

Struktur-Funktions-Beziehungen der humanen Septine

Dissertation

Zur Erlangung des Doktorgrades des Fachbereichs Chemie der
Technischen Universität Dortmund

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

vorgelegt von
Diplom-Chemiker

Eldar Zent

geb. in Orsk (Russland)

Dortmund, 2012

Diese Dissertation wurde zwischen Oktober 2008 und Juni 2012 in der Abteilung „Strukturelle Biologie“ des Max-Planck-Instituts für molekulare Physiologie in Dortmund unter der Leitung von Prof. Dr. Alfred Wittinghofer angefertigt.

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

Für Nadine

A handwritten signature in black ink, consisting of a stylized, cursive script that appears to be the name 'Nadine'.

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG	1
1.1. Das Cytoskelett	1
1.1.1. Beschreibung der drei Haupt-Filamenttypen	1
1.1.2. Polymerisation und Dynamik der Cytoskelfilamente	5
1.2 Guaninnukleotid-bindende Proteine (GNBPs)	7
1.2.1 Die Ras-Superfamilie	7
1.2.2 Die strukturellen Motive der GNBPs	8
1.2.3 Die Regulation der GNBPs	10
1.2.4 Die dimerisierenden G-Proteine	12
1.2.5 Die Funktion und die Hydrolyse-Mechanismen der GADs	14
1.3 Septine	17
1.3.1 Entdeckung	17
1.3.2 Genomvergleich	17
1.3.3 Biologische Funktion der Septine	19
1.3.4 Die strukturellen Ebenen der Septin-Organisation	21
1.3.4.1 Struktur der G-Domäne von Septin	22
1.3.4.2 G- und NC-Interface	23
1.3.4.3 Hexamer	24
1.3.4.4 Die Rolle von Sept9 und anderen Vertretern der Gruppe 3	25
1.3.4.5 Übergeordnete Strukturen	27
1.3.5 Dynamik der Septine	28
1.3.6 Regulation der Septin-Polymerisation	31
1.3.7 GTP-Hydrolyse	33
1.3.8 Die Struktur von Sept2 im GppNHp-Zustand	34
2. ZIELSETZUNG	36
3. MATERIALIEN UND METHODEN	37
3.1 Materialien	37
3.1.1 Puffer und Lösungen	37
3.1.2 Geräte	38
3.2 Methoden	41
3.2.1 Molekularbiologische Methoden	41
3.2.2 Proteinbiochemische Methoden	44
3.2.2.1 Überexpression	44
3.2.2.2 Zellaufschluss	44
3.2.2.3 Proteinreinigung mittels Affinitätschromatographie	45
3.2.2.4 Proteinreinigung mittels Größenausschlusschromatographie	45
3.2.2.5 Konzentration der Proteine	46
3.2.2.6 Nukleotidbefreiung und Nukleotidaustausch	46
3.2.3 Biophysikalische Methoden	46
3.2.3.1 Analytische Gelfiltration	46
3.2.3.2 Nukleotidbestimmung mittels HPLC	47
3.2.3.3 Fluoreszenzmethoden	47
3.2.3.4 Oberflächenplasmonresonanz	48
3.2.4 Röntgenkristallographische Methoden	51
3.2.4.1 Kristallisation	51
3.2.4.2 Grundlagen der Röntgenstrukturanalyse	52

3.2.4.3 Datensammlung	53
3.2.4.4 Phasenproblem	53
3.2.4.5 Modellbau und Strukturverfeinerung	54
4. ERGEBNISSE	55
4.1 Konstrukte	55
4.2 Die G-Domäne des humanen Sept7	56
4.2.1 Konstruktherstellung und Reinigung der G-Domäne von Sept7	56
4.2.2 Biochemische Charakterisierung der G-Domäne von Sept7	58
4.2.3 Kristallisation und Strukturlösung der G-Domäne des Sept7 im GDP-gebundenen Zustand	58
4.2.4 Die Struktur von Sept7(29-297)	60
4.2.5 Analyse der Unterschiede im G-Interface zwischen Sept2 und Sept7	65
4.2.6 Stabilisierung des G-Interface durch den <i>switch</i> II Bereich	67
4.2.7 Die Bindung zwischen dem Nukleotid und der G-Domäne von Sept7	69
4.2.8 Bestimmung der Nukleotidaffinitäten mit Hilfe der Gleichgewichtstitration	74
4.2.9 Die intrinsische GTP-Hydrolyse	78
4.3 Funktion der GTPase-Reaktion für die Septine	82
4.3.1 Charakterisierung der Sept7-Dimere über Oberflächenplasmonresonanz	83
4.3.2 Kristallisation und Strukturlösung der G-Domäne von Sept7 im GppNHp-gebundenen Zustand	91
4.3.3 Kristallisation von Sept7(29-297)-Mutante im GppNHp-gebundenen Zustand	92
4.3.4 Struktur von Sept7(29 - 297, S149F)·GppNHp	93
4.4 Charakterisierung von Vertretern anderer Septin-Gruppen	95
4.4.1 Herstellung und Reinigung der Konstrukte der G-Domänen von Sept2, Sept6 und Sept9	95
4.4.2 Charakterisierung der G-Domänen von Sept2, Sept6 und Sept9	97
4.4.3 Analyse der intrinsischen GTP-Hydrolyse mittels Umkehrphasen-HPLC	98
4.4.4 Wechselwirkungen zwischen den G-Domänen von Sept2 und Sept6	99
4.4.5 Wechselwirkungen zwischen den G-Domänen von Sept7 und Sept9	102
4.5 Analyse des humanen Septinkomplexes	104
5. DISKUSSION	106
5.1 Dimerisierung über das G-Interface	106
5.1.1 <i>Switch</i> II als Teil des G-Interface	106
5.1.2 Unterschiede zwischen den Septin-Gruppen.	107
5.2 Eigenschaften der G-Domäne des Sept7	109
5.2.1 Nukleotidbindung	109
5.2.2 Intrinsische Hydrolyse von GTP	111
5.3 Einfluss des Nukleotidzustandes auf die Stabilität des G-Dimers	115
5.4 Modell der nukleotid-abhängigen Stabilität des G-Interface	117
5.5 Struktur von Sept7(S149F) im GppNHp-gebundenen Zustand	122
7. LITERATURVERZEICHNIS	128

