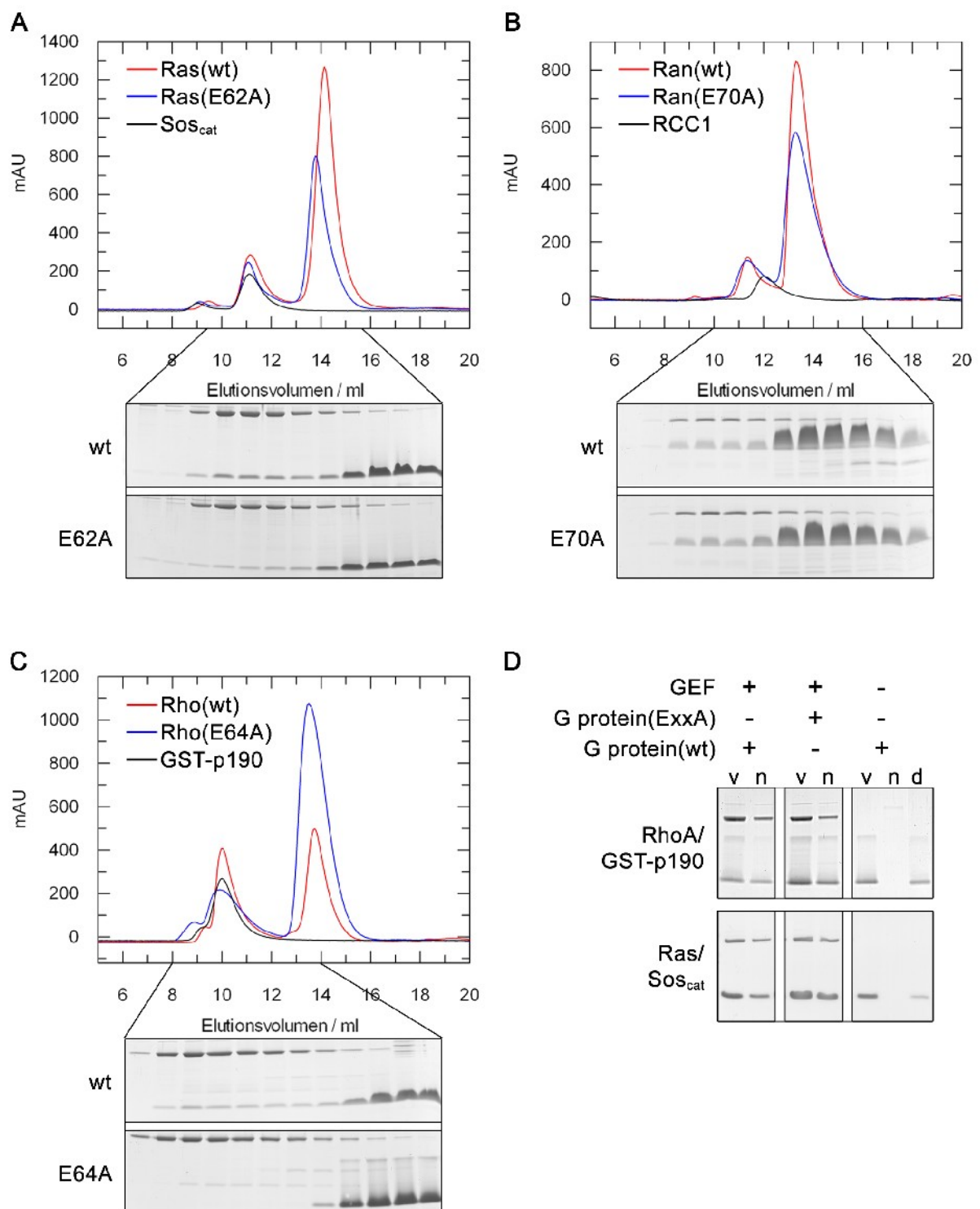
In der Promotionsarbeit von C. Thomas wurde die GEF-Aktivität von RCC1 auf Ran E70K im Vergleich zu Ran wt und die Aktivität von Sos auf Ras E62K untersucht. Dabei zeigte sich, dass Ras E62K genauso wie Ras E62A keinen GEF-katalysierten Austausch mehr durchführen kann. Ran E70K weist ebenfalls nur noch eine geringe Aktivität durch RCC1 auf (siehe Anhang).

Tabelle 4: Geschwindigkeitskonstanten des mGDP Austauschs

G Protein	GEF	wt / $10^4 \text{ s}^{-1}$	E→A / $10^4 \text{ s}^{-1}$
Ras	-	$0,432 \pm 0,098$	$0,320 \pm 0,122$
Ras	Sos (100 nM)	$3,06 \pm 2,92$	$0,566 \pm 0,172$
Ras	Sos (2 $\mu\text{M}$ )	$26,1 \pm 2,38$	$0,912 \pm 0,168$
Rap	-	$0,620 \pm 0,357$	$0,518 \pm 0,213$
Rap	C3G (100 nM)	$8,62 \pm 5,04$	$1,96 \pm 0,736$
Rap	Epac1 (100 nM)	$38,6 \pm 7,39$	$7,51 \pm 0,429$
Rap	Epac1 (2 $\mu\text{M}$ )	$269 \pm 25,5$	$62,9 \pm 1,75$
Rap	Epac2 (100 nM)	$6,00 \pm 0,533$	$0,684 \pm 0,377$
Rap	Epac2 (2 $\mu\text{M}$ )	$169 \pm 33,2$	$2,54 \pm 2,21$
Rho	-	$1,06 \pm 0,463$	$0,502 \pm 0,163$
Rho	GST-p190 (100 nM)	$2,27 \pm 2,70$	$1,39 \pm 0,41$
Rho	GST-p190 (2 $\mu\text{M}$ )	$43,4 \pm 19,3$	$0,998 \pm 0,555$
Rho	p115 (100 nM)	$2,979 \pm 0,654$	$0,710 \pm 0,103$
Rho	p115 (2 $\mu\text{M}$ )	$32,8 \pm 4,34$	$0,544 \pm 0,126$
Ran	-	$0,114 \pm 0,0510$	$0,173 \pm 0,158$
Ran	RCC1 (1 nM)	$17,2 \pm 2,91$	$3,51 \pm 0,914$
Ran	RCC1 (100 nM)	$204 \pm 39,8$	$219,5 \pm 4,95$
Rab	-	$1,69 \pm 0,514$	$5,80 \pm 3,76$
Rab	Rabex-5 (100 nM)	$209 \pm 39,9$	$322 \pm 56,3$
Sec4	-	$7,35 \pm 1,29$	$11,5 \pm 1,92$
Sec4	Sec2 (100 nM)	$257 \pm 15,1$	$253 \pm 27,5$

### 3.1.3 Komplexbildung von G Proteinen und GEFs

Die Inhibition der GEF-Katalyse durch die Mutation des Glutamats kann einerseits durch eine verringerte Affinität zum G Protein, andererseits durch eine verringerte katalytische Aktivität entstehen. Um dies zu klären, wurden Gelfiltrationsläufe durchgeführt, die zeigten, dass die Komplexbildung durch die Mutation nicht beeinflusst wurde (Abb. 27). Sowohl Ras (wt) als auch Ras (E62A) wurden mit der katalytischen Domäne von Sos, Ran (wt) und Ran (E70A) mit RCC1 im Komplex eluiert (Abb. 27A,B). RhoA (E64A) zeigte eine etwas geringere Affinität zu GST-p190GEF im Vergleich zum Wildtyp, da weniger RhoA (E64A) im Komplex eluierte (Abb. 27C). Eine Komplexbildung ist dennoch vorhanden.



**Abbildung 27: Komplexbildung von G Proteinen und GEFs**

**A, B, C:** Analytische Gelfiltration (S75 10/30) von G Proteinen und GEF, die im Verhältnis 5:1 inkubiert wurden (Puffer: Standardpuffer). Die Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE analysiert. **A:** wt Ras (rot) und E62A Ras (blau) mit Sos (schwarz) **B:** wt Ran (rot) und E70A (blau) mit RCC1 (schwarz). **C:** wt RhoA (rot) und E64A RhoA (blau) mit GST-p190 (schwarz). **D:** Analytische Ultrafiltration von Ras/Sos und RhoA/GST-p190. G Proteine wurden im Verhältnis 3:1 mit GEF in Anwesenheit von EDTA über Nacht inkubiert und fünfmal über einen 50 kDa Filter gewaschen. Das Gel zeigt die Proben vor (v) und nach (n) der Filtration. d zeigt den Durchfluss der Probe von G Protein ohne GEF.

Um die G Protein-GEF-Interaktionen mit einer weiteren Methode zu überprüfen, wurden analytische Ultrafiltrationen durchgeführt, bei der G Protein und GEF inkubiert und anschließend durch Membranen mit einer Ausschlussgröße von 50 kDa ultrafiltriert wurden. Dabei zeigten RhoA wt und RhoA (E64A) eine Komplexbildung mit p190GEF, während sich RhoA alleine im Eluat befand (Abb. 27D). Dies wurde auch für Ras und Sos bestätigt (Abb. 27D). Eine Durchführung dieses Versuchs mit Ran und RCC1 schlug fehl, da Ran unspezifisch an die Membran band und sich stets im Überstand und nicht im Filtrat befand (Daten nicht gezeigt).

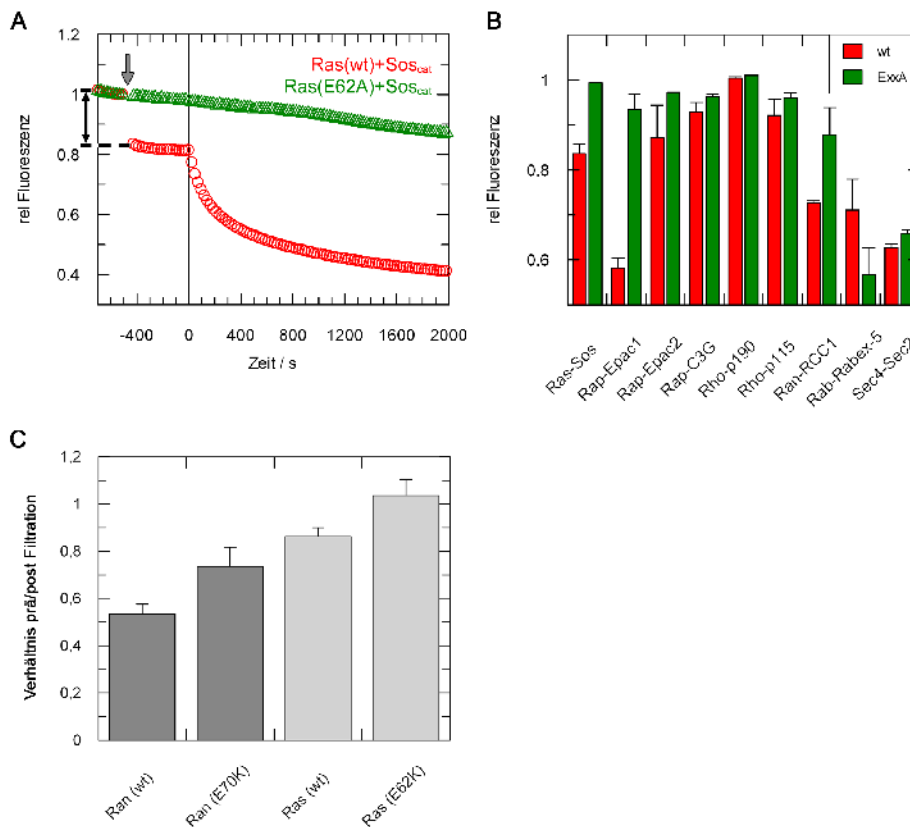
### 3.1.4 Verringerung der Nukleotidaffinität im trimeren Komplex

Die Inkubation eines Nukleotid-gebundenen G Proteins mit seinem GEF führt zunächst zur Bildung eines trimeren Komplexes mit verringerter Nukleotidaffinität. Dies resultiert in einer Verschiebung des chemischen Gleichgewichts hin zum dimeren Komplex aus GEF und G Protein.

Fluoreszenzmessungen eignen sich zur Beobachtung der Verschiebung des chemischen Gleichgewichts, da die Fluoreszenzintensität freier Nukleotide geringer ist. Entsprechend zeigte die Zugabe des GEFs vor Zugabe des GDP-Überschusses einen deutlichen Unterschied zwischen wt und Glu→Ala mutierten G Proteinen (Abb. 28A,B). Die Affinität von GEF und G Protein wurde durch die Mutation nicht verringert (s.o.) und ist nicht Grund der Fluoreszenzunterschiede. Bei Ras wt mit Sos trat eine Verringerung der Fluoreszenzintensität auf 83% auf, während Ras E62A und Sos keine Dissoziation des Nukleotids aufwiesen. Noch deutlicher zeigte sich dies für Rap und Epac1, für die die Fluoreszenzintensität auf 58% mit wt und nur 92% mit der E62A Mutante abfiel (Abb. 28B). Epac2 und C3G zeigten einen höheren Anteil gebundenen Nukleotids. Geht man von dem Richtwert der minimalen relativen Fluoreszenz von 50% aus, da das Lösungsmittel die mant-Fluoreszenz nicht auf Null *quenchen* kann, ergibt sich somit, dass Rap (wt)/Epac1 nur noch knapp 10% Nukleotid gebunden hatten und der größte Teil als dimerer Komplex vorlag. Bei Ras handelte es sich um etwa 33% trimeren Komplex.

Die Rho-Proteine zeigten eine nur geringe Reduktion der Fluoreszenzintensität, die sich zudem nicht zwischen wt und E64A unterschieden. Ran wies, wie Ras, eine Reduktion der Intensität auf, die im Falle des wt-Proteins deutlicher ausfiel als in der E70A-Mutante.

Eine Umkehrung des Verhaltens trat bei Rab5 und Rabex-5 auf. Während Rab5A wt eine Reduktion auf 70% zeigt, verringerte sich die Fluoreszenz im Rab5A E80A System auf 57%. Sec4 und Sec2 zeigten für wt und Glu-Mutante eine ähnliche Reduktion auf etwa 65%. Damit befanden sich bis zu 90% von Rab5 (E80A) bzw. Sec4 im dimeren Komplex mit ihrem GEF und nur 10% im trimeren.



**Abbildung 28: Die Bildung des dimeren G Protein - GEF-Komplexes**

**A:** Methode zur Bestimmung der Verringerung der Fluoreszenzintensität durch Zugabe des GEFs (grauer Pfeil). GDP-Zugabe zur Messung der eigentlichen GEF-Aktivität erfolgt zum Zeitpunkt 0. **B:** Änderung der Fluoreszenzintensität durch Zugabe des GEFs. Die Verschiebung des Gleichgewichts vom trimeren zum dimeren Komplex wurde für die angegebenen G Proteine sowohl für den wt als auch für die E→A Mutante bestimmt. **C:** Analytische Ultrafiltration von G Protein mit GEF (10 kDa Ausschluss) bei Bestimmung der Nukleotid-Konzentration vor und nach Filtration mittels HPLC. Angeben ist das Verhältnis hieraus.

Um das Verhältnis des dimeren zum trimeren Komplexes näher zu charakterisieren, wurden Ultrafiltrationsexperimente mit den Glu→Lys Mutanten von Ras/Sos und Ran/RCC1 durchgeführt (Abb. 28C). Ran (wt)/RCC1 wies nach mehrmaligem Waschen einen Nukleotidgehalt von 52% auf, während Ran (E70K)/RCC1 noch zu 70% Nukleotid gebunden hatten. Ras (wt)/Sos hatten noch 85% Nukleotidbeladung, während Ras (E62K)/Sos keinen Nukleotidverlust zeigten.



## 3.2 Regulator of Adhesion and Polarisation enriched in Lymphocytes, RapL

### 3.2.1 Sequenzvergleich

Die niedrige Sequenzhomologie zwischen RA-Domänen zeigt sich bereits zwischen Proteinen der Rassf-Familie mit einer Identität von 12% bis maximal 30% (Abb. 29). Die stärkste Verwandtschaft besteht zwischen RapL (Rassf5), Rassf1 und Rassf3 mit 35% bzw. 43% Identität. Der Vergleich von RapL mit anderen RA-Domänen Proteinen zeigt nur maximal 5% Sequenzidentität.

Die einzige Möglichkeit, einen Vergleich mit anderen RA-Domänen, u.a. mit bekannter Struktur, durchzuführen, besteht in der Analyse der Sekundärstruktur der Ubiquitininfaltung. Der Sequenzvergleich, basierend aus Sekundärstruktur-Vorhersage und vorhandenen Strukturen, ist in Abb. 29 gezeigt. Mit der Lösung der Struktur der RA-Domäne von RapL<sup>(432)</sup> während der Durchführung dieser Arbeit zeigte sich, dass es deutliche Abweichungen von der typischen Ubiquitin-Domäne geben kann, die den Vergleich von RA-Domänen Proteinen zusätzlich erheblich erschweren.

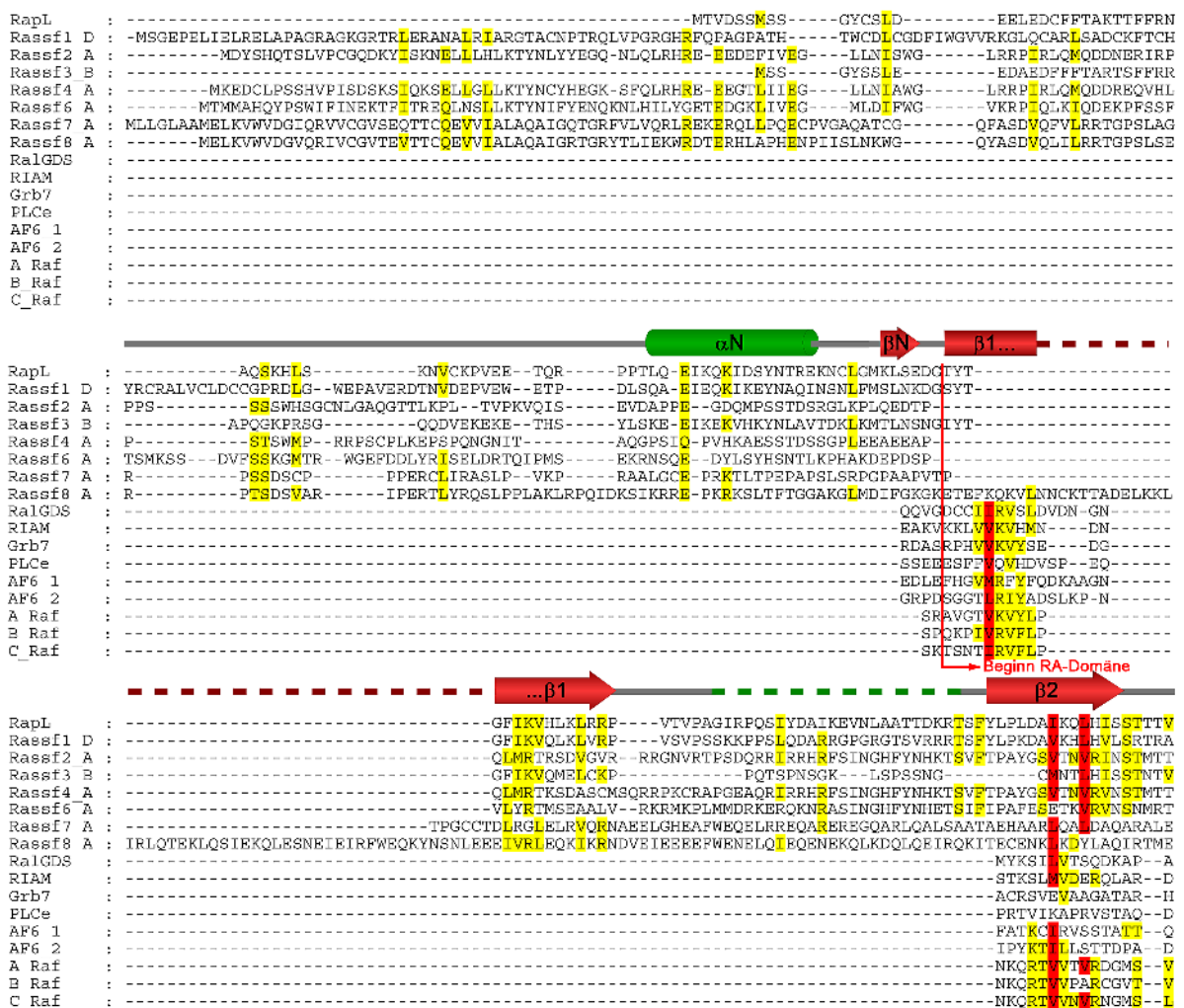


Abbildung 29 (Teil 1)

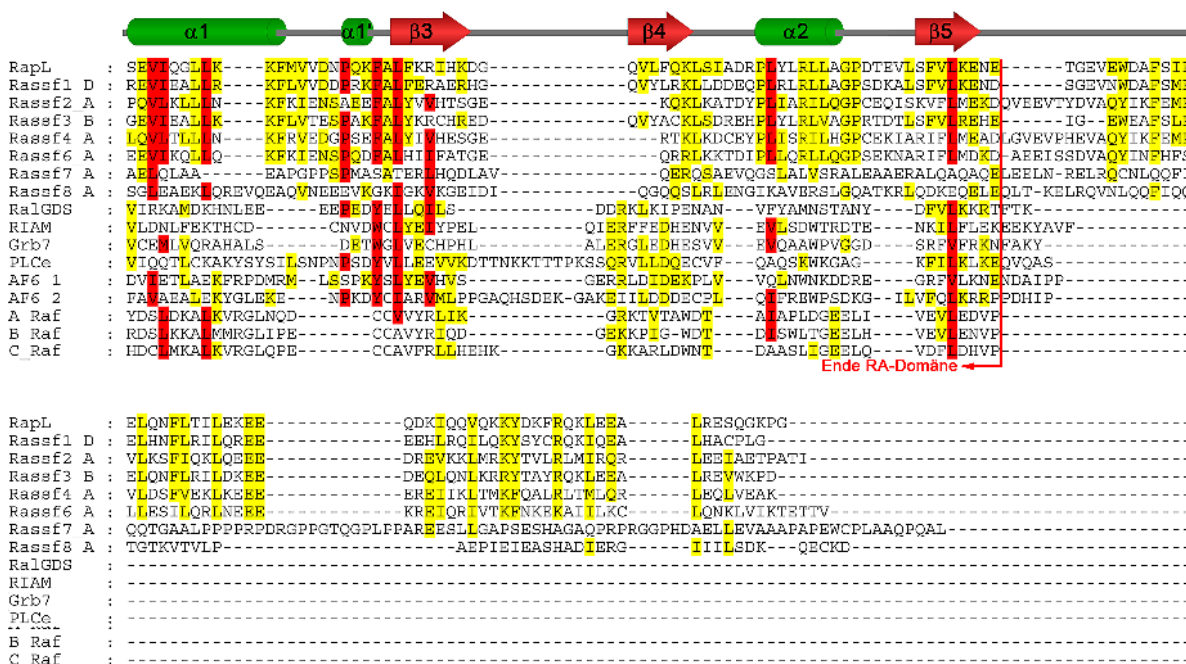


Abbildung 29: Sequenzvergleich von Rassf Proteinen

Sequenzvergleich von Rassf-Proteinen auf der Basis ihrer Sekundärstruktur(-Vorhersage). Die Grenzen der RA-/RB-Domäne ist mit roten Pfeilen gekennzeichnet. Die Verlängerung von  $\beta 1$  im Vergleich zu anderen RA-/RB-Domänen ist ebenfalls in anderen Rassf-Proteinen konserviert. Grüne gestrichelte Linie: unstrukturierter Bereich in der RapL-Struktur<sup>(432)</sup>. Rot: 100% konserviert, Gelb: 60-80% konserviert.

### 3.2.2 Aufreinigung von RapL

#### Wahl der Konstrukte

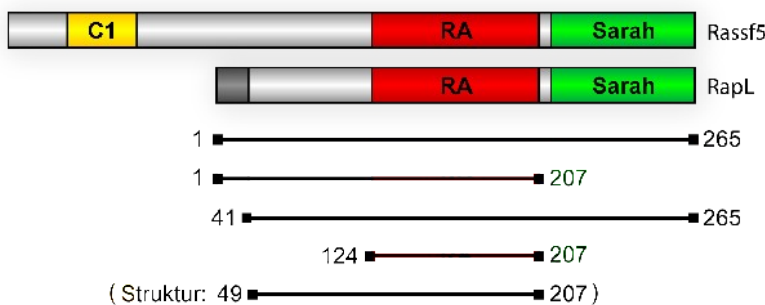


Abbildung 30: Konstrukte von RapL

Wahl der Konstruktgrenzen von RapL. Zum Vergleich ist das Konstrukt, das zur Strukturlösung von RapL geführt hat<sup>(432)</sup>, eingetragen.

Um die Eigenschaften der einzelnen Domänen von RapL zu untersuchen, wurden verschiedene Konstrukte des Proteins hergestellt (Abb. 30). Aufgrund der geringen Homologie zu anderen RA-Domänen Proteinen, war die Bestimmung geeigneter Verkürzungen schwierig. Das Konstrukt RapL (1-265) entspricht dem Volllänge (VL) Protein. Zur Abtrennung der *Coiled-coil*-Domäne



(SARAH) wurde ein Konstrukt von Aminosäure 1 bis 207 gewählt (RapL(1-207)). RapL (41-265) schließt den Bereich aus, der nicht homolog zu Nore1A ist und RapL (124-207) beinhaltet ausschließlich die RA-Domäne, in den von der *Smart*- und der *Pfam*-Datenbank vorhergesagten Grenzen. Zum Vergleich wurde in Abb. 30 ebenfalls das Konstrukt aufgelistet, welches letztendlich zur Lösung der Kristallstruktur von RapL führte<sup>(432)</sup>.

### ***Aufreinigung von RapL***

Der Erfolg der Aufreinigung der RapL-Konstrukte ist in Tabelle 5 angegeben. Es zeigte sich, dass bis auf RapL(124-207) alle Konstrukte (unter Einschränkungen) aufgereinigt werden konnten.

**Tabelle 5: Reinigungserfolg verschiedener RapL-Konstrukte**

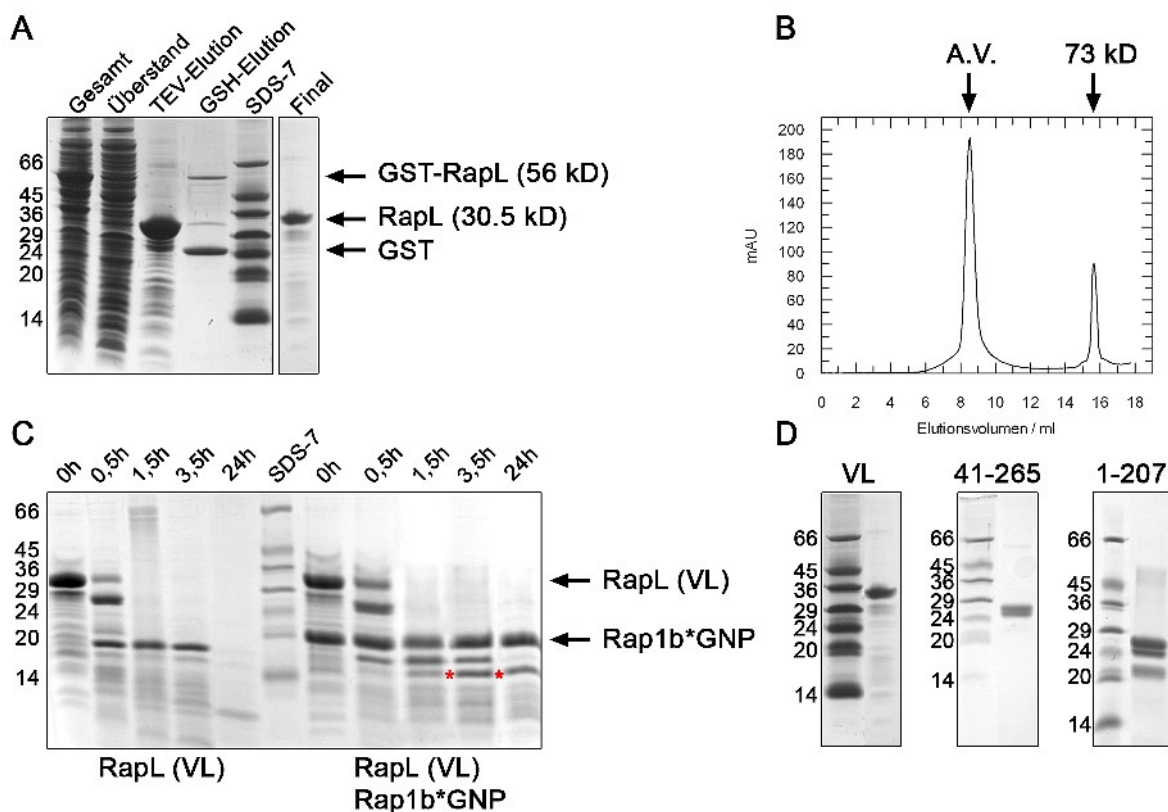
<b>Protein</b>	<b>Konstrukt</b>	<b>Ausbeute</b>	<b>Eigenschaften</b>
RapL	1-265	12mg / 10L TB	Schlecht reproduzierbar
RapL	1-207	28mg / 10L TB	NaCl > 500mM
RapL	41-265	60mg / 10L TB	Sehr gut löslich.
RapL	124-207	unlöslich	

RapL (1-207) war nur unter hoher NaCl-Zugabe löslich (500mM). Auch Veränderung des pHs oder Zugabe von Glycerin änderte die Löslichkeit nicht. Zusätzlich zeigte sich stets geringer Abbau des Proteins, der auch unter Verwendung von Protease-Inhibitoren nicht vermieden werden konnte (Abb. 31D).

RapL (41-265) zeigte sehr gute Löslichkeit und war in hoher Ausbeute zu erhalten (Abb. 31D).

Die Expression und Löslichkeit von RapL (124-207) wurde unter verschiedenen Expressionsbedingungen und in unterschiedlichen Puffern getestet, wobei keine Bedingung gefunden werden konnte, in der dieses Konstrukt im löslichen Überstand verblieben wäre. Auch durch Nachweis des GST-Tags über Western-Blot konnte keine Bande in der löslichen Fraktion identifiziert werden.

Die Reinigung von RapL (VL) war schlecht reproduzierbar und zeigt nur in 50% aller Versuche Erfolg (Abb. 31A), in allen anderen wurde stets unlösliches Protein im Pellet erhalten. Das nur gering lösliche GST-Fusionsprotein konnte durch die Verwendung von GSH-Sepharose angereichert werden (Abb. 31A) und TEV-Spaltung auf der Säule ergab ausreichend reines Protein, welches durch Gelfiltration weiter gereinigt werden konnte. Auf einer analytischen Gelfiltration S200 10/30 lief eine Probe des gereinigten Proteins sowohl im Ausschlussvolumen, als auch als vermeintliches Dimer bei etwa 73kDa (erwartet: 61kDa) (Abb. 31B).



**Abbildung 31: Aufreinigung von RapL**

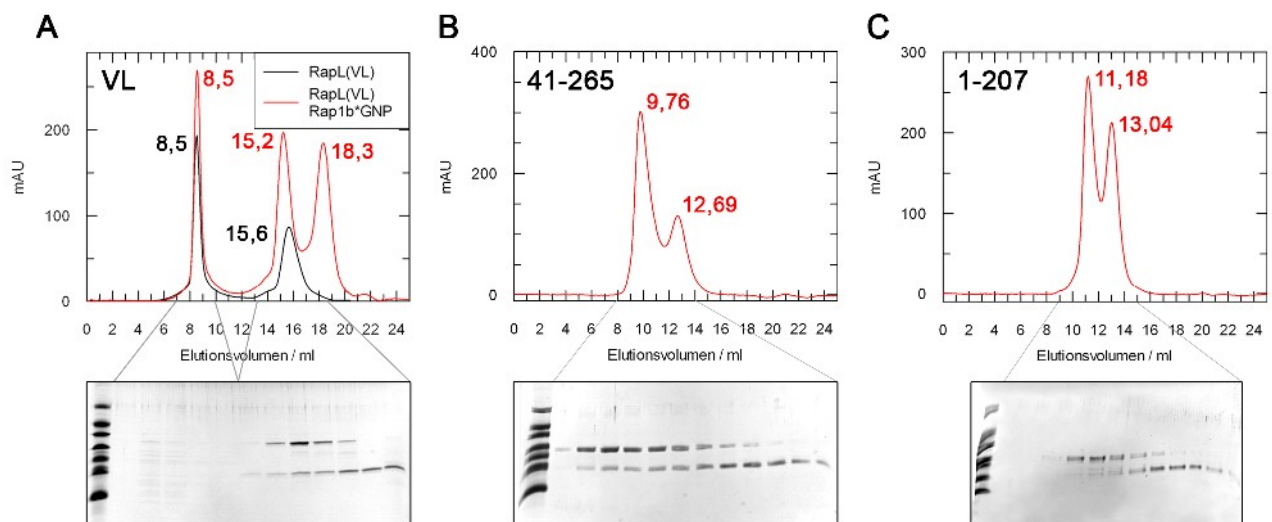
**A:** Exemplarische Reinigung von RapL (VL). Das Fusionsprotein GST-RapL(VL) ist etwa 56 kDa, RapL alleine 30.5 kD und GST 26 kDa groß. **B:** Analytische Gelfiltration (S200 10/30) der finalen RapL (VL) Probe nach der präparativen Gelfiltration. Pufferbedingungen: 50mM Tris pH 7,5, 50mM NaCl, 5mM MgCl<sub>2</sub>, 5mM β-ME. Nach Eichung der Säule kann Peak 1 dem Ausschlussvolumen (A.V.) und Peak2 einer Molmasse von 73 kD zugeordnet werden. **C:** Trypsinierung von RapL (VL) bei Probenentnahme zu den angegebenen Zeitpunkten (Trypsin: 3,3 μg/mg Protein). Linke Hälfte: RapL (VL), rechte Hälfte: RapL(VL)+Rap1B\*GNP. **D:** Finale Reinheit der aufgereinigten RapL-Konstrukte.

### 3.2.3 Interaktion mit Rap1B

Die Interaktion von RapL mit Rap Proteinen ist bereits ausreichend quantifiziert und befindet sich im μM Bereich (siehe Einleitung). Um reines Protein zur Verwendung in der Kristallisation zu erhalten, wurde die Interaktion von RapL mit Rap1B c' (im Folgenden Rap1B genannt) mittels analytischer Gelfiltration untersucht. Sollte hier ein Komplex sichtbar sein, könnte das erhaltene, reine Protein direkt in Kristallisationsansätzen eingesetzt werden.

RapL (VL) eluierte im Komplex mit Rap1B\*GNP früher als RapL (VL) alleine (Abb. 32A). Die Verschiebung um 0,4 ml entsprach auf der verwendeten S200 10/30-Säule etwa 20kDa, während durch die Bindung von zwei Rap1B Molekülen an das RapL-Dimer ein Anstieg um 40 kDa erwartet worden war (14,9 ml). Das SDS-Gel weist auf eine Komplexbildung hin, die entsprechend des Vergleiches der Bandenintensitäten von RapL und Rap nicht eindeutig einem 1:1 Komplex

entspricht. Dies lag wahrscheinlich an einer nicht ausreichend hohen Affinität von RapL (VL) und Rap1B, die eine Dissoziation von Rap1B und RapL ermöglichte. Eine qualitative Überprüfung einer Komplexbildung ergibt sich durch Trypsinisierung eines Ansatzes aus beiden Proteinen, unter der Voraussetzung, dass ein Interaktionspartner (Rap1B\*GNP) deutlich stabiler bei Anwesenheit von Trypsin ist als der andere (Abb. 31C). Während sich bei RapL (VL) ein stabiles Konstrukt bei etwa 10 kDa herausbildet, findet sich unter Anwesenheit von Rap1B\*GNP ein deutlich größeres Fragment bei etwa 15 kDa (Abb. 31C). Dieses entspricht sehr wahrscheinlich der RA-Domäne, die durch die Interaktion mit Rap1B\*GNP vor dem Abbau durch Trypsin geschützt ist. Das Fragment ist kleiner als das stabile Konstrukt, welches zur Strukturlösung des RapL-Ras-Komplexes eingesetzt wurde und noch weitere RA-unabhängige Strukturmerkmale aufweist<sup>(432)</sup>.



**Abbildung 32: Analytische Gelfiltration von RapL-Rap1B Komplexen**

Gelfiltrationsläufe verschiedener RapL-Konstrukte mit Rap1B\*GNP. Die Proteinkonzentrationen betragen stets 100µM RapL und 150µM Rap1B als Ausgangskonzentration. Puffer: 50mM Tris pH 7,5, 50mM NaCl, 5mM MgCl<sub>2</sub>, 5mM β-ME, 0.2mM GppNHp. **A:** Gelfiltrationslauf (S200, 10/30) von RapL(VL)+Rap1B\*GNP (rotes Profil) im Vergleich zu RapL(VL) alleine (schwarzes Profil). Es ist deutlich eine Verschiebung des Absorptionsmaximums von 15,6 zu 15,2 zu erkennen. Ausgewählte Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE analysiert. **B:** Analyse von RapL(41-265) mit Rap1B\*GNP auf einer S75 10/30-Säule. **C:** Gelfiltrationslauf von RapL(1-207) und Rap1B\*GNP auf einer S75 10/30-Säule. Hier wurde eine NaCl-Konzentration von 500mM eingesetzt.

Die Reinigung des Komplexes aus RapL (41-265) und Rap1B\*GNP war erfolgreich (Abb. 32B). Gemäß der SDS-PAGE eluierten beide Proteine bei einem Elutionsvolumen von 9,76 ml, was einer apparenten Molekülmasse von 74 kDa entsprach. Die Molmasse eines 2:2 Komplexes betrüge 91,4 kDa, was ebenfalls wieder um etwa 20 kDa höher läge. Die Elution von ungebundenem Rap1B bei 12,69 ml entsprach einer Molmasse von 22 kDa.

Bei dem RapL (1-207) Konstrukt konnte keine Komplexbildung beobachtet werden, was sehr wahr-

scheinlich auf den hohen NaCl-Gehalt von 500 mM im Gelfiltrationspuffer zurückzuführen ist, der für eine ausreichende Löslichkeit von RapL (1-207) verwendet werden musste. Die Elution von RapL (1-207) bei 11,18ml (entspricht 41,6 kDa) konnte ebenfalls wieder der Molekülmasse eines RapL-Dimers (47,4 kDa) zugeordnet werden.

Die den RapL-Rap1B Komplex enthaltenden Fraktionen der erfolgreichen Gelfiltrationen wurden vereinigt und in Kristallisationsansätzen eingesetzt. Es konnten jedoch keine Proteinkristalle erhalten werden.

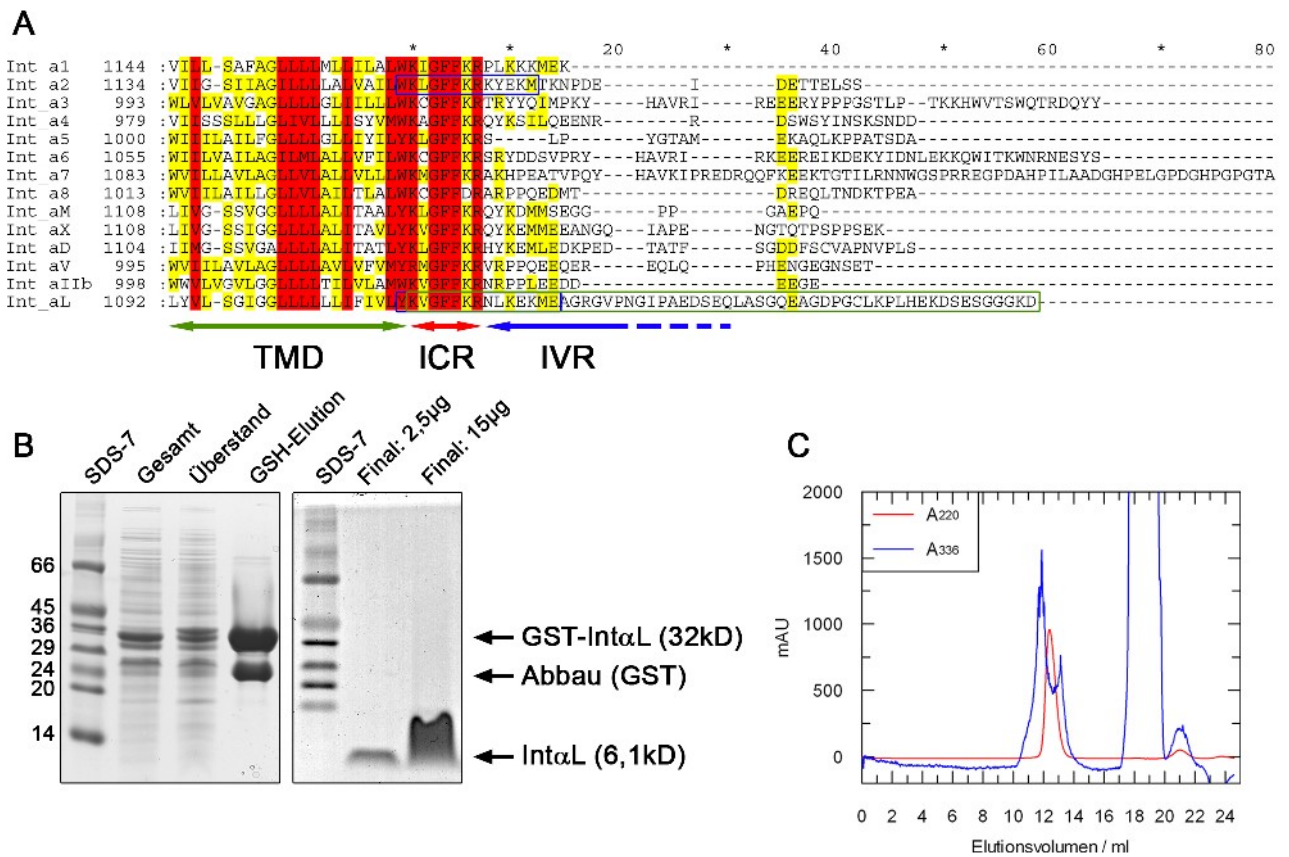
### 3.2.4 Aufreinigung des zytoplasmatischen Teils von Integrinen

Der Vorschlag, dass RapL einen Komplex mit der  $\alpha$ -UE von Integrinen ausbildet<sup>(431)</sup>, wurde mit rekombinant aufgereinigten Proteinen *in vitro* untersucht.

Hierfür wurde der vollständige zytoplasmatische Teil der  $\alpha$ -UE (Abb. 33A, grüne Box) im *E. coli* Expressionssystem als GST-Fusionsprotein aufgereinigt (GST-Int  $\alpha$ L) und konnte nur mit 50%-iger Reinheit erhalten werden, da reines GST nicht von GST-Int aufgrund des geringen Größenunterschieds getrennt werden konnte. Die Abtrennung von Int  $\alpha$ L mittels TEV ergab anschließend reineres Protein (Abb. 33B). Im SDS-Gel lief die Proteinbande bei etwa 10 kDa mit einer höheren apparenten Molmasse als erwartet (6,5 kDa). Um die Identität des Proteins zu klären, wurde ein ESI-MS Spektrum aufgenommen, welches die Molmasse mit 6833 Da bestätigte.

Für spätere Interaktionsstudien wurde das Protein mit dem Fluorophor Iaedans an das einzige vorhandene Cystein (C1070) des Konstrukts gekoppelt und der Kopplungserfolg durch Absorptionsmessung bei der Anregungswellenlänge von Aedans (336 nm) während der zur Abtrennung des überschüssigen Farbstoffs eingesetzten Gelfiltration durchgeführt (Abb. 33C). Eine quantitative Abschätzung der Ausbeute war nicht möglich, da kein Tryptophan vorhanden ist, welches eine hinreichend genaue Proteinkonzentrationsbestimmung über A280 ermöglichen würde. Ein Vergleich mit der deutlich ungenaueren Methode nach Bradford ergab eine Ausbeute von 58% markierten Proteins.

Zwei weitere Integrinkonstrukte wurden durch die Direktsynthese der Peptide der konservierten zytoplasmatischen Region von Integrin  $\alpha$ L und Integrin  $\alpha$ 2 (Abb. 33A, blaue Boxen) durch die Firma Genscript (New Jersey) erhalten. Diese waren an ihrem C-terminalen Aspartat mit Edans, einem Derivat von Aedans, markiert.



**Abbildung 33: Aufreinigung der  $\alpha$ -Untereinheit von Integrinen**

**A:** Sequenzvergleich des zytoplasmatischen Bereichs der Integrin  $\alpha$ -Untereinheit, beginnend mit der Transmembrandomäne (TMD). Die *Integrin conserved region* (ICR) befindet sich zwischen dem membranständigen Teil und der variablen Region (IVR). Die Sequenz des rekombinant aufgereinigten  $\alpha$ L-Teils ist grün umrahmt, die synthetisierten Peptide von  $\alpha$ 2 und  $\alpha$ L sind mit einem blauen Rahmen gekennzeichnet. **B:** Aufreinigung der vollständigen zytoplasmatischen Domäne von Integrin  $\alpha$ L. **C:** Gelfiltration (S75 10/30) zur Aufreinigung des Aedans-markierten Int  $\alpha$ L-Konstrukts. Rotes Profil: Absorption bei 220nm, blaues Profil: Absorption bei der Anregungswellenlänge von Aedans (336nm). Puffer: 50 mM Tris pH 7,5, 100 mM NaCl, 5 mM  $\text{CaCl}_2$ , 5 mM  $\beta$ ME.

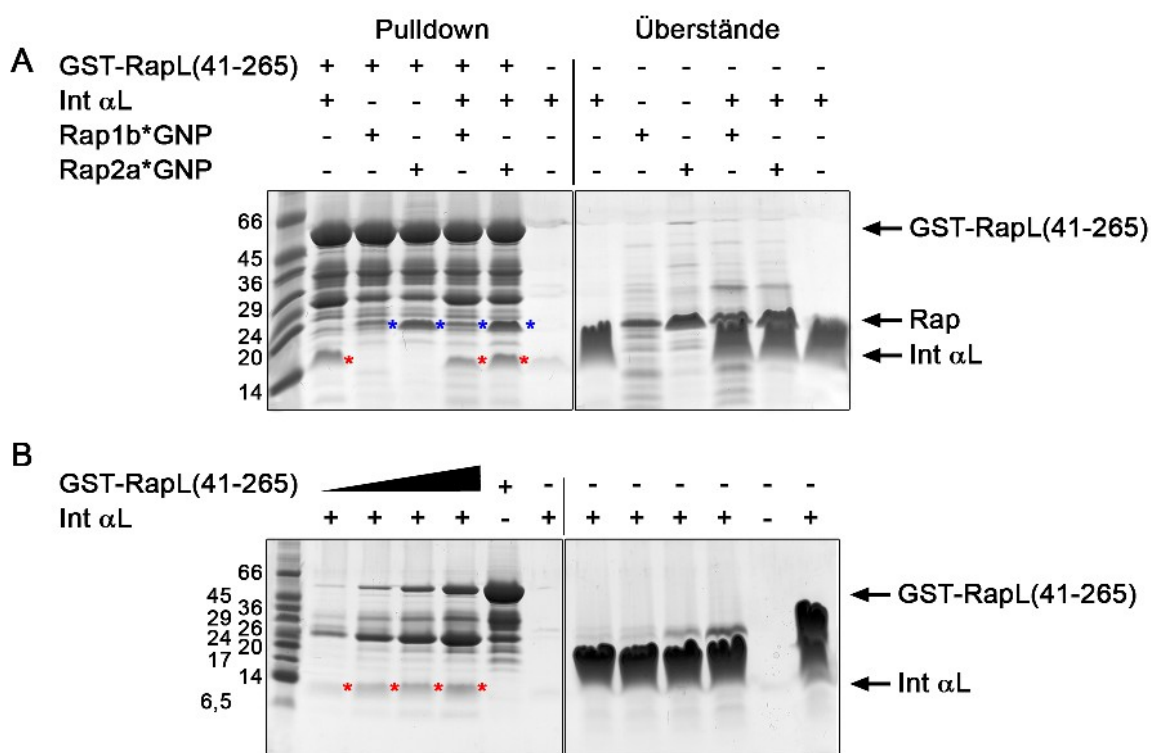
### 3.2.5 Interaktion von RapL und Integrin

Zur qualitativen Untersuchung der Interaktion von Integrinen mit RapL wurden *Pulldown*-Experimente durchgeführt. Hierzu wurden RapL (41-265) bzw. Int  $\alpha$ L als GST-Fusionsprotein an GSH-Sepharose immobilisiert und die entsprechenden Interaktionspartner zugegeben. Dabei zeigte sich, dass Int  $\alpha$ L mit GST-RapL (41-265) interagiert (Abb. 34A, rote Markierung). Um die Interaktion zu verifizieren wurde bei gleichbleibendem GSH-Sepharose-Anteil und gleichbleibendem Überschuss von Int  $\alpha$ L eine ansteigende GST-RapL (41-265) Konzentration eingesetzt (Abb. 34B, linker Teil). Im Ergebnis wurde eine parallel zur GST-RapL Konzentration ansteigende Menge an gebundenem Int  $\alpha$ L beobachtet (Abb. 34B, rote Markierung). In der Kontrolle ist kein Int  $\alpha$ L zu beobachten.

Im Gegensatz zu bisher beschriebenen Ergebnissen<sup>(431)</sup> erforderte die Interaktion von Int  $\alpha$ L und GST-RapL (41-265) nicht die Anwesenheit von Rap1B\*GNP oder Rap2A\*GNP, die zwar mit GST-RapL interagierten, jedoch unabhängig von Int  $\alpha$ L (Abb. 34A, blaue Markierung).

Die umgekehrte Anordnung, Immobilisation von GST-Int  $\alpha$ L und Zugabe von RapL, zeigte ebenfalls eine deutliche Interaktion beider Proteine (Abb. 34C). Die Kontrollen waren zwar nicht eindeutig negativ (Abb. 34C,D, grüne Markierungen), jedoch ist die Bande von RapL mit GST-Int  $\alpha$ L stärker als ohne GST-Int  $\alpha$ L. Auch hier war die Interaktion abermals unabhängig von Rap1B\*GNP oder Rap2A\*GNP, die auch nicht gemeinsam mit RapL (41-265) an GST-Int  $\alpha$ L banden, im Gegensatz zur umgekehrten Anordnung (Abb. 34A). Eine konzentrationsabhängige Interaktion von GST-Int  $\alpha$ L und RapL (41-265) konnte ebenfalls beobachtet werden (Abb. 34D).

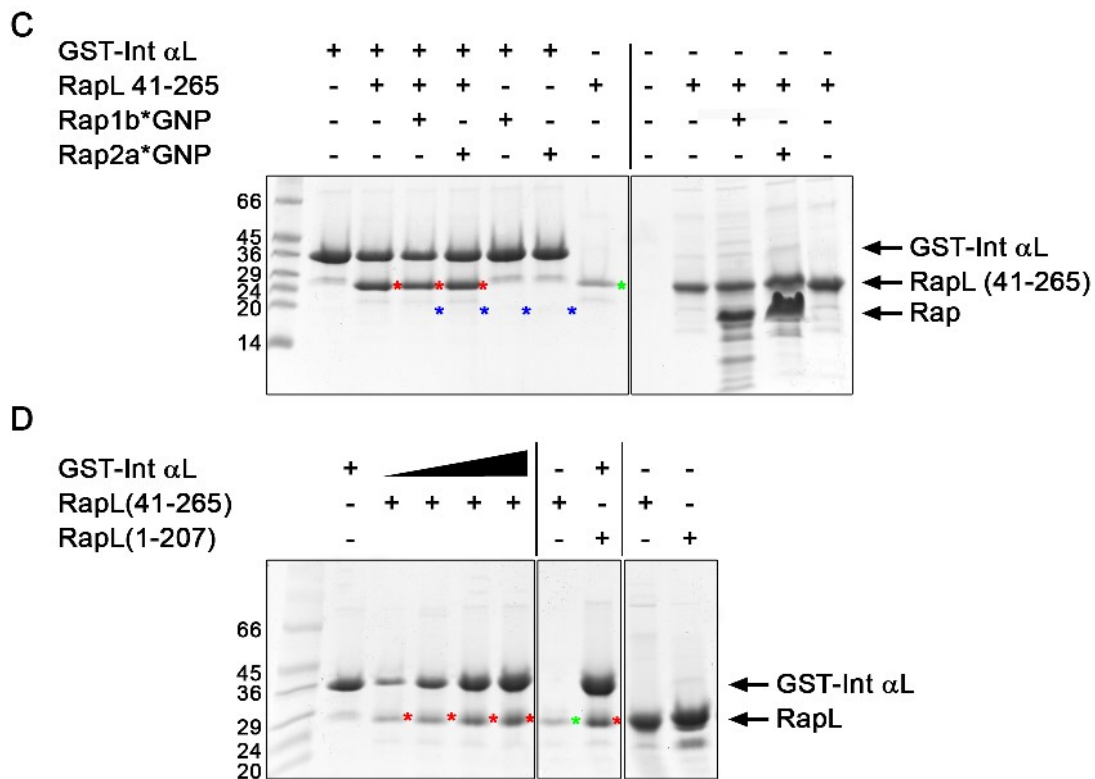
Das Konstrukt RapL (1-207), welches zusätzlich zur RA-Domäne auch den N-Terminus einschließt (Abb. 30) interagiert ebenfalls mit GST-Int  $\alpha$ L (Abb. 34D); ein Hinweis darauf, dass sich die Interaktionsfläche von RapL zu Int  $\alpha$ L sehr wahrscheinlich zwischen AS 41 und 207, also der RA-Domäne, befindet.



**Abbildung 34: Qualitative Untersuchung der Interaktion von RapL mit Integrin  $\alpha$ L**

**A:** Interaktion von GST-RapL (41-265) mit Int  $\alpha$ L, Rap1B\*GNP und Rap2A\*GNP. Sowohl Rap1B als auch Rap2A (blaue Markierung) binden an GST-RapL. Int  $\alpha$ L (rote Markierung) zeigt eine Rap-unabhängige Interaktion mit GST-RapL (41-265). Rechte Hälfte: Überstände nach der Inkubation der Interaktionspartner mit GSH-Sepharose. **B:** Bestimmung der Konzentrationsabhängigkeit der Interaktion von GST-RapL mit Int  $\alpha$ L (rote Markierung) bei gleichbleibender Konzentration der GSH-Sepharose. Rechte Hälfte: Überstände nach der Inkubation.



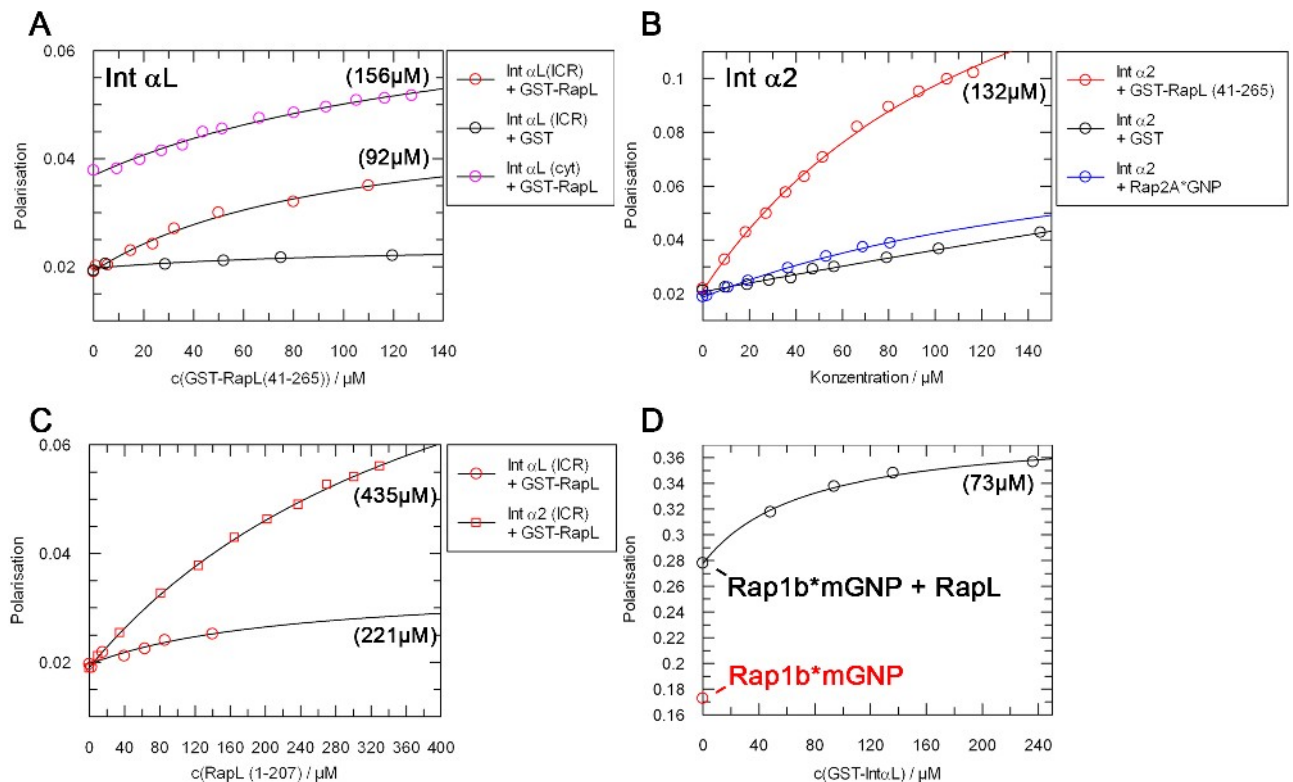


**Abbildung 34-Teil 2: Qualitative Untersuchung der Interaktion von RapL mit Integrin  $\alpha$ L**

**C:** Interaktion von GST-Int  $\alpha$ L mit RapL (41-265). Die Bindung von RapL (41-265) ist unabhängig von Rap Proteinen (rote Markierung). Allerdings wird kein Rap zusammen mit RapL an GST-Int  $\alpha$ L gebunden (blaue Markierung). Die Kontrolle ohne GST-Int  $\alpha$ L zeigt ebenfalls eine geringe RapL Konzentration (grüne Markierung). Rechte Seite: Überstände nach der Inkubation der Reaktionspartner. **D:** Linker Teil: Konzentrationsabhängige Interaktion von GST-Int  $\alpha$ L mit RapL (41-265) (rote Markierung) bei gleichbleibender GSH-Sepharose Konzentration. Die Kontrolle von RapL (41-265) zeigt ebenfalls eine schwache Bande (grüne Markierung), trotz der Abwesenheit von GST-Int  $\alpha$ L. Mittlerer Teil: Interaktion von GST-Int  $\alpha$ L mit RapL (1-207). Rechter Teil: Überstände der Ansätze des mittleren Teils. Verwendeter Puffer bei allen Reaktionen: 50 mM Tris pH 7,5, 100 mM NaCl, 5 mM  $\text{CaCl}_2$ , 5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 5 mM  $\beta$ ME.

Die Quantifizierung der Affinität zwischen RapL und rekombinant aufgereinigtem Int  $\alpha$ L (cyt) erforderte eine ausreichende Aedans-Markierung von Int  $\alpha$ L mit mehr als 50% Ausbeute und eine vollständig Abtrennung des überschüssigen Fluorophors über Gelfiltration um überhaupt ein Polarisationssignal zu erhalten (Abb. 35A). Durch Titration mit GST-RapL (41-265) wurde eine Affinität von 156  $\mu\text{M}$  bestimmt (Tabelle 6), wobei Sättigung aufgrund der geringen Affinität nicht erreicht werden konnte. Titration des kürzen, synthetischen Konstrukts von Int  $\alpha$ L (ICR) mit GST-RapL (41-265) ergab eine Affinitätskonstante von 92  $\mu\text{M}$ . Die Differenz des Startwerts liegt in unterschiedlichen Massen, verschiedenen Kopplungen und Kopplungspositionen (Cys vs. Glu) zwischen den beiden eingesetzten Konstrukten begründet.





### Abbildung 35: Quantifizierung der Interaktion von RapL mit Integrinen

Messung von Integrin-Peptiden ( $5\mu\text{M}$ ) mit GST-RapL-Konstrukten. Die ermittelten Affinitäten sind in Klammern angegeben. (Puffer: 50 mM Tris pH 7,5, 50 mM NaCl, 5 mM  $\beta$ -ME) **A:** Polarisationsmessung von Aedans-Int  $\alpha$ L(cyt) und Edans-Int  $\alpha$ L(ICR) mit GST-RapL (41-265). **B:** Polarisationsmessung von Edans-Int  $\alpha$ 2 mit GST-RapL (41-265) (rote Kurve). Als Kontrolle diente die Zugabe von Rap2A\*GNP (blau) und GST (schwarz). **C:** Polarisationsmessung von Aedans-Int  $\alpha$ L(ICR) ( $\circ$ ) bzw. Edans-Int  $\alpha$ 2(ICR) ( $\square$ ) mit RapL (1-207). **D:** Bildung eines ternären Komplexes. Hier wurden  $1\mu\text{M}$  Rap1b\*mGNP vorgelegt (rot) und  $10\mu\text{M}$  RapL (41-265) zugegeben. Anschließend wurde GST-Int  $\alpha$ L zutitriert.

Völlig andere Eigenschaften zeigte das synthetische Peptid der  $\alpha$ 2-Isoform von Integrinen (ICR). Der Polarisationsanstieg war um das 10-fache höher als mit Int  $\alpha$ L (Abb. 35B), bei gleichem Startwert. Die Affinität zwischen Edans-Int  $\alpha$ 2 und RapL (41-265) lag vergleichbar bei  $132\mu\text{M}$  (Abb. 35B, rot). Um ein Artefakt und unspezifische Bindung auszuschließen, wurden GST und Rap2A\*GNP ebenfalls zutitriert. Die Änderung des Polarisationssignals war deutlich geringer als mit RapL (Abb. 35B), so dass von einer spezifischen Bindung von RapL an Edans-Int  $\alpha$ 2 ausgegangen werden kann. Die Intensitätszunahme während der GST-Titration erfolgte möglicherweise durch eine Änderung der Lösungsviskosität, die die Rotationsdiffusionskonstante beeinflusst (siehe 4.7, S. 144). Dementsprechend folgten die Signale der GST-Titration auch keiner Sättigungsfunktion (Tabelle 6). Für Rap2A\*GNP wurde zwar ein  $K_D$  von  $192\mu\text{M}$  ermittelt, die Titration ist jedoch nicht annähernd gesättigt und im Vergleich zu RapL deutlich geringer im maximalen Polarisationswert.

Bemerkenswert ist der Unterschied des maximalen Polarisationswerts zum Ende der Titration zwischen den beiden Integrin-Isoformen, der bei Int  $\alpha 2$  um das 10-fache höher ausfällt als bei Int  $\alpha L$ ; sowohl durch Zugabe von GST-RapL (41-265) als auch GST (Tabelle 6).

Die Bestimmung der Affinität zwischen Edans-Int  $\alpha 2$  und RapL (1-207) war nur in Niedrig-Salzpuffer (50mM) möglich, da sich sonst keine Signaländerung ergab. Da RapL (1-207) unter diesen Bedingungen nur eine geringe Löslichkeit zeigte, sind die ermittelten  $K_D$ -Werte von 435  $\mu M$  und 221  $\mu M$  fraglich (Tabelle 6), obwohl der Verlauf einer Sättigungsfunktion entspricht (Abb. 35C).

Um die Bildung eines ternären Komplexes nachzuweisen, wurden 1  $\mu M$  Rap1B\*mGNP und 10  $\mu M$  RapL (41-265) vorgelegt und GST-Int  $\alpha L$  zutitriert (Abb. 35D). Unter diesen Bedingungen wurde ein Polarisationsignal erhalten, welches eine Affinität von 73  $\mu M$  ergab. Allerdings handelt es sich hierbei, aufgrund der Affinität im  $\mu M$ -Bereich, nicht um einen gesättigten Komplex aus Rap1B\*mGNP und RapL. Wurde ein ausreichend hoher Überschuss RapL zugegeben, um das Polarisationsignal von Rap1B\*mGNP mit RapL abzusättigen, konnte keine Signaländerung mehr durch Zugabe von GST-Int  $\alpha L$  erhalten werden (Daten nicht gezeigt). Ein weiterer Hinweis darauf, dass RapL an GST-Int  $\alpha L$  Rap-unabhängig bindet und sozusagen „wegfängt“.

**Tabelle 6: Ermittelte Werte der Polarisations Titration von Integrinen und RapL**

Vorgelegter Partner	Interaktions-Partner	Titration	$K_D$	Polarisations-Startwert	Polarisations-Endwert
Integrin $\alpha L$ (cyt) (rek.)		GST-RapL (41-265)	156 $\mu M$	0,0369	0,0711
Integrin $\alpha L$ (ICR) (synth.)		GST-RapL (41-265)	92,5 $\mu M$	0,0192	0,0485
Integrin $\alpha L$ (ICR) (synth.)		GST-RapL (1-207)	221 $\mu M$	0,0196	0,0342
Integrin $\alpha 2$ (synth.)		GST-RapL (41-265)	132 $\mu M$	0,0211	0,2000
Integrin $\alpha 2$ (synth.)		GST	1585 $\mu M$	0,0207	0,2824
Integrin $\alpha 2$ (synth.)		Rap2A*GNP	192 $\mu M$	0,0186	0,0888
Integrin $\alpha 2$ (synth.)		RapL (1-207)	435 $\mu M$	0,0191	0,1053
Rap1B*mGNP-RapL (41-265)		GST-Int $\alpha L$	73,3 $\mu M$	0,2776	0,3832

Eine Messung der Interaktion von Edans-Int  $\alpha 2$  mit GST-RapL (41-265) bei Anwesenheit einer sättigenden Konzentration von Rap1A\*GNP oder Rap2A\*GNP führte nicht zu auswertbaren Daten (Daten nicht gezeigt), während dies bei Abwesenheit von Rap Proteinen möglich war (Abb. 35B). Die Zugabe von Rap Proteinen zu einem Ansatz aus Edans-Int  $\alpha 2$  bei sättigender Konzentration von GST-RapL (41-265) führte ebenfalls nicht zu einer Änderung des Polarisationssignals (Daten nicht gezeigt).

### 3.3 Arap-Proteine

#### 3.3.1 Sequenzvergleich

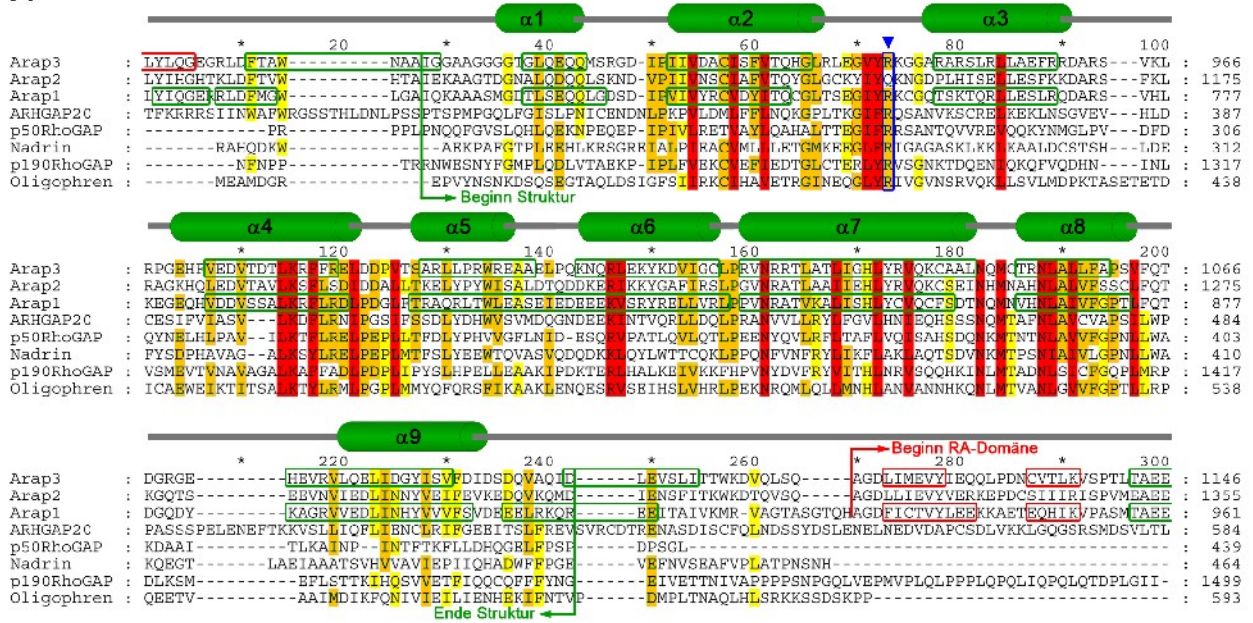
Die Familie der *ArfGAP*-, *RhoGAP*-, *Ankyrin-Repeat domain proteins* (ARAP) besteht aus drei Mitgliedern. Während von Arap2 und Arap3 nur jeweils eine Isoform bestätigt wurde, konnten von Arap1 sechs verschiedene Isoformen identifiziert werden, die sich hauptsächlich im N-Terminus unterscheiden (Quelle: *UniProt* Datenbank). Im Folgenden wird die Isoform 1 von Arap1 (1-1210) als Arap1 bezeichnet.

Die Sequenzidentität der verschiedenen Proteine ist hoch. Arap1 zu Arap2 weist 28% Identität, Arap2 zu Arap3 29% und Arap1 zu Arap3 27% Identität auf (vollständiges Alignment, siehe Anhang), die hauptsächlich über die ArfGAP und die RhoGAP-Domäne vermittelt werden.

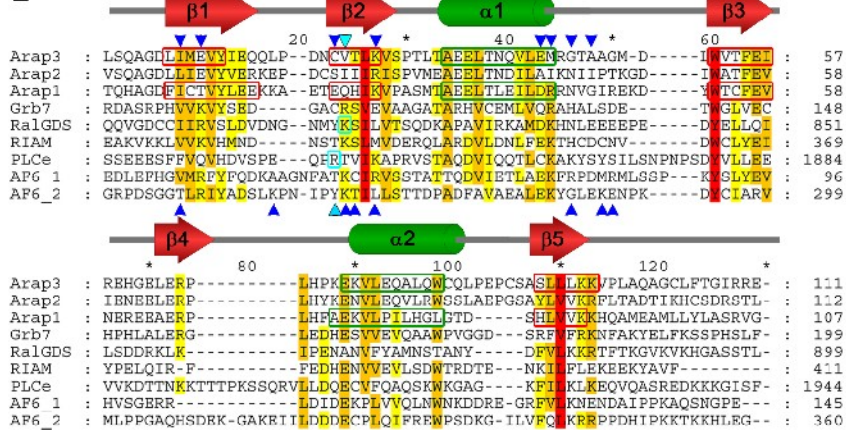
Ein Vergleich der RhoGAP-Domänen untereinander und mit anderen RhoGAP-Domänen, zeigt die typische hohe Konservierung dieser Domänen, insbesondere im Bereich des katalytischen Arginins, welches in Arap2 jedoch nicht vorhanden ist (Abb. 36A). Die Vorhersage der Sekundärstruktur von Arap1 und Arap3 deckt sich gut mit den bekannten Strukturen von GAP-Domänen. Während die GAP-Domänen untereinander eine Sequenzidentität von 40-48% aufweisen, besteht die höchste Homologie von Arap1 zu p190RhoGAP und Oligophrenin (21%) und von Arap3 ebenfalls zu p190RhoGAP (20%).

Der Vergleich der RA-Domänen von Arap2 und Arap3 ergibt eine Homologie von 44%, während beide nur noch 33% identisch mit Arap1 sind. Zu anderen RA-Domänen besitzen Arap1, Arap2 und Arap3 eine geringe Sequenzidentität mit maximal 17% zu Grb7 (Abb. 36B). Eine genauere Analyse zeigt, dass die Reste, die in RalGDS oder PLC $\epsilon$  maßgeblich an der Interaktion mit dem G Protein beteiligt sind, in Arap1, Arap2 und Arap3 nur zum Teil konserviert sind (Abb. 36B, blaue Pfeile). Insbesondere ist die zentrale positive Ladung im  $\beta$ 2-Strang in Arap1-3 nicht konserviert (Abb. 36B, cyan). In RB-Domänen, wie Raf<sup>(380)</sup> oder PI3K<sup>(424)</sup> ist dieser Rest jedoch ebenfalls nicht konserviert, bzw. in der Struktur nicht an gleicher Stelle lokalisiert (Daten nicht gezeigt).

A



B



C

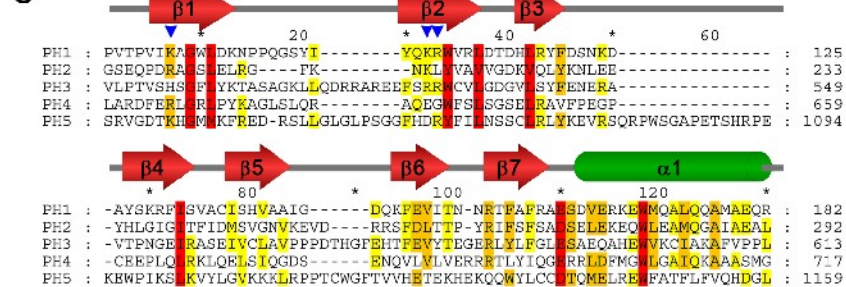


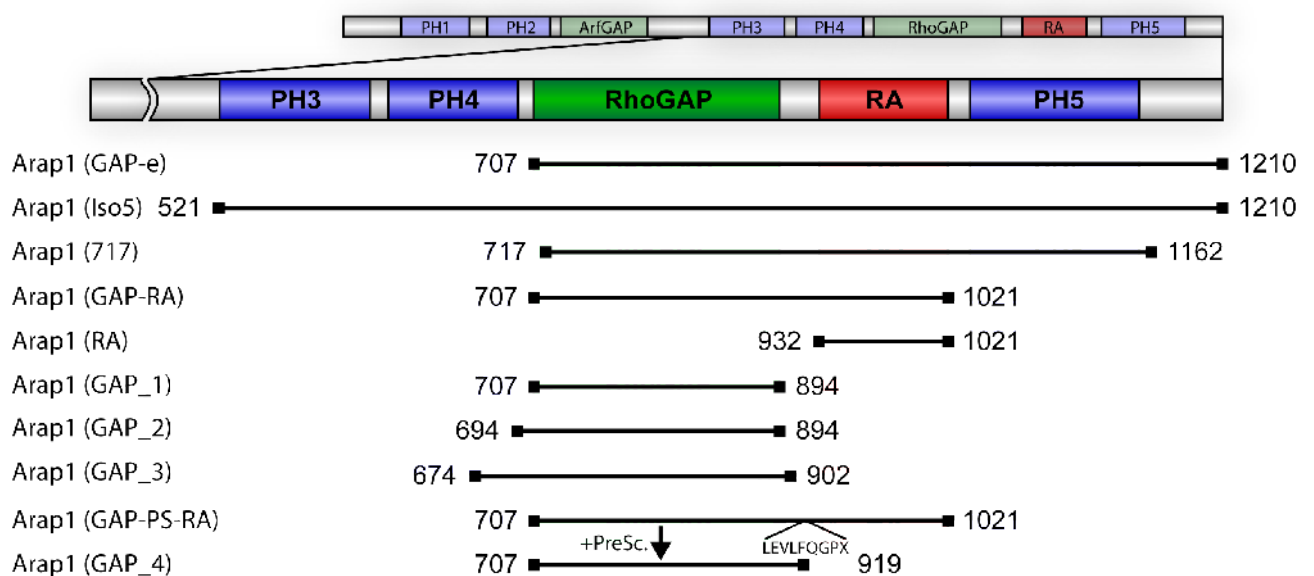
Abbildung 36: Sequenzvergleich von Arap Proteinen

Sequenzvergleich von Arap Proteinen mit anderen Proteinen. α-Helices (grün) und β-Faltblätter (rot) der GAP-Domäne von Graf1 sind angezeigt. Die grünen und roten Quadrate zeigen die vorhergesagte Sekundärstruktur von Arap1 und Arap3 an. **A:** Vergleich der RhoGAP-Domänen. Das konservierte Arginin ist blau gekennzeichnet. Der Beginn und das Ende der Struktur von Graf1 sind eingezeichnet. **B:** Vergleich der RA-Domänen. Pfeile der oberen Reihe: Interagierende Reste von RalGDS mit Ras(E31K)<sup>(483)</sup>. Pfeile der unteren Reihe: Interagierende Reste von PLCε mit Ras<sup>(484)</sup>. Cyan zeigt die Reste mit dem höchsten Beitrag zur Affinität. **C:** Vergleich der PH-Domänen von Arap1. Die blauen Pfeile markieren positiv geladene Reste in β1 und β2. Die angedeuteten Strukturmerkmale sind Vorhersagen des PHYRE-Servers.

Der Vergleich der PH-Domänen von Arap1 zeigt eine nur geringe Konservierung, bei gleichzeitiger hoher Konservierung der Sekundärstruktur (Abb. 36C). Die Zuordnung der Sekundärstruktur zur Sequenz der einzelnen PH-Domänen erfolgte mittels des *Threading-Servers Phyre*. Die von Lemmon<sup>(482)</sup> vorgeschlagenen positiv geladenen Reste, die zur Bindung von Phosphoinositolen notwendig sind, sind nur teilweise in PH1, PH3 und PH5 vorhanden (Abb. 36C, blaue Markierung). Das zusätzliche Lysin in  $\beta 2$  fehlt jedoch bei allen, während das Lysin aus  $\beta 1$  nur in PH1 und PH5 vorhanden ist.

### 3.3.2 Aufreinigung von Arap1

#### Wahl der Konstrukte



**Abbildung 37: Konstrukte von Arap1**

Wahl der Konstruktgrenzen von Arap1 (Isoform 1).

Aufgrund der Größe von Arap1 mussten kleinere Konstrukte hergestellt werden, um eine Expression in *E. coli* zu gewährleisten (Abb. 37). Eine Expression des Volllängen-Konstrukts in *Sf9*-Zellen ist nicht möglich (mündliche Mitteilung, Dr. Sonja Krugmann). Demzufolge wurden Fragmente gewählt, die stets den Bereich der RhoGAP-Domäne und/oder der RA-Domäne abdecken. Arap1 (GAP-e) schließt die RhoGAP-Domäne, die RA-Domäne, die fünfte PH-Domäne und den Bereich bis zum Ende des Proteins ein. Arap1 (Iso5) entspricht der 5. Isoform von Arap1, die bei der dritten PH-Domäne beginnt und ansonsten eine gleiche Sequenz wie Isoform 1 aufweist. Das Konstrukt Arap1 (717) entspricht dem Fragment von Arap3 (GAP-RA-PH) (s.u.). Arap1 (GAP-RA) ist das kleinste Konstrukt, welches sowohl die RA-Domäne als auch die RhoGAP-Domäne



einschließt. Das Konstrukt von 932-1021 beinhaltet nur die RA-Domäne, während von der GAP Domäne drei verschieden lange Konstrukte hergestellt wurden. Ein weiteres Konstrukt, Arap1 (GAP-PS-RA), entspricht dem Arap1 (GAP-RA)-Konstrukt, weist jedoch zusätzlich eine *PreScission*-Schnittstelle zwischen der RhoGAP und der RA-Domäne auf (AS 919). Das dadurch entstehende GAP-Konstrukt wurde als GAP\_4 bezeichnet.

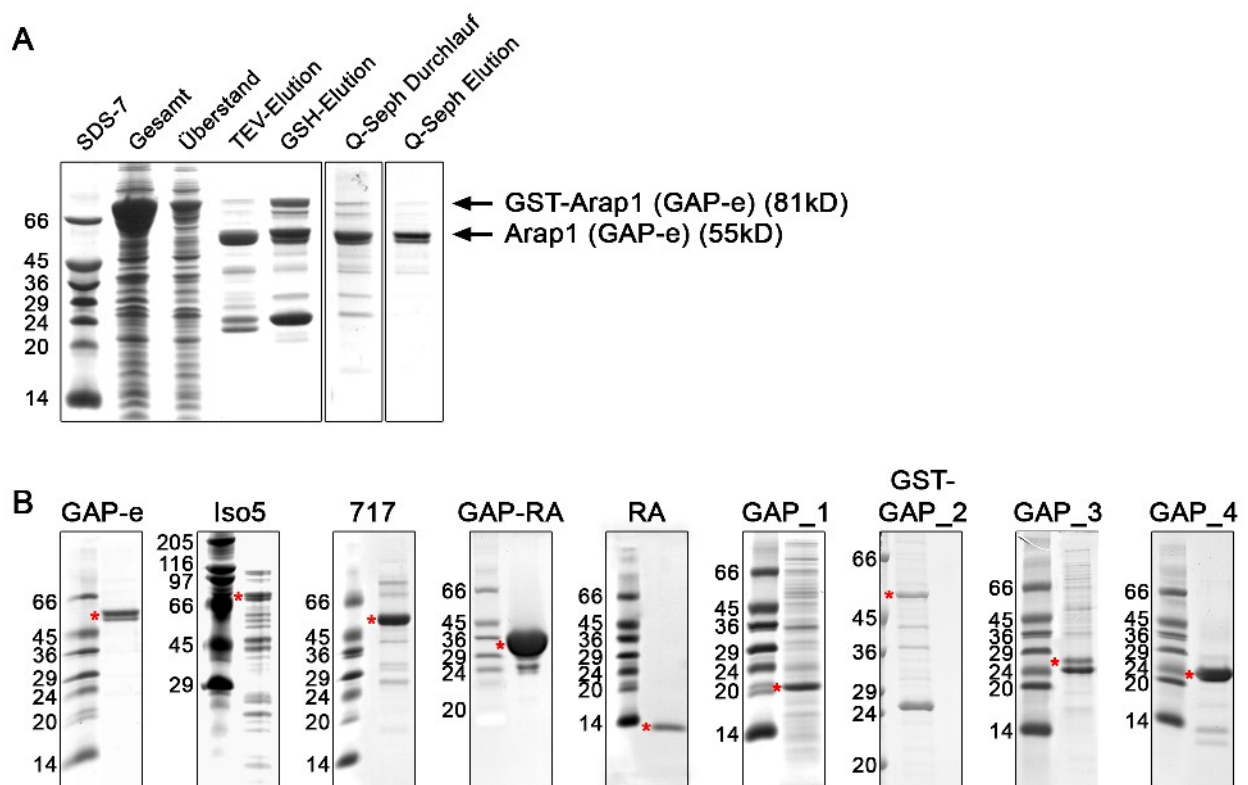
### ***Aufreinigung von Arap1***

Der Erfolg der Aufreinigungen ist in Tabelle 7 angegeben.

**Tabelle 7: Reinigungserfolg verschiedener Arap1-Konstrukte**

<b>Protein</b>	<b>Konstrukt</b>	<b>Ausbeute</b>	<b>Eigenschaften</b>
Arap1	GAP-e	15mg / 10L TB	Abbau, Zwischenschritt Q-Sepharose notwendig, Elution als Dimer
Arap1	Iso5	21mg / 10L TB	Läuft im Ausschlussvolumen der Gelfiltration
Arap1	717	53mg / 10L TB	Sehr unrein
Arap1	GAP-RA	31-150mg / 10L TB	Sehr gute Löslichkeit, Abbaubande
Arap1	RA	124mg / 10L TB	Starke Abhängigkeit von Reduktionsmitteln
Arap1	GAP_1	11mg / 10L TB	Läuft im Ausschlussvolumen der Gelfiltration
Arap1	GAP_2	13mg / 10L TB	Nur als Fusionsprotein isolierbar Läuft im Ausschlussvolumen der Gelfiltration
Arap1	GAP_3	1,7mg / 10L TB	Sehr unlöslich. Keine Gelfiltration möglich.
Arap1	GAP-PS-RA	23 mg / 10L TB	Gleiches Verhalten wie GAP-RA
Arap1	GAP_4	15 mg / 10L TB	Erhalten durch PreScission-Spaltung von GAP-PS-RA und Abtrennung der RA-Domäne

Der Reinigungserfolg der Konstrukte war sehr unterschiedlich, wobei die gewählten Konstrukte durchgängig zumindest in geringen Ausbeuten löslich waren. In Abb. 38A ist die Reinigung von Arap1 (GAP-e) exemplarisch gezeigt. Die Überexpression des Konstrukts war sehr stark, wie bei allen Arap1 Konstrukten, allerdings verblieb nur ein geringer Teil im löslichen Überstand. Die Trennung von Arap1 (GAP-e) mit TEV auf der Säule ergab etwa 30 mg geschnittenes Protein, bei dem stets Abbauprodukte detektiert wurden, die im Verlauf der Aufreinigung verstärkt auftraten. Die Abtrennung abbauender Proteasen und Verunreinigungen wurde über den zusätzlichen Schritt eines Ionenaustauschers erfolgreich durchgeführt und die Elution mit 500 mM NaCl ergab deutlich reineres Protein (Abb. 38A), welches durch die angefügte Aufreinigung über Gelfiltration in den gewünschten Puffer mit noch höherer Reinheit überführt werden konnte. Eine geringfügige Abbaubande konnte jedoch nie verhindert werden (Abb. 38B).



**Abbildung 38: Aufreinigung von Arap1**

**A:** Aufreinigung von Arap1 (GAP-e). Das Fusionsprotein wurde auf der Säule mit TEV geschnitten und anschließend eluiert (TEV-Elution). GSH-Elution: Elution des auf der Säule verbliebenen Proteins mit GSH. Von der anschließenden Q-Sepharose ist der Durchlauf des Auftrags und die Elution mit 500 mM NaCl gezeigt. **B:** Finale Reinheit der verschiedenen Arap1-Konstrukte. Die rote Markierung kennzeichnet das gewünschte Protein. (Für genaue Pufferbedingungen, siehe Anhang)

Die Aufreinigung des 78 kDa Proteins Arap1 (Iso5) gestaltete sich als schwierig, da das Konstrukt stets im Ausschlussvolumen der Gelfiltrationssäule eluierte und nur sehr unrein erhalten werden konnte (Abb. 38B). Das Konstrukt Arap1 (717) eluierte zwar nicht im Ausschlussvolumen, konnte jedoch ebenfalls nicht mit der gewünschten Reinheit erhalten werden.

Arap1 (GAP-RA) und Arap1 (RA) zeigten hohe Löslichkeit mit bis zu 90%-iger Reinheit (Abb. 38B). Im Verlauf mehrerer Aufreinigungen von Arap1 (RA) zeigte sich, dass das Konstrukt stark von der Anwesenheit von Reduktionsmitteln abhing. So zeigte das Elutionsprofil der Gelfiltration bei Abwesenheit von Reduktionsmitteln mehrere Maxima, die alle Arap1 (RA) zugeordnet werden konnten und unterschiedlichen Aggregationszuständen entsprachen. Die anschließende Zugabe von 5 mM DTE bei einem erneuten Gelfiltrationslauf erhöhte die Ausbeute nicht-aggregierten Proteins, welches etwa bei Dimergröße eluierte (Daten nicht gezeigt). Das längere Arap1 (GAP-RA)-Konstrukt zeigte dieses Verhalten nicht und eluierte konstant als Dimer.

Die Reinigung der GAP-Domäne von Arap1 in ausreichender Reinheit und Menge war nicht



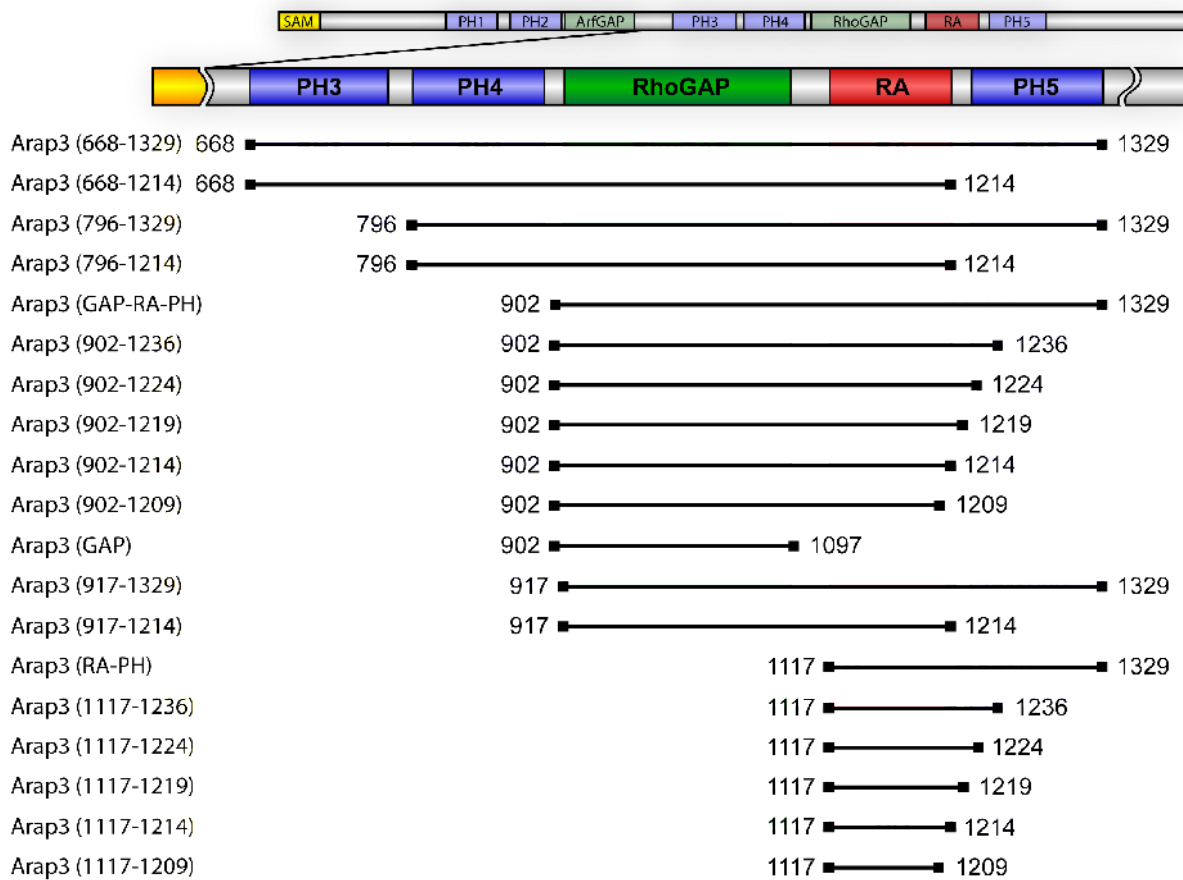
möglich. Arap1 (GAP\_1) eluierte stets im Ausschlussvolumen der Gelfiltration und war unrein (Abb. 38B). Arap1 (GAP\_2) präzipitierte vollständig bei dem Versuch, es von GST zu trennen und wurde deshalb nur als GST-Fusionsprotein aufgereinigt. Es eluierte allerdings ebenfalls im Ausschlussvolumen, so dass die Identität des Fusionsproteins mittels Western-Blot überprüft werden musste. Ein drittes Konstrukt der GAP-Domäne (GAP\_3), mit ähnlichen Konstruktgrenzen wie das bereits publizierte Konstrukt von Arap1<sup>(249)</sup>, war nur in sehr geringem Anteil löslich (nicht sichtbar nach SDS-PAGE) und konnte aufgrund der geringen Ausbeute nur über eine GSH-Säule gereinigt werden.

Als einzig erfolgreiche Strategie erwies sich die Aufreinigung der GAP-Domäne im Verbund mit der RA-Domäne (GAP-PS-RA) bei anschließender Abspaltung des RA-Teils und weitergehender Aufreinigung über Gelfiltration. Hierüber konnte deutlich reineres Protein gewonnen werden, welches nicht mehr aggregierte und nicht im Ausschlussvolumen der Gelfiltration lief.

### **3.3.3 Aufreinigung Arap3**

#### ***Wahl der Konstrukte***

Arap3 (VL) lässt sich in *SF9*-Zellen nur in geringer Menge mit einer Löslichkeit von maximal 1,5 mg/ml aufreinigen<sup>(485)</sup>. Demzufolge wurden verschiedene, kürzere Konstrukte des 1545 Aminosäuren langen Proteins in *E. coli*-Zellen (i.d.R. BL21DE3-Rosetta, BL21DE3-Codon<sup>+</sup> RIL) getestet (Abb. 39). Nur wenige Konstrukte zeigten eine ausreichende Löslichkeit, die über Western-Blot detektiert werden konnte. Hierzu gehörten Arap3 (668-1329), Arap3 (GAP-RA-PH), Arap3 (GAP) und Arap3 (RA-PH), wobei auffällt, dass nur Konstrukte, die die fünfte PH-Domäne enthielten, löslich waren. Sobald diese entfernt und eine Begrenzung hinter der RA-Domäne gewählt wurde, verminderte sich die Löslichkeit deutlich (Abb. 40D).



**Abbildung 39: Getestete Konstrukte von Arap3**

Gezeigt sind die in Testexpressionen und vollständigen Expressionen getesteten Konstrukte von Arap3

### *Aufreinigung von Arap3*

Eine Zusammenfassung der aufreinigbaren Konstrukte von Arap3 ist in Tabelle 8 gegeben.

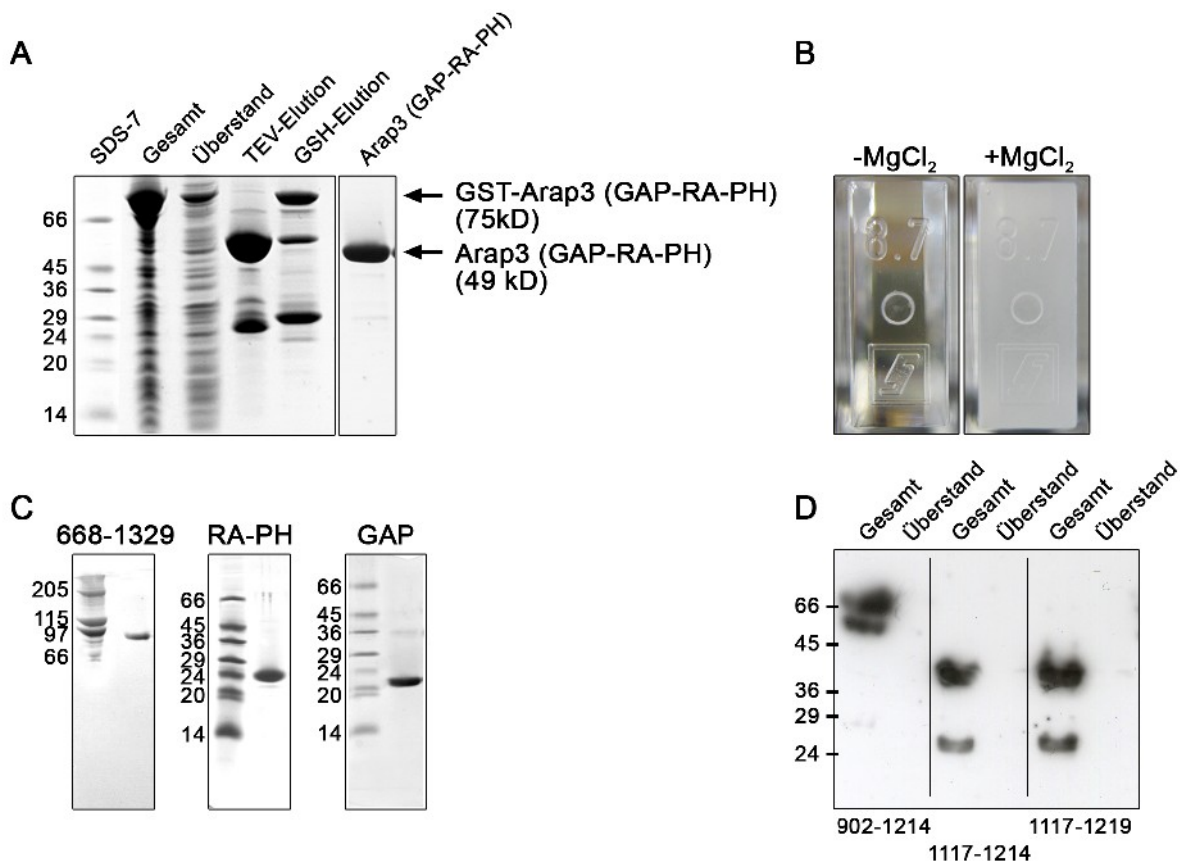
**Tabelle 8: Reinigungserfolg der Arap3-Konstrukte**

Protein	Konstrukt	Ausbeute	Eigenschaften
Arap3	668-1329 (His)	4.7mg / 10L TB	Elution als Monomer geringe Löslichkeit
Arap3	GAP-RA-PH	47mg / 10L TB	Monomer nur bei Anwesenheit von Glycerin Präzipitation bei Anwesenheit von MgCl <sub>2</sub> geringe Löslichkeit
Arap3	RA-PH	16mg / 10L TB	Elution als Monomer Gute Löslichkeit
Arap3	GAP	83mg / 10L TB	Vollständige Präzipitation innerhalb von 5h bei 4°C

Arap3 (668-1329) wurde aufgrund seiner Größe als His<sub>6</sub>-markiertes Protein exprimiert und aufge-

reingt. Dies führte jedoch zu einer geringen Expression des Proteins, welches demzufolge nur in geringer Ausbeute erhalten werden konnte. Es konnte in sehr guter Reinheit als Monomer isoliert werden (Abb. 40C), allerdings führten Konzentrationen über 5 mg/ml zu einer Präzipitation des Proteins.

Die Reinigung von Arap3 (GAP-RA-PH) ist in Abb. 40A gezeigt. Das Protein konnte nach dem Standardprotokoll, bei Spaltung des Fusionsproteins auf der Säule, erhalten werden. Es eluierte als Monomer, wenn dem Puffer 5% Glycerin zugesetzt wurden. Allerdings zeigte sich auch bei diesem Konstrukt eine sehr geringe Löslichkeit, die maximal etwa 10 mg/ml erreichte. Zusätzlich präzipitierte das Protein sofort, sobald  $MgCl_2$  in geringen Mengen (sub-äquimolar) im Puffer enthalten war (Abb. 40B), was seinen Einsatz gemeinsam mit G Proteinen deutlich erschwerte (s.u.).



**Abbildung 40: Aufreinigung von Arap3**

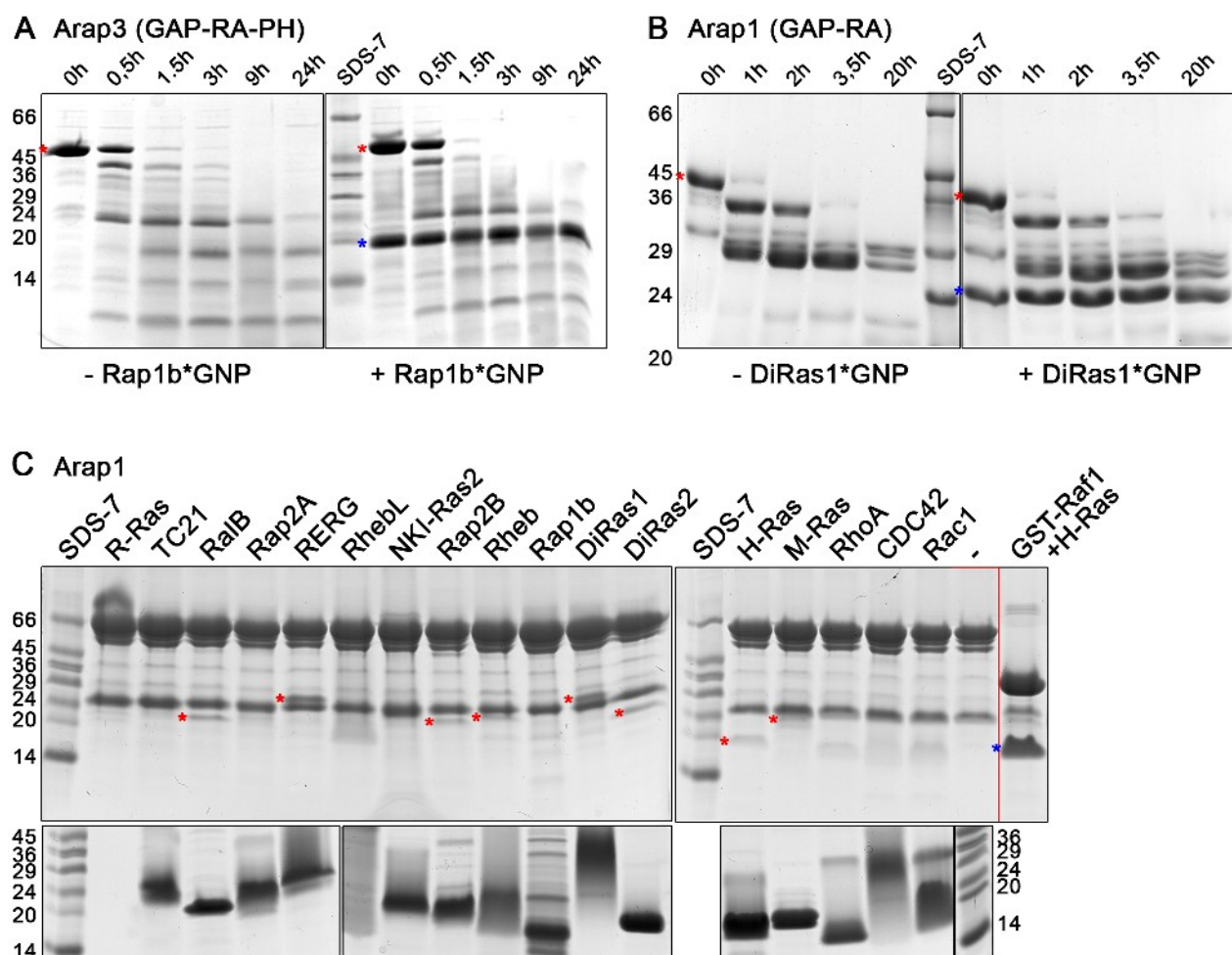
**A:** Aufreinigung von Arap3 (GAP-RA-PH). Die rechte Bande ist die finale Reinheit nach Gelfiltration. **B:** Löslichkeit von 1 mg/ml Arap3 (GAP-RA-PH) bei Anwesenheit von  $10\mu M$   $MgCl_2$ . **C:** Finale Reinheit der aufgereinigten Arap3 Konstrukte. **D:** Beispiel eines Western-Blots der Testexpressions-Ergebnisse von Arap3(902-1214), Arap3(1117-1214) und Arap3(1117-1214). (Pufferbedingungen sind im Anhang angegeben)

Arap3 (GAP) und Arap3 (RA-PH) waren gut aufzureinigen und zeigten eine hohe Löslichkeit (Abb. 40C). Beide eluierten als Monomer von der Gelfiltration. Allerdings konnte Arap3 (GAP) nach dem

Auftauen nicht länger als wenige Stunden bei 4°C gelagert werden, da sonst eine fast vollständige Präzipitation des Proteins auftrat.

### 3.3.4 Interaktion mit G Proteinen der Ras-Familie

Um den Einfluss der RA-Domäne auf die RhoGAP-Aktivität der Arap-Proteine zu untersuchen wurde zunächst der Versuch unternommen, Bindungspartner der RA-Domäne zu identifizieren. In früheren Studien wurde für Arap3 Rap1B als Interaktionspartner identifiziert<sup>(250)</sup>, während eine Bindung von DiRas1 oder DiRas2 an Arap1 postuliert wurde<sup>(400)</sup>.



**Abbildung 41: Qualitative Analyse der Interaktion von Ras-Proteinen mit Arap**

**A:** Stabilitätsmessung von Arap3 (GAP-RA-PH) (rote Markierung) ohne und mit (blaue Markierung) Rap1b\*GNP (Mg-frei) unter Anwesenheit von 3,3 µg Trypsin / mg Arap3. Der Puffer war ebenfalls MgCl<sub>2</sub>-frei. **B:** Stabilitätsmessung von Arap1 (GAP-RA) (rote Markierung) ohne und mit (blaue Markierung) DiRas1\*GNP bei Verwendung von 3,3 µg Trypsin / mg Arap1. **C:** Interaktion von GST-Arap1 (GAP-RA) mit den angegebenen G Proteinen in der GppNHP-gebundenen Form. Mögliche Interaktionen sind rot gekennzeichnet. Die Positivkontrolle, GST-Raf1(RBD) mit H-Ras\*GNP ist blau gekennzeichnet, die Pufferkontrolle ist rot eingrahmt. Die Überstände nach der Inkubation und der ersten Zentrifugation sind in den darunter liegenden Gelen dargestellt. Die undeutliche Lauffront einiger Proteine ist typisch für G Proteine, bei Verwendung von Tricin-Gelen. (Verwendeter Puffer: Standardpuffer)

In einem qualitativen Ansatz wurde Arap3 (GAP-RA-PH) analytisch trypsiniert und der Einfluss von Rap1B\*GNP auf das Fragment-Muster untersucht. Die Anwesenheit von Rap1B\*GNP rief keine Änderung hervor und es wurden die gleichen Fragmente erhalten wie ohne Rap1B\*GNP (Abb. 41A). Allerdings musste dieses Experiment aufgrund der  $Mg^{2+}$ -Unverträglichkeit von Arap3 (GAP-RA-PH) in  $MgCl_2$ -freiem Puffer durchgeführt werden und zusätzlich Rap1B\*GNP gegen  $Mg^{2+}$ -freien Puffer ausgetauscht werden. Abb. 41B zeigt die analytische Trypsinierung von Arap1 (GAP-RA) unter Anwesenheit von DiRas1\*GNP, wobei auch hier keine Veränderung des Bandenmusters bei Anwesenheit des postulierten Interaktionspartners sichtbar war.

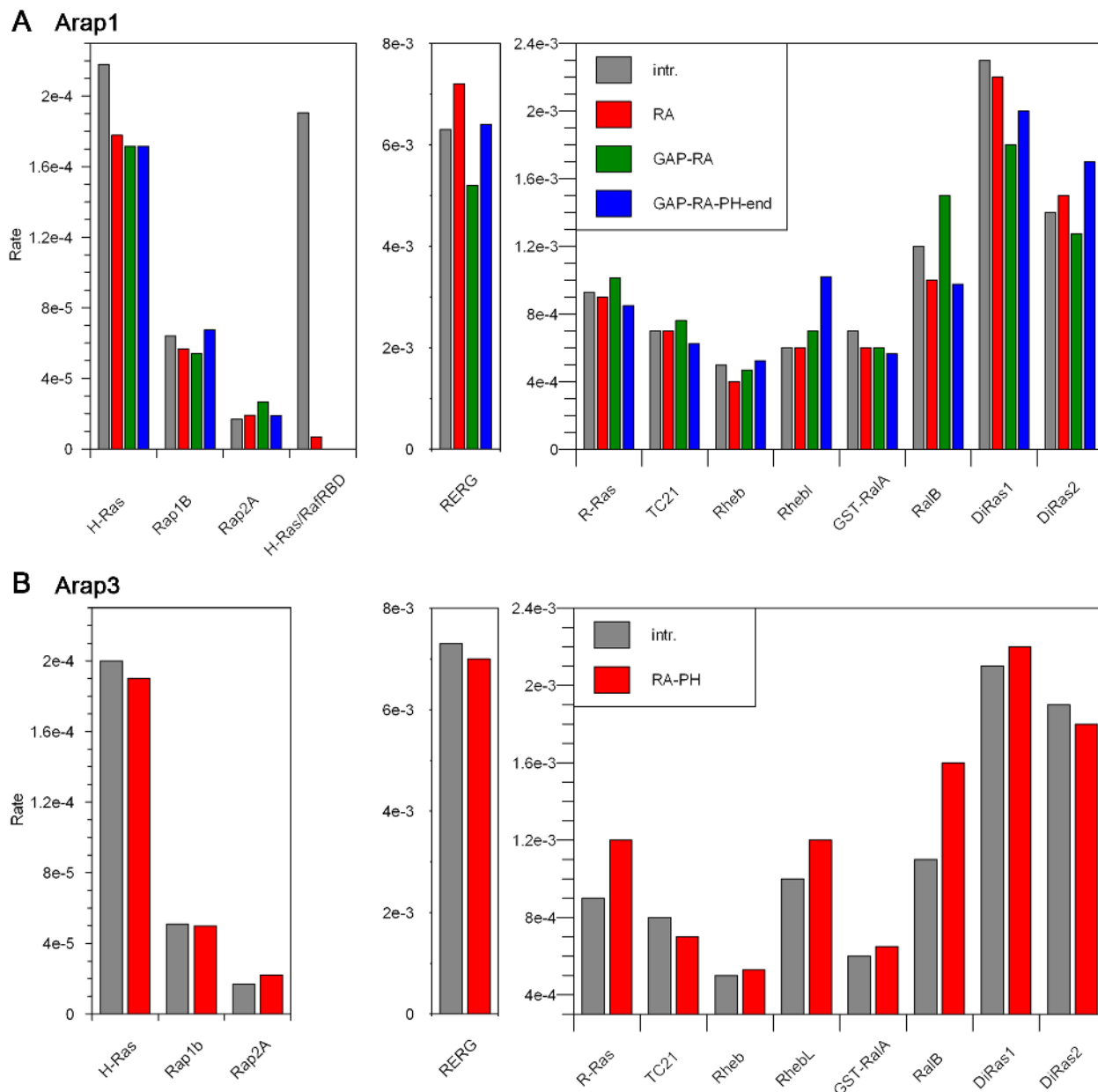
Eine systematische Analyse der Interaktion von Arap1 mit G Proteinen der Ras-Familie erfolgte durch *Pulldown*-Experimente. Hierzu wurden die Nukleotide von 17 verschiedenen G Proteinen zu GppNHp ausgetauscht und mit GST-Arap1 (GAP-RA) und GSH-Sepharose inkubiert (Abb. 41C). Der Ansatz wurde nur einmal gewaschen, um auch niedrig-affine Interaktionen detektieren zu können. Neben geringen Abbaubanden der Originalprobe von GST-Arap1 (GAP-RA) zeigten sich zusätzliche Banden bei RERG und DiRas1 mit stärkster Intensität, bei RalB und DiRas2 mit mittlerer Ausprägung und eine geringe Bande bei Rap2B, Rheb, H-Ras und M-Ras (Abb. 41C). Die Überstände der jeweiligen Ansätze sind als Ladungskontrolle in Abb. 41C gezeigt. Als Positivkontrolle diente GST-Raf1(RBD) mit H-Ras\*GNP, welches entsprechend der nanomolaren Affinität dieser Proteine eine deutlich stärkere Bande aufwies als die Interaktionspartner von Arap1 (GAP-RA). Das Laufverhalten einzelner Proteine (bsp. Rheb, DiRas1) ist typisch für manche G Proteine in Tricin SDS-PAGES.

Um diese Ergebnisse zu verifizieren und quantifizieren, wurden GDI-Versuche mit den im *Pulldown* getesteten Proteinen durchgeführt. Hierzu wurden alle Proteine mit mant-GppNHp beladen, wobei einige der G Proteine einen starken Verlust des Nukleotids und damit der Fluoreszenzintensität bereits ohne Zugabe jeglicher Interaktionspartner zeigten und somit ungeeignet für Fluoreszenz-basierte Methoden waren, bei denen kein freies Nukleotid im Überschuss zugegeben werden kann. Die verbliebenen G Proteine wurden mit allen erhaltenen, die RA-Domäne einschließenden Konstrukten von Arap1 getestet (Abb. 42A).

Die erwartete Verminderung der Dissoziationsrate konnte bei keinem der getesteten G Proteine beobachtet werden. Eine geringfügige Verminderung um etwa das 1,3-fache ergab sich für DiRas1 und Arap1 (GAP-RA), die jedoch im Vergleich zur Kontrolle von H-Ras\*mGNP und Raf1 (RBD) sehr gering ausfiel (9,4-fach) (Abb. 42A).

Das gleiche Bild ergab sich bei den Messungen mit Arap3 (RA-PH). Das längere Konstrukt Arap3

(GAP-RA-PH) wurde aufgrund der  $MgCl_2$ -Unverträglichkeit nicht getestet. Auch hier sind die Austauschraten nach Zugabe von Arap3 vergleichbar mit den intrinsischen Raten der G Proteine (Abb. 42B).



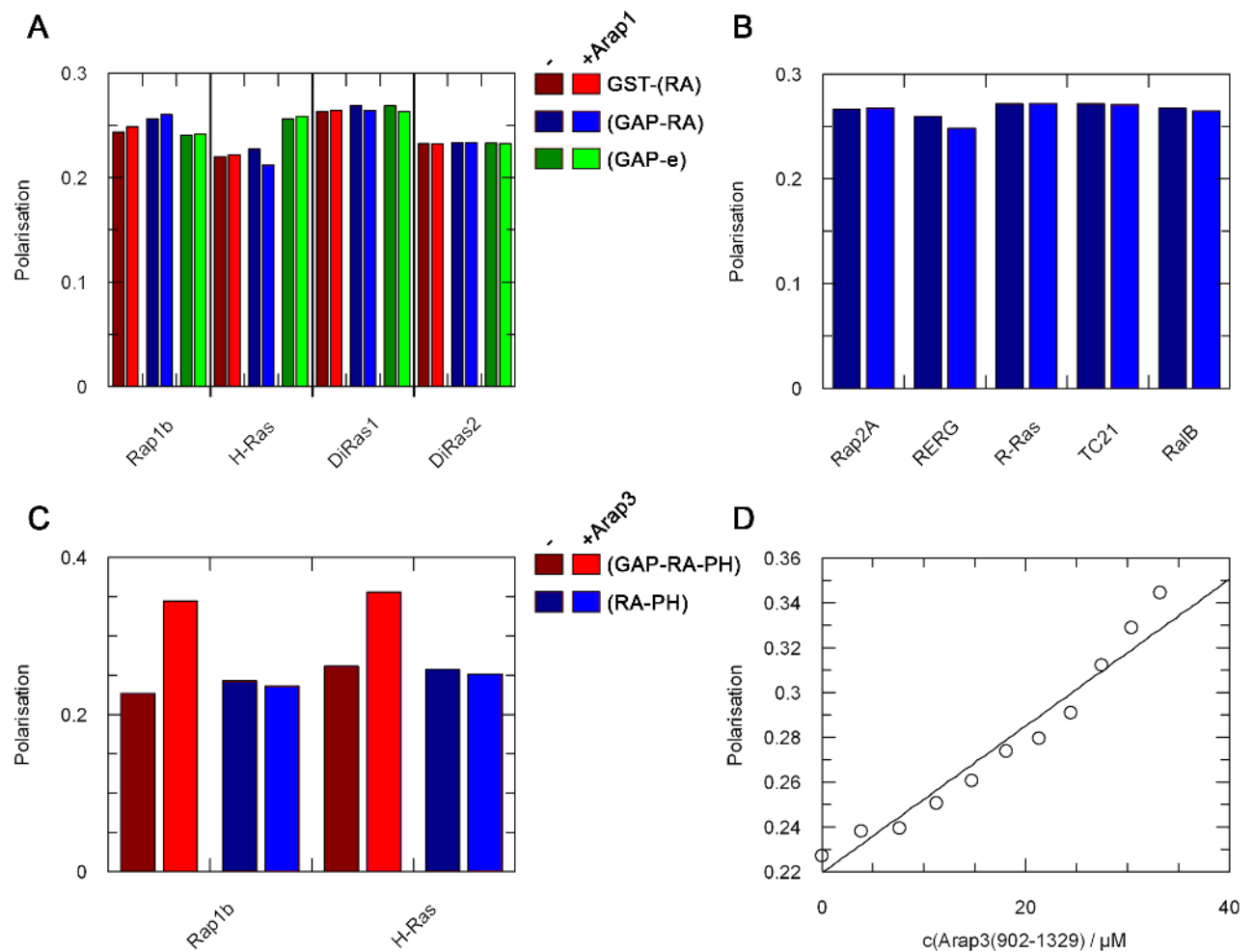
**Abbildung 42: GDI-Versuch zur Interaktion von Arap-Proteinen mit G Proteinen der Ras-Familie**

Getestet wurden 100 nM G Protein, gebunden an mGppNHP und 100  $\mu M$  Effektor-Protein. Die Reaktion wurde mit 10  $\mu M$  GDP gestartet (Standardpuffer). **A:** Zugabe von Arap1-Konstrukten zu den angegebenen G Proteinen. Aufgrund der unterschiedlichen intrinsischen Raten wurde die Abbildung aufgeteilt. Die Positivkontrolle von H-Ras mit Raf1(RBD) ist im linken Bild gezeigt. **B:** Zugabe von Arap3 (RA-PH) zu verschiedenen G Proteinen der Ras-Familie.

Unabhängig von der Interaktion mit den Arap-Proteinen ermöglichten die Messungen den Vergleich der intrinsischen Austauschraten einzelner G Proteine der Ras Subfamilie. Proteine mit hoher Homologie zu H-Ras (siehe Anhang) zeigten einen sehr geringen Austausch von  $0,2 \cdot 10^{-4}$  -  $2 \cdot 10^{-4} s^{-1}$ .

## Ergebnisse

Hierzu zählen H-Ras und die Rap Proteine (Abb. 42, linker Bereich). R-Ras, TC21, Rheb, RhebL und die Ral Proteine wiesen eine mittlere Rate von etwa  $5 \cdot 10^{-4} - 12 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$  auf, während die DiRas Proteine eine sehr hohe intrinsische Austauschrate von  $15 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$  und  $23 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$  besaßen (Abb. 42, rechter Bereich). RERG bildete einen Spezialfall mit einer intrinsischen Rate von  $60 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$  (Abb. 42, mittlere Abbildung) mit der Folge, dass bereits die Verdünnung im Messpuffer auf  $500 \mu\text{l}$  zu einer Verschiebung des chemischen Gleichgewichts führte und in einer schnellen Dissoziation des Nukleotids vom G Protein und damit in einem instabilen Messsignal resultierte.



**Abbildung 43: Polarisationsmessungen von Arap Proteinen und G Proteinen der Ras-Familie**

Polarisationsmessung von  $1 \mu\text{M}$  G Protein (mGNP) und  $50-100 \mu\text{M}$  Arap (Standardpuffer). **A:** Interaktion von GST-Arap1 (RA) (rot), Arap1 (GAP-RA) (blau) und Arap1 (GAP-e) (grün). Gezeigt sind jeweils der Polarisationswert ohne und mit Arap1. **B:** Polarisationsänderung nach Zugabe von Arap1 (GAP-RA) zu den angegebenen G Proteinen. **C:** Polarisationsintensität nach Zugabe von Arap3 (GAP-RA-PH) oder Arap3 (RA-PH) zu Rap1B\*mGNP und H-Ras\*mGNP. Die Messung von Arap3 (GAP-RA-PH) wurde bei Abwesenheit von  $\text{MgCl}_2$  durchgeführt. **D:** Polarisationsstiteration von Arap3 (GAP-RA-PH) zu Rap1B\*mGNP.

Eine weitere Möglichkeit, um die Interaktion der G Proteine mit Arap1 und Arap3 nachzuweisen,



bestand in der Messung der Polarisationsänderung durch Zugabe des Effektorproteins. Hierfür wurden mindestens ein 50-facher Überschuss Arap1 (GAP-RA) zu 1  $\mu\text{M}$  G Protein zugegeben (Abb. 43B). Die vermeintlichen Interaktionspartner von Arap1 (Rap1B, H-Ras, DiRas1 und DiRas2) wurden mit allen verfügbaren Konstrukten von Arap1 getestet, jedoch konnte nie eine signifikante Änderung der Polarisationsintensität detektiert werden (Abb. 43A,B).

Die Interaktion von Arap3 (GAP-RA-PH) mit Rap1B\*mGNP und H-Ras\*mGNP wurde unter Abwesenheit von  $\text{MgCl}_2$  gemessen (Abb. 43C), wobei die Zugabe von 50  $\mu\text{M}$  Arap3 (GAP-RA-PH) zunächst zu einem Anstieg des Polarisationssignals um etwa das 1,5-fache von 0,227 auf 0,344 führte. Eine Quantifizierung wurde jedoch durch die schlechte Löslichkeit von Arap3 verhindert und, da nur ein konstanter Anstieg des Signals erhalten wurde (Abb. 43D). Die Zugabe des löslicheren Konstrukts Arap3 (RA-PH) zu Rap1B\*mGNP oder H-Ras\*mGNP ergab keine Änderung der Polarisation (Abb. 43C).

Weiterhin wurde die Interaktion zwischen H-Ras\*mGNP bzw. Rap\*mGNP zu Arap1 und Arap3 über ITC gemessen und ebenfalls keine Interaktion festgestellt (Daten nicht gezeigt). Auch der Nachweis über analytische Ultrafiltration oder analytische Gelfiltration ergab keine Interaktion mit H-Ras oder Rap1B (Daten nicht gezeigt). Zusätzlich wurde die Interaktion von Arap1 mit G Proteinen der Ras-Familie bei Anwesenheit von RhoA und CDC42 mittels Polarisations Titration überprüft, um den Einfluss der RhoGAP-Domäne auf die Bindung von Ras-Proteinen zu untersuchen. Hierbei ergaben sich ebenfalls keine Signaländerungen (Daten nicht gezeigt).

### 3.3.5 Interaktion mit Proteinen der Rho-Familie

Die Quantifizierung der Bindung von G Proteinen der Rho-Familie an die GAP-Domäne von Arap1 und Arap3 zeigt die Spezifität der Arap-Proteine zu den Unterfamilien der Rho-Proteine auf, die für das Verständnis der biologischen Funktion dieser Proteine essenziell ist.

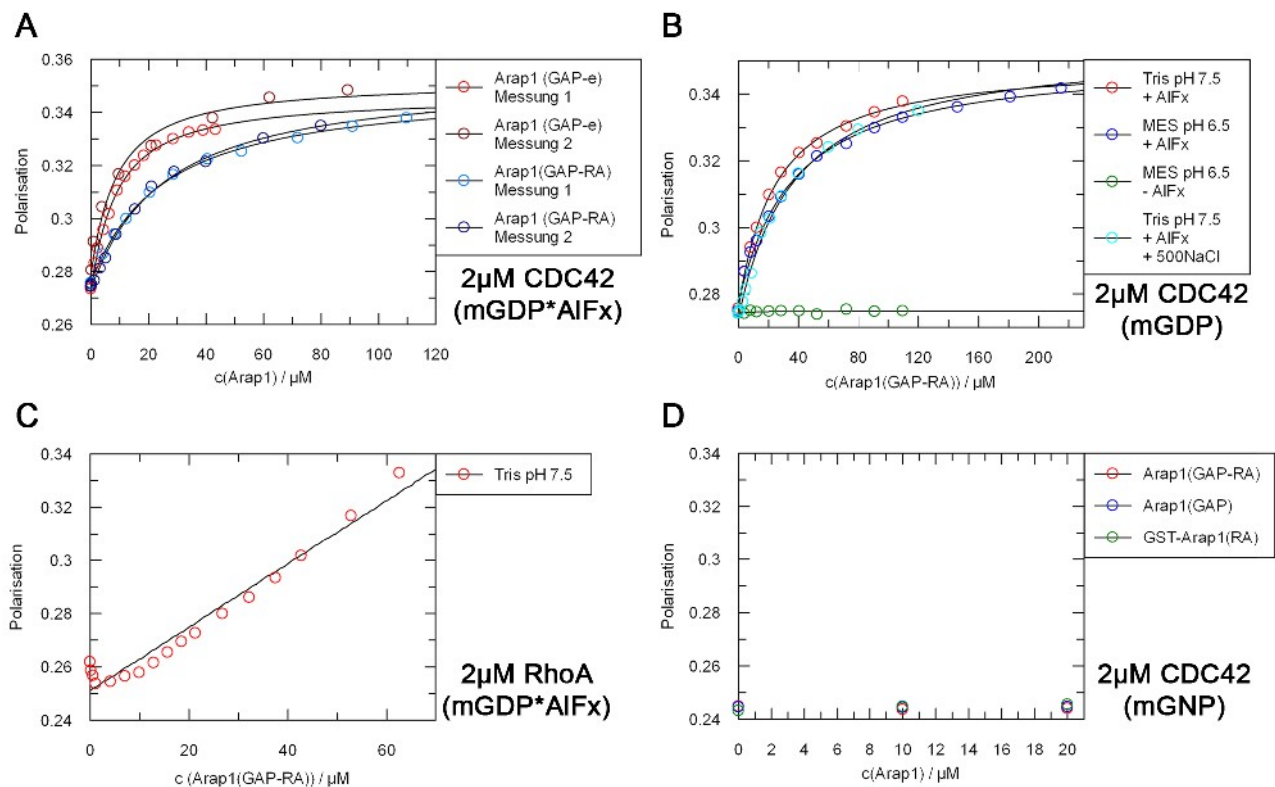
Die Affinität der Proteine wurde mittels Polarisations Titration bestimmt. Von Arap1 standen nur zwei Konstrukte, Arap1 (GAP-RA) und Arap1 (GAP-e) zur Verfügung, da die GAP-Domäne alleine nicht aufreinigbar war.

Zunächst wurde die Interaktion von Arap1 (GAP-RA) oder Arap1 (GAP-e) mit CDC42\*mGDP bei Anwesenheit von 1 mM  $\text{AlF}_x$  gemessen (Abb. 44A). Hierbei ergab sich ein  $K_D$  von 7,98  $\mu\text{M}$  für Arap1 (GAP-e) und 35,1  $\mu\text{M}$  für Arap1 (GAP-RA). Um diesen Unterschied zu verifizieren, wurde die Messung erneut mit neuen Proteinchargen von beiden Proteinen durchgeführt, die ähnliche Affinitätskonstanten erbrachten (Abb. 44A, Tabelle 9). Die Interaktion von Arap1 (GAP-RA) mit

## Ergebnisse

CDC42\*mGDP bei Abwesenheit von AIF<sub>x</sub> zeigte erwartungsgemäß keine Polarisationsänderung. Änderungen in den Pufferbedingungen, MES bei pH 6,5 oder 200 mM NaCl änderten die Affinität der Bindung von Arap1 und CDC42 nicht (Abb. 44B). Die Affinität von Arap1 (GAP-RA) zu RhoA konnte nicht bestimmt werden, da die Zugabe von Arap1 einen linear zunehmenden Anstieg der Polarisation bewirkte, der keiner Sättigungsfunktion folgte (Abb. 44C).

mGNP beladenes CDC42 interagierte nicht mit Arap1 (GAP-RA), Arap1 (GAP\_1) oder nur mit der RA-Domäne in diesem Messansatz (Abb. 44D).

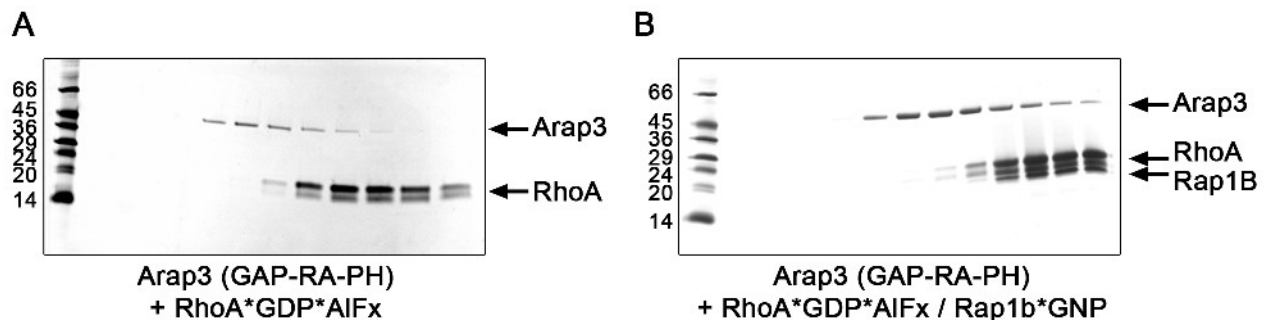


**Abbildung 44: Bindung von Arap1 an Proteine der Rho-Familie**

Polarisationstitration von Arap1 (GAP-RA) bzw. Arap1 (GAP-e) mit RhoA und CDC42. Vorgelegt wurden jeweils 2 μM G Protein, beladen mit mGDP oder mGNP (Puffer: Standardpuffer. Bei Verwendung der mGDP-beladenen Proteine wurde 1mM AIF<sub>x</sub> zugegeben). **A:** Interaktion von Arap1(GAP-e) (rot) oder Arap1 (GAP-RA) (blau) mit CDC42\*mGDP bei Anwesenheit von AIF<sub>x</sub>. Messung 1 und Messung 2 unterscheiden verschiedene Proteinchargen. **B:** Titration von Arap1 (GAP-RA) zu CDC42\*mGDP bei An- und Abwesenheit (grün) von AIF<sub>x</sub>. Getestet wurden zwei verschiedene Puffer bei unterschiedlichem pH. **C:** Interaktion von Arap1 (GAP-RA) mit RhoA\*mGDP (AIF<sub>x</sub>). **D:** Polarisationsmessung verschiedener Arap1 Konstrukte und CDC42\*mGNP.

Aufgrund der schlechten Löslichkeitseigenschaften von Arap3 (GAP) und Arap3 (GAP-RA-PH) konnte keine Titration dieser Proteine mit RhoA oder CDC42 erfolgreich durchgeführt werden. Die Bindung von Arap3 (GAP-RA-PH) an RhoA wurde mittels analytischer Gelfiltration unter Ausschluss von MgCl<sub>2</sub> durchgeführt, bei der keine Komplexbildung detektiert werden konnte (Abb. 45A). Die Zugabe des vermeintlichen Interaktionspartners Rap1B\*GNP erbrachte ebenfalls keine

Änderung (Abb. 45B).



**Abbildung 45: Interaktion von Arap3 (GAP-RA-PH) mit RhoA**

Die Interaktion von Arap3 und RhoA wurde mittels analytischer Gelfiltration analysiert. Hierfür wurden 1 mg RhoA\*GDP mit 0,5 mg Arap3 inkubiert und auf eine S75 10/30 Säule aufgetragen (Puffer: 50 mM Tris pH 7,5, 50 mM NaCl, 10 % Glycerin, 5 mM  $\beta$ ME, 0,5 mM GDP, 1 mM AlFx). **A:** Interaktion von Arap3 mit RhoA\*GDP. **B:** Zugabe von 0,5 mg Rap1B\*GNP und anschließende Gelfiltration.

**Tabelle 9: Affinitätskonstanten der Interaktion von Arap1 mit Rho-Proteinen**

Konstrukt	G Protein	Puffer	Affinitätskonstante
Arap1 (GAP-e)	CDC42*mGDP	+AlFx	7,98 $\mu$ M (P-Charge 1) 7,80 $\mu$ M (P-Charge 2)
Arap1 (GAP-RA)	CDC42*mGDP	+ AlFx	23,9 $\mu$ M (P-Charge 1) 35,1 $\mu$ M (P-Charge 2)
Arap1 (GAP-RA)	CDC42*mGDP	- AlFx	keine Interaktion
Arap1 (GAP-RA)	CDC42*mGDP	+ AlFx, MES pH 6.5	23,63 $\mu$ M
Arap1 (GAP-RA)	CDC42*mGDP	+ AlFx, 200 mM NaCl	34.74 $\mu$ M
Arap1 (GAP-RA)	RhoA*mGDP	+ AlFx	nicht bestimmbar
Arap1 (GAP-RA)	CDC42*mGNP		keine Interaktion
Arap1 (GAP_1)	CDC42*mGNP		keine Interaktion
Arap1 GST-(RA)	CDC42*mGNP		keine Interaktion

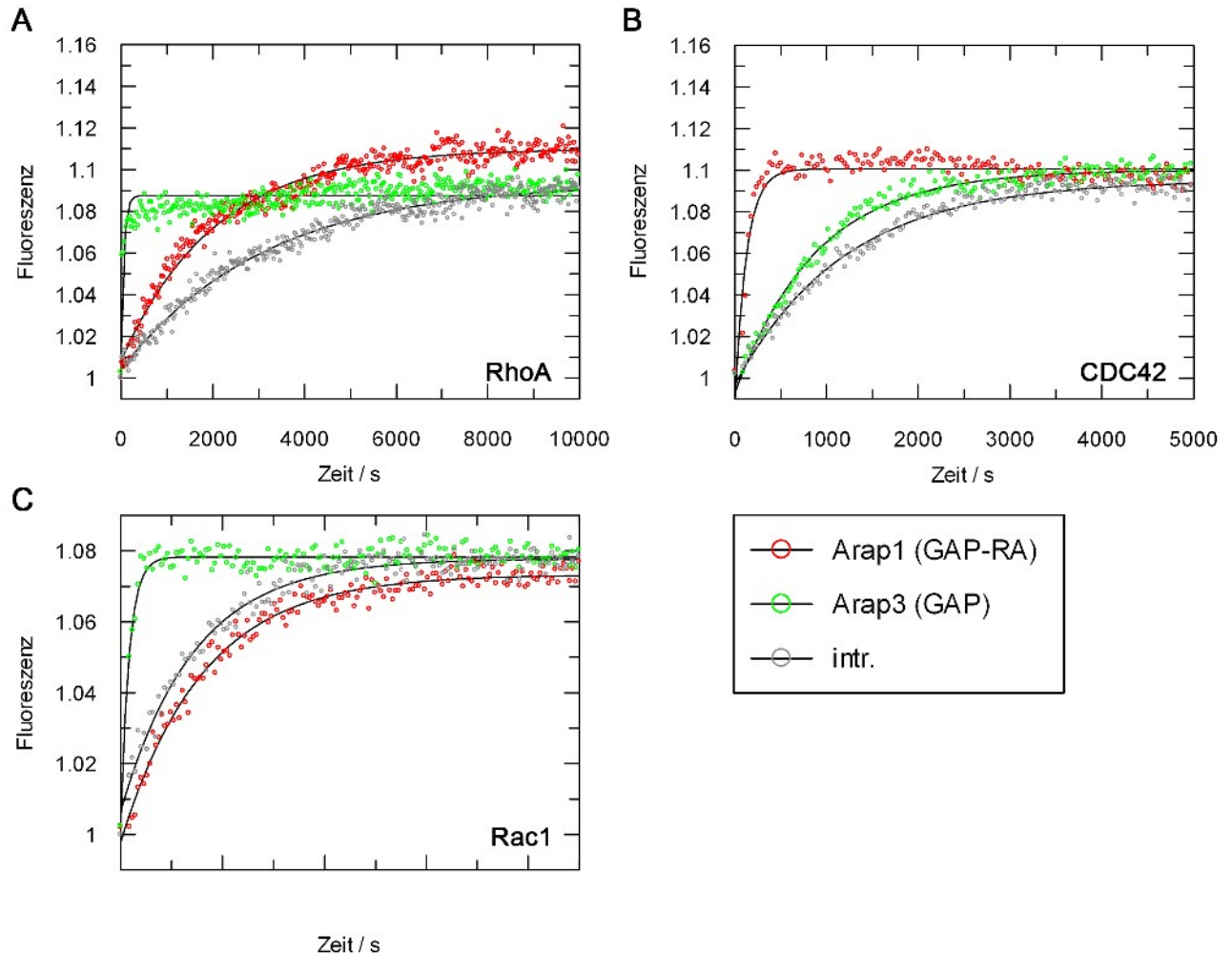
### 3.3.6 Hydrolyse-Aktivität der Arap Proteine

Die Hydrolyse-Aktivität von Arap1 und Arap3 wurde mittels HPLC-Messungen und fluorimetrischen Messungen über das *Phosphate Binding Protein* (PBP) durchgeführt (zur Verfügung gestellt von M. Miertzschke).

#### *Spezifität von Arap1 und Arap3*

Die Bestimmung der Spezifität von Arap1 und Arap3 wurde unter *single turnover* Bedingungen durchgeführt, wobei die Reaktion durch Zugabe von 1  $\mu$ M GTP gestartet wurde. Demzufolge zeigte

Arap3 (GAP) eine deutliche Aktivierung von RhoA ( $0,016 \text{ s}^{-1}$ ) (Abb. 46A), während Arap1 (GAP-RA) die Reaktion nur gering beschleunigen konnte ( $0,0005 \text{ s}^{-1}$ ), bei einer intrinsischen Rate von RhoA von  $0,0003 \text{ s}^{-1}$ .



**Abbildung 46: Hydrolysespezifität der Arap-Proteine zu Proteinen der Rho-Familie**

Bestimmung der katalytischen Aktivität von Arap Proteinen zu Rho Proteinen. Vorgelegt wurden  $2 \mu\text{M}$  Rho Protein,  $10 \mu\text{M}$  GAP und  $20 \mu\text{M}$  PBP, während die Messung durch Zugabe von  $1 \mu\text{M}$  GTP gestartet wurde (Standardpuffer). **A:** Spezifität von Arap1 und Arap3 zu RhoA. **B:** Messung von CDC42. **C:** Aktivität von Arap1 und Arap3 auf Rac1.

Dieses Verhalten kehrte sich um, wenn CDC42 eingesetzt wurde (Abb. 46B). Hier besaß Arap1 (GAP-RA) mit einer Rate von  $0,0079 \text{ s}^{-1}$  (9,9-fach) die höchste Aktivität, während Arap3 (GAP) nahezu keine Aktivität aufwies. Rac1 zeigte eine erhöhte Hydrolyse, wenn Arap3 (GAP) eingesetzt wurde (8,6-fach), während Arap1 inaktiv war (Abb. 46C).

Tabelle 10: Raten der Hydrolysemessungen von Arap und Rho Proteinen

G Protein	GAP	Rate (*10 <sup>-4</sup> ) / s <sup>-1</sup>
CDC42	intr.	8,29
	10 µM Arap1 (GAP-RA)	79,1
	10 µM Arap1 (GAP_1)	8,44
	10 µM Arap1 (GST-GAP_2)	5,31
	5 µM Arap1 (GAP_4)	122
	5 µM Arap1 (GAP-PS-RA) + PreSc.	179
	10 µM Arap3 (GAP)	11,2
RhoA	intr.	3,19
	10 µM Arap1 (GAP-RA)	4,91
	10 µM Arap1 (GAP_1)	3,03
	10 µM Arap1 (GST-GAP_2)	1,23
	5 µM Arap1 (GAP_4)	6,67
	5 µM Arap1 (GAP-PS-RA) + PreSc.	5,60
	10 µM Arap3 (GAP)	160
Rac1	intr.	13,9
	10 µM Arap1 (GAP-RA)	12,4
	10 µM Arap1 (GAP_1)	13,0
	5 µM Arap1 (GAP_4)	15,0
	5 µM Arap1 (GAP-PS-RA) + PreSc.	17,2
	10 µM Arap3 (GAP)	120

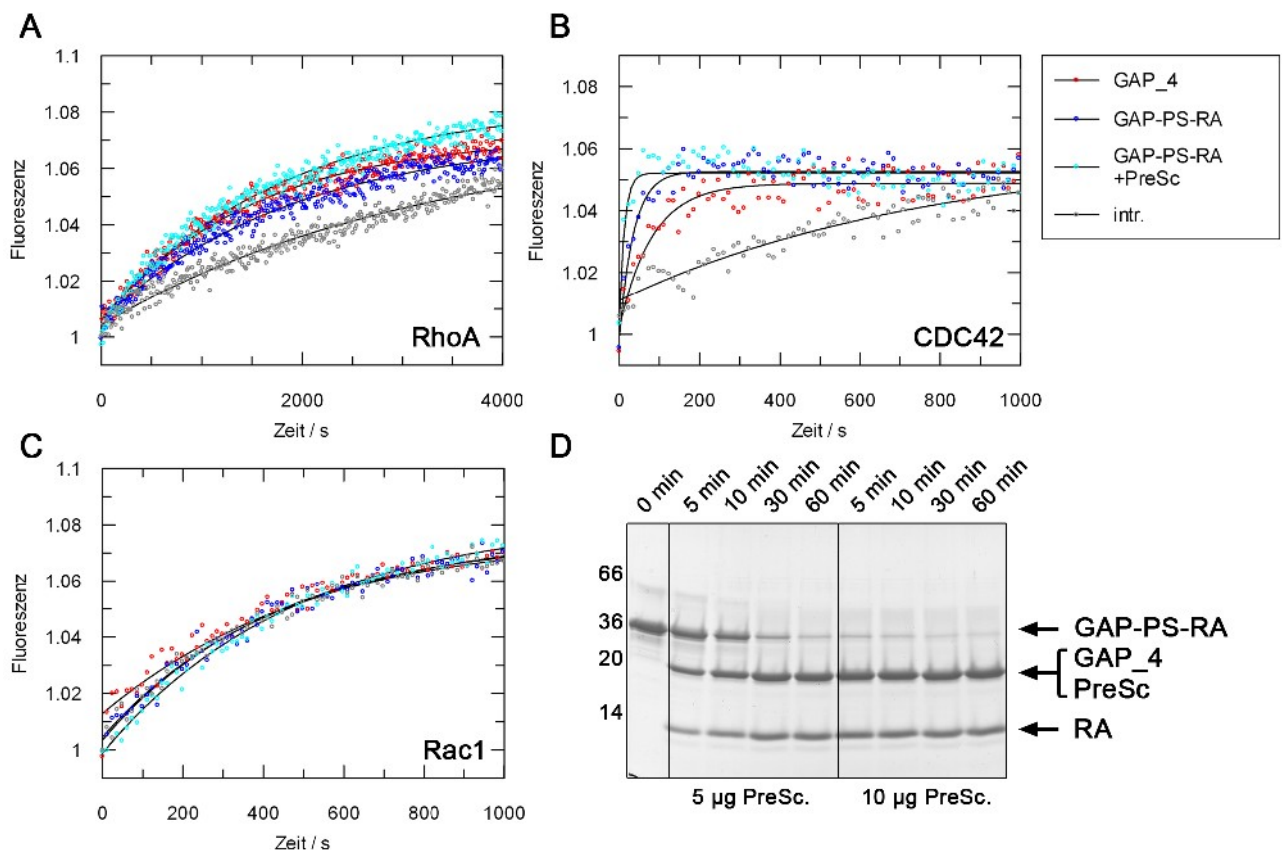
### **Die GAP-Domäne von Arap1**

Verschiedene Konstrukte der GAP-Domäne von Arap1 (GAP\_1, \_2, \_3) zeigten keine Aktivierung von RhoA, Rac1 oder CDC42 (Exp. nicht gezeigt, Tabelle 10), entweder verursacht durch fehlende katalytisch aktive Motive über die GAP-Domäne hinaus oder aufgrund von Stabilitätsproblemen der Proteine.

Dementsprechend wurde Arap1 (GAP\_4) als weiteres Konstrukt aus dem (GAP-PS-RA)-Konstrukt hergestellt (siehe S. 73). Das (GAP-PS-RA)-Konstrukt ermöglichte zusätzlich die Untersuchung des Einflusses der RA-Domäne auf die GAP-Aktivität, indem GAP und RA durch Zugabe von PreScission direkt vor GTP-Zugabe voneinander getrennt werden konnten (Abb. 47D). Die Messungen ergaben, dass Arap1 (GAP\_4) auch ohne die RA-Domäne aktiv auf CDC42 war, bei gleicher Katalyserate wie das längere GAP-PS-RA-Konstrukt (Abb. 47A). Eine Änderung der

Spezifität durch die Abspaltung der RA-Domäne ergab sich nicht (Abb. 47A-C).

Im Gegensatz zu den inaktiven GAP\_1/\_2/\_3 Konstrukten besitzt Arap1 (GAP\_4) eine zusätzliche Helix (vgl. Abb. 36 u. 37), die für die Aktivität des (GAP\_4)-Konstrukts verantwortlich sein könnte. Das (GAP)-Konstrukt von Arap3 ist im Vergleich zu Arap1 (GAP\_4) 14 Aminosäuren kürzer, besitzt also nicht die C-terminale Helix und zeigt trotzdem hohe katalytische Aktivität.



**Abbildung 47: Hydrolyserate von Arap1 nach Trennung von GAP und RA**

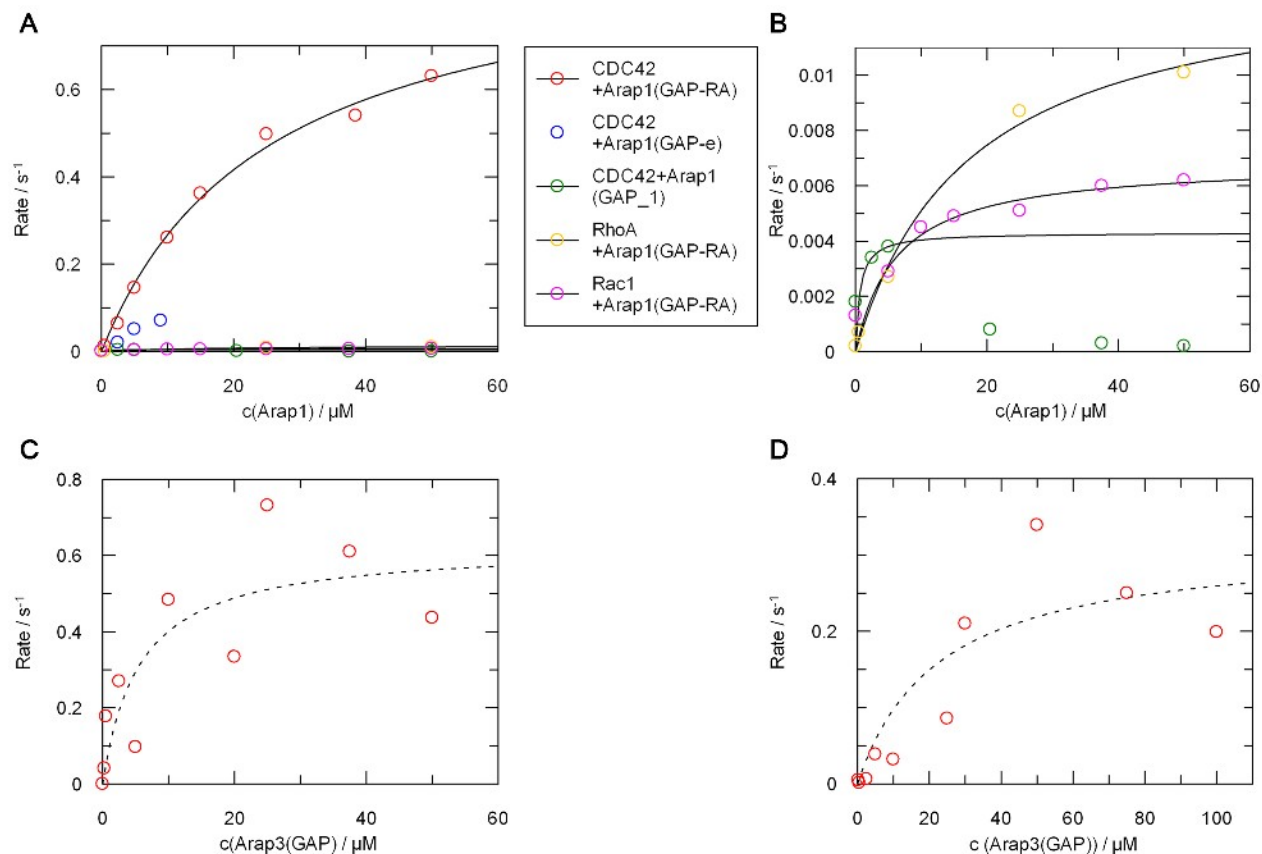
Bestimmung der Hydrolyserate von Arap1 über PBP-Fluoreszenzänderung in Standardpuffer. Vorgelegt wurden 2  $\mu\text{M}$  Rho-Protein, 5  $\mu\text{M}$  Arap1 und 20  $\mu\text{M}$  PBP. Einem Ansatz von Arap1 (GAP-PS-RA) wurden 10 $\mu\text{g}$  PreScission-Protease zugegeben. Die Messung wurde durch Zugabe von 1  $\mu\text{M}$  GTP gestartet. **A:** Messung von RhoA und Arap1. **B:** CDC42. **C:** Rac1 **D:** Testspaltung von Arap1 (GAP-PS-RA) durch Zugabe unterschiedlicher PreScission-Konzentrationen.

### *k<sub>cat</sub>/K<sub>M</sub>-Messungen mit Arap1*

Da sich deutliche Spezifitätsunterschiede zwischen den verschiedenen Arap-Proteinen zeigten, wurden  $K_M$  und  $k_{cat}$  über *Stopped-flow* Messungen bestimmt, um die Ursache der Differenzen aufzuklären.

Der Vergleich von Arap1 mit verschiedenen Rho Proteinen zeigte, dass der  $K_M$  weitestgehend gleich blieb, während sich  $k_{cat}$  stark unterschied (Abb. 48A,B). Die Messung von Arap1 (GAP-RA) mit

CDC42 ergab die höchste maximale Rate mit  $0,042 \text{ s}^{-1}$ , bei einem  $K_M$ -Wert von  $25,3 \mu\text{M}$  (Tabelle 11). Dies ergab einen Quotienten von  $37,25 \text{ s}^{-1} \mu\text{M}^{-1}$ . RhoA wurde nur schwach von Arap1 (GAP-RA) aktiviert ( $k_{\text{cat}}=0,014 \text{ s}^{-1}$ ) bei einem ähnlichen  $K_M$  von  $17,4 \mu\text{M}$  (Abb. 48B). Rac1 zeigte die geringste Aktivierung durch Arap1 ( $6,9 \text{ s}^{-1}$ ), allerdings war auch der  $K_M$ -Wert deutlich geringer, wodurch sich ein höherer Quotient ergab als bei RhoA (Tabelle 11).



**Abbildung 48: Bestimmung von  $K_M$  und  $k_{\text{cat}}$  für Arap1**

Stopped-flow Messungen von Rho Proteinen und Arap1. Hierbei wurden  $2 \mu\text{M}$  G Protein (Nt-frei) mit  $10 \mu\text{M}$  PBP in einer Spritze und  $1 \mu\text{M}$  GTP,  $10 \mu\text{M}$  PBP und unterschiedliche Konzentrationen an GAP in der anderen Spritze vorgelegt und die Reaktion durch Mischung gestartet (Standardpuffer). **A:** Messwerte von Arap1-Konstrukten mit CDC42, RhoA und Rac1. **B:** Vergrößerte Darstellung der Messpunkte aus A. **C:** Messung von Arap3 (GAP) und RhoA. **D:** Messung von Arap3 (GAP) und Rac1.

Neben dem (GAP-RA)-Konstrukt konnte nur von Arap1 (GAP\_1) ausreichend Protein erhalten werden. Wie bereits in den vorhergehenden Messungen zeigte letzteres nur eine sehr geringe Aktivität auf CDC42, die zunächst anstieg, bei höheren Konzentrationen jedoch wieder abfiel (Abb. 48B). Die Auswertung geringer Raten wurde durch starkes Rauschen des Signals erschwert, so dass die ermittelten Raten für geringe Konzentrationen von Arap1 (GAP\_1) nicht vertrauenswürdig waren.

Das Konstrukt Arap1 (GAP-e) konnte nicht in höheren Konzentrationen als  $20 \mu\text{M}$  eingesetzt



werden (Abb. 48A), da die Ausgangslösung aufgrund schlechter Löslichkeit nur gering konzentriert war. Allerdings zeigten sich hier qualitativ starke Unterschiede im Vergleich zum kürzeren (GAP-RA)-Konstrukt (Abb. 48A). Der  $k_{\text{cat}}$ -Wert scheint deutlich erniedrigt, eine Aussage über den  $K_M$ -Wert ist anhand der wenigen Messpunkte nicht möglich.

**Tabelle 11:  $K_M$  und  $k_{\text{cat}}$  Werte für Arap1**

G Protein	Konstrukt	$K_M / \mu\text{M}$	$k_{\text{cat}} / 10^{-3} \text{ s}^{-1}$	$k_{\text{cat}} / K_M * 10^{-3}$
RhoA	Arap1 (GAP-RA)	17,4	14,0	0,805
Rac1	Arap1 (GAP-RA)	6,30	6,9	1,095
CDC42	Arap1 (GAP-RA)	25,3	942	37,25
	Arap1 (GAP-e)	-	-	-
	Arap1 (GAP_1)	(0.6667)	(4,3)	(6,45)

*Angaben in Klammern sind nicht verlässlich*

Der Einsatz von Arap3 (GAP-RA-PH) schloss sich aufgrund der  $\text{Mg}^{2+}$ -Unverträglichkeit aus. Arap3 (GAP) zeigte Aktivität auf RhoA und Rac1, jedoch konnten  $K_M$  und  $k_{\text{cat}}$  trotz wiederholter Versuche und unterschiedlicher Proteinchargen nicht bestimmt werden, da das Protein durch die Lagerung bei  $4^\circ\text{C}$  präzipitierte und keine konsistenten Daten erhalten werden konnten. Qualitativ zeigte sich die höchste Aktivität von Arap3 (GAP) auf RhoA (Abb. 48C); Rac1 konnte ebenfalls durch Arap3 (GAP) aktiviert werden (Abb. 48D), während CDC42 Aktivitätsmessungen nicht auswertbar waren.

### ***Einfluss der RA-Domäne auf die RhoGAP-Aktivität***

#### ***Arap3***

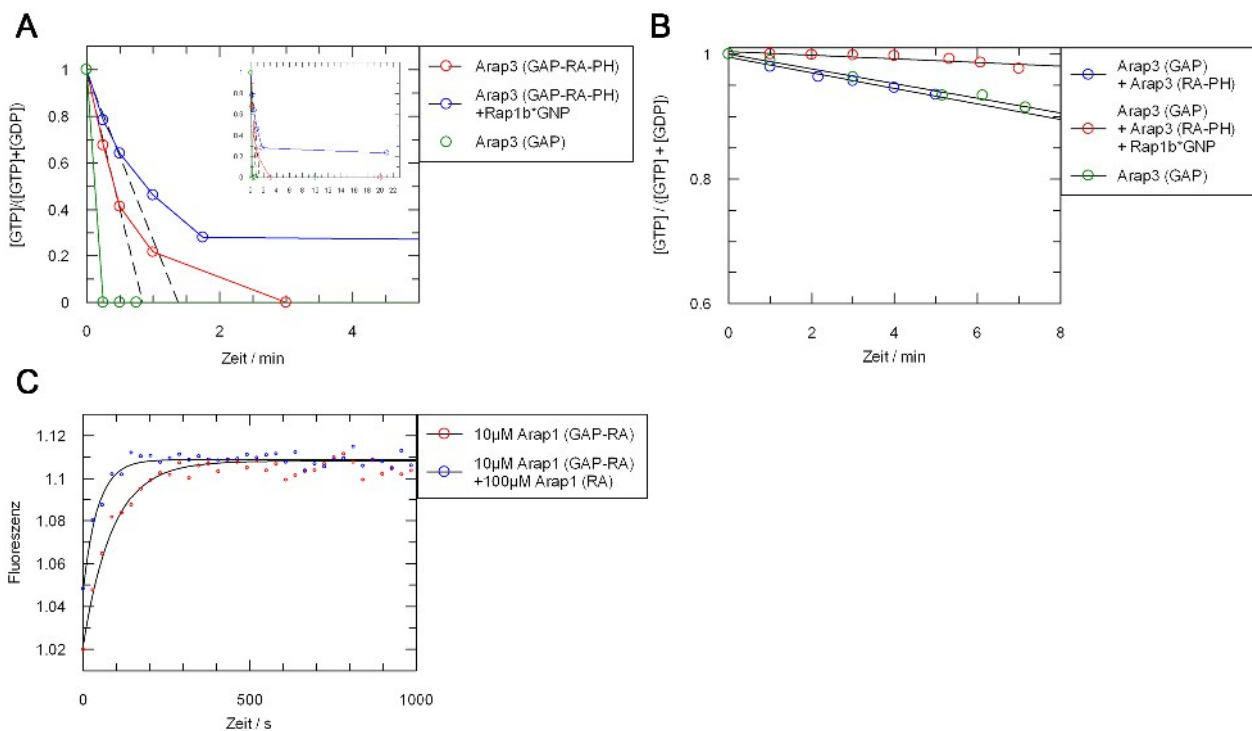
Die Unterschiede zwischen den einzelnen Konstrukten von Arap1 deuten einen Einfluss der Einzeldomänen auf die katalytische Aktivität an.

In *Multiturnover* HPLC-Hydrolyse-Messungen besaß die GAP-Domäne von Arap3 eine höhere Aktivität auf RhoA als das Konstrukt Arap3 (GAP-RA-PH) (Abb. 49A). Hierbei ist allerdings zu beachten, dass alle Messungen in  $\text{MgCl}_2$ -freiem Puffer durchgeführt wurden. Durch Zugabe eines Überschusses von  $\text{Mg}^{2+}$ -freiem Rap1B\*GNP verringerte sich die Hydrolyserate geringfügig, wobei die Messung nicht bei 0 % GTP endete (Abb. 49A). Beide Effekte sind auf die Abwesenheit von Magnesium zurückzuführen, da dadurch die Affinität sowohl von Rap1B als auch von RhoA zum Nukleotid deutlich herabgesetzt war und ein Austausch der Nukleotide stattfand. Dies führte zur Bindung von GTP an Rap1B, wodurch GTP nicht mehr hydrolysiert wurde und gleichzeitig zur Bindung von GppNHp an RhoA, weshalb letzteres eine geringere Hydrolyseaktivität unter den

gewählten *Multiturnover*-Bedingungen aufwies.

Da Arap3 (GAP) eine deutliche Beschleunigung der Hydrolyse aufwies, wurde der Einfluss der RA-PH-Domäne auf die GAP-Domäne von Arap3 untersucht. Hierzu wurde Arap3 (RA-PH) *in trans* zur GAP-Domäne zugegeben und die Hydrolyse-Aktivität von RhoA mittels HPLC gemessen (Abb. 49B). Hierbei wurde eine 80-fach geringere GAP-Konzentration (10nM) eingesetzt, um die Raten der Reaktion bestimmen zu können. Dabei zeigte sich, dass die Zugabe von Arap3 (RA-PH) keinen Einfluss auf die Aktivität von Arap3 (GAP) besaß. Die Zugabe von Rap1B\*GNP führte wieder zu einer Verringerung der Hydrolyserate von RhoA (Abb. 49B).

Um eine mögliche Interaktion zwischen der GAP-Domäne und der RA-PH-Domäne nachweisen zu können, wurden ITC-Messungen durchgeführt, die jedoch keine Signaländerungen ergaben (Daten nicht gezeigt).



**Abbildung 49: Einfluss einzelner Domänen auf die katalytische Aktivität von Arap**

**A:** Bestimmung der Aktivität von Arap3 (GAP-RA-PH) und Arap3(GAP) auf RhoA unter *multiturnover*-Bedingungen (Vollständige Messung in klein). Hierzu wurden 80  $\mu\text{M}$  RhoA (Nt-frei) mit 60  $\mu\text{M}$  GTP und 0,8  $\mu\text{M}$  Arap3 inkubiert und Messwerte bei den angegebenen Zeitpunkten entnommen, um mittels HPLC die prozentuale GTP-Konzentration zu bestimmen (Puffer: Standardpuffer ohne  $\text{MgCl}_2$ , mit 5% Glycerin). Zu einem Ansatz (blau) wurde 5  $\mu\text{M}$  Rap1B\*GNP (in  $\text{MgCl}_2$ -freiem Puffer) zugegeben. **B:** Einfluss der RA-PH-Domäne auf die Aktivität der GAP-Domäne von Arap3. Hierzu wurden 100  $\mu\text{M}$  RhoA, 80  $\mu\text{M}$  GTP und 10 nM Arap3 (GAP) vorgelegt und Messpunkte entnommen. Zu Ansatz 2 (rot) wurden 20  $\mu\text{M}$  Rap1B\*GNP zugegeben. (Messbedingungen wie unter A). **C:** Einfluss der RA-Domäne auf die GAP-Aktivität von Arap1. Es wurden PBP-Messungen (s.o.) mit 2  $\mu\text{M}$  CDC42 und 10  $\mu\text{M}$  Arap1 (GAP-RA) bei An-/Abwesenheit von 100  $\mu\text{M}$  RA-Domäne durchgeführt.

### *Arap1*

Bereits die Messungen von GAP\_4 und GAP-PS-RA zeigten keinen Einfluss der RA-Domäne auf die GAP-Aktivität (s. S. 88), was jedoch nochmals in einem weiteren Experiment untersucht werden sollte.

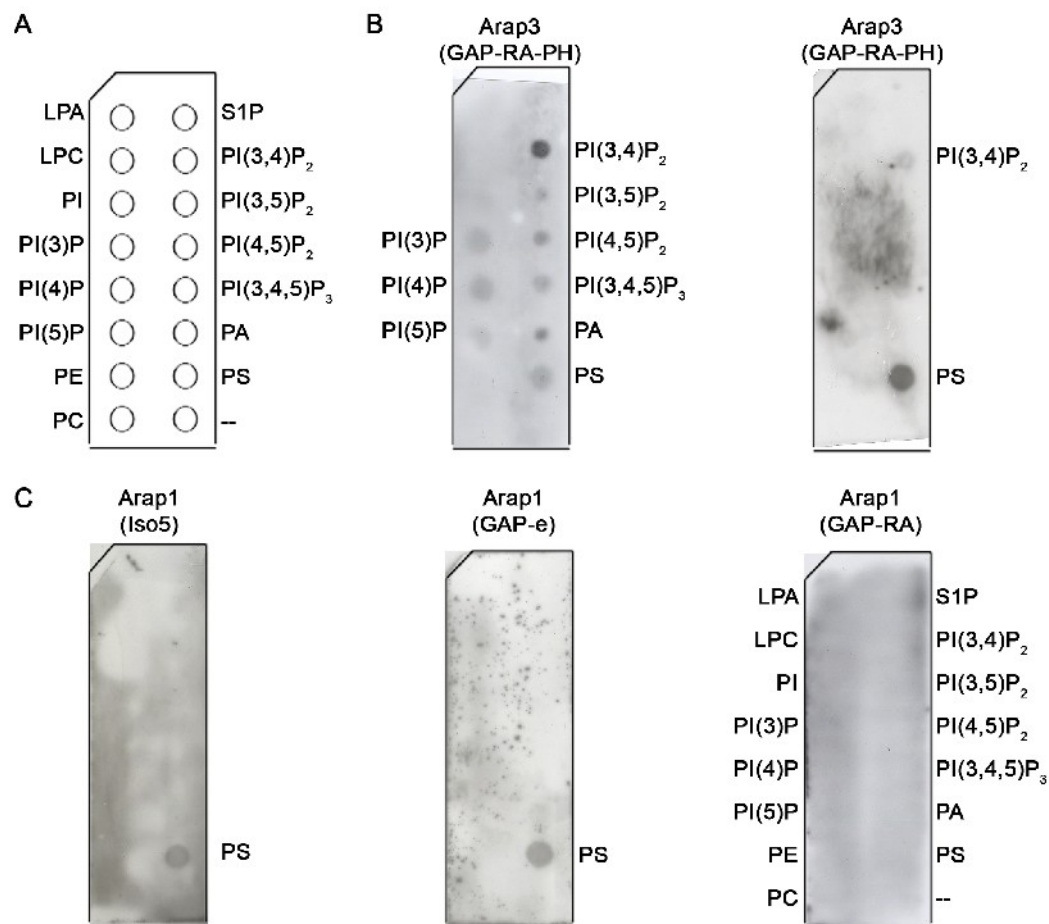
Würde die RA-Domäne von Arap1 (GAP-RA) an CDC42 binden, müsste ein Überschuss an freier RA-Domäne die Aktivität von Arap1 (GAP-RA) verringern, unter der Voraussetzung, dass die Affinität zwischen Arap1 (RA) und CDC42 ausreichend hoch ist. Die Rate unter Anwesenheit der RA-Domäne ist jedoch geringfügig schneller (Abb. 49C) und wäre eher ein Hinweis auf eine allosterische Aktivierung der GAP-Domäne von (GAP-RA) durch freies RA. Dafür ist der Effekt jedoch sehr gering.

### **3.3.7 Bindungspartner der PH-Domänen**

Die Bindung von Phosphoinositolen an die PH-Domänen von Arap1 und Arap3 wurde mittels *PIP-Strip* Nitrocellulose untersucht. Hierzu wurden GST-Fusionsproteine von Arap1 und Arap3 Konstrukten über Nacht mit PIP-Strips inkubiert und die Bindung an die darauf immobilisierten Phosphoinositole mittels Antikörpern nachgewiesen.

Arap3 (GAP-RA-PH) band demnach mit hoher Affinität an  $PI(3,4)P_2$  und Phosphatidylserin (PS), wobei die Intensität zwischen verschiedenen Messungen unterschiedlich war. Mit geringer Affinität wurden in einer der Messungen auch andere Phosphoinositole und Phosphatidylsäure detektiert (Abb. 50B). Das getestete Konstrukt von Arap3 enthielt die fünfte PH-Domäne, so dass die hier detektierte Bindung an Phosphoinositole wahrscheinlich über diese Domäne vermittelt wird.

Arap1 zeigte eine deutlich spezifischere Bindung ausschließlich an Phosphatidylserin. Eine genauere Festlegung der Bindestelle, über den Einsatz verschiedener Konstrukte zeigte, dass auch hier sehr wahrscheinlich die fünfte PH-Domäne (bzw. PH5-Ende) verantwortlich für die Interaktion mit Phosphatidylserin zeichnet, da das Arap1 (GAP-RA)-Konstrukt kein positives Signal zeigte (Abb. 50C). Dabei ist nicht ausgeschlossen, dass PH3 und PH4 ebenfalls PS binden könnten.



**Abbildung 50: Bindung von Phosphoinositolen an Arap Proteine**

**A:** PIP-Strip (*Echelon*). Zuordnung: LPA: Lysophosphatsäure, LPC: Lysophosphocholin, PI: Phosphoinositol, PI(x)P: Phosphoinositol-Monophosphat, S1P, Sphingosin-1-Phosphat, PI(x,x)P: Phosphoinositol-Diphosphat, PI(3,4,5): Phosphoinositol-3,4,5-Triphosphat, PA: Phosphatidylsäure, PS: Phosphatidylserin. **B:** Bindung von Arap3 (GAP-RA-PH) an Phosphoinositole in 2 verschiedenen Messungen mit gleicher Proteincharge (Inkubationspuffer: 50 mM Tris 7.5, 50 mM NaCl, 5% Glycerin, 5 mM  $\beta$ ME). **C:** Detektion der Interaktion von Arap1 mit Phosphoinositolen, bei Verwendung der angegebenen Konstrukte (Inkubationspuffer: Standardpuffer).

### 3.3.8 Kristallisation von Arap

Die Kristallstruktur von Arap alleine und im Komplex mit Interaktionspartnern würde einen Einblick in die Regulationsmechanismen dieses Proteins geben. Unter Berücksichtigung der gewonnenen Ergebnisse wurden verschiedene Kristallansätze bei Verwendung der vorhandenen Screens durchgeführt (Tabelle 12). Die Ansätze wurden sowohl bei 4°C als auch bei 25°C inkubiert. Es wurden ausschließlich Kristalle von RhoA und CDC42 erhalten, die aufgrund der geringen Affinität zu den Arap Proteinen unabhängig kristallisierten. Die Kristallisation von Arap war nicht erfolgreich.

Tabelle 12: Kristallisationsansätze mit Arap Proteinen

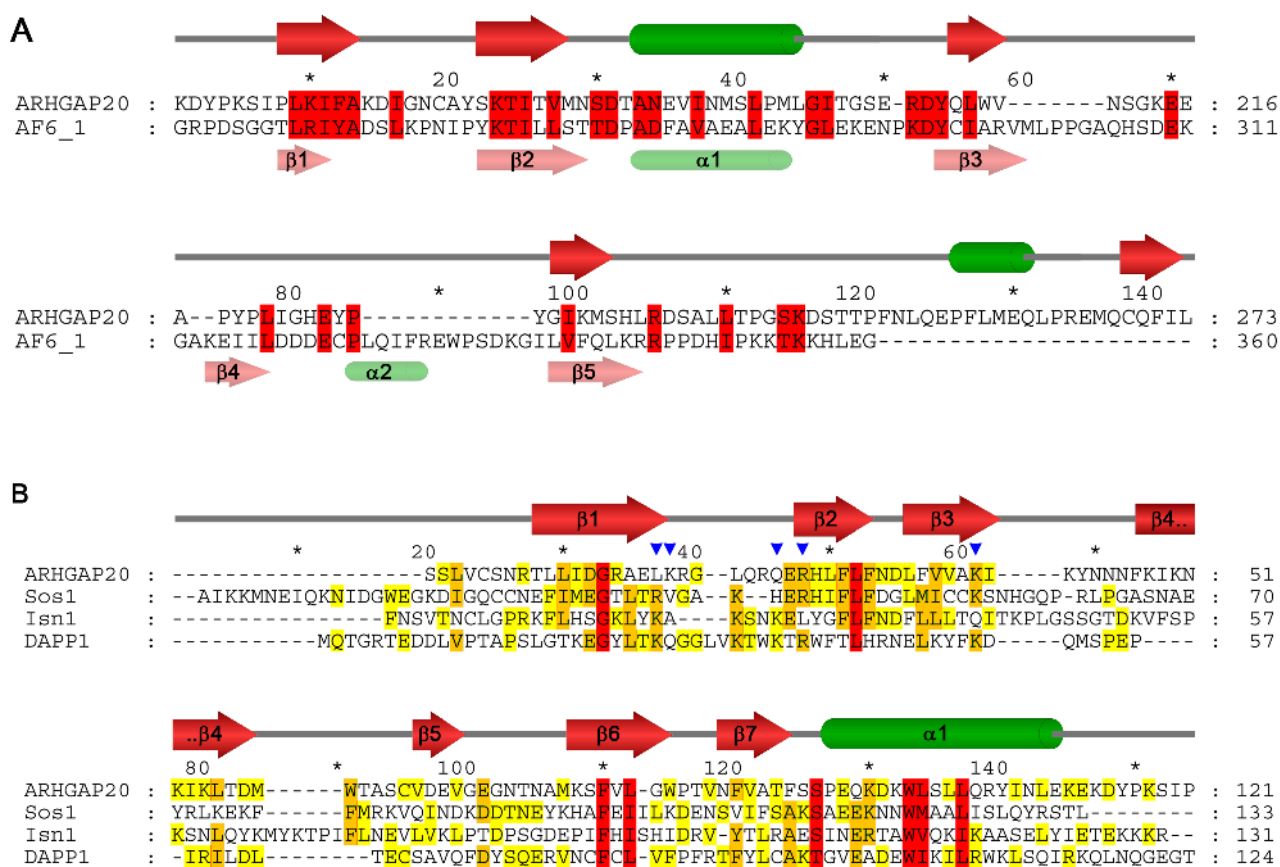
<b>Arap</b>	<b>Konstrukt</b>	<b>G Protein 1</b>	<b>G Protein 2</b>
Arap1	(RA)		
Arap1	(RA)		DiRas1 c' (GNP)
Arap1	(RA)		DiRas2 c' (GNP)
Arap1	(GAP-RA)		
Arap1	(GAP-RA)	RhoA c' (GDP, AIF <sub>x</sub> )	
Arap1	(GAP-RA)	RhoA c' (GNP)	
Arap1	(GAP-RA)	CDC42 c' (GDP, AIF <sub>x</sub> )	
Arap1	(GAP-RA)	CDC42 c' (GDP, AIF <sub>x</sub> )	DiRas2 c' (GNP)
Arap1	(GAP-e)		
Arap1	(GAP-e)	CDC42 c' (GDP, AIF <sub>x</sub> )	
Arap1	(GAP-e)	CDC42 c' (GDP, AIF <sub>x</sub> )	DiRas2 c' (GNP)
Arap3	(GAP-RA-PH)		
Arap3	(GAP-RA-PH)	RhoA c' (GDP, AIF <sub>x</sub> )	
Arap3	(GAP-RA-PH)	RhoA c' (GDP, AIF <sub>x</sub> )	Rap1B c' (GNP)

Bei den Ansätzen zeigte sich, dass sowohl das schlecht lösliche Arap3 als auch das sehr gut lösliche Arap1 in der Mehrheit der Bedingungen präzipitierte. Insbesondere Arap3 war nicht verwendbar zur Kristallisation.

### 3.4 ARHGAP20

#### 3.4.1 Sequenzvergleich

ARHGAP20 besitzt fünf verschiedene Spleißvarianten, die sich hauptsächlich in den ersten 33 Aminosäuren unterscheiden. Die in dieser Arbeit untersuchte Isoform ist ARHGAP20 1e, welche erst hinter dem variablen N-Terminus beginnt. Das gesamte Protein besitzt 1155 Aminosäuren bei einer Molmasse von 129 kDa. Ein Konstrukt, welches der Isoform 1a entspricht wurde von Y. Takai zur Verfügung gestellt.



**Abbildung 51: Sequenzvergleich von ARHGAP20**

**A:** Sequenzvergleich der RA-Domäne von ARHGAP20 mit der ersten RA-Domäne von AF6. Die Sekundärstruktur über der Sequenz entspricht der Vorhersage von ARHGAP20, die untere der von AF6. **B:** Sequenzvergleich der PH-Domäne von ARHGAP20 mit den PH-Domänen der Proteine, die die höchste Verwandtschaft in Bezug auf Sequenz und Sekundärstruktur aufweisen. Die angedeutete Sekundärstruktur entspricht der vorhergesagten Sekundärstruktur von ARHGAP20. Diese entspricht der Struktur der PH-Domäne von Sos1 bis auf wenige Abweichungen (gemäß *Phyre*). Blaue Pfeile indizieren die für die Bindung von Phosphoinositolen verantwortlichen, positiv geladenen Reste von DAPP1<sup>(486)</sup>.

Der Sequenzvergleich der RhoGAP-Domäne zeigt mit 18% die höchste Identität zu p50RhoGAP (Abb. 36A), während keine besonders erhöhte Homologie zu den Arap-Proteinen vorhanden ist (14-16%). Die konservierten Bereiche enthalten die typische Sequenz der RhoGAP-Proteine einschließ-

lich des katalytischen Arginins.

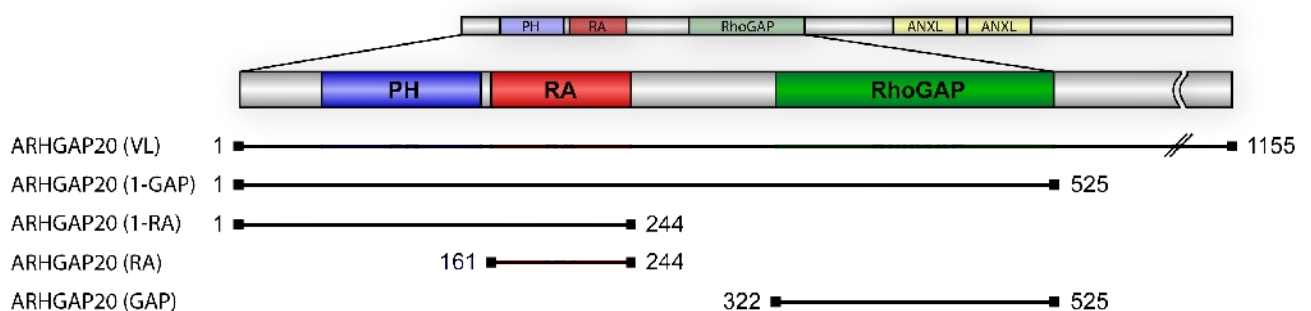
Die RA-Domäne unterscheidet sich deutlich von bekannten RA-Domänen oder den vorhergesagten RA-Domänen der Arap-Proteine, da eine Sekundärstruktur-Vorhersage von ARHGAP20 nicht die typische Ubiquitin-Faltung identifizieren konnte (Abb. 51A). Auch die *smart*-Datenbank identifiziert die RA-Domäne nicht. Ein Vergleich mit dem nächsten Sequenzhomolog, AF6 (erste RA-Domäne), zeigt eine sehr hohe Konservierung im Bereich von  $\beta 1$  bis  $\beta 3$ , der die Interaktionsfläche mit Ras-ähnlichen Proteinen einschließt, der Bereich hinter  $\beta 3$  ist in Sequenz und Sekundärstruktur jedoch nur sehr gering konserviert (Abb. 51A). Dabei ist nicht ausgeschlossen, dass der Bereich von AS 211 bis 228 eine Insertion bildet und die nachfolgenden Strukturelemente an der Ubiquitin-Faltung beteiligt sind.

Die Identifikation des Proteins mit der höchsten Sequenz- und Struktur-Identität zur PH-Domäne von ARHGAP20 erfolgte über den *Threading-Server Phyre*. Hierbei zeigte sich, dass die PH-Domäne von Sos1 und die PH-Domäne von Intersectin 1 (DH-PH) die höchste Homologie zu ARHGAP20 aufweisen (10% und 13%). Ein drittes Protein ist DAPP1, dessen PH-Domäne mit hoher Affinität an  $PI(3,4,5)P_3$  und  $PI(3,4)P_2$  bindet<sup>(486)</sup>. Die Sekundärstruktur der verschiedenen Domänen ist hoch konserviert (Abb. 51B) und positiv geladene Reste in  $\beta 1$ ,  $\beta 2$  und  $\beta 3$  von DAPP1 sind auch bei ARHGAP20 vorhanden, die jedoch stellenweise um wenige Positionen voneinander abweichen (Abb. 51B).

### 3.4.2 Aufreinigung von ARHGAP20

#### Konstrukte

Aufgrund der Größe von ARHGAP20 wurde ARHGAP20 (VL) in *SF9*-Zellen exprimiert und sowohl kleinere Konstrukte des Proteins als auch ARHGAP20 (VL) in pGEX-Vektoren zur Expression in *E. coli* kloniert. Die dabei verwendeten Konstrukte sind in Abb. 52 gezeigt. Hierbei wurden nur Konstrukte verwendet, die maximal die ersten 525 Reste einschlossen.



**Abbildung 52: Konstrukte von ARHGAP20**

Die Nummern entsprechen der Sequenz von ARHGAP20 Isoform 1e (UniProt: Q9P2F6-4).



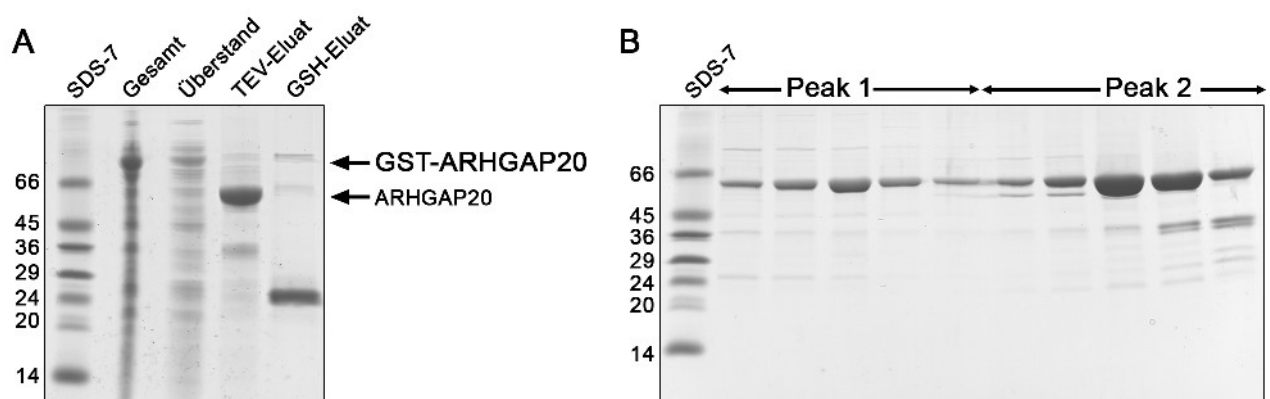
### Aufreinigung von ARHGAP20

Die Löslichkeit der Konstrukte von ARHGAP20 wurde über Testexpressionen mit anschließendem Western Blot getestet. Dabei zeigte sich, dass jedes Konstrukt, außer ARHGAP20 (1-GAP), vollständig unlöslich war und über GST-Antikörper nicht im löslichen Überstand nachgewiesen werden konnte.

**Tabelle 13: Löslichkeit der Konstrukte von ARHGAP20**

Protein	Konstrukt	Ausbeute	Eigenschaften
ARHGAP20	1-1155 (VL)	-	unlöslich
ARHGAP20	1-GAP	23 mg / 10L TB	Nur löslich bei NaCl > 300mM, Eluiert als Monomer und Dimer
ARHGAP20	1-RA	-	unlöslich
ARHGAP20	RA	-	unlöslich
ARHGAP20	GAP	-	unlöslich

Eine erfolgreiche Reinigung war nur von ARHGAP20 (1-GAP) möglich (Tabelle 13), welches sowohl die PH- und die RA-Domäne als auch die GAP-Domäne einschloss. Die Aufreinigung erfolgte als GST-Fusionsprotein, welches auf der Säule mittels TEV abgetrennt wurde (Abb. 53A). Das Protein eluierte von der Gelfiltration in zwei Fraktionen, die einem Dimer und einem Monomer entsprachen (Abb. 53B), wobei allerdings nur ein Puffer mit minimal 300 mM NaCl verwendet werden konnte, da das Protein unterhalb von 300 mM präzipitierte. Die Zugabe von 5% Glycerin, um hydrophobe Wechselwirkungen zu minimieren führte ebenfalls sofort zur Präzipitation von ARHGAP20 (1-GAP).

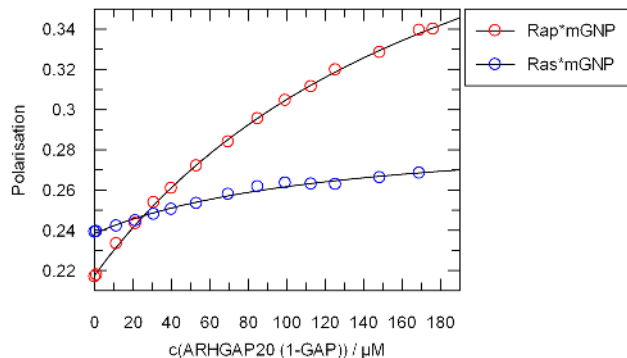


**Abbildung 53: Aufreinigung von ARHGAP20 (1-GAP)**

**A:** Aufreinigung des Konstrukts über eine GSH-Säule. TEV-Eluat zeigt die Elution des Proteins (59,5 kDa) nach der Abtrennung des GST-Teils auf der Säule. **B:** Gelfiltration des TEV-Eluats (S75-16/60). Das Protein eluierte als Dimer (Peak 1) und als Monomer (Peak 2). Verwendeter Puffer: 50 mM Tris pH 7,5, 300 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM βME.

### 3.4.3 Interaktion mit Ras und Rap

Da Rap1B als möglicher Interaktionspartner von ARHGAP20 angenommen wird, wurde die Affinität zu Rap1B\*mGNP und H-Ras\*mGNP über Polarisations Titration in 300 mM NaCl-haltigem Puffer bestimmt. Hierbei ergab sich ein  $K_D$  zu Rap1B\*mGNP von 196  $\mu\text{M}$  und zu Ras\*mGNP von 120  $\mu\text{M}$  (Abb. 54), wobei der Maximalwert der Titration deutlich unterschiedlich war. Während sich die Rap1B-Titration einem Wert von 0,479 annäherte, verblieb die Titration bei Vorlage von H-Ras bei 0,29 und damit nur 0,05 höher als der Anfangswert. Da ein Protein von 59,5 kDa als Titrant eingesetzt wurde, war dieser Anstieg geringer als erwartet und deutete auf artifizielle Polarisationsänderungen hin, die durch Zugabe jeglichen Proteins verursacht werden könnte (vgl. Abb. 35B).



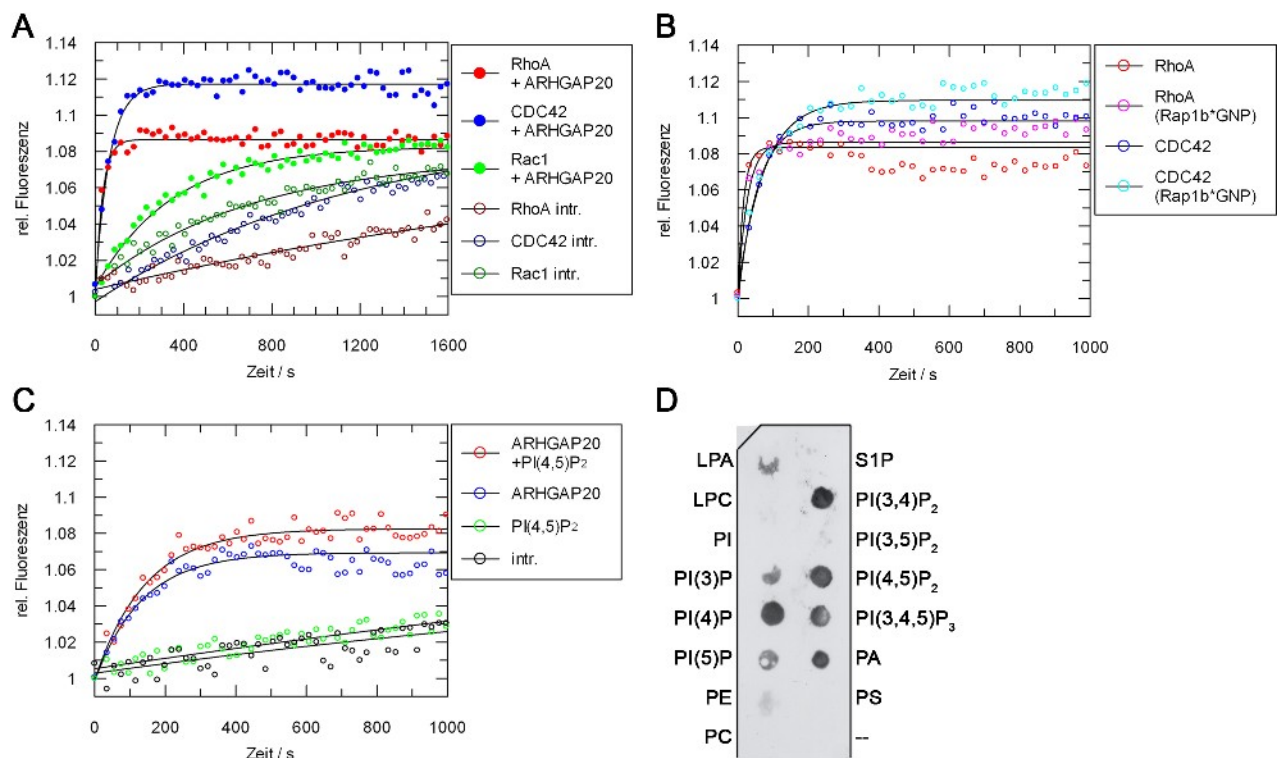
**Abbildung 54: Interaktion von ARHGAP (1-GAP) mit G Proteinen der Ras-Familie**

Polarisationstitration von G Proteinen der Ras-Familie mit ARHGAP20 (1-GAP) (Messpuffer: 50 mM Tris pH 7,5, 300 mM NaCl, 5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 5 mM  $\beta\text{ME}$ ). **A:** Vorlage von 2  $\mu\text{M}$  Rap\*mGNP. **B:** Vorlage von 2  $\mu\text{M}$  H-Ras\*mGNP.

### 3.4.4 Hydrolyse-Aktivität von ARHGAP20

Auch die Hydrolyse-Aktivität von ARHGAP20 konnte nur mit dem (1-GAP)-Konstrukt bei Anwesenheit von 300 mM NaCl gemessen werden. Zunächst wurde die Spezifität gegenüber den Rho-Proteinen über die fluorimetrische Messung mittels PBP (Spektrometer) bestimmt. Hierbei zeigten 100 nM ARHGAP20 (1-GAP) eine 100-fache Beschleunigung der Hydrolyse von RhoA und eine 19-fache Erhöhung der Katalyse von CDC42. Die Aktivität von Rac1 wurde nur gering um das 2-fache erhöht (Abb. 55A, Tabelle 14). ARHGAP20 (1-GAP) zeigte demzufolge eine deutliche Spezifität für RhoA und CDC42.

Die Zugabe von 100  $\mu\text{M}$  Rap1B\*GNP resultierte nicht in einer Beschleunigung der Hydrolyse von RhoA oder CDC42 (Abb. 55B, Tabelle 14).



#### Abbildung 55: Hydrolyseaktivität von ARHGAP20 (1-GAP)

Fluorimetrische Hydrolysemessungen von ARHGAP20 mittels PBP (Puffer: 50 mM Tris pH 7,5, 300 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM βME). **A:** Spezifitätsmessung mit Proteinen der Rho-Familie. Es wurden 2 μM G Protein, 100 nM ARHGAP20 (1-GAP) und 20 μM PBP vorgelegt und die Reaktion durch Zugabe von 1 μM GTP gestartet. **B:** Hydrolysemessung von ARHGAP20 (1-GAP) und RhoA (Nt-frei) bzw. CDC42 (Nt-frei) bei Anwesenheit von 100 μM Rap1b\*GNP (Bedingungen wie unter A). **C:** Hydrolysemessung von 10 nM ARHGAP20 (1-GAP) und 2 μM RhoA (Nt-frei) bei Anwesenheit von 45 μM PI(4,5)P<sub>2</sub>. Die Reaktion wurde durch 1 μM GTP gestartet. **D:** PIP-Strip von GST-ARHGAP20 (1-GAP) in Standardpuffer (inkl. 300 mM NaCl).

Bei Bestimmung der Interaktion mit Phosphoinositolen zeigte ARHGAP20 (1-GAP) eine sehr geringe Spezifität und interagierte mit nahezu allen PIPs mit Ausnahme von PI(3,5)P<sub>2</sub> (Abb. 55D). PI(4,5)P<sub>2</sub> (Abb. 55C, Tabelle 14) und PI(3,4)P<sub>2</sub> (Daten nicht gezeigt) besaßen allerdings keinen Einfluss auf die katalytische Aktivität von ARHGAP20 (1-GAP).

#### 3.4.5 Kristallisation von ARHGAP20

Zur Kristallisation von ARHGAP20 wurden zwei verschiedene Ansätze durchgeführt. Zunächst wurde ARHGAP20 in Standardpuffer mit 300 mM NaCl eingesetzt und verschiedene Screens getestet. Da das Protein im Großteil der Ansätze präzipitierte, wurde in einem zweiten Versuch NaCl in einer Endkonzentration von 600 mM eingesetzt, da das Protein 1:1 mit dem Kristallisationspuffer verdünnt wird. Auch dies führte nicht zur Kristallisation des Proteins.

## Ergebnisse

**Tabelle 14: Katalytische Aktivität von ARHGAP20 (1-GAP)**

<b>G Protein</b>	<b>GAP</b>	<b>Rate / 10<sup>-4</sup> s<sup>-1</sup></b>
Rac1	intr.	13,9
	100 nM ARHGAP20 (1-GAP)	28
CDC42	intr.	8,29
	100 nM ARHGAP20 (1-GAP)	156
	100 nM ARHGAP20 (1-GAP) + 100 μM Rap1B*GNP	133
RhoA	intr.	3,19
	100 nM ARHGAP20 (1-GAP)	316
	100 nM ARHGAP20 (1-GAP) + 100 μM Rap1B*GNP	361
	10 nM ARHGAP20 (1-GAP)	74
	10 nM ARHGAP20 (1-GAP) + 45 μM PI (4,5)P <sub>2</sub>	70

## 3.5 *Ras interference*, Rin

### 3.5.1 Sequenzvergleich

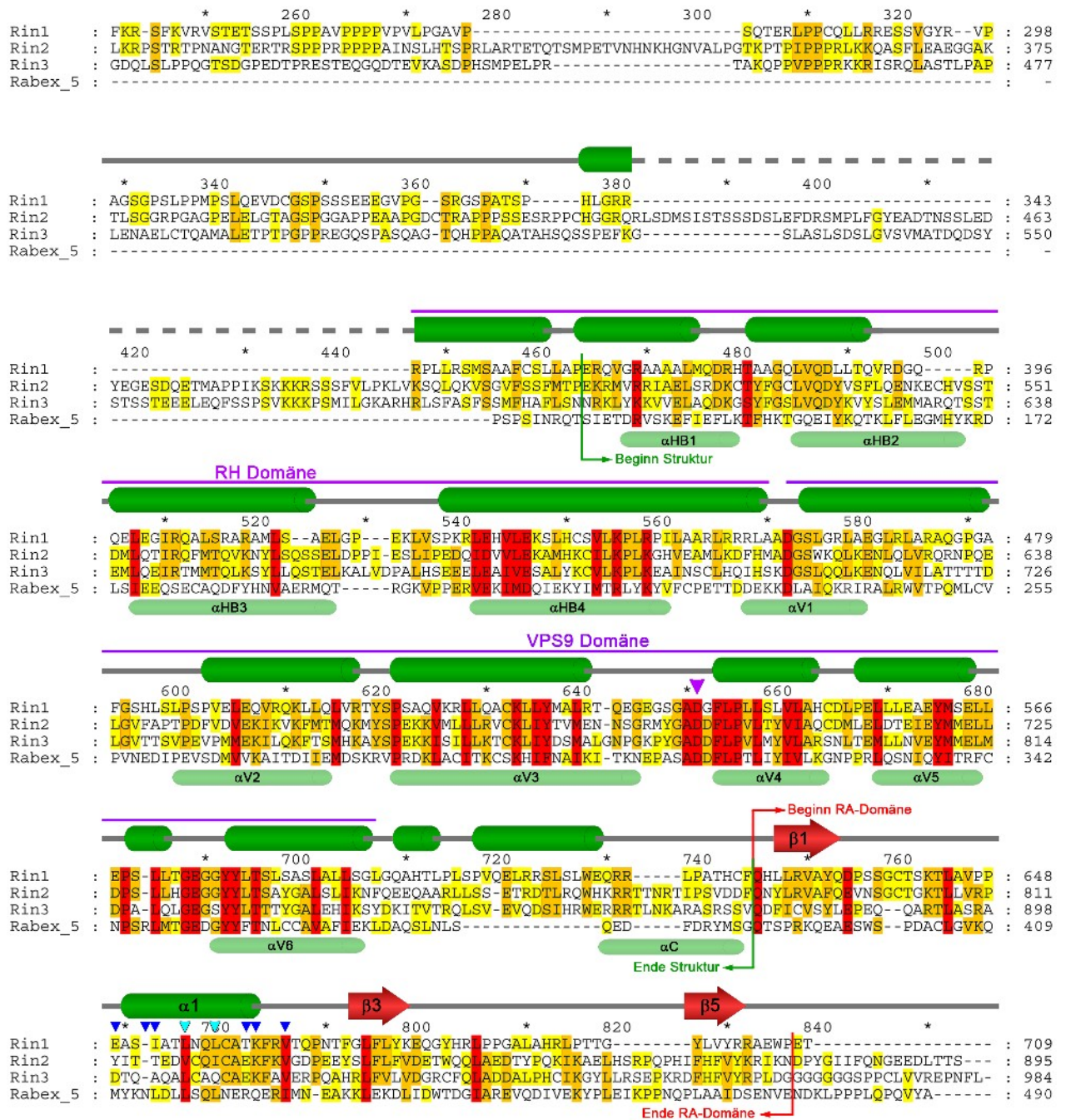
*Ras interference* (Rin)-Proteine bezeichnen drei Proteine, die als Effektoren von Ras identifiziert wurden. Rin1 besitzt zwei bekannte Spleißvarianten, von denen Isoform 2 um die Aminosäuren 429-490 verkürzt ist (Abb. 56), wodurch wesentliche Bereiche der katalytischen Domäne fehlen. Rin2 besitzt ebenfalls zwei Isoformen, die sich in der Länge des N-Terminus unterscheiden. Die vier Rin3-Isoformen unterscheiden sich in der Länge des C-Terminus.

Der Vergleich von Rin1, Rin2 und Rin3 zeigt die größten Unterschiede zwischen der SH2 und der VPS9-Domäne (Alignment, siehe Anhang), während die größte Sequenzhomologie zwischen den RA-Domänen, den katalytischen VPS9-Domänen sowie den sogenannten Rin-Homologie (RH)-Domänen (Abb. 56) besteht.

Der Vergleich mit der Vps9-RabGEF-Struktur von Rabex-5<sup>(48)</sup> zeigt eine hohe Homologie zwischen beiden Proteinen, die sich insbesondere in einer starken Ähnlichkeit zwischen der RH-Domäne von Rin und der *Helical bundle* (HB)-Domäne von Rabex-5 äußert (Abb. 56, HB1-HB5). Die (HB)-Domäne von Rabex-5 ist entscheidend für eine hohe GEF-Aktivität und Löslichkeit des Proteins. Das katalytisch aktive Aspartat von Rabex-5 (Abb. 56, lila Pfeil) ist auch bei den Rin-Proteinen in einem Bereich hoher Homologie konserviert.

C-Terminal der VPS9-Domäne (nach  $\alpha V6$ ) nimmt die Konservierung mit Rabex-5 ab und es treten zusätzliche Sekundärstruktur-Elemente auf, die in die RA-Domäne übergehen, welche in Rabex-5 nicht vorhanden ist. Delprato and Lambright<sup>(214)</sup> identifizierten eine C-terminal von der VPS9-Domäne gelegene Helix als autoinhibitorisches Element. Der Vergleich mit den Rin-Proteinen zeigt, dass sich an dieser Stelle die  $\alpha 1$ -Helix der RA-Domäne befindet (Abb. 56), wobei die Sequenzhomologie der gesamten RA-Domäne zu Rabex-5 jedoch gering ist. Einige der identifizierten Reste sind auch in Rin1 konserviert (Abb. 56, blaue Markierungen) und könnten demzufolge eine Funktion in der postulierten Autoinhibition der VPS9-Domäne durch die RA-Domäne ausüben.

## Ergebnisse



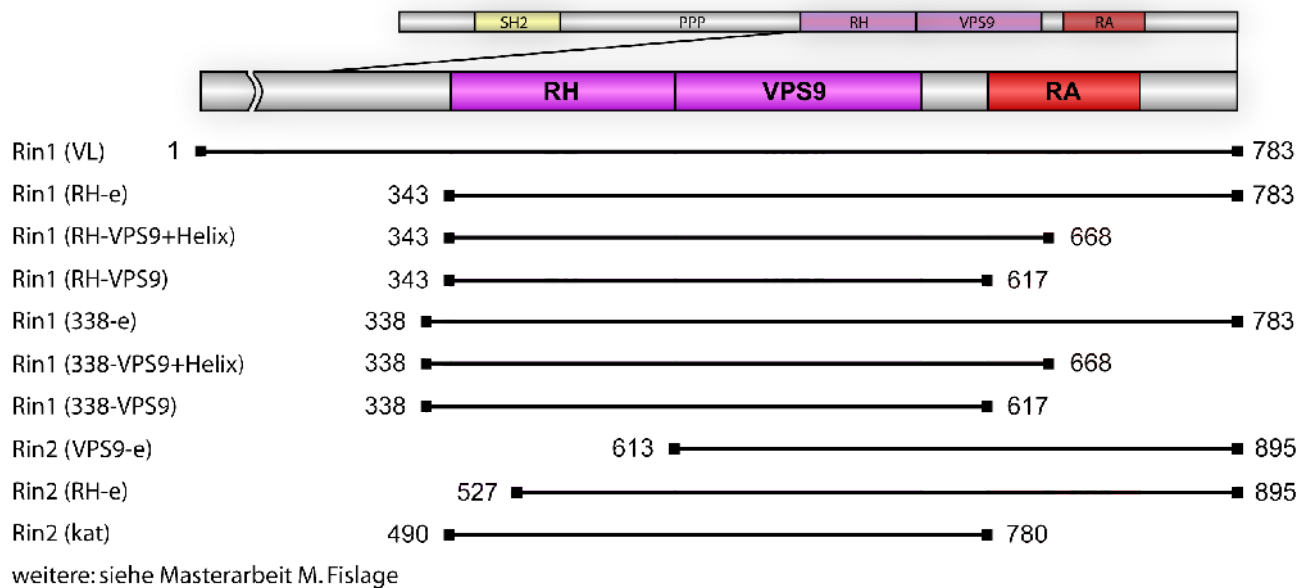
**Abbildung 56: Sequenzvergleich der Rin-Proteine**

Sequenzvergleich von Rin-Proteinen mit Rabex-5. Die Domänengrenzen der Struktur von Rabex-5 sind angedeutet. Die Sekundärstruktur von Rabex-5 ist unterhalb der Sequenzen, die vorhergesagte Sekundärstruktur (*Phyre*) von Rin1 oberhalb angegeben. Das katalytische Aspartat von Rabex-5 ist durch die lila Markierung gekennzeichnet. Die blauen und cyan-farbenen Pfeile markieren die für die Autoinhibition von Rabex-5 verantwortlichen Reste, mit den in Rin1-mutierten Aminosäuren in cyan. Die Sekundärstrukturvorhersage der RA-Domäne zeigt nur  $\beta$ -Faltblatt Strukturen an den Positionen von  $\beta$ 1,  $\beta$ 3 und  $\beta$ 5 der Ubiquitin-Faltung an.



### 3.5.2 Aufreinigung von Rin

#### Konstrukte



#### Abbildung 57: Konstrukte von Rin

Gewählte Konstruktgrenzen von Rin1 und Rin2. Alle Konstrukte wurden über das *Gateway*-System in den pGEX 4T1-TEV-GW-Vektor kloniert. Rin1 (RH-e) wurde zusätzlich über Restriktion und Ligation in den pGEX 4T1-TEV und in pET28A-2xHis-E.i.F. kloniert.

Unter Einbeziehung der Homologie zwischen Rabex-5 und den Rin-Proteinen wurden mehrere Konstrukte hergestellt, die die katalytische Domäne und die RA-Domäne umfassen (Abb. 57).

Ein Konstrukt der RA-Domäne existierte bereits<sup>(391)</sup>. Weiterhin wurden Rin1 (VL) und Konstrukte, die nur die RH- und die VPS9-Domäne einschließen hergestellt. Zur Untersuchung der Inhibition von Rin1 durch die RA-Domäne wurde das Konstrukt Rin1 (RH-VPS9+Helix) erstellt, welches zusätzlich zur katalytischen Domäne den Bereich einschließlich der  $\alpha$ 1-Helix der RA-Domäne enthält. Weiterhin wurden die Konstrukte Rin1(RH-e) L655A und Rin1(RH-e) L655A/L658A kloniert, die Mutationen in der Helix der RA-Domäne aufweisen. Weitere Konstrukte wurden in der Masterarbeit von M. Fislage erstellt.

#### Aufreinigung

Das Konstrukt Rin1 (RH-e) war das einzige, lösliche Konstrukt neben der RA-Domäne, welches in ausreichender Menge, nachweisbar erhalten werden konnte (Tabelle 15). Häufig trat eine starke Bande bei 60 kDa auf, welche sich auf gleicher Höhe mit einigen der getesteten GST-Fusionsproteine von Rin1 befand. Nach Analyse mittels ESI und Western Blot, handelt es sich bei diesem

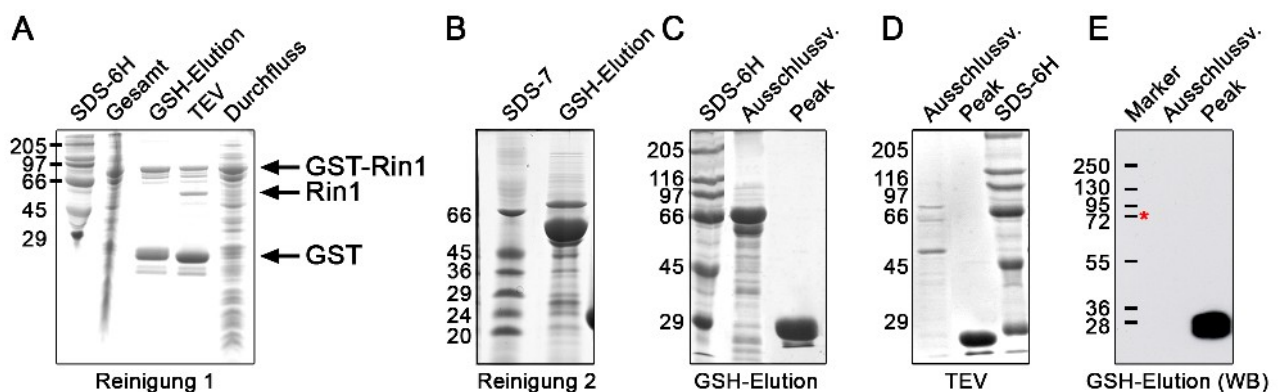


Protein nicht um Rin1 sondern wahrscheinlich um GroEL2 (siehe Masterarbeit M. Fislage).

**Tabelle 15: Reinigungserfolg der Rin-Proteine**

Protein	Konstrukt	Ausbeute	Eigenschaften
Rin1	(RH-e)	32 mg / 10L TB 134mg / 30L TB (Fermenter)	Nur als GST-Fusionsprotein ausreichend löslich. Eluiert im Ausschlussvolumen sehr unreines Protein
Rin1	alle getesteten	-	unlöslich
Rin2	alle getesteten	-	unlöslich

Rin1 (RH-e) befand sich nur dann im löslichen Überstand, wenn 0,1% NP40 und 0,1% Triton-X 100 zum Aufschlusspuffer zugegeben wurden. Anschließend konnte Standardpuffer verwendet werden. Bei diesem Konstrukt befand sich stets ein Großteil des Proteins im Durchfluss der GSH-Säule (Abb. 58A), während das restliche, auf der Säule verbliebene Fusionsprotein nicht mit TEV oder Thrombin gespalten werden konnte, obwohl unterschiedliche Linkerlängen zwischen der TEV-Schnittstelle und Rin1 getestet wurden. Auch die Inkubation mit TEV in Lösung benötigte bis zu 2 Tage und hohe TEV-Konzentrationen, um etwa 50% des Fusionsproteins zu spalten (Abb. 58A, "TEV"). Da das resultierende Rin1 (RH-e) nur gering löslich war, wurde auf die Verwendung des Proteins verzichtet und stattdessen nur mit dem GST-Fusionsprotein gearbeitet. Die Bande bei 60 kDa war stets anwesend und variierte je nach Aufreinigung, trotz gleich bleibender Bedingungen, in ihrer Intensität (Abb. 58B).



**Abbildung 58: Aufreinigung von Rin1 (RH-e)**

**A:** Aufreinigung des löslichen Extrakts von Rin1 (RH-e) über eine GSH-Säule bei Elution des Fusionsproteins mit GSH (GSH-Elution) und anschließender Proteolyse der Hälfte des Eluats mit TEV für 2 Tage bei 4°C. **B:** GSH-Elution einer anderen Aufreinigung desselben Konstrukts. **C:** Gelfiltration des Fusionsproteins (S200 26/60). Gezeigt ist eine Fraktion des Ausschlussvolumens und eine Fraktion eines Peaks bei etwa 50 kDa. **D:** Gelfiltration des TEV-hydrolysierten Eluats (S200 26/60). **E:** Western Blot der Fraktionen aus C mit GST-Antikörpern. Die rote Markierung kennzeichnet die Position, an der GST-Rin1 (RH-e) zu erwarten war.

Das Protein eluierte als GST-Fusionsprotein sowie als geschnittenes Protein im Ausschlussvolumen

einer S200 10/30 Säule. (Abb. 58C,D). Interessanterweise konnte GST-Rin1 (RH-e) im Western-Blot nicht durch die Detektion mit GST-Antikörpern nachgewiesen werden (Abb. 58E). Die Existenz des Proteins ist jedoch nachgewiesen, da durch TEV-Spaltung ein Abbauprodukt erhalten werden konnte (Abb. 58A). Diese Tatsache erschwerte den Umgang mit Rin1 deutlich, da keine Möglichkeit bestand, das Vorhandensein des Proteins zu verifizieren.

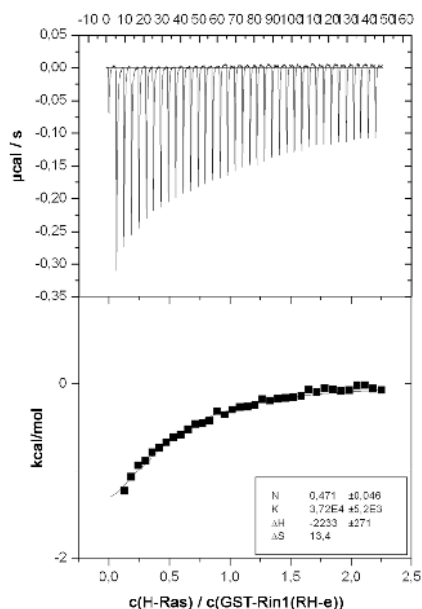
Eine korrekte Faltung des Proteins kann somit nicht bestätigt werden, da es nicht mit ausreichender Affinität an die GSH-Säule band, kein ausreichend zugängliches Epitop für den GST-Antikörper aufwies sowie präzipitierte, sobald man den GST-Teil entfernte.

Da das Protein nur mit geringer Affinität an die GSH-Säule band, wurde ebenfalls die Aufreinigung über einen Ionenaustauscher (Source Q) versucht, die sich jedoch nicht als sinnvoll erwies, da das Protein im Ausschlussvolumen nicht von den Verunreinigungen abgetrennt werden konnte.

Eine weitergehende Beschreibung der Aufreinigung verschiedener Rin1-Konstrukte ist in der Masterarbeit von M. Fislage zu finden.

### 3.5.3 Charakterisierung von Rin1

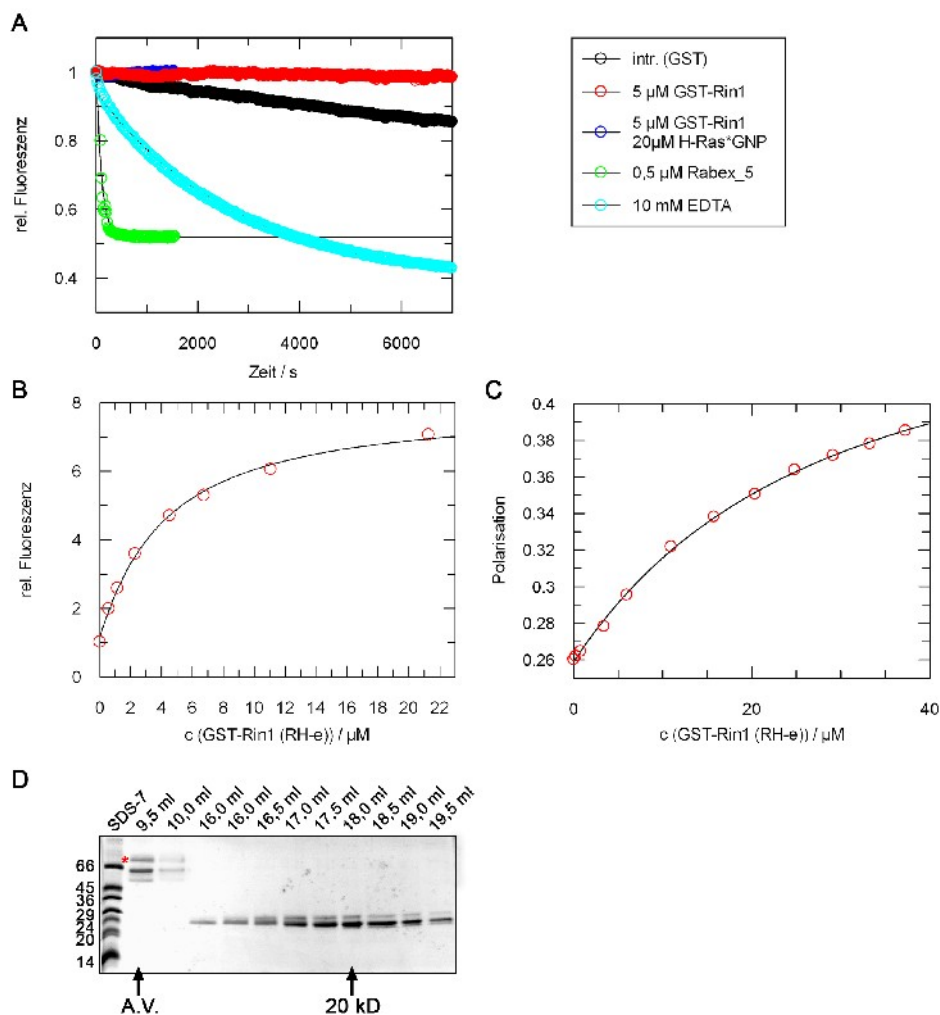
Mit dem erhaltenen GST-Rin1 (RH-e) Konstrukt konnten weitergehende Experimente durchgeführt werden. Hierbei ist jedoch zu beachten, dass das Protein nur sehr unrein und eventuell nicht korrekt gefaltet erhalten werden konnte (Abb. 58C).



**Abbildung 59: Interaktion von Rin1 (RH-e) mit Ras\*GNP**

ITC-Messung zur Bestimmung der Affinität zwischen H-Ras\*GNP (Spritze: 1 mM) und GST-Rin1 (RH-e) (Zelle, 100  $\mu\text{M}$ ). Zur Auswertung wurde die Kontrolle der Titration von H-Ras\*GNP in Puffer subtrahiert (Puffer: Standardpuffer).

Da die Bindung der RA-Domäne an Ras bereits etabliert war, wurde mittels ITC die Interaktion zwischen dem längeren Konstrukt und H-Ras\*GNP überprüft. Dabei wurde keine eindeutige Bindungskurve erhalten, die zudem ein falsches molares Verhältnis aufwies, da die Proteinkonzentration von GST-Rin1 (RH-e) aufgrund der Verunreinigungen nur sehr ungenau über die Bradford-Methode bestimmt werden konnte. Die Auswertung der Messung ergab eine Affinität von 27  $\mu\text{M}$  (Abb. 59), was auf eine korrekte Faltung zumindest der RA-Domäne hindeutet. Die Affinität ist jedoch geringer als die der freien RA-Domäne ( $0.88 \mu\text{M}$ )<sup>(391)</sup>.



**Abbildung 60: Einfluss von Rin1 auf Rab5**

**A:** GEF-Messungen von 200 nM Rab5A\*mGDP mit den angegebenen Proteinen (Standardpuffer) **B:** Fluoreszenztitration von 5  $\mu\text{M}$  Rab5A\*mGDP mit GST-Rin1 (RH-e) (Standardpuffer). **C:** Polarisationstitration von 5  $\mu\text{M}$  Rab5A\*mGDP mit GST-Rin1 (RH-e) (Standardpuffer). **D:** Analytische Gelfiltration (S200 10/30) von 1mg Rab5\*GDP mit GST-Rin1 (RH-e) (rote Markierung) in einem 2:1 Verhältnis. Das Ausschlussvolumen (A.V.) und das Elutionsvolumen eines 20 kDa-Proteins sind angegeben.

Da die Bindung an Ras bestätigt ist, wurde der Einfluss von Ras\*GNP auf die GEF-Aktivität des Proteins untersucht. Dabei zeigte sich, dass GST-Rin1 (RH-e) sowohl alleine als auch bei Anwesen-

heit eines vierfachen Überschusses (20  $\mu\text{M}$ ) H-Ras\*GNP eine Inhibition des intrinsischen Austauschs von Rab5 bewirkte (Abb. 60A). Der Vergleich mit dem Rab5-GEF Rabex-5 und mit der Zugabe von 10mM EDTA zeigt deutlich den Unterschied zu einem katalysierten Austausch.

Zusätzlich ergab die Zugabe von GST-Rin1 (RH-e) eine starke Erhöhung der Fluoreszenzintensität (Daten nicht gezeigt), was auf eine Bindung von GST-Rin1 an Rab5A\*mGDP hinweist. Um dies zu verifizieren, wurden Fluoreszenztitrationen und Polarisationsmessungen von Rab5A\*mGDP und GST-Rin1 (RH-e) durchgeführt, die eine Sättigungskurve zeigen, der eine entsprechende Funktion angepasst werden konnte (Abb. 60B,C). Die Fluoreszenztitration ergab einen  $K_D$  von 3,6  $\mu\text{M}$  während die Polarisationsmessungen einen 6-fach höheren Wert von 24  $\mu\text{M}$  lieferte.

Die Überprüfung mittels analytischer Gelfiltration (Abb. 60D) und ITC-Messungen (Daten nicht gezeigt) zeigte demgegenüber jedoch keine Komplexbildung beider Proteine. Die ITC-Messungen wurden bei zwei verschiedenen Temperaturen, unterschiedlichen Konzentrationen und bei Anwesenheit von H-Ras\*GNP durchgeführt.

In der Masterarbeit von Marcus Fislage wurde die GEF-Aktivität mehrerer Konstrukte von Rin1, einschließlich der L655A, L658A Mutanten auf unterschiedliche Rab-Proteine getestet (Tabelle 16). Rin1 besaß auf keines der getesteten Proteine GEF-Aktivität.

**Tabelle 16: Auf GEF-Aktivität von Rin1 getestete Rab-Proteine (Masterarbeit M. Fislage)**

Rab Protein				
Rap1B (mGDP)	Rab5A (mGDP)	Rab9 (GDP)	Rab16 (GDP)	Rab27 (GDP)
Rab2 (GDP)	Rab6 (mGNP)	Rab11 (mGTP)	Rab18 (mGDP)	Rab38 (GDP)
Rab3A (mGDP)	Rab7 (mGTP)	Rab13 (mGDP)	Rab21 (mGDP)	Ypt1 (mGDP)
Rab4 (GDP)	Rab8A (mGTP)			

### 3.5.4 Kristallisation von Rin1

Die Tatsache, dass GST-Rin1 (RH-e) an Rab5 in der GDP-Form bindet ist einzigartig für eine GEF - G Protein Interaktion. Um diese Interaktion weitergehend untersuchen zu können, wurden Kristallisationsansätze durchgeführt.

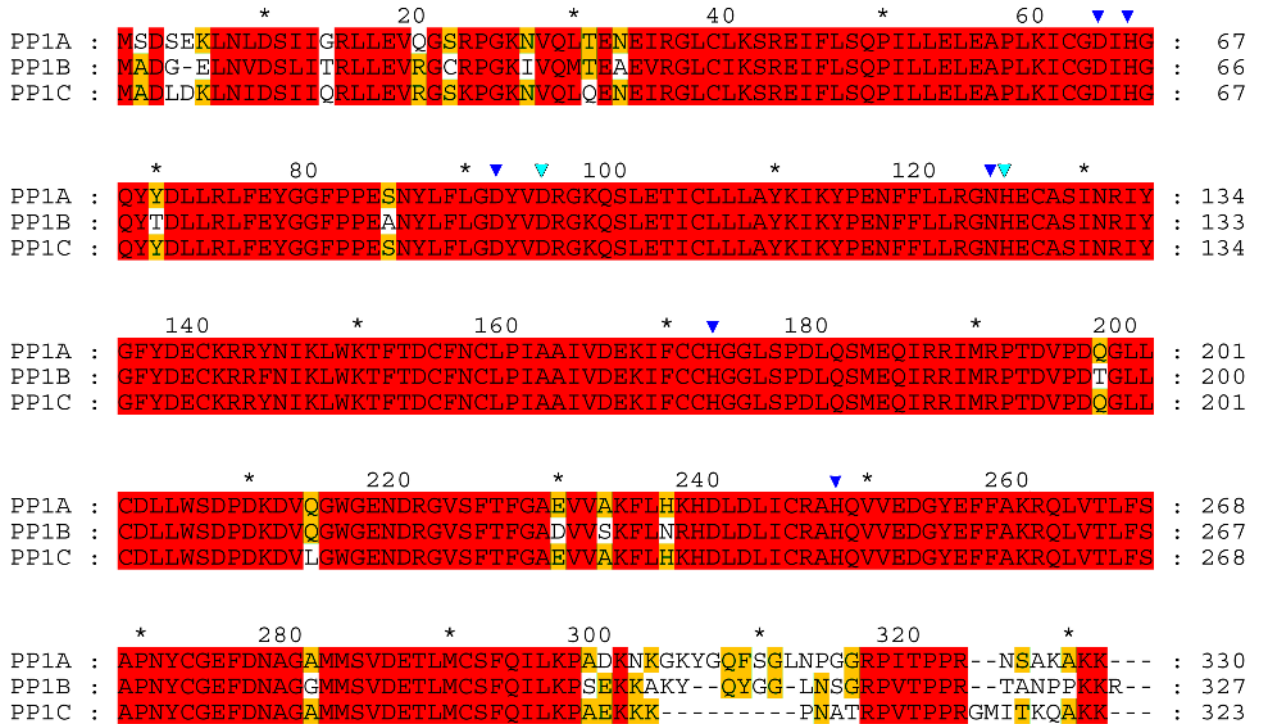
Der Einsatz von geschnittenem Rin1 (RH-e) war aufgrund der geringen Löslichkeit nicht möglich. GST-Rin1 (RH-e), obwohl GST-Fusionsprotein, aggregiert und unrein, wurde alleine, im Komplex mit H-Ras\*GNP und im Komplex mit Rab5\*GDP eingesetzt. Unter fast allen Bedingungen trat sofort Präzipitat auf, welches jegliche Kristallisation verhinderte.

Die Kristallisation von Rin1 war somit nicht erfolgreich.

### 3.6 Shoc2-PP1c

#### 3.6.1 Sequenzvergleich

##### *Proteinphosphatase 1*



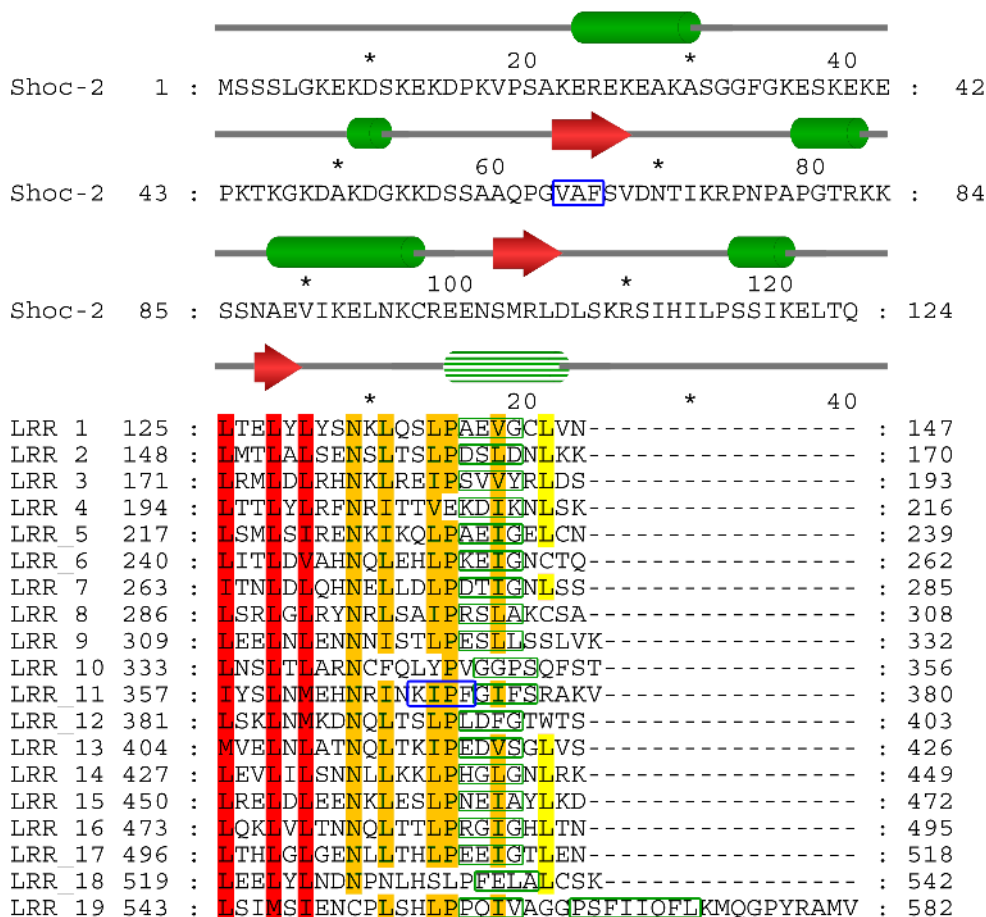
**Abbildung 61: Sequenzvergleich der PP1c-Isoformen**

Vergleich der alpha- (PP1A), beta- (PP1B) und gamma- (PP1C) Isoform der Proteinphosphatase 1. Die für die Bindung des Mn<sup>2+</sup> im aktiven Zentrum verantwortlichen Reste sind blau markiert. Das Histidin, welches als Proton-abstrahierende Base fungiert und das stabilisierende Aspartat sind in cyan markiert.

Proteinphosphatase 1 (PP1c) ist eine Phosphatase mit sehr geringer Substratspezifität, die durch Bindung an regulatorische Untereinheiten deutlich erhöht wird. Ein Vergleich der drei Isoformen von PP1c (alpha: PP1ca; beta: PP1cb; gamma: PP1cc) zeigt eine sehr hohe Identität der Proteine, die sich nur in wenigen Aminosäuren am N-Terminus und deutlich am C-Terminus unterscheiden. Die für die Mn<sup>2+</sup>-Bindung bedeutsamen Reste und damit das aktive Zentrum der Phosphatasen sind zu 100% konserviert (Abb 61). Ein Vergleich mit der Struktur der Phosphatasen zeigt, dass die nicht konservierten Reste ausschließlich an der Proteinoberfläche liegen und somit wahrscheinlich für die Interaktion mit unterschiedlichen Partnern verantwortlich sind. Insbesondere der variable C-Terminus ist z.B. für die spezifische Bindung des regulatorischen Proteins MYPT1<sup>(487)</sup> an PP1cb verantwortlich.

### Shoc2: Vergleich der Leucin-Rich Repeats

Es wird angenommen, dass Shoc2 ein regulatorisches Protein der Phosphatasen ist, mit keiner Spezifität zu einer bestimmten Isoform<sup>(135)</sup>. Die Sekundärstrukturvorhersage der N-terminalen Nicht-LRR Domäne zeigt eine  $\alpha/\beta$ -Struktur, die jedoch nicht einer bekannten Faltung zugeordnet werden kann.



**Abbildung 62: Sequenzvergleich der LRRs von Shoc2**

Vergleich der *Leucin-rich repeats* von Shoc2. Die N-terminale Domäne ist gemeinsam mit der vorhergesagten Sekundärstruktur (*PsiPred*) gezeigt. Die vermeintliche Sekundärstruktur der LRRs ist über der Sequenz und als grüne Box angedeutet. Zwei potentielle konservierte Sequenzmotive, RVXF, die für die Interaktion mit PP1 notwendig sein könnten, sind durch blaue Rechtecke markiert.

Die Anzahl der LRRs schwankt je nach Publikation und Datenbank (Pfam: 17). Ein Sequenzvergleich der LRRs untereinander zeigt, dass das typische Motiv LxxLxLxxN/C in 19 Wiederholungen konserviert ist. Demnach kann davon ausgegangen werden, dass mindestens 19 LRRs vorhanden sind (Abb. 62), die im Vergleich mit anderen LRR-Proteinen<sup>(488)</sup> außerordentlich regelmäßig sind. Es sind nur LRR-Längen von 23 und 24 AS vorhanden, die gemäß der Sekundärstruktur-Vorhersage (*PsiPred*) alle eine Helix von 4 Aminosäuren aufweisen sollen. Dieser geht bis

auf eine Ausnahme stets ein Prolin voran (Abb. 62).

Vor dem als „LRR\_1“ benannten *Repeat* befindet sich ebenfalls ein LRR-Motiv, dem jedoch das vorangehende L und das N/C fehlen. Die Sekundärstruktur ist jedoch konserviert, so dass ein 20. LRR nicht ausgeschlossen werden kann.

Das typische Sequenzmotiv regulatorischer Proteine, (R/K)Vx(F/W) oder auch nur VxF<sup>(489)</sup> – in der Identifizierung von Shoc2 als Phosphatase-regulatorisches Protein unerwähnt<sup>(135)</sup> – kann zwei Stellen von Shoc2 zugeordnet werden (Abb. 62). Das erste Motiv liegt in der N-terminalen Domäne und entspricht nur dem kurzen Motiv, da ein vorausgehender positiv geladener Rest fehlt. Das zweite Motiv befindet sich im elften LRR am Übergang zur Helix und schließt das den Helices vorangehende Prolin mit ein. Dieses Motiv zeigt jedoch alle postulierten Reste, einschließlich des vorausgehenden positiv geladenen Restes.

### 3.6.2 Reinigung von PP1c und Shoc2

#### *Strategien zur Isolierung eines Komplexes aus PP1c und Shoc2*

Um die Kristallstruktur von PP1c und Shoc2 zu lösen, wurden unterschiedliche Reinigungsmethoden getestet. Einerseits wurden die Proteine getrennt voneinander rekombinant exprimiert und aufgereinigt und anschließend *in vitro* inkubiert und die Komplexbildung untersucht. Der zweite Ansatz bestand in der rekombinanten Co-Expression beider Proteine oder durch Transformation eines bicistronischen Plasmids. Die getesteten Ansätze sind in Abb. 63 gezeigt. Es wurden jeweils Shoc2, PP1cb und PP1cc einzeln als His (pET28-Vektor)- oder GST (pGex4T1-Vektor)-Fusionsprotein exprimiert. Weiterhin wurden alle Kombinationen von PP1ca, PP1cb, PP1cc und Shoc2 je als His- oder GST-Protein getestet, wobei die Plasmide entweder Cotransformiert oder bicistronisch in *E. coli* eingebracht wurden.

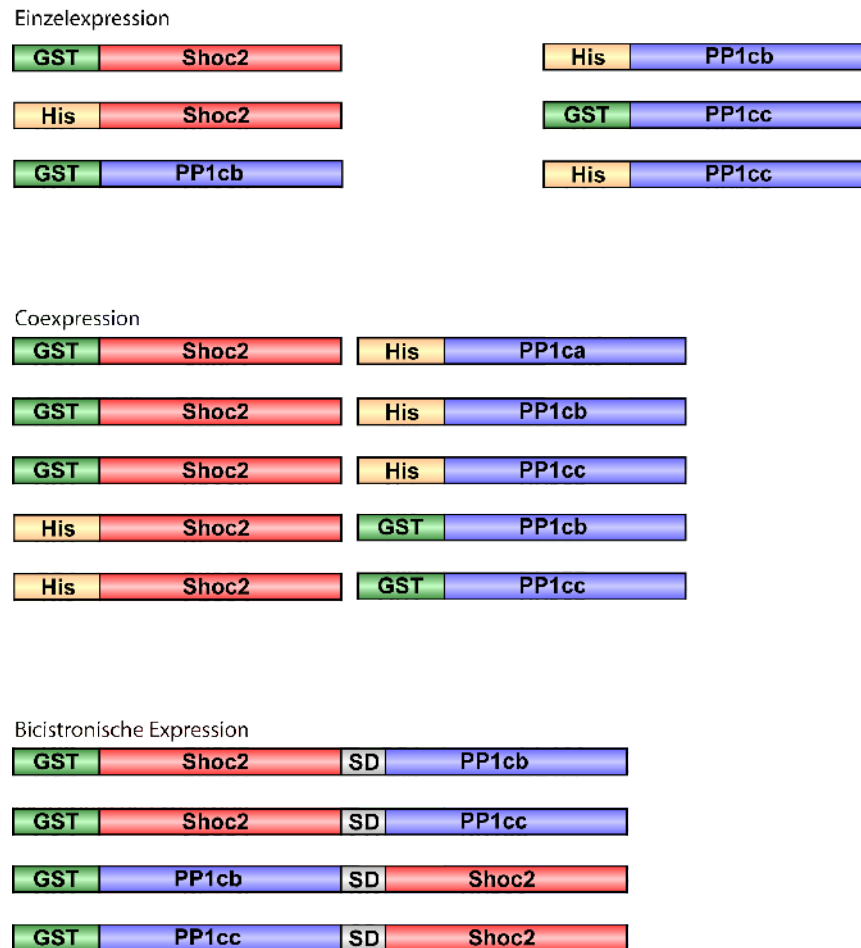
Dabei zeigte sich, dass PP1cb sowohl als His- als auch als GST-Protein vollständig unlöslich war, während PP1cc als Einzelprotein als GST-Fusionsprotein erhalten werden konnte. Gleiches gilt für GST-Shoc2. Als His-Protein wurde es stark überexprimiert, war jedoch ausschließlich im Pellet vorzufinden (Daten nicht gezeigt).

Sobald die Proteine von zwei Plasmiden oder bicistronisch exprimiert wurden, war in der Regel kein PP1c zu detektieren. Shoc2 wurde nur dann überexprimiert, wenn es als GST-Fusionsprotein vorlag. Stellvertretend für die durchgeführten Versuche ist in Abb. 64E ein Western-Blot mit Anti-GST- und Anti-His-Antikörpern nach der Cotransformation von pGex4T1-Shoc2 (GST) und pET28a-PP1cc (His) gezeigt. Hierzu wurden drei verschiedene Puffer getestet und über Nickel- und



GSH-Sepharose aufgereinigt. Dabei konnten geringe Mengen von Shoc2 in Lösung detektiert werden, die mittels GSH-Sepharose angereichert werden konnten. In der Elution von Ni-beads war weder GST-Shoc2 noch His-PP1cc detektierbar.

### Reinigung von PP1cc und Shoc2



**Abbildung 63: Getestete Ansätze der Aufreinigung von Shoc2 und PP1c im Komplex**

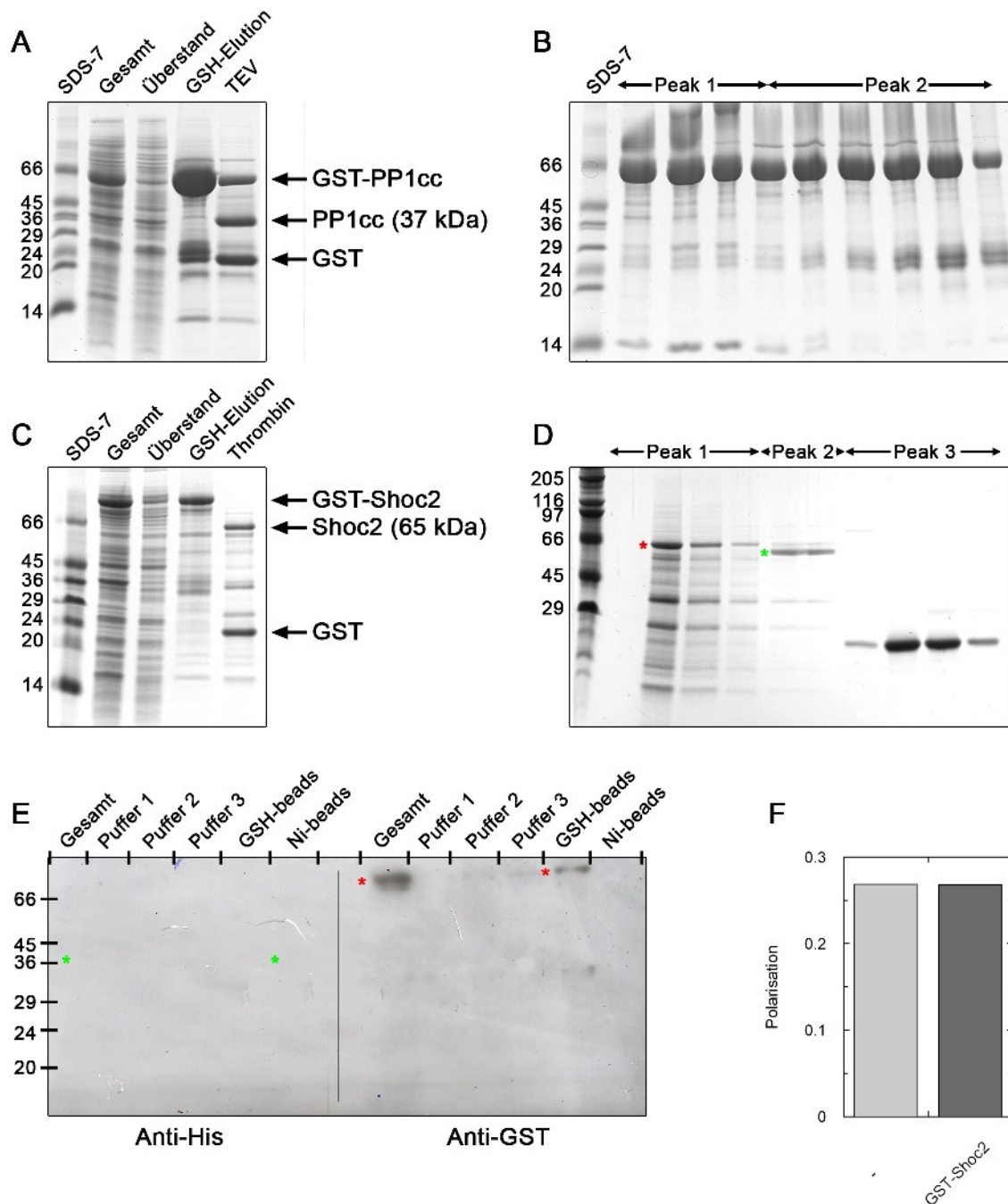
Zur Aufreinigung von Shoc2 und PP1c wurden verschiedene Strategien durchgeführt (zum Teil von C. Koerner durchgeführt). Expression der Einzelproteine, Coexpression von Shoc2 und PP1c, sowie bicistronische Expression über ein Konstrukt mit Shine-Dalgarno-Sequenz (SD) zwischen den Genen. GST-Tags sind in Grün, His<sub>6</sub>-Tags in gelb gezeichnet; Shoc2 in rot und die PP1c-Isoformen in blau.

Nach mehreren Versuchen der Reinigung von PP1cc im 10L-Maßstab mit Ausbeuten von maximal 5 mg / 10L wurde ein Fermenter-Lauf von 30L TB-Medium unter gleichen Bedingungen durchgeführt. Dabei konnten 47 mg Protein erhalten werden, die jedoch nur zu etwa 90% rein waren (Abb. 64). Obwohl das Protein nur eine geringe Löslichkeit zeigte und 0,1% NP40 und 0,1% Triton-X 100 zum Lysepuffer zugegeben werden mussten, konnte es über eine GSH-Säule angereichert werden. Nach TEV-Spaltung (Abb. 64A) präzipitierte es stark während des Aufkon-

zentrierens, so dass nur das GST-Fusionsprotein erhalten werden konnte (Abb. 64B). Das Protein konnte (unabhängig von der An- und Abwesenheit von  $\text{MnCl}_2$ ) aktiv erhalten werden (Überprüfung durch Dephosphorylierung von *p*-Nitrophenylphosphat (PNPP)).

Mehrfach wurde versucht, PP1cc und Shoc2 gemeinsam aufzureinigen. Hierbei wurden *Pulldown*-Experimente mit GST-PP1cc/Shoc2 und GST-Shoc2/PP1cc bei An- und Abwesenheit von M-Ras\*GNP durchgeführt, die keine Interaktion der Proteine zeigen konnten (Daten nicht gezeigt). Zusätzlich wurden die Proteine als GST-Fusionsproteine gemeinsam über Gelfiltration aufgereinigt, von der beide Proteine in unterschiedlichen Fraktionen eluierten (Daten nicht gezeigt). Dies wurde sowohl über Western-Blot als auch über den Nachweis der Aktivität der Phosphatase über Hydrolyse von PNPP überprüft.

Die Interaktion von Shoc2 mit M-Ras\*GNP wurde mittels des GDI-Versuchs (Daten nicht gezeigt) und über die Änderung der Polarisation durch Zugabe von GST-Shoc2 untersucht (Abb. 64F). Dabei konnte keine Interaktion nachgewiesen werden.



#### Abbildung 64: Aufreinigung von PP1c und Shoc2

**A:** Aufreinigung von GST-PP1cc über eine GSH-Säule (Puffer: 50 mM Tris pH 7,5, 100 mM NaCl, 2 mM MnCl<sub>2</sub>, 5 mM βME). Elution erfolgte mit GSH. Ein Teil des Proteins wurde mit TEV vom Fusionsprotein getrennt. **B:** Gelfiltration (S200 16/60) von GST-PP1cc. Das Protein eluierte in 2 Peaks über das gesamte Elutionsvolumen der Säule. **C:** Aufreinigung von GST-Shoc2 über eine GSH-Säule (Puffer: 50 mM Tris pH 8,5, 300 mM NaCl, 5 mM βME). Die Elution erfolgte mit GSH und die Trennung vom Fusionsprotein mit Thrombin. **D:** Gelfiltration (S200 26/60) von Shoc2. Das Protein eluierte in drei verschiedenen Peaks. Rot: GST-Shoc2, grün: kleineres Fragment, verwendet für Edman-Sequenzierung. **E:** Western-Blot der Coexpression von GST-Shoc2 und His-PP1cc. Getestet wurden drei verschiedene Puffer, von denen Protein in Puffer 3 in zwei Ansätzen über GSH- und Ni-beads weiter angereichert wurde. Gezeigt sind die Blots mit Anti-His und Anti-GST-Antikörper. GST-Shoc2 ist rot markiert, die erwartete Position von His-PP1cc in grün. **F:** Polarisationsmessung von 5 μM M-Ras\*GNP vor und nach Zugabe von 50 μM GST-Shoc2.

## 4 Diskussion

### 4.1 Mechanismen der GEF-Katalyse

#### 4.1.1 Das konservierte Glutamat ist essenziell für die GEF-Katalyse

G Proteine der Ras-Superfamilie besitzen, bis auf wenige Ausnahmen, ein hochkonserviertes Glutamat C-terminal des Walker B Motivs. Basierend auf bereits gelösten Strukturen und wenigen biochemischen Untersuchungen, wurde diesem Rest eine Funktion in der GEF-Katalyse zugesprochen (s. S. 15). Während *switch I* keine Funktion in der Katalyse der GEF-Reaktion übernimmt und vom GEF aus dem aktiven Zentrum „entfernt“ wird, unterliegt *switch II* einer hohen Remodellierung und einer starken Fixierung durch das GEF.

In der Tat zeigen alle Strukturen, bis auf wenige Ausnahmen (s.u.) die Interaktion des Glutamats mit dem Lysin des *P-loops*. Mutation des Glutamats von Ras, Rap und Rho führten zu einer vollständigen Inhibierung der GEF-Reaktion mit der Einschränkung, dass Epac1 noch geringe Aktivität auf Rap1 besaß (s. S. 54). Eine Reduktion der Aktivität, ohne vollständig inhibierend zu wirken, wurde ebenfalls für Ran E70A und RCC1 beobachtet. Ras-, Rap- und Rho- (inkl. Rop-) Strukturen weisen alle eine direkte Interaktion des Glutamats mit Lysin auf, während Ran ein Sulfation im aktiven Zentrum gebunden hatte, was die direkte Interaktion von Glu und Lys verhindert<sup>(201)</sup>. Andersherum betrachtet: Das Glutamat von Ran ist weniger essenziell für die GEF-Aktivität von RCC1, so dass die Bindung eines Sulfations im aktiven Zentrum des Nt-freien Komplexes möglich war. Neben Ran-RCC1 wiesen die Komplexstrukturen Rac1-Tiam1<sup>(218)</sup>, CDC42-Intersectin<sup>(219)</sup> und CDC42-SopE<sup>(220)</sup> ein Sulfation im aktiven Zentrum auf. CDC42-SopE sowie Rac1-Tiam1 zeigen keine Interaktion von *P-loop* Lysin und dem konservierten Glutamat. *switch I* von Rac1 im Komplex mit Tiam1 besitzt die typische Trinukleotid-gebundene Form, so dass das Glutamat in das umgebende Lösungsmittel weist. Bei CDC42-SopE ist der Abstand zwischen Lysin und Glutamat sehr groß, analog zu Ran und RCC1. Bei CDC42 im Komplex mit Intersectin ist die Interaktion beider Aminosäuren ungestört, trotz Anwesenheit eines Sulfats.

#### **Die Funktion des Glutamats**

Die Mutation des Glutamats könnte sich einerseits in einer reduzierten Affinität von GEF und G Protein äußern, andererseits zu einer Verringerung der Katalyse führen. Um die Ursache des Effekts zu überprüfen wurde für Ras, Ran und Rho die Komplexbildung zu ihren GEFs untersucht, die unter Verwendung unterschiedlicher Methoden durch die Glu→Ala Mutation nicht beeinflusst war (s. S. 57). Es handelt sich folglich um einen katalytischen Effekt.

Ein weiterer Hinweis hierauf ergibt sich in der Untersuchung der Nukleotid-Affinität im G Protein-GEF-Komplex. Qualitativ wurde hierfür die Fluoreszenzänderung von mant-GDP-gebundenen G Proteinen durch Zugabe ihrer GEFs zwischen G Protein (wt) und G Protein (E→A) verglichen (s. S. 59). Bis auf RhoA mit p190GEF zeigten alle wt G Proteine eine Reduktion der Fluoreszenz und damit eine Verschiebung des Gleichgewichts vom trimeren zum dimeren Komplex. Die E→A Mutation verhinderte diese Gleichgewichtsverschiebung bei allen Proteinen mit Ausnahme der Rab-Proteine. Nicht-Gleichgewicht Experimente mit E→K Mutationen (Filtration, s. S. 59) bestätigten ebenfalls, dass die Dissoziation des Nukleotids von der Mutante geringer ist als von wt G Proteinen.



Mit diesen Experimenten bestätigte sich die katalytisch essenzielle Funktion des G Protein-Glutamats, die in unterschiedlichen G Protein-Familien konserviert geblieben ist. Abweichungen des Mechanismus finden sich bei den Arf-Proteinen, die keine Konservierung des Glutamats aufweisen<sup>(490)</sup>. Bei diesen Proteinen wird der negativ geladene Rest *in trans* vom GEF bereitgestellt und erfüllt ebenfalls die Nukleotid-verdrängende Funktion, um anschließend eine Interaktion mit dem *P-Loop* Lysin einzugehen<sup>(88)</sup>.

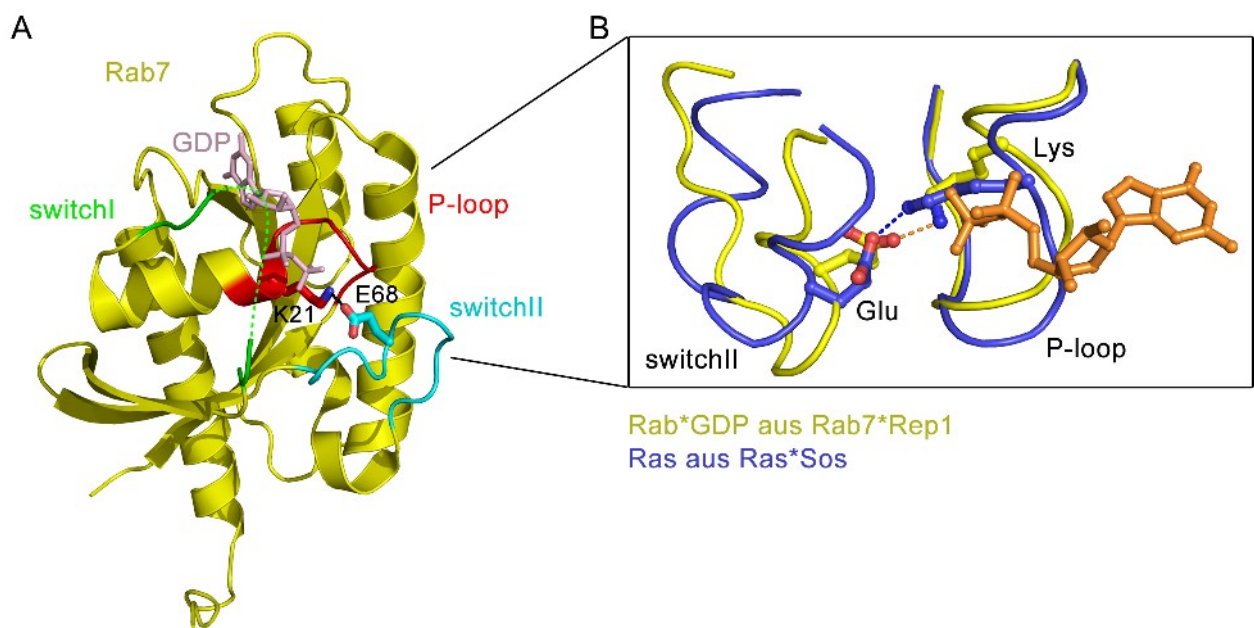
#### 4.1.2 Die Funktion des Glutamats der Rab-Proteine

Die Rab-Familie weicht als einzige G Protein Familie von diesem Muster ab, obwohl gerade diese G Proteine die höchste Konservierung des Glutamats aufweisen. Die Mutation zu Alanin führte im Fall von Sec2 und Sec4 zu keinem Effekt, bei Rab5 und Rabex-5 wird die Austauschrate durch die Mutation sogar geringfügig gesteigert (s. S. 54). Die Strukturen von Rab5 und Rabex-5, sowie Sec2 und Sec4 zeigen keine Bindung des Glutamats an das Lysin, da es in das umgebende Lösungsmittel weist.

Die kürzlich erfolgte Strukturlösung von Rab21 und Rabex-5 konnte diese Beobachtung dadurch erklären, dass – analog zu den Arf-Proteinen – ein negativ geladenes Aspartat in das aktive Zentrum ragt und das Nukleotid *in trans* verdrängt<sup>(214)</sup>. Auch die Gleichgewichtsexperimente mit Rab5 E80A und Rabex-5 zeigten eine stärkere Verschiebung zum Heterodimer als mit dem wt Protein analog zur erhöhten Austauschrate des E80A-Proteins (s. S. 59); bei Sec2 und Sec4 sind wt und E→A Mutante gleich stark reduziert.

Die hohe Konservierung des Glutamats erklärt sich durch die Struktur von Rab mit ihren GDI-Proteinen<sup>(42)</sup>. Ähnlich wie bei der G Protein-GEF Interaktion bindet das Glutamat an das *P-loop* Lysin (Abb. 65A) mit einem konträren Effekt: Die Funktion der RabGDIs liegt in einer Verringerung der Austauschrate. Dementsprechend zeigt der Rab-GDI-Komplex, trotz der analogen Interaktion von Glu und Lys, eine zum GEF-Komplex veränderte Konformation des *switch II* und des *P-loops* (Abb. 65B). *Switch II* in der GEF-gebundenen Form ist in Richtung des *P-loops* verschoben, wodurch die Bindung des Magnesiums verhindert wird. Der *P-loop* ist aufgrund des fehlenden Nukleotids verändert.

In der GDP-gebundenen GDI-Form besitzt der *P-loop* die typische Nukleotid-gebundene Form und erinnert an die Konformation der GDP-gebundenen Form des präfinalen trimeren Rop\*GDP-Prone Komplexes. *Switch II* nimmt nicht die Verdrängungs-Konformation ein, sondern ermöglicht nur die Bindung des Glutamats an Lysin.



**Abbildung 65: Die Funktion des Glutamats der Rab-Proteine**

**A:** Rab7-Bindung an Rep1 (nicht gezeigt) weist die Interaktion des konservierten Glutamats mit dem *P-loop* Lysin auf (1vgo). **B:** Überlagerung der Nukleotid-Bindungsstellen von Rab\*GDP im Komplex mit Rep1 (gelb) und nukleotid-freiem Ras im Komplex mit Sos (blau). Die Interaktion zwischen Glu und Lys ist sehr ähnlich; *P-loop* und *switch II* besitzen allerdings unterschiedliche Konformationen.

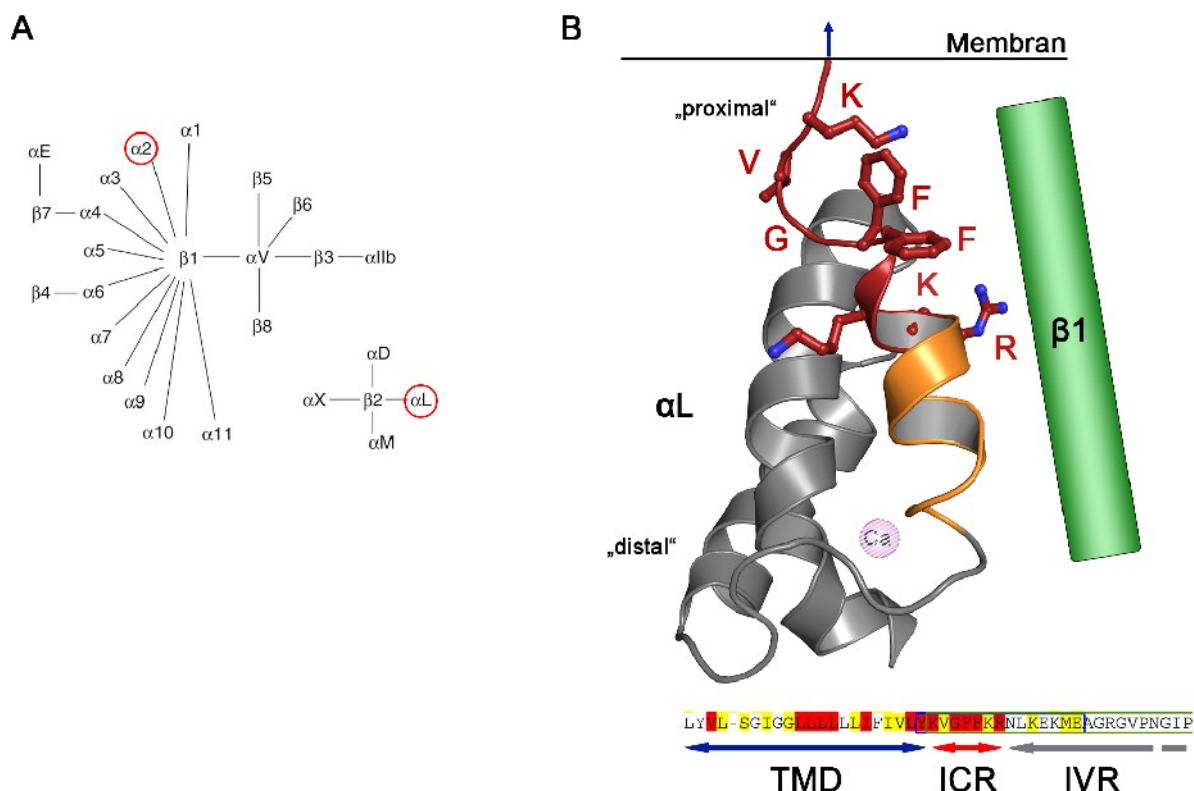
Es kann nun postuliert werden, dass andere Interaktionen zwischen GDI und Rab zu einer Erhöhung der Nukleotidaffinität führen und der Interaktion zwischen Glu und Lys entgegen wirken, da diese durch das Einbringen der negativen Ladung eigentlich zu einer Verringerung der Nukleotidaffinität führen müsste. Analog zum Rop\*GDP-Prone Komplex wird der Rab\*GDP-GDI Komplex so

eventuell auf die GEF-Katalyse vorbereitet, die den zweiten wichtigen Schritt der Aktivierung von Rab-Proteinen nach der GDI-Bindung darstellt (siehe 1.1.2).

## 4.2 RapL und die Rap-abhängige Aktivierung von Integrinen

In Gelfiltrationsexperimenten homodimerisierten die RapL-Konstrukte 1-207 und 41-265. Für die C-terminale *Coiled-coil*-Domäne (in RapL (41-265) vorhanden) ist dies bekannt<sup>(124)</sup> (Dissertation D. Schwarz). Da aber auch (1-207) ein Dimer bildete, kann entweder auch der N-Terminus homodimerisieren oder RapL dimerisiert direkt über die RA-Domäne (vgl. auch Arap1). Dies lässt den Schluss zu, dass RapL entweder über mehrere Domänen vermittelt homodimerisiert oder eine Multimerisierung des VL-Proteins auftritt. In der Tat zeigten etwa 50% der RapL (VL) Menge einen Aggregations-Peak auf der Gelfiltration während das restliche Protein als Dimer eluierte (s. S. 64).

### 4.2.1 RapL bindet direkt an Integrine unterschiedlicher Klassen



**Abbildung 66: Einteilung von Integrinen und Struktur von Int  $\alpha$ L**

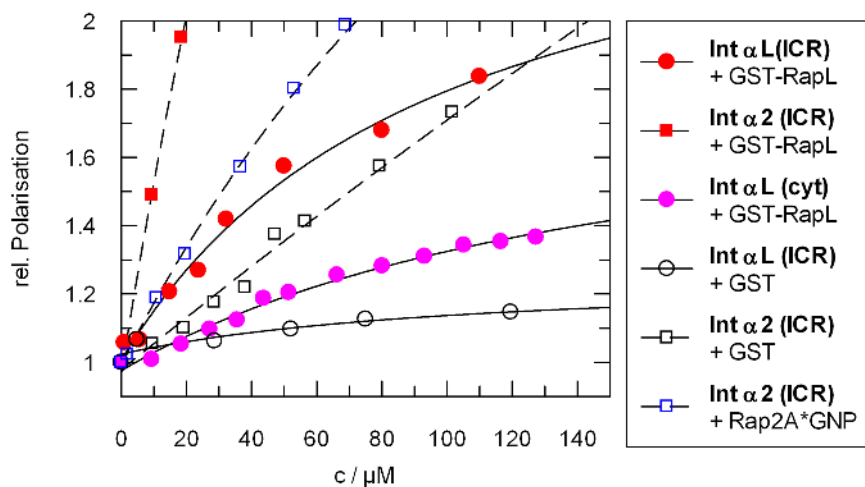
**A:** Kombinationsmöglichkeiten der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten von Integrinen (aus Takada *et al.*<sup>(491)</sup>). **B:** Struktur der  $\alpha$ L-Untereinheit von LFA1 (2k8o). Festlegung der Bindungsstelle der  $\beta$ 1-Untereinheit basiert auf NMR-Titrationen<sup>(491)</sup>. Die Ca<sup>2+</sup>-Bindungsstelle ist eingezeichnet. Rot und Orange markiert ist die sog. ICR-Region von  $\alpha$ L, welches in den Messungen verwendet wurde. Das konservierte GFFKR-Motiv ist rot dargestellt.



Über *in vitro* Polarisationsmessungen konnte erstmals die direkte Bindung von RapL an die alpha-Untereinheit von Integrinen bestätigt werden. Es wurde zwar bereits postuliert, dass RapL als Effektor von Rap1 eine Integrin-aktivierende Funktion ausübt, die eine direkte Interaktion zwischen Integrin  $\alpha$ L und RapL erfordert<sup>(431)</sup>, jedoch basierte dies auf Immunpräzipitationen, die verbrückende Interaktionspartner nicht ausschließen können.

Zwei unterschiedlich lange Konstrukte von LFA1 (Abb. 66) ( $\alpha$ L(ICR) und  $\alpha$ L(cyt)) banden beide mit einer außerordentlich geringen Affinität von 156  $\mu$ M und 92  $\mu$ M an RapL. Der 1,5-fache Affinitäts-Unterschied zwischen beiden Konstrukten ist aufgrund der hohen Messunsicherheiten insignifikant (s. S. 69). Als Vertreter einer anderen Integrin-Klasse wurde VLA2 ( $\alpha$ 2 $\beta$ 1, Abb. 66A) auf Bindung an RapL getestet. Das kurze Konstrukt des membranproximalen Teils der  $\alpha$ 2-Untereinheit besaß mit 132  $\mu$ M eine gleichermaßen niedrige Affinität zu RapL wie LFA1.

Da RapL mit beiden Integrin-Typen bei vergleichbarer Affinität interagiert, verläuft die Bindung vermutlich über konservierte Bereiche der Integrine (Abb. 66B, unterer Teil). Aufgrund der hohen Homologie aller Integrin  $\alpha$ -Untereinheiten in diesem Bereich (ICR, *Integrin conserved region*) ist die Bindung von RapL an andere Subtypen sehr wahrscheinlich.



**Abbildung 67: Normierte Polarisationsmessungen von RapL und Integrin-Isoformen**

Normierung des Polarisationssignals der Messungen der Titrations von Int  $\alpha$ L ( $\circ$ ) und Int  $\alpha$ 2 ( $\square$ ) aus Abb. 35.

Der direkte Vergleich der Messungen von  $\alpha$ L und  $\alpha$ 2 zeigt deutliche Unterschiede in der Änderung der Polarisation, obwohl gleiche Fluorophore und ähnliche Molmassen verwendet wurden. Die Titration von  $\alpha$ L und GST-RapL (41-265) ergab einen geringen Anstieg der Polarisation auf maximal den 1,5- bis 2-fachen Wert (Abb 67,  $\circ$ ,  $\square$ ). Titration mit GST ( $\circ$ ) führte nur zu einer vernachlässigbaren Erhöhung des Polarisationssignals.

Titration von Int  $\alpha 2$  führte hingegen zu einem starken Anstieg der Polarisation und einem Maximalwert, der dem 10-fachen des Ausgangswertes entsprach (Abb 67, □). Die unspezifische Titration mit GST (Abb 67, □) zeigte ebenfalls deutlich höhere Polarisationsänderungen, die allerdings nicht einer Sättigungsfunktion folgten. Eine mögliche Erklärung wäre, dass der Fluorophor von  $\alpha L$  mobiler als der von  $\alpha 2$  ist, weshalb  $\alpha 2$  stärkere Polarisationsänderungen bei Bindung an RapL gezeigt haben könnte (siehe auch Kap. 4.7).

Der direkte Vergleich von  $\alpha L$  und  $\alpha 2$  ist hierdurch jedoch erschwert. Auch die Titration von Rap2A\*GNP zu Int  $\alpha 2$  (Abb. 67 □) lieferte Polarisationswerte, die sogar höher waren als die Bindung von RapL an Int  $\alpha L$ . Es kann also nicht ausgeschlossen werden, dass Rap2A eventuell ebenfalls direkt an Integrine bindet.

Demgegenüber stehen *Pulldown*-Experimente (s. S. 67), die – in beiden Richtungen durchgeführt – eine Interaktion von RapL (41-265) und Int  $\alpha L$  (cyt) bestätigen (Die Verwendung von Int  $\alpha 2$  war nicht möglich, da nur geringe Mengen des synthetisierten Konstrukts zur Verfügung standen). Hierbei zeigte GST-RapL eine schwache Bindung an Int  $\alpha L$  und der Versuch eine konzentrationsabhängige Interaktion zu erhalten ergab eine mäßige Erhöhung der Int- $\alpha L$ -Bande (s. S. 67); möglicherweise ein Resultat der geringen Affinität beider Proteine. Die umgekehrte Anordnung, GST-Int  $\alpha L$  und RapL (41-265), spiegelte den niedrigen  $K_D$  nicht wider und deutete demnach auf ein Artefakt hin: Die RapL-Bande war ähnlich intensiv wie GST-Int  $\alpha L$  und RapL band auch in der Negativ-Probe selbstständig an GSH-Sepharose. Trotzdem konnte eine Konzentrationsabhängigkeit der Bindung beider Proteine nachgewiesen werden (s. S. 67).

#### 4.2.2 Einfluss der Rap-Bindung

RapL besitzt eine ausreichend hohe Affinität zu Rap1B, um als Komplex zu eluieren (s. S. 64). Insbesondere war diese Interaktion unabhängig vom eingesetzten Konstrukt, da sowohl das VL-Protein als auch RapL (41-265) mit Rap1 interagierten. Damit ist ein Einfluss der N-terminalen Domäne von RapL, die sich von der Spleißvariante Nore1A unterscheidet, auf die Rap1-Bindung ausgeschlossen. In *Pulldown*-Experimenten von RapL mit Rap1 und Rap2 zeigte Rap2 eine stärkere Bindung an RapL (s. S. 67); ein Ergebnis, das bereits in früheren Studien bestätigt werden konnte<sup>(124;413)</sup>.

Die Interaktion von RapL und Rap1/2 wurde durch die Anwesenheit von Integrin nicht beeinflusst. Es konnte ein ternärer Komplex zwischen GST-RapL (41-265), Rap1/Rap2 und Int  $\alpha L$  detektiert werden (*Pulldown*-Experimente, S. 67). In der umgekehrten Anordnung (GST-Int  $\alpha L$  mit RapL) konnte kein Trimer beobachtet werden. Das Experiment war jedoch, wie bereits diskutiert, nicht

vollständig vertrauenswürdig.

Es verbleibt die Frage, ob tatsächlich ein trimere Komplex aus Integrin, RapL und Rap gebildet werden kann. Polarisationsmessungen mit mant-GppNHp-beladenem Rap bestätigten die Interaktion mit RapL und die zusätzliche Bindung von GST-Int  $\alpha$ L (s. S. 69). Der Komplex wurde nicht mehr gebildet, wenn ein hoher Überschuss von RapL in Lösung war, d.h. das Integrin wurde sozusagen von freiem RapL „weggefangen“ und die wenigen Moleküle die an Rap-RapL gebunden hatten, reichten nicht, um eine sichtbare Polarisationsänderung zu bewirken.

Der entgegengesetzte Ansatz, Edans-markiertes Integrin einzusetzen und die Bindung von Rap1/Rap2 bei Anwesenheit eines Überschusses von RapL zu beobachten, misslang aus ungeklärten Gründen. Möglicherweise war die Massenänderung der Zugabe der 19 kDa großen G Proteine zu ca. 36 kDa Integrin-RapL (41-265) zu gering um einen Anstieg anzeigen zu können.

### 4.2.3 Bedeutung der Integrin-Bindung

Die Beurteilung der gewonnenen Ergebnisse, die direkte Bindung von RapL an Integrine und die Ausbildung eines ternären Komplexes, erfolgt unter Einschränkungen, da die Polarisationsmessungen aufgrund der sehr geringen Affinität und der Beobachtung unspezifischer Bindung von GST nicht ohne Zweifel verlässlich sind und die *Pulldown*-Experimente z.T. widersprüchliche Ergebnisse lieferten. Trotzdem liefern sie entscheidende Hinweise, die zur Aufklärung der Funktion von RapL beitragen.

Bisher wurde RapL ausschließlich eine Funktion in Lymphozyten zugesprochen, in denen es die Affinität von LFA1 ( $\alpha$ L $\beta$ 2, Abb. 66) zu seinem Ligand ICAM Rap1A-abhängig erhöhen soll und so die Migration von Lymphozyten reguliert<sup>(431;439)</sup>.

LFA1 wird ausschließlich in Lymphozyten exprimiert, während sich VLA2 in unterschiedlichen Gewebetypen findet, die auch Immunzellen wie T-Zellen und Mastzellen einschließen (Tabelle 17). RapL wiederum zeigt eher ein ähnliches Expressionsmuster wie LFA1, schließt die Coexpression mit VLA2 jedoch nicht aus (Tabelle 17). Die Liganden für aktiviertes VLA2 sind Bestandteile der extrazellulären Matrix, insbesondere Collagen der Typen I-IV<sup>(492;493)</sup>. Es übernimmt dadurch wichtige Funktionen in der Zellmigration, die insbesondere in Bezug auf die Migration und Invasion von Tumorzellen eingehender untersucht wurde: Eine Inhibition von VLA2 führt zu einer starken Reduktion der Migrationsfähigkeit von Zellen<sup>(494;495)</sup>.

In der Tat wird RapL ein Einfluss auf die Migration von Zellen zugesprochen, die am Beispiel von

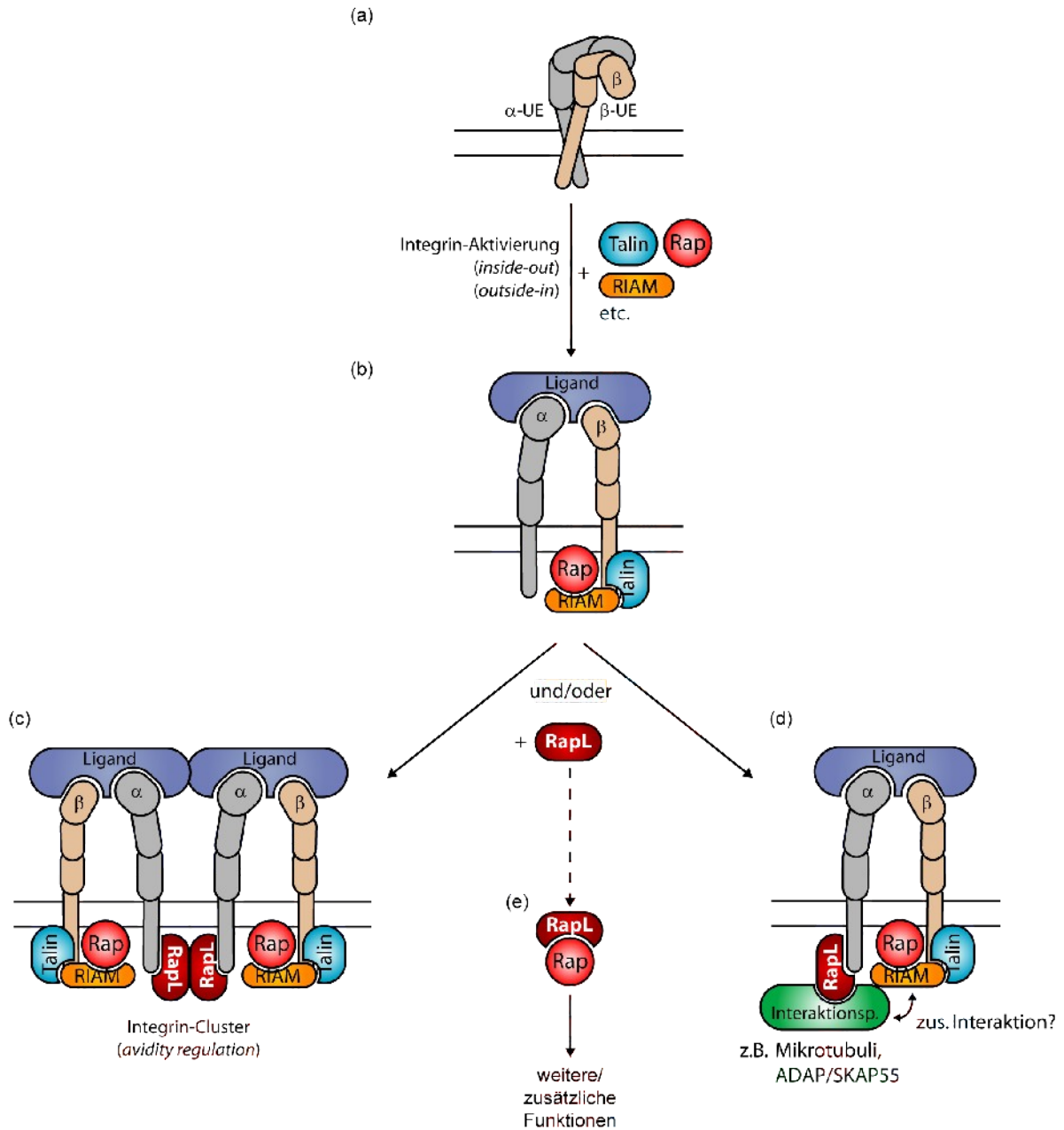
T-Zellen und B-Zellen untersucht wurde<sup>(124;144)</sup>. Es wäre also möglich, dass die beobachteten Effekte von RapL nicht ausschließlich über LFA1 vermittelt werden sondern auch über andere Integrine, insbesondere VLA2. Lymphozyten ändern im Laufe ihrer Entwicklung und ihrer Migration in Zielgewebe das Expressionsmuster von Membranrezeptoren, so auch von Integrinen. Es wäre also naheliegend, dass RapL eine Funktion in der Regulation mehrerer Integrin-Typen übernehmen könnte. Zudem ist die Bindung von RapL an die  $\alpha$ -Untereinheit weiterer Integrine nicht ausgeschlossen und sollte eingehender untersucht werden.

**Tabelle 17: Gewebe- und Ligandenspezifität von Integrinen**

	Synonym	Liganden	Gewebespezifität	Ref.
$\alpha$ L $\beta$ 2	LFA1	ICAM, ICAM-4	Lymphozyten: B-Zellen T-Zellen	<a href="http://biogps.gnf.org">http://biogps.gnf.org</a> (496) (497)
$\alpha$ 2 $\beta$ 1	VLA-2	Collagen Typ I-IV Laminin E-cadherin	Endothelzellen Epithelzellen T-Zellen (insbes. aktivierte T-Zellen) Mastzellen Dendritische Zellen Thrombozyten	<a href="http://biogps.gnf.org">http://biogps.gnf.org</a> (498) (499) (500) (501)
			<b>Gewebespezifität</b>	<b>Ref.</b>
<b>RapL</b>			Lymphozyten: B-Zellen T-Zellen Monozyten Monoblasten	<a href="http://biogps.gnf.org">http://biogps.gnf.org</a> (124) (431)

Integrine werden durch Aufhebung der Interaktion des zytoplasmatischen Teils von  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheit aktiviert<sup>(438)</sup>. RapL kann kein direkter Integrin-Aktivator sein, da die Affinität zur  $\alpha$ -UE der Integrine mit 150  $\mu$ M deutlich geringer ist, als die 2,3  $\mu$ M hohe Affinität zwischen  $\alpha$ - und  $\beta$ -UE<sup>(502)</sup> (Abb. 66B).

Entweder ist die Interaktion von RapL mit Integrinen unabhängig vom Aktivierungsgrad der Integrine oder RapL interagiert nur mit der aktivierten Form der Integrine. RapL könnte demnach die Rekrutierung von weiteren Bindungspartnern an den Ort der Integrin-Aktivierung übernehmen (Abb. 68). Ob dies im Zuge des sog. *outside-in* Signalwegs oder als eine, nach der Talin-vermittelten Aktivierung von Integrinen erfolgende Modifikation des *inside-out* Wegs geschieht, bleibt ungeklärt.



**Abbildung 68: Einordnung der Funktion von RapL**

(a) Aufgrund der geringen Affinität zwischen RapL und Integrin, kann RapL nicht direkt an der Integrin-Aktivierung beteiligt sein. (b) Bindung anderer Integrin-Interaktionspartner (z.B. die aufgeführten) führen zur Aktivierung von Integrinen. (c) RapL-Bindung an Integrine könnte die Cluster-Bildung unterstützen, aufgrund der Dimerisierungs-/Multimerisierungseigenschaften von RapL. (d) Des Weiteren könnte die Bindung von RapL weitere Interaktionspartner an Integrine lokalisieren, was Punkt (c) nicht ausschließen muss. Diese Interaktionspartner könnten zusätzlich mit weiteren Integrin-bindenden Proteinen interagieren. (e) Die Bindung von Rap (oder Ras) an RapL könnte zusätzliche Funktionen, wie z.B. die Bindung von MST-Kinasen, ermöglichen.

Eine *inside-out* modifizierende Funktion könnte RapL aufgrund seiner multimerisierenden Eigenschaften zugesprochen werden. Die sog. *Avidity Regulation*<sup>(503;504)</sup> von Integrinen beschreibt die Bildung von Integrin-Clustern, wodurch die Affinität zu extrazellulären Liganden erhöht wird (Abb. 68). RapL könnte in einem solchen Modell als Multimer eine Ankerfläche zwischen mehreren

Integrin-Molekülen bilden. Interessant sind in diesem Zusammenhang Berichte über die Mikrotubuli-bindende Funktion von RapL<sup>(456;457;504)</sup>, wodurch es als Adaptermolekül zwischen Mikrotubuli und Integrinen fungieren könnte.

Als essenzieller Faktor für die *Avidity Regulation* fungieren ADAP/SKAP55<sup>(505;506)</sup>, welche nach T-Zell-Rezeptor-Aktivierung die Integrin Cluster-Bildung induzieren. Interessanterweise interagieren ADAP/SKAP55 mit RIAM<sup>(507)</sup>, welches ebenfalls Rap-abhängig die Integrin-Aktivierung auslöst. Möglicherweise übernimmt auch RapL eine Funktion in der Regulation von ADAP/SKAP55 und deren Modulation der Integrin-Aktivität.

Es verbleibt die Frage, inwiefern Rap an diesen Mechanismen beteiligt sein könnte. Denkbar wäre, dass nach erfolgter Rap-Aktivierung ein Rap-RapL-Komplex (oder auch Ras-RapL) zusätzliche Funktionen übernimmt, bsp. in der Regulation der MST-Kinasen.

In der Betrachtung der Integrin-Aktivierung darf der wichtige Prozess der Endo- und Exozytose, der für ein „Recycling“ der Integrin (-*Cluster*) sorgt, nicht unbeachtet bleiben<sup>(504;508)</sup>. Auch hier wäre die Regulation durch Interaktion von RapL mit Integrinen und/oder Mikrotubuli denkbar. Ebenso wäre die Assoziation mit anderen G Proteinen oder deren Effektoren möglich, da die Ubiquitin-Faltung der RA-Domäne eine hohe Zahl an Wechselwirkungen – insbes. mit G Proteinen – ermöglichen könnte (siehe Einleitung). Interaktionen von RapL mit Rab5/21,6,7,11, die z.T. Aufgaben in der Integrin-Aktivierung übernehmen<sup>(509;510)</sup>, wurden in dieser Arbeit getestet und können ausgeschlossen werden (Daten nicht gezeigt).

#### 4.2.4 Ausblick

Die Beobachtung der direkten Interaktion bestimmter Integrine mit RapL sollte eingehender untersucht werden. Hierfür müssten weitere Integrin-Isoformen getestet und über Mutationsstudien die Signifikanz der Interaktion von RapL mit Int  $\alpha 2$  und Int  $\alpha L$  untersucht werden.

Zusätzlich könnte die Interaktion der  $\alpha$ -UE mit der  $\beta$ -UE *in vitro* über Polarisationsmessungen untersucht und der Einfluss von RapL hierauf bestimmt werden. Hierzu würde eine Fluorophor-markierte  $\beta$ -UE eingesetzt und die Dissoziation der  $\alpha$ -UE nach Bindung von RapL beobachtet.

Als möglicher Interaktionspartner von RapL sollten ADAP/SKAP55 untersucht werden, da diese eine wichtige Funktion in der Rap-vermittelten Integrin-Aktivierung übernimmt.

Auch eine Co-Kristallisation von RapL und Integrinen wäre möglich; ebenso wie ein *Soaking* des Integrin-Peptids in einen vorhandenen Komplexkristall aus RapL und Ras, der bereits gelöst werden konnte<sup>(432)</sup>. Hier könnte allerdings die geringe Affinität störend wirken.

In einem späteren Schritt läge die Untersuchung der Bindung von RapL an VLA2 *in vivo*, deren Interaktion bisher in der Literatur noch unbekannt ist.

### 4.3 Arap1 und Arap3: Regulation von Multidomänen-Proteinen

#### 4.3.1 Spezifität der RhoGAP-Aktivität von Arap1 und Arap3

##### *Arap3*

Die GAP-Domäne von Arap3 zeigte eine klare Spezifität für RhoA mit zusätzlich geringer Aktivität auf Rac1 (Tabelle 18). Dies entspricht Messungen mit Arap3 (VL), welches ebenfalls *in vitro* und *in vivo* als RhoA-GAP klassifiziert wurde<sup>(250)</sup> (siehe S. 24, und Anhang, S. 218). Ein längeres Konstrukt konnte aufgrund der geschilderten Löslichkeitsschwierigkeiten nicht getestet werden.

**Tabelle 18: Beschleunigung der GTPase-Aktivität**

10 $\mu$ M GAP / 2 $\mu$ M GNBP	RhoA	CDC42	Rac1
Arap1 (GAP-RA)	1,5x	9,5x-21x	-
Arap3 (GAP)	50x	-	8,6x

##### *Arap1*

Arap1 (GAP\_4) und Arap1 (GAP-RA) zeigten eine eindeutige Spezifität für CDC42 (Tabelle 18), im Gegensatz zu publizierten Ergebnissen, nach denen Arap1 als RhoGAP identifiziert wurde<sup>(249)</sup>. Die Autoren legten sich auf RhoA fest, da sie *in vivo* nach Arap1-Expression eine schwache Erhöhung der aktiven CDC42-Konzentration detektierten, was sie auf eine fehlende CDC42GAP-Aktivität und aktive ArfGAP-Funktion zurückführten (siehe S. 24, und Anhang, S. 218).

In einer genaueren Analyse über  $K_M/k_{cat}$ -Messungen (s. S. 89) unterschieden sich die  $K_M$ -Werte von RhoA und CDC42 nur gering (17,4  $\mu$ M und 25,3  $\mu$ M). Der  $k_{cat}$ -Wert bei CDC42 war jedoch mit 0,942  $s^{-1}$  67-fach höher als mit RhoA (0,014  $s^{-1}$ ). Trotz dieser deutlichen Unterschiede ist Arap1 (GAP-RA) im Vergleich mit anderen CDC42GAPs, die  $k_{cat}$ -Werte von 42  $s^{-1}$  erreichen können<sup>(511)</sup>, verhältnismäßig schwach.

Die Affinitätskonstante von Arap1 (GAP-RA) und CDC42\*GDP in Gegenwart von AIF<sub>x</sub> lag mit 24-35  $\mu$ M im Bereich des  $K_M$ -Werts, während für RhoA  $K_D$  und  $K_M$  nicht miteinander verglichen werden konnten, da keine Sättigung in der Bestimmung der Affinität erhalten wurde (s. S. 82). Auch



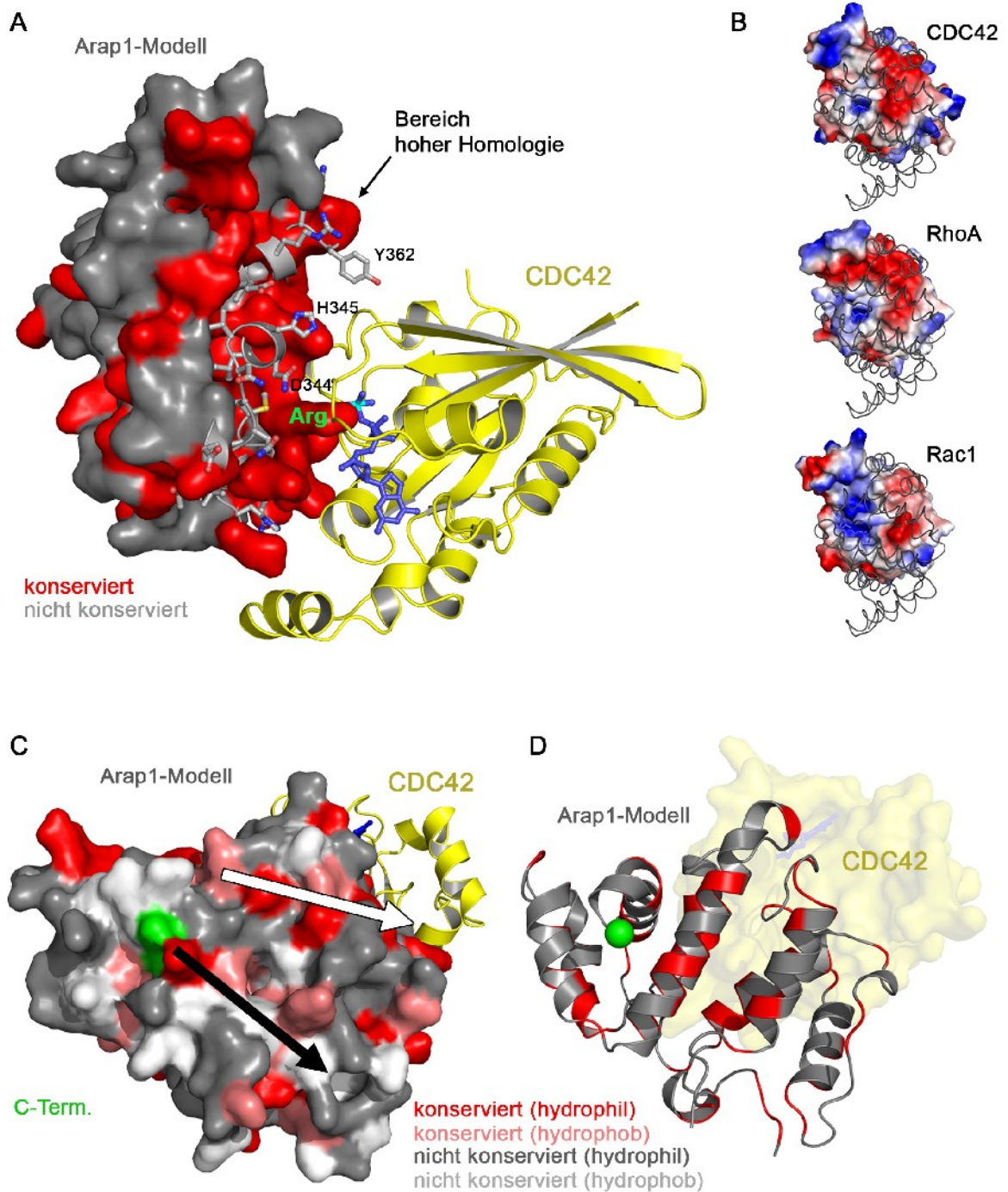
hier zeigte sich wieder die Spezifität für CDC42, da sehr wahrscheinlich der durch AIF<sub>x</sub> imitierte Übergangszustand aufgrund der geringen Aktivität von Arap1 (GAP-RA) auf RhoA im getesteten Konzentrationsbereich nicht gebildet werden konnte.

### **Vergleich von Arap1 und Arap3**

Der Vorteil des Arap-Systems besteht in der Möglichkeit erstmals einen direkten Vergleich zweier nah verwandter RhoGAPs (s. S. 72) durchzuführen, die unterschiedliche Spezifität besitzen. Die molekularen Grundlagen der G Protein-Spezifität der RhoGAP-Proteine sind bisher weitestgehend unverstanden. Die *in vitro* Spezifität der meisten RhoGAP-Proteine spiegelt häufig die Aktivität *in vivo* wieder, auch wenn hierzu Ausnahmen bestehen<sup>(259)</sup> (s. S. 24). Die Komplexität erhöht sich zusätzlich durch Interaktion dieser Proteine mit weiteren Proteinen/Substanzen. So vermag die Interaktion von p190RhoGAP mit PIPs oder die Phosphorylierung von MgcRacGAP die Spezifität vollständig umzukehren<sup>(512;513)</sup>.

Die Oberflächen von CDC42 und RhoA sind im Bereich der Interaktion mit GAPs (oder Effektoren) sehr homolog; die Ladungsverteilung unterscheidet sich nur geringfügig zwischen den beiden G Proteinen und kann nicht Grundlage der Spezifitätsverteilung sein (Abb. 69B). Rac1 unterscheidet sich von den anderen Rho-Proteinen durch eine stärker positiv geladene Oberfläche, die ursächlich für die Inaktivität von Arap1 auf Rac1 sein könnte.

Da die Strukturen der GAP-Domänen von Arap1 oder Arap3 nicht gelöst werden konnten, wurde ein Modell von Arap1, basierend auf der Struktur von CDC42GAP und CDC42\*GDP\*AIF<sub>4</sub><sup>(514)</sup> erstellt und die nicht zwischen den Arap-Proteinen konservierten Aminosäuren hervorgehoben (Abb. 69A). Nur wenige Aminosäuren konnten hierüber identifiziert werden, die ausreichend nah am G Protein liegen und die Spezifität vermitteln könnten. Der Bereich, der katalytisch mit dem Nukleotid und dem *P-loop* interagieren würde (inkl. Arg-Finger), ist hoch konserviert (Abb. 69A, rot); und folglich nicht verantwortlich für die Spezifität. Auch die *switch II*-bindende Oberfläche ist identisch. Die *switch I*-kontaktierenden Reste Q340, H344 und N345 sind nicht zwischen Arap1 und Arap3 konserviert, allerdings nimmt *switch I* nicht an der Katalyse teil, so dass diese Reste nur einen Effekt auf  $K_M$  und  $K_D$ , nicht jedoch auf  $k_{cat}$  besitzen könnten. Da der  $K_M$  zu RhoA und CDC42 gleich ist, müssen andere nicht-konservierte Reste Einfluss nehmen, indem sie beispielsweise die katalytischen Reste des GAPs stabilisieren und fixieren. Um dies im Detail aufklären zu können, benötigte man jedoch die Struktur von Arap1/3.



**Abbildung 69: Modell der GAP-Domäne von Arap1**

**A:** Modellierung der GAP-Domäne von Arap1, basierend auf der Struktur von CDC42\*GDP\*AIF<sub>x</sub>-CDC42GAP. Die konservierten Reste zwischen Arap1-3 sind rot markiert. Möglicherweise interagierende Reste, die nicht konserviert sind und so für die Spezifität verantwortlich sein könnten, sind im Detail gezeigt. **B:** Oberflächen-Darstellung der Ladung von CDC42, RhoA und Rac1 aus der Sicht der GAP-Interaktionsfläche. GAP ist in Wurmdarstellung eingezeichnet (grau). **C:** Markierung des C-Terminus (grün) der GAP-Domäne des Arap1-Modells aus A. *Rot:* konservierte Reste (hydrophil), *Hellrot:* konservierte Reste (hydrophob), *Grau:* nicht konserviert (hydrophil), *Hellgrau:* nicht konserviert (hydrophob). *Schwarzer Pfeil:* mögliche Position der C-terminalen Helix, basierend auf Hydrophobizität. *Weißer Pfeil:* mögliche Position der Helix, basierend auf Konservierung. **D:** Cartoon-Darstellung von C mit dem C-Terminus als grüne Kugel.

### ***Eigenschaften der GAP-Domäne von Arap1 und Arap3***

Trotz des Entwurfs mehrerer Konstrukte blieb die Aufreinigung der GAP-Domäne von Arap1 erfolglos. Das einzig mögliche Fragment wurde durch die PreScission-Spaltung des (GAP-PS-RA)-Konstrukts erhalten, wodurch es zusätzlich zur GAP-Domäne noch eine C-terminale Helix aufwies. Diese ist allerdings in Position und Sequenz nicht zwischen Arap3 und Arap1 konserviert (s. S. 72), was von einem Aktivitäts-regulierenden Element erwartet würde. Bekannte Strukturen von RhoGAP-Proteinen weisen diese Helix nicht auf, so dass ihre möglichen Bindestellen auf der GAP-Oberfläche nur basierend auf Sequenzhomologie (Abb. 69C, weißer Pfeil) und/oder Hydrophobizität (Abb. 69C, schwarzer Pfeil) postuliert werden kann. Da der C-Terminus der RhoGAP-Domäne auf der gegenüberliegenden Seite des G Protein-bindenden Bereichs liegt (Abb. 69C), spricht auch dies gegen einen direkten Einfluss der Helix auf die GAP-Aktivität; andere Bindungsstellen sind natürlich nicht ausgeschlossen.

Eine genauere Betrachtung der Sequenzkonservierung zwischen Arap1 und Arap3 zeigt die höchste Sequenzhomologie auf der Seite, die die G Proteine bindet. Dies beinhaltet natürlich die G Protein-bindenden Reste, zusätzlich jedoch einen großen Bereich, der diesen Resten benachbart ist (Abb. 69A, oberer Bereich) und deutlich ausgeprägter ist, als Bereiche auf der Rückseite der GAP-Domäne (Abb. 69C, D). Das lässt den Schluss zu, dass an der konservierten Oberfläche in Richtung von CDC42 weitere Domänen von Arap oder Interaktionspartner binden könnten, die aufgrund der räumlichen Nähe einen Einfluss auf die GAP-Aktivität besitzen würden (s.u.).

Die Frage nach der Unlöslichkeit der GAP-Domäne von Arap1 kann entsprechend des Modells nicht beantwortet werden, da keine besonders erhöhte Hydrophobizität der Oberfläche (Abb. 69C) im Vergleich zu anderen GAP-Domänen oder Arap3 festgestellt werden konnte. Die Tatsache, dass die GAP-Domäne erfolgreich aus der Spaltung des (GAP-RA)-Konstrukts erhalten werden konnte, lässt zwei Erklärungen zu. Entweder führt die Präsenz der RA-Domäne zu einer vollständigen Faltung der GAP-Domäne, die ohne RA nicht in *E. coli* möglich ist. Andererseits könnte der im Vergleich zu den anderen GAP-Konstrukten längere C-Terminus (s. S. 73) zu einer verbesserten Löslichkeit geführt haben.

Die erfolgreiche Aufreinigung eines GAP-Konstrukts von AS 674-896 durch Miura *et al.*<sup>(249)</sup> konnte hier nicht reproduziert werden. Dieses Konstrukt schließt einen großen Teil der N-terminal der GAP-Domäne liegenden PH-Domäne ein und ist C-terminal kürzer als bekannte RhoGAP-Strukturen. Der Versuch, selbst ein entsprechendes Konstrukt zu erhalten, schlug fehl und resultierte in stark unlöslichem Protein, welches nur als GST-Fusionsprotein in sehr geringen Mengen erhalten

werden konnte.

### 4.3.2 Die RA-Domäne als regulierendes Element

#### *Interaktionspartner der RA-Domäne von Arap3 und Arap1*

In früheren Studien wurde Rap1B als Interaktionspartner der RA-Domäne von Arap3 vorgeschlagen, basierend auf qualitativen Bindungsstudien mit Arap3 (VL) an Nitrocellulose<sup>(250)</sup>. Eine Reproduktion dieses Ergebnisses konnte weder in quantitativen noch in qualitativen *in vitro* Experimenten erhalten werden, trotz der guten Löslichkeitseigenschaften eines Konstrukts, welches die RA- und die C-terminale PH5-Domäne enthielten (s. S. 81). Auch in einem größeren Ansatz mussten alle getesteten Proteine der Ras-Subfamilie als Interaktionspartner von Arap3 (RA-PH) ausgeschlossen werden (Tabelle 19). Der Vorteil des verwendeten Konstrukts lag in der Anwesenheit der PH-Domäne, die bsp. für TIAM einen Einfluss auf die Bindung eines G Proteins an die RA-Domäne besitzt<sup>(210)</sup>, hier jedoch nicht zur verstärkten Interaktion mit G Proteinen führte. Es ist nicht ausgeschlossen, dass möglicherweise die Anwesenheit weiterer Interaktionspartner erforderlich ist, die eine Bindung von Ras-Proteinen an die RA-Domäne von Arap3 induzieren würden.

**Tabelle 19: Auf Interaktion getestete G Proteine der Ras-Subfamilie**

H-Ras	Rap2A	TC21	Rheb	RalA	DiRas1	RERG
Rap1B	R-Ras	M-Ras	RhebL	RalB	DiRas2	

Diese Untersuchungen führen zu der Vermutung, dass die RA-Domäne von Arap3 nicht mit Mitgliedern der Ras-Familie interagiert. Auch die bereits publizierten Ergebnisse sind wenig vertrauenswürdig, da die Bindung von Rheb an Raf (RBD) als Positivkontrolle eingesetzt wurde, deren Interaktion jedoch von mehreren Gruppen ausgeschlossen wurde<sup>(413)</sup>(K. Uhlenbrock, *unveröffentlicht*).

In dem Bestreben, Bindungspartner der RA-Domäne von Arap1 zu identifizieren, wurden *Pulldown*-Experimente, GDI-Versuche und Polarisationsmessungen eingesetzt (s. 3.3.4), die trotz der Verwendung unterschiedlicher Arap1-Konstrukte stets negativ waren. Zwar konnten einige Proteine (inkl. DiRas1 und DiRas2) im *Pulldown*-Ansatz beobachtet werden, es muss allerdings beachtet werden, dass dies nur unter nicht sehr stringenten Bedingungen (1x waschen, keine Detergenzien) durchgeführt wurde. Falls eines dieser Proteine als Interaktionspartner von Arap1

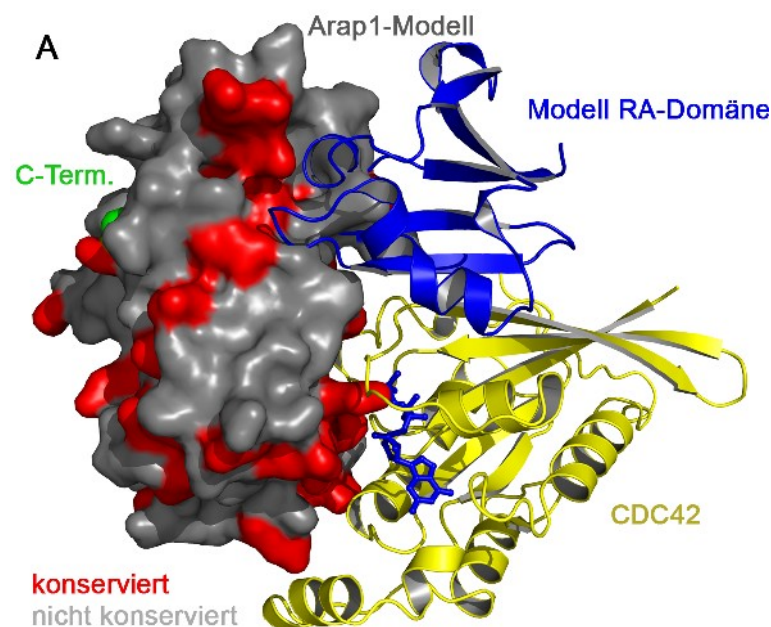
existierte, wäre die Affinität außerordentlich gering und eher im hohen  $\mu\text{M}$ - bis niedrigen  $\text{mM}$ -Bereich einzuordnen.

In anderen Studien wurden DiRas1 über *Pulldown*-Experimente (zeigten nur eine sehr schwache Bande)<sup>(400)</sup> und DiRas2 in *in vivo* Kolokalisationsstudien (A. Chandra, *unveröffentlicht*) als Bindungspartner von Arap1 (RA) identifiziert. Insbesondere DiRas1 wäre interessant, da eine Überexpression zu vakuolären Strukturen führt<sup>(168)</sup>, ein Effekt, der auch für Arap3 beschrieben wurde<sup>(458)</sup> (allerdings nicht für Arap1).

### **Interaktion der RA-Domäne von Arap1 mit Rho-Proteinen**

Neben der Interaktion der RA-Domäne von Arap1 mit G Proteinen der Ras-Familie wäre auch eine Interaktion mit Rho-Proteinen denkbar. Eine entsprechende Bindung für die RA-Domäne wurde für FHOD1 nachgewiesen<sup>(418)</sup>. Auch die Bindung von RopGAP an das Rho-Protein Rop erfolgt sowohl über eine Effektor-Region (CRIB) als auch über die GAP-Domäne<sup>(290)</sup> (A. Schaefer, *unveröffentlicht*), wodurch die GAP-Aktivität erhöht wird.

Grundsätzlich wäre eine Interaktion der RA-Domäne, abgesehen von wenigen Überschneidungen, zusätzlich zur GAP-Bindung möglich (Abb. 70) in der Annahme, dass die Bindung analog zu Ras-Proteinen erfolgte. Sowohl in *Pulldown*-Experimenten als auch über Polarisationsmessungen (CDC42\*GNP) wurde jedoch keine Interaktion beobachtet (s. S. 79, 84).



### **Abbildung 70: Simultane Bindung von GAP und RA an CDC42**

Modell der simultanen Bindung einer RA-Domäne und der GAP-Domäne an CDC42, basierend auf der Überlagerung von CDC42\*CDC42GAP mit Raps\*Raf(RBD). Farbkodierung der GAP-Domäne analog zu Abb. 69.

### ***Einfluss der RA-Domäne auf die RhoGAP-Aktivität***

Weder für Arap1 noch für Arap3 konnte ein Effekt der RA-Domäne auf die GAP-Aktivität beobachtet werden.

In Hydrolyse-Messungen besaß Rap1B\*GNP keinen Einfluss auf die Aktivität von Arap3 (GAP-RA-PH). Vielmehr verringerte sich die Hydrolyserate wahrscheinlich aufgrund eines Austauschs von GTP und GppNHp zwischen RhoA und Rap1B, der durch die Abwesenheit von Magnesium ausgelöst wurde (s. S. 91). Im Gegensatz hierzu berichten Publikationen mit dem VL Protein von einer (nicht quantifizierten) geringen Aktivierung der GAP-Aktivität *in vitro* und einer Reduktion des Rho\*GTP-Levels in Zellen um 20% durch Überexpression von Arap3 gemeinsam mit Rap1A im Vergleich zu Arap3 alleine<sup>(250)</sup>.

Auch die RA-Domäne von Arap1 besaß keinen Einfluss auf die GAP-Aktivität. Im direkten Vergleich wiesen (GAP\_4), (GAP-RA) und (GAP-RA) nach PreScission-Spaltung gleiche Aktivierung von CDC42 auf (s. S. 88). Die Zugabe eines Überschusses der RA-Domäne *in trans* zu einem Hydrolyse-Ansatz aus Arap1 (GAP-RA) und CDC42 änderte die Hydrolyserate nicht und weist nochmals daraufhin, dass die RA-Domäne nicht an CDC42 bindet (s. S. 91).

Die fehlende Aktivierung durch die RA-Domänen ist entweder auf die Verkürzung der VL-Proteine zurückzuführen oder es findet grundsätzlich keine Regulierung statt, da auch die publizierten Ergebnisse über Arap3 (VL) nur von geringen Effekten berichten.

### **4.3.3 Regulation der RhoGAP-Aktivität durch andere Effekte**

Einige GAP-Proteine werden in ihrer Aktivität durch weitere Domänen reguliert wie bsp. OPHN1/Graf, die über Membranbindung ihrer BAR-Domänen die Autoinhibition verlieren<sup>(515)</sup> oder p190RhoGAP, dessen Aktivität durch Interaktion mit PIPs reguliert wird<sup>(512)</sup>. Ein Großteil der RhoGAPs wird entweder über posttranslationale Modifikationen oder über die Rekrutierung der Proteine an die Membran aktiviert<sup>(259)</sup>.

### ***Regulation von Arap3***

Es stellt sich die Frage, wie und ob die RhoGAP-Aktivität von Arap3 reguliert wird. Der Vergleich der katalytischen Aktivität der GAP-Domäne mit dem längeren Konstrukt (GAP-RA-PH) offenbart bei gleicher Konzentration große Unterschiede: Die Arap3(GAP)-katalysierte Reaktion war in *single-turnover* Reaktionen zu schnell, um noch eine Rate bestimmen zu können, während das (GAP-RA-PH)-Konstrukt eine vergleichsweise geringere Aktivität besaß (s. S. 91).

Es bestanden also Aktivitätsunterschiede, die durch die Anwesenheit des (RA-PH)-Teils von Arap3 ausgelöst wurden. Bei der Bewertung dieses Effekts dürfen die Löslichkeitsprobleme ( $Mg^{2+}$ -Unverträglichkeit) des (GAP-RA-PH)-Konstrukts nicht unbeachtet bleiben, da der inhibierende Effekt hierauf zurückführbar sein könnte. So übte die Zugabe von (RA-PH) zur GAP-Domäne keine inhibierende Wirkung aus, anders als bsp. die BAR-PH-Domäne von OPHN1, die eindeutig inhibierend auf die GAP-Domäne wirkte<sup>(515)</sup>. Eine andere Ursache für die ausbleibende Inhibition könnte allerdings auch eine zu geringe Affinität zwischen Arap3 (GAP) und Arap3 (RA-PH) sein, für die keine Interaktion in ITC-Messungen festgestellt wurde.

Erstmals konnte eine Interaktion der C-terminalen PH-Domäne mit Phosphoinositolen beobachtet werden, da bisher nur die Interaktion der N-terminalen PH1-Domäne mit verschiedenen Phosphoinositolen bekannt war. PH5 (bzw. (GAP-RA-PH5)) bindet demnach an Phosphatidylserin (PS) und  $PI(3,4)P_2$  sowie deutlich geringer an weitere Phosphoinositole. Unter den hier durchgeführten Messbedingungen blieb die katalytische Aktivität von Arap3 (GAP-RA-PH) bei Anwesenheit von Phosphatidylserin gleich, so dass ein allosterischer Effekt auszuschließen ist.

Somit bleibt die Ursache der verminderten Aktivität von Arap3 (GAP-RA-PH) im Vergleich zu Arap3 (GAP) ungelöst, da kein Interaktionspartner identifiziert werden konnte, der die Aktivität von (GAP-RA-PH) erhöhte.

### ***Regulation von Arap1***

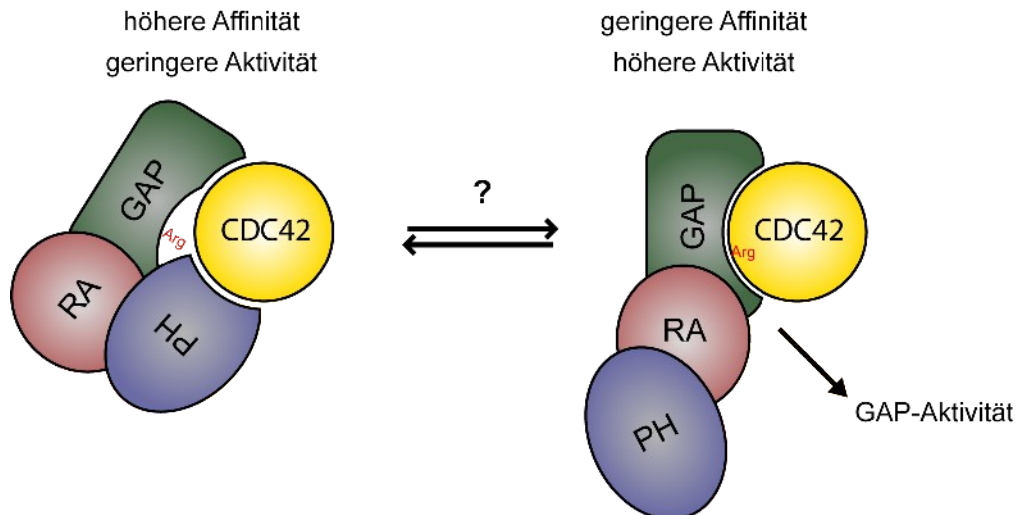
Analog zu Arap3 zeigten sich Aktivitäts-Unterschiede auch für Arap1, sobald ein längeres Konstrukt eingesetzt wurde, welches die C-terminale PH5-Domäne einschloss. Hier ist zunächst die Differenz in der Affinität von Arap1 zu  $CDC42 \cdot GDP \cdot AIF_x$  zu nennen, die beim längeren (GAP-e)-Konstrukt mit  $7,8 \mu M$  bis zu 4,5-fach höher war als mit Arap1 (GAP-RA) (s. S. 84). Zusätzlich unterschieden sich die  $K_M/k_{cat}$  Messungen beider Konstrukte, die im Falle von Arap1 (GAP-e) aufgrund der geringen maximal möglichen Proteinkonzentration nicht auswertbar waren. Qualitativ betrachtet, ist der  $K_M$ -Wert von Arap1 (GAP-e) geringer als von Arap1 (GAP-RA) (entsprechend auch die höhere Affinität) und der  $k_{cat}$ -Wert deutlich erniedrigt (s. S. 89): Bei gleicher Konzentration ist (GAP-e) halb so aktiv wie (GAP-RA) auf CDC42. Die Ursache hierfür könnte sich nur durch nähere Einblicke in das System erschließen, bsp. durch die Lösung der Komplexstruktur.

Auch für Arap1 wurde Phosphatidylserin als Bindungspartner identifiziert, ebenfalls ohne Einfluss auf die katalytische Aktivität des Proteins. Phosphoinositole banden nicht an die PH5-Domäne und konnten auch nicht für PH3 oder PH4 beobachtet werden. Dies steht im Gegensatz zu einer



Publikation, nach der jede PH-Domäne von Arap1 (unspezifisch) an eine Vielzahl von Phosphoinositolen binden soll<sup>(463)</sup>.

**„Modell“ der GAP-Regulation**



**Abbildung 71: Modell der GAP-Regulation im Multidomänen-Verbund von Arap1**

Auf Ergebnissen der Hydrolyse- und Aktivitätsmessungen mit verschiedenen Arap1-Konstrukten und CDC42 basierendes Modell. Demnach würde die Bindung der PH-Domäne von Arap1 und CDC42 zu einer Verringerung der GAP-Aktivität führen, da das aktive Zentrum nicht vollständig ausgebildet werden kann. Gleichzeitig wäre die Affinität durch die PH-Interaktion erhöht. Durch nicht bekannte Regulationsmechanismen könnte sich die Bindung der PH-Domäne an CDC42 lösen und die Affinität zwischen Arap1 und CDC42 verringern. Dies hätte zusätzlich eine erhöhte GAP-Aktivität zur Folge, da sich das aktive Zentrum ausbilden könnte.

Die Aktivitätsunterschiede der verschiedenen Konstrukte von Arap1 und Arap3, insbesondere aber die Ergebnisse zu Arap1, ermöglichen Vermutungen über die Ursache dieses Effekts.

- Der (RA-PH)-Bereich von Arap1 könnte seinerseits an die GAP-Domäne binden und allosterisch die Affinität erhöhen und die Aktivität erniedrigen.
- (RA-PH) könnte direkt an CDC42 binden (Abb. 71), was für die RA-Domäne alleine jedoch nicht nachweisbar war (s.o.).

Es wäre demnach denkbar, dass (RA-PH) (oder evtl. auch nur die PH-Domäne alleine) als „Effektor“ an CDC42 bindet und so einerseits die Affinität erhöht, andererseits jedoch die katalytische Aktivität vermindert (Abb. 71).

Bekannte G Protein - PH Interaktionen beinhalten die PH-Domänen der DH-PH-Tandems von RhoGEFs<sup>(218)</sup>, die PH-Domäne des Arf1-Effektors ARHGAP21<sup>(322)</sup>, und die split-PH-Domäne von PLC $\gamma$ <sup>(516)</sup>, von der jedoch noch keine Komplexstruktur mit einem Rho-Protein gelöst wurde. Überlagerungen mit dem Arap1-Modell zeigen, dass die bekannten PH-Domänen-Interaktionen über

gleiche Flächen erfolgt wie die GAP-Bindung (nicht gezeigt) und demnach die mögliche Bindung der PH-Domäne von Arap1 an CDC42 über ein anderes Interface erfolgen müsste.

#### 4.3.4 Ausblick

Sowohl für Arap1 als auch Arap3 konnte eine Verringerung der GAP-Aktivität festgestellt werden, sobald Konstrukte eingesetzt wurden, die die C-terminalen RA- und PH-Domänen enthielten. Da für diese keine potenziellen Interaktionspartner gefunden wurden, bzw. keinen Einfluss auf die Katalyse zeigten, bleibt nur die strukturelle Aufklärung der Konstrukte um eine Aussage über die Grundlage der Inhibition machen zu können. Die Berührungsflächen zwischen den Domänen sind ohne Struktur ebenfalls nicht bekannt, so dass auch keine Mutationsanalysen durchgeführt werden könnten.

Ein weiterer Ansatz ist die umfassende Analyse von interagierenden Proteinen durch *in vivo*-Methoden, die zur Zeit von A. Chandra durchgeführt werden. Einschränkend ist hierbei festzustellen, dass bereits identifizierte Proteine (Di-Ras2) *in vitro* keine Bindung aufwiesen.

## 4.4 ARHGAP20

### *Reinigungserfolg*

Von ARHGAP20 konnte nur ein Konstrukt löslich erhalten werden, welches alle Domänen bis einschließlich der RhoGAP-Domäne einschloss. Die Aufreinigung des Proteins erforderte hohe NaCl-Konzentrationen, ohne die es sofort präzipitierte. Beide Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass ARHGAP20 eine sehr kompakte Struktur haben muss, da einzelne Domänen ohne den Verbund im Gesamtprotein nicht löslich sind.

#### 4.4.1 ARHGAP20 ist ein RhoA- und CDC42-GAP

In den hier durchgeführten Messungen mit in *E. coli* exprimiertem ARHGAP20 (1-GAP) und der notwendig hohen Salzkonzentration konnte ARHGAP20 die Hydrolyse von RhoA etwa 100-fach und die Hydrolyse von CDC42 19-fach beschleunigen, während Rac1 nur 2-fach stimuliert wurde (s. S. 100).

*In vitro*-Messungen von Yamada *et al.*<sup>(426)</sup> mit rekombinant in SF9-Zellen aufgereinigtem ARHGAP20 zeigten eine Spezifität für RhoA, während es auf CDC42 oder Rac1 inaktiv war. Damit bestätigt sich auch für das kürzere Konstrukt die Bevorzugung von RhoA, allerdings mit

einer zusätzlichen Aktivierung von CDC42. Dies könnte auf die kürzere Konstruktlänge, fehlende posttranslationale Modifikationen (z.B. Phosphorylierung) oder eine schlechtere Faltung im Gegensatz zum *SF9*-exprimierten Protein zurückzuführen sein.

#### 4.4.2 Interaktion mit G Proteinen und der Einfluss auf die Hydrolyse

Die für ARHGAP20 postulierte Bindung an Rap1B\*GNP<sup>(426)</sup> konnte über Polarisationsmessungen *in vitro* quantifiziert werden; demnach ergab sich ein  $K_D$  von 196  $\mu\text{M}$  (s. S. 98). Zusätzlich wurde die Affinität an Ras\*mGNP zu 120  $\mu\text{M}$  bestimmt. Ähnlich wie in den Polarisationsmessungen der Interaktion von RapL mit unterschiedlichen Integrinen wurden zwar Sättigungsfunktionen beobachtet, die maximale Änderung der Polarisation war jedoch deutlich unterschiedlich. Demzufolge würde man die Interaktion mit Ras als unspezifisch ansehen, da für die Bindung eines ca. 58 kDa großen Proteins an ein G Protein eine stärkere Polarisationsänderung erwartet worden wäre.

Die hohe Salzkonzentration ist wahrscheinlich für die geringe Affinität zu Rap1B verantwortlich, da die Interaktionsflächen zwischen RA-Domäne und G Protein in der Regel sehr hydrophil sind (s. S. 37).

In Hydrolysemessungen von ARHGAP20 und RhoA bzw. CDC42 erbrachte die Zugabe eines 100-fachen Überschusses von Rap1B\*GNP keine Änderung der Aktivität, im Gegensatz zu publizierten Ergebnissen von Yamada *et al.*<sup>(426)</sup> mit dem VL Protein.

Die veröffentlichten Hydrolysemessungen wurden nicht quantifiziert, so dass ein Vergleich der Aktivität von ARHGAP20 (1-GAP) mit ARHGAP20 VL schwierig ist. Trotz unterschiedlicher Methoden und eingesetzter Konzentrationen, zeigt das verkürzte Konstrukt von ARHGAP20 alleine eine vergleichbare Aktivität wie ARHGAP20 (VL) nach Rap1B-Aktivierung (Tabelle 20). ARHGAP20 (VL) ohne Rap1B ist deutlich schwächer<sup>(426)</sup>. Das verkürzte ARHGAP20 wäre demnach konstitutiv aktiv.

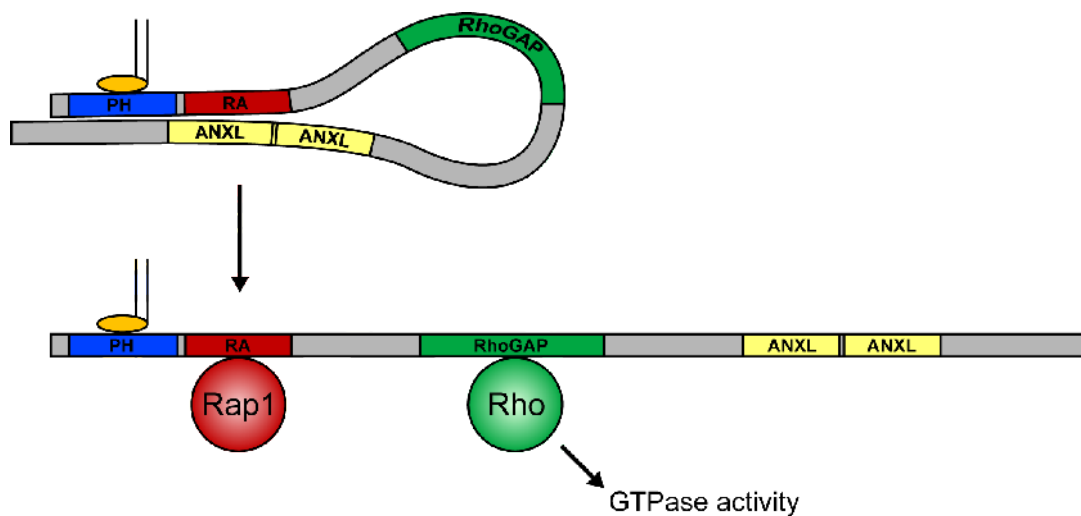
**Tabelle 20: Halbwertszeiten der Reaktion von ARHGAP20 und RhoA**

		$t_{1/2}$	c (ARHGAP20)
ARHGAP20 (VL)	- Rap1B	$\approx$ 5-6 min	2 nM
ARHGAP20 (VL)	+ Rap1B	$\approx$ 50 sec	2 nM
ARHGAP20 (1-525)	+/- Rap1B	23 sec	10 nM

*ARHGAP20 (VL) aus Yamada et al.*<sup>(426)</sup>

Dieses Ergebnis erinnert an typische Rho-Effektoren (z.B. mDia<sup>(65)</sup>), die in großen Multidomänen-

Proteinen eine Autoinhibition z.T. über N- und C-Terminus besitzen. Es könnte postuliert werden, dass die C-terminalen,  $\alpha$ -helicalen *Annexin-like repeats* von ARHGAP20 durch Bindung an den N-Terminus eine Inhibition auslösen (Abb. 72), ähnlich zu den ebenfalls  $\alpha$ -helicalen *Armadillo-repeats*<sup>(268)</sup> von mDia. Beide Struktur motive sind bekannt für Protein-Protein-Wechselwirkungen. Ein Vergleich der Sequenzen von ARHGAP20 und Arap1 (s. S. 72) zeigte, trotz der möglicherweise ähnlichen Regulationsmechanismen, keine Bereiche hoher Homologie, die nicht auch in anderen RhoGAP-Proteinen konserviert wären. Dementsprechend konnten keine Sequenzmerkmale identifiziert werden, die eine Autoinhibition der Proteine verursachen könnten.



**Abbildung 72: spekulatives Modell der Aktivierung von ARHGAP20**

Modell, basierend auf dem Vergleich der hier durchgeführten Hydrolysemessungen mit den Ergebnissen aus<sup>(426)</sup>. Demnach kann eine Interaktion zwischen N-Terminus und C-Terminus von ARHGAP20 angenommen werden, die die RhoGAP-Aktivität verringert. Da diese Interaktion nicht direkt nachgewiesen wurde, bleibt das Modell spekulativ. Durch Bindung von Rap1B\*GTP an die RA-Domäne wird die Interaktion gelöst und die RhoGAP-Domäne aktiviert.

#### 4.4.3 Die N-terminale PH-Domäne bindet mehrere PIPs

ARHGAP20 (1-GAP) band vergleichsweise unspezifisch an Phosphoinositole mit der höchsten Affinität zu  $PI(3,4)P_2$  und  $PI(4)P$ ; allgemein zu Phosphoinositolen, die an Position 4 modifiziert sind (s. S. 99). Trotz dieser hohen Variabilität konnte keine Bindung an  $PI(3,5)P_2$  festgestellt werden, obwohl geringe Affinität zu  $PI(3)P$  und  $PI(5)P$  bestand. Die geringe Spezifität der PIP-Bindung von ARHGAP20 könnte auf die hohe Salzkonzentration im Puffer zurückzuführen sein, die aufgrund der sonst schlechteren Löslichkeit von ARHGAP20 nicht reduziert werden konnte.

Die PH-Domäne von ARHGAP20 besitzt die höchste Konservierung zu PH-Domänen von Sos1, Isn1 und DAPP1 (s. S. 95). Ein Alignment dieser Proteine zeigte, dass im Bereich der PIP-Bindung zwischen  $\beta$ -Faltblatt 1 und 2 mehrere positiv geladene Reste lokalisiert sind, deren strukturelle

Modellierung jedoch schwierig ist. PH-Domänen zeigen insbesondere in der PIP-Bindungstasche eine hohe Variabilität, die eine Vorhersage von Interaktionen selbst dann erschweren, wenn die Apo-Struktur bereits gelöst ist<sup>(482)</sup>.

Analog zu den Arap-Proteinen konnte keine allosterische Regulation der GAP-Aktivität durch PI(3,4)P<sub>2</sub> und PI(4,5)P<sub>2</sub> beobachtet werden (s. S. 99). Es könnte auch hier angenommen werden, dass für eine Änderung der Aktivität von ARHGAP20 durch PIPs dessen C-Terminus vorhanden sein muss. Andererseits könnte eine Regulation durch Phosphoinositole über Membranrekrutierung von ARHGAP20 erfolgen (Abb. 72).

### 4.4.4 Ausblick

Entsprechend der Beobachtungen bei den Arap-Proteinen kann nur die Strukturaufklärung von ARHGAP20 zu einer detaillierten Einsicht in den Regulationsmechanismus führen. Die bereits publizierten biochemischen Untersuchungen zeigten klar, dass ARHGAP20 durch Rap1 aktiviert wird, während hier Hinweise darauf vorliegen, dass sehr wahrscheinlich der C-Terminus für diese Autoinhibition notwendig ist. In weitergehenden Studien sollten dementsprechend Konstrukte erstellt werden, die größere Bereiche des C-Terminus einschließen, um deren Einfluss auf die Hydrolyse zu bestimmen. Entsprechend wären auch Ansätze interessant, die die Inhibition durch den C-Terminus *in trans* untersuchen würden; ähnlich den OPHN1-Ergebnissen<sup>(515)</sup>.

## 4.5 RabGEF-Aktivität von Rin

### 4.5.1 Rekombinante Aufreinigung von Rin

Die rekombinant in *E. coli* durchgeführte Aufreinigung der Rin-Proteine gestaltete sich als sehr schwierig und widersprüchlich. Neben der sehr geringen Löslichkeit, die teilweise durch Pufferbedingungen etwas verbessert werden konnte, wies das GST-Fusionsprotein eine Resistenz gegen TEV und Thrombin auf, trotz vorhandener Schnittstellen. Der GST-Teil des Fusionsproteins reagierte nicht mit Antikörpern, das Protein präzipitierte nach Trennung der Fusion und in Gelfiltrations-Experimenten zeigte es stets hohe Aggregate (s. S. 104). Auch der Reinigungserfolg anderer Gruppen war selbst unter Verwendung von SF9-Zellen außerordentlich gering (mündliche Mitteilung J. Colicelli), so dass *in vitro* Versuche stets kritisch betrachtet werden sollten.

Da auch das VL-Protein in eukaryotischen Zellen schwer zu erhalten ist, könnte spekuliert werden, dass hydrophobe Bereiche auf der Proteinoberfläche für die geringe Löslichkeit verantwortlich sind

und die Interaktion mit weiteren Proteinen für eine ausreichende Stabilität benötigen. Dies wäre typisch für Rab-GEFs und Rab-Effektoren, die wie Rabex-5 und Rabaptin-5 in Multiprotein-Verbänden auftreten<sup>(517)</sup>. Für Rin1 sind derartige GEF-Effektor-Komplexe bislang jedoch nicht bekannt.

Trotz dieser Beobachtungen zeigte GST-Rin1 (RH-e) in ITC-Messungen eine Affinität von 27  $\mu\text{M}$  zu Ras\*GNP (s. S. 106); ein Indiz, dass zumindest die C-terminal gelegene RA-Domäne eine korrekte Faltung aufwies. Die Affinität des Rin1 (RH-e)-Konstrukts war demnach geringer als die der RA-Domäne allein (0.88  $\mu\text{M}$ )<sup>(391)</sup>, was entweder an der Anwesenheit der (RH-Vps9)-Domäne des Proteins oder an der Präsenz des GST-Teils liegen könnte.

#### 4.5.2 GEF-Aktivität von Rin1

Trotz des Einsatzes verschiedener Konstrukte, mehrerer Messbedingungen und der Verwendung einer Vielzahl von Rab-Proteinen konnte keine GEF-Aktivität von Rin1 detektiert werden. Publierte Ergebnisse mit in *SF9*-Zellen gereinigtem VL-Protein zeigten GEF-Aktivität von Rin auf Rab5<sup>(427)</sup>; was mit den hier und in der Masterarbeit von M. Fislage getesteten, verkürzten Konstrukten jedoch nicht beobachtet werden konnte.

#### 4.5.3 Homologie zu Rabex-5 und der Einfluss der RA-Domäne von Rin1

Die sog. *Rin-homology* (RH)-Domäne der Rin-Proteine, ein Bereich hoher Konservierung N-terminal von der Vps9-Domäne, besitzt starke Ähnlichkeit in der Sekundärstruktur mit dem *helical bundle* von Rabex-5, so dass die Vermutung nahe lag, dass dieser Bereich von Rin einen Einfluss auf die Stabilität der Vps9-Domäne besitzen könnte. In der Tat konnten nur Konstrukte aufgereinigt werden, die die RH-Domäne einschlossen (s. S. 105).

Die GEF-Aktivität der rekombinant aufgereinigten Vps9-Domäne von Rabex-5, wurde lange als ungewöhnlich schwach eingestuft<sup>(518)</sup>. Die Vps9-Domäne besaß *in vitro*, analog zu Rin1, nur eine geringe Löslichkeit. Durch die Identifikation eines „*helical bundles*“, das der Vps9-Domäne N-terminal vorausgeht, führte im Verbund mit der Vps9-Domäne zu einem ausgesprochen löslichen Protein und hoher GEF-Aktivität<sup>(48)</sup> (vgl. GEF-Messungen, S. 54).

Die GEF-Aktivität von Rabex-5 wird *in vitro* durch die Anwesenheit und Länge einer autoinhibitorischen Helix C-terminal der Vps9-Domäne reguliert<sup>(214)</sup>. Der Sequenzvergleich mit Rin1 zeigt an dieser Stelle die Helix der RA-Domäne von Rin, für die ebenfalls eine inhibitorische Funktion postuliert wurde<sup>(427)</sup>. Allerdings führte der Ausschluss der RA-Domäne von Rin1-Konstrukten zu

einer stark verringerten Löslichkeit, wodurch weitergehende Untersuchungen verhindert wurden. Mutationen von mit Rabex-5 konservierten Resten der Helix, resultierten nicht in einer Aktivierung des Proteins.

Die mögliche Oberfläche der Vps9-Domäne von Rin1, basierend auf einem Modell aus Rin1-Sequenz und Struktur von Rabex-5, zeigt eine Konservierung der G Protein-Bindungsstelle inkl. des katalytisch aktiven Aspartats. Entsprechend sollte eine Aktivität von Rin1 auf Rab5 erwartet werden können. Es ist folglich nicht zu erklären, bzw. aufgrund der schlechten Proteineigenschaften nicht zu eruieren, warum Rin1 inaktiv verblieb.

### **4.5.4 Rin1 bindet an Rab5, ist jedoch katalytisch inaktiv**

Trotz der katalytischen Inaktivität von Rin1 wurde in den GEF-Fluoreszenz-Messungen ein Anstieg der Fluoreszenz von mGDP-gebundenem Rab5 bei Zugabe von GST-Rin1 (RH-e) beobachtet.

In weitergehenden Untersuchungen über Fluoreszenzmessungen und Polarisationsmessungen konnte eine Sättigungskurve für die Titration von Rab5\*mGDP mit Rin1 erhalten werden, was auf die Bildung eines ternären Komplexes aus Rin1 und Rab5\*mGDP hindeutet. Die Affinität lag bei 3,6  $\mu\text{M}$ , bzw. 24  $\mu\text{M}$ . Diese Eigenschaft, bei gleichzeitiger Inaktivität des GEFs, wurde bisher noch nicht beobachtet, außer für die E $\rightarrow$ A G Protein-Mutanten, die allerdings keine Änderung des Fluoreszenzsignals bei Bindung des GEFs hervorriefen (siehe 4.1 ). Die Struktur Rop\*GDP-Prone konnte zwar als Trimer gelöst werden, jedoch zeigten auch diese Proteine keine Bindung in Fluoreszenzmessungen (Promotion C. Thomas).

Es wäre ebenfalls möglich, dass die beobachteten Fluoreszenz- und Polarisations Effekte nicht die Bindung von Rin1 an Rab5, sondern die Bindung der Verunreinigungen der Rin1-Lösung an Rab5\*mGDP zeigten. Wie M. Fislage in seiner Masterarbeit zeigte, besteht ein großer Teil der Rin1-Aufreinigung aus GroEL (siehe auch Abb. 58), das gleichermaßen an Rab5 binden und die Effekte hervorrufen könnte. Leider wurden weitere Experimente durch die schlechten Proteineigenschaften von Rin1 verhindert.

### **4.5.5 Ausblick:**

Der wichtigste Ansatz in der Charakterisierung der Rin-Proteine läge darin, lösliche und verwendbare Konstrukte zu erhalten, die *in vitro*-Messungen ohne Einschränkungen ermöglichen würden. Dies könnte durch die Erstellung von Konstrukten von Rin2 und Rin3 gelingen, da in der hier vorliegenden Arbeit (und M. Fislage) hauptsächlich Rin1 bearbeitet wurde. Erste Ansätze (s. S. 103)



sahen nicht sehr vielversprechend aus.

Wäre dies wider Erwarten möglich, könnten Mutationsstudien im Interface von Rin und Rab5 die Interaktion beider Proteine bestätigen, wodurch die Bindung von Chaperonen oder anderen Proteinen ausgeschlossen werden könnten. Die strukturelle Aufklärung eines Komplexes aus Rin, Rab und GDP würde, zusätzlich zum Rop-Prone Paar, die Untersuchung eines weiteren trimeren GEF-Komplexes ermöglichen. Auch der Einfluss der RA-Domäne könnte durch Mutationsstudien näher untersucht und die Homologie zu Rabex-5 und dessen inhibitorischer Helix verifiziert werden.

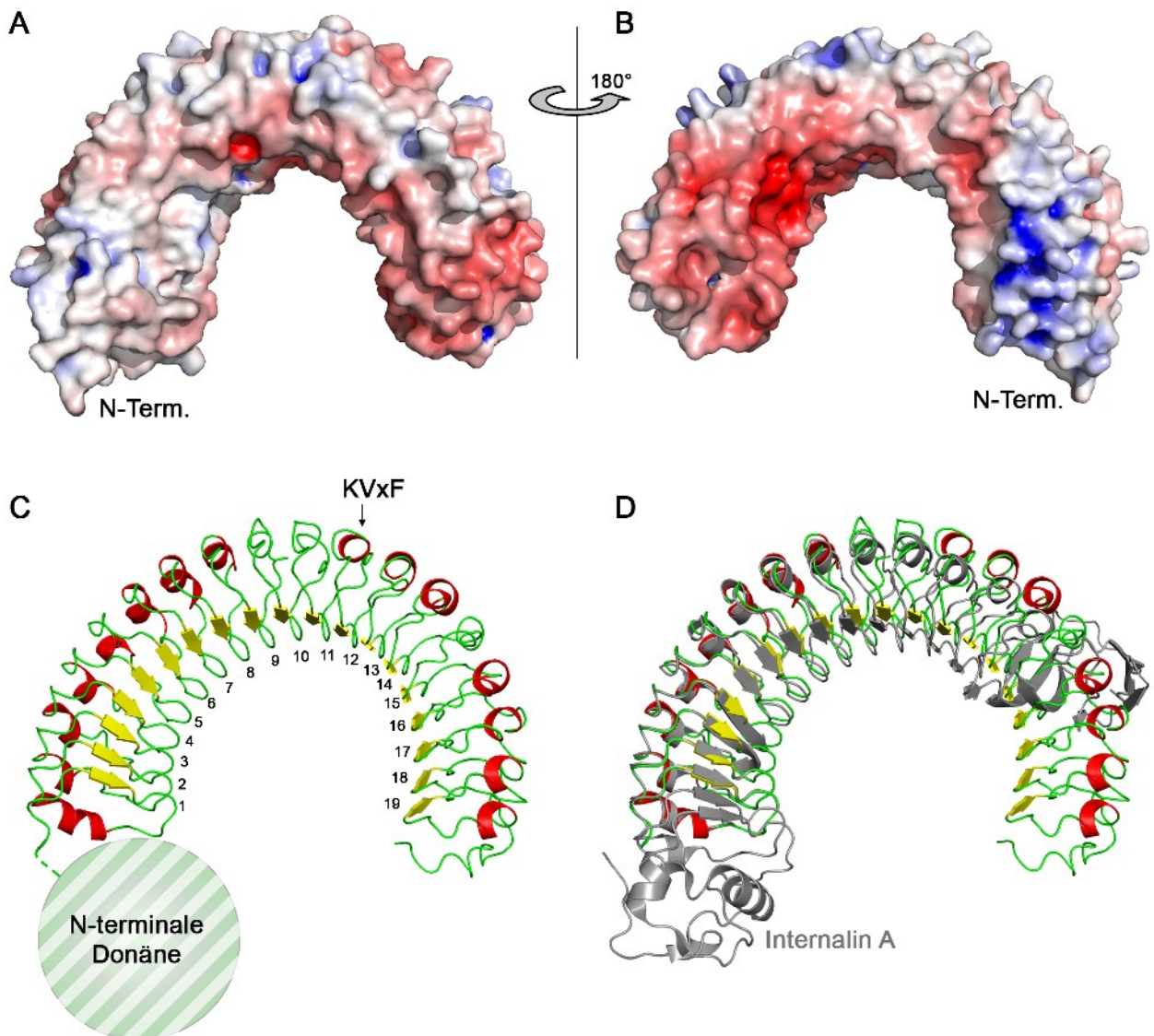
#### **4.6 Shoc2: Effektor und PP1-regulatorisches Protein**

Die Eigenschaften von Shoc2 konnten nicht eingehender untersucht werden, da das Protein bereits in der Aufreinigung nicht mit hinreichend guten Eigenschaften erhalten werden konnte (s. S. 113). Es war leider nicht möglich, einen stabilen Komplex aus Shoc2, PP1c und/oder M-Ras zu erhalten; trotz der Vielzahl der getesteten Methoden. Shoc2 zeigte weder in *Pulldown*-Experimenten noch in der Coexpression eine Bindung an PP1c oder M-Ras. Auch Polarisationsmessungen mit M-Ras verliefen ergebnislos.

Die Reinigung von Shoc2 alleine enthielt einen hohen Chaperon-Anteil (welches über Edman-Abbau identifiziert werden konnte) und eluierte aggregiert im Ausschlussvolumen von Gelfiltrations-Experimenten.

##### **4.6.1 Modell der LRR-Domäne von Shoc2**

Die hohe Regelmäßigkeit der LRRs von Shoc2 (s. S. 109) ermöglichen die Bildung eines Strukturmodells (Abb. 73). Die exakten Positionen der Seitenketten sind selbstverständlich nicht vertrauenswürdig; die hohe Ordnung dieses Strukturmotivs erlaubt aber die korrekte Positionierung einzelner Aminosäuren. Die einzelnen *Repeats* von Shoc2 sind in der Regel 23 Aminosäuren lang, dessen variabler Teil stets eine  $\alpha$ -Helix mit einem vorangehendem Prolin aufweist. Da diese nur 4 Reste lang ist, handelt es sich sehr wahrscheinlich um eine  $3_{10}$ -Helix, die häufig in kurzen LRRs vorhanden ist. Interessanterweise ergab sich bereits durch die Verwendung von kurzen LRRs und deren Überlagerung in der Modell-Bildung (siehe Beschriftung, Abb. 73) die solenoide Form der LRRs, die den typischen *Twist* aufweisen und sich nur geringfügig im Radius von Internalin A unterscheiden (Abb. 73D).



**Abbildung 73: Modell der LRRs von Shoc2**

Das Modell wurde anhand von 4 aufeinander folgenden *Repeats* von Internalin A in der Apo-Form erstellt, die konsekutiv aneinander gefügt wurden (bei Überlagerung von jeweils 2 *Repeats*), bis eine Anzahl von 19 *Repeats* erreicht war. Anschließend wurde die Sequenz von Shoc2, basierend auf dem LRR-Alignment überlagert. **A:** Oberflächendarstellung (Poisson-Boltzmann) des Modells (rot: negativ, blau: positiv). **B:** Drehung des Modells aus A um 180° entlang der y-Achse. **C:** Cartoon-Darstellung des Shoc2-Modells. Die Position der N-terminalen Domäne mit unbekannter Struktur ist angedeutet. **D:** Überlagerung von Internalin A (grau) und dem Shoc2-Modell (farbig).

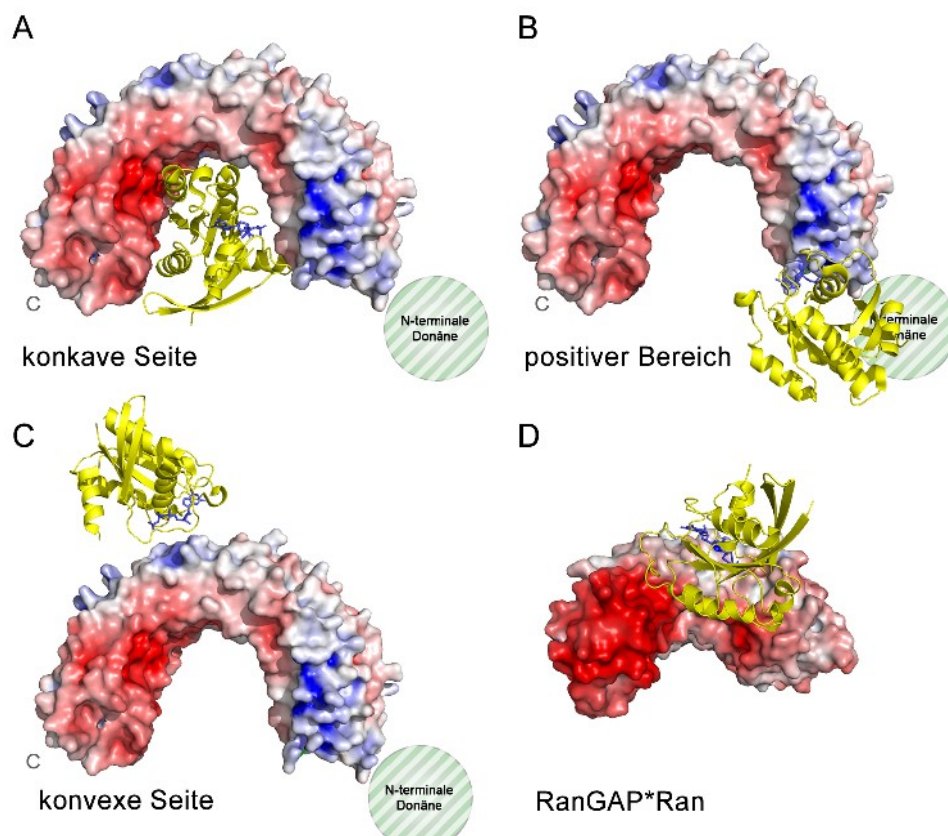
Die Oberflächenladung, gemäß der Poisson-Boltzmann-Berechnung, zeigt einen stark negativ geladenen C-Terminus sowohl auf der konvexen als auch auf der konkaven Seite, während der N-Terminus eher neutral bis positiv geladen wäre (Abb. 73A,B).

#### 4.6.2 Bindung von M-Ras an Shoc2

Shoc2 wird in der Literatur sowohl als H-/K-/N-Ras Effektor mit unbekanntem Einfluss auf MAP-

Kinasen<sup>(355;480)</sup>, sowie als M-Ras Effektor mit PP1c-regulatorischer Funktion<sup>(135)</sup> beschrieben.

Eine RA-Domänen-ähnliche Faltung für die Interaktion mit Ras-Proteinen ist aufgrund des Modells und der Sekundärstrukturvorhersage der N-terminalen Domäne ausgeschlossen, so dass Shoc2 als Ras-Effektor ohne RA-/RB-Domäne klassifiziert werden kann (s. 1.4.3 ). Entsprechend wurde auch die Adenylatzyklase zunächst als LRR-Effektor von Ras eingestuft, jedoch wurde später eine N-terminale RA-Domäne identifiziert<sup>(519)</sup>.



**Abbildung 74: Mögliche M-Ras Bindungsstellen an Shoc2**

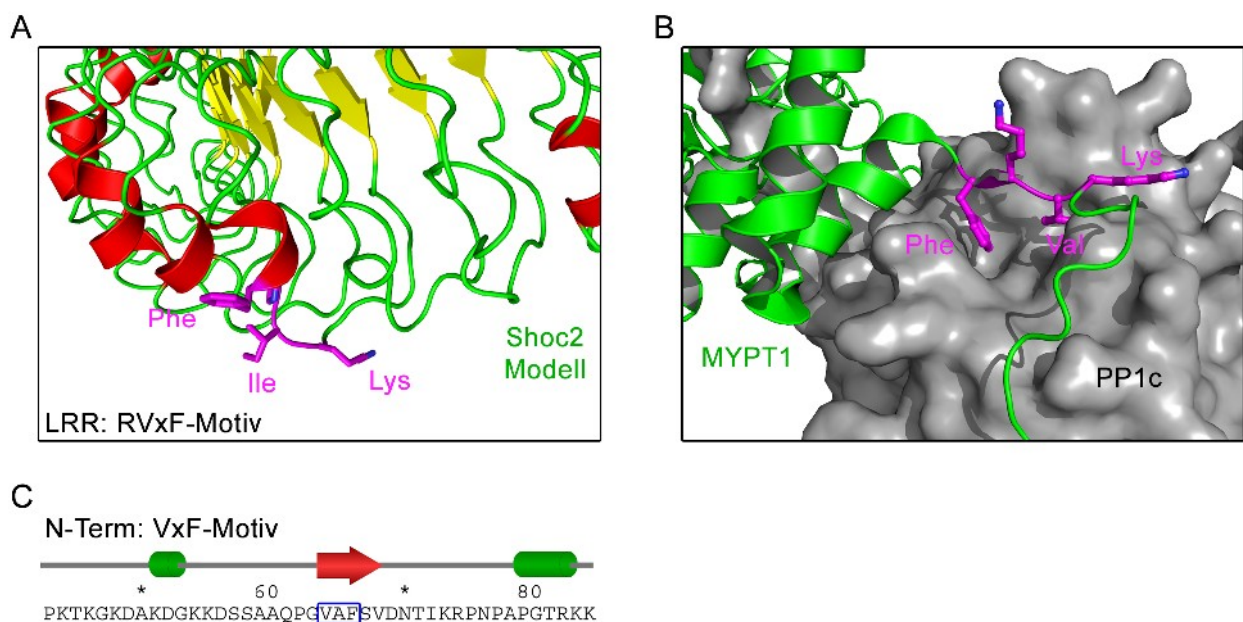
Basierend auf unterschiedlichen Eigenschaften mögliche M-Ras (gelb) Bindungsstellen an Shoc2 (Modell). **A:** Bindung an die konkave Seite ermöglicht eine sehr große Interaktionsfläche; der Radius der LRRs ist ausreichend groß. **B:** Interaktion des negativ geladenen M-Ras (insbes. *switch I* und *II*) mit dem stark positiven Bereich des N-Terminus der LRRs. M-Ras wäre damit in der Nähe der N-terminalen Domäne. **C:** Bindung an die positiv geladene Fläche auf der konvexen Seite der LRRs in der Nähe des RVxF-Motivs (s.u.). **D:** Interaktion von RanGAP (LRR, Oberflächendarstellung) mit Ran (gelb) (1k5g). Die Oberfläche von Ran ist deutlich positiver geladen als die von M-Ras.

Ein Großteil der Interaktionen von LRR-Domänen mit anderen Proteinen verläuft über die konkave Seite<sup>(488)</sup>, von wenigen Ausnahmen wie Ran-RanGAP abgesehen<sup>(342)</sup>. Der Radius der LRRs des Shoc2-Modells würde die Bindung eines G Proteins auf der konkaven Seite zulassen (Abb. 74A).

Die starke negative Oberflächenladung von Shoc2 wirft die Frage auf, wie die vornehmlich ebenfalls negativ geladenen Interaktionspartner M-Ras, bei dem vor allem *switch I* und *switch II* saure Reste aufweisen<sup>(520)</sup> und die Phosphatasen, deren Oberfläche stark negativ geladen ist<sup>(487)</sup>, mit

Shoc2 interagieren würden. Nur der Bereich des N-Terminus (Abb. 74B) oder kleinere Flächen der konvexen Seite (Abb. 74C) zeigen positive geladene Flächen. Ein Vergleich mit der Struktur des LRR-Proteins RanGAP mit Ran zeigt eine Bindung über die „Seite“ von LRRs (Abb. 74D) und entspricht keinem der oben gewählten Schemata. Eine solche Anordnung wäre ebenfalls denkbar. Neben der Interaktion mit der LRR-Domäne bliebe eine Bindung an die N-terminale Domäne, deren Sekundärstruktur keiner bekannten Faltung entspricht.

### 4.6.3 Shoc2 als PP1-regulatorisches Protein



**Abbildung 75: Das RVxF-Motiv**

**A:** Das KIPF-Motiv im 11.LRR liegt auf der konvexen Seite in der vorhergesagten Helix. **B:** KVxF-Motiv von MYPT1 (grün) und die Bindung an PP1c (grau). **C:** Dem VxF-Motiv der N-terminalen Domäne von Shoc2 wird eine  $\beta$ -Faltblatt Struktur vorhergesagt.

Unklar bleibt, wie die Interaktion von PP1c mit Shoc2 erfolgen und welchen Einfluss M-Ras auf diese Interaktion haben kann. Die Bindung von Phosphatasen an ihre regulatorischen Interaktionspartner basiert auf wenigen Grundlagen, trotz der Heterogenität dieser Proteine<sup>(521)</sup>. Wie die Struktur von MYPT1 mit PP1c zeigt<sup>(487)</sup>, besteht die größte Interaktionsfläche zwischen dem variablen C-Terminus von PP1c (s. S. 108) und dem regulatorischen Protein, worüber sehr wahrscheinlich die Spezifität zwischen PP1c und dem Regulator definiert wird. Des Weiteren existiert ein essenzielles Sequenzmerkmal in nahezu allen Phosphatase-regulatorischen Proteinen, das sog. RVxF-Motiv<sup>(521)</sup>, dessen Konsensussequenz weitgefächert als (R/K)x(V/I)x(F/W) beschrieben werden kann, wobei das erste „x“ eine beliebige Anzahl oder keine Aminosäure darstellt<sup>(521)</sup>. Die Bindung dieses Motivs

an PP1c ist bei allen bekannten Strukturen gleich. Es befindet sich auf einem langgestreckten *Loop* des regulatorischen Proteins (Abb. 75B), wodurch es mit einem konservierten Bereich der Phosphatasen interagieren kann. Leider findet dieses Motiv keine Erwähnung in bisherigen Publikationen über Shoc2<sup>(135)</sup>.

Die Analyse von Shoc2 zeigt zwei mögliche Motive (Abb. 75A,C), die hierfür in Frage kämen:

- Im elften LRR befindet sich das KIPF-Motiv (Abb. 73C, 75A), welches (R/K)(V/I)xF entsprechen würde. Allerdings würde die kompakte Struktur von Shoc2 die typische Interaktion dieses Motivs mit PP1c schlecht zulassen, außer die vorhergesagte Helix würde zugunsten eines variableren *loops* restrukturiert; eventuell induziert durch die Bindung von PP1c. Zumindest befindet sich das Motiv auf einem der „äußersten“ LRRs und wäre erreichbar für PP1c.
- Demgegenüber bietet sich das zweite Motiv (VAF) an (Abb. 75C), welches sich in der N-terminalen Domäne in einem vorhergesagten  $\beta$ -Strang befindet und so an der beschriebenen Interaktion teilnehmen könnte. In der Tat gehen VAF mehrere basische Reste voraus, die sehr gut dem erwarteten Motiv entsprechen. Die Phosphatase-bindende Region wäre demnach die N-terminale Domäne.

Rodriguez-Viciano *et al.*<sup>(135)</sup> konnten *in vitro* einen Komplex aus Shoc2, PP1c und (in nicht-stöchiometrischer Menge) M-Ras nachweisen, während dies hier nicht gelang. Der Unterschied besteht darin, dass sie Shoc2 aus Säuger-Zellen isolierten, während hier rekombinant in *E. coli* hergestelltes Shoc2 verwendet wurde, welches offensichtlich andere Eigenschaften aufweist. Diese könnten Aggregation von Shoc2 durch eventuell unvollständige Faltung sein oder benötigte posttranslationale Modifikationen, die die Bindung an PP1c oder M-Ras induzieren würden.

#### 4.6.4 Ausblick

##### *Aufreinigung*

Das rekombinante *E. coli*-Protein besitzt offenbar nicht die gewünschten Eigenschaften, so dass Shoc2 entweder rekombinant in *SF9*-Zellen oder direkt in Säugerzellen exprimiert und gereinigt werden sollte. Auch die bicistronische Coexpression mit der alpha-Isoform von PP1c wurde noch nicht getestet.

Zusätzlich könnte Sur-8, das zu Shoc2 homologe Protein aus *C. elegans* rekombinant getestet werden, da es in anderen Studien<sup>(355;480)</sup> bereits erfolgreich *in vitro* als H-/K-/N-Ras-Effektor eingesetzt wurde.



### ***Einfluss der verschiedenen Domänen***

Die genauere Eingrenzung der Effektorregion von Shoc2 ist von zentraler Bedeutung für das Verständnis des Proteins. Demzufolge könnte die N-terminale Domäne separat exprimiert und insbesondere auf die Bindung an PP1c oder auch an Ras-Proteinen untersucht werden, in der Hoffnung, dass dieses Konstrukt eine bessere Löslichkeit zeigt als die LRRs. Auch die LRR-Domäne könnte separat exprimiert und gereinigt werden.

### ***Expression als Fusionsprotein***

Humane LRR-Proteine zeigen häufig eine schlechte Löslichkeit, wenn sie rekombinant exprimiert werden. Mehrere Publikationen zeigten die erfolgreiche Isolierung von LRRs durch Fusion mit löslichen LRR-Proteinen<sup>(522)</sup>. Durch die sog. *Hybrid-LRR*-Technik konnte durch Fusion des 60-AS langen *Variable Lymphocyte Receptor* (aus *Schleimaal*) mit dem *Toll-like-Receptor* (TLR) dessen LRR-Struktur gelöst werden, da die Löslichkeit ausreichend erhöht wurde.

Dies wäre ein vielversprechender Ansatz für die Strukturlösung der LRRs von Shoc2.

## **4.7 Kurze methodische Diskussion**

Eine häufig angewandte Methode, um Wechselwirkungen zwischen Makromolekülen zu bestimmen beruht auf der Fluoreszenz-Polarisation (siehe 6.4.3). Trotz zahlreicher erfolgreicher Anwendungen ergaben sich in dieser Arbeit Schwierigkeiten in der Datenauswertung. Einerseits blieben viele Experimente ergebnislos und zeigten keine Polarisationsänderungen (s. S. 82, S. Ismail, A. Kravchenko und andere) andererseits zeigte die Zugabe des gleichen Interaktionspartners (RapL) zu unterschiedlichen Integrinfragmenten ähnliche Bindungsaffinität jedoch sehr unterschiedliche Polarisationsänderungen, obwohl Fluorophor gleich und Masse des Fluorophors ähnlich waren (s. S. 118). Es ergeben sich also Einschränkungen in der Verwendung dieser Methode.

Die physikalische Grundlage der Polarisationsmessungen liegt in der Additivität von Polarisationsänderungen, so dass die Polarisation von in Lösung befindlichem freiem Fluorophor und (Protein-)gebundenem Fluorophor summiert werden kann. Die Einzel-Fluoreszenz ergibt sich aus der Perrin-Formel von 1926<sup>(523)</sup>:

$$P = P_0 \frac{1}{1 + \left(1 - \frac{1}{3} P_0\right) \frac{RT}{V \eta} \tau}$$

R: universelle Gaskonstante

T: Temperatur

$P_0$ : maximale Polarisierung (ohne Rotation)

V: molares Volumen

$\tau$ : Lebensdauer des angeregten Fluorophors

$\eta$ : Lösungsviskosität

Anhand dieser Gleichung sind einige im System liegende Einschränkungen zu nennen (siehe auch Jameson et al.<sup>(524)</sup>), die Anwendung auf die Experimente der hier vorliegenden Arbeit finden:

- Die Lebensdauer des angeregten Fluorophors verändert die Polarisierung. Ändert sich also die Fluoreszenz (genauer: die Quantenausbeute) durch die Bindung eines Proteins an den Fluorophor, dann ist die Polarisationsänderung nicht mehr additiv. Dies wurde für die in dieser Arbeit untersuchten Systeme überprüft. Direkte Fluoreszenzänderungen ergaben sich nicht.
- Die Polarisationsänderung ist nur annäherungsweise abhängig von der Massenänderung, da das molare Volumen und nicht die Masse die Polarisationsänderung bestimmt. Nur unter der Voraussetzung, dass der (Protein-gebundene) Fluorophor möglichst einer idealen Kugel entspricht kann über die Stokes-Einstein Formel die Masse einbezogen werden. Dies ist ein weiterer Nachteil für die Messung von Protein-Interaktionen, die nur selten zu einer kugelförmigen Änderung des molaren Volumens des Fluorophors führen.
- Die Lösungsviskosität nimmt entscheidenden Anteil an der Polarisationsänderung, so dass durch hohe Proteinkonzentrationen oder Änderungen des Messpuffers durch Zugabe des Proteinpuffers eine Änderung der Polarisierung und mitunter eine Abweichung von der Sättigungsfunktion zu erwarten ist.

Ein Hauptaugenmerk sollte auf die Löslichkeit der Proteine gerichtet werden<sup>(525)</sup>. Eine schlechte Löslichkeit – vor allem präzipitiertes Protein – können die Polarisierung beträchtlich verringern und eventuell zu negativen Ergebnissen führen; Ursache hierfür sind Streueffekte (Rayleigh-Streuung). Bsp. ändert die Zugabe von 0.7% Glycogen die „Trübheit“ (*turbidity*) einer Lösung von Dansyl-markiertem BSA soweit, dass sich die Polarisierung um 20% von 0.3 auf 0.25 verringert<sup>(526)</sup>. Negative Ergebnisse mit schlecht löslichen Proteinkonstrukten liegen somit im Rahmen des Möglichen und könnten auch die Ergebnisse hier, aufgrund der schlechten Löslichkeit einiger der verwendeten Proteine, beeinflusst haben.

Auch die Art der Markierung, bzw. die Flexibilität des Fluorophors vor und nach Interaktion mit



Makromolekülen bestimmt den Polarisationsanstieg. Hoch flexible Bereiche ergeben geringere Polarisationsänderungen, da sie „entkoppelt“ von der Volumen- bzw. Massenänderung vorliegen<sup>(524)</sup>. Dies könnte bsp. bei den Integrin-RapL-Messungen der Fall sein, bei denen RapL an die flexible Struktur eines Peptids band, dessen Fluorophor sich am C-Terminus befand.

## 5 Zusammenfassung

Ein Glutamat (E62 in Ras), C-terminal des Walker B-Motivs, ist in nahezu allen G Proteinen der Ras-Superfamilie hoch konserviert. Die hier erhaltenen Ergebnisse bestätigten die essenzielle katalytische Funktion dieses Restes für die Nukleotid-Austausch Funktion von GEF-Proteinen. Durch die negative Ladung des Restes wird die Affinität zum Nukleotid verringert und das Gleichgewicht des trimeren G Protein\*Nt-GEF Komplexes zum Dimer verschoben, stabilisiert durch eine Interaktion des Glutamats mit dem *P-loop* Lysin. Die Rab-Proteine bilden eine Ausnahme dieser Regel, da sie das konservierte Glutamat nicht für die GEF-Katalyse sondern für die Bindung eines GDIs einsetzen.

Ein weiterer Aspekt dieser Arbeit war die funktionelle Aufklärung der Ras-Protein-bindenden RA-Domänen. Die RA-Domäne von RapL besitzt eine rein rekrutierende Funktion, so dass RapL ausschließlich als Adapterprotein fungiert. Die hier erstmals nachgewiesene, schwach-affine Bindung von RapL an Integrine ist nicht durch die Interaktion mit Rap-Proteinen reguliert, erlaubt aber die Bildung eines trimeren Komplexes aus Rap, RapL und Integrin. RapL könnte demgemäß die Rekrutierung von Rap an den Ort der Integrin-Aktivierung bei anschließender Übertragung an andere Rap-Effektoren übernehmen. Als weitere Funktion wäre die Bindung zusätzlicher Proteine wie Mikrotubuli und deren Lokalisation an Integrine und *Focal Adhesions* denkbar.

Bei den Arap-Proteinen übernimmt die RA-Domäne keine regulatorische Funktion. Vielmehr wurde eine *in vitro* Interaktion dieser Domäne mit Ras-Proteinen ausgeschlossen. Allerdings lassen Konstrukt-bedingte Unterschiede in der RhoGAP-Aktivität von Arap1 und Arap3 einen Einfluss der C-terminalen PH5-Domäne auf die GAP-Aktivität vermuten. Für Arap1 äußerte sich dies in einer höheren Affinität und einer geringeren Aktivität im Vergleich zu kürzen Konstrukten. Ein regulatorischer Interaktionspartner der PH-Domäne konnte nicht identifiziert werden. Somit kann postuliert werden, dass die RA-Domäne von Arap1 oder Arap3 entweder an andere, nicht identifizierte Proteine bindet oder ausschließlich strukturell für die Proteinintegrität benötigt wird.

Die hier erfolgte Analyse mehrerer RA-Domänen, gemeinsam mit publizierten Ergebnissen über andere RA-/RB-Domänen-Effektoren lässt den Schluss zu, dass diese Proteinfamilie eine strukturelle und nahezu ausschließlich rekrutierende Funktion übernimmt, mit Ausnahme von ARHGAP20 und der PI3-Kinase. Dies ist analog zu Rab- und Arf-Effektoren und steht im Gegensatz zu den regulatorisch aktiven Rho-Effektoren. Die außerordentlich häufig vorkommende Ubiquitin-Faltung (Ubiquitin, SUMO, RADs/RBDs) hat sich demnach evolutionär auch in RAD/RBD-Proteinen als reines Protein-Interaktions-Modul etabliert.

## 6 Material und Methoden

### 6.1 Material

#### 6.1.1 Bakterienstämme

Tabelle 21: Verwendete Bakterienstämme

E.coli-Stamm	Genotyp	Referenz
TG1	supE, hsdD5, thi, D(lac-proAB), F' [traD36, proAB <sup>+</sup> , lacI <sup>q</sup> , lacZDM15]	(527)
DH5α	endA1, glnV44, thi-1, recA1, relA1, gyrA96, deoR, nupG, Φ80dlacZΔM15 Δ(lacZYAargF), U169, hsdR17(rK- mK+), λ-	(528)
Top10	F- mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 araD139 Δ(araleu) 7697 galU galK rpsL (StrR) endA1 nupG	<i>Invitrogen</i>
BL21 (DE 3)	ompT, hsd <sub>S</sub> (r <sub>B</sub> <sup>-</sup> , m <sub>B</sub> <sup>-</sup> ), gal(lcIts857, ind1, Sam7, nin5, lacUV5-T7gene1), dcm (DE3)	(529)
Rosetta (DE 3)	ompT, hsd <sub>S<sub>B</sub></sub> (r <sub>B</sub> <sup>-</sup> , m <sub>B</sub> <sup>-</sup> ), gal(lcIts857, ind1, Sam7, nin5, lacUV5-T7gene1), dcm (DE3), pRARE <sup>2</sup> (CamR)	<i>Novagen</i>
BL21 (DE 3) Codon+ RIL	ompT, hsd <sub>S<sub>B</sub></sub> (r <sub>B</sub> <sup>-</sup> , m <sub>B</sub> <sup>-</sup> ), gal (lcIts857, ind1, Sam7, nin5, lacUV5-T7gene1), dcm (DE3), Tet <sup>r</sup> , endA, HTE (argU, ileY, leuW, CamR)	(530)
CK600K	supE, hsdM <sup>+</sup> , hsdR <sup>-</sup> , KanR	<i>Stratagene</i>
BL21 (DE 3) pLys	F <sup>-</sup> ompT hsd <sub>S<sub>B</sub></sub> (r <sub>B</sub> <sup>-</sup> m <sub>B</sub> <sup>-</sup> ) gal dcm (DE3) pLysS (Cam <sup>R</sup> )	<i>Novagen</i>

#### 6.1.2 Nährmedien und Antibiotika

*Lysogeny broth* (LB) Voll-Medium:

- 10 g/l Bacto-Tryptone
- 10 g/l NaCl
- 5 g/l Hefe-Extrakt

LB-Platten-Agar:

- 10 g/l Bacto-Tryptone
- 10 g/l NaCl
- 5 g/l Hefe-Extrakt
- 16 g/l Bacto-Agar
- Antibiotika-Zusatz

*Terrific Broth* (TB) Voll-Medium:

- 12 g/l Bacto-Tryptone
- 24 g/l Hefe-Extrakt
- 0,4% (v/v) Glycerin
- 2,31 g/l KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>
- 12,54 g/l K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

Antibiotika-Zusätze:	Ampicillin:	100 µg/ml
	Chloramphenicol:	25 µg/ml
	Kanamycin:	25 µg/ml
	Streptomycin:	20 µg/ml
	Spectinomycin:	50 mg/ml

### 6.1.3 Plasmide und Oligonukleotide

#### **Plasmide:**

pGex 4T1-TEV:	Amersham Pharmacia (Freiburg), modifiziert mit TEV-Protease
pGex 4T1-TEV_GW:	Amersham Pharmacia (Freiburg), modifiziert mit TEV-Protease und AttR-sites für Gateway®-Klonierung
pGex 4T3:	Amersham Pharmacia (Freiburg)
pGex 2T:	Amersham Pharmacia (Freiburg)
pET20 2xHis <i>EcoRI</i> in Frame:	EMD Biosciences, modifiziert mit N- und C-terminalem 6x His-Tag und <i>EcoRI</i> -Schnittstelle im <i>reading frame</i> .
PfastBac HT-B:	Invitrogen
pFastBac_GW:	Invitrogen, modifiziert mit AttB-sites für Gateway®-Klonierung
pFastBac <i>dual</i> :	Invitrogen
pCR®8/GW/TOPO:	Invitrogen

#### **Oligonukleotide zur Sequenzierung:**

Alle Oligodesoxyribonukleotide wurden von den Firmen MWG Biotech, Sigma oder Metabion bezogen.

**Tabelle 22: Oligonukleotide zur Sequenzierung**

5'-pGex	kodierend	sense
5' - GGG CTG GCA AGC CAC GTT TGG - 3'		
3'-pGex	nicht kodierend	antisense
5' - CGG GGA GCT GCA TGT GTC AGA GG - 3'		
5' pET	kodierend	sense
5' - AGA TCT CGA TCC CGC GAA ATT AAT ACG - 3'		
3' pET	nicht kodierend	antisense
3' - CAA AAA ACC CCT CAA GAC CCG TTT AG - 5'		
5' pFastBac	kodierend	sense
5' - AAA TGA TAA CCA TCT CGC - 3'		
3' pFastBac	nicht kodierend	antisense
3' - GTG GTT TGT CCA AAC TCA TC - 5'		

## Material und Methoden

---

pCR <sup>®</sup> 8/GW/TOPO	kodierend	sense
5' - CCA CGT TGT TTA ACT ACT CGT TAC G- 3'		
pCR <sup>®</sup> 8/GW/TOPO	nicht kodierend	antisense
3' - GTT GCA ACA AAT TGA TGA GCA ATT A- 5'		

---

### 6.1.4 Chemikalien

#### *Nukleotide:*

GDP:	Sigma (Deisenhofen)
GTP:	Sigma (Deisenhofen)
GppCH <sub>2</sub> p:	Sigma (Deisenhofen)
GppNHp:	Sigma (Deisenhofen)
mant-GDP:	Biolog (Bremen)
mant-GppNHp:	Biolog (Bremen)
mant-GTP:	Biolog (Bremen)
ATP:	Sigma (Deisenhofen)
tamra-GTP:	Biolog (Bremen)
	eigene Herstellung (Dr. Alexander Eberth)

#### *Proteinstandards:*

SDS-7	66 / 45 / 36 / 29 / 24 / 20 / 14,2 kDa Sigma (Deisenhofen)
SDS-6H	205/ 116/ 97,4/ 66/ 45/ 29 kDa Sigma (Deisenhofen)
<i>Low Range Marker</i>	26.6 / 17 / 14,2 / 6,5 / 3,5 / 1,1 Sigma (Deisenhofen)
<i>Prestained marker</i>	250 / 130 / 95 / <u>72</u> / 55 / 36 / <u>28</u> / 17 / 11 Fermentas (St. Leon-Rot)

#### *Nukleinsäurestandard:*

Lambda Bst EII	8453 - 113 bp MBBL (Bielefeld)
----------------	-----------------------------------

#### *Chemikalien:*

Agarose	Life Technologies (Karlsruhe)
Dimethylsulfoxid (DMSO):	Serva (Heidelberg)
β-Mercaptoethanol:	Serva (Heidelberg)
Ethidiumbromid:	Serva (Heidelberg)
Glutathion:	Merck (Darmstadt)
Isopropyl-2-D-thiogalactosid (IPTG):	Gerbu Biotechnik (Gaiberg)
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF):	Serva (Heidelberg)
Super Signal West Pico	

Stable Peroxide Solution:	Pierce (Rockford, USA)
Super Signal West	
Pico Luminol/ Enhancer Solution:	Pierce (Rockford, USA)
Aprotinin (10x: 1 mg/ml):	Carl Roth (Karlsruhe)
Pefablock (10x: 1 mg/ml):	Serva (Heidelberg)
Pepstatin A (10x: 1 mg/ml):	Serva (Heidelberg)
Leupeptin (10x: 1 mg/ml):	Carl Roth (Karlsruhe)
NP-40	Serva (Heidelberg)
Triton X-100	Serva (Heidelberg)

Alle weiteren verwendeten Chemikalien wurden von den Firmen Aldrich, Fluka, Gerbu, ICN, Life Technologies, Merck, Riedel de Haen, Roth, Serva und Sigma bezogen.

### ***FPLC-Säulenmaterial:***

GSH-Sepharose <i>fast flow</i> :	Amersham Pharmacia (Freiburg)
Q-Sepharose	GE Healthcare (Freiburg)
DEAE-Sepharose	GE Healthcare (Freiburg)
Hi-Load Superdex G75:	Amersham Pharmacia (Freiburg)
Hi-Load Superdex G200:	Amersham Pharmacia (Freiburg)
Nickel-Sepharose	GE Healthcare (Freiburg)
Glutathion-Sepharose 4B (GSH-beads)	Amersham Pharmacia (Freiburg)

### **6.1.5 Proteine und Enzyme**

Pfu-Polymerase ( <i>Pyrococcus furiosus</i> )	Stratagene (Heidelberg)
Pwo-Polymerase ( <i>Pyrococcus woesei</i> )	Roche Diagnostics (Mannheim)
Q-Taq-Polymerase ( <i>Thermus aquaticus</i> )	Qiagen (Hilden)
HiFidelity-Polymerase (Mix aus Taq und "Neuem Proofreading Protein")	Roche Diagnostics (Mannheim)
Phusion-Polymerasen (modifizierte Pfu)	New England Biolabs (Beverly, MA)
BSA:	Sigma (Deisenhofen)
Restriktionsendonukleasen:	New England Biolabs (Beverly, MA)
T4-DNA-Ligase:	New England Biolabs (Beverly, MA)
Deoxyribonuklease I (Bovine Pancreas):	AppliChem (Darmstadt)
<i>LR Clonase II Enzyme Mix</i>	Invitrogen (Karlsruhe)
Proteinase K	Invitrogen (Karlsruhe)
Lysozym (Chicken egg white):	Sigma (Deisenhofen)
Thrombin:	Serva (Heidelberg)
Alkalische Phosphatase: ( <i>Calve Intestine</i> )	Roche Diagnostics (Mannheim)
Sepharose-gekoppelte Alkalische Phosphatase: ( <i>Calve Intestine</i> )	Sigma (Deisenhofen)
Phosphodiesterase I (2 U/ml): ( <i>Crotalus adamanteus</i> )	Sigma (Deisenhofen)
Rap1GAP	MPI Dortmund (Dr. Begona Sot)
TEV-Protease:	MPI Dortmund (Caro Koerner)
MDCC-gekoppeltes PBP	MPI Dortmund (Dr. Mandy Miertzschke)

### 6.1.6 Verwendete Antikörper

Sheep Anti-mouse AK	GE Healthcare (München)
Donkey Anti-rabbit AK	GE Healthcare (München)
Mouse Anti-GST AK	GE Healthcare (München)
Rabbit Anti-His AK	GE Healthcare (München)

### 6.1.7 Kit-Systeme

QIAprep Spin Miniprep Kit:	Qiagen (Hilden)
QIAGEN Plasmid Midi Kit:	Qiagen (Hilden)
QIAprep Spin Gel Extraction Kit:	Qiagen (Hilden)
QIAprep Spin PCR Purification Kit:	Qiagen (Hilden)
pCR8/GW/TOPO <sup>®</sup> TA Cloning Kit	Invitrogen (Karlsruhe)
PipStrip <sup>®</sup> -Membran	Echelon Biosciences (Salt Lake City, USA)

### 6.1.8 Puffer und Lösungen

Genauere Angaben zu den verwendeten Puffern während der Aufreinigung von Proteinen finden sich im Anhang.

#### *Verwendete Standard-Puffer:*

Standardpuffer:	50	mM	Tris pH 7,5	
	50	mM	NaCl	
	5	mM	MgCl <sub>2</sub>	
	5	mM	βME	
AlF <sub>x</sub> (16,67 mM)	0.1	g	AlCl <sub>3</sub>	
	3,15	g	NaF	(entspricht 50-fach
	ad 45	ml	H <sub>2</sub> O	molarem Überschuss)
PBS-Puffer, pH 7,4:	2,7	mM	KCl	
	10	mM	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	
	1,8	mM	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	
	140	mM	NaCl	
Austauschpuffer (10x):	2	M	Ammoniumsulfat	
	0,1	mM	ZnCl <sub>2</sub>	
			pH 7,0	
HPLC-Laufpuffer:	100	mM	Kaliumphosphat	
	10	mM	Tetrabutylammoniumbromid (TBA-Br)	
	7,5	%	Acetonitril (Standard) bzw.	
	25	%	Acetonitril (mant-Nukleotide)	
SDS-Glycin-Sammelgel-Puffer:	500	mM	Tris/H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> pH 6,8	
	4	%	SDS	



SDS-Glycin-Trenngel-Puffer:	1,5	M	Tris/H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> pH 8,8
SDS-Glycin-Laufpuffer:	25	mM	Tris/HCl
	192	mM	Glycin
	2	%	SDS
SDS-Tricin-Gel-Puffer:	3	M	Tris/HCl pH 8,45
	0,3	%	SDS
SDS-Tricin-Anoden-Puffer:	0,2	M	Tris/HCl pH 8,9
SDS-Tricin-Kathoden-Puffer:	0,1	M	Tris
	0,1	M	Tricin
	0,1	%	SDS
Western-Blot Anoden-Puffer:	300	mM	Tris/HCl pH 8,7-8,8
	100	mM	Tricine
Western-Blot Kathoden-Puffer:	300	mM	Capronsäure
	30	mM	Tris pH 8,7
5x SDS-Probenpuffer (nach Laemmli):	50	mM	Tris/HCl pH 6,8
	50	%	Glycerol
	10	mM	DTE
	10	%	SDS
	0,1	%	Bromphenolblau
Färbelösung für SDS-Gele:	50	mM	Tris/HCl pH 6,8
	50	%	Glycerol
	10	mM	DTE
	10	%	SDS
	0,1	%	Bromphenolblau
dNTP-Lösung:	10	mM	dGTP
	10	mM	dCTP
	10	mM	dATP
	10	mM	dTTP
Terminator-Mix:	1,58	μM	A-DyeDesoxy
	47,37	μM	C-DyeDesoxy
	0,42	μM	G-DyeDesoxy
	94,74	μM	T-DyeDesoxy
	5,79	μM	dATP
	15,79	μM	dCTP
	15,79	μM	dTTP
	78,95	μM	dGTP

	168,42 mM	Tris/HCl
	4,21 mM	Ammoniumsulfat
	42,1 mM	Magnesiumchlorid
	0,42 U/ $\mu$ l	AmpliTaQFS-DNA-Polymerase, pH 9,0
6 x DNA- Probenpuffer:	0,25 %	Bromphenolblau
	0,25 %	Xylencyanol
	30 %	Glycerol in TAE-Puffer
TAE-Puffer:	40 mM	Tris/Acetat pH 8,5
	1 mM	EDTA

### 6.1.9 Verwendete Materialien und Geräte

PD10-Säulen:	Säulen Amersham Pharmacia (Freiburg)
Amicon Ultra 5k / 10k / 30k:	Millipore (Bedford, USA)
Millipore Ultrafree Biomax 5k / 10k / 30k / 50k:	Millipore (Bedford, USA)
DNA-Sequenzierer:	ABIMED (Langenfeld)
T3000 Termocycler:	Biometra (Göttingen)
Fluoromax 1 Spektralfluorimeter:	Horiba Jobin Yvon (München)
Fluoromax 2 Spektralfluorimeter:	Horiba Jobin Yvon (München)
Fluoromax 4 Spektralfluorimeter:	Horiba Jobin Yvon (München)
FPLC (Äkta Prime):	Amersham Pharmacia (Freiburg)
HPLC C-R6A-Chromatopac Integrator:	Shimadzu (Duisburg)
HPLC System Gold 166:	Beckman (München)
HPLC C18 Ultrasphere-Säule:	Beckman (München)
HPLC C18 Nucleosil-100 Vorsäule:	Bischoff (Leonberg)
Isothermes Titrations Kalorimeter:	MicroCal VP-ITC
Massenspektrometer:	Voyager DE Pro (Applied Biosystems)
Fotometer BioPhotometer:	Eppendorf (Hamburg)
Fotometer Ultrospec 1000 UV/visible:	Amersham Pharmacia (Freiburg)
Stopped-Flow-Gerät SX.18 MV:	Applied Photophysics (Leathehead, UK)
Thermomixer 5436:	Eppendorf (Hamburg)
FastBlot B43 ( <i>semi-dry</i> ):	Biometra (Göttingen)
Zellkulturplatten/24 well-Platten Linbro:	Flow Laboratories (USA)
Crystal Quick 96 well – Platten:	Greiner bio-one Corning pZero (3550, 3553)
Cryoanlage:	Oxford Cryosystems (Oxford, U.K.)
Röntgenanode:	Rotierende CuK $\alpha$ -Röntgenanode ( $\lambda = 1,54179 \text{ \AA}$ ) Bruker (Karlsruhe)
Röntgendetektor:	MAR 345 mar research (Hamburg)
Kristallisationsroboter:	Mosquito, TTP Labtech (UK)
RockImager 1000: 4°C)	Formulatrix RockImager, RockMaker (20°C, Waltham, USA)

### 6.1.10 Kristallografische Screens

#### *Hampton Research*

Index	MPD
PEG/Ion	AmmSO4
Grid	Additive Screen
Clear Strategy Screen (CSS)	

#### *Nextal/Qiagen (Hilden)*

Classics I	PEG I
Classics II	PEG II
Classics Light	ProteinComplex
JCSG+	Anions
JCSG Core I	Cations
JCSG Core II	MbClass I
JCSG Core III	MbClass II
JCSG Core IV	pHClear I
PACT	Cryos
AmmSO4	MPD

## 6.2 Molekularbiologische Methoden

### 6.2.1 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion (PCR, *polymerase chain reaction*)<sup>(531)</sup> ist ein *in vitro* Verfahren zur Vervielfältigung von DNA-Sequenzen, deren Anfangs- und End-Sequenzen bekannt sind. Die Religations-Temperatur wurde jeweils mit Hilfe der Wallace-Formel<sup>(532)</sup> empirisch abgeschätzt.

#### *Präparative PCR*

Für die Amplifikation eines DNA-Fragments aus genomischer DNA wurden je nach Erfolg der PCR verschiedene DNA-Polymerasen verwendet.

Der Reaktionsansatz besteht aus:

	<b>Q-Taq</b>	<b>Pfu</b>	<b>Pwo</b>
DNA-Matrize	3 µl	3 µl	3 µl
dNTPs	5 µl	5 µl	5 µl
Primer sense	50 pmol	50 pmol	50 pmol
Primer asense	50 pmol	50 pmol	50 pmol
Polymerase-Puffer (10x)	5 µl	5 µl	5 µl
Q-Lösung (5x)	10 µl	-	-

## Material und Methoden

---

DMSO	-	5 µl	-
Wasser	ad 49,5 µl	ad 49,5 µl	ad 49,5 µl
Q-Taq-Polymerase	0,5 µl	-	-
Pfu-Polymerase	-	0,5 µl	-
Pwo-Polymerase	-	-	0,5 µl

---

Die PCR erfolgte nach folgendem Protokoll:

---

Denaturierung	5 min	94 °C	
Denaturierung	1 min	92 °C	
Hybridisierung	1 min	Primer-spezifisch	25 Zyklen
Elongation	1 min / kb	72 °C	
Elongation	10 min	72 °C	

---

### *Analytische PCR zur Detektion positiver Klone*

Zur Detektion positiver Klone wurde wenig Zellmaterial von Agaroseplatten dem oben beschriebenen PCR-Ansatz (Verwendung nur einer Polymerase) zugegeben und das PCR-Programm durchgeführt.

### **DNA-Sequenzierung**

Zur DNA-Sequenzierung wurde die Methode nach Sanger *et al.*<sup>(533)</sup> verwendet. Die fluoreszenzmarkierten Didesoxynukleotide sind im verwendeten „ABI PRISM Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit“ der Firma Perkin Elmer im Verhältnis 1 : 200 zu Desoxyribonukleotiden enthalten („Terminator-Mix“).

Für den Sequenzierungsansatz wurden folgende Chemikalien gemischt:

---

Plasmid-DNA	1 µg
Terminator-Mix	4 µl
Spezifischer Sequenzierprimer	10 pmol
H <sub>2</sub> O	ad 15 µl

---

Folgendes Programm wurde verwendet:

---

Denaturierung	2 min	96 °C	
Denaturierung	30 s	92 °C	
Hybridisierung	20 s	50 °C	25 Zyklen

---

Elongation	4 min	60 °C
Elongation	10 min	72 °C

Der Ansatz wurde durch Ethanolfällung (inkl. EDTA und Natriumacetat) präzipitiert, anschließend mit 70% (v/v) Ethanol gewaschen, getrocknet und durch die *Zentrale Einheit Synthese und Sequenzierung des MPI für molekulare Physiologie, Dortmund* mit Hilfe eines Perkin-Elmer ABI-Sequencers 373A (Überlingen).

### **Mutagenese PCR: Quikchange**

Die Mutagenese einzelner Aminosäuren durch den Austausch der entsprechenden Basen wurde in der Regel über das *Quikchange*-Protokoll der Firma *Qiagen* durchgeführt. Hierzu wurde folgender Ansatz verwendet:

	<b>Ansatz 1</b>	<b>Ansatz 2</b>	<b>Ansatz 3</b>
Plasmid-DNA	50 ng	50 ng	50 ng
Polymerase-Puffer	1x	1x	1x
dNTPs	200 µM	200 µM	200 µM
Primer antisense	10 pmol	-	10 pmol
Primer sense	-	10 pmol	10 pmol
Polymerase	0.5 µl	0.5 µl	0.5 µl
H <sub>2</sub> O	ad 15 µl	ad 15 µl	ad 15 µl

Die Polymerase wurde je nach Erfolg gewählt (*Pfu*, *Phusion*, *HiFi*).

Folgendes Programm wurde verwendet:

Denaturierung	7 min	98 °C	
Denaturierung	1 min	92 °C	
Hybridisierung	1 min	55 °C	30 Zyklen
Elongation	1 min / kb	65 °C	
Elongation	10 min	65 °C	

Der Ansatz wurde anschließend in TG1 oder DH5a transformiert und die Klone auf Mutation hin sequenziert (siehe unten).

## **6.2.2 Weitere molekularbiologische Methoden**

### ***DNA-Agarose-Gelelektrophorese***

Zur Auftrennung von DNA-Fragmenten nach ihrer Größe wurde eine horizontale Agarose-

Gelelektrophorese<sup>(534)</sup> durchgeführt.

Die Agarose wurde in einer Konzentration von 0.9% in TAE-Puffer mit 10% (w/v) Ethidiumbromid polymerisiert. Die Elektrophorese wurde horizontal bei ca. 10V/cm Gel in TAE-Puffer bis zur vollständigen Trennung der Fragmente durchgeführt und die DNA-Banden bei 320nm detektiert.

### ***DNA-Hydrolyse mit Restriktionsendonukleasen***

Die enzymatischen Spaltreaktionen mit kommerziell erwerblichen Restriktionsendonukleasen wurden entweder bei 37°C für 1-2 Stunden oder bei 37°C über Nacht in den von den Herstellern angegebenen idealen Puffern durchgeführt. Die erhaltenen Spaltprodukte wurden mittels Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und anhand ihrer Größe identifiziert.

### ***Ligation von DNA-Fragmenten in Vektoren***

Für die Ligation von DNA-Fragmenten in Vektoren wurde DNA-Ligase des T4-Phagen verwendet. Der Ligationsansatz bestand aus 20-200ng (i.d.R. 100ng) des linearisierten Vektors in einem möglichst geringen Volumen, wozu das restringierte Fragment in 3-10-fachem Überschuss (i.d.R. 3-fach) zugegeben wurde. Die Ligation erfolgte über Nacht bei 12°C/4°C.

War die Ligation nicht erfolgreich, wurde die Religation des Vektors durch vorhergehende Dephosphorylierung mittels Alkalischer Phosphatase (Shrimps) bei 37 °C verhindert.

### ***Transformation von E. coli***

Zur Transformation kompetenter *E. coli*-Zellen wurden diese auf Eis aufgetaut und anschließend 200 µl mit 30 µl Ligationsansatz bzw. 20 ng gereinigter Plasmid-DNA versetzt und 30 Minuten auf Eis gelagert. Die Transformation erfolgte durch einen 2-minütigen Hitzeschock bei 42°C. Nach Zugabe von 1 ml LB-Medium und Inkubation bei 37°C für 45 Minuten wurden die Zellen abzentrifugiert und in 200 µl LB-Medium resuspendiert. Dies wurde auf einer LB-Agar-Platte (mit den entsprechenden Antibiotika) ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

### ***Isolierung von Plasmid-DNA***

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* wurde mit den *Minipräp* und *Midipräp* Kit-Systemen der Firma *Qiagen* durchgeführt.

### ***Isolierung von DNA-Fragmenten***

Die gewünschten DNA-Fragmente wurden entsprechend ihrer Laufhöhe identifiziert und die Banden anschließend mit dem „QIAquick gel extraction kit“ der Firma *Qiagen* gemäß den Angaben des Herstellers. Die Elution der DNA erfolgte durch Zentrifugation nach Zugabe von 30 µl H<sub>2</sub>O.

### ***Klonierung über die Gateway®-Methode***

Hierzu wurde die LR Rekombination gewählt, nachdem über PCR das Gen mit *attR*-Stellen amplifiziert wurde. Hierbei wurde gemäß des *Invitrogen*-Protokolls verfahren. Das Gen wurde über eine Topoisomerase-Reaktion gemäß Protokoll in den pCR<sup>®</sup>8/GW/TOPO-Vektor inseriert und anschließend über *attL*-Rekombination in das Zielplasmid transferiert. Hierzu wurden i.d.R. 100ng Topo-Vektor mit 150 ng Zielvektor in einem Endvolumen von 8µl gemischt und die Reaktion durch Zugabe von 2µl LR Clonase II gestartet (1h, 25°C). Zugabe von Proteinase K für 10 min bei 37°C stoppte die Reaktion und der Ansatz wurde in DH5α oder Top10-Zellen transformiert.

## **6.3 Proteinchemische Methoden**

### **6.3.1 Expression rekombinanter Proteine**

#### ***Analytische Expression***

Zur Bestimmung der Löslichkeit verschiedener Konstrukte wurden Testexpressionen durchgeführt. Hierzu wurden zwei verschiedene Ansätze gewählt: Einerseits wurden die optimalen Expressionsbedingungen bestimmt, andererseits wurden unter gleich bleibenden Expressionsbedingungen verschiedene Puffer ausgewählt. Bei beiden Vorgehensweisen wurden je Bedingung 20 ml des Expressionsmediums (inklusive der entsprechenden Antibiotika) mit 200 µl einer Über-Nacht-Vorkultur beimpft und bei 37°C im Schüttler inkubiert. Die anschließenden Bedingungen variierten je nach Konstrukt und Löslichkeit. Allgemein wurden stets 3 verschiedene Temperaturen und verschiedene Expressionsdauern getestet. Bei Variation des Puffers wurden in der Regel verschiedene pH-Werte, unterschiedliche Salzkonzentration und der Einfluss von Glycerin oder Detergenzien wie NP-40 und Triton X-100 untersucht.

Der Aufschluss erfolgte mittels Ultraschall (*Microtip*, 3x 1min bei 40% Intensität). Das Gesamtlysate wurde für 20 Minuten bei 34000g zentrifugiert und 16 µl des Überstands mit 4 µl Lämmli-Puffer für die Analyse mittels SDS-PAGE abgenommen.

### ***Präparative Expression rekombinanter Proteine***

Die Expression im präparativen Maßstab erfolgte gemäß den –aus den analytischen Expressionen erhaltenen– optimalen Bedingungen. Die Zellen wurden anschließend 15 Minuten bei 6200g pelletiert und im jeweiligen Puffer resuspendiert. Die Suspension wurde bei -20 °C gelagert.

Genauere Angaben zu den Expressionsbedingungen finden sich im Anhang.

#### **6.3.2 Präparation der G Proteine (Ras und Rap)**

Dieses bereits etablierte Protokoll wurde zur Aufreinigung von Ras- und Rap-Konstrukten verwendet.

Das in Ras-Puffer (30mM Tris pH 7.5, 5mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM DTE) resuspendierte Bakterienpellet wurde aufgetaut, nach Zugabe einer Spatelspitze Lysozym und 200 µl DNase zunächst mindestens 30 Minuten auf Eis gerührt und anschließend mit Hilfe eines *Microfluidizers* (zwei Durchläufe) vollständig aufgeschlossen. Zur Abtrennung der Zellüberreste und der unlöslichen Bestandteile wurde die Suspension 30 min bei 105000g (JA 30.50 Rotor) zentrifugiert und das Pellet verworfen.

Der Überstand wurde mit 10 ml/min auf eine DEAE-Säule (Ras) bzw, auf Q-Sepharose-Säule (Rap) aufgetragen (Säulenvolumen: 600ml). Anschließend wurde ausreichend mit Ras-Puffer gewaschen und letztendlich durch einen NaCl-Gradienten von 0mM bis 500 mM über 2 L eluiert. Die Ras-/Rap-enthaltenden Fraktionen wurden vereinigt. Ras wurde anschließend mit 2,4M Ammoniumsulfat gefällt und nach Abzentrifugation wieder in Ras-Puffer gelöst. Rap-Proteine wurden in einer *Amicon*-Kammer (Volumen: 150ml) durch Druckfiltration aufkonzentriert.

Das erhaltene Protein wurde mittels Größenausschlusschromatografie (S75, 1L SV) weiter aufgereinigt und das erhaltene, reine Protein in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert. Für Rap1A war eine weiterer Aufreinigungsschritt über eine 30ml Q-Sepharose-Säule notwendig, um ausreichend reines Protein zu erhalten.

#### **6.3.3 Standard-Protokolle der Protein-Präparation**

Die eingefrorenen Bakterienzellen wurden aufgetaut, nach Zugabe einer Spatelspitze Lysozym und 200µl DNase für mindestens 30 Minuten auf Eis gerührt. In der Regel wurde eine Mischung aus verschiedenen Protease-Inhibitoren zugegeben um Proteinabbau zu verhindern. Anschließend wurden die Zellen mit Hilfe eines *Microfluidizers* (zwei Durchläufe) aufgeschlossen und 30 min bei 105000g (JA 30.50 Rotor) zentrifugiert.



### ***His-Proteine***

Proteine, die mit einem His-Tag kloniert wurden, wurden über eine, 30ml Säulenvolumen enthaltende, Nickel-Sepharose-Säule aufgereinigt. Der erste Waschschrift enthielt zusätzlich zum Protein-Puffer 20mM Imidazol, um niedrig-affin bindende Proteine zu eluieren. Anschließend wurde das gewünschte Protein mit einem Imidazol-Gradienten (0-500 mM) oder mit 500mM Imidazol eluiert, aufkonzentriert und der Größenausschlusschromatografie zugeführt.

Genauere Angaben zu den Konstrukten und den Pufferbedingungen können dem Anhang entnommen werden.

### ***GST-Proteine***

Die Mehrheit der in dieser Arbeit verwendeten Proteine wurden mit Hilfe des Glutathion-S-Transferase-*Tags* aufgereinigt. Die Aufreinigung erfolgte über Glutathion-Sepharose-Säulen unterschiedlicher Größe. Im ersten Waschschrift wurde mit dem Proteinpuffer ausreichend gewaschen. Der zweite Schritt beinhaltete einen Hochsalz-ATP-Puffer, entsprechend des vorher verwendeten Protein-Puffers, um möglicherweise gebundene Chaperone abzutrennen. Anschließend wurde wieder auf den Protein-Puffer äquilibriert um entweder das GST-Fusionsprotein mit 20mM GSH in Protein-Puffer zu eluieren oder auf der Säule mit TEV/Thrombin über Nacht das Protein von GST zu schneiden, welches dann mit Protein-Puffer eluiert wurde.

Wurden die Proteine als GST-Fusionsproteine eluiert, erfolgte nach der Elution die TEV/Thrombin-Spaltung des Fusionsproteins über Nacht.

Die weitere Aufreinigung erfolgte in der Regel über eine Größenausschlusschromatografie.

Zum Teil war es notwendig, die nicht auf der Säule gespaltenen Proteine nochmals über eine im Gelfiltrations-Puffer äquilibrierte GSH-Säule zu geben, um noch vorhandenes GST vollständig abzutrennen.

### ***Präparation Abbau-zeigender Proteine***

Nach diesem Protokoll wurden unter anderem verschiedene Konstrukte von Arap1 aufgereinigt, da sie verstärkten Abbau zeigten.

Die Aufreinigung erfolgte nach dem Protokoll für GST-Proteine. Allerdings wurde nach der Elution von der GSH-Säule ein weiterer Aufreinigungsschritt über einen Ionentauscher (Q-Sepharose, 50ml Säulenvolumen) durchgeführt. Dies ermöglicht den Vorteil einer schnellen Abtrennung eventuell vorhandener Proteasen, wobei ebenfalls bereits vorhandene Abbauprodukte zum Teil vom

erwünschten Protein getrennt werden konnten. Da in der Regel eine höhere Salzkonzentration für die Löslichkeit des Proteins essenziell war, wurde das Protein vor dem Auftragen auf den Ionenaustauscher stark mit Protein-Puffer verdünnt. Anschließend erfolgte die Größenausschlusschromatografie.

Genauere Angaben zur Aufreinigung einzelner Proteinkonstrukte sind im Anhang zu finden.

### 6.3.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Zur analytischen Auftrennung von Proteinen anhand ihrer Molmasse wurde eine denaturierende, diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)<sup>(535;536)</sup> verwendet.

Üblicherweise wurden Gele mit 12%-18% Acrylamid-Konzentration verwendet, bei 5%-igem Sammelgel. Zur Analyse unterschiedlicher Proteinproben wurden zwei verschiedene SDS-Gel-Systeme verwendet. Als Standard-Gel wurden Tricin-haltige Gele herangezogen, die entsprechend der Angaben unter 6.1.8 hergestellt wurden. Generell ermöglichen diese Gele eine sauberere Trennung der Proteinbanden. Die Elektrophorese wurde hierbei unter konstanter Spannung von 100 mV durchgeführt.

Bestimmte Proteine (z.B. Rho-Proteine) zeigen ein außerordentlich schlechtes Laufverhalten in Tricin-Gelen, weshalb hierfür Glycin-SDS-Gele verwendet wurden. Diese wurden auch verwendet, wenn anschließend ein Western-Blot durchgeführt werden sollte. Glycin-SDS-Gele wurden bei konstanter Stromstärke von 36mA eingesetzt.

Die Proben wurden stets in Detergenz (DTE,  $\beta$ -Mercaptoethanol)-haltigem Lämmli-Puffer aufgetragen. Die Gele wurden anschließend in Coomassie-Färbelösung für ca. 20 Minuten gefärbt und in Wasser über mehrere Stunden entfärbt.

### 6.3.5 Western-Blot

Für den Western-Blot von Gelen wurde das semi-trockene Verfahren gewählt. Hierzu wurden Glycin-SDS-Gele in der *semi-dry*-Apparatur für 15min bei 300mA auf Nitrocellulose-Papier übertragen. Dieses wurde mit Poinceau-Rot gefärbt und anschließend in PBS-Puffer wieder entfärbt. Die Zugabe der Antikörper erfolgte in PBS-Puffer inkl. 4% Milchpulver. Zwischen jedem Antikörper-Schritt wurde mindestens 3-mal mit PBS (inkl. 0.1% Triton-X 100) gewaschen.

Für einen His-Blot, wurden Anti-His Antikörper (*rabbit*) in einer Verdünnung von 1:500 eingesetzt. Der sekundäre Antikörper (*donkey* Anti-*rabbit*) wurde 1:2500 verwendet. Für die Detektion von GST wurde Anti-GST (*mouse*) 1:2000 eingesetzt, während der Anti-*mouse* Antikörper (*sheep*) in

einer Verdünnung von 1:1000 verwendet wurde.

Anschließend wurde die Chemolumineszenz-Reaktion mit der Peroxid-Lösung und der Pico-Luminol-Lösung von Super Signal West gestartet und auf Film übertragen. Als Marker wurden entweder SDS-7 oder der *Prestained marker* verwendet.

### **6.3.6 Bestimmung der Phosphoinositol-Spezifität (*PIP-Strip*)**

Für die Bestimmung der Spezifität von Proteinen für spezifische Phosphoinositol-Derivate eignet sich der kommerziell erhältliche *Pip-Strip*-Kit der Firma *Echelon Biosciences*. Als Reaktionspuffer wurde der für das Protein verwendete optimale Reinigungspuffer eingesetzt.

Hier wurden GST- und His-Fusionsproteine an die PIP-Derivate auf Nitrocellulose-Membran gemäß des Hersteller-Protokolls gebunden. Die verschiedenen Waschschrte erfolgten mit TBS-T-Puffer inkl. 3% BSA.

Die Detektion der gebundenen Proteine erfolgte durch Antikörper-Detektion gegen GST oder His-*Tag* (siehe Western-Blot).

### **6.3.7 Proteinkonzentrationsbestimmung**

#### ***Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford***

Bei dieser Methode erfolgt die Bestimmung der Gesamtproteinmenge durch eine Farbreaktion mit dem Farbstoff Coomassie Brilliant Blue G250<sup>(537)</sup>.

Durch die Interaktion mit den Seitenketten von Arginin, Histidin, Lysin, Tyrosin, Tryptophan und Phenylalanin kommt es zu einer bathochromen Verschiebung des Absorptionsmaximums von 465 nach 595 nm. Durch die Kalibrierung mit Rinder-Serum-Albumin (BSA)-Lösungen wurde die genaue Proteinkonzentration nach dem Lambert-Beer-Gesetz bei 595nm bestimmt.

#### ***Fotometrische Proteinkonzentrationsbestimmung bei 280 nm***

Eine weitere Möglichkeit der Konzentrationsbestimmung ist die Absorptionsmessung bei 280 nm. Hierbei wird das Protein in einer Lösung, die 6 M Guanidin-HCl und 20 mM Phosphatpuffer (pH 6.5) enthält, vollständig entfaltet und die Extinktion bei einer Wellenlänge von 280 nm gemessen. Der Extinktionskoeffizient wird theoretisch berechnet<sup>(538)</sup> und über das Lambert-Beer-Gesetz die Proteinkonzentration bestimmt.

### ***Proteinkonzentrationsbestimmung nach Ehresmann***

Die Bestimmung nach Ehresmann<sup>(539)</sup> ist eine empirische Methode, die sich nur zur Bestimmung sehr reiner Proteinlösungen eignet. Die Bestimmung beruht auf der Messung der Absorption der Carbonylbindungen des Proteinrückgrats nach folgender Formel:

$$A_{228,5} - A_{234,5} / 3,154 = c(\text{Protein}) [mg \cdot ml^{(-1)}]$$

### ***Proteinkonzentrationsbestimmung nach Ellmann***

Die Bestimmung der Proteinkonzentration mit Ellmanns Reagenz<sup>(540)</sup> legt die Modifikation exponierter Cysteine zugrunde. Diese werden in Thiol-freiem Puffer (Ascorbinsäure-Puffer) mit DTNB-Reagenz umgesetzt, wozu das Protein zunächst mit Hilfe von Ultrafiltration oder PD10-Säulen umgepuffert wurde. Hierbei entsteht 2-Nitro-5-thiobenzoat dessen Konzentration beim Absorptionsmaximum von 412nm bestimmt wurde (Extinktionskoeffizient: 14150 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>). Die Bestimmung der Proteinkonzentration wird entsprechend der Anzahl der Cystein-Reste pro Protein korrigiert.

### **6.3.8 Konzentrierung von Proteinen durch Ultrafiltration**

Die Ultrafiltration verwendet das Molekularsieb-Prinzip. Die Membran der Konzentratoren besitzt Poren einer genau festgelegten Größe, die Moleküle unterhalb der Ausschlussgröße durchlässt und größere zurückhält.

Zur Konzentrierung sehr großer Volumina wurden *Amicon*-Kammern (Druckfiltration) bis zu 150ml verwendet, während für mittlere Volumina *Amicon*-Konzentratoren der Firma *Millipore* und für Volumina unterhalb 2 ml *Ultrafree-0.5 Biomax*-Konzentratoren(*Millipore*) verwendet wurden. Die Porengröße der Membranen konnte zwischen 5, 10 und 30 kDa variiert werden. Die Zentrifugation erfolgte bei 2750g und 4 °C.

### **6.3.9 Analytische Ultrafiltration**

Die Methode der Ultrafiltration kann ebenfalls analytisch eingesetzt werden, um die Komplexbildung zweier Proteine zu detektieren. Hierzu wurden *Ultrafree-Biomax* Konzentratoren (*Millipore*) verwendet. Die Ausschlussgröße der Molmasse wurde so gewählt, dass der kleinere Interaktionspartner permeabel ist, während der größere im Überstand verbleibt. Je nach Erfolg wurde Glycerin im Puffer verwendet, um durch eine erhöhte Puffer-Hydrophobizität eine bessere Permeabilität der Proteine zu erreichen. Hierzu wurden i.d.R. 0.5 mg des größeren Proteins (z.B.

Sos) und ein 5-facher molarer Überschuss des kleineren Proteins (z.B. Ras\*GNP) eingesetzt. Als Reaktionspuffer wurde der für das Protein verwendete optimale Reinigungspuffer übernommen. Als Kontrolle diente stets ein Ansatz, der nur das kleinere Protein enthielt.

### **6.3.10 Fluoreszenzmarkierung von Proteinen mit Iaedans**

Für die Markierung eines Proteins mit einem Fluoreszenzfarbstoff wurde 5-[2-(2-Iodacetamido)ethylamino]-naphthalen-1-sulfonsäure (Iaedans) verwendet, welches über die Thiolgruppe an Cysteine gekoppelt wird.

Hierzu wurde das Protein durch Ultrafiltration oder Verwendung von PD10-Gelfiltrationssäulen in einen Ascorbat-haltigen Puffer (5mM) überführt, um vorhandene Thiole abzutrennen. Die Reaktion erfolgte über Nacht bei 4°C bei einem 10-fach molaren Überschuss von Iaedans (gelöst in DMSO). Der Überschuss des unreaktierten Edukts wurde durch Gelfiltration (S75 10/30) entfernt. Der Erfolg der Reaktion wurde durch ESI-MS-Messungen des Produkts, und durch den Vergleich der Proteinkonzentration mit der Iaedans-Konzentration bestimmt. Iaedans besitzt ein Absorptionsmaximum bei 336nm mit einem Extinktionskoeffizienten von  $5700 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$ .

### **6.3.11 Nukleotidaustausch und -Befreiung von G Proteinen**

G Proteine der Ras-Familie weisen in der Regel eine nahezu hundertprozentige Beladung mit Nukleotid auf. Je nach Protein handelt es sich hierbei verstärkt um GDP oder GTP. Die verwendete Methode des Nukleotidaustauschs wird dabei durch die Art des gewünschten Nukleotids bestimmt. Nicht-hydrolysierbare Nukleotid-Analoga, wie bsp. GppNHp, werden unter Zuhilfenahme der Alkalischen Phosphatase ausgetauscht. Hydrolysierbare Nukleotide, wie GDP oder GTP, müssen über die EDTA-Methode dem G Protein zugeführt werden.

#### ***Nukleotidaustausch mit Hilfe Alkalischer Phosphatase***

Der Austausch über die Verwendung von Alkalischer Phosphatase hat zum Vorteil, dass die Austauschreaktion vollständiger ist. Der Erfolg wird allerdings maßgeblich durch die Anwesenheit des sog. Austauschpuffers bestimmt, der  $\text{ZnCl}_2$  und  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  enthält. Dieser wird in einer Endkonzentration von 0,2 M Ammoniumsulfat und  $10 \mu\text{M}$   $\text{ZnCl}_2$  als 10x Puffer eingesetzt. Die Alkalische Phosphatase wurde in einer Konzentration von 0.5-10 U/mg Protein eingesetzt, je nach Erfolg der Reaktion.

### Austausch zu mant-GppNHp:

In der Regel wurden für den 0.5 bis 1 mg Protein verwendet. Das Nukleotide wurden in einem 1,5 bis 5-fachen molaren Überschuss eingesetzt. Die Reaktion erfolgte über Nacht bei 4°C und der Erfolg der Reaktion wurde anschließend mittels HPLC überprüft. War der Austausch nicht zu mindestens 95% erfolgreich wurden weiteres Nukleotid und Alkalische Phosphatase zugegeben.

### Austausch zu GppNHp:

Für Ras wurde ein Ansatz von 30mg Protein durchgeführt. Das Nukleotid wurde in einem 5-fachen molaren Überschuss zugegeben. Die Reaktion erfolgte bei 4°C über Nacht. Alle anderen Proteine wurden in einem Ansatz von 5mg eingesetzt, bei einem Nukleotidüberschuss von ebenfalls 5-facher molare Konzentration.

Die Abtrennung der Alkalischen Phosphatase (100kDa), des Austauschpuffers und des überschüssigen Nukleotids erfolgte mittels Gelfiltration (S75 10/30).

### ***Nukleotidaustausch mit EDTA***

Mit EDTA wurden die Nukleotide GDP, GTP, mGDP und tamra-GTP ausgetauscht. Hierbei wird die Affinität des Nukleotids zum G Protein durch Komplexierung des Magnesium-Ions verringert und durch Zugabe eines hohen Überschusses des gewünschten Nukleotids wird dieses verstärkt an das G Protein gebunden. Der Austausch-Puffer enthält entsprechend kein Magnesium.

Hierzu wurden 20 mM EDTA und ein 20-50-facher molarer Überschuss des Nukleotids eingesetzt. Der Austausch zu den mant- und tamra-Nukleotiden erfolgte in einem Ansatz von 0.5mg Protein, während der Austausch zu GDP und GTP in einem größeren Ansatz von 5mg durchgeführt wurde. Die Überführung in einen Mg<sup>2+</sup>-haltigen Puffer und die Abtrennung des EDTA und des überschüssigen Nukleotids erfolgte über Gelfiltration (S75 10/30).

### ***Nukleotidaustausch von Rap zu Rap\*GDP***

Rap-Proteine zeigen eine sehr hohe Nukleotidaffinität und eine langsame Nukleotiddissoziation auch in Anwesenheit von EDTA (siehe Ergebnisteil). Dies hat einerseits zur Folge, dass Rap nach der Aufreinigung aus Bakterienzellen mehrheitlich GTP-gebunden auftritt und andererseits der Austausch mit EDTA nur sehr langsam erfolgt. Um GDP-gebundenes Rap zu erhalten wurde dementsprechend Rap1GAP (Dank an B. Sot) eingesetzt, dass für 30 Minuten in einem 2-fachen Überschuss eingesetzt wurde. Dies wurde entweder in der Lösung belassen oder über eine Gelfiltration abgetrennt.

### ***Nukleotidbefreiung***

Um die Hydrolyse von Rho-Proteinen messen zu können, müssen diese „Nukleotid-befreit“ werden, da die intrinsische Hydrolyse zu schnell abläuft, als dass ein Austausch zu GTP nach dem Standardprotokoll sinnvoll wäre. Hierzu wurden 2 mg Protein (RhoA c', CDC42 c', Rac1 c') mit bead-gekoppelter Alkalischer Phosphatase (5 U/mg) inkubiert, bei einem 1.5-fachen Überschuss von GppCp. Hierbei musste darauf geachtet werden, dass der Reaktionsansatz nicht höher als 1mM konzentriert war, da sonst die Rho-Proteine präzipitierten. Dies war insbesondere bei RhoA F25N der Fall. Ebenfalls wurde Austauschpuffer in oben beschriebener Konzentration zugegeben. Die Reaktion erfolgte über Nacht bei 4°C und der Erfolg des GDP-Abbaus mittels HPLC überprüft. Die vollständige Abtrennung der bead-AP erfolgte durch mindestens 5-maliges Abzentrifugieren und Entnahme des Überstandes.

Anschließend wurden dem Ansatz 2U/ml Phosphodiesterase zugegeben, um das gebundene GppCp zu hydrolysieren (4°C). Die Inaktivierung des Enzyms erfolgte durch 2-maliges Einfrieren in flüssig N<sub>2</sub> und Auftauen. Der Erfolg des vollständigen Nukleotid-Abbaus wurde mittels HPLC überprüft. Ein Austausch des Puffers um die Nukleotide und die Alkalische Phosphatase abzutrennen ist nach dieser Methode nicht möglich, da die G Proteine präzipitieren würden. Die Lagerung erfolgte bei -80°C.

### **6.3.12 Affinitätspräzipitation (*Pull-down*)**

Diese Methode wurde zur Detektion von Protein-Protein-Interaktionen eingesetzt. Hierbei lag ein Bindungspartner stets als GST-Fusionsprotein vor und wurde an GSH-Sepharose-*beads* immobilisiert. Dieser Ansatz wurde mit einem molaren Überschuss des Interaktionspartners gesättigt und anschließend mindestens 4-mal mit Puffer gewaschen (Ausnahme: G Protein-Spezifitäts-Experiment mit Arap1: Nur 1-mal gewaschen). Als Reaktionspuffer wurde der für das Protein verwendete optimale Reinigungspuffer eingesetzt. Als Negativ-Kontrolle diente die Zugabe des Interaktionspartners zu *beads*, ohne Protein, bzw. zu GST-beladenen *beads*. Die Detektion erfolgte mit Hilfe von SDS-Gelen (Glycin und Tricin). Die Proteine wurden von den *beads* durch direkte Zugabe von Reaktions-Puffer und Lämmli-Puffer zum Reaktionsansatz nach der letzten Abnahme des Überstands eluiert. I. d. R. wurde der Überstand vollständig auf das Gel aufgetragen. Zum Vergleich wurde der Überstand des ersten Zentrifugationsschrittes ebenfalls aufgetragen. Für genauere Angaben, siehe Ergebnisteil.

### **6.3.13 Analytische Protease-Spaltung**

Die analytische Protease-Spaltung dient der Detektion der Proteinstabilität, der Bestimmung stabiler Konstrukte und der Identifizierung stabiler Komplexe. Hierzu wurden Trypsin und Chymotrypsin in Konzentrationen von 0.01-0.2 mg/ml eingesetzt, was etwa 0.002-0.05 µg Protease pro µg Protein entspricht. Die optimale Konzentration wurde jeweils für jedes Experiment einzeln festgelegt. Die Reaktion erfolgte entweder bei 4°C oder bei Raumtemperatur im Protein-Puffer. Zu bestimmten Zeitpunkten wurden Proben entnommen und auf ein Gel aufgetragen. Das Gesamtprotein jeder Probe entsprach dabei i.d.R. 10 µg.

## **6.4 Biophysikalische Methoden**

### **6.4.1 Bestimmung der Nukleotidbeladung über Umkehrphasen-HPLC**

Der Nachweis von Nukleotiden kann über die Umkehrphasen-Hochdruck-Flüssigchromatografie (*reversed-phase* HPLC) erfolgen. Hierbei werden die negativ geladenen Phosphat-Gruppen der Nukleotide mit positiv geladenen Tetrabutylammonium (TBA)-Ionen maskiert, die im polaren Lösungsmittel enthalten sind. Als Säulenmatrix dient eine Nucleosil-C18-Säule. Um die Laufzeit zu optimieren wurde dem Puffer 7.5% Acetonitril zugefügt. Da mant-markierte Nukleotide eine erhöhte Retentionszeit aufwiesen, wurde entsprechend der Acetonitril-Anteil auf 25% erhöht.

Die Detektion der Nukleotide erfolgte fotometrisch bei einer Wellenlänge von 254 nm. Über eine Kalibrierung mit Nukleotidstandards kann anschließend die Nukleotidkonzentration durch Integration der Peak-Flächen bestimmt werden.

### ***Hydrolysemessungen unter Bestimmung der Nukleotidkonzentration mittels HPLC***

Die Bestimmung der Nukleotidkonzentration mittels HPLC ermöglicht Hydrolysemessungen über den Vergleich von GTP zur Gesamtnukleotidmenge. In der Regel wurden 100 µM G Protein und variierende Mengen GAP – je nach Aktivität – eingesetzt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von GAP gestartet und Proben (25 µl) zu bestimmten Zeitpunkten entnommen und die Reaktion in flüssigem Stickstoff gestoppt. Zur Auswertung wurden diese für 1 Minute bei 95°C denaturiert und der Nukleotidgehalt des Überstandes bestimmt. Normiert wurde auf den Anfangsgehalt von GTP im Vergleich zu ([GTP]+[GDP]).



### 6.4.2 ESI-MS

Zur Bestimmung der Molekülmasse von Proteinen wurde die Elektrospray-Ionisation-Massenspektrometrie eingesetzt. Dies wurde in der Abteilung von Prof. Waldmann vom technischen Personal durchgeführt. Dabei wurde eine Proteinkonzentration von 1 mg/ml in einer Lösung mit 10% Acetonitril hergestellt, die mit Hilfe der „Protein-Methode“ vermessen wurde. Hierbei wird die Probe über HPLC (5% Acetonitril) in Proteinfraktionen aufgetrennt und diese einzeln der ESI-MS zugeführt (LCQ-Massenspektrometer). Die Auswertung erfolgte mit dem BioWorks-Programm.

### 6.4.3 Fluoreszenzspektroskopie

Moleküle werden von Photonen mit einer Energie im sichtbaren oder ultravioletten Bereich elektronisch angeregt. Die Desaktivierung des angeregten Zustands kann dabei strahlend, strahlungslos oder über thermische Dissipation erfolgen. Eine Möglichkeit der strahlenden Desaktivierung ist die Emission eines Photons mit geringerer Energie als der des absorbierten Photons, in Form von Fluoreszenz. Die Energie des Photons ist geringer, da das angeregte Molekül Stöße mit seiner Umgebung erfährt und so Schwingungsenergie verliert.

Dadurch ist die Fluoreszenz abhängig von der Umgebung des Fluorophors, wobei insbesondere die Polarität des Lösungsmittels den Anteil der strahlungslosen Übergänge (*quenching*) bestimmt.

Das Messprinzip der Fluoreszenzspektroskopie beruht auf diesem Effekt, dass sich Fluoreszenzintensität und -Wellenlänge aufgrund einer geänderten chemischen Umgebung des Fluorophors bei Interaktion mit einem anderen Molekül ändert. Insbesondere der Übergang von Protein-gebundenem Fluorophor zum stark quencheden Wasser ruft eine hohe Fluoreszenz-Änderung hervor.

In dieser Arbeit wurden folgende Fluoreszenz-Farbstoffe eingesetzt:

**Tabelle 23: Anregungs- und Emissionswellenlängen der verwendeten Fluorophore**

	Anregung	Emission [nm]	Ext.-Koeff. $\epsilon$ bei Anr.	Stopped-flow <i>cut-off</i> Filter
Mant	360	450	22600 M <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup>	408
Tamra	546	583	78000 M <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup>	570
Aedans	336	490	5700 M <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup>	475
Edans	335	493	5900 M <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup>	475
MDCC	425	465	46800 M <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup>	455

### ***Fluoreszenztitration***

Die Affinitätsbestimmung über Fluoreszenztitration erfolgte in den Fluoromax-Spektrometern. Hierzu wurden an mant-Nukleotide gebundene G Proteine, bzw. Aedans-markierte Proteine in einer Konzentration von 100nM bis 5  $\mu$ M, je nach Affinität, vorgelegt und Proteinlösungen des vermeintlichen Interaktionspartners zutitriert. Das verwendete Spektrometer war mit einem 4-fach Küvettenwechsler ausgestattet, was die parallele Aufnahme von 4 Messreihen ermöglichte. Die Schlitzbreiten wurden in der Regel auf 1x1 mm (Anregung) und 2x2 mm (Emission) eingestellt. Zur Bestimmung der Dissoziationskonstanten ( $K_D$ ) wurden die Mittelwerte jedes Titrationsschrittes ermittelt und gegen die zugegebene Proteinkonzentration aufgetragen. Mit Hilfe des Programms GraFit 5 (Erithacus Software Ltd.) wurde eine quadratischen Bindungskurve an die Messwerte gemäß der folgenden Gleichung<sup>(541)</sup> angepasst.

$$F = F_0 + (F_e - F_0) \cdot \frac{([A]_0 + [B]_0 + K_D) - \sqrt{([A]_0 + [B]_0 + K_D)^2 - 4 \cdot [A]_0 \cdot [B]_0}}{2[A]_0}$$

F: Gesamt-Fluoreszenz

$F_0$ : Grund-Fluoreszenz

$F_e$ : Fluoreszenz nach Beendigung der Titration

$[A]_0$ : Anfangskonzentration des Stoffs A

$[B]_0$ : Anfangskonzentration des Stoffs B

Die numerische Bestimmung der Parameter ergibt den Wert der Dissoziationskonstanten  $K_D$ .

### ***Polarisationstitration***

Die Polarisationstitration verwendet die Eigenschaft eines Fluorophors, linear polarisiertes Licht aufgrund seiner Rotation in eine andere Raumrichtung als Fluoreszenz abzugeben. Hierzu ist jedoch die Eigenschaft notwendig, dass die Rotationsgeschwindigkeit im Vergleich zur Fluoreszenzlebensdauer ausreichend groß ist, um den Fluoreszenzvektor messbar ändern zu können. Das ist abhängig von der Rotationsdiffusionskonstante, die ihrerseits vom molaren Volumen und damit annäherungsweise von der Masse des Fluorophors abhängig ist.

Dies kann für Affinitätsmessungen eingesetzt werden, falls sich die apparente Molmasse des Fluorophors durch Bindung an ein weiteres Molekül ausreichend ändert.

Der experimentelle Ansatz, sowie die anschließende Auswertung erfolgten in Analogie zur Fluoreszenztitration.

Die Polarisation ist gemäß folgender Gleichung definiert:

$$P = \frac{I_{\parallel} - G \cdot I_{\perp}}{I_{\parallel} + G \cdot I_{\perp}}$$

$I_{\parallel}$ : Fluoreszenz-Intensität in Einstrahlrichtung

$I_{\perp}$ : Fluoreszenz-Intensität in 90° zur Einstrahlrichtung

G: Gerätekonstante

### ***GEF-Versuch***

Die Bestimmung der GEF-Aktivität eines Proteins wird ebenfalls mit Hilfe der Fluoreszenzspektrometer vorgenommen. Hierzu wurde Fluoreszenz-markiertes mant-Nukleotid (i.d.R. mGDP)-beladenes G Protein in einer Konzentration von 150nM vorgelegt und das GEF-Protein in unterschiedlichen Konzentrationen zugegeben. Der Start der Reaktion erfolgte durch Zugabe von 10  $\mu$ M unmarkierten GDPs. Bei der Messung der Rap-GEFs Epac1 und Epac2 wurden jeweils 1 mM cAMP zugegeben.

Die Auswertung erfolgte durch Anpassung einer monoexponentiellen Funktion an die Messwerte mit Hilfe des Programms *GraFit 5*.

### ***GDI-Versuch***

Häufig zeigen Interaktionspartner von G Proteinen keine Fluoreszenz- oder Polarisationsänderungen, obwohl eine Bindung stattfindet. Eine indirekte Bestimmung, die nicht von einer direkten Fluoreszenzänderung abhängig ist, ist die Bestimmung der Affinität über den sog. GDI-Versuch. Hierbei macht man sich die Tatsache zunutze, dass G Protein-Effektoren an den dimeren Komplex aus Nukleotidtriphosphat und G Protein binden und so eine Stabilisierung des Dimers hervorrufen, die sich in einer verminderten Dissoziationsrate (*off-rate*) des Nukleotids vom G Protein äußert. Dieser Effekt sollte eine Konzentrationsabhängigkeit des Effektors aufweisen, wodurch die Affinitätskonstante bestimmt werden kann.

Der Versuchsaufbau entspricht der Durchführung der GEF-Versuche, nur dass mit mant-GppNHp beladene G Proteine in unterschiedlicher Konzentration (je nach angenommener Affinität zum Effektor) eingesetzt wurden. Die Zugabe des Effektors erfolgte ebenfalls in unterschiedlichen Konzentrationen. Gestartet wurde die Reaktion mit 10  $\mu$ M GDP.

### ***Schnelle Kinetik über Stopped-Flow-Messungen***

Reaktionen, die zeitlich mittels der Fluoreszenzspektrometer nicht mehr aufgelöst werden können

(u.a. Hydrolyse-Messungen, G-Protein-Effektor-Assoziation), wurden mit Hilfe einer *Stopped-Flow*-Apparatur (*Applied Photophysics SX16MV*) aufgenommen. Auf diesem Weg kann die Kinetik sehr schneller Reaktionen fluoreszenzspektroskopisch gemessen werden. Die Exzitation erfolgt jeweils bei der Anregungswellenlänge des Fluorophors (s.o.), während das Emissionssignal hinter einem Kantenfilter bei Wellenlängen zwischen Anregung und Emission aufgenommen wurde. Die Auswertung erfolgte auch hier mit dem Programm *GraFit Version 5.0* (*Erithacus Software Ltd.*).

### ***Hydrolysemessungen mittels MDCC-markiertem Phosphate-Binding-Protein (PBP)***

Für die Bestimmung der Hydrolyse eignet sich N-(2-[1-Maleimid]-ethyl)-7-diethylaminocoumarin-3-carboxamid (MDCC)-markiertes PBP (großer Dank an M. Miertzschke), welches durch die hoch-affine Bindung freien Phosphats das Fluoreszenzsignal ändert<sup>(542;543)</sup>. Dies kann genutzt werden, um die Konzentration des Phosphats nach Hydrolyse von Nukleotiden zu bestimmen. Der Unterschied zu HPLC-Messungen besteht in der Detektion der Phosphat-Freisetzung und nicht in der Bestimmung der direkten Hydrolyse.

### *Stopped-flow Messungen:*

Für die Bestimmung der Hydrolyseaktivität von RhoA, CDC42 und Rac1 bei Ab- und Anwesenheit eines GAPs wurden 0,5  $\mu\text{M}$  Nukleotid-befreites G Protein und 10 $\mu\text{M}$  MDCC-PBP eingesetzt. Hierzu wurden GAP-Proteine in unterschiedlicher Konzentration sowie 0,25 $\mu\text{M}$  GTP (Endkonzentration) zugegeben und die Fluoreszenzänderung im Stopped-flow-Gerät bei 25°C verfolgt.

Die Auswertung erfolgte durch Angleichung einer monoexponentiellen Funktion, da es sich um *single-turnover*-Bedingungen handelte.

### *Messung mit dem Fluoreszenzspektrometer:*

Für Hydrolysemessungen im Spektrometer wurden 2  $\mu\text{M}$  G Protein, 1  $\mu\text{M}$  GTP und 20  $\mu\text{M}$  MDCC-PBP eingesetzt, die Phosphatfreisetzung zeitaufgelöst verfolgt und durch eine monoexponentielle Funktion ausgewertet. GAP wurde in der Regel im Überschuss für *single-turnover*-Reaktionen eingesetzt.

#### 6.4.4 Isotherme Titrationskalorimetrie

Bei der Isothermen Titrationskalorimetrie wird die Wärmetönung einer Reaktion als Messsignal genutzt, so dass neben der Affinitätskonstanten direkt die Reaktionsenthalpie erhalten wird. Eine Bestimmung der freien Reaktionsenthalpie ist über folgende Gleichungen möglich:

$$\Delta G^0 = -RT \ln K_A$$

$$\Delta G^0 = \Delta H^0 - T \Delta S^0$$

Das Messprinzip liegt darin, dass eine Referenzzelle bei konstanter Temperatur gehalten und diese gemessen wird. Eine Wärmeänderung in der Messzelle hat zur Folge, dass der Temperaturunterschied über eine Verringerung oder Erhöhung des Heizstroms ausgeglichen werden muss. Diese Stromänderung wird zeitabhängig detektiert. Der Ligand wird robotergesteuert in zeitlich konstanten Intervallen zugegeben und die Änderung des Heizstroms anschließend über die Zeit integriert und mit der konstanten Heizspannung multipliziert, um so die Messgrößen gemäß folgender Gleichung zu bestimmen:

$$\frac{1}{V_0} \cdot \frac{dQ}{d[A]_0} = \Delta H^0 \cdot \left[ \frac{1}{2} - \frac{1 - (1+r)/2 - X/2}{X^2 - 2X(1-r) + (1+r)^2} \right]$$

$$r = 1 / K_A [B]_0$$

$$X = [A]_0 / [B]_0$$

$V_0$ : Zellvolumen

$dQ$ : Änderung der Wärmetönung

$d[A]_0$ : Änderung der zutitrierten Menge von A

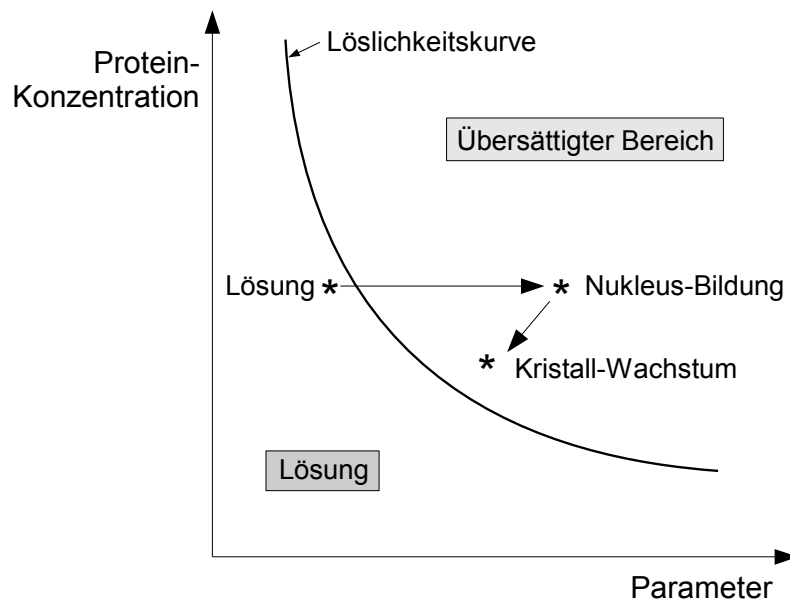
Die Konzentrationen der Lösungen wurden entsprechend der optimalen Signalhöhe ausgetestet und eingesetzt.

#### 6.5 Kristallisation

Um ein Protein zu kristallisieren, wird dieses in einem optimalen Lösungsmittel gelöst. Durch Verlust an Solvens (Verdampfung) gelangt die Lösung in einen übersättigten Bereich und die Kristallnukleus-Bildung beginnt. Dadurch wird der Lösung wieder Protein entzogen und weiteres überschüssiges Lösungsmittel verdampft. Durch dieses Prinzip entstehen ausreichend große Kristalle, die zur röntgenkristallografischen Untersuchung geeignet sind.

Die Wahl der Lösungsmittelzusätze ist essenziell, da sie die Löslichkeit und die

Wachstumsgeschwindigkeit der Proteine beeinflussen. Zusätzlich erhöhen sie die effektive Konzentration des Proteins, indem sie das Wasser immobilisieren (*salting-out*).



**Abbildung 76: Löslichkeitskurve für ein Protein als Funktion z.B. der Salzkonzentration**

Die Kristallisation wurde nach der Methode des hängenden und der Methode des sitzenden Tropfens durchgeführt. Beim hängenden Tropfen wurden Linbro-Platten mit 24 Vertiefungen verwendet. Das Protein wurde in der Regel in 1µl+1µl Mischungen mit der Reservoir-Lösung (Volumen: 1ml) eingesetzt.

Die Methode des sitzenden Tropfens wurde in 96er Ansätzen verwendet (Greiner und Corning), die von einem Roboter (*Mosquito*) pipettiert wurden. Die Proteinlösung und die Präzipitanz-Lösung wurden im Verhältnis 200 nl zu 200 nl gemischt. Das Reservoirvolumen betrug 70 µl.

## 7 Literaturverzeichnis

1. Koonin, E.V., Wolf, Y.I and Aravind, L. (2000). Protein fold recognition using sequence profiles and its application in structural genomics. *Adv Protein Chem*, **54**, 245-275.
2. Leipe, D.D., Koonin, E.V and Aravind, L. (2003). Evolution and classification of P-loop kinases and related proteins. *J Mol Biol*, **333**, 781-815.
3. Saraste, M., Sibbald, P and Wittinghofer, A. (1990). The P-loop--a common motif in ATP- and GTP-binding proteins. *Trends BiochemSci*, **15**, 430-434.
4. Sprang, S. (1997). G protein mechanisms - insights from structural analysis. *AnnuRevBiochem*, **66**, 639-678.
5. Vetter, I. and Wittinghofer, A. (2001). Signal transduction - The guanine nucleotide-binding switch in three dimensions. *Science*, **294**, 1299-1304.
6. Walker, J., Saraste, M, Runswick, M and Gay, N. (1982). Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *EMBO J*, **1**, 945-951.
7. Bourne, H., Sanders, D and McCormick, F. (1991). The GTPase superfamily: conserved structure and molecular mechanism. *Nature*, **349**, 117-127.
8. Daumke, O., Lundmark, R, Vallis, Y, Martens, S, Butler, P and McMahon, H. (2007). Architectural and mechanistic insights into an EHD ATPase involved in membrane remodelling. *Nature*, **449**, 923-NIL.
9. Montoya, G., Svensson, C, Luirink, J and Sinning, I. (1997). Crystal structure of the NG domain from the signal-recognition particle receptor FtsY. *Nature*, **385**, 365-368.
10. Gasper, R., Meyer, S, Gotthardt, K, Sirajuddin, M and Wittinghofer, A. (2009). It takes two to tango: regulation of G proteins by dimerization. *Nat Rev Mol Cell Biol*, , .
11. Egea, P., Shan, S, Napetschnig, J, Savage, D, Walter, P and Stroud, R. (2004). Substrate twinning activates the signal recognition particle and its receptor. *Nature*, **427**, 215-221.
12. Focia, P., Shepotinovskaya, I, Seidler, J and Freymann, D. (2004). Heterodimeric GTPase core of the SRP targeting complex. *Science*, **303**, 373-377.
13. Scrima, A. and Wittinghofer, A. (2006). Dimerisation-dependent GTPase reaction of MnmE: how potassium acts as GTPase-activating element. *EMBO J*, **25**, 2940-2951.
14. Gasper, R., Scrima, A and Wittinghofer, A. (2006). Structural insights into HypB, a GTP-binding protein that regulates metal binding. *JBiolChem*, **281**, 27492-27502.
15. Schindelin, N., Kisker, C, Sehlessman, J, Howard, J and Rees, D. (1997). STRUCTURE OF ADP-CENTER-DOT-AIF(4)(-)-STABILIZED NITROGENASE COMPLEX AND ITS IMPLICATIONS FOR SIGNAL TRANSDUCTION. *Nature*, **387**, 370-376.
16. Moser, C., Mol, O, Goody, R and Sinning, I. (1997). The signal recognition particle receptor of escherichia coli (Ftsy) Has a nucleotide exchange factor built into the gtpase domain. *ProcNatAcadSciUSA*, **94**, 11339-11344.
17. Bos, J., Rehmann, H and Wittinghofer, A. (2007). GEFs and GAPs: Critical elements in the control of small G proteins [Review]. *Cell*, **129**, 865-877.
18. Scheffzek, K. and Ahmadian, M. (2005). GTPase activating proteins: structural and functional insights 18 years after discovery [Review]. *Cellular & Molecular Life Sciences*, **62**, 3014-3038.
19. Harvey, J. (1964). An Unidentified Virus which causes the Rapid Production of Tumours in Mice. *Nature*, **204**, .
20. Shih, T., Weeks, M, Young, H and Scolnick, E. (1979). Identification of a Sarcoma Virus-Coded Phosphoprotein in Nonproducer Cells Transformed by Kirsten or Harvey Murine Sarcoma Virus. *Virology*, **96**,

- 64-79.
21. Langbeheim, H., Shih, T and Scolnick, E. (1980). Identification of a Normal Vertebrate Cell Protein Related to the p21 Src of Harvey Murine Sarcoma Virus. *Virology*, **106**, 292-300.
  22. Barbacid, M. (1987). ras Genes. *AnnRevBiochem*, **56**, 779-827.
  23. Bos, J. (1989). ras oncogenes in human cancer: a review. *Cancer Res*, **49**, 4682-4689.
  24. Almoguera, C., Shibata, D, Forrester, K, Martin, J, Arnheim, N and Perucho, M. (1988). Most human carcinomas of the exocrine pancreas contain mutant c-K-ras genes. *Cell*, **53**, 549-554.
  25. Wilentz, R.E., Chung, C.H, Sturm, P.D, Musler, A, Sohn, T.A, Offerhaus, G.J, Yeo, C.J, Hruban, R.H and Slebos, R.J. (1998). K-ras mutations in the duodenal fluid of patients with pancreatic carcinoma. *Cancer*, **82**, 96-103.
  26. Pai, E., Kabsch, W, Krengel, U, Holmes, K, John, J and 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.
  27. Takai, Y., Sasaki, T and Matozaki, T. (2001). Small GTP-binding proteins. *Physiol Rev*, **81**, 153-208.
  28. Colicelli, J. (2004). Human RAS superfamily proteins and related GTPases. *Science's STKE*, **250**, 1-31.
  29. Zerial, M. and McBride, H. (2001). Rab proteins as membrane organizers. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, **2**, 107-117.
  30. Lazar, T., Gotte, M and Gallwitz, D. (1997). VESICULAR TRANSPORT - HOW MANY YPT/RAB-GTPASES MAKE A EUKARYOTIC CELL [Review]. *Trends BiochemSci*, **22**, 468-472.
  31. Pereira-Leal, J.B. and 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.
  32. Pereira-Liel, J. and Seabra, M. (2001). Evolution of the Rab family of small GTP-binding proteins. *JMolBiol*, **313**, 889-901.
  33. Gorvel, J., Chavrier, P, Zerial, M and Gruenberg, J. (1991). rab5 Controls early endosome fusion in vitro. *Cell*, **64**, 915-925.
  34. Woodman, P.G. (2000). Biogenesis of the sorting endosome: the role of Rab5. *Traffic*, **1**, 695-701.
  35. Simpson, J.C., Griffiths, G, Wessling-Resnick, M, Fransen, J.A.M, Bennett, H and Jones, A.T. (2004). A role for the small GTPase Rab21 in the early endocytic pathway. *J Cell Sci*, **117**, 6297-6311.
  36. Kauppi, M., Simonsen, A, Bremnes, B, Vieira, A, Callaghan, J, Stenmark, H and Olkkonen, V.M. (2002). The small GTPase Rab22 interacts with EEA1 and controls endosomal membrane trafficking. *J Cell Sci*, **115**, 899-911.
  37. Hunziker, W. and Peters, P.J. (1998). Rab17 localizes to recycling endosomes and regulates receptor-mediated transcytosis in epithelial cells. *J Biol Chem*, **273**, 15734-15741.
  38. Seabra, M.C. and Wasmeier, C. (2004). Controlling the location and activation of Rab GTPases. *Curr Opin Cell Biol*, **16**, 451-457.
  39. Chavrier, P., Gorvel, J, Stelzer, E, Simons, K, Gruenberg, J and Zerial, M. (1991). Hypervariable C-terminal domain of rab proteins acts as a targeting signal. *Nature*, **353**, 769-772.
  40. Seabra, M., Brown, M, Slaughter, C, Sdhof, T and Goldstein, J. (1992). Purification of component A of Rab geranylgeranyl transferase: Possible identity with the choroideremia gene product. *Cell*, **70**, 1049-1057.
  41. Pylypenko, O., Rak, A, Reents, R, Niculae, A, Sidorovitch, V, Vioaca, M, Bessolitsyna, E, Thoma, N, Waldmann, H, Schlichting, I, Goody, R and Alexandrov, K. (2003). Structure of rab escort protein-1 in



- complex with Rab geranylgeranyltransferase. *Molecular Cell*, **11**, 483-494.
42. Rak, A., Pylypenko, O, Niculae, A, Pyatkov, K, Goody, R and Alexandrov, K. (2004). Structure of the Rab7 : REP-1 complex: Insights into the mechanism of rab prenylation and choroideremia disease. *Cell*, **117**, 749-760.
  43. Soldati, T., Shapiro, A, Svejstrup, A and Pfeffer, S. (1994). Membrane targeting of the small GTPase Rab9 is accompanied by nucleotide exchange. *Nature*, **369**, 76-77.
  44. Ullrich, O., Horiuchi, H, Bucci, C and Zerial, M. (1994). Membrane association of Rab5 mediated by GDP-dissociation inhibitor and accompanied by GDP/GTP exchange. *Nature*, **368**, 157-160.
  45. Pylypenko, O., Rak, A, Durek, T, Kushnir, S, Dursina, B, Thomae, N, Constantinescu, A, Brunsveld, L, Watzke, A, Waldmann, H, Goody, R and Alexandrov, K. (2006). Structure of doubly prenylated Ypt1 : GDI complex and the mechanism of GDI-mediated Rab recycling. *EMBO J*, **25**, 13-23.
  46. Alexandrov, K., Horiuchi, H, Steele-Mortimer, O, Seabra, M and 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.
  47. Goud, B., Salminen, A, Walworth, N and Novick, P. (1988). A GTP-binding protein required for secretion rapidly associates with secretory vesicles and the plasma membrane in yeast. *Cell*, **53**, 753-768.
  48. Delprato, A., Merithew, E and Lambright, D. (2004). Structure, exchange determinants, and family-wide rab specificity of the tandem helical bundle and Vps9 domains of Rabex-5. *Cell*, **118**, 607-617.
  49. Itzen, A., Rak, A and Goody, R. (2007). Sec2 is a highly efficient exchange factor for the Rab protein Sec4. *JMolBiol*, **365**, 1359-1367.
  50. Itzen, A., Pylypenko, O, Goody, R, Alexandrov, K and Rak, A. (2006). Nucleotide exchange via local protein unfolding - structure of Rab8 in complex with MSS4. *EMBO J*, **25**, 1445-1455.
  51. Grosshans, B., Ortiz, D and Novick, P. (2006). Rabs and their effectors: Achieving specificity in membrane traffic [Review]. *ProcNatAcadSciUSA*, **103**, 11821-11827.
  52. Strom, M., Vollmer, P, Tan, T and Gallwitz, D. (1993). A yeast GTPase-activating protein that interacts specifically with a member of the Ypt/Rab family. *Nature*, **361**, 736-739.
  53. Fukuda, M. (2008). Regulation of secretory vesicle traffic by Rab small GTPases. *Cell Mol Life Sci*, **65**, 2801-2813.
  54. Andres, D., Seabra, M, Brown, M, Armstrong, S, Smeland, T, Cremers, F and Goldstein, J. (1993). cDNA cloning of component A of Rab geranylgeranyl transferase and demonstration of its role as a Rab escort protein. *Cell*, **73**, 1091-1099.
  55. Goody, R.S., Rak, A and Alexandrov, K. (2005). The structural and mechanistic basis for recycling of Rab proteins between membrane compartments. *Cell Mol Life Sci*, **62**, 1657-1670.
  56. Shapiro, A. and Pfeffer, S. (1995). Quantitative analysis of the interactions between prenyl Rab9, GDP dissociation inhibitor-alpha, and guanine nucleotides. *JBiolChem*, **270**, 11085-11090.
  57. Alexandrov, K., Simon, I, Yurchenko, V, Iakovenko, A, Rostkova, E, Scheidig, A and Goody, R. (1999). Characterization of the ternary complex between Rab7, REP-1 and Rab geranylgeranyl transferase. *EurJBiochem*, **265**, 160-170.
  58. Dirac-Svejstrup, A., Soldati, T, Shapiro, A and Pfeffer, S. (1994). Rab-GDI presents functional Rab9 to the intracellular transport machinery and contributes selectivity to Rab9 membrane recruitment. *JBiolChem*, **269**, 15427-15430.
  59. Sivars, U., Aivazian, D and Pfeffer, S. (2003). Yip3 catalyses the dissociation of endosomal Rab-GDI complexes. *Nature*, **425**, 856-859.
  60. Wennerberg, K. and Der, C.J. (2004). Rho-family GTPases: it's not only Rac and Rho (and I like it). *J Cell Sci*,

- 117, 1301-1312.
61. Chardin, P. (2006). Function and regulation of Rnd proteins [Review]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, **7**, 54-62.
  62. Mackay, D. and Hall, A. (1998). Rho gtpases [Review]. *JBiolChem*, **273**, 20685-20688.
  63. Nobes, C. and Hall, A. (1994). Regulation and function of the Rho subfamily of small GTPases. *Curr Opin Genet Dev*, **4**, 77-81.
  64. Hirshberg, M., Stockley, R., Dodson, G and Webb, M. (1997). THE CRYSTAL STRUCTURE OF HUMAN RAC1, A MEMBER OF THE RHO-FAMILY COMPLEXED WITH A GTP ANALOGUE. *Nature Structural Biology*, **4**, 147-152.
  65. Lammers, M., Rose, R, Scrima, A and Wittinghofer, A. (2005). The regulation of mDial by autoinhibition and its release by Rho center dot GTP. *EMBO J*, **24**, 4176-4187.
  66. Thomas, C., Fricke, I, Scrima, A, Berken, A and Wittinghofer, A. (2007). Structural evidence for a common intermediate in small G protein-GEF reactions. *Molecular Cell*, **25**, 141-149.
  67. Heasman, S.J. and Ridley, A.J. (2008). Mammalian Rho GTPases: new insights into their functions from in vivo studies. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **9**, 690-701.
  68. Rottner, K., Hall, A and Small, J.V. (1999). Interplay between Rac and Rho in the control of substrate contact dynamics. *Curr Biol*, **9**, 640-648.
  69. Hall, A. (1990). The cellular functions of small GTP-binding proteins. [Review] [74 refs]. *Science*, **249**, 635-640.
  70. Ridley, A. and Hall, A. (1992). The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors. *Cell*, **70**, 389-399.
  71. Hotchin, N. and Hall, A. (1995). The assembly of integrin adhesion complexes requires both extracellular-matrix and intracellular rho/rac gtpases. *JCell Biol*, **131**, 1857-1865.
  72. Ridley, A. (2006). Rho GTPases and actin dynamics in membrane protrusions and vesicle trafficking [Review]. *Trends in Cell Biology*, **16**, 522-529.
  73. Higgs, H. and Pollard, T. (2000). Activation by Cdc42 and PIP2 of Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASp) stimulates actin nucleation by Arp2/3 complex. *JCell Biol*, **150**, 1311-1320.
  74. Vernoud, V., Horton, A, Yang, Z and Nielsen, E. (2003). Analysis of the small GTPase gene superfamily of Arabidopsis [Review]. *Plant Physiol*, **131**, 1191-1208.
  75. Berken, A. and Wittinghofer, A. (2008). Structure and function of Rho-type molecular switches in plants. *Plant Physiol Biochem*, **46**, 380-393.
  76. Yang, Z. (2002). Small GTPases: versatile signaling switches in plants. *Plant Cell*, **14 Suppl**, S375-88.
  77. Berken, A. (2006). ROPs in the spotlight of plant signal transduction. *Cell Mol Life Sci*, **63**, 2446-2459.
  78. Kahn, R., Cherfils, J, Elias, M, Lovering, R, Munro, S and Schurmann, A. (2006). Nomenclature for the human Arf family of GTP-binding proteins: ARF, ARL, and SAR proteins [Review]. *JCell Biol*, **172**, 645-650.
  79. D'Souza-Schorey, C. and Chavrier, P. (2006). ARF proteins: roles in membrane traffic and beyond. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **7**, 347-358.
  80. Munro, S. (2005). The Arf-like GTPase Arl1 and its role in membrane traffic. *Biochem Soc Trans*, **33**, 601-605.
  81. Schürmann, A., Kolling, S, Jacobs, S, Saftig, P, Krauss, S, Wennemuth, G, Kluge, R and Joost, H. (2002). Reduced sperm count and normal fertility in male mice with targeted disruption of the ADP-ribosylation factor-like 4 (Arl4) gene. *Mol Cell Biol*, **22**, 2761-2768.
  82. Fan, Y., Esmail, M, Ansley, S, Blacque, O, Boroevich, K, Ross, A, Moore, S, Badano, J, May-Simera, H,

- Compton, D, Green, J, Lewis, R, van Haelst, M, Parfrey, P, Baillie, D, Beales, P, Katsanis, N, Davidson, W and Leroux, M. (2004). Mutations in a member of the Ras superfamily of small GTP-binding proteins causes Bardet-Biedl syndrome. *NatGenet*, **36**, 989-993.
83. Avidor-Reiss, T., Maer, A, Koundakjian, E, Polyanovsky, A, Keil, T, Subramaniam, S and Zuker, C. (2004). Decoding cilia function: Defining specialized genes required for compartmentalized cilia biogenesis. *Cell*, **117**, 527-539.
84. Beghin, A., Galmarini, C.M and Dumontet, C. (2007). Tubulin folding pathways: implication in the regulation of microtubule dynamics. *Curr Cancer Drug Targets*, **7**, 697-703.
85. Hanzal-Bayer, M., Renault, L, Roversi, P, Wittinghofer, A and Hillig, R. (2002). The complex of Arl2-GTP and PDE delta: from structure to function. *EMBO J*, **21**, 2095-2106.
86. Hillig, R., Hanzal-Bayer, M, Linari, M, Becker, J, Wittinghofer, A and Renault, L. (2000). Structural and biochemical properties show ARL3-GDP as a distinct GTP binding protein. *Structure*, **8**, 1239-1245.
87. Amor, J., Harrison, D, Kahn, R and Ringe, D. (1994). Structure of the human ADP-ribosylation factor 1 complexed with GDP. *Nature*, **372**, 704-708.
88. Goldberg, J. (1998). Structural basis for activation of arf gtpase - mechanisms of guanine nucleotide exchange and gtp-myristoyl switching. *Cell*, **95**, 237-248.
89. Pasqualato, S., Menetrey, J, Franco, M and Cherfils, J. (2001). The structural GDP/GTP cycle of human Arf6. *EMBO reports*, **2**, 234-238.
90. Lee, F.J., Huang, C.F, Yu, W.L, Buu, L.M, Lin, C.Y, Huang, M.C, Moss, J and Vaughan, M. (1997). Characterization of an ADP-ribosylation factor-like 1 protein in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*, **272**, 30998-31005.
91. Lin, C., Huang, P, Liao, W, Cheng, H, Huang, C, Kuo, J, Patton, W, Massenburg, D, Moss, J and Lee, F. (2000). ARL4, an ARF-like protein that is developmentally regulated and localized to nuclei and nucleoli. *JBiolChem*, **275**, 37815-37823.
92. Moore, M. (1998). Ran and nuclear transport. *JBiolChem*, **273**, 22857-22860.
93. Dasso, M. (2001). Running on ran: Nuclear transport and the mitotic spindle [Review]. *Cell*, **104**, 321-324.
94. Pemberton, L., Blobel, G and Rosenblum, J. (1998). Transport routes through the nuclear pore complex. *CurrOpinCell Biol*, **10**, 392-399.
95. Kato, K., Cox, A, Hisaka, M, Graham, S, Buss, J and Der, C. (1992). Isoprenoid addition to Ras protein is the critical modification for its membrane association and transforming activity. *ProcNatAcadSciUSA*, **89**, 6403-6407.
96. Quilliam, L.A., Huff, S.Y, Rabun, K.M, Wei, W, Park, W, Broek, D and Der, C.J. (1994). Membrane-targeting potentiates guanine nucleotide exchange factor CDC25 and SOS1 activation of Ras transforming activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, 8512-8516.
97. Zhang, F. and Casey, P. (1996). Protein prenylation - molecular mechanisms and functional consequences. *AnnuRevBiochem*, **65**, 241-269.
98. Kinsella, B., Erdman, R and Maltese, W. (1991). Posttranslational modification of Ha-ras p21 by farnesyl versus geranylgeranyl isoprenoids is determined by the COOH- terminal amino acid. *ProcNatAcadSciUSA*, **88**, 8934-8938.
99. Whyte, D., Kirschmeier, P, Hockenberry, T, Nunezolive, I, James, L, Catino, J, Bishop, W and Pai, J. (1997). K- and N-Ras are geranylgeranylated in cells treated with farnesyl protein transferase inhibitors. *JBiolChem*, **272**, 14459-14464.
100. Kawata, M., Farnsworth, C.C, Yoshida, Y, Gelb, M.H, Glomset, J.A and Takai, Y. (1990). Posttranslationally processed structure of the human platelet protein smg p21B: evidence for geranylgeranylation and carboxyl

- methylation of the C-terminal cysteine. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **87**, 8960-8964.
101. Hancock, J., Magee, A., Childs, J and Marshall, C. (1989). All ras proteins are polyisoprenylated but only some are palmitoylated. *Cell*, **57**, 1167-1177.
  102. Magee, A., Gutierrez, L, McKay, I, Marshall, C and Hall, A. (1987). Dynamic fatty acylation of p21N-ras. *EMBO J*, **6**, 3353-3357.
  103. Smotrys, J. and Linder, M. (2004). Palmitoylation of intracellular signaling proteins: Regulation and function [Review]. *AnnuRevBiochem*, **73**, 559-587.
  104. Hancock, J. (2003). Ras proteins: Different signals from different locations [Review]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, **4**, 373-384.
  105. Rocks, O., Peyker, A and Bastiaens, P. (2006). Spatio-temporal segregation of Ras signals: one ship, three anchors, many harbors. *CurrOpinCell Biol*, **18**, 351-357.
  106. Rocks, O., Peyker, A, Kahms, M, Verveer, P, Koerner, C, Lumbierres, M, Kuhlmann, J, Waldmann, H, Wittinghofer, A and Bastiaens, P. (2005). An acylation cycle regulates localization and activity of palmitoylated Ras isoforms. *Science*, **307**, 1746-1752.
  107. Katayama, M., Kawata, M, Yoshida, Y, Horiuchi, H, Yamamoto, T, Matsuura, Y and Takai, Y. (1991). The posttranslationally modified C-terminal structure of bovine aortic smooth muscle rhoA p21. *JBiolChem*, **266**, 12639-12645.
  108. Khosravi-Far, R., Lutz, R.J, Cox, A.D, Conroy, L, Bourne, J.R, Sinensky, M, Balch, W.E, Buss, J.E and 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.
  109. Khosravi-Far, R., Clark, G, Abe, K, Cox, A, McLain, T, Lutz, R, Sinensky, M and Der, C. (1992). Ras (CXXX) and Rab (CC/CXC) prenylation signal sequences are unique and functionally distinct. *JBiolChem*, **267**, 24363-24368.
  110. Joberty, G., Tavitian, A and Zahraoui, A. (1993). Isoprenylation of Rab proteins possessing a C-terminal CaaX motif. *FEBS Lett*, **330**, 323-328.
  111. Campbell, S., Khosravifar, R, Rossman, K, Clark, G and Der, C. (1998). Increasing complexity of ras signaling [Review]. *Oncogene*, **17**, Special-1413.
  112. Wittinghofer, A. and Nassar, N. (1996). How Ras-related proteins talk to their effectors. *Trends BiochemSci*, **21**, 488-491.
  113. Der, C., Krontiris, T and Cooper, G. (1982). Transforming genes of human bladder and lung carcinoma cell lines are homologous to the ras genes of Harvey and Kirsten sarcoma viruses. *ProcNatlAcadSciUSA*, **79**, 3637-3640.
  114. Fasano, O., Aldrich, T, Tamanoi, F, Taparowsky, E, Furth, M and Wigler, M. (1984). Analysis of the transforming potential of the human H-ras gene by random mutagenesis. *ProcNatlAcadSciUSA*, **81**, 4008-4012.
  115. Scheffzek, K., Ahmadian, M, Kabsch, W, Wiesmuller, L, Lautwein, A, Schmitz, F and Wittinghofer, A. (1997). The Ras-RasGAP complex: structural basis for GTPase activation and its loss in oncogenic Ras mutants. *Science*, **277**, 333-338.
  116. Aoki, Y., Niihori, T, Kawame, H, Kurosawa, K, Filocamo, M, Kato, K, Suzuki, Y, Kure, S and Matsubara, Y. (2005). Germline mutations in HRAS proto-oncogene cause Costello syndrome. *NatGenet*, **37**, 1038-1040.
  117. Tidyman, W.E. and Rauen, K.A. (2008). Noonan, Costello and cardio-facio-cutaneous syndromes: dysregulation of the Ras-MAPK pathway. *Expert Rev Mol Med*, **10**, e37.
  118. Ramírez-Flandes, S. and Ulloa, O. (2008). Bosque: integrated phylogenetic analysis software. *Bioinformatics*, **24**, 2539-2541.

119. Mitin, N., Rossman, K and Der, C. (2005). Signaling interplay in Ras superfamily function [Review]. *Current Biology*, **15**, R563-R574.
120. Kolch, W. (2005). Coordinating ERK/MAPK signalling through scaffolds and inhibitors. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **6**, 827-837.
121. Kitayama, H., Sugimoto, Y, Matsuzaki, T, Ikawa, Y and Noda, M. (1989). A ras-related gene with transformation suppressor activity. *Cell*, **56**, 77-84.
122. Raaijmakers, J.H. and Bos, J.L. (2008). Specificity in Ras and Rap signaling. *J Biol Chem*, , .
123. Bos, J. (2005). Linking Rap to cell adhesion [Review]. *Curr Opin Cell Biol*, **17**, 123-128.
124. Miertzschke, M., Stanley, P, Bunney, T.D, Rodrigues-Lima, F, Hogg, N and Katan, M. (2007). Characterization of interactions of adapter protein RAPL/Nore1B with RAP GTPases and their role in T cell migration. *J Biol Chem*, **282**, 30629-30642.
125. McCormick, F. (1995). Ras-related proteins in signal transduction and growth control. *Molecular Reproduction & Development*, **42**, 500-506.
126. Haubruck, H. and McCormick, F. (1991). Ras p21: effects and regulation. *Biochim Biophys Acta*, **1072**, 215-229.
127. Sternberg, P. and Alberolaila, J. (1998). Conspiracy theory - ras and raf do not act alone [Review]. *Cell*, **95**, 447-450.
128. Karsan, A. (2008). Notch and integrin affinity: a sticky situation. *Sci Signal*, **1**, pe2.
129. Püschel, A.W. (2007). GTPases in semaphorin signaling. *Adv Exp Med Biol*, **600**, 12-23.
130. Kinbara, K., Goldfinger, L, Hansen, M, Chou, F and Ginsberg, M. (2003). Ras GTPases: Integrins' friends or foes? [Review]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, **4**, 767-776.
131. Ivins, J.K., Yurchenco, P.D and Lander, A.D. (2000). Regulation of neurite outgrowth by integrin activation. *J Neurosci*, **20**, 6551-6560.
132. Matsumoto, K., Asano, T and Endo, T. (1997). Novel small gtpase m-ras participates in reorganization of actin cytoskeleton. *Oncogene*, **15**, 2409-2417.
133. Keduka, E., Kaiho, A, Hamada, M, Watanabe-Takano, H, Takano, K, Ogasawara, M, Satou, Y, Satoh, N and Endo, T. (2009). M-Ras evolved independently of R-Ras and its neural function is conserved between mammalian and ascidian, which lacks classical Ras. *Gene*, **429**, 49-58.
134. Nuñez Rodriguez, N., Lee, I.N.L, Banno, A, Qiao, H.F, Qiao, R.F, Yao, Z, Hoang, T, Kimmelman, A.C and Chan, A.M. (2006). Characterization of R-ras3/m-ras null mice reveals a potential role in trophic factor signaling. *Mol Cell Biol*, **26**, 7145-7154.
135. Rodriguez-Viciania, P., Oses-Prieto, J, Burlingame, A, Fried, M and McCormick, F. (2006). A phosphatase holoenzyme comprised of Shoc2/Sur8 and the catalytic subunit of PP1 functions as an M-Ras effector to modulate Raf activity. *Molecular Cell*, **22**, 217-230.
136. Sun, P., Watanabe, H, Takano, K, Yokoyama, T, Fujisawa, J and Endo, T. (2006). Sustained activation of M-Ras induced by nerve growth factor is essential for neuronal differentiation of PC12 cells. *Genes Cells*, **11**, 1097-1113.
137. Erdogan, M., Pozzi, A, Bhowmick, N, Moses, H.L and Zent, R. (2007). Signaling pathways regulating TC21-induced tumorigenesis. *J Biol Chem*, **282**, 27713-27720.
138. Pozzi, A., Coffa, S, Bulus, N, Zhu, W, Chen, D, Chen, X, Mernaugh, G, Su, Y, Cai, S, Singh, A, Brissova, M and Zent, R. (2006). H-Ras, R-Ras, and TC21 differentially regulate ureteric bud cell branching morphogenesis. *Mol Biol Cell*, **17**, 2046-2056.
139. Sharma, R., Sud, N, Chattopadhyay, T.K and Ralhan, R. (2005). TC21/R-Ras2 upregulation in esophageal

- tumorigenesis: potential diagnostic implications. *Oncology*, **69**, 10-18.
140. Bos, J., de Rooij, J and Reedquist, K. (2001). Rap1 signalling: Adhering to new models [Review]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, **2**, 369-377.
141. Caron, E., Self, A and Hall, A. (2000). The GTPase Rap1 controls functional activation of macrophage integrin alpha M beta 2 by LPS and other inflammatory mediators. *Current Biology*, **10**, 974-978.
142. Tsukamoto, N., Hattori, M, Yang, H, Bos, J and Minato, N. (1999). Rap1 GTPase-activating protein SPA-1 negatively regulates cell adhesion. *JBiolChem*, **274**, 18463-18469.
143. Kooistra, M.R.H., Dubé, N and Bos, J.L. (2007). Rap1: a key regulator in cell-cell junction formation. *J Cell Sci*, **120**, 17-22.
144. Kinashi, T. and Katagiri, K. (2004). Regulation of lymphocyte adhesion and migration by the small GTPase Rap1 and its effector molecule, RAPL. *Immunol Lett*, **93**, 1-5.
145. Pannekoek, W., Kooistra, M.R.H, Zwartkruis, F.J.T and Bos, J.L. (2008). Cell-cell junction formation: The role of Rap1 and Rap1 guanine nucleotide exchange factors. *Biochim Biophys Acta*, , .
146. Schwamborn, J., Muller, M, Becker, A and Puschel, A. (2007). Ubiquitination of the GTPase Rap1B by the ubiquitin ligase Smurf2 is required for the establishment of neuronal polarity. *EMBO J*, **26**, 1410-1422.
147. Ryu, J., Futai, K, Feliu, M, Weinberg, R and Sheng, M. (2008). Constitutively active Rap2 transgenic mice display fewer dendritic spines, reduced extracellular signal-regulated kinase signaling, enhanced long-term depression, and impaired spatial learning and fear extinction. *J Neurosci*, **28**, 8178-8188.
148. Fu, Z., Lee, S.H, Simonetta, A, Hansen, J, Sheng, M and Pak, D.T.S. (2007). Differential roles of Rap1 and Rap2 small GTPases in neurite retraction and synapse elimination in hippocampal spiny neurons. *J Neurochem*, **100**, 118-131.
149. Zhu, Y., Pak, D, Qin, Y, McCormack, S.G, Kim, M.J, Baumgart, J.P, Velamoor, V, Auberson, Y.P, Osten, P, van Aelst, L, Sheng, M and Zhu, J.J. (2005). Rap2-JNK removes synaptic AMPA receptors during depotentiation. *Neuron*, **46**, 905-916.
150. Feig, L. (2003). Ral-GTPases: approaching their 15 minutes of fame [Review]. *Trends in Cell Biology*, **13**, 419-425.
151. van Dam, E.M. and Robinson, P.J. (2006). Ral: mediator of membrane trafficking. *Int J Biochem Cell Biol*, **38**, 1841-1847.
152. Moskalenko, S., Henry, D, Rosse, C, Mirey, G, Camonis, J and White, M. (2002). The exocyst is a Ral effector complex. *Nature Cell Biology*, **4**, 66-72.
153. Ohta, Y., Suzuki, N, Nakamura, S, Hartwig, J and Stossel, T. (1999). The small GTPase RalA targets filamin to induce filopodia. *ProcNatlAcadSciUSA*, **96**, 2122-2128.
154. Wolthuis, R., de Ruiter, N, Cool, R and Bos, J. (1997). Stimulation of gene induction and cell growth by the Ras effector Rlf. *EMBO J*, **16**, 6748-6761.
155. Cascone, I., Selimoglu, R, Ozdemir, C, Del Nery, E, Yeaman, C, White, M and Camonis, J. (2008). Distinct roles of RalA and RalB in the progression of cytokinesis are supported by distinct RalGEFs. *EMBO J*, **27**, 2375-2387.
156. Lim, K., O'Hayer, K, Adam, S, Kendall, S, Campbell, P, Der, C and Counter, C. (2006). Divergent roles for RalA and RalB in malignant growth of human pancreatic carcinoma cells. *Current Biology*, **16**, 2385-2394.
157. Roccio, M., Bos, J and Zwartkruis, F. (2006). Regulation of the small GTPase Rheb by amino acids. *Oncogene*, **25**, 657-664.
158. Stocker, H., Radimerski, T, Schindelholz, B, Wittwer, F, Belawat, P, Daram, P, Breuer, S, Thomas, G and Hafen, E. (2003). Rheb is an essential regulator of S6K in controlling cell growth in Drosophila. *Nature Cell Biology*, **5**, 559-565.

159. Karbowiczek, M., Robertson, G and Henske, E. (2006). Rheb inhibits C-Raf activity and B-Raf/C-Raf heterodimerization. *JBiolChem*, **281**, 25447-25456.
160. Sarbassov, D., Ali, S and Sabatini, D. (2005). Growing roles for the mTOR pathway [Review]. *CurrOpinCell Biol*, **17**, 596-603.
161. Manning, B. and Cantley, L. (2003). Rheb fills a GAP between TSC and TOR. *Trends BiochemSci*, **28**, 573-576.
162. Li, Y., Werner, H and Püschel, A.W. (2008). Rheb and mTOR regulate neuronal polarity through Rap1B. *J Biol Chem*, **283**, 33784-33792.
163. Huang, J. and Manning, B.D. (2009). A complex interplay between Akt, TSC2 and the two mTOR complexes. *Biochem Soc Trans*, **37**, 217-222.
164. Avruch, J., Hara, K, Lin, Y, Liu, M, Long, X, Ortiz-Vega, S and Yonezawa, K. (2006). Insulin and amino-acid regulation of mTOR signaling and kinase activity through the Rheb GTPase. *Oncogene*, **25**, 6361-6372.
165. Yuan, J., Shan, Y, Chen, X, Tang, W, Luo, K, Ni, J, Wan, B and Yu, L. (2005). Identification and characterization of RHEBL1, a novel member of Ras family, which activates transcriptional activities of NF-kappa B. *Mol Biol Rep*, **32**, 205-214.
166. Tee, A., Blenis, J and Proud, C. (2005). Analysis of mTOR signaling by the small G-proteins, Rheb and RhebL1. *FEBS Lett*, **579**, 4763-4768.
167. Dunlop, E.A., Dodd, K.M, Seymour, L.A and Tee, A.R. (2009). Mammalian Target of Rapamycin Complex 1-mediated phosphorylation of eukaryotic initiation factor 4E-binding protein 1 requires multiple protein-protein interactions for substrate recognition. *Cell Signal*, . .
168. Kontani, K., Tada, M, Ogawa, T, Okai, T, Saito, K, Araki, Y and Katada, T. (2002). Di-Ras, a distinct subgroup of Ras family GTPases with unique biochemical properties. *JBiolChem*, **277**, 41070-41078.
169. Ellis, C.A., Vos, M.D, Howell, H, Vallecorsa, T, Fults, D.W and Clark, G.J. (2002). Rig is a novel Ras-related protein and potential neural tumor suppressor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 9876-9881.
170. Ligon, A.H., Pershouse, M.A, Jasser, S.A, Yung, W.K and Steck, P.A. (1997). Identification of a novel gene product, RIG, that is down-regulated in human glioblastoma. *Oncogene*, **14**, 1075-1081.
171. Yu, Y., Xu, F, Peng, H, Fang, X, Zhao, S, Li, Y, Cuevas, B, Kuo, W.L, Gray, J.W, Siciliano, M, Mills, G.B and Bast, R.C.J. (1999). NOEY2 (ARHI), an imprinted putative tumor suppressor gene in ovarian and breast carcinomas. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 214-219.
172. Kim, S.H., Kim, S and Ghil, S.H. (2008). Rit contributes to neurite outgrowth triggered by the alpha subunit of Go. *Neuroreport*, **19**, 521-525.
173. Shao, H., Kadono-Okuda, K, Finlin, B and Andres, D. (1999). Biochemical characterization of the Ras-related GTPases Rit and Rin. *Archives of Biochemistry & Biophysics*, **371**, 207-219.
174. Shi, G. and Andres, D.A. (2005). Rit contributes to nerve growth factor-induced neuronal differentiation via activation of B-Raf-extracellular signal-regulated kinase and p38 mitogen-activated protein kinase cascades. *Mol Cell Biol*, **25**, 830-846.
175. Hoshino, M., Yoshimori, T and Nakamura, S. (2005). Small GTPase proteins Rin and Rit bind to PAR6 GTP-dependently and regulate cell transformation. *JBiolChem*, **280**, 22868-22874.
176. Cismowski, M., Ma, C, Ribas, C, Xie, X, Spruyt, M, Lizano, J, Lanier, S and Duzic, E. (2000). Activation of heterotrimeric G-protein signaling by a Ras-related protein - Implications for signal integration. *JBiolChem*, **275**, 23421-23424.
177. Graham, T.E., Key, T.A, Kilpatrick, K and Dorin, R.I. (2001). Dexas1/AGS-1, a steroid hormone-induced guanosine triphosphate-binding protein, inhibits 3',5'-cyclic adenosine monophosphate-stimulated secretion in AtT-20 corticotroph cells. *Endocrinology*, **142**, 2631-2640.

178. Blumer, J.B., Cismowski, M.J, Sato, M and Lanier, S.M. (2005). AGS proteins: receptor-independent activators of G-protein signaling. *Trends Pharmacol Sci*, **26**, 470-476.
179. Vargiu, P., de Abajo, R, Garcia-Ranea, J, Valencia, A, Santisteban, P, Crespo, P and Bernal, J. (2004). The small GTP-binding protein, Rhes, regulates signal transduction from G protein-coupled receptors. *Oncogene*, **23**, 559-568.
180. Errico, F., Santini, E, Migliarini, S, Borgkvist, A, Centonze, D, Nasti, V, Carta, M, De Chiara, V, Prosperetti, C, Spano, D, Herve, D, Pasqualetti, M, Di Lauro, R, Fisone, G and Usiello, A. (2008). The GTP-binding protein Rhes modulates dopamine signalling in striatal medium spiny neurons. *Mol Cell Neurosci*, **37**, 335-345.
181. Elam, C., Hesson, L, Vos, M, Eckfeld, K, Ellis, C, Bell, A, Krex, D, Birrer, N, Latif, F and Clark, G. (2005). RRP22 is a farnesylated, nucleolar, ras-related protein with tumor suppressor potential. *Cancer Res*, **65**, 3117-3125.
182. Zou, H., Hu, L, Li, J, Zhan, S and Cao, K. (2006). Cloning and characterization of a novel small monomeric GTPase, RasL10B, with tumor suppressor potential. *Biotechnol Lett*, **28**, 1901-1908.
183. Zucman-Rossi, J., Legoix, P and Thomas, G. (1996). Identification of new members of the Gas2 and Ras families in the 22q12 chromosome region. *Genomics*, **38**, 247-254.
184. Louro, R., Nakaya, H.I, Paquola, A.C.M, Martins, E.A.L, da Silva, A.M, Verjovski-Almeida, S and Reis, E.M. (2004). RASL11A, member of a novel small monomeric GTPase gene family, is down-regulated in prostate tumors. *Biochem Biophys Res Commun*, **316**, 618-627.
185. Stolle, K., Schnoor, M, Fuellen, G, Spitzer, M, Cullen, P and Lorkowski, S. (2007). Cloning, genomic organization, and tissue-specific expression of the RASL11B gene. *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Structure & Expression*, **1769**, 514-524.
186. Fenwick, C., Na, S, Voll, R, Zhong, H, Im, S, Lee, J and Ghosh, S. (2000). A subclass of Ras proteins that regulate the degradation of I kappa B. *Science*, **287**, 869-873.
187. Chen, Y., Wu, J and Ghosh, G. (2003). KappaB-Ras binds to the unique insert within the ankyrin repeat domain of IkappaBbeta and regulates cytoplasmic retention of IkappaBbeta x NF-kappaB complexes. *J Biol Chem*, **278**, 23101-23106.
188. Chen, Y., Vallee, S, Wu, J, Vu, D, Sondek, J and Ghosh, G. (2004). Inhibition of NF-kappaB activity by IkappaBbeta in association with kappaB-Ras. *Mol Cell Biol*, **24**, 3048-3056.
189. Takahashi, K., Mitsui, K and Yamanaka, S. (2003). Role of ERas in promoting tumour-like properties in mouse embryonic stem cells. *Nature*, **423**, 541-545.
190. Lee, M.Y., Lee, S.H, Park, J.H and Han, H.J. (2009). Interaction of galectin-1 with caveolae induces mouse embryonic stem cell proliferation through the Src, ERas, Akt and mTOR signaling pathways. *Cell Mol Life Sci*, , .
191. Finlin, B., Gau, C, Murphy, G, Shao, H, Kimel, T, Seitz, R, Chiu, Y, Botstein, D, Brown, P, Tamanoi, F, Andres, D and Perou, C. (2001). RERG is a novel ras-related, estrogen-regulated and growth-inhibitory gene in breast cancer. *JBiolChem*, **276**, 42259-42267.
192. Haeusler, L.C., Blumenstein, L, Stege, P, Dvorsky, R and Ahmadian, M.R. (2003). Comparative functional analysis of the Rac GTPases. *FEBS Lett*, **555**, 556-560.
193. Lenzen, C., Cool, R, Prinz, H, Kuhlmann, J and Wittinghofer, A. (1998). Kinetic analysis by fluorescence of the interaction between Ras and the catalytic domain of the guanine nucleotide exchange factor Cdc25Mm. *Biochemistry*, **19**, 7420-7430.
194. Klebe, C., Prinz, H, Wittinghofer, A and Goody, R. (1995). The kinetic mechanism of Ran-nucleotide exchange catalyzed by RCC1. *Biochemistry*, **34**, 12543-12552.
195. Buday, L. and Downward, J. (2008). Many faces of Ras activation. *Biochim Biophys Acta*, **1786**, 178-187.



196. Cai, Y., Chin, H.F, Lazarova, D, Menon, S, Fu, C, Cai, H, Sclafani, A, Rodgers, D.W, De La Cruz, E.M, Ferro-Novick, S and Reinisch, K.M. (2008). The structural basis for activation of the Rab Ypt1p by the TRAPP membrane-tethering complexes. *Cell*, **133**, 1202-1213.
197. Wurmser, A.E., Sato, T.K and Emr, S.D. (2000). New component of the vacuolar class C-Vps complex couples nucleotide exchange on the Ypt7 GTPase to SNARE-dependent docking and fusion. *J Cell Biol*, **151**, 551-562.
198. Rossman, K., Der, C and Sondek, J. (2005). GEF means go: Turning on Rho GTPases with guanine nucleotide-exchange factors [Review]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, **6**, 167-180.
199. Cote, J. and Vuori, K. (2007). GEF what? Dock 180 and related proteins help Rac to polarize cells in new ways [Review]. *Trends in Cell Biology*, **17**, 383-393.
200. Casanova, J.E. (2007). Regulation of Arf activation: the Sec7 family of guanine nucleotide exchange factors. *Traffic*, **8**, 1476-1485.
201. Renault, L., Kuhlmann, J, Henkel, A and Wittinghofer, A. (2001). Structural basis for guanine nucleotide exchange on Ran by the regulator of chromosome condensation (RCC1). *Cell*, **105**, 245-255.
202. Aronheim, A., Engelberg, D, Li, N, al-Alawi, N, Schlessinger, J and Karin, M. (1994). Membrane targeting of the nucleotide exchange factor Sos is sufficient for activating the Ras signaling pathway. *Cell*, **78**, 949-961.
203. Margarit, S., Sondermann, H, Hall, B, Nagar, B, Hoelz, A, Pirruccello, M, Bar-Sagi, D and Kuriyan, J. (2003). Structural evidence for feedback activation by Ras-GTP of the Ras-specific nucleotide exchange factor SOS. *Cell*, **112**, 685-695.
204. Freedman, T.S., Sondermann, H, Kuchment, O, Friedland, G.D, Kortemme, T and Kuriyan, J. (2009). Differences in flexibility underlie functional differences in the Ras activators son of sevenless and Ras guanine nucleotide releasing factor 1. *Structure*, **17**, 41-53.
205. de Rooij, J., Zwartkruis, F, Verheijen, M, Cool, R, Nijman, S, Wittinghofer, A and Bos, J. (1998). Epac is a Rap1 guanine-nucleotide-exchange factor directly activated by cyclic AMP. *Nature*, **396**, 474-477.
206. Rehmann, H., Prakash, B, Wolf, E, Rueppel, A, de Rooij, J, Bos, J and Wittinghofer, A. (2003). Structure and regulation of the cAMP-binding domains of Epac2. *Nature Structural Biology*, **10**, 26-32.
207. Rehmann, H., Arias-Palomo, E, Hadders, M.A, Schwede, F, Llorca, O and Bos, J.L. (2008). Structure of Epac2 in complex with a cyclic AMP analogue and RAP1B. *Nature*, **455**, 124-127.
208. Kawasaki, H., Springett, G, Toki, S, Canales, J, Harlan, P, Blumenstiel, J, Chen, E, Bany, I, Mochizuki, N, Ashbacher, A, Matsuda, M, Housman, D and Graybiel, A. (1998). A Rap guanine nucleotide exchange factor enriched highly in the basal ganglia [published erratum appears in Proc Natl Acad Sci U S A 1999 Jan 5;96(1):318]. *ProcNatlAcadSciUSA*, **95**, 13278-13283.
209. Tanaka, S., Morishita, T, Hashimoto, Y, Hattori, S, Nakamura, S, Shibuya, M, Matuoka, K, Takenawa, T, Kurata, T, Nagashima, K and et al. (1994). C3G, a guanine nucleotide-releasing protein expressed ubiquitously, binds to the Src homology 3 domains of CRK and GRB2/ASH proteins. *ProcNatlAcadSciUSA*, **91**, 3443-3447.
210. Arthur, W., Quilliam, L and Cooper, J. (2004). Rap1 promotes cell spreading by localizing Rac guanine nucleotide exchange factors. *JCell Biol*, **167**, 111-122.
211. Yamauchi, J., Miyamoto, Y, Tanoue, A, Shooter, E and Chan, J. (2005). Ras activation of a Rac1 exchange factor, Tiam1, mediates neurotrophin-3-induced Schwann cell migration. *ProcNatlAcadSciUSA*, **102**, 14889-14894.
212. Spaargaren, M. and Bischoff, J. (1994). Identification of the guanine nucleotide dissociation stimulator for Ral as a putative effector molecule of R-ras, H-ras, K-ras, and Rap. *ProcNatlAcadSciUSA*, **91**, 12609-12613.
213. Hofer, F., Fields, S, Schneider, C and Martin, G. (1994). Activated ras interacts with the ral guanine-nucleotide dissociation stimulator. *ProcNatlAcadSciUSA*, **91**, 11089-11093.
214. Delprato, A. and Lambright, D. (2007). Structural basis for Rab GTPase activation by VPS9 domain exchange

- factors. *Nat.Struct.Mol.Biol*, **14**, 406-412.
215. Thomas, C., Fricke, I, Weyand, M and Berken, A. (2009). 3D structure of a binary ROP-PRONE complex: the final intermediate for a complete set of molecular snapshots of the RopGEF reaction. *Biol Chem*, , .
216. Cherfils, J. and Chardin, P. (1999). GEFs: structural basis for their activation of small GTP-binding proteins. *Trends BiochemSci*, **24**, 306-311.
217. Boriack-Sjodin, P., Margarit, S, Barsagi, D and Kuriyan, J. (1998). The structural basis of the activation of ras by sos. *Nature*, **394**, 337-343.
218. Worthylake, D., Rossman, K and Sondek, J. (2000). Crystal structure of Rac1 in complex with the guanine nucleotide exchange region of Tiam1. *Nature*, **408**, 682-688.
219. Snyder, J., Worthylake, D, Rossman, K, Betts, L, Pruitt, W, Siderovski, D, Der, C and Sondek, J. (2002). Structural basis for the selective activation of Rho GTPases by Dbl exchange factors. *Nature Structural Biology*, **9**, 468-475.
220. Buchwald, G., Friebel, A, Galan, J, Hardt, W, Wittinghofer, A and Scheffzek, K. (2002). Structural basis for the reversible activation of a Rho protein by the bacterial toxin SopE. *EMBO J*, **21**, 3286-3295.
221. Sato, Y., Fukai, S, Ishitani, R and Nureki, O. (2007). Crystal structure of the Sec4p-Sec2p complex in the nucleotide exchanging intermediate state. *ProcNatlAcadSciUSA*, **104**, 8305-8310.
222. Dong, G., Medkova, M, Novick, P and Reinisch, K. (2007). A catalytic coiled coil: Structural insights into the activation of the Rab GTPase Sec4p by Sec2p. *Molecular Cell*, **25**, 455-462.
223. Mossessova, E., Corpina, R and Goldberg, J. (2003). Crystal structure of ARF1 center dot Sec7 complexed with brefeldin A and its implications for the guanine nucleotide exchange mechanism. *Molecular Cell*, **12**, 1403-1411.
224. Feuerstein, J., Goody, R and Webb, M. (1989). The mechanism of guanosine nucleotide hydrolysis by p21 c-Ha-ras. The stereochemical course of the GTPase reaction. *JBiolChem*, **264**, 6188-6190.
225. Wittinghofer, A. (2006). Phosphoryl transfer in Ras proteins, conclusive or elusive?. *Trends BiochemSci*, **31**, 20-23.
226. Lahiri, S., Zhang, G, Dunaway-Mariano, D and Allen, K. (2003). The pentacovalent phosphorus intermediate of a phosphoryl transfer reaction. *Science*, **299**, 2067-2071.
227. Blackburn, G., Williams, N, Gamblin, S and Smerdon, S. (2003). Comment on "The pentacovalent phosphorus intermediate of a phosphoryl transfer reaction". *Science*, **301**, NIL.
228. Allen, K. and Dunaway-Mariano, D. (2003). Response to comment on "The pentacovalent phosphorus intermediate of a phosphoryl transfer reaction". *Science*, **301**, NIL.
229. Chakrabarti, P., Suveyzdis, Y, Wittinghofer, A and Gerwert, K. (2004). Fourier transform infrared spectroscopy on the Rap center dot RapGAP reaction, GTPase activation without an arginine finger. *JBiolChem*, **279**, 46226-46233.
230. Kotting, C., Blessenohl, M, Suveyzdis, Y, Goody, R, Wittinghofer, A and Gerwert, K. (2006). A phosphoryl transfer intermediate in the GTPase reaction of Ras in complex with its GTPase-activating protein. *ProcNatlAcadSciUSA*, **103**, 13911-13916.
231. Chakrabarti, P., Daumke, O, Suveyzdis, Y, Kotting, C, Gerwert, K and Wittinghofer, A. (2007). Insight into catalysis of a unique GTPase reaction by a combined biochemical and FTIR approach. *JMolBiol*, **367**, 983-995.
232. Sondek, J., Lambright, D, Noel, J, Hamm, H and Sigler, P. (1994). GTPase mechanism of Gproteins from the 1.7-A crystal structure of transducin alpha-GDP-AIF-4. *Nature*, **372**, 276-279.
233. Coleman, D., Berghuis, A, Lee, E, Linder, M, Gilman, A and Sprang, S. (1994). Structures of active conformations of Giα1 and the mechanism of GTP hydrolysis. *Science*, **265**, 1405-1412.

234. Wittinghofer, A. (1997). Signaling mechanistics: aluminum fluoride for molecule of the year. *Current Biology*, **7**, R682-R685.
235. Rittinger, K., Walker, P, Eccleston, J, Nurmahomed, K, Owen, D, Laue, E, Gamblin, S and Smerdon, S. (1997). Crystal structure of a small G protein in complex with the GTPase-activating protein RhoGAP. *Nature*, **388**, 693-697.
236. Pan, X., Eathiraj, S, Munson, M and Lambright, D. (2006). TBC-domain GAPs for Rab GTPases accelerate GTP hydrolysis by a dual-finger mechanism. *Nature*, **442**, 303-306.
237. Veltel, S., Gasper, R, Eisenacher, E and Wittinghofer, A. (2008). The retinitis pigmentosa 2 gene product is a GTPase-activating protein for Arf-like 3. *Nat.Struct.Mol.Biol*, **15**, 373-380.
238. Kuhnel, K., Veltel, S, Schlichting, I and Wittinghofer, A. (2006). Crystal structure of the human retinitis pigmentosa 2 protein and its interaction with Arl3. *Structure*, **14**, 367-378.
239. Seewald, M., Korner, C, Wittinghofer, A and Vetter, I. (2002). RanGAP mediates GTP hydrolysis without an arginine finger. *Nature*, **415**, 662-666.
240. Daumke, O., Weyand, M, Chakrabarti, P, Vetter, I and Wittinghofer, A. (2004). The GTPase-activating protein Rap1GAP uses a catalytic asparagine. *Nature*, **429**, 197-201.
241. Scrima, A., Thomas, C, Deaconescu, D and Wittinghofer, A. (2008). The Rap-RapGAP complex: GTP hydrolysis without catalytic glutamine and arginine residues. *EMBO J*, **27**, 1145-1153.
242. Bi, X., Corpina, R and Goldberg, J. (2002). Structure of the Sec23/24-Sar1 pre-budding complex of the COPII vesicle coat. *Nature*, **419**, 271-277.
243. Goldberg, J. (1999). Structural and functional analysis of the ARF1-ARFGAP complex reveals a role for coatomer in GTP hydrolysis. *Cell*, **96**, 893-902.
244. Mandiyan, V., Andreev, J, Schlessinger, J and Hubbard, S. (1999). Crystal structure of the ARF-GAP domain and ankyrin repeats of PYK2-associated protein beta. *EMBO J*, **18**, 6890-6898.
245. Bernards, A. and Settleman, J. (2004). GAP control: regulating the regulators of small GTPases [Review]. *Trends in Cell Biology*, **14**, 377-385.
246. Trahey, M. and McCormick, F. (1987). A cytoplasmic protein stimulates normal N-ras p21 GTPase, but does not affect oncogenic mutants. *Science*, **238**, 542-545.
247. Walker, S., Kupzig, S, Bouyoucef, D, Davies, L, Tsuboi, T, Bivona, T, Cozier, G, Lockyer, P, Buckler, A, Rutter, G, Allen, M, Philips, M and Cullen, P. (2004). Identification of a Ras GTPase-activating protein regulated by receptor-mediated Ca<sup>2+</sup> oscillations. *EMBO J*, **23**, 1749-1760.
248. Liu, Q., Walker, S, Gao, D, Taylor, J, Dai, Y, Arkell, R, Bootman, M, Roderick, H, Cullen, P and Lockyer, P. (2005). CAPRI and RASAL impose different modes of information processing on Ras due to contrasting temporal filtering of Ca<sup>2+</sup>. *JCell Biol*, **170**, 183-190.
249. Miura, K., Jacques, K.M, Stauffer, S, Kubosaki, A, Zhu, K, Hirsch, D.S, Resau, J, Zheng, Y and Randazzo, P.A. (2002). ARAP1: a point of convergence for Arf and Rho signaling. *Mol Cell*, **9**, 109-119.
250. Krugmann, S., Williams, R, Stephens, L and Hawkins, P. (2004). ARAP3 is a P13K- and rap-regulated GAP for RhoA. *Current Biology*, **14**, 1380-1384.
251. Bigay, J., Casella, J, Drin, G, Mesmin, B and Antonny, B. (2005). ArfGAP1 responds to membrane curvature through the folding of a lipid packing sensor motif. *EMBO J*, **24**, 2244-2253.
252. Kahn, R.A., Bruford, E, Inoue, H, Logsdon, J.M.J, Nie, Z, Premont, R.T, Randazzo, P.A, Satake, M, Theibert, A.B, Zapp, M.L and Cassel, D. (2008). Consensus nomenclature for the human ArfGAP domain-containing proteins. *J Cell Biol*, **182**, 1039-1044.
253. Randazzo, P. and Hirsch, D. (2004). Arf GAPs: multifunctional proteins that regulate membrane traffic and actin remodelling [Review]. *CellSignal*, **16**, 401-413.

254. Inoki, K., Zhu, T and Guan, K. (2003). TSC2 mediates cellular energy response to control cell growth and survival. *Cell*, **115**, 577-590.
255. Bollag, G. and McCormick, F. (1991). Differential regulation of rasGAP and neurofibromatosis gene product activities. *Nature*, **351**, 576-579.
256. Ohba, Y., Mochizuki, N, Yamashita, S, Chan, A, Schrader, J, Hattori, S, Nagashima, K and Matsuda, M. (2000). Regulatory proteins of R-Ras, TC21/R-Ras2, and M-Ras/R-Ras3. *JBiolChem*, **275**, 20020-20026.
257. Kupzig, S., Deaconescu, D, Bouyoucef, D, Walker, S, Liu, Q, Polte, C, Daumke, O, Ishizaki, T, Lockyer, P, Wittinghofer, A and Cullen, P. (2006). GAP1 family members constitute bifunctional Ras and Rap GTPase-activating proteins. *JBiolChem*, **281**, 9891-9900.
258. Cullen, P.J. and Lockyer, P.J. (2002). Integration of calcium and Ras signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **3**, 339-348.
259. Tcherkezian, J. and Lamarche-Vane, N. (2007). Current knowledge of the large RhoGAP family of proteins. *Biol Cell*, **99**, 67-86.
260. Moon, S.Y. and Zheng, Y. (2003). Rho GTPase-activating proteins in cell regulation. *Trends Cell Biol*, **13**, 13-22.
261. Bishop, A. and Hall, A. (2000). Rho GTPases and their effector proteins [Review]. *BiochemJ*, **348**, 241-255.
262. Bustelo, X.R., Sauzeau, V and Berenjano, I.M. (2007). GTP-binding proteins of the Rho/Rac family: regulation, effectors and functions in vivo. *Bioessays*, **29**, 356-370.
263. Hotta, K., Tanaka, K, Mino, A, Kohno, H and Takai, Y. (1996). Interaction of the Rho family small G proteins with kinectin, an anchoring protein of kinesin motor. *Biochem Biophys Res Commun*, **225**, 69-74.
264. Hess, J.A., Ross, A.H, Qiu, R.G, Symons, M and Exton, J.H. (1997). Role of Rho family proteins in phospholipase D activation by growth factors. *J Biol Chem*, **272**, 1615-1620.
265. Maesaki, R., Ihara, K, Shimizu, T, Kuroda, S, Kaibuchi, K and Hakoshima, T. (1999). The structural basis of Rho effector recognition revealed by the crystal structure of human RhoA complexed with the effector domain of PKN/PRK1. *Molecular Cell*, **4**, 793-803.
266. Peck, J., Oberst, M, Bouker, K, Bowden, E and Burbelo, P. (2002). The RhoA-binding protein, Rhophilin-2, regulates actin cytoskeleton organization. *JBiolChem*, **277**, 43924-43932.
267. Dvorsky, R., Blumenstein, L, Vetter, I and Ahmadian, M. (2004). Structural insights into the interaction of ROCK1 with the switch regions of RhoA. *JBiolChem*, **279**, 7098-7104.
268. Rose, R., Weyand, M, Lammers, M, Ishizaki, T, Ahmadian, M and Wittinghofer, A. (2005). Structural and mechanistic insights into the interaction between Rho and mammalian Dia. *Nature*, **435**, 513-518.
269. Abdul-Manan, N., Aghazadeh, B, Liu, G, Majumdar, A, Ouerfelli, O, Siminovitch, K and Rosen, M. (1999). Structure of Cdc42 in complex with the GTPase-binding domain of the 'Wiskott-Aldrich syndrome' protein. *Nature*, **399**, 379-383.
270. Morreale, A., Venkatesan, M, Mott, H, Owen, D, Nietlispach, D, Lowe, P and Laue, E. (2000). Structure of Cdc42 bound to the GTPase binding domain of PAK. *Nature Structural Biology*, **7**, 384-388.
271. Hart, M., Callow, M, Souza, B and Polakis, P. (1996). IQGAP1, A CALMODULIN-BINDING PROTEIN WITH A RASGAP-RELATED DOMAIN, IS A POTENTIAL EFFECTOR FOR CDC42HS. *EMBO J*, **15**, 2997-3005.
272. Chou, M. and Blenis, J. (1996). The 70 kDa S6 kinase complexes with and is activated by the Rho family G proteins Cdc42 and Rac1. *Cell*, **85**, 573-583.
273. Dvorsky, R. and Ahmadian, M. (2004). Always look on the bright site of Rho: structural implications for a conserved intermolecular interface. *EMBO reports*, **5**, 1130-1136.

274. Modha, R., Campbell, L.J, Nietlispach, D, Buhecha, H.R, Owen, D and Mott, H.R. (2008). The Rac1 polybasic region is required for interaction with its effector PRK1. *J Biol Chem*, **283**, 1492-1500.
275. Lei, M., Lu, W, Meng, W, Parrini, M, Eck, M, Mayer, B and Harrison, S. (2000). Structure of PAK1 in an autoinhibited conformation reveals a multistage activation switch. *Cell*, **102**, 387-397.
276. Frost, J., Xu, S, Hutchison, M, Marcus, S and Cobb, M. (1996). ACTIONS OF RHO FAMILY SMALL G PROTEINS AND P21-ACTIVATED PROTEIN KINASES ON MITOGEN-ACTIVATED PROTEIN KINASE FAMILY MEMBERS. *Molecular & Cellular Biology*, **16**, 3707-3713.
277. Lei, M., Robinson, M and Harrison, S. (2005). The active conformation of the PAK1 kinase domain. *Structure*, **13**, 769-778.
278. Kim, A., Kakalis, L, Abdul-Manan, M, Liu, G and Rosen, M. (2000). Autoinhibition and activation mechanisms of the Wiskott-Aldrich syndrome protein. *Nature*, **404**, 151-158.
279. Higgs, H. and Pollard, T. (1999). Regulation of actin polymerization by Arp2/3 complex and WASp/Scar proteins [Review]. *JBiolChem*, **274**, 32531-32534.
280. Hemsath, L., Dvorsky, R, Fiegen, D, Carlier, M and Ahmadian, M. (2005). An electrostatic steering mechanism of Cdc42 recognition by Wiskott-Aldrich syndrome proteins. *Molecular Cell*, **20**, 313-324.
281. Eden, S., Rohatgi, R, Podtelejnikov, A, Mann, M and Kirschner, M. (2002). Mechanism of regulation of WAVE1-induced actin nucleation by Rac1 and Nck. *Nature*, **418**, 790-793.
282. Sheffield, P., Oliver, C, Kremer, B, Sheng, S, Shao, Z and Macara, I. (2003). Borg/septin interactions and the assembly of mammalian septin heterodimers, trimers, and filaments. *JBiolChem*, **278**, 3483-3488.
283. Joberty, G., Perlungher, R and Macara, I. (1999). The Borgs, a new family of Cdc42 and TC10 GTPase-interacting proteins. *Molecular & Cellular Biology*, **19**, 6585-6597.
284. Hong, Z., Zhang, Z, Olson, J.M and Verma, D.P. (2001). A novel UDP-glucose transferase is part of the callose synthase complex and interacts with phragmoplastin at the forming cell plate. *Plant Cell*, **13**, 769-779.
285. Uhrig, J.F., Mutondo, M, Zimmermann, I, Deeks, M.J, Machesky, L.M, Thomas, P, Uhrig, S, Rambke, C, Hussey, P.J and Hülskamp, M. (2007). The role of Arabidopsis SCAR genes in ARP2-ARP3-dependent cell morphogenesis. *Development*, **134**, 967-977.
286. Wu, G., Gu, Y, Li, S and Yang, Z. (2001). A genome-wide analysis of Arabidopsis Rop-interactive CRIB motif-containing proteins that act as Rop GPase targets. *The Plant Cell*, **13**, 2841-2856.
287. Gu, Y., Fu, Y, Dowd, P, Li, S, Vernoud, V, Gilroy, S and Yang, Z. (2005). A Rho family GTPase controls actin dynamics and tip growth via two counteracting downstream pathways in pollen tubes. *JCell Biol*, **169**, 127-138.
288. Fu, Y., Gu, Y, Zheng, Z, Wasteneys, G and Yang, Z. (2005). Arabidopsis interdigitating cell growth requires two antagonistic pathways with opposing action on cell morphogenesis. *Cell*, **120**, 687-700.
289. Klahre, U. and Kost, B. (2006). Tobacco rhoGtpase activating protein1 spatially restricts signaling of rac/rop to the apex of pollen tubes. *Plant Cell*, **18**, 3033-3046.
290. Wu, G., Li, H and Yang, Z. (2000). Arabidopsis RopGAPs are a novel family of Rho GTPase-activating proteins that require the Cdc42/Rac-interactive binding motif for Rop-specific GTPase stimulation. *Plant Physiol*, **124**, 1625-1636.
291. Lutcke, A., Parton, R, Murphy, C, Olkkonen, V, Dupree, P, Valencia, A, Simons, K and Zerial, M. (1994). Cloning and subcellular-localization of novel rab proteins reveals polarized and cell-type-specific expression. *JCell Sci*, **107**, 3437-3448.
292. Stenmark, H., Vitale, G, Ullrich, O and Zerial, M. (1995). Rabaptin-5 is a direct effector of the small GTPase Rab5 in endocytic membrane fusion. *Cell*, **83**, 423-432.
293. Ullrich, O., Stenmark, H, Alexandrov, K, Huber, L, Kaibuchi, K, Sasaki, T, Takai, Y and Zerial, M. (1993).

- Rab GDP dissociation inhibitor as a general regulator for the membrane association of rab proteins. *JBiolChem*, **268**, 18143-18150.
294. Itzen, A. and Goody, R.S. (2008). Key determinants of Rab specificity. *Structure*, **16**, 1437-1439.
295. Ostermeier, C. and 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.
296. McBride, H., Rybin, V., Murphy, C., Giner, A., Teasdale, R. and Zerial, M. (1999). Oligomeric complexes link Rab5 effectors with NSF and drive membrane fusion via interactions between EEA1 and syntaxin 13. *Cell*, **98**, 377-386.
297. Pfeffer, S. (2005). Structural clues to Rab GTPase functional diversity [Review]. *JBiolChem*, **280**, 15485-15488.
298. Shin, H., Hayashi, M., Christoforidis, S., Lacas-Gervais, S., Hoepfner, S., Wenk, M., Modregger, J., Uttenweiler-Joseph, S., Wilm, M., Nystuen, A., Frankel, W., Solimena, M., De Camilli, P. and Zerial, M. (2005). An enzymatic cascade of Rab5 effectors regulates phosphoinositide turnover in the endocytic pathway. *JCell Biol*, **170**, 607-618.
299. Seals, D.F., Eitzen, G., Margolis, N., Wickner, W.T. and Price, A. (2000). A Ypt/Rab effector complex containing the Sec1 homolog Vps33p is required for homotypic vacuole fusion. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 9402-9407.
300. Rink, J., Ghigo, E., Kalaidzidis, Y. and Zerial, M. (2005). Rab conversion as a mechanism of progression from early to late endosomes. *Cell*, **122**, 735-749.
301. Rybin, V., Ullrich, O., Rubino, M., Alexandrov, K., Simon, I., Seabra, M., Goody, R. and Zerial, M. (1996). GTPASE ACTIVITY OF RAB5 ACTS AS A TIMER FOR ENDOCYTIC MEMBRANE FUSION. *Nature*, **383**, 266-269.
302. Sönnichsen, B., De Renzis, S., Nielsen, E., Rietdorf, J. and 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.
303. Lian, J., Stone, S., Jiang, Y., Lyons, P. and Ferro-Novick, S. (1994). Ypt1p implicated in v-SNARE activation. *Nature*, **372**, 698-701.
304. Sogaard, M., Tani, K., Ye, R., Geromanos, S., Tempst, P., Kirchhausen, T., Rothman, J. and Süllner, T. (1994). A rab protein is required for the assembly of SNARE complexes in the docking of transport vesicles. *Cell*, **78**, 937-948.
305. Echard, A., Jollivet, F., Martinez, O., Lacapère, J.J., Rousselet, A., Janoueix-Lerosey, I. and Goud, B. (1998). Interaction of a Golgi-associated kinesin-like protein with Rab6. *Science*, **279**, 580-585.
306. Burguete, A.S., Fenn, T.D., Brunger, A.T. and Pfeffer, S.R. (2008). Rab and Arl GTPase family members cooperate in the localization of the golgin GCC185. *Cell*, **132**, 286-298.
307. Spang, A., Matsuoka, K., Hamamoto, S., Schekman, R. and Orci, L. (1998). Coatamer, Arf1p, and nucleotide are required to bud coat protein complex I-coated vesicles from large synthetic liposomes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 11199-11204.
308. Zhao, L., Helms, J.B., Brügger, B., Harter, C., Martoglio, B., Graf, R., Brunner, J. and Wieland, F.T. (1997). Direct and GTP-dependent interaction of ADP ribosylation factor 1 with coatamer subunit beta. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 4418-4423.
309. Zhao, L., Helms, J., Brunner, J. and Wieland, F. (1999). GTP-dependent binding of ADP-ribosylation factor to coatamer in close proximity to the binding site for dilysine retrieval motifs and p23. *JBiolChem*, **274**, 14198-14203.
310. Boehm, M., Aguilar, R.C. and Bonifacino, J.S. (2001). Functional and physical interactions of the adaptor protein complex AP-4 with ADP-ribosylation factors (ARFs). *EMBO J*, **20**, 6265-6276.

311. Austin, C., Boehm, M and Tooze, S.A. (2002). Site-specific cross-linking reveals a differential direct interaction of class 1, 2, and 3 ADP-ribosylation factors with adaptor protein complexes 1 and 3. *Biochemistry*, **41**, 4669-4677.
312. Brown, H.A., Gutowski, S, Moomaw, C.R, Slaughter, C and Sternweis, P.C. (1993). ADP-ribosylation factor, a small GTP-dependent regulatory protein, stimulates phospholipase D activity. *Cell*, **75**, 1137-1144.
313. Cockcroft, S., Thomas, G.M, Fensome, A, Geny, B, Cunningham, E, Gout, I, Hiles, I, Totty, N.F, Truong, O and Hsuan, J.J. (1994). Phospholipase D: a downstream effector of ARF in granulocytes. *Science*, **263**, 523-526.
314. Honda, A., Nogami, M, Yokozeki, T, Yamazaki, M, Nakamura, H, Watanabe, H, Kawamoto, K, Nakayama, K, Morris, A, Frohman, M and Kanaho, Y. (1999). Phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase alpha is a downstream effector of the small G protein ARF6 in membrane ruffle formation. *Cell*, **99**, 521-532.
315. Martin, T.F. (2001). PI(4,5)P(2) regulation of surface membrane traffic. *Curr Opin Cell Biol*, **13**, 493-499.
316. Kawasaki, M., Nakayama, K and Wakatsuki, S. (2005). Membrane recruitment of effector proteins by Arf and Rab GTPases. *Curr Opin Struct Biol*, **15**, 681-689.
317. Mattera, R., Arighi, C.N, Lodge, R, Zerial, M and Bonifacino, J.S. (2003). Divalent interaction of the GGAs with the Rabaptin-5-Rabex-5 complex. *EMBO J*, **22**, 78-88.
318. Fielding, A., Schonteich, E, Matheson, J, Wilson, G, Yu, X, Hickson, G, Srivastava, S, Baldwin, S, Prekeris, R and Gould, G. (2005). Rab11-FIP3 and FIP4 interact with Arf6 and the Exocyst to control membrane traffic in cytokinesis. *EMBO J*, **24**, 3389-3399.
319. Shiba, T., Koga, H, Shin, H, Kawasaki, M, Kato, R, Nakayama, K and Wakatsuki, S. (2006). Structural basis for Rab11-dependent membrane recruitment of a family of Rab11-interacting protein 3 (FIP3)/Arfophilin-1. *Proc Natl Acad Sci USA*, **103**, 15416-15421.
320. Hickson, G.R.X., Matheson, J, Riggs, B, Maier, V.H, Fielding, A.B, Prekeris, R, Sullivan, W, Barr, F.A and Gould, G.W. (2003). Arfophilins are dual Arf/Rab 11 binding proteins that regulate recycling endosome distribution and are related to Drosophila nuclear fallout. *Mol Biol Cell*, **14**, 2908-2920.
321. D'Souza-Schorey, C., Boshans, R.L, McDonough, M, Stahl, P.D and Van Aelst, L. (1997). A role for POR1, a Rac1-interacting protein, in ARF6-mediated cytoskeletal rearrangements. *EMBO J*, **16**, 5445-5454.
322. Menetrey, J., Perderiset, M, Cicolari, J, Dubois, T, Elkhatib, N, El Khadali, F, Franco, M, Chavrier, P and Houdusse, A. (2007). Structural basis for ARF1-mediated recruitment of ARHGAP21 to Golgi membranes. *EMBO J*, **26**, 1953-1962.
323. Shin, O.H. and Exton, J.H. (2001). Differential binding of arfaptin 2/POR1 to ADP-ribosylation factors and Rac1. *Biochem Biophys Res Commun*, **285**, 1267-1273.
324. Xu, W. and Stamnes, M. (2006). The actin-depolymerizing factor homology and charged/helical domains of drebrin and mAbp1 direct membrane binding and localization via distinct interactions with actin. *J Biol Chem*, **281**, 11826-11833.
325. Goode, B.L., Rodal, A.A, Barnes, G and Drubin, D.G. (2001). Activation of the Arp2/3 complex by the actin filament binding protein Abp1p. *J Cell Biol*, **153**, 627-634.
326. Kahn, R. and Gilman, A. (1986). The protein cofactor necessary for ADP-ribosylation of Gs by cholera toxin is itself a GTP binding protein. *J Biol Chem*, **261**, 7906-7911.
327. O'Neal, C., Jobling, M, Holmes, R and Hol, W. (2005). Structural basis for the activation of cholera toxin by human ARF6-GTP. *Science*, **309**, 1093-1096.
328. Nie, Z., Hirsch, D.S and Randazzo, P.A. (2003). Arf and its many interactors. *Curr Opin Cell Biol*, **15**, 396-404.
329. Gommel, D.U., Memon, A.R, Heiss, A, Lottspeich, F, Pfannstiel, J, Lechner, J, Reinhard, C, Helms, J.B,

- Nickel, W and Wieland, F.T. (2001). Recruitment to Golgi membranes of ADP-ribosylation factor 1 is mediated by the cytoplasmic domain of p23. *EMBO J*, **20**, 6751-6760.
330. Majoul, I., Straub, M, Hell, S.W, Duden, R and Söling, H.D. (2001). KDEL-cargo regulates interactions between proteins involved in COPI vesicle traffic: measurements in living cells using FRET. *Dev Cell*, **1**, 139-153.
331. Lu, L., Horstmann, H, Ng, C and Hong, W. (2001). Regulation of Golgi structure and function by ARF-like protein 1 (Arl1). *J Cell Sci*, **114**, 4543-4555.
332. Panic, B., Perisic, O, Veprintsev, D, Williams, R and Munro, S. (2003). Structural basis for Arl1-dependent targeting of homodimeric GRIP domains to the Golgi apparatus. *Molecular Cell*, **12**, 863-874.
333. Van Valkenburgh, H., Shern, J, Sharer, J, Zhu, X and Kahn, R. (2001). ADP-ribosylation factors (ARFs) and ARF-like 1 (ARL1) have both specific and shared effectors - Characterizing ARL1-binding proteins. *JBiolChem*, **276**, 22826-22837.
334. Linari, M., Hanzal-Bayer, M and Becker, J. (1999). The delta subunit of rod specific cyclic GMP phosphodiesterase, PDE delta, interacts with the Arf-like protein Arl3 in a GTP specific manner. *FEBS Lett*, **458**, 55-59.
335. Veltel, S., Kravchenko, A, Ismail, S and Wittinghofer, A. (2008). Specificity of Arl2/Arl3 signaling is mediated by a ternary Arl3-effector-GAP complex. *FEBS Lett*, **582**, 2501-2507.
336. Nancy, V., Callebaut, I, El Marjou, A and De Gunzburg, J. (2002). The delta subunit of retinal rod cGMP phosphodiesterase regulates the membrane association of Ras and Rap GTPases. *JBiolChem*, **277**, 15076-15084.
337. Zhang, H., Liu, X, Zhang, K, Chen, C, Frederick, J, Prestwich, G and Baehr, W. (2004). Photoreceptor cGMP phosphodiesterase delta subunit (PDE delta) functions as a prenyl-binding protein. *JBiolChem*, **279**, 407-413.
338. Norton, A., Hosier, S, Terew, J, Li, N, Dhingra, A, Vardi, N, Baehr, W and Cote, R. (2005). Evaluation of the 17-kDa prenyl-binding protein as a regulatory protein for phototransduction in retinal photoreceptors. *JBiolChem*, **280**, 1248-1256.
339. Sharer, J. and Kahn, R. (1999). The ARF-like 2 (ARL2)-binding protein, BART - Purification, cloning, and initial characterization. *Journal of Biological Chemistry*, **274**, 27553-27561.
340. Zhang, T., Li, S, Zhang, Y, Zhong, C, Lai, Z and Ding, J. (2009). Crystal Structure of the ARL2-GTP-BART Complex Reveals a Novel Recognition and Binding Mode of Small GTPase with Effector. *Structure*, **17**, 602-610.
341. Muromoto, R., Sekine, Y, Imoto, S, Ikeda, O, Okayama, T, Sato, N and Matsuda, T. (2008). BART is essential for nuclear retention of STAT3. *Int Immunol*, **20**, 395-403.
342. Vetter, I., Nowak, C, Nishimoto, T, Kuhlmann, J and Wittinghofer, A. (1999). Structure of a Ran-binding domain complexed with Ran bound to a GTP analogue: implications for nuclear transport. *Nature*, **398**, 39-46.
343. Chook, Y. and Blobel, G. (1999). Structure of the nuclear transport complex karyopherin-beta 2-Ran center dot GppNHp. *Nature*, **399**, 230-237.
344. Schrader, N., Koerner, C, Koessmeier, K, Bangert, J, Wittinghofer, A, Stoll, R and Vetter, I.R. (2008). The crystal structure of the Ran-Nup153ZnF2 complex: a general Ran docking site at the nuclear pore complex. *Structure*, **16**, 1116-1125.
345. Vetter, I., Arndt, A, Kutay, U, Gorlich, D and Wittinghofer, A. (1999). Structural view of the Ran-Importin beta interaction at 2.3 Å resolution. *Cell*, **97**, 635-646.
346. Görlich, D., Prehn, S, Laskey, R and Hartmann, E. (1994). Isolation of a protein that is essential for the first step of nuclear protein import. *Cell*, **79**, 767-778.
347. Powers, M. and Forbes, D. (1994). Cytosolic factors in nuclear transport: What's importin?. *Cell*, **79**, 931-934.



348. Seewald, M., Kraemer, A, Farkasovsky, M, Korner, C, Wittinghofer, A and Vetter, I. (2003). Biochemical characterization of the Ran-RanBP1-RanGAP system: Are RanBP proteins and the acidic tail of RanGAP required for the Ran-RanGAP GTPase reaction?. *Molecular & Cellular Biology*, **23**, 8124-8136.
349. Prunuske, A.J., Liu, J, Elgort, S, Joseph, J, Dasso, M and Ullman, K.S. (2006). Nuclear envelope breakdown is coordinated by both Nup358/RanBP2 and Nup153, two nucleoporins with zinc finger modules. *Mol Biol Cell*, **17**, 760-769.
350. Wilde, A. and Zheng, Y. (1999). Stimulation of microtubule aster formation and spindle assembly by the small GTPase Ran. *Science*, **284**, 1359-1362.
351. Caudron, M., Bunt, G, Bastiaens, P and Karsenti, E. (2005). Spatial coordination of spindle assembly by chromosome-mediated signaling gradients. *Science*, **309**, 1373-1376.
352. Clarke, P.R. and Zhang, C. (2008). Spatial and temporal coordination of mitosis by Ran GTPase. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **9**, 464-477.
353. Matheny, S., Chen, C, Kortum, R, Razidlo, G, Lewis, R and White, M. (2004). Ras regulates assembly of mitogenic signalling complexes through the effector protein IMP. *Nature*, **427**, 256-260.
354. Morrison, D.K. and Davis, R.J. (2003). Regulation of MAP kinase signaling modules by scaffold proteins in mammals. *Annu Rev Cell Dev Biol*, **19**, 91-118.
355. Sieburth, D., Sun, Q and Han, M. (1998). Sur-8, a conserved ras-binding protein with leucine-rich repeats, positively regulates ras-mediated signaling in c-elegans. *Cell*, **94**, 119-130.
356. Li, W., Han, M and Guan, K.L. (2000). The leucine-rich repeat protein SUR-8 enhances MAP kinase activation and forms a complex with Ras and Raf. *Genes Dev*, **14**, 895-900.
357. McLeod, S.J., Li, A.H.Y, Lee, R.L, Burgess, A.E and Gold, M.R. (2002). The Rap GTPases regulate B cell migration toward the chemokine stromal cell-derived factor-1 (CXCL12): potential role for Rap2 in promoting B cell migration. *J Immunol*, **169**, 1365-1371.
358. Christian, S.L., Lee, R.L, McLeod, S.J, Burgess, A.E, Li, A.H.Y, Dang-Lawson, M, Lin, K.B.L and Gold, M.R. (2003). Activation of the Rap GTPases in B lymphocytes modulates B cell antigen receptor-induced activation of Akt but has no effect on MAPK activation. *J Biol Chem*, **278**, 41756-41767.
359. Nonaka, H., Takei, K, Umikawa, M, Oshiro, M, Kuninaka, K, Bayarjargal, M, Asato, T, Yamashiro, Y, Uechi, Y, Endo, S, Suzuki, T and Kariya, K. (2008). MINK is a Rap2 effector for phosphorylation of the postsynaptic scaffold protein TANC1. *Biochem Biophys Res Commun*, **377**, 573-578.
360. Greco, F., Ciana, A, Pietra, D, Balduini, C, Minetti, G and Torti, M. (2006). Rap2, but not Rap1 GTPase is expressed in human red blood cells and is involved in vesiculation. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, **1763**, 330-335.
361. Janoueixlerosey, I., Pasheva, E, Detand, M, Tavitian, A and Degunzburg, J. (1998). IDENTIFICATION OF A SPECIFIC EFFECTOR OF THE SMALL GTP BINDING PROTEIN RAP2. *EurJBiochem*, **252**, 290-298.
362. Wang, S., Zhang, Z, Ying, K, Chen, J, Meng, X, Yang, Q, Xie, Y and Mao, Y. (2003). Cloning, expression, and genomic structure of a novel human Rap2 interacting gene (RPIP9). *BiochemGenet*, **41**, 13-25.
363. Kukimoto-Niino, M., Takagi, T, Akasaka, R, Murayama, K, Uchikubo-Kamo, T, Terada, T, Inoue, M, Watanabe, S, Tanaka, A, Hayashizaki, Y, Kigawa, T, Shirouzu, M and Yokoyama, S. (2006). Crystal structure of the RUN domain of the RAP2-interacting protein x. *JBiolChem*, **281**, 31843-31853.
364. Mori, T., Wada, T, Suzuki, T, Kubota, Y and Inagaki, N. (2007). Singar1, a novel RUN domain-containing protein, suppresses formation of surplus axons for neuronal polarity. *J Biol Chem*, **282**, 19884-19893.
365. Taira, M., Evrard, J, Steinmetz, A and Dawid, I. (1995). Classification of LIM proteins [letter]. *Trends Genet*, **11**, 431-432.
366. Machida, N., Umikawa, M, Takei, K, Sakima, N, Myagmar, B, Taira, K, Uezato, H, Ogawa, Y and Kariya, K.

- (2004). Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 4 as a putative effector of Rap2 to activate the c-Jun N-terminal kinase. *J Biol Chem*, **279**, 15711-15714.
367. Jiang, H., Luo, J, Urano, T, Frankel, P, Lu, Z, Foster, D and Feig, L. (1995). Involvement of Ral GTPase in v-Src-induced phospholipase D activation. *Nature*, **378**, 409-412.
368. Brymora, A., Valova, V, Larsen, M, Roufogalis, B and Robinson, P. (2001). The brain exocyst complex interacts with RaIA in a GTP-dependent manner. *JBiolChem*, **276**, 29792-29797.
369. Moskalenko, S., Tong, C, Rosse, C, Mirey, G, Formstecher, E, Daviet, L, Camonis, J and White, M. (2003). Ral GTPases regulate exocyst assembly through dual subunit interactions. *JBiolChem*, **278**, 51743-51748.
370. Cantor, S., Urano, T and Feig, L. (1995). Identification and characterization of Ral-binding protein 1, a potential downstream target of Ral GTPases. *Molecular & Cellular Biology*, **15**, 4578-4584.
371. Jullienflores, V., Dorseuil, O, Romero, F, Letourneur, F, Saragosti, S, Berger, R, Tavitian, A, Gacon, G and Camonis, J. (1995). Bridging ral gtpase to rho-pathways - rlip76, a ral effector with cdc42/rac gtpase-activating protein activity. *JBiolChem*, **270**, 22473-22477.
372. Rossé, C., L'Hoste, S, Offner, N, Picard, A and Camonis, J. (2003). RLIP, an effector of the Ral GTPases, is a platform for Cdk1 to phosphorylate epsin during the switch off of endocytosis in mitosis. *J Biol Chem*, **278**, 30597-30604.
373. Sharma, R., Singhal, S.S, Cheng, J, Yang, Y, Sharma, A, Zimniak, P, Awasthi, S and Awasthi, Y.C. (2001). RLIP76 is the major ATP-dependent transporter of glutathione-conjugates and doxorubicin in human erythrocytes. *Arch Biochem Biophys*, **391**, 171-179.
374. Stuckler, D., Singhal, J, Singhal, S.S, Yadav, S, Awasthi, Y.C and Awasthi, S. (2005). RLIP76 transports vinorelbine and mediates drug resistance in non-small cell lung cancer. *Cancer Res*, **65**, 991-998.
375. Uhlenbrock, K., Weiwad, M, Wetzker, R, Fischer, G, Wittinghofer, A and Rubio, I. (2009). Reassessment of the role of FKBP38 in the Rheb/mTORC1 pathway. *FEBS Lett*, **583**, 965-970.
376. Bai, X., Ma, D, Liu, A, Shen, X, Wang, Q.J, Liu, Y and Jiang, Y. (2007). Rheb activates mTOR by antagonizing its endogenous inhibitor, FKBP38. *Science*, **318**, 977-980.
377. Sun, Y., Fang, Y, Yoon, M, Zhang, C, Roccio, M, Zwartkruis, F.J, Armstrong, M, Brown, H.A and Chen, J. (2008). Phospholipase D1 is an effector of Rheb in the mTOR pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **105**, 8286-8291.
378. Manning, B. and Cantley, L. (2007). AKT/PKB signaling: Navigating downstream [Review]. *Cell*, **129**, 1261-1274.
379. Shao, H. and Andres, D. (2000). A novel RalGEF-like protein, RGL3, as a candidate effector for Rit and Ras. *JBiolChem*, **275**, 26914-26924.
380. Nassar, N., Horn, G, Herrmann, C, Scherer, A, McCormick, F and Wittinghofer, A. (1995). The 2.2 Å crystal structure of the Ras-binding domain of the serine/threonine kinase c-Raf1 in complex with Rap1A and a GTP analogue. *Nature*, **375**, 554-560.
381. Kiel, C. and Serrano, L. (2006). The ubiquitin domain superfold: Structure-based sequence alignments and characterization of binding epitopes. *JMolBiol*, **355**, 821-844.
382. Ponting, C. and Benjamin, D. (1996). A novel family of ras-binding domains. *Trends BiochemSci*, **21**, 422-425.
383. Dickson, B., Sprenger, F, Morrison, D and Hafen, E. (1992). Raf functions downstream of Ras1 in the Sevenless signal transduction pathway [see comments]. *Nature*, **360**, 600-603.
384. Thomas, S., DeMarco, M, D'Arcangelo, G, Halegoua, S and Brugge, J. (1992). Ras is essential for nerve growth factor- and phorbol ester- induced tyrosine phosphorylation of MAP kinases. *Cell*, **68**, 1031-1040.
385. Williams, N., Paradis, H, Agarwal, S, Charest, D, Pelech, S and Roberts, T. (1993). Raf-1 and p21v-ras cooperate in the activation of mitogen- activated protein kinase. *ProcNatlAcadSciUSA*, **90**, 5772-5776.

386. Avruch, J., Zhang, X and Kyriakis, J. (1994). Raf meets Ras: completing the framework of a signal transduction pathway. *TIBS*, **19**, 279-283.
387. Huang, L., Hofer, F, Martin, G and Kim, S. (1998). Structural basis for the interaction of Ras with RalGDS. *Nature Structural Biology*, **5**, 422-426.
388. Scheffzek, K., Grunewald, P, Wohlgemuth, S, Kabsch, W, Tu, H, Wigler, M, Wittinghofer, A and Herrmann, C. (2001). The Ras-Byr2RBD complex: Structural basis for Ras effector recognition in yeast. *Structure*, **9**, 1043-1050.
389. Vetter, I., Linnemann, T, Wohlgemuth, S, Geyer, M, Kalbitzer, H, Herrmann, C and Wittinghofer, A. (1999). Structural and biochemical analysis of Ras-effector signaling via RalGDS. *FEBS Lett*, **451**, 175-180.
390. Herrmann, C., Horn, G, Spaargaren, M and Wittinghofer, A. (1996). Differential interaction of the ras family GTP-binding proteins H-Ras, Rap1A, and R-Ras with the putative effector molecules Raf kinase and Ral-guanine nucleotide exchange factor. *JBiolChem*, **271**, 6794-6800.
391. Wohlgemuth, S., Kiel, C, Krämer, A, Serrano, L, Wittinghofer, F and Herrmann, C. (2005). Recognizing and defining true Ras binding domains I: biochemical analysis. *J Mol Biol*, **348**, 741-758.
392. Nassar, N., Horn, G, Herrmann, C, Block, C, Janknecht, R and Wittinghofer, A. (1996). Ras/Rap effector specificity determined by charge reversal. *Nature Structural Biology*, **3**, 723-729.
393. Wittinghofer, A. and Herrmann, C. (1995). Ras-effector interactions, the problem of specificity. *FEBS Lett*, **369**, 52-56.
394. Voice, J., Klemke, R, Le, A and Jackson, J. (1999). Four human Ras homologs differ in their abilities to activate Raf-1, induce transformation, and stimulate cell motility. *JBiolChem*, **274**, 17164-17170.
395. Herrmann, C. and Nassar, N. (1996). Ras and its effectors. *Progress in Biophysics & Molecular Biology*, **66**, 1-41.
396. McCormick, F. and Wittinghofer, A. (1996). Interactions between Ras proteins and their effectors. *CurrOpinBiotechnol*, **7**, 449-456.
397. Herrmann, C. (2003). Ras-effector interactions: after one decade [Review]. *CurrOpinStructBiol*, **13**, 122-129.
398. Goldfinger, L.E. (2008). Choose your own path: specificity in Ras GTPase signaling. *Mol Biosyst*, **4**, 293-299.
399. Kiel, C., Wohlgemuth, S, Rousseau, F, Schymkowitz, J, Ferkinghoff-Borg, J, Wittinghofer, F and Serrano, L. (2005). Recognizing and defining true Ras binding domains II: in silico prediction based on homology modelling and energy calculations. *J Mol Biol*, **348**, 759-775.
400. Kiel, C., Foglierini, M, Kuemmerer, N, Beltrao, P and Serrano, L. (2007). A genome-wide Ras-effector interaction network. *J Mol Biol*, **370**, 1020-1032.
401. Kiel, C. and Serrano, L. (2007). Prediction of Ras-effector interactions using position energy matrices. *Bioinformatics*, **23**, 2226-2230.
402. Kiel, C., Beltrao, P and Serrano, L. (2008). Analyzing protein interaction networks using structural information. *Annu Rev Biochem*, **77**, 415-441.
403. Linnemann, T., Geyer, M, Jaitner, B, Block, C, Kalbitzer, H, Wittinghofer, A and Herrmann, C. (1999). Thermodynamic and kinetic characterization of the interaction between the Ras binding domain of AF6 and members of the Ras subfamily. *JBiolChem*, **274**, 13556-13562.
404. Rudolph, M., Linnemann, T, Grunewald, P, Wittinghofer, A, Vetter, I and Herrmann, C. (2001). Thermodynamics of Ras/effector and Cdc42/effector interactions probed by isothermal titration calorimetry. *JBiolChem*, **276**, 23914-23921.
405. Kiel, C., Serrano, L and Herrmann, C. (2004). A detailed thermodynamic analysis of Ras/effector complex interfaces. *JMolBiol*, **340**, 1039-1058.

406. Willard, M.D., Willard, F.S, Li, X, Cappell, S.D, Snider, W.D and Siderovski, D.P. (2007). Selective role for RGS12 as a Ras/Raf/MEK scaffold in nerve growth factor-mediated differentiation. *EMBO J*, **26**, 2029-2040.
407. Traver, S., Bidot, C, Spassky, N, Baltauss, T, De Tand, M.F, Thomas, J.L, Zalc, B, Janoueix-Lerosey, I and Gunzburg, J.D. (2000). RGS14 is a novel Rap effector that preferentially regulates the GTPase activity of galphao. *Biochem J*, **350 Pt 1**, 19-29.
408. Willard, F.S., Willard, M.D, Kimple, A.J, Soundararajan, M, Oestreich, E.A, Li, X, Sowa, N.A, Kimple, R.J, Doyle, D.A, Der, C.J, Zylka, M.J, Snider, W.D and Siderovski, D.P. (2009). Regulator of G-protein signaling 14 (RGS14) is a selective H-Ras effector. *PLoS ONE*, **4**, e4884.
409. Cook, S., Rubinfeld, B, Albert, I and McCormick, F. (1993). RapV12 antagonizes Ras-dependent activation of ERK1 and ERK2 by LPA and EGF in Rat-1 fibroblasts. *EMBO J*, **12**, 3475-3485.
410. Schmitt, J. and Stork, P. (2002). PKA phosphorylation of Src mediates cAMP's inhibition of cell growth via Rap1. *Molecular Cell*, **9**, 85-94.
411. York, R., Yao, H, Dillon, T, Ellig, C, Eckert, S, Mccleskey, E and Stork, P. (1998). Rap1 mediates sustained MAP kinase activation induced by nerve growth factor. *Nature*, **392**, 622-626.
412. Houslay, M.D. and Kolch, W. (2000). Cell-type specific integration of cross-talk between extracellular signal-regulated kinase and cAMP signaling. *Mol Pharmacol*, **58**, 659-668.
413. Rodriguez-Viciana, P., Sabatier, C and McCormick, F. (2004). Signaling specificity by Ras family GTPases is determined by the full spectrum of effectors they regulate. *Molecular & Cellular Biology*, **24**, 4943-4954.
414. Sasagawa, S., Ozaki, Y, Fujita, K and Kuroda, S. (2005). Prediction and validation of the distinct dynamics of transient and sustained ERK activation. *Nat Cell Biol*, **7**, 365-373.
415. Stork, P. (2005). Directing NGF's actions: it's a rap. *Nature Cell Biology*, **7**, 338-339.
416. Boettner, B., Govek, E, Cross, J and Van Aelst, L. (2000). The junctional multidomain protein AF-6 is a binding partner of the Rap1A GTPase and associates with the actin cytoskeletal regulator profilin. *ProcNatAcadSciUSA*, **97**, 9064-9069.
417. Bondeva, T., Balla, A, Varnai, P and Balla, T. (2002). Structural determinants of Ras-Raf interaction analyzed in live cells. *MolBiolCell*, **13**, 2323-2333.
418. Schulte, A., Stolp, B, Schönichen, A, Pylypenko, O, Rak, A, Fackler, O.T and Geyer, M. (2008). The human formin FHOD1 contains a bipartite structure of FH3 and GTPase-binding domains required for activation. *Structure*, **16**, 1313-1323.
419. Leever, S., Paterson, H and Marshall, C. (1994). Requirement for Ras in Raf activation is overcome by targeting Raf to the plasma membrane. *Nature*, **369**, 411-414.
420. Stokoe, D., Macdonald, S, Cadwallader, K, Symons, M and Hancock, J. (1994). Activation of Raf as a result of recruitment to the plasma membrane. *Science*, **264**, 1463-1467.
421. Ohtsuka, T., Shimizu, K, Yamamori, B, Kuroda, S and Takai, Y. (1996). ACTIVATION OF BRAIN B-RAF PROTEIN KINASE BY RAP1B SMALL GTP- BINDING PROTEIN. *JBiolChem*, **271**, 1258-1261.
422. Rehmann, H., Das, J, Knipscheer, P, Wittinghofer, A and Bos, J. (2006). Structure of the cyclic-AMP-responsive exchange factor Epac2 in its auto-inhibited state. *Nature*, **439**, 625-628.
423. Kishida, S., Koyama, S, Matsubara, K, Kishida, M, Matsuura, Y and Kikuchi, A. (1997). Colocalization of Ras and Ral on the membrane is required for Ras-dependent Ral activation through RalGDP dissociation stimulator. *Oncogene*, **15**, 2899-2907.
424. Pacold, M., Suire, S, Perisic, O, Lara-Gonzalez, S, Davis, C, Walker, E, Hawkins, P, Stephens, L, Eccleston, J and Williams, R. (2000). Crystal structure and functional analysis of Ras binding to its effector phosphoinositide 3-kinase gamma. *Cell*, **103**, 931-943.
425. Suire, S., Hawkins, P and Stephens, L. (2002). Activation of phosphoinositide 3-kinase gamma by Ras.

- Current Biology*, **12**, 1068-1075.
426. Yamada, T., Sakisaka, T, Hisata, S, Baba, T and Takai, Y. (2005). RA-RhoGAP, Rap-activated Rho GTPase-activating protein implicated in neurite outgrowth through Rho. *JBiolChem*, **280**, 33026-33034.
427. Tall, D., Barbieri, M, Stahl, P and Horazdovsky, B. (2001). Ras-activated endocytosis is mediated by the Rab5 guanine nucleotide exchange activity of RIN1. *Developmental Cell*, **1**, 73-82.
428. van der Weyden, L. and Adams, D.J. (2007). The Ras-association domain family (RASSF) members and their role in human tumorigenesis. *Biochim Biophys Acta*, **1776**, 58-85.
429. Avruch, J., Xavier, R, Bardeesy, N, Zhang, X, Praskova, M, Zhou, D and Xia, F. (2008). The Rassf family of tumor suppressor polypeptides. *J Biol Chem*, , .
430. Tommasi, S., Dammann, R, Jin, S, Zhang, X, Avruch, J and Pfeifer, G. (2002). RASSF3 and NORE1: identification and cloning of two human homologues of the putative tumor suppressor gene RASSF1. *Oncogene*, **21**, 2713-2720.
431. Katagiri, K., Maeda, A, Shimonaka, M and Kinashi, T. (2003). RAPL, a Rap1-binding molecule that mediates Rap1-induced adhesion through spatial regulation of LFA-1. *Nature Immunology*, **4**, 741-748.
432. Stieglitz, B., Bee, C, Schwarz, D, Yildiz, O, Moshnikova, A, Khokhlatchev, A and Herrmann, C. (2008). Novel type of Ras effector interaction established between tumour suppressor NORE1A and Ras switch II. *EMBO J*, **27**, 1995-2005.
433. Hogg, N., Laschinger, M, Giles, K and McDowall, A. (2003). T-cell integrins: more than just sticking points. *J Cell Sci*, **116**, 4695-4705.
434. Dustin, M.L., Bivona, T.G and Philips, M.R. (2004). Membranes as messengers in T cell adhesion signaling. *Nat Immunol*, **5**, 363-372.
435. Mor, A., Dustin, M.L and Philips, M.R. (2007). Small GTPases and LFA-1 reciprocally modulate adhesion and signaling. *Immunol Rev*, **218**, 114-125.
436. Cantor, J.M., Ginsberg, M.H and Rose, D.M. (2008). Integrin-associated proteins as potential therapeutic targets. *Immunol Rev*, **223**, 236-251.
437. Carmona, G., Göttig, S, Orlandi, A, Scheele, J, Bäuerle, T, Jugold, M, Kiessling, F, Henschler, R, Zeiher, A.M, Dimmeler, S and Chavakis, E. (2009). Role of the small GTPase Rap1 for integrin activity regulation in endothelial cells and angiogenesis. *Blood*, **113**, 488-497.
438. Banno, A. and Ginsberg, M.H. (2008). Integrin activation. *Biochem Soc Trans*, **36**, 229-234.
439. Katagiri, K., Ohnishi, N, Kabashima, K, Iyoda, T, Takeda, N, Shinkai, Y, Inaba, K and Kinashi, T. (2004). Crucial functions of the Rap1 effector molecule RAPL in lymphocyte and dendritic cell trafficking. *Nature Immunology*, **5**, 1045-1051.
440. Katagiri, K., Shimonaka, M and Kinashi, T. (2004). Rap1-mediated lymphocyte function-associated antigen-1 activation by the T cell antigen receptor is dependent on phospholipase C-gamma1. *J Biol Chem*, **279**, 11875-11881.
441. Calderwood, D.A., Zent, R, Grant, R, Rees, D.J, Hynes, R.O and Ginsberg, M.H. (1999). The Talin head domain binds to integrin beta subunit cytoplasmic tails and regulates integrin activation. *J Biol Chem*, **274**, 28071-28074.
442. Ulmer, T.S., Calderwood, D.A, Ginsberg, M.H and Campbell, I.D. (2003). Domain-specific interactions of talin with the membrane-proximal region of the integrin beta3 subunit. *Biochemistry*, **42**, 8307-8312.
443. Tadokoro, S., Shattil, S.J, Eto, K, Tai, V, Liddington, R.C, de Pereda, J.M, Ginsberg, M.H and Calderwood, D.A. (2003). Talin binding to integrin beta tails: a final common step in integrin activation. *Science*, **302**, 103-106.
444. Tanentzapf, G. and Brown, N.H. (2006). An interaction between integrin and the talin FERM domain mediates

- integrin activation but not linkage to the cytoskeleton. *Nat Cell Biol*, **8**, 601-606.
445. Zhang, X., Jiang, G, Cai, Y, Monkley, S.J, Critchley, D.R and Sheetz, M.P. (2008). Talin depletion reveals independence of initial cell spreading from integrin activation and traction. *Nat Cell Biol*, **10**, 1062-1068.
446. Katagiri, K., Hattori, M, Minato, N, Irie, S, Takatsu, K and Kinashi, T. (2000). Rap1 is a potent activation signal for leukocyte function-associated antigen 1 distinct from protein kinase C and phosphatidylinositol-3-OH kinase. *Molecular & Cellular Biology*, **20**, 1956-1969.
447. Han, J., Lim, C.J, Watanabe, N, Soriani, A, Ratnikov, B, Calderwood, D.A, Puzon-McLaughlin, W, Lafuente, E.M, Boussiotis, V.A, Shattil, S.J and Ginsberg, M.H. (2006). Reconstructing and deconstructing agonist-induced activation of integrin  $\alpha$ 5 $\beta$ 3. *Curr Biol*, **16**, 1796-1806.
448. Lee, H., Lim, C.J, Puzon-McLaughlin, W, Shattil, S.J and Ginsberg, M.H. (2009). RIAM activates integrins by linking talin to ras GTPase membrane-targeting sequences. *J Biol Chem*, **284**, 5119-5127.
449. Praskova, M., Khokhlatchev, A, Ortiz-Vega, S and Avruch, J. (2004). Regulation of the MST1 kinase by autophosphorylation, by the growth inhibitory proteins, RASSF1 and NORE1, and by Ras. *Biochem J*, **381**, 453-462.
450. Aoyama, Y., Avruch, J and Zhang, X. (2004). Norel inhibits tumor cell growth independent of Ras or the MST1/2 kinases. *Oncogene*, **23**, 3426-3433.
451. Khokhlatchev, A., Rabizadeh, S, Xavier, R, Nedwidek, M, Chen, T, Zhang, X, Seed, B and Avruch, J. (2002). Identification of a novel Ras-regulated proapoptotic pathway. *Current Biology*, **12**, 253-265.
452. Scheel, H. and Hofmann, K. (2003). A novel interaction motif, SARAH, connects three classes of tumor suppressor. *Curr Biol*, **13**, R899-900.
453. Hwang, E., Ryu, K, Pääkkönen, K, Güntert, P, Cheong, H, Lim, D, Lee, J, Jeon, Y.H and Cheong, C. (2007). Structural insight into dimeric interaction of the SARAH domains from Mst1 and RASSF family proteins in the apoptosis pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **104**, 9236-9241.
454. Katagiri, K., Imamura, M and Kinashi, T. (2006). Spatiotemporal regulation of the kinase Mst1 by binding protein RAPL is critical for lymphocyte polarity and adhesion. *Nat Immunol*, **7**, 919-928.
455. Zhou, D., Medoff, B.D, Chen, L, Li, L, Zhang, X, Praskova, M, Liu, M, Landry, A, Blumberg, R.S, Boussiotis, V.A, Xavier, R and Avruch, J. (2008). The Nore1B/Mst1 complex restrains antigen receptor-induced proliferation of naïve T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **105**, 20321-20326.
456. Liu, L., Tommasi, S, Lee, D, Dammann, R and Pfeifer, G.P. (2003). Control of microtubule stability by the RASSF1A tumor suppressor. *Oncogene*, **22**, 8125-8136.
457. Moshnikova, A., Frye, J, Shay, J.W, Minna, J.D and Khokhlatchev, A.V. (2006). The growth and tumor suppressor NORE1A is a cytoskeletal protein that suppresses growth by inhibition of the ERK pathway. *J Biol Chem*, **281**, 8143-8152.
458. Krugmann, S., Anderson, K.E, Ridley, S.H, Risso, N, McGregor, A, Coadwell, J, Davidson, K, Eguinoa, A, Ellson, C.D, Lipp, P, Manifava, M, Ktistakis, N, Painter, G, Thuring, J.W, Cooper, M.A, Lim, Z, Holmes, A.B, Dove, S.K, Michell, R.H, Grewal, A, Nazarian, A, Erdjument-Bromage, H, Tempst, P, Stephens, L.R and Hawkins, P.T. (2002). Identification of ARAP3, a novel PI3K effector regulating both Arf and Rho GTPases, by selective capture on phosphoinositide affinity matrices. *Mol Cell*, **9**, 95-108.
459. Raaijmakers, J., Deneubourg, L, Rehmann, H, de Koning, J, Zhang, Z, Krugmann, S, Erneux, C and Bos, J. (2007). The PI3K effector Arap3 interacts with the PI(3,4,5)P-3 phosphatase SHIP2 in a SAM domain-dependent manner. *CellSignal*, **19**, 1249-1257.
460. Cuthbert, E.J., Davis, K.K and Casanova, J.E. (2008). Substrate specificities and activities of AZAP family Arf GAPs in vivo. *Am J Physiol Cell Physiol*, **294**, C263-70.
461. Yoon, H., Miura, K, Cuthbert, E, Davis, K, Ahvazi, B, Casanova, J and Randazzo, P. (2006). ARAP2 effects on the actin cytoskeleton are dependent on Arf6-specific GTPase-activating-protein activity and binding to RhoA-

- GTP. *J Cell Sci*, **119**, 4650-4666.
462. I, S.T.T., Nie, Z, Stewart, A, Najdovska, M, Hall, N.E, He, H, Randazzo, P.A and Lock, P. (2004). ARAP3 is transiently tyrosine phosphorylated in cells attaching to fibronectin and inhibits cell spreading in a RhoGAP-dependent manner. *J Cell Sci*, **117**, 6071-6084.
463. Daniele, T., Di Tullio, G, Santoro, M, Turacchio, G and De Matteis, M.A. (2008). ARAP1 regulates EGF receptor trafficking and signalling. *Traffic*, **9**, 2221-2235.
464. Yoon, H., Lee, J and Randazzo, P.A. (2008). ARAP1 regulates endocytosis of EGFR. *Traffic*, **9**, 2236-2252.
465. Krugmann, S., Andrews, S, Stephens, L and Hawkins, P.T. (2006). ARAP3 is essential for formation of lamellipodia after growth factor stimulation. *J Cell Sci*, **119**, 425-432.
466. Kowanetz, K., Husnjak, K, Höller, D, Kowanetz, M, Soubeyran, P, Hirsch, D, Schmidt, M.H.H, Pavelic, K, De Camilli, P, Randazzo, P.A and Dikic, I. (2004). CIN85 associates with multiple effectors controlling intracellular trafficking of epidermal growth factor receptors. *Mol Biol Cell*, **15**, 3155-3166.
467. Katoh, M. and Katoh, M. (2003). Identification and characterization of human KIAA1391 and mouse Kiaa1391 genes encoding novel RhoGAP family proteins with RA domain and ANXL repeats. *Int J Oncol*, **23**, 1471-1476.
468. Kalla, C., Nentwich, H, Schlotter, M, Mertens, D, Wildenberger, K, Döhner, H, Stilgenbauer, S and Lichter, P. (2005). Translocation t(X;11)(q13;q23) in B-cell chronic lymphocytic leukemia disrupts two novel genes. *Genes Chromosomes Cancer*, **42**, 128-143.
469. Han, L. and Colicelli, J. (1995). A human protein selected for interference with ras function interacts directly with ras and competes with raf. *MolCellBiol*, **15**, 1318-1323.
470. Afar, D., Han, L, Mclaughlin, J, Wong, S, Dhaka, A, Parmar, K, Rosenberg, N, Witte, O and Colicelli, J. (1997). Regulation of the oncogenic activity of BCR-ABL by a tightly bound substrate protein RIN1. *Immunity*, **6**, 773-782.
471. Deininger, K., Eder, M, Kramer, E.R, Zieglgänsberger, W, Dodt, H, Dornmair, K, Colicelli, J and Klein, R. (2008). The Rab5 guanylate exchange factor Rin1 regulates endocytosis of the EphA4 receptor in mature excitatory neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **105**, 12539-12544.
472. Kimura, T., Sakisaka, T, Baba, T, Yamada, T and Takai, Y. (2006). Involvement of the Ras-Ras-activated Rab5 guanine nucleotide exchange factor RIN2-Rab5 pathway in the hepatocyte growth factor-induced endocytosis of E-cadherin. *J Biol Chem*, **281**, 10598-10609.
473. Hunker, C.M., Giambini, H, Galvis, A, Hall, J, Kruk, I, Veisaga, M.L and Barbieri, M.A. (2006). Rin1 regulates insulin receptor signal transduction pathways. *Exp Cell Res*, **312**, 1106-1118.
474. Saito, K., Murai, J, Kajihō, H, Kontani, K, Kurosu, H and Katada, T. (2002). A novel binding protein composed of homophilic tetramer exhibits unique properties for the small GTPase Rab5. *J Biol Chem*, **277**, 3412-3418.
475. Kajihō, H., Saito, K, Tsujita, K, Kontani, K, Araki, Y, Kurosu, H and Katada, T. (2003). RIN3: a novel Rab5 GEF interacting with amphiphysin II involved in the early endocytic pathway. *J Cell Sci*, **116**, 4159-4168.
476. Kong, C., Su, X, Chen, P and Stahl, P.D. (2007). Rin1 interacts with signal-transducing adaptor molecule (STAM) and mediates epidermal growth factor receptor trafficking and degradation. *J Biol Chem*, **282**, 15294-15301.
477. Senda, K., Goi, T, Hirono, Y, Katayama, K and Yamaguchi, A. (2007). Analysis of RIN1 gene expression in colorectal cancer. *Oncol Rep*, **17**, 1171-1175.
478. Milstein, M., Mooser, C.K, Hu, H, Fejzo, M, Slamon, D, Goodglick, L, Dry, S and Colicelli, J. (2007). RIN1 is a breast tumor suppressor gene. *Cancer Res*, **67**, 11510-11516.
479. Chen, C.R., Kang, Y and Massagué, J. (2001). Defective repression of c-myc in breast cancer cells: A loss at

- the core of the transforming growth factor beta growth arrest program. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 992-999.
480. Selfors, L., Schutzman, J, Borland, C and Stern, M. (1998). Soc-2 encodes a leucine-rich repeat protein implicated in fibroblast growth factor receptor signaling. *Proc Natl Acad Sci USA*, **95**, 6903-6908.
481. Lenzen, C., Cool, R and Wittinghofer, A. (1995). Analysis of intrinsic and CDC25-stimulated guanine nucleotide exchange of p21ras-nucleotide complexes by fluorescence measurements. *Methods Enzymol*, **255**, 95-109.
482. Lemmon, M.A. (2004). Pleckstrin homology domains: not just for phosphoinositides. *Biochem Soc Trans*, **32**, 707-711.
483. Huang, L., Weng, X, Hofer, F, Martin, G and Kim, S. (1997). Three-dimensional structure of the Ras-interacting domain of RalGDS. *Nature Structural Biology*, **4**, 609-615.
484. Bunney, T., Harris, R, Gandarillas, N, Josephs, M, Roe, S, Sorli, S, Paterson, H, Rodrigues-Lima, F, Esposito, D, Ponting, C, Gierschik, P, Pearl, L, Driscoll, P and Katan, M. (2006). Structural and mechanistic insights into ras association domains of phospholipase C epsilon. *Molecular Cell*, **21**, 495-507.
485. Krugmann, S., Stephens, L and Hawkins, P.T. (2006). Purification of ARAP3 and characterization of GAP activities. *Methods Enzymol*, **406**, 91-103.
486. Ferguson, K.M., Kavran, J.M, Sankaran, V.G, Fournier, E, Isakoff, S.J, Skolnik, E.Y and Lemmon, M.A. (2000). Structural basis for discrimination of 3-phosphoinositides by pleckstrin homology domains. *Mol Cell*, **6**, 373-384.
487. Terrak, M., Kerff, F, Langsetmo, K, Tao, T and Dominguez, R. (2004). Structural basis of protein phosphatase 1 regulation. *Nature*, **429**, 780-784.
488. Bella, J., Hindle, K.L, McEwan, P.A and Lovell, S.C. (2008). The leucine-rich repeat structure. *Cell Mol Life Sci*, **65**, 2307-2333.
489. Egloff, M.P., Johnson, D.F, Moorhead, G, Cohen, P.T, Cohen, P and Barford, D. (1997). Structural basis for the recognition of regulatory subunits by the catalytic subunit of protein phosphatase 1. *EMBO J*, **16**, 1876-1887.
490. Renault, L., Guibert, B and Cherfils, J. (2003). Structural snapshots of the mechanism and inhibition of a guanine nucleotide exchange factor. *Nature*, **426**, 525-530.
491. Takada, Y., Ye, X and Simon, S. (2007). The integrins. *Genome Biol*, **8**, 215.
492. Elices, M.J. and Hemler, M.E. (1989). The human integrin VLA-2 is a collagen receptor on some cells and a collagen/laminin receptor on others. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **86**, 9906-9910.
493. Barnes, M.J., Knight, C.G and Farndale, R.W. (1998). The collagen-platelet interaction. *Curr Opin Hematol*, **5**, 314-320.
494. Etoh, T., Thomas, L, Pastel-Levy, C, Colvin, R.B, Mihm, M.C.J and Byers, H.R. (1993). Role of integrin alpha 2 beta 1 (VLA-2) in the migration of human melanoma cells on laminin and type IV collagen. *J Invest Dermatol*, **100**, 640-647.
495. Defilles, C., Lissitzky, J, Montero, M, André, F, Prévot, C, Delamarre, E, Marrakchi, N, Luis, J and Rigot, V. (2009). alphavbeta5/beta6 integrin suppression leads to a stimulation of alpha2beta1 dependent cell migration resistant to PI3K/Akt inhibition. *Exp Cell Res*, , .
496. Kürzinger, K., Reynolds, T, Germain, R.N, Davignon, D, Martz, E and Springer, T.A. (1981). A novel lymphocyte function-associated antigen (LFA-1): cellular distribution, quantitative expression, and structure. *J Immunol*, **127**, 596-602.
497. Evans, R., Patzak, I, Svensson, L, De Filippo, K, Jones, K, McDowall, A and Hogg, N. (2009). Integrins in immunity. *J Cell Sci*, **122**, 215-225.
498. McCall-Culbreath, K.D. and Zutter, M.M. (2008). Collagen receptor integrins: rising to the challenge. *Curr Drug Targets*, **9**, 139-149.



499. Kasirer-Friede, A., Kahn, M.L and Shattil, S.J. (2007). Platelet integrins and immunoreceptors. *Immunol Rev*, **218**, 247-264.
500. Zutter, M.M., Santoro, S.A, Painter, A.S, Tsung, Y.L and Gafford, A. (1994). The human alpha 2 integrin gene promoter. Identification of positive and negative regulatory elements important for cell-type and developmentally restricted gene expression. *J Biol Chem*, **269**, 463-469.
501. Zutter, M.M. and Santoro, S.A. (1990). Widespread histologic distribution of the alpha 2 beta 1 integrin cell-surface collagen receptor. *Am J Pathol*, **137**, 113-120.
502. Bhunia, A., Tang, X, Mohanram, H, Tan, S and Bhattacharjya, S. (2009). NMR solution conformations and interactions of integrin alphaLbeta2 cytoplasmic tails. *J Biol Chem*, **284**, 3873-3884.
503. van Kooyk, Y. and Figdor, C.G. (2000). Avidity regulation of integrins: the driving force in leukocyte adhesion. *Curr Opin Cell Biol*, **12**, 542-547.
504. Kinashi, T. (2005). Intracellular signalling controlling integrin activation in lymphocytes. *Nat Rev Immunol*, **5**, 546-559.
505. Abram, C.L. and Lowell, C.A. (2009). The ins and outs of leukocyte integrin signaling. *Annu Rev Immunol*, **27**, 339-362.
506. Ménasché, G., Kliche, S, Bezman, N and Schraven, B. (2007). Regulation of T-cell antigen receptor-mediated inside-out signaling by cytosolic adapter proteins and Rap1 effector molecules. *Immunol Rev*, **218**, 82-91.
507. Ménasché, G., Kliche, S, Chen, E.J.H, Stradal, T.E.B, Schraven, B and Koretzky, G. (2007). RIAM links the ADAP/SKAP-55 signaling module to Rap1, facilitating T-cell-receptor-mediated integrin activation. *Mol Cell Biol*, **27**, 4070-4081.
508. Pellinen, T. and Ivaska, J. (2006). Integrin traffic. *J Cell Sci*, **119**, 3723-3731.
509. Fabbri, M., Di Meglio, S, Gagliani, M.C, Consonni, E, Molteni, R, Bender, J.R, Tacchetti, C and Pardi, R. (2005). Dynamic partitioning into lipid rafts controls the endo-exocytic cycle of the alphaL/beta2 integrin, LFA-1, during leukocyte chemotaxis. *Mol Biol Cell*, **16**, 5793-5803.
510. Pellinen, T., Arjonen, A, Vuoriluoto, K, Kallio, K, Fransén, J.A.M and Ivaska, J. (2006). Small GTPase Rab21 regulates cell adhesion and controls endosomal traffic of beta1-integrins. *J Cell Biol*, **173**, 767-780.
511. Zhang, B., Wang, Z and Zheng, Y. (1997). Characterization of the interactions between the small GTPase Cdc42 and its GTPase-activating proteins and putative effectors - comparison of kinetic properties of Cdc42 binding to the Cdc42-interactive domains. *JBiolChem*, **272**, 21999-22007.
512. Ligeti, E., Dagher, M, Hernandez, S, Koleske, A and Settleman, J. (2004). Phospholipids can switch the GTPase substrate preference of a GTPase-activating protein. *JBiolChem*, **279**, 5055-5058.
513. Minoshima, Y., Kawashima, T, Hirose, K, Tonzuka, Y, Kawajiri, A, Bao, Y.C, Deng, X, Tatsuka, M, Narumiya, S, May, W.S.J, Nosaka, T, Semba, K, Inoue, T, Satoh, T, Inagaki, M and Kitamura, T. (2003). Phosphorylation by aurora B converts MgcRacGAP to a RhoGAP during cytokinesis. *Dev Cell*, **4**, 549-560.
514. Nassar, N., Hoffman, G, Manor, D, Clardy, J and Cerione, R. (1998). Structures of Cdc42 bound to the active and catalytically compromised forms of Cdc42GAP. *Nature Structural Biology*, **5**, 1047-1052.
515. Eberth, A., Lundmark, R, Gremer, L, Dvorsky, R, Koessmeier, K.T, McMahon, H.T and Ahmadian, M.R. (2009). A BAR domain-mediated autoinhibitory mechanism for RhoGAPs of the GRAF family. *Biochem J*, **417**, 371-377.
516. Walliser, C., Retlich, M, Harris, R, Everett, K.L, Josephs, M.B, Vatter, P, Esposito, D, Driscoll, P.C, Katan, M, Gierschik, P and Bunney, T.D. (2008). rac regulates its effector phospholipase Cgamma2 through interaction with a split pleckstrin homology domain. *J Biol Chem*, **283**, 30351-30362.
517. Horiuchi, H., Lippe, R, McBride, H, Rubino, M, Woodman, P, Stenmark, H, Rybin, V, Wilm, M, Ashman, K, Mann, M and 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.
518. Esters, H., Alexandrov, K., Iakovenko, A., Ivanova, T., Thoma, N., Rybin, V., Zerial, M., Scheidig, A and Goody, R. (2001). Vps9, Rabex-5 and DSS4: Proteins with weak but distinct nucleotide-exchange activities for Rab proteins. *JMolBiol*, **310**, 141-156.
519. Kido, M., Shima, F., Satoh, T., Asato, T., Kariya, K and Kataoka, T. (2002). Critical function of the ras-associating domain as a primary ras-binding site for regulation of *Saccharomyces cerevisiae* adenylyl cyclase. *JBiolChem*, **277**, 3117-3123.
520. Ye, M., Shima, F., Muraoka, S., Liao, J., Okamoto, H., Yamamoto, M., Tamura, A., Yagi, N, Ueki, T and Kataoka, T. (2005). Crystal structure of M-Ras reveals a GTP-bound "off" state conformation of Ras family small GTPases. *J Biol Chem*, **280**, 31267-31275.
521. Cohen, P. (2002). Protein phosphatase 1 - targeted in many directions [Review]. *JCell Sci*, **115**, 241-256.
522. Jin, M.S. and Lee, J. (2008). Application of hybrid LRR technique to protein crystallization. *BMB Rep*, **41**, 353-357.
523. WEBER, G. (1952). Polarization of the fluorescence of macromolecules. I. Theory and experimental method. *Biochem J*, **51**, 145-155.
524. Jameson, D.M. and Seifried, S.E. (1999). Quantification of protein-protein interactions using fluorescence polarization. *Methods*, **19**, 222-233.
525. Jameson, D.M. and Croney, J.C. (2003). Fluorescence polarization: past, present and future. *Comb Chem High Throughput Screen*, **6**, 167-173.
526. Teale, F.W. (1969). Fluorescence depolarization by light-scattering in turbid solutions. *Photochem Photobiol*, **10**, 363-374.
527. Gibson, T. (1984). Studies on the Epstein-Barr virus genome
528. Grant, S.G., Jessee, J, Bloom, F.R and Hanahan, D. (1990). Differential plasmid rescue from transgenic mouse DNAs into *Escherichia coli* methylation-restriction mutants. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **87**, 4645-4649.
529. Studier, F.W. and 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.
530. Pugh, R.A., Honda, M, Leesley, H, Thomas, A, Lin, Y, Nilges, M.J, Cann, I.K.O and Spies, M. (2008). The iron-containing domain is essential in Rad3 helicases for coupling of ATP hydrolysis to DNA translocation and for targeting the helicase to the single-stranded DNA-double-stranded DNA junction. *J Biol Chem*, **283**, 1732-1743.
531. Mullis, K., Faloona, F, Scharf, S, Saiki, R, Horn, G and Erlich, H. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, **51 Pt 1**, 263-273.
532. Sambrook, J., Fritsch, E and Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning - A Laboratory Manual, Second edition*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
533. Sanger, F., Nicklen, S and Coulson, A.R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **74**, 5463-5467.
534. McDonell, M.W., Simon, M.N and Studier, F.W. (1977). Analysis of restriction fragments of T7 DNA and determination of molecular weights by electrophoresis in neutral and alkaline gels. *J Mol Biol*, **110**, 119-146.
535. Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.
536. Shapiro, A.L., Viñuela, E and Maizel, J.V.J. (1967). Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gels. *Biochem Biophys Res Commun*, **28**, 815-820.
537. Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein

- utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, **72**, 248-254.
538. Gill, S.C. and von Hippel, P.H. (1989). Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. *Anal Biochem*, **182**, 319-326.
539. Ehresmann, B., Imbault, P and Weil, J.H. (1973). Spectrophotometric determination of protein concentration in cell extracts containing tRNA's and rRNA's. *Anal Biochem*, **54**, 454-463.
540. Sedlak, J. and Lindsay, R.H. (1968). Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Anal Biochem*, **25**, 192-205.
541. Herrmann, C. and Nassar, N. (1996). Ras and its effectors. *Prog Biophys Mol Biol*, **66**, 1-41.
542. Brune, M., Hunter, J, Corrie, J and Webb, M. (1994). Direct, real-time measurement of rapid inorganic phosphate release using a novel fluorescent probe and its application to actomyosin subfragment 1 ATPase. *Biochemistry*, **33**, 8262-8271.
543. Shutes, A. and Der, C.J. (2006). Real-time in vitro measurement of intrinsic and Ras GAP-mediated GTP hydrolysis. *Methods Enzymol*, **407**, 9-22.
544. Maurer-Stroh, S., Koranda, M, Benetka, W, Schneider, G, Sirota, F.L and Eisenhaber, F. (2007). Towards complete sets of farnesylated and geranylgeranylated proteins. *PLoS Comput Biol*, **3**, e66.

## 8 Anhang

### 8.1 *Krev interaction trapped protein, Krit1*

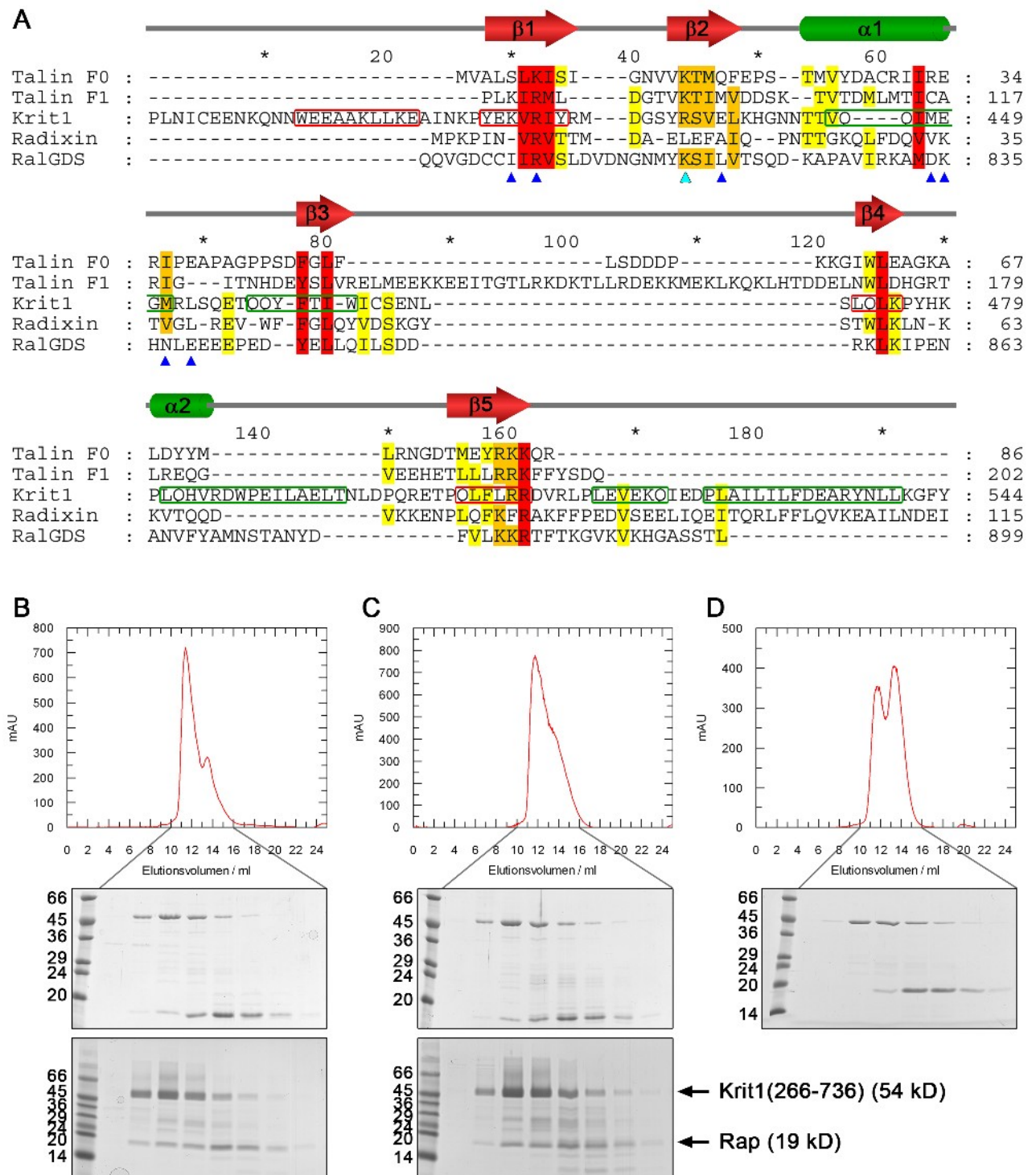
Die Bedeutung von Krit1 (CCM1) als genuiner Effektor von Rap1 wird zunehmend diskutiert. Im Gegensatz zu den RA-Domänen Effektoren, handelt es sich hierbei um eine Interaktion von Rap mit einer FERM-Domäne. Die Lösung der Kristallstruktur dieses neuartigen Komplexes wäre von starkem Interesse.

Ein Sequenzvergleich der Ubiquitin-Faltung der FERM-Domäne mit den FERM-Domänen von Talin und Radixin und der RA-Domäne von RalGDS zeigt eine sehr hohe Homologie im Bereich von  $\beta 1$ ,  $\beta 2$  und  $\alpha 1$ , der Bindungsstelle von Ras Proteinen (Abb. 77A). Insbesondere die positiv geladenen Reste von  $\beta 1$  und  $\beta 2$  (Abb. 77A), die für die Interaktion zu Ras-Proteinen verantwortlich sind, sind in Talin, RalGDS und Krit1 konserviert, während das nicht an G Proteine bindende Radixin die Konservierung des  $\beta 2$  nicht aufweist. Die Sekundärstruktur von Krit1 ist jedoch unterschiedlich vorhergesagt im Vergleich zur regulären Ubiquitin-Faltung von Talin oder RalGDS. Es findet sich beispielsweise keine Vorhersage eines  $\beta$ -Faltblattes analog zu  $\beta 2$  oder  $\beta 3$ , wobei für  $\beta 3$  eine helicale Struktur vorgeschlagen wird.  $\alpha 2$  ist im Vergleich zu den anderen Proteinen deutlich verlängert.

Um die Struktur des Komplexes lösen zu können, wurde das Konstrukt Krit1 (266-783), welches die höchste Affinität zu Rap aufweist<sup>(391)</sup>, aufgereinigt und mit GppNHp-beladenen Rap Proteinen inkubiert. Die Komplexbildung wurde mittels analytischer Gelfiltration untersucht. Dabei zeigte sich, dass Rap1A\*GNP (Abb. 77B) und Rap1B\*GNP (Abb. 77C) eine deutliche Co-Elution mit Krit1 (266-783) aufwiesen, während dies bei Rap2A\*GNP (Abb. 77D) nicht zu beobachten war. Die Komplexbildung wurde deutlicher, wenn ein 2-facher Überschuss von Krit1 (266-783) eingesetzt wurde (Abb. 77B,C unteres Gel).

Da sich ein Komplex mit Rap1 bildete, wurden Ansätze mit einem Überschuss an Krit1 (266-783) und Rap1A\*GNP, bzw. Rap1B\*GNP nochmals in größerem Maßstab präparativ aufgereinigt und die den Komplex enthaltenden Fraktionen vereinigt.

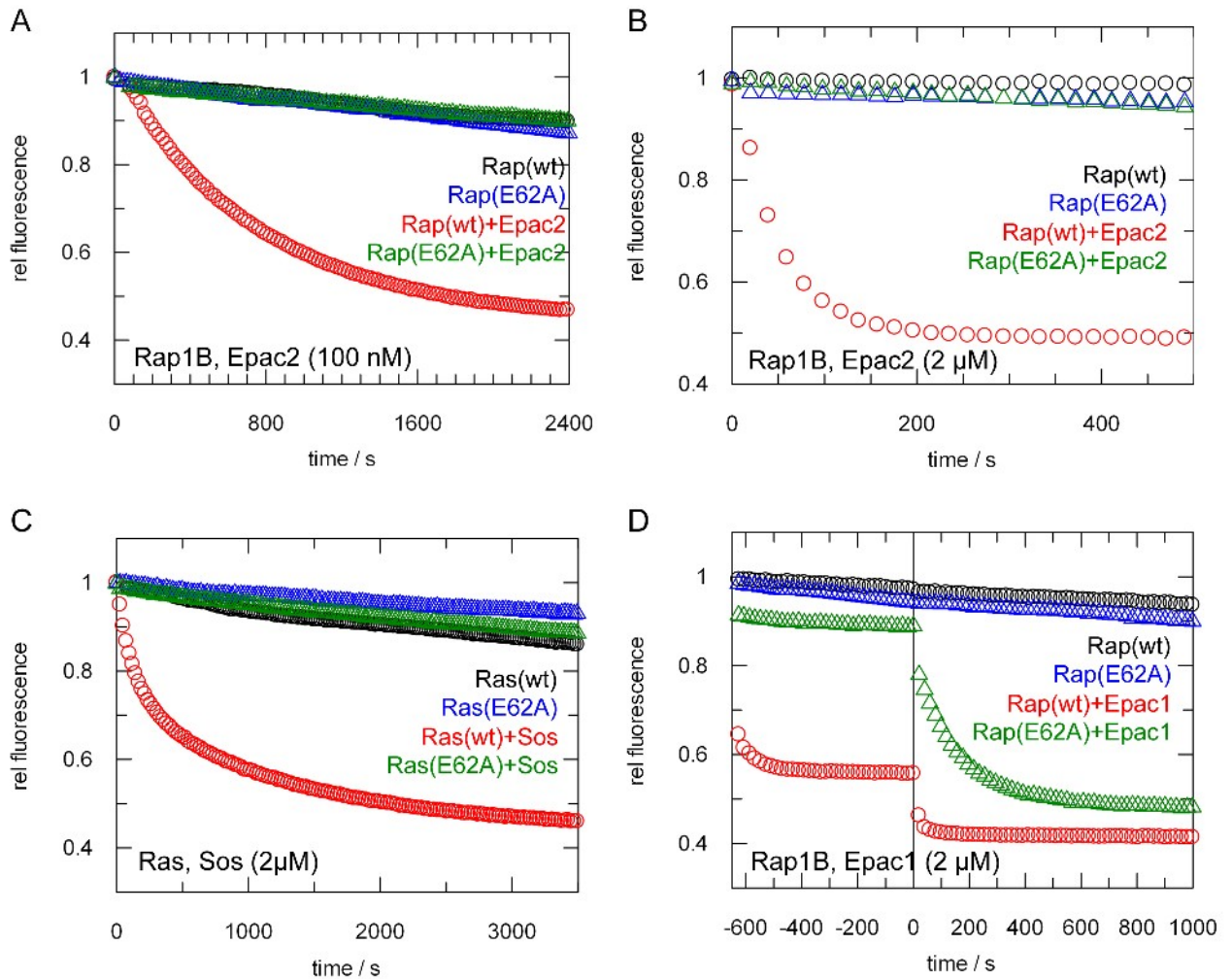
Es wurden Kristallansätze des Rap1A-Komplexes und des Rap1B-Komplexes bei 4°C und 25°C durchgeführt bei denen bisher keine Kristalle oder Kristallisationskeime beobachtet werden konnten.



**Abbildung 77: Interaktion zwischen Krit1 (266-736) und Rap Proteinen**

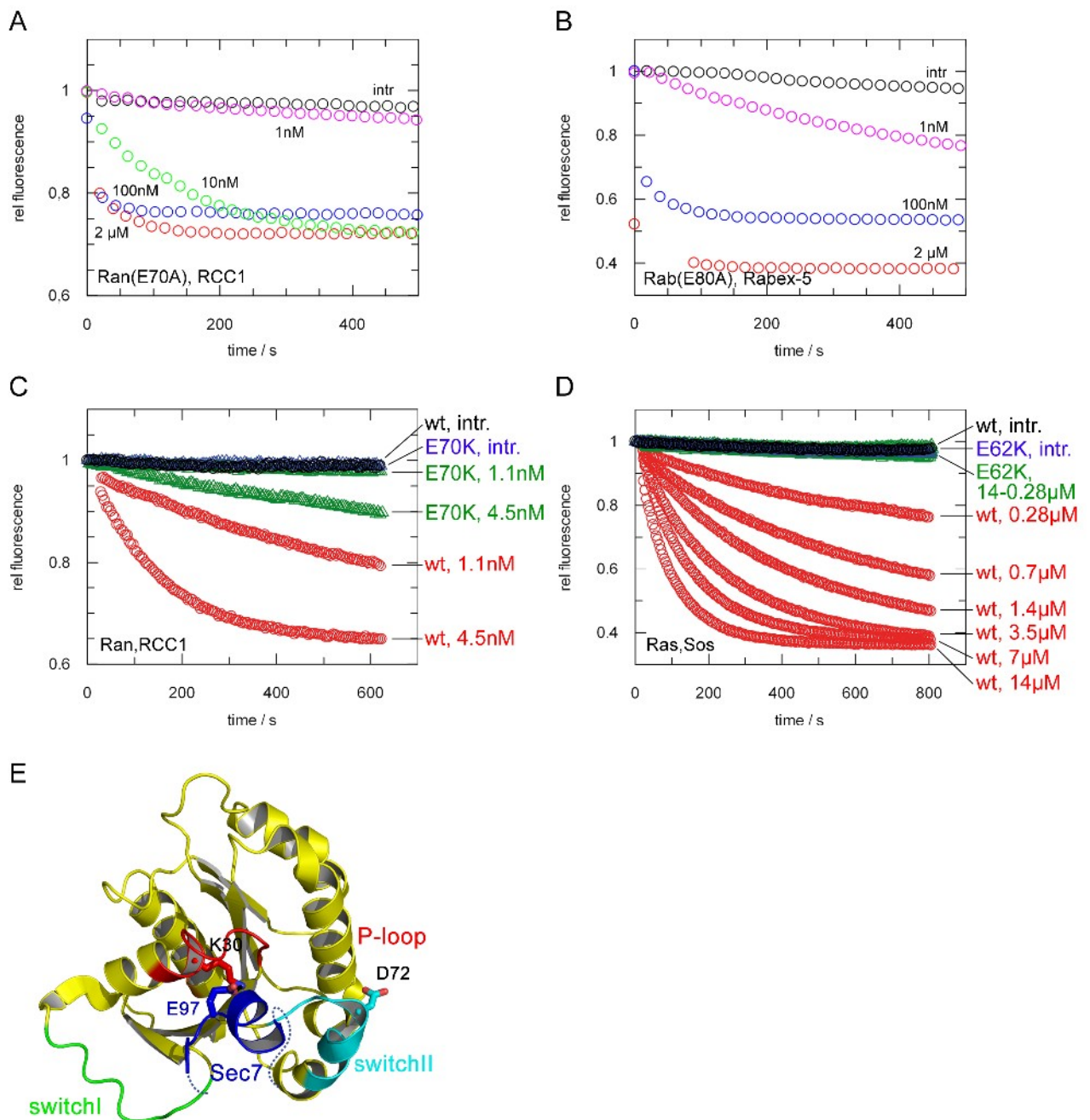
**A:** Sequenzvergleich von Krit1 mit anderen FERM-Domänen-Proteinen und RalGDS. Es ist nur der Bereich der Ubiquitin-Faltung gezeigt. Die angedeutete Sekundärstruktur ist der Struktur von Talin1 entnommen. Die vorhergesagten Sekundärstrukturelemente von Krit1 sind mit roten ( $\beta$ -Faltblatt) und grünen ( $\alpha$ -Helix) Rechtecken markiert. **B, C, D:** Analytische Gelfiltrationen (S200 10/30) von 0.5 mg (77  $\mu$ M) Krit1 mit 2-fachem molarem Überschuss von Rap (oberes Gel) bzw. 1 mg (155  $\mu$ M) Krit1 mit 2-fachem molarem Unterschuss von Rap (unteres Gel). **B:** Rap1A\*GNP, **C:** Rap1B\*GNP, **D:** Rap2A\*GNP.

## 8.2 Die Funktion des essenziellen Glutamats in der GEF-Katalyse



### Katalyse bei höherer GEF-Konzentration

**A:** GEF-Versuch mit Rap1B und 100 nM Epac2. **B:** Reaktion von Rap1B und 2 μM Epac2. **C:** GEF-Katalyse von Ras mit 2 μM Sos. **D:** Reaktion von Rap1B mit 2 μM Epac1. Aufgrund der starken Verschiebung des Gleichgewichts zum dimeren Rap\*Epac1-Komplex, wurde auch der Bereich vor Zugabe (Zeitpunkt 0) von GDP dargestellt.



### Weitere Messungen zur Funktion des konservierten Glutamats

**A:** GEF-Katalyse von Ran (E70A) bei mehreren Konzentrationen von RCC1. **B:** Katalysierter Nt-Austausch von Rab5 (E80A) nach Zugabe von unterschiedlichen Rabex-5-Konzentrationen. **C,D:** Ladungsumkehrung durch Mutation von E→K (grün) in Ran (C) und Ras (D). Messung von verschiedenen GEF-Konzentrationen (modifiziert nach C. Thomas, Dissertation). **E:** Struktur von Arf1 im Komplex mit Sec7 (nicht gezeigt). Das katalytische Glutamat wird *in trans* von Sec7 (blau) bereitgestellt (kein pdb-Eintrag, (88)).



Anhang

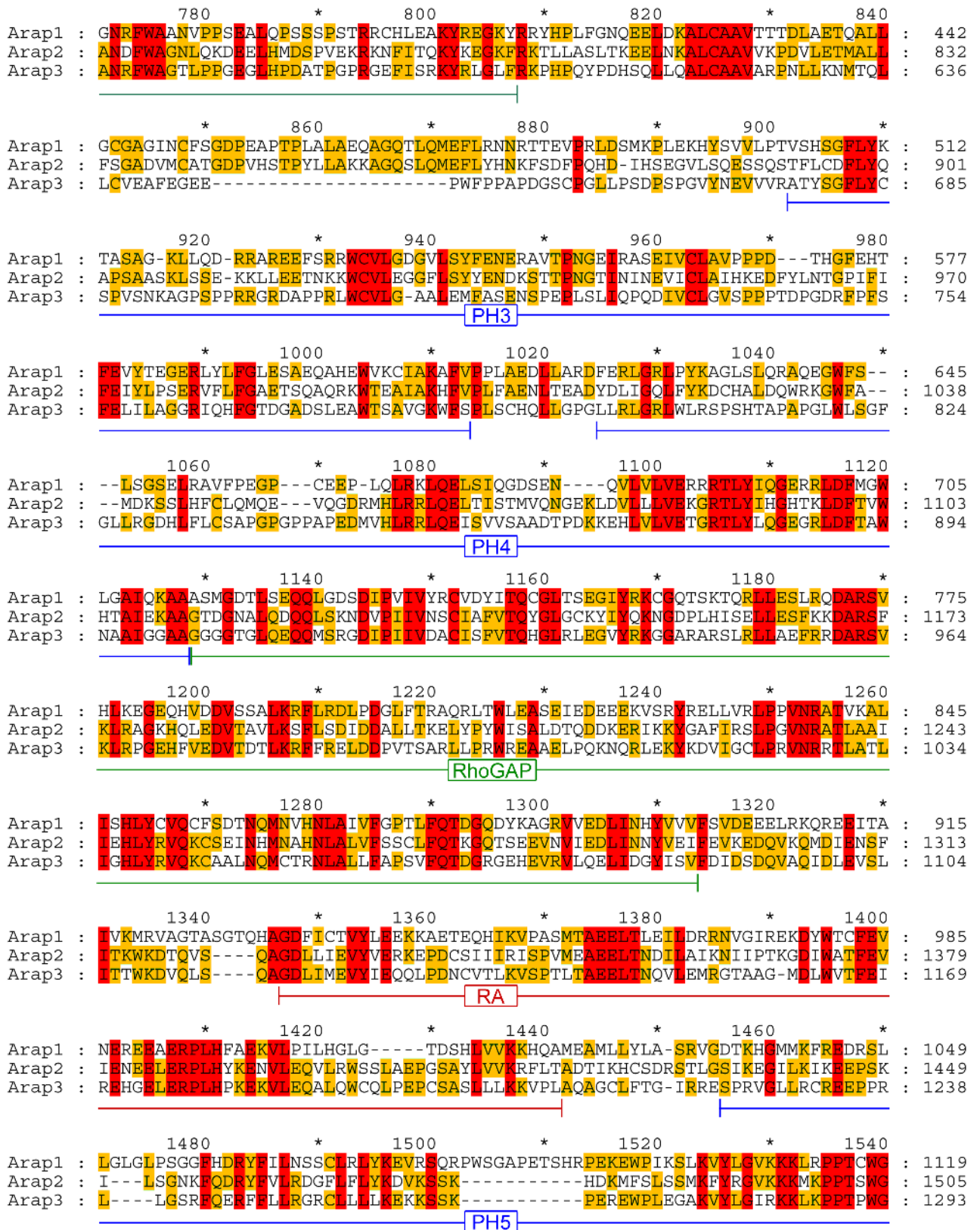
HRAS	: -TCLDILDTAGQDEEYS--AMRDQYMRTGEG	: 77	ARL13A	: ---EISYIDLNIDIKGREAWPNYYAQHGLV	: 93
NRAS	: -TCLDILDTAGQDEEYS--AMRDQYMRTGEG	: 77	ARL13B	: -KFEVTFIDDLGGQIRIR--GWNKYYAESYG	: 91
KRAS	: -TCLDILDTAGQDEEYS--AMRDQYMRTGEG	: 77	ARL14	: -NFSITVWVGVGQEKMR--TWGVCYCENTDG	: 84
MRAS	: -WAIIDVLTAGQDEEFS--AMREQYMRTGDG	: 87	ARL15	: --AIDNVKELGADNIR--KYWSRYYQGSQG	: 102
RRAS1	: -PARIDILDTAGQDEFG--AMREQYMRAGHG	: 103	ARL16	: ---KTTRELGCQMG--PIWSSYYGNCRSLL	: 102
RRAS2	: -AARIDILDTAGQDEFG--AMREQYMRTGEG	: 88	ARL17	: ---TFAMVWVGVSHFKIRPLWQHFFQNTKGAR	: 89
DIRAS1	: -VCTIQITDTTGGSHQFP--AMQRLSISKGHA	: 81	ARFRP	: --ARIMFMDLGGQDELO--SNDWKYYAECHG	: 95
DIRAS2	: -ICTIQITDTTGGSHQFP--AMQRLSISKGHA	: 81	RAB1A	: -TIKIQIWDTAGCERFR--TTSYYRGAHG	: 86
ERAS	: -DCIINVLTAGQAIHR--ARDQCLAVCDG	: 115	RAB1B	: -TIKIQIWDTAGCERFR--TTSYYRGAHG	: 83
RASD1	: -VYQIDILDTSGNHFPF--AMRRLSILTGDV	: 98	RAB2A	: ----IQIWDTAGCESFR--STRSYYRGAAG	: 81
RHEB	: -EYHQQLVDTAGQDEYS--IFPQTYSIDING	: 80	RAB2B	: ----IQIWDTAGCESFR--STRSYYRGAAG	: 81
RIT1	: -PANIDILDTAGQAEFT--AMRDQYMRAGEG	: 95	RAB3A	: -RIKIQIWDTAGCERYR--TTTAYYRGAMG	: 97
RIT2	: -PAYIDILDTAGQAEFT--AMREQYMRGEG	: 94	RAB3C	: -RIKIQIWDTAGCERYR--TTTAYYRGAMG	: 105
RAP1A	: -QCMIEILDTAGTEQFT--AMRDLYMKNKGQG	: 77	RAB3B	: -RVKIQIWDTAGCERYR--TTTAYYRGAMG	: 97
RAP1B	: -QCMIEILDTAGTEQFT--AMRDLYMKNKGQG	: 77	RAB3D	: -RIKIQIWDTAGCERYR--TTTAYYRGAMG	: 97
RAP2A	: -PSVIEILDTAGTEQFA--SMRDLYIKNGQG	: 77	RAB4A	: ----IQIWDTAGCERFR--STRSYYRGAAG	: 83
RAP2C	: -PSVIEILDTAGTEQFA--SMRDLYIKNGQG	: 77	RAB4B	: ----IQIWDTAGCERFR--STRSYYRGAAG	: 83
RAP2B	: -PSVIEILDTAGTEQFA--SMRDLYIKNGQG	: 77	RAB5A	: -TVKFEIWDTAGCERYH--SLAPMYRGAQA	: 95
RALA	: -EVQIDILDTAGQDEYA--ARDNYFRSGEG	: 88	RAB5C	: -TVKFEIWDTAGCERYH--SLAPMYRGAQA	: 96
RALB	: -EVQIDILDTAGQDEYA--ARDNYFRSGEG	: 88	RAB5B	: -TVKFEIWDTAGCERYH--SLAPMYRGAQA	: 95
REM2	: -EVTIVVYCIWEIGDAG--GARDHCLQTGDA	: 180	RAB6A	: -TVRLQIWDTAGCERFR--SLIPSYIRDSTV	: 88
REM1	: -DTTIVVVTWEAKLDKSWSQESCLQGGSA	: 156	RAB6C	: -TIGRLIWDTAGCERLR--SLIPRYIRDSAA	: 88
RHOA	: -QVEIALWDTAGQDEYDR--LRPLSYPDTDV	: 79	RAB6B	: -TVRLQIWDTAGCERFR--SLIPSYIRDSTV	: 88
RHOB	: -QVEIALWDTAGQDEYDR--LRPLSYPDTDV	: 79	RAB7A	: RLVTMQIWDTAGCERFQ--SLGVAFYRGADC	: 83
RHOC	: -QVEIALWDTAGQDEYDR--LRPLSYPDTDV	: 79	RAB7B	: TTLKIQIWDTAGCERFR--SLVSTFYKGS DG	: 83
RHOD	: -PVHSHIWDTAGQDDYDR--LRPLFYPDASV	: 91	RAB7L	: EIVRLQIWDIAGCERFT--STRLLYYRDASA	: 83
RHOF	: -EVTINLYBTAGQDEYDR--LRPLSYQNTHL	: 93	RAB8A	: -RIKIQIWDTAGCERFR--TTTAYYRGAMG	: 83
RHOG	: -TVNENLWDTAGQDEYDR--LRPLSYQNTNV	: 77	RAB8B	: -KIKIQIWDTAGCERFR--TTTAYYRGAMG	: 83
RHOH	: -QISIGIWDTAGNDAFRS--LRPLSYQQADV	: 78	RAB9A	: HFVTMQIWDTAGCERFR--SLRTPPFYRGSDC	: 82
RHOQ	: -QYLGLYDTAGQDEYDR--LRPLSYPMTDV	: 83	RAB9B	: RFVTMQIWDTAGCERFK--SLRTPPFYRGADC	: 82
RHOBTB1	: -SVSRLIWDTFGDHKK---DRRFAYGRSDV	: 102	RAB10	: -KIKIQIWDTAGCERFR--TTTAYYRGAMG	: 84
RHOBTB2	: -SVSRLIWDTFGDHKK---DRRFAYGRSDV	: 102	RAB11A	: ----AQIWDTAGCERYR--ATSAYYRGAVG	: 86
CDC42	: -PYTIGLFDTAGQDEYDR--LRPLSYPQTDV	: 77	RAB11B	: ----AQIWDTAGCERYR--ATSAYYRGAVG	: 86
RAC1	: -PVNIGLWDTAGQDEYDR--LRPLSYPQTDV	: 77	RAB12	: -KIRIQIWDTAGCERFN--STRSAYYRSAGK	: 117
RAC2	: -PVNIGLWDTAGQDEYDR--LRPLSYPQTDV	: 77	RAB13	: -KIKIQIWDTAGCERFR--TTTAYYRGAMG	: 83
RAC3	: -PVNIGLWDTAGQDEYDR--LRPLSYPQTDV	: 77	RAB14	: ----IQIWDTAGCERFR--AMTRSYRGAAG	: 86
RND1	: -RVEISLWDTSGSSFYDN--VRPLCYSDSDA	: 87	RAB15	: -KVRIQIWDTAGCERYQ--TTTKQYYRRAQG	: 83
RND2	: -RIEINMWDTS GSSFYDN--VRPLAYPDSDA	: 81	RAB17	: -SLKIEIWDTAGQEKYH--SVCHLYFRGANA	: 93
RND3	: -RIEISLWDTSGSSFYDN--LRPLSYPDSDA	: 97	RAB18	: ----LAIWDTAGCERFR--TTTAYYRGAQG	: 83
Wrch-1	: -PVRQLICDTAGQDEFDK--LRPLCYTNTDI	: 135	RAB19B	: VLLQMQIWDTAGCERFR--TTTQSYRSAHA	: 139
ROP1	: -TVNIGLWDTAGQDEYNR--LRPLSYRGADV	: 80	RAB20	: ----ISLWDTAGREQPHG--LGSMYCRGAAA	: 75
ROP2	: -TVNIGLWDTAGQDEYNR--LRPLSYRGADV	: 79	RAB21	: -RVNIALIWDTAGCERFH--ALGPIYYRDSNG	: 94
ROP3	: -TVNIGLWDTAGQDEYNR--LRPLSYRGADV	: 80	RAB22A	: -LHKFLIWDTAGCERFR--SLAPMYRGSAA	: 80
ROP4	: -TVNIGLWDTAGQDEYNR--LRPLSYRGADV	: 80	RAB23	: -DVRMLIWDTAGQDEFD--ATKAYYRGAQA	: 84
ROP5	: -TVNIGLWDTAGQDEYNR--LRPLSYRGADV	: 80	RAB24	: -TVTIGIWDTAGSERYE--ASRIYYRGAKA	: 83
ROP6	: -TINIGLWDTAGQDEYNR--LRPLSYRGADV	: 80	RAB25	: ----AQIWDTAGLERYR--ATSAYYRGAVG	: 87
ROP7	: -TVNIGLWDTAGQDEYNR--LRPLSYRGADV	: 80	RAB26	: -KVKIQIWDTAGCERFR--STHAYYRDAHA	: 139
ROP8	: -TVNIGLWDTAGQDEYNR--LRPLSYRGADV	: 92	RAB27A	: -RIHQLIWDTAGCERFR--STTAFFRDAMG	: 94
ROP9	: -IVNIGLWDTAGQDEYSR--LRPLSYRGADI	: 80	RAB27B	: -KVHQLIWDTAGCERFR--STTAFFRDAMG	: 94
ROP10	: -TVNIGLWDTAGQDEYNR--LRPLSYRGADV	: 82	RAB28	: LNVTIQIWDIGSQIIGG--KMDKIYGAQGV	: 89
ROP11	: -TVNIGLWDTAGQDEYNR--LRPLSYRGADV	: 82	RAB30	: ----IQIWDTAGCERFR--STQSYRSANA	: 84
RAN	: -PIKFNVDIWDTAGQEKFG--GARDGYYIOAQC	: 85	RAB31	: -LHKFLIWDTAGCERFR--SLAPMYRGSAA	: 80
ARF1	: --ISFTVWVGVGGQDKIR--PWRRHYFQNTQG	: 87	RAB32	: TLVRLQIWDIAGCERFG--NMTRVVYKEAVG	: 101
ARF3	: --ISFTVWVGVGGQDKIR--PWRRHYFQNTQG	: 87	RAB33A	: ----IQIWDTAGCERFRK--SMVEHYRNVHA	: 112
ARF4	: --ICFTVWVGVGGQDRIR--PWKKHYFQNTQG	: 87	RAB33B	: ----IQIWDTAGCERFRK--SMVQHYRNVHA	: 109
ARF5	: --ICFTVWVGVGGQDKIR--PWRRHYFQNTQG	: 87	RAB34	: -PFSIQIWDTAGCERFRK--CFASTYYRGAQA	: 127
ARF6	: --VKFNVDVGVGGQDKIR--PWRRHYFQNTQG	: 83	RAB35	: -KVKIQIWDTAGCERFR--TTTSTYYRGTHG	: 83
ARL1	: --LKFQVWDLGQTSIR--PYWRCYYSNTDA	: 87	RAB36	: -PYSIQIWDTAGQEKFK--CFASTAYYRGAQV	: 198
ARL2	: --FKINVDVGVGGQKSLR--SYWRNYFESTDG	: 86	RAB37	: -RVKIQIWDTAGCERFR--STHAYYRDAQA	: 105
ARL3	: --FKINVDVGVGGQKIR--PYWKNYFENTDI	: 87	RAB38	: TVVRLQIWDIAGCERFG--NMTRVVYREAMG	: 85
ARL4A	: -TVTIFHWVGVGGQKLR--PWKSYTRCTDG	: 95	RAB40A	: -RVKIKLWDTSSCGRFC--TTFRSYYRGAQG	: 89
ARL4C	: -GISCHFVWVGVGGQKLR--PWKSYTRCTDG	: 88	RAB40B	: -RVKIKLWDTSSCGRFC--TTFRSYYRGAQG	: 89
ARL4D	: -GITFQVWVGVGGQKLR--PWKSYTRCTDG	: 96	RAB40C	: -RVKIKLWDTSSCGRFC--TTFRSYYRGAQG	: 89
ARL5A	: --TRFLMWDIGGQESLR--SSWNTYYTNTDF	: 86	RAB41	: -IVQLQIWDTAGCERFR--SLIPSYIRDSTI	: 96
ARL5B	: --THFLMWDIGGQESLR--SSWNTYYTNTDF	: 86	RAB43	: ----IQIWDTAGCERFR--TTTQSYRSANG	: 93
ARL6	: --LSFTVDFMGGQGRYR--NWEHYKKGQA	: 89	SEC4	: -KVKIQIWDTAGCERFR--TTTAYYRGAMG	: 95
ARL8A	: --VTIKLWDTGGQPRFR--SMWERYCRGVSA	: 91	RAGA	: -NLVNLWDCGGQDPTFMEYFTS--QRDNIF	: 82
ARL8B	: --VTIKLWDTGGQPRFR--SMWERYCRGVNA	: 91	RAGB	: -NLVNLWDCGGQDPTFMEYFTS--QRDNIF	: 143
ARL9	: --SQMFEIIGGSKPFR--SYWEMYLSKGLL	: 89	RAGC	: -FVNFQIWDFFQMDFFDPTFDYEMIFRGTG	: 138
ARL10	: --FEIDILEIGSQNLR--FYWKEFVSEVDV	: 148	RAGD	: -FVNFQIWDFFQMDFFDPTFDYEMIFRGTG	: 139
ARL11	: -HVSITLWVGVGGQAPLR--ASWKDYLEGTDI	: 83			

Alignment des G3-Motivs aller G Proteine der Ras-Superfamilie  
 Alignment der Region um das konservierte Glutamat (blau). Einteilung nach Subfamilien.





Anhang



```

          *           1560           *           1580           *           1600           *
Arap1 : FTIVVHETEKHEKQQWYLCDDTQMLELREWTFATFLFVQHDGLVWPESEPSRVSRVAVP-EVRLGVSVLIIFLR-- : 1186
Arap2 : LTAY-----SEKHHWHICDSSQTQTEWMTSIFIAQHEYDIWEPAGKERKRSITKNPKIGGLPIIPIQHE : 1570
Arap3 : FTLI-----LEKMHLYLSCDDEEMWDWTTSILKAQHD-DQQFVVLRRHSSSDLARQKFGTmplLPIRGD : 1357
      └──────────────────────────────────────────────────────────────────────────────────┘

          1620           *           1640           *           1660           *           1680
Arap1 : GSENMRRSVAAFTADPLSLLRNV----- : 1210
Arap2 : GNATLARKNIESARAELERLRLEKCDKESVDSSLKERASMVHCLFHH-----KDDKLRNRP : 1627
Arap3 : DSGATLLSANQTLRRLHNRRTLSMFFPMKSSQGSVEEQEELPEPVYEEFPVYEEVGAFPELIQDTSTSFST : 1427

          *           1700           *           1720           *           1740           *
Arap1 : ----- : -
Arap2 : RKHRSFNCLEDTEPEAPLGQPKGHKG-----LKTLRKTEDRNSKATLDSDHKLPSRVIEELNVVLQRSR : 1691
Arap3 : TREWTVKPENPLTSQKSLDQPFLSKSSSTLGQEERPPEPPPPGPPSKSSPQARGSLLEEQLLQELSSLILRKG : 1497

          1760           *           1780           *
Arap1 : ----- : -
Arap2 : TLPKELQDEQILK----- : 1704
Arap3 : ETTAGLGSPPSQSSPQSPSPTGLPTQTPGFPTQPPCTSSPPSSQPLT : 1544

```

### Sequenzvergleich von Arap1,2 und Arap3

Alignment von Arap1 (Isoform 1), Arap2 und Arap3. Die Domänenvorhersage basierend auf der *Smart*-Datenbank ist eingezeichnet.

## 8.4 Sequenzalignment Rin-Proteine

```

Rin1_1 : -----*-----20-----*-----40-----*-----60-----*----- : 20
Rin2_2 : MLDFSQESTLFPREARKRTSFQPQVWRNFTASQTTEPACSGASLGEMTAWTMGARGLDKRGSFVKLID : 71
Rin3_1 : -----MIRHACAPARCDPTGVPV : 18

Rin1_1 : -----80-----*-----100-----*-----120-----*-----140----- : 65
Rin2_2 : TTCHLARPKPAQDPLYDVP-----NASGGQAGGEPQRPG-----RVVSLRERILLT : 142
Rin3_1 : TIASEIGHLKQEMVRTDVENLENGLEPAETHSMVRHKDCGYSEEDVKTCCARDSGYDSLNRSLILDRLLHT : 59
Rin3_1 : VVCKGEEHEEEDGMRLCL-----P-ANPKNCLPHRR : 59

Rin1_1 : -----160-----*-----180-----*-----200-----*----- : 135
Rin2_2 : REVWLQIQANAAAALHMLRTEPPGTFLVRKSNTRCQALCMRLP-EASGPSFVSSHYLESPGGVSLGSE : 211
Rin3_1 : HPIWLQSLSEEEAAEVLQAQPPGIFLVHKS TKMQKKVLSLRLP--CEFGAPLKEFAIKESTYTFSLGSSG : 130
Rin3_1 : CPVWLQSLGQAEVARIHRVAVAGMFLVRDSSSKQLVLCVHFESLNESSAEVLEYTIKHEKSILYLEGSA : 130
SH2

Rin1_1 : -----220-----*-----240-----*-----260-----*-----280----- : 205
Rin2_2 : LMFPELVQLICAYCHTRITLLPLQLFRATHHATHKELEAISHLGIEFWSSSLNIIKAQRG-PAGGFVLPO : 282
Rin3_1 : ISFADLFRLLIAFYCISRDVLPFTLKLPIAISTAKSEAQLLELAQMGLNFWSSPADSKPPNLPVPHRPLSSD : 200
Rin3_1 : LVFEELFRLLIAFYCVSRDLIPFTLRLEQAILEASSFTDLETIANLGLGEWDSLNPQERGKPAEPRDR- : 200

Rin1_1 : -----300-----*-----320-----*-----340-----*----- : 250
Rin2_2 : GVCPLASLRQLCLINGVHSIKTRTPSELECSQTNGALCFINPLFLKVHSDQLSGG-----LKRPPSTRTPN : 346
Rin3_1 : ---APGFPLVSSLRPTAHDANCACIELSVGNDRILWFVNEIFIEDCSSALPTDQPPLGNCPARPLPPTS : 267

Rin1_1 : -----360-----*-----380-----*-----400-----*-----420----- : 271
Rin2_2 : TETSSPLSPFAVPPPPVPLP-----SHTSPRLARTETQTSMPETVNHNKHG-- : 393
Rin3_1 : ANGTERTRSPPPRPPPAIN-----ATSPTRSWARRRPPPPVPLPQLPCSPAQPPVLPALAPAPACPLP : 338
Rin3_1 : TSPVVPAPHVTPHAPGPPDPHPNQPPM : 338

Rin1_1 : -----440-----*-----460-----*-----480-----*----- : -
Rin2_2 : -----NVALPGTKPTPIPPR-----LKKQASFLAEAGG : 422
Rin3_1 : MTCERLPCPTAGLGPLREEAMKPGAASSPLQQVPAPPLPAKKNLPTAPPPRRVRSERVSLEDQSPGMAAEGD : 409

Rin1_1 : -----500-----*-----520-----*-----540-----*-----560----- : -
Rin2_2 : AKTLSGGRPGA GPELELG-----TAGSPGGAPP : 450
Rin3_1 : QLSLPPQGTSDGPEDTPRESTEQGDTEVKASDPHSMPELPRTAQKQPVPPPRKKRISRQLASTLPAPLEN : 480

Rin1_1 : -----580-----*-----600-----*-----620-----*-----64----- : 326
Rin2_2 : ---GAVPSQT-----ERLPPCQLLRRESVSGYRVPAGSGPSLPPMPSLQEVDCGSPSSSEEG--- : 514
Rin3_1 : ---EAAPGDCTRAPPESSSRPPCHGGRQLSDMSISTSSDSLDFDRSMPLFGYEADTNSLLEDYE--- : 551
Rin3_1 : AELCTQAMALETPTPGPREGQSPASQAGTQHPPAQAHAHQSSPEFKGSLASLSDSLGVSMATDQDSYS : 551

Rin1_1 : -----660-----*-----680-----*-----700-----*----- : 385
Rin2_2 : -----VPGSRGSEATSPHLGRRRPLLRSMASAAFCSLLAPERQVGRAAAAIMQDRHTAAGQLVQD : 584
Rin3_1 : -GESDQETMAPPKSKKRS SSVFLPKLVKSQLOKQVSGVSSFMTPPKRMVRRIAELSRDKCTYFGCLVQD : 622
Rin3_1 : TSSTEELEQFSSPSVKKKPSMILGKARHRLSFASFSSMFAFLSNNRKLKLVVLAQDKGSYFGSLVQD : 622
RH

Rin1_1 : -----720-----*-----740-----*-----760-----*-----780----- : 446
Rin2_2 : LLTQVRDQQ---R-PQELRQALSRRAMLSAELGPEKLVSEKRL-----EHVLEKSLHCSVLKPLRP : 654
Rin3_1 : YVSLQENKECHVSSDMLQTRQFMTQVKNYLSQSSSELDPPIESLIP-EDQIDVVLKAMHKCILKPLK : 693
Rin3_1 : YKVYSLEMMARQTSSTEMLQETRTMMTQLKSYLQSTELKALVDALHSEEELEAIVSALYKCVLKPLKE : 693

```

```

Rin1_1 : ILAAR*RRRRLA*ADGSLGR*LARGLRLARA*QGGAFGSHLSL*SPVLE*QVRQKLLQLV*RTYSPSAQVKRLLQ : 517
Rin2_2 : HVEAM*LKDFHMADG*SWKQ*LKENLQLV*RQRNPQELGV*FAPTDFV*DVEKIKV*KFMTM*QKMYSP*EKKVMLLLR : 725
Rin3_1 : AINSC*HQIH*SKDGS*LQQLKEN*QLVILATTTTDL*GVTT*SVPEV*PMM*EKILQ*KFTSM*HKAYS*PEKKIS*ILK : 764

Rin1_1 : ACKL*L*MALRT-QE*EGSGAD*GFLPL*LSVLA*HCDLPE*LLLEAE*YMS*ELLEPS*ILT*GEGGY*YLT*SLSAS*IA : 587
Rin2_2 : VCKL*I*YTVMEN-NS*CRMYGAD*DFL*PVLY*VIAQC*DMLELD*TEI*EYMM*BLLD*PSLL*HGEGGY*YLT*SAYGALS : 795
Rin3_1 : TCKL*I*YDSMALGN*PKPY*GADDFL*PVLY*VILARS*NLTEM*LLNVE*YMMEL*MDPAL*QLGEG*SYLT*TTYGALE : 835
Vps9

Rin1_1 : LLSGL*GQAHTL*PSPVQ*ELR*SLSLWE*QR-----L*PATHCF*HL*LRVAYQ*DSSG*CTSK*T*LAVPPEASIA : 653
Rin2_2 : LIKNF-Q*EEQAAR*LSS*STRD*TLRQ*WHKRR*TTN*R*TIPSV*DDF*ONY*LRVAF*QEVNS*GCTG*K*TLLVRP*YITTE : 865
Rin3_1 : HIKSY-D*KIT*TVTR*QLSV*EVQDS*IHRW*ERR*TLN*KARAS*RS*SVDF*ICV*SYLE*PEQ--Q*ART*LASRADTQAQ : 903

Rin1_1 : TLNQL*CATK*FRVTQ*ENTFGL*F*LYKEQ*GYHR*PPGALA*HRLP*TTGVLV*YRRAE*WPETQ*GAVTEEE*GSGQ*SEA : 724
Rin2_2 : DVCQI*CAEK*FKVGD*PEEYS*LFLF*VDET*WQQLA*EDTY*PQK*IKAE*LHSR*PQPHI*FHFV*YKRI*KNDPY*GII*FQN : 936
Rin3_1 : ALCAQ*CAEK*FAVER*EQAHR*L*FVLVD*GRCF*QLA*DDAL*PHCI*KGYL*LRSE*PKRD*FHFV*YRPLD*GGGG*GGG*SP : 974
RA

Rin1_1 : RSRGE*EQGCQ*GGDG*DAGVKAS*PRDIRE*QSETT*ABGGQ*GQAQ*EGPA*QPGE*PEAEGS*RAAEE : 783
Rin2_2 : GEEDL*TTS----- : 944
Rin3_1 : CLVVR*EPNFL----- : 984

```

### Sequenzvergleich von Rin1,2 und Rin3

Alignment von Rin1 (Isoform 1), Rin2 (Isoform 2) und Rin3 (Isoform 1). Die Domänenvorhersage basiert auf der *Smart*-Datenbank.



### 8.5 Sequenzalignment Ras-Proteine

	*	20	*	40	*	60	
NRas	:	-----	-----	-----	MTEYKLVVVVGGAGGVGKSALTIQLIQNHFVD	:	30
HRas	:	-----	-----	-----	MTEYKLVVVVGGAGGVGKSALTIQLIQNHFVD	:	30
KRas	:	-----	-----	-----	MTEYKLVVVVGGAGGVGKSALTIQLIQNHFVD	:	30
MRas	:	-----	MATSAV-----	-----	PSDNLPTYKLVVVVGGDGGVGSALTIQFFQKIFVP	:	40
TC21	:	-----	MAAAG-----	WRDGS-----	QEKYRLVVVGGGGVGSALTIQFIQSYFVT	:	41
RRas	:	-----	MSSGAASGTGRGRPRGGGPGDPPPSETH	-----	KLVVVVGGGGVGSALTIQFIQSYFVS	:	56
Rap1A	:	-----	-----	-----	MREYKLVVLSGGVGSALTVQFVQGIFVE	:	30
Rap1B	:	-----	-----	-----	MREYKLVVLSGGVGSALTVQFVQGIFVE	:	30
Rap2A	:	-----	-----	-----	MREYKVVVLSGGVGSALTVQFVTGTFIE	:	30
Rap2B	:	-----	-----	-----	MREYKVVVLSGGVGSALTVQFVTGTFIE	:	30
Rap2C	:	-----	-----	-----	MREYKVVVLSGGVGSALTVQFVTGTFIE	:	30
RalA	:	-----	MAANKP-----	K-----	GQNSLALHKVIMVSGGVGSALTLQFMDFEVE	:	41
RalB	:	-----	MAANKS-----	K-----	GQSSLALHKVIMVSGGVGSALTLQFMDFEVE	:	41
DiRas1	:	-----	-----	-----	MPE-QSNDYRVVVVFGAGGVGSLSLVRVFKGTFRD	:	34
DiRas2	:	-----	-----	-----	MPE-QSNDYRVAVFGAGGVGSLSLVRVFKGTFRD	:	34
DiRas3	:	---	MGNASFGSKEQKLLKRLRLLPALLILRAFKPHRKIR	-----	YRVVVVGTAGVGKSTLLHKWASGNFRH	:	64
RIT1	:	-----	MDSGTR-----	PVGS-----	CCS-SPAGLSREYKLVMLGAGGVGSAMTMOFISHRFPE	:	48
RIT2	:	-----	MEVEN-----	EASC-----	SPGSAGGSREYKVVMLGAGGVGSAMTMOFISHQFPD	:	47
ERas	:	MELPTKPGT	FDLGLATWSPSQGETHRAQARRRDVGRQLPEY	-----	KAVVVVGSAGGVGSALTIQLNHQCFVE	:	68
Rheb	:	-----	-----	-----	MPQS--KSRKIAILGYRSVGKSLTIQFVGEQFVD	:	33
Rheb1	:	-----	-----	-----	MPLV--RYRKVVILGYRCVVKTSLAHQFVEGEFSE	:	33
Rheb1c	:	-----	-----	-----	MWMD--DLDTTVTLLP--TGKTSLAHQFVEGEFSE	:	31
REGG	:	-----	-----	-----	MAKS--AEVKLAIFGRAGVGKSLVVRFLTGRFIW	:	33
RasL12	:	-----	-----	-----	MSSVFGKPRAGSGPQSAP--LEVNLAILGRGAKSALT	:	47
RasL11A	:	-----	-----	-----	MRPLSMGHFLLAPIP--ESSDYLLPKD---	:	54
RasL11B	:	-----	-----	-----	MRLIQNMCTIAEYPAPGNAAASDCCVGAAGRRLV	:	60
NKI_Ras1	:	-----	-----	-----	MGKGCQVVVCGLLSVGKTAILEQLLYGNHTI	:	31
NKI_Ras2	:	-----	-----	-----	MGKSCQVVVCGQASVGKTSILEQLLYGNHV	:	31
RasD1	:	-----	-----	-----	MKLAAMIKKMCPDSELSIPAKNCYRMVILGSSKVGKTA	:	51
RasD2	:	-----	-----	-----	MMKTLSSGNCTLSVPAKNSYRMVVLGASRVGKST	:	46
RasL10A	:	-----	-----	-----	MGGSLRVAVLGAAPGVGKTAITRQFLFGDYPE	:	31
RasL10B	:	-----	-----	-----	MVSTYRVAVLGARVGKSAITVRQFLVNEEISE	:	31

#### Walker A (G1)

	*	80	*	100	*	120	*	
NRas	:	---EYDPTIEDSYRKQVVID-GETCLDILDTAG-----	---	QEEYSAMRDQYMRGTGEGFLCVFAINN	:	86		
HRas	:	---EYDPTIEDSYRKQVVID-GETCLDILDTAG-----	---	QEEYSAMRDQYMRGTGEGFLCVFAINN	:	86		
KRas	:	---EYDPTIEDSYRKQVVID-GETCLDILDTAG-----	---	QEEYSAMRDQYMRGTGEGFLCVFAINN	:	86		
MRas	:	---DYDPTIEDSYLKHTEID-NQWAIIDVLDTAG-----	---	QEEFSAMREQYMRGTGEGFLVVSVD	:	96		
TC21	:	---DYDPTIEDSYTKQCVID-DRAARLDILDTAG-----	---	QEEFGAMREQYMRGTGEGFLVVSVD	:	97		
RRas	:	---DYDPTIEDSYTKICSVD-GIPARDILDTAG-----	---	QEEFGAMREQYMRAGHGFLVFAIND	:	112		
Rap1A	:	---KYDPTIEDSYRKQVEVD-CQQCMIEILDAG-----	---	TEQFTAMRDLYMKNGQGFALVVSITA	:	86		
Rap1B	:	---KYDPTIEDSYRKQVEVD-AQQCMIEILDAG-----	---	TEQFTAMRDLYMKNGQGFALVVSITA	:	86		
Rap2A	:	---KYDPTIEDFYRKEIEVD-SSPSVLEILDAG-----	---	TEQFASMRDLYIKNGQGFILVSVLN	:	86		
Rap2B	:	---KYDPTIEDFYRKEIEVD-SSPSVLEILDAG-----	---	TEQFASMRDLYIKNGQGFILVSVLN	:	86		
Rap2C	:	---KYDPTIEDFYRKEIEVD-SSPSVLEILDAG-----	---	TEQFASMRDLYIKNGQGFILVSVLN	:	86		
RalA	:	---DYEPTKADSRYRKKVVD-GEEVQDILDTAG-----	---	QEDYAAIRDNYFRSGEGFLCVFSITE	:	97		
RalB	:	---DYEPTKADSRYRKKVVD-GEEVQDILDTAG-----	---	QEDYAAIRDNYFRSGEGFLVFSITE	:	97		
DiRas1	:	---TYIPTIEDTYRQVISCD-KSVCTQITDTTG-----	---	SHQFPAMQRLSISKGHAFILVVSITS	:	90		
DiRas2	:	---SYIPTVEDTYRQVISCD-KSICTQITDTTG-----	---	SHQFPAMQRLSISKGHAFILVVSITS	:	90		
DiRas3	:	---EYLPTIENTYQQLGCS-HGVLSEHITDSKS-----	---	GDGNRALQRHVIARGHAFVLVSVTK	:	120		
RIT1	:	---DHDPTIEDAYKIRIRID-DEPANLILDTAG-----	---	QAEFTAMRDQYMRAGEGFIIICYSITD	:	104		
RIT2	:	---YHDPTIEDAYKTQVRID-NEPAYLILDTAG-----	---	QAEFTAMREQYMRGEGGFIIICYSVTD	:	103		
ERas	:	---DHDPTIQDSYWKELTLD-SGDCINVLDTAG-----	---	QAIHRALRDQCLAVCDGVLGVFALDD	:	124		
Rheb	:	---SYDPTIENTFTKLITVN-GQEYHQLVDTAG-----	---	QDEYSIFPQTYSIDINGYILVVSITS	:	89		
Rheb1	:	---GYDPTVENTYSKIVTLG-KDEFHLHLVDTAG-----	---	QDEYSILPYSFIIGVHGYYLVVSVTS	:	89		
Rheb1c	:	---GYDPTVENTYSKIVTLG-KDEFHLHLVDTAG-----	---	QDEYSILPYSFIIGVHGYYLVVSVTS	:	87		
REGG	:	---EYDPTLESTYRHOATID-DEVVSEILDAG-----	---	QEDTIQREGHMRWGEGFVLVVDITD	:	88		
RasL12	:	---EYDPNLEDYSSEETVD-HQPVHLRVMDTAD-----	---	LDTPRNCERYLNWAHAFLVVSVD	:	102		
RasL11A	:	---DYEPNTGKLYSRLVYVE-GDQLSQQIQDTPGGV- QIQDQLPQVVDLSLKCQVWAEGLLVVSITD	---	QVHENSLSQSEQLNRCIRWADAVVIVFSITD	:	117		
RasL11B	:	---DYERNAGNLYTRQVQIE-GETLALQVQDTPG-I- QVHENSLSQSEQLNRCIRWADAVVIVFSITD	---	QVHENSLSQSEQLNRCIRWADAVVIVFSITD	:	122		
NKI_Ras1	:	GMEDCETMEDVYMASVETDRGVKEQHLHYDTRG- LQEGVELPKHYFSPADGFVLVVSINN	---	LQEGVELPKHYFSPADGFVLVVSINN	:	90		
NKI_Ras2	:	GSEMIETQEDIYVGSLETDRGVREQRFYDTRG- LRDGAELPRHCFSCDTGYYLVVSTDS	---	LRDGAELPRHCFSCDTGYYLVVSTDS	:	90		
RasD1	:	---AYTPT-IEDFHRKVFYSIRGEVYQDILDTSGNH- PFPAMRRLSILTDGDFILVFSLDN	---	PFPAMRRLSILTDGDFILVFSLDN	:	107		
RasD2	:	---QYTPT-IEDFHRKVFYINIRGDMYQDILDTSGNH- PFPAMRRLSILTDGDFILVFSLDN	---	PFPAMRRLSILTDGDFILVFSLDN	:	102		
RasL10A	:	---RHRPTDGPRLYRPAVLLDGAVYDLSIRDGDVAGPGSSPGPEWPDAKDWSLQDQDFAFVLVVDICS	---	RHRPTDGPRLYRPAVLLDGAVYDLSIRDGDVAGPGSSPGPEWPDAKDWSLQDQDFAFVLVVDICS	:	97		
RasL10B	:	---VCVPTTARRLYLPAVVMNGHVHDQLLDFPPIS-AFPVNTLQEWADTCCRGLRSVHAYILVVDICC	---	VCVPTTARRLYLPAVVMNGHVHDQLLDFPPIS-AFPVNTLQEWADTCCRGLRSVHAYILVVDICC	:	96		

„T35“ (G2)

Walker B (G3) „Q61“

	140	*	160	*	180	*	200																																											
NRas	: SKS	FADINLYRE	QIKRVK	DSDD	-----VPMVL	VGNKCDLP	-TRT	VDTKQ	AHELAKSYG	----IPF	: 141																																							
HRas	: TKS	FEDIHQYRE	QIKRVK	DSDD	-----VPMVL	VGNKCDLA	-ART	VESRQ	AQDLARSYG	----IPY	: 141																																							
KRas	: TKS	FEDIHHYRE	QIKRVK	DSDD	-----VPMVL	VGNKCDLP	-SRT	VDTKQ	AQDLARSYG	----IPF	: 141																																							
MRas	: KAS	FEHVDRFHQ	LILRVK	DRDE	-----FPMIL	VGNKADLDH	QRQV	TQEB	EGQLARQLK	----VTY	: 153																																							
TC21	: RGS	FEEIYKFQR	QILRVK	DRDE	-----FPMIL	VGNKADLDH	QRQV	TQEB	EGQLARQLK	----VTY	: 153																																							
RRas	: RQS	FNEVGKLF	TQILRVK	DRDD	-----FPVVL	VGNKADLES	QRQV	PRSE	EASAFGASHH	----VAY	: 168																																							
Rap1A	: QST	FNDLQDLRE	QILRVK	DTED	-----VPMIL	VGNKCDLE	DERV	VGKE	QGONLARQWCN	----CAF	: 143																																							
Rap1B	: QST	FNDLQDLRE	QILRVK	DTDD	-----VPMIL	VGNKCDLE	DERV	VGKE	QGONLARQWNN	----CAF	: 143																																							
Rap2A	: QQS	FQDIKPMRD	QILRVK	KRYEK	-----VPVIL	VGNKVDLES	EREV	SSSE	GRALAEEWG	----CPF	: 142																																							
Rap2B	: QQS	FQDIKPMRD	QILRVK	KRYER	-----VPMIL	VGNKVDLE	GERE	VSYS	EKGALAEEWS	----CPF	: 142																																							
Rap2C	: QQS	FQDIKPMRD	QILRVK	KRYEK	-----VPLIL	VGNKVDLE	PERE	VMSSE	GRALAEEWG	----CPF	: 142																																							
RalA	: MES	FAATADFRE	QILRVK	KEDEN	-----VPFLL	VGNKSDLED	KRQV	SVEE	EAKNRAEQWN	----VNY	: 153																																							
RalB	: HES	FTATAAEFRE	QILRVK	AEED	-----KIPLL	VGNKSDLE	ERRQ	VPVE	EARSKAEEWG	----VQY	: 154																																							
DiRas1	: KQS	LEELGP	-IYKLI	VQIKG	--S	----VED	IPVML	VGNK	CDLET	-QREVD	TRE	AAQVAQEWK	----CAF	: 146																																				
DiRas2	: RQS	LEELKP	-IYE	QICEIKG	-D	----VES	IPML	VGNK	CDLES	PSREV	QSS	EAEAL	TWK	----CAF	: 147																																			
DiRas3	: KET	LEELKA	-FYELI	CKIKGN	-N	----LHKF	PVIL	VGNK	SDDT	-HRE	VALND	GATCAMEWN	----CAF	: 177																																				
RIT1	: RRS	FHEVREFK	QLIYRVR	RTDD	-----TPVVL	VGNKSDLK	QLRQ	VTKE	EGLALAREFS	----CPF	: 160																																							
RIT2	: RQS	FQEA	AKFKEL	IFQVR	RHTYE	-----IPLVL	VGNKIDLE	QFRQ	VSTEE	GLSLAQEYN	----CGF	: 159																																						
ERas	: PSS	LIQL	---Q	IWATG	PHP	-----AQLPL	VGNKCDL	VTT	AGDA	AAAAAL	LAHSW	----AHF	: 177																																					
Rheb	: IKS	FEVIK	-IHGKL	LD	DMVGK	-----VQ	IPIML	VGNK	KDLHM	ERTI	SYE	EKGAL	AESWN	----AAF	: 145																																			
Rheb1	: LHS	FQVIES	-LYQKL	HEGHGK	-----TR	VPVVL	VGNK	ADL	SPERE	VQAVE	EKGK	LAESWG	----ATF	: 145																																				
Rheb1lc	: LHS	FQVIES	-LYQKL	HEGHGK	-----TR	VPVVL	VGNK	ADL	SPERE	VQAVE	EKGK	LAESWG	----ATF	: 143																																				
REERG	: RGS	FEEVLP	-LKNIL	DEIKKP	-----KN	VTL	VGNK	ADL	DHSR	QVSTEE	EKE	LATELA	----CAF	: 144																																				
RasL12	: RQS	FDS	SSSS	-YLELL	ALHAKETQ	----RS	IPALL	LGNK	LDMA	QYRQ	VTKAE	EGVAL	AGRF	----CLF	: 160																																			
RasL11A	: YDS	YLS	IRP	-LYQH	IRKVHPD	-----SK	APVI	I	VGNK	GDLL	HARQ	VQT	DGI	QLANELG	----SLF	: 173																																		
RasL11B	: YKS	YELISQ	-LHQH	VQQLHLG	-----TR	LPVVV	VAN	KADL	LHI	KQV	DPQL	GLQL	ASMLG	----CSF	: 178																																			
NKI_Ras1	: LES	FQ	RVELL	KKEID	KDKKE	-----VAIVL	VGNKIDL	SE	QRQV	DAEVA	QWAK	SEK	----VRL	: 146																																				
NKI_Ras2	: RES	FQ	RVELL	KKEID	KDKKE	-----VTIVL	VGNKCDL	QE	QRV	DPD	V	AQHW	AKSEK	----VKL	: 146																																			
RasD1	: RDS	FEEV	QRLR	QIL	DTK	SCLN	KNT	KEN	VDP	VPL	V	ICGN	KGDR	--DFY	REVD	QREIE	QLVG	DDP	QRCAY	: 173																														
RasD2	: RES	FDE	VKRL	QKIL	EVKS	SCLN	KNT	KEA	EL	PM	V	ICGN	KD	HG	-EL	CRQV	PTEA	ELL	VSGD	-ENCAY	: 168																													
RasL10A	: PDS	F	DYV	KALR	QRTA	ETR	-----PAGA	EAPIL	V	VGNK	RDR	--QRL	R	F	G	P	R	R	A	L	V	R	R	G	Y	: 156																								
RasL10B	: FDS	F	EYV	K	T	I	R	Q	I	L	E	T	R	-----VIG	T	S	E	T	P	I	I	V	G	N	R	D	L	--Q	R	G	R	V	I	P	R	N	V	S	H	L	V	R	K	T	-W	K	C	G	Y	: 155

## NkxD (G4)

	*	220	*	240	*	260	*																																																									
NRas	: IETS	AKTR	-QG	VEDA	F	YTL	VREI	R	-----	: 164																																																						
HRas	: IETS	AKTR	-QG	VEDA	F	YTL	VREI	R	-----	: 164																																																						
KRas	: IETS	AKTR	-QR	VEDA	F	YTL	VREI	R	-----	: 164																																																						
MRas	: IETS	AKDP	PLN	V	DKA	F	H	L	V	R	V	I	R	-----	: 176																																																	
TC21	: ME	S	AKIR	-M	N	V	Q	A	F	E	H	L	V	R	V	I	R	-----	: 176																																													
RRas	: F	R	ASAK	L	R	-L	N	V	D	E	A	F	E	Q	L	V	R	A	R	V	R	-----	: 191																																									
Rap1A	: L	E	S	A	K	S	K	-I	N	V	N	E	I	F	Y	D	L	V	R	Q	I	N	-----	: 166																																								
Rap1B	: L	E	S	A	K	S	K	-I	N	V	N	E	I	F	Y	D	L	V	R	Q	I	N	-----	: 166																																								
Rap2A	: M	E	T	S	A	K	S	K	-T	M	V	D	E	L	F	A	E	I	V	R	Q	M	N	-----	: 165																																							
Rap2B	: M	E	T	S	A	K	N	-A	S	V	D	E	L	F	A	E	I	V	R	Q	M	N	-----	: 165																																								
Rap2C	: M	E	T	S	A	K	S	K	-S	M	V	D	E	L	F	A	E	I	V	R	Q	M	N	-----	: 165																																							
RalA	: V	E	T	S	A	K	R	-A	N	V	D	K	V	F	D	L	M	R	E	I	R	-----	: 176																																									
RalB	: V	E	T	S	A	K	R	-A	N	V	D	K	V	F	D	L	M	R	E	I	R	-----	: 177																																									
DiRas1	: M	E	T	S	A	K	M	-Y	N	V	K	E	L	F	Q	E	L	L	T	L	E	T	R	-----	: 170																																							
DiRas2	: M	E	T	S	A	K	L	N	-H	N	V	K	E	L	F	Q	E	L	L	N	L	E	K	R	-----	: 171																																						
DiRas3	: M	E	I	S	A	K	T	D	-V	N	V	Q	E	L	F	H	M	L	L	N	Y	K	K	-----	: 201																																							
RIT1	: F	E	T	S	A	A	Y	R	-Y	I	D	D	V	F	H	A	L	V	R	E	I	R	R	K	E	-----	: 186																																					
RIT2	: F	E	T	S	A	A	L	R	-F	C	I	D	D	A	F	H	G	L	V	R	E	I	R	K	K	E	-----	: 185																																				
ERas	: V	E	T	S	A	K	R	-Q	G	V	E	E	A	F	S	L	L	V	H	E	I	Q	R	-----	: 201																																							
Rheb	: L	E	S	S	A	K	E	N	-Q	T	A	V	D	V	F	R	R	I	I	L	E	A	E	-----	: 168																																							
Rheb1	: M	E	S	S	A	R	E	N	-Q	L	T	Q	G	I	F	T	K	V	I	Q	E	I	A	-----	: 168																																							
Rheb1lc	: M	E	S	S	A	R	E	N	-Q	L	T	Q	G	I	F	T	K	V	I	Q	E	I	A	-----	: 166																																							
REERG	: Y	E	C	S	A	C	T	G	E	G	N	I	T	E	I	F	Y	E	L	C	R	E	V	R	-----	: 168																																						
RasL12	: F	E	V	S	A	C	L	D	F	E	H	V	Q	H	V	F	H	E	A	V	R	E	A	R	-----	: 184																																						
RasL11A	: L	E	I	S	T	S	E	N	Y	E	D	V	C	D	V	F	Q	H	L	C	K	E	V	S	-----	: 197																																						
RasL11B	: Y	E	V	S	V	S	E	N	Y	N	D	V	S	A	F	H	V	L	C	K	E	V	S	-----	: 202																																							
NKI_Ras1	: W	E	V	I	V	T	D	R	-K	T	L	I	E	P	F	T	L	L	A	S	K	L	S	-----	: 169																																							
NKI_Ras2	: W	E	V	S	V	A	D	R	-R	S	L	L	E	P	F	V	Y	L	A	S	K	M	T	-----	: 169																																							
RasD1	: F	E	I	S	A	K	N	-S	S	L	D	Q	M	F	R	A	L	F	A	M	A	K	L	P	S	E	M	S	P	D	L	H	R	K	V	S	V	Q	C	D	V	L	H	K	K	A	L	R	N	K	L	L	R	A	G	S	G	G	G	G	D	P	G	: 240
RasD2	: F	E	V	S	A	K	N	-T	N	V	D	E	M	F	Y	V	L	F	S	M	A	K	L	P	H	E	M	S	P	A	L	H	R	K	I	S	V	Q	Y	G	D	A	F	H	P	R	P	F	C	M	R	R	V	K	--E	M	-----D	-----	: 226					
RasL10A	: L	E	C	S	A	K	Y	N	-W	H	V	L	R	L	F	R	E	L	L	R	-----	: 176																																										
RasL10B	: V	E	C	S	A	K	Y	N	-W	H	I	L	L	L	F	S	E	L	L	K	S	-----	: 176																																									

## Anhang

	280	*	300	*	320	*	340									
NRas	: -----	QYRMK	KLNSS	-----	DDGTQGC	-----	MGLP-	CVVM	-----	: 189						
HRas	: -----	QHKLR	KLNPP	-----	DESGPGC	-----	MSCK-	CVLS	-----	: 189						
KRas	: -----	QYRLK	KISK	-----	EEKTPGC	-----	VKIKK	CIIM	-----	: 189						
MRas	: -----	QQIPE	KSQKKK	TKWRG	DRATGT	-----	HKLQ-	CVIL	-----	: 208						
TC21	: -----	KFQEQ	ECPPS	PE	-----	PTRKE	KDK	-----	KGCH-	CVIF	: 204					
RRas	: -----	KYQEQ	ELPPSP	-----	PSAPR	KKG	-----	GGCP-	CVLL	-----	: 218					
Rap1A	: -----	RKTPVE	-----	KKKP	-----	KKKS	CLLL	-----	-----	: 184						
Rap1B	: -----	RKTPVP	-----	GKAR	-----	KKSS	COLL	-----	-----	: 184						
Rap2A	: -----	YAAQPD	-----	KDDP	-----	CCSAC	NIQ	-----	-----	: 183						
Rap2B	: -----	YAAQPN	-----	GDEG	-----	CCSAC	CVIL	-----	-----	: 183						
Rap2C	: -----	YSSLPE	-----	KQDQ	-----	CCTT	CVVQ	-----	-----	: 183						
RalA	: -----	ARKMED	SKEKN	-----	GKKKR	KSL	-----	AKRIR	ERCCIL	-----	: 206					
RalB	: -----	TKKSEN	KDKN	-----	GKKSS	KN	-----	KKSF	KERCCLL	-----	: 206					
DiRas1	: -----	RNMSL	NIDG	KRS	-----	GKQK	RTD	-----	RVK	GKCTLM	-----	: 198				
DiRas2	: -----	RTVSL	QIDG	KKS	-----	KQQR	KE	-----	KLK	GKCVIM	-----	: 199				
DiRas3	: -----	PTTGL	QEPE	KKS	-----	QMPN	TTE	-----	KLLD	KCIIM	-----	: 229				
RIT1	: -----	KEAVL	AMEK	SKPKNS	-----	VWKRL	KSP	-----	FRK	KKDSVT	-----	: 219				
RIT2	: -----	SMPSL	-MEK	KLK	KDS	-----	LWK	KLGS	-----	LKK	KRENMT	-----	: 217			
ERas	: -----	VQEAM	AKEP	MARS	-----	CREK	TRHQ	-----	KAT	CHCG	CSVA	-----	: 233			
Rheb	: -----	KMDGA	ASQ	GKSS	-----	-----	-----	-----	-----	CSVM	-----	: 184				
Rheb1	: -----	RVENS	YGQ	ERR	-----	-----	-----	-----	-----	CHLM	-----	: 183				
Rheb1c	: -----	RVENS	YGQ	ERR	-----	-----	-----	-----	-----	CHLM	-----	: 181				
RERG	: -----	RRRMV	QGK	TR	-----	RRSS	TTHV	QQA	INKML	-----	: 194					
RasL12	: -----	RELEK	SPL	TRPL	-----	FISEE	RALPH	QAPL	TARH	GLASCT	FNTL	STIN	LKEM	PTVAQ	-----	: 237
RasL11A	: -----	KMHGL	SG	-ERR	-----	RASII	PR	-----	P	-----	RSP	NMQD	LKRR	FKQAL	-----	: 231
RasL11B	: -----	HKQQP	SST	PPEKR	-----	RTSLI	PR	-----	P	-----	KSP	NMQD	LKRR	FKQAL	-----	: 238
NKI_Ras1	: -----	QPQSK	SF	PLPG	-----	-----	-----	-----	-----	-----	RKN	KGNS	NSEN	-----	: 192	
NKI_Ras2	: -----	QPQSK	S	AFPLS	-----	-----	-----	-----	-----	-----	RKN	KG	SGS	LDG	-----	: 191
RasD1	: DAFGIV	APFARR	PSVH	SDL	MYIRE	-----	KASAG	SQ	-----	AKDK	ER	CVIS	-----	-----	: 281	
RasD2	: -AYGMV	SPFARR	PSVNS	DL	KYI	KA	-----	KVLR	REGQ	-----	ARER	DK	CTIQ	-----	: 266	
RasL10A	: -----	CALVR	ARPA	HPAL	RLQG	-----	-----	-----	-----	-----	ALHP	AR	CSLM	-----	: 203	
RasL10B	: -----	VGCAR	CKHV	HAAL	RFQG	-----	-----	-----	-----	-----	ALRR	NR	CAIM	-----	: 203	

CaaX

### Sequenzvergleich von G Proteinen der Ras-Unterfamilie

Vergleich von G Proteinen der Ras-Familie. Die typischen Sequenzmotive und das katalytische Glutamat (bzw. dessen Variation) sind eingezeichnet.



## 8.6 Posttranslationale Modifikation von Proteinen der Ras-Subfamilie

### Posttranslationale Modifikation von Proteinen der Ras-Subfamilie

Exp. Gesicherte Daten				Sequenzbasierte Vorhersage			
N-Ras	F (GG)	Palm		RasL10B	F, GG		
H-Ras	F	Palm (2)		NKI-Ras1			Poly-K?
K-Ras4A	F (GG)	Palm		NKI-Ras2			Poly-K?
K-Ras4B	F (GG)		Poly-K	RERG			Poly-K?
Rap1A	Ger		Poly-K	RasL11B			Poly-K?
Rap1B	Ger		Poly-K	RasL11A			Poly-K?
Rap2A	F	Palm		RasL12			Poly-K?
Rap2b	GG	Palm		GEM		Palm	Poly-K
Rap2c	F	Palm		REM1		Palm	Poly-K
R-Ras	GG, F	Palm	Poly-K	REM2		Palm	Poly-K
TC21	F, GG		Poly-K	RhebL	F, GG		
M-Ras	GG, F			ERas	F		
Rheb	F, GG			Rit1			Poly-K
RalA	GG, F		Poly-K	Rit2			Poly-K
RalB	GG, F		Poly-K	ARHI	F, GG		
Di-Ras1	F, GG		Poly-K	RasD1	F		Poly-K
Di-Ras2	F		Poly-K	RasD2	F		Poly-K
RasL10A	F		Poly-R?				

(GG): Geranylgeranylierung auch möglich. F, GG: Modifikation nicht eindeutig. Präferenz für F (nach PrenBase<sup>(544)</sup>)

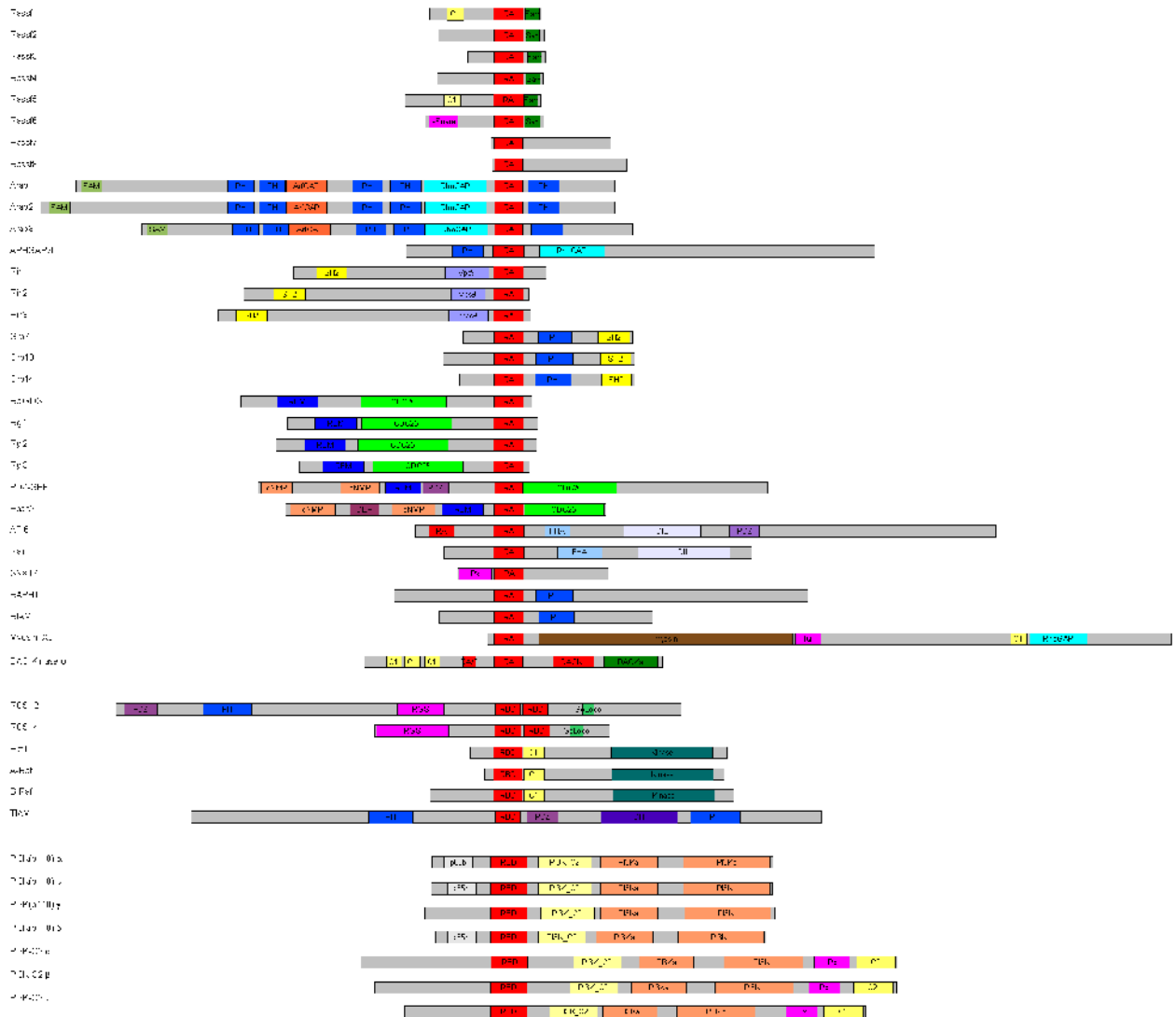
## 8.7 Substrat-Spezifität der RhoGAP-Proteine

Name	Organism	Specificity	
		<i>In vitro</i>	<i>In vivo</i>
p50RhoGAP	<i>H. sapiens</i>	<b>Cdc42</b> , Rac1, RhoA	RhoA
BPGAP1	<i>H. sapiens</i>	<b>Cdc42</b> , RhoA	RhoA
Bcr	<i>H. sapiens</i>	Cdc42, <b>Rac1</b> , Rac2	Rac1
Abr	<i>H. sapiens</i>	Cdc42, Rac1, Rac2	ND
mCdcGAP	<i>M. musculus</i>	Cdc42, Rac1	Cdc42, Rac1
TCGAP	<i>M. musculus</i>	<b>Cdc42</b> , <b>Rac1</b> , RhoA	No activity
GRIT	<i>H. sapiens</i>	<b>Cdc42</b> , Rac1, <b>RhoA</b>	<b>Cdc42</b> , Rac1, <b>RhoA</b>
hCdcGAP	<i>H. sapiens</i>	Cdc42, Rac1	Cdc42, Rac1
cl-CdcGAPr	<i>D. melanogaster</i>	ND	ND
ARAP1	<i>H. sapiens</i>	Cdc42, Rac1, <b>RhoA</b>	RhoA
ARAP2	<i>H. sapiens</i>	ND	ND
ARAP3	<i>H. sapiens</i>	Cdc42, Rac1, <b>RhoA</b>	RhoA
ARAP3	<i>M. musculus</i>	RhoA	RhoA
erGAP1	<i>M. musculus</i>	ND	Cdc42, RhoA
erGAP2	<i>M. musculus</i>	ND	ND
erGAP3	<i>H. sapiens</i>	<b>Rac1</b> , Cdc42	ND
p115	<i>H. sapiens</i>	ND	RhoA
p85- $\alpha$	<i>H. sapiens</i>	None	None
p85- $\beta$	<i>H. sapiens</i>	ND	ND
RIP1	<i>M. musculus</i>	<b>Cdc42</b> , Rac1	ND
RaiBP1	<i>R. norvegicus</i>	<b>Cdc42</b> , Rac1	ND
RLIP76	<i>H. sapiens</i>	<b>Cdc42</b> , Rac1	ND
DLC-1	<i>H. sapiens</i>	<b>RhoA</b> , Cdc42	ND
DLC-2	<i>H. sapiens</i>	<b>RhoA</b> , Cdc42	RhoA
p122RhoGAP	<i>R. norvegicus</i>	RhoA	RhoA
RhoGAP80C	<i>D. melanogaster</i>	ND	Rho1, Rac1, Rac2
$\alpha$ 1-Chimaerin	<i>H. sapiens</i>	Rac1	Rac1
$\beta$ 1-Chimaerin	<i>R. norvegicus</i>	Rac1	ND
RICH-1	<i>H. sapiens</i>	Cdc42, Rac1	Cdc42, Rac1
RICH-2	<i>H. sapiens</i>	Cdc42, Rac2	ND
Nadrin	<i>R. norvegicus</i>	Cdc42, Rac1, <b>RhoA</b>	ND
3BP-1	<i>M. musculus</i>	Cdc42, Rac1	Rac1
Oligophrenin-1	<i>H. sapiens</i>	Cdc42, Rac1, <b>RhoA</b>	RhoA, Cdc42
Graf	<i>G. gallus</i>	Cdc42, RhoA	<b>RhoA</b>
Graf-2	<i>H. sapiens</i>	Cdc42, RhoA	ND
PSGAP	<i>M. musculus</i>	<b>RhoA</b> , Cdc42	RhoA, <b>Cdc42</b>
GMIP	<i>H. sapiens</i>	RhoA	RhoA
PARG1	<i>H. sapiens</i>	Cdc42, Rac1, <b>RhoA</b>	RhoA
ArhGAP9	<i>H. sapiens</i>	<b>Cdc42</b> , <b>Rac1</b> , RhoA	ND
ArhGAP12	<i>H. sapiens</i>	ND	ND
Arhgap15	<i>H. sapiens</i>	Rac1	Rac1
CAMGAP1	<i>R. norvegicus</i>	Cdc42, Rac1	ND

Name	Organism	Specificity	
		<i>In vitro</i>	<i>In vivo</i>
Mycsin-IXb	<i>H. sapiens</i>	RhoA	ND
Myr5	<i>R. norvegicus</i>	Cdc42, <b>RhoA</b> , Rac1	RhoA
Myr7	<i>R. norvegicus</i>	RhoA	RhoA
ArhGAP10	<i>H. sapiens</i>	<b>Cdc42</b> , RhoA, Rac1	ND
XrGAP	<i>X. laevis</i>	ND	ND
CeGAP	<i>C. elegans</i>	Rac1, Cdc42, RhoA	ND
MgcRacGAP	<i>H. sapiens</i>	Rac1, Cdc42, RhoA	Cdc42, RhoA
RnGAP	<i>D. melanogaster</i>	Rac1, Cdc42	Rac1, Cdc42
DRacGAP	<i>D. melanogaster</i>	ND	Rac1, Cdc42
CYK-4	<i>C. elegans</i>	<b>Rac1</b> , <b>Cdc42</b> , RhoA	ND
RAFhoGAP	<i>R. norvegicus</i>	RhoA	RhoA
IGAP1	<i>R. norvegicus</i>	No activity	ND
FlGAP	<i>H. sapiens</i>	Cdc42, Rac1	Cdc42, <b>Rac1</b>
p73RhoGAP	<i>H. sapiens</i>	ND	RhoA
p68RacGAP	<i>M. musculus</i>	Rac1	Rac1
ArhGAP6	<i>H. sapiens</i>	RhoA	RhoA
OCRL-1	<i>H. sapiens</i>	Rac1	Rac1
Vilse	<i>D. melanogaster</i>	<b>Rac1</b> , Cdc42	Rac1, Cdc42
SYD-1	<i>C. elegans</i>	None	ND
p190-A	<i>R. norvegicus</i>	Rac1, Cdc42, <b>RhoA</b>	RhoA
p190-B	<i>H. sapiens</i>	Rac1, Cdc42, <b>RhoA</b>	ND
p190	<i>D. melanogaster</i>	ND	RhoA
Sac7p	<i>S. cerevisiae</i>	Rho1p	Rho1p
Bag7p	<i>S. cerevisiae</i>	Rho1p	Rho1p
Rga1p	<i>S. cerevisiae</i>	Cdc42	Cdc42p
Rga2p	<i>S. cerevisiae</i>	Cdc42	Cdc42p
Bem3p	<i>S. cerevisiae</i>	Cdc42p	Cdc42p
Lrg1p	<i>S. cerevisiae</i>	Cdc42p, Rho2p	ND
Bem2p	<i>S. cerevisiae</i>	Rho1p	Rho1p
Rgd1p	<i>S. cerevisiae</i>	Rho3p, Rho4p	Rho3p
Rgd2p	<i>S. cerevisiae</i>	Cdc42p, Rho5p	ND
DdRacGAP1	<i>D. discoideum</i>	DdRac1A, DdRacC	ND

entnommen aus (259)

## 8.8 Die Familie der RA-/RB-Domänen Proteine



### RAD/RBD-Proteine

Proteine mit RA-Domäne oder RB-Domäne (nach *Smart*-Datenbank)

## 8.9 Aufreinigungsbedingungen

Protein	Konstrukt		Aufschlusspuffer		Endpuffer	
Arap1	521-1210	(Iso_5)	50 mM 100 mM 5 mM	Tris pH 7.5 NaCl $\beta$ ME Protease-Inh.	50 mM 50 mM 5 mM	Tris pH 7.5 NaCl DTE
Arap1	674-902	(GAP_3)	50 mM 50 mM 5 mM	Tris pH 7.5 NaCl $\beta$ ME	50 mM 50 mM 5 mM	Tris pH 7.5 NaCl $\beta$ ME
Arap1	694-894	(GAP_2)	25 mM 100 mM 5 mM	Tris pH 7.5 NaCl $\beta$ ME	25 mM 100 mM 5 mM	Tris pH 7.5 NaCl $\beta$ ME
Arap1	707-894	(GAP_1)	50 mM 50 mM 5 mM	Tris pH 7.5 NaCl $\beta$ ME	50 mM 50 mM 5 mM	Tris pH 7.5 NaCl $\beta$ ME
Arap1	707-1021	(GAP-RA)	25 mM 100 mM 5 mM	Tris pH 7.5 NaCl DTE Protease-Inh.	25 mM 50 mM 5 mM	Tris pH 7.5 NaCl DTE
Arap1	707-1210	(GAP-e)	50 mM 50 mM 5 mM	Tris pH 7.5 NaCl $\beta$ ME Protease-Inh.	50 mM 50 mM 5 mM	Tris pH 7.5 NaCl $\beta$ ME
Arap1	717-1162	(717)	50 mM 50 mM 5 mM	Tris pH 7.5 NaCl $\beta$ ME Protease-Inh.	50 mM 50 mM 5 mM	Tris pH 7.5 NaCl DTE
Arap1	932-1021	(RA)	50 mM 150 mM 5 mM 5 mM	Tris pH 7.5 NaCl $MgCl_2$ $\beta$ ME	25 mM 50 mM 5 mM	Tris pH 7.5 NaCl DTE
Arap3	668-1329	(668)	50 mM 50 mM 2 mM 10 mM	Tris pH 7.5 NaCl $\beta$ ME Imidazol Protease-Inh.	50 mM 50 mM 5 % 5 mM	Tris pH 7.5 NaCl Glycerin DTE
Arap3	902-1097	(GAP)	50 mM 500 mM 5 mM 5 mM	Tris pH 7.5 NaCl $MgCl_2$ $\beta$ ME	50 mM 50 mM 5 mM	Tris pH 7.5 NaCl $\beta$ ME
Arap3	902-1329	(GAP-RA-PH)	50 mM 50 mM 5 % 5 mM	Tris pH 7.5 NaCl Glycerin DTE Protease-Inh.	50 mM 50 mM 5 % 5 mM	Tris pH 7.5 NaCl Glycerin DTE
Arap3	1117-1329	(RA-PH)	50 mM 500 mM 5 mM	Tris pH 7.5 NaCl $MgCl_2$ $\beta$ ME Protease-Inh.	25 mM 25 mM 5 mM	HEPES pH 7.5 NaCl $\beta$ ME

ARHGAP20	1-525	(1-GAP)	50 mM 300 mM 5 mM	Tris pH 7.5 NaCl $\beta$ ME Protease-Inh.	50 mM 300 mM 5 mM	Tris pH 7.5 NaCl $\beta$ ME
C3G	830-1078		50 mM 50 mM 5 mM	Tris pH 7.5 NaCl $\beta$ ME	50 mM 50 mM 5 mM	Tris pH 7.5 NaCl $\beta$ ME
CDC42	1-181	c'	50 mM 50 mM 5 mM 5 mM	Tris pH 7.5 NaCl $MgCl_2$ $\beta$ ME	25 mM 50 mM 5 mM 5 mM	Tris pH 7.5 NaCl $MgCl_2$ DTE
DiRas1	VL		25 mM 50 mM 5 mM 5 mM	Tris pH 7.5 NaCl $MgCl_2$ $\beta$ ME	25 mM 50 mM 5 mM 5 mM	Tris pH 7.5 NaCl $MgCl_2$ $\beta$ ME
DiRas2	VL, 1-171	VL und c'	25 mM 50 mM 5 mM 5 mM	Tris pH 7.5 NaCl $MgCl_2$ $\beta$ ME	25 mM 50 mM 5 mM 5 mM	Tris pH 7.5 NaCl $MgCl_2$ $\beta$ ME
Epac1	141-881		50 mM 400 mM 10 % 5 mM 5 mM	Tris pH 7.5 NaCl Glycerin $\beta$ ME EDTA Protease-Inh.	50 mM 50 mM 5 % 5 mM	Tris pH 7.5 NaCl Glycerin $\beta$ ME
Epac2	280-993	(Maus)	50 mM 400 mM 10 % 5 mM 5 mM	Tris pH 7.5 NaCl Glycerin $\beta$ ME EDTA Protease-Inh.	50 mM 50 mM 5 % 5 mM	Tris pH 7.5 NaCl Glycerin $\beta$ ME
Integrin $\alpha 2$	1155-1167	(ICR)	synthetisiert			
Integrin $\alpha L$	1112-1127	(ICR)	synthetisiert			
Integrin $\alpha L$	1113-1170	(cyt)	50 mM 100 mM 5 mM 5 mM	Tris pH 7.5 NaCl $CaCl_2$ $\beta$ ME Protease-Inh.	50 mM 100 mM 5 mM 5 mM	Tris pH 7.5 NaCl $CaCl_2$ $\beta$ ME
Krit1	266-783		50 mM 500 mM 5 mM 5 mM	Tris pH 7.5 NaCl $MgCl_2$ $\beta$ ME Protease-Inh.	25 mM 100 mM 5 mM	Tris pH 7.5 NaCl DTE
M-Ras	VL		50 mM 300 mM 5 mM 5 mM	Tris pH 7.5 NaCl $MgCl_2$ $\beta$ ME	50 mM 100 mM 5 mM 5 mM	Tris pH 7.5 NaCl $MgCl_2$ $\beta$ ME
M-Ras	1-178	c'	50 mM 500 mM 5 mM 5 mM	Tris pH 7.5 NaCl $MgCl_2$ $\beta$ ME	50 mM 100 mM 5 mM 5 mM	Tris pH 7.5 NaCl $MgCl_2$ $\beta$ ME

## Anhang

NKI-Ras2	VL		30 mM 50 mM 5 mM 3 mM	Tris pH 7.5 NaCl MgCl <sub>2</sub> DTE	30 mM 50 mM 5 mM 3 mM	Tris pH 7.5 NaCl MgCl <sub>2</sub> DTE
p115RhoGEF	382-786		30 mM 50 mM 5 mM 3 mM	Tris pH 7.5 NaCl MgCl <sub>2</sub> DTE Protease-Inh.	30 mM 50 mM 5 mM 3 mM	Tris pH 7.5 NaCl MgCl <sub>2</sub> DTE
p190RhoGEF	811-1210	(Maus)	30 mM 50 mM 5 mM 3 mM	Tris pH 7.5 NaCl MgCl <sub>2</sub> DTE Protease-Inh.	30 mM 50 mM 5 mM 3 mM	Tris pH 7.5 NaCl MgCl <sub>2</sub> DTE
PP1cc	VL		20 mM 150 mM 1 mM 2 mM	Tris pH 7.5 NaCl MnCl <sub>2</sub> βME Protease-Inh.	20 mM 150 mM 1 mM 2 mM	Tris pH 7.5 NaCl MnCl <sub>2</sub> βME
R-Ras	VL		30 mM 50 mM 5 mM 3 mM	Tris pH 7.5 NaCl MgCl <sub>2</sub> DTE	30 mM 50 mM 5 mM 3 mM	Tris pH 7.5 NaCl MgCl <sub>2</sub> DTE
Rab5	VL	wt, E80A	50 mM 50 mM 5 mM 5 mM 20 mM	Tris pH 7.5 NaCl MgCl <sub>2</sub> βME Imidazol	50 mM 50 mM 5 mM 5 mM	Tris pH 7.5 NaCl MgCl <sub>2</sub> βME
Rab5	15-187	n'c'	50 mM 50 mM 5 mM 5 mM 20 mM	Tris pH 7.5 NaCl MgCl <sub>2</sub> βME Imidazol	25 mM 25 mM 5 mM 5 mM	Tris pH 7.5 NaCl MgCl <sub>2</sub> βME
Rabex-5	132-391		50 mM 50 mM 5 mM 5 mM 20 mM	Tris pH 7.5 NaCl MgCl <sub>2</sub> βME Imidazol	50 mM 50 mM 5 mM 5 mM	Tris pH 7.5 NaCl MgCl <sub>2</sub> βME
Rac1	1-181	c'	50 mM 50 mM 5 mM 5 mM	Tris pH 7.5 NaCl MgCl <sub>2</sub> βME	25 mM 50 mM 5 mM 5 mM	Tris pH 7.5 NaCl MgCl <sub>2</sub> DTE
Raf1	51-131	(RBD)	50 mM 200 mM 5 mM	Tris pH 7.5 NaCl βME	25 mM 50 mM 5 mM	Tris pH 7.5 NaCl βME
RalA	VL		30 mM 50 mM 5 mM 3 mM	Tris pH 7.5 NaCl MgCl <sub>2</sub> DTE	30 mM 50 mM 5 mM 3 mM	Tris pH 7.5 NaCl MgCl <sub>2</sub> DTE
RalB	VL		30 mM 50 mM 5 mM	Tris pH 7.5 NaCl MgCl <sub>2</sub>	30 mM 50 mM 5 mM	Tris pH 7.5 NaCl MgCl <sub>2</sub>

			3 mM	DTE	3 mM	DTE
Ran	VL	wt, E70A	20 mM 2 mM 1 mM	K <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> pH 6.6 MgCl <sub>2</sub> DTE	50 mM 100 mM 5 mM 5 mM	Tris pH 7.5 NaCl MgCl <sub>2</sub> DTE
Rap1A	1-167	c'	25 mM 5 mM 5 mM	Tris pH 7.5 MgCl <sub>2</sub> DTE	25 mM 25 mM 5 mM 5 mM	Tris pH 7.5 NaCl MgCl <sub>2</sub> DTE
Rap1B	1-167	c' (wt, E62A)	25 mM 5 mM 5 mM	Tris pH 7.5 MgCl <sub>2</sub> DTE	25 mM 25 mM 5 mM 5 mM	Tris pH 7.5 NaCl MgCl <sub>2</sub> DTE
Rap2A	1-167	c'	25 mM 5 mM 5 mM	Tris pH 7.5 MgCl <sub>2</sub> DTE	25 mM 25 mM 5 mM 5 mM	Tris pH 7.5 NaCl MgCl <sub>2</sub> DTE
RapL	1-207		50 mM 500 mM 5 mM 5 mM	Tris pH 7.5 NaCl MgCl <sub>2</sub> βME Protease-Inh.	50 mM 500 mM 5 mM	Tris pH 7.5 NaCl βME
RapL	1-265	(VL)	50 mM 300 mM 5 mM 5 mM	Tris pH 7.5 NaCl MgCl <sub>2</sub> βME Protease-Inh.	25 mM 50 mM 5 mM	HEPEs pH 7.5 NaCl βME
RapL	41-265		50 mM 50 mM 5 mM	Tris pH 7.5 NaCl βME Protease-Inh.	50 mM 50 mM 5 mM	Tris pH 7.5 NaCl DTE
Ras	1-166	c' (wt, E62A)	50 mM 5 mM 5 mM	Tris pH 7.5 MgCl <sub>2</sub> DTE	50 mM 25 mM 5 mM 5 mM	Tris pH 7.5 NaCl MgCl <sub>2</sub> DTE
RCC1	19-421		20 mM 1 mM 1 mM	K <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> pH 6.8 MgCl <sub>2</sub> DTE	50 mM 5 mM 5 mM	Tris pH 7.5 MgCl <sub>2</sub> DTE
RERG			30 mM 50 mM 5 mM 3 mM	Tris pH 7.5 NaCl MgCl <sub>2</sub> DTE	30 mM 50 mM 5 mM 3 mM	Tris pH 7.5 NaCl MgCl <sub>2</sub> DTE
Rheb		c'	30 mM 50 mM 5 mM 3 mM	Tris pH 7.5 NaCl MgCl <sub>2</sub> DTE	30 mM 50 mM 5 mM 3 mM	Tris pH 7.5 NaCl MgCl <sub>2</sub> DTE
RhebL	VL		30 mM 50 mM 5 mM 3 mM	Tris pH 7.5 NaCl MgCl <sub>2</sub> DTE	30 mM 50 mM 5 mM 3 mM	Tris pH 7.5 NaCl MgCl <sub>2</sub> DTE
RhoA	1-181	c' (wt, E63A)	50 mM	Tris pH 7.5	50 mM	Tris pH 7.5

## Anhang

			50 mM 2 % 5 mM	NaCl Glycerin βME	50 mM 5 mM	NaCl βME
Rin1	343-783	(RH-e)	50 mM 200 mM 5 mM 1 mM 0,1 % 0,1 %	Tris pH 7.5 NaCl βME EDTA NP40 Triton X 100 Protease-Inh.	30 mM 50 mM 3 mM	Tris pH 7.5 NaCl DTE
Sec2	1-165		50 mM 200 mM 5 mM 20 mM	Tris pH 7.5 NaCl βME Imidazol	50 mM 200 mM 5 mM	Tris pH 7.5 NaCl βME
Sec4	20-186	n'c' (wt, E80A)	50 mM 200 mM 5 mM 5 mM	Tris pH 7.5 NaCl MgCl <sub>2</sub> βME	50 mM 200 mM 5 mM 5 mM	Tris pH 7.5 NaCl MgCl <sub>2</sub> βME
Shoc2	VL		50 mM 300 mM 5 mM	Tris pH 8.5 NaCl βME Protease-Inh. (4h Expression)	50 mM 300 mM 5 mM	Tris pH 8.5 NaCl βME
Sos	564-1049		50 mM 500 mM 5 mM 5 mM	Tris pH 7.5 NaCl MgCl <sub>2</sub> βME	50 mM 50 mM 5 mM	Tris pH 7.5 NaCl βME
TC21	VL		30 mM 50 mM 5 mM 3 mM	Tris pH 7.5 NaCl MgCl <sub>2</sub> DTE	30 mM 50 mM 5 mM 3 mM	Tris pH 7.5 NaCl MgCl <sub>2</sub> DTE



## 8.10 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Vergleich von TRAFAC- und SIMIBI-G Proteinen.....	2
Abbildung 2: Vergleich von Ras-ähnlichen G Proteinen, und GADs.....	3
Abbildung 3: Nukleotid-abhängige Konformationsänderungen von Ras-ähnlichen G Proteinen.....	5
Abbildung 4: Einteilung der Ras-Superfamilie.....	6
Abbildung 5: Die Rab-Familie.....	7
Abbildung 6: Rho-Proteine.....	8
Abbildung 7: Phylogenetischer Baum der Ras-Subfamilie.....	11
Abbildung 8: Ausgewählte Beispiele von GEF-Proteinen von Mitgliedern der Ras-Superfamilie..	16
Abbildung 9: Darstellung des GEF-Mechanismus anhand von Rop und PRONE.....	18
Abbildung 10: Katalytische Mechanismen von verschiedenen GAPs.....	21
Abbildung 11: Modularer Aufbau ausgewählter GAP-Proteine der Ras-Superfamilie.....	23
Abbildung 12: Substratspezifität der RhoGAP-Proteine.....	24
Abbildung 13: G Protein-Effektor Interaktionen der Rho-Familie.....	26
Abbildung 14: Rab-Effektoren.....	30
Abbildung 15: Effektoren der Arf- und Arl-Familie.....	32
Abbildung 16: Ran-Effektoren.....	35
Abbildung 17: Effektoren der Ras-G Proteinen.....	37
Abbildung 18: Proteine mit RA-/RB-Domäne.....	38
Abbildung 19: RAD-/RBD-Effektoren.....	40
Abbildung 20: Integrin-Aktivierung.....	43
Abbildung 21: Arap-Proteine und ARHGAP20.....	47
Abbildung 22: Rin-Proteine.....	48
Abbildung 23: Modell der Shoc2-Funktion.....	50
Abbildung 24: Sequenzvergleich von G Proteinen.....	52
Abbildung 25: Die Funktion des konservierten Glu62 in Ras.....	53
Abbildung 26: Der Einfluss des konservierten Glutamats auf die GEF-Reaktion von G Proteinen..	54
Abbildung 27: Komplexbildung von G Proteinen und GEFs.....	57
Abbildung 28: Die Bildung des dimeren G Protein - GEF -Komplexes.....	59
Abbildung 29: Sequenzvergleich von Rassf Proteinen.....	61
Abbildung 30: Konstrukte von RapL.....	61
Abbildung 31: Aufreinigung von RapL.....	63
Abbildung 32: Analytische Gelfiltration von RapL-Rap1B Komplexen.....	64
Abbildung 33: Aufreinigung der $\alpha$ -Untereinheit von Integrinen.....	66
Abbildung 34: Qualitative Untersuchung der Interaktion von RapL mit Integrin $\alpha$ L.....	67
Abbildung 35: Quantifizierung der Interaktion von RapL mit Integrinen.....	69
Abbildung 36: Sequenzvergleich von Arap Proteinen.....	72
Abbildung 37: Konstrukte von Arap1.....	73
Abbildung 38: Aufreinigung von Arap1.....	75
Abbildung 39: Getestete Konstrukte von Arap3.....	77
Abbildung 40: Aufreinigung von Arap3.....	78
Abbildung 41: Qualitative Analyse der Interaktion von Ras-Proteinen mit Arap.....	79
Abbildung 42: GDI-Versuch zur Interaktion von Arap-Proteinen mit G Proteinen der Ras-Familie	81
Abbildung 43: Polarisationsmessungen von Arap Proteinen und G Proteinen der Ras-Familie.....	82
Abbildung 44: Bindung von Arap1 an Proteine der Rho-Familie.....	84
Abbildung 45: Interaktion von Arap3 (GAP-RA-PH) mit RhoA.....	85
Abbildung 46: Hydrolysespezifität der Arap-Proteine zu Proteinen der Rho-Familie.....	86

Abbildung 47: Hydrolyserate von Arap1 nach Trennung von GAP und RA.....	88
Abbildung 48: Bestimmung von $K_M$ und $k_{cat}$ für Arap1.....	89
Abbildung 49: Einfluss einzelner Domänen auf die katalytische Aktivität von Arap.....	91
Abbildung 50: Bindung von Phosphoinositolen an Arap Proteine.....	93
Abbildung 51: Sequenzvergleich von ARHGAP20.....	95
Abbildung 52: Konstrukte von ARHGAP20.....	96
Abbildung 53: Aufreinigung von ARHGAP20 (1-GAP).....	97
Abbildung 54: Interaktion von ARHGAP (1-GAP) mit G Proteinen der Ras-Familie.....	98
Abbildung 55: Hydrolyseaktivität von ARHGAP20 (1-GAP).....	99
Abbildung 56: Sequenzvergleich der Rin-Proteine.....	102
Abbildung 57: Konstrukte von Rin.....	103
Abbildung 58: Aufreinigung von Rin1 (RH-e).....	104
Abbildung 59: Interaktion von Rin1 (RH-e) mit Ras*GNP.....	105
Abbildung 60: Einfluss von Rin1 auf Rab5.....	106
Abbildung 61: Sequenzvergleich der PP1c-Isoformen.....	108
Abbildung 62: Sequenzvergleich der LRRs von Shoc2.....	109
Abbildung 63: Getestete Ansätze der Aufreinigung von Shoc2 und PP1c im Komplex.....	111
Abbildung 64: Aufreinigung von PP1c und Shoc2.....	113
Abbildung 65: Die Funktion des Glutamats der Rab-Proteine.....	116
Abbildung 66: Einteilung von Integrinen und Struktur von Int $\alpha_L$ .....	117
Abbildung 67: Normierte Polarisationsmessungen von RapL und Integrin-Isoformen.....	118
Abbildung 68: Einordnung der Funktion von RapL.....	122
Abbildung 69: Modell der GAP-Domäne von Arap1.....	126
Abbildung 70: Simultane Bindung von GAP und RA an CDC42.....	129
Abbildung 71: Modell der GAP-Regulation im Multidomänen-Verbund von Arap.....	132
Abbildung 72: spekulatives Modell der Aktivierung von ARHGAP20.....	135
Abbildung 73: Modell der LRRs von Shoc2.....	140
Abbildung 74: Mögliche M-Ras Bindungsstellen an Shoc2.....	141
Abbildung 75: Das RVxF-Motiv.....	142
Abbildung 76: Löslichkeitskurve für ein Protein als Funktion z.B. der Salzkonzentration.....	174
Abbildung 77: Interaktion zwischen Krit1 (266-736) und Rap Proteinen.....	205

## 8.11 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Biologische Funktion der Ras-Proteine.....	12
Tabelle 2: Rho-Effektoren.....	25
Tabelle 3: Interaktionspartner der Arap-Proteine.....	45
Tabelle 4: Geschwindigkeitskonstanten des mGDP Austauschs.....	56
Tabelle 5: Reinigungserfolg verschiedener RapL-Konstrukte.....	62
Tabelle 6: Ermittelte Werte der Polarisations Titration von Integrinen und RapL.....	70
Tabelle 7: Reinigungserfolg verschiedener Arap1-Konstrukte.....	74
Tabelle 8: Reinigungserfolg der Arap3-Konstrukte.....	77
Tabelle 9: Affinitätskonstanten der Interaktion von Arap1 mit Rho-Proteinen.....	85
Tabelle 10: Raten der Hydrolysemessungen von Arap und Rho Proteinen.....	87
Tabelle 11: $K_M$ und $k_{cat}$ Werte für Arap1.....	90
Tabelle 12: Kristallisationsansätze mit Arap Proteinen.....	94

Tabelle 13: Löslichkeit der Konstrukte von ARHGAP20.....	97
Tabelle 14: Katalytische Aktivität von ARHGAP20 (1-GAP).....	100
Tabelle 15: Reinigungserfolg der Rin-Proteine.....	104
Tabelle 16: Auf GEF-Aktivität von Rin1 getestete Rab-Proteine (Masterarbeit M. Fislage).....	107
Tabelle 17: Gewebe- und Ligandenspezifität von Integrinen.....	121
Tabelle 18: Beschleunigung der GTPase-Aktivität.....	124
Tabelle 19: Auf Interaktion getestete G Proteine der Ras-Subfamilie.....	128
Tabelle 20: Halbwertszeiten der Reaktion von ARHGAP20 und RhoA.....	134
Tabelle 21: Verwendete Bakterienstämme.....	148
Tabelle 22: Oligonukleotide zur Sequenzierung.....	149
Tabelle 23: Anregungs- und Emissionswellenlängen der verwendeten Fluorophore.....	169

## 8.12 Abkürzungsverzeichnis

AmmSO <sub>4</sub>	Ammoniumsulfat	GST	Glutathion-S-Transferase
AP	Alkalische Phosphatase	Iaedans	5-[2-(2-Iodacetamido)ethylamino]-naphthalen-1-sulfonsäure
AS	Aminosäure	i.d.R.	in der Regel
bp	Basenpaare	intr.	intrinsisch
β-ME	β-Mercaptoethanol	LTP	<i>Long-term-potential</i>
BSA	Rinderserum Albumin	m	2',3'-O-N-Methyl-anthraniloyl-
bsp.	beispielsweise		
bzw	beziehungsweise	mant	2',3'-O-N-Methyl-anthraniloyl-
c'	C-terminal verkürzt	MDCC	N-(2-[1-Maleimid]-ethyl)-7-diethylaminocoumarin-3-carboxamid
DTNB	5,5'-Dithiobis-2-Nitrobenzolsäure	n'	N-terminal verkürzt
Edans	(5-((2-Aminoethyl)amino) naphthalen-1-sulfonsäure)	Nt	Nukleotid
GCP	Guanosin-5'-[(β,γ)-methylen]-triphosphat	PBP	Phosphat-bindendes Protein
GDP	Guanosindiphosphat	PDE	Phosphodiesterase
GNBP	Guanin-Nukleotid bindendes Protein	PIP	Phosphoinositolphosphat
GNP	Guanosin-5'-[(β,γ)-imido]-triphosphat	OD	optische Dichte
GppCp	Guanosin-5'-[(β,γ)-methylen]-triphosphat	sog.	sogenannt
GppNHp	Guanosin-5'-[(β,γ)-imido]-triphosphat	tamra	5-Carboxytetramethylrhodamin-succinimidylester
GSP	Guanosin-5'-[γ-thio]-triphosphat	ü.N.	über Nacht
GTP	Guanosintriphosphat	VL	Volllänge
GTPγS	Guanosin-5'-[γ-thio]-triphosphat	wt	Wildtyp
GSH	Glutathion	Y2H	<i>Yeast-2-Hybrid</i>

### **8.13 Publikationen von Ergebnissen dieser Arbeit**

Gasper R., Thomas C., Ahmadian, M., Wittinghofer A. The role of the conserved switch II glutamate in guanine nucleotide exchange factor-mediated nucleotide exchange of GTP-binding proteins (2008). *J. Mol. Biol.* **379**(1), 51-63

## 9 Danksagung

Ich möchte mich herzlich bei allen Bedanken, die zum Gelingen meiner Arbeit beigetragen haben.

Zunächst gilt mein Dank Prof. Dr. Alfred Wittinghofer, der mich in allen den Jahren stets unterstützt hat und von dem ich wirklich viel gelernt habe. Ich danke ihm vor allem dafür, dass er gemeinsam mit mir um meine Projekte gekämpft und mir immer neue Wege eröffnet hat, die letztendlich zum Erfolg geführt haben.

Weiterhin möchte ich mich bei Prof. Dr. Roland Winter für seine Bereitschaft bedanken, meine Arbeit zu betreuen und mir die Möglichkeit zu geben an der Universität Dortmund zu promovieren.

Mein besonderer Dank gilt Caro Koerner, die wirklich alles daran gesetzt hat, mich zu unterstützen und mir irgendwie zu Erfolgen zu verhelfen. Ohne sie wäre ein Großteil meiner Arbeit erheblich schwieriger gewesen und wahrscheinlich auch nicht zustande gekommen.

Bedanken möchte ich mich auch bei Doro Vogt für ihre Unterstützung im und Organisation des Labors danken. Rita Schebaum danke ich für ihr Organisationstalent bei allen „außerlaborischen“ Dingen.

Insbesondere gilt mein Dank meinen Laborkollegen für die großartigen wissenschaftlichen und nicht-wissenschaftlichen Diskussionen. Einige von Euch sind für mich zu wirklich wichtigen Freunden geworden. Aleksandra Kravchenko, Antje Schaefer, Arjan Kortholt, Bernd Gilsbach, Eldar Zent, Katharina Uhlenbrock, Katja Gotthardt, Lothar Graemer, Mandy Miertzschke, Matthieu Bosman, Nicole Kucera, Patricia Stege, Shehab Ismail, Silke Kleinboelting, Simon Meyer, Sonja Hermes, Stefan Veltel, Susanne Lücke, Sven Hennig, Yiu Fung (Franz) Ho und allen ehemaligen und aktuellen Azubis. Letztendlich natürlich auch allen Ehemaligen, Andrea Scrima, Delia Deaconescu, Marcus Fislage, Marian Farkasovsky, Michael Lammers und Rolf Rose.

Dem Team unserer großartigen Kristallographie-Abteilung, Ingrid Vetter, Georg Holtermann, Michael Weyand und Wulf Blankenfeldt gebührt mein großer Dank in der Unterstützung meiner Arbeit.

Mandy Miertzschke und Stefan Veltel möchte ich herzlich für die Korrektur dieser Arbeit danken.

Mein Dank gilt auch der IMPRS und allen Organisatoren, Prof. Dr. Martin Engelhardt, Waltraud Hofmann-Goody, Christa Hornemann und Jutta Rötter für die Begleitung meiner Promotionszeit.

Dem Fonds der Chemischen Industrie danke ich für die finanzielle Unterstützung der ersten zwei Jahre meiner Promotion.

Danken möchte ich vor allem auch meiner Frau Miriam, deren Rückhalt und Unterstützung Grundlage für das Gelingen dieser Arbeit war; insbesondere, wenn die Erfolge auch einmal ausblieben.

## 10 Lebenslauf

### Raphael Gasper-Schönenbrücher

geboren am 12. April 1980 in Bonn-Bad Godesberg

verheiratet

Adresse: Kettelerstraße 9  
44803 Bochum

Beschäftigt bei: MPI für molekulare Physiologie  
Abteilung strukturelle Biologie  
Otto-Hahn-Str. 11  
44227 Dortmund

### Ausbildung:

---

Grundschule	1986-1990	Grundschule Neunkirchen-Seelscheid
Gymnasium:	1990-1999	Antoniuskolleg Neunkirchen
	01. Juni 1999	Abitur
Zivildienst:	1999-2000	Heinrich-Hanselmann-Schule für geistig-behinderte Kinder, St. Augustin.
Universität:	2000-2005	Ruhr-Universität Bochum, Fakultät für Chemie
	02. Juni 2005	Diplom in Biochemie
Diplomarbeit:	2004-2005	Strukturelle und funktionelle Charakterisierung der GTPase HypB

### Promotion:

---

PhD-School:	seit 2005	Mitglied der <i>International Max-Planck-Research School in Chemical Biology</i>
-------------	-----------	--

### zusätzliche Tätigkeiten:

---

stud. Hilfskraft	2003	1 Jahr: studentische Hilfskraft im Labor von Prof. Wöll, Lehrstuhl für Physikalische Chemie, Ruhr-Universität Bochum
------------------	------	--

---

Praktikum	2004	4-monatiges Forschungspraktikum im Labor von Prof. Griesinger, Abteilung für NMR-basierte strukturelle Biologie, MPI Göttingen  „Paramagnetic tagging of diamagnetic proteins for solution NMR“
Tagungsorganisation	2006	'1 <sup>st</sup> PhD student symposium of the IMPRS-CB: New Insights into Chemical Biology' in Dortmund.

**Publikationen:**

---

Gasper R., Scrima A., Wittinghofer A. Structural insights into HypB, a GTP-binding protein that regulates metal binding (2006). *J. Biol. Chem.* **281**(37), 27492-27502

Veltel S., Gasper R., Eisenacher E., Wittinghofer A. The retinitis pigmentosa 2 gene product is a GTPase-activating protein for Arf-like 3 (2008). *Nat. Struct. Mol. Biol.* **15**(4), 373-380

Gasper R., Thomas C., Ahmadian, M., Wittinghofer A. The role of the conserved switch II glutamate in guanine nucleotide exchange factor-mediated nucleotide exchange of GTP-binding proteins (2008). *J. Mol. Biol.* **379**(1), 51-63

Gasper R., Meyer S., Wittinghofer A. Lob der Zweisamkeit: Neue Mechanismen der GTPase-Aktivierung (2008). *Biospektrum* 2-2008, 128-133

Gasper R., Meyer S., Gotthardt K., Sirajuddin M., Wittinghofer A. It takes two to tango: regulation of G proteins by dimerization (2009). *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **10**(6), 423-429

Yaman E.\*, Gasper R.\*, Koerner C., Wittinghofer A., Tazebay U. RasGEF1A and RasGEF1B are guanine nucleotide exchange factors that discriminate between Rap GTPases and mediate Rap2 specific nucleotide exchange. *FEBS Lett.* **276**(16), 4607-4616

## **11 Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln angefertigt habe. Sie wurde noch nicht in dieser oder ähnlicher Form bei einer anderen Abteilung oder entsprechenden Einrichtung einer Hochschule eingereicht.

Dortmund, den

---

Raphael Gasper-Schönenbrücher