1. Einleitung

Die Septine sind Proteine, welche als die vierte Komponente des Cytoskeletts angesehen werden. Auf der Ebene der Aminosäuresequenz sind sie aber mit den Guaninnukleotid-bindenden Proteinen wie Ras verwandt, die als essentielle Regulatoren vieler wichtiger Signalprozesse fungieren.

Daher werden im Folgenden zuerst die Eigenschaften des Cytoskeletts und der Guaninnukleotid-bindenden Proteine umrissen, die für das Verständnis der Aspekte der Septinbiologie, die später diskutiert werden soll, notwendig sind.

1.1. Das Cytoskelett

Die räumlichen und mechanischen Eigenschaften sind bei eukaryotischen Zellen im höchsten Maß entwickelt und beruhen auf einem bemerkenswerten, als Cytoskelett bezeichneten Filamentsystem.

Die vielseitigen Funktionen des Cytoskeletts beruhen auf den Eigenschaften von drei Proteinfamilien, die sich zu drei Haupt-Filamenttypen zusammenfassen lassen. Jeder Filamenttyp hat charakteristische mechanische Eigenschaften, aber einige grundsätzliche Prinzipien sind allen gemein. Diese Prinzipien liefern die Grundlagen für ein allgemeines Verständnis der Funktion des Cytoskeletts.

1.1.1. Beschreibung der drei Haupt-Filamenttypen

Drei Arten von Cytoskelettfilamenten sind den meisten eukaryotischen Zellen gemein. Sie sind für die räumliche Organisation der Zellen von grundlegender Bedeutung. *Aktinfilamente* legen die Form der Zelloberfläche fest und sind für die Fortbewegung der ganzen Zelle erforderlich. *Mikrotubuli* bestimmen die Lage membranumschlossener Organellen und leiten den intrazellulären Transport. *Intermediärfilamente* bieten mechanische Festigkeit und Widerstand gegen Scherkräfte.

Aktinfilamente, die auch als F-Aktin oder Mikrofilamente bezeichnet werden, sind aus den Aktinmonomeren (G-Aktin) aufgebaut. Aktin ist das am häufigsten vorkommende Protein einer eukaryotischen Zelle. Es handelt sich um ein globuläres 42 kDa großes polares Protein, das eine Bindungsstelle für ein ATP-Molekül besitzt (Abb. 1.1). Durch die *head-to-tail* Anlagerung der G-Aktinmonomere bilden sich zweisträngige,

helikale Polymere aus. Mit einem Durchmesser von 5 bis 9 nm sind diese Filamente sehr flexibel. Sie werden jedoch durch die Quervernetzung mit Hilfe anderer Proteine zu linearen Bündeln, flächigen Netzen und räumlichen Gelen organisiert. Aktinfilamente sind zwar überall in der Zelle verteilt, ihre größte Dichte erreichen sie jedoch an der Zellkortex unmittelbar unterhalb der Plasmamembran.

Mikrotubuli sind lange gerade Hohlzylinder. Mit ihrem äußeren Durchmesser von 25 nm sind sie wesentlich starrer als die Aktinfilamente. Mikrotubuli werden aus den Tubulinuntereinheiten aufgebaut. Bei einer Tubulinuntereinheit handelt es sich um ein Heterodimer, welches aus zwei nahe verwandten 55 kDa großen globulären Proteinen, α -Tubulin und β -Tubulin, zusammengesetzt ist (Abb. 1.1). Dabei werden α - und β -Tubuline durch nicht kovalenten Bindungen sehr fest zusammengehalten, so dass sie in der Zelle ausschließlich als dimere Komplexe vorliegen. Die α - und β -Monomere haben je eine Bindungsstelle für ein Molekül GTP. Das an das α -Tubulinmonomer gebundene GTP ist physikalisch fest in die Kontaktgrenzfläche des Dimers eingeschlossen und wird weder hydrolysiert noch ausgetauscht. Es kann daher als fester Bestandteil der Struktur des Tubulinheterodimer angesehen werden. Das Nukleotid des β -Tubulins ist hingegen dynamischer. Es kann durch das Protein von GTP zu GDP hydrolysiert oder durch ein neues GTP-Nukleotid ersetzt werden. Die *head-to-tail* Anlagerung von Heterodimeren führt zur Bildung linearer polarisierter Protofilamente. Aus dreizehn parallel angeordneten Protofilamenten werden die Mikrotubulizylinder aufgebaut (Abb. 1.1). Meistens sind die Mikrotubuli mit einem Ende an einem Mikrotubuli organisierenden Zentrum (MOC), dem Centrosom, befestigt. Für die Bildung der MOC-Strukturen ist das γ -Tubulin essentiell. Hierbei handelt es sich um eine weitere Isoform des Tubulins, die neben den α - und β -Tubulinen in der Zelle vorkommt.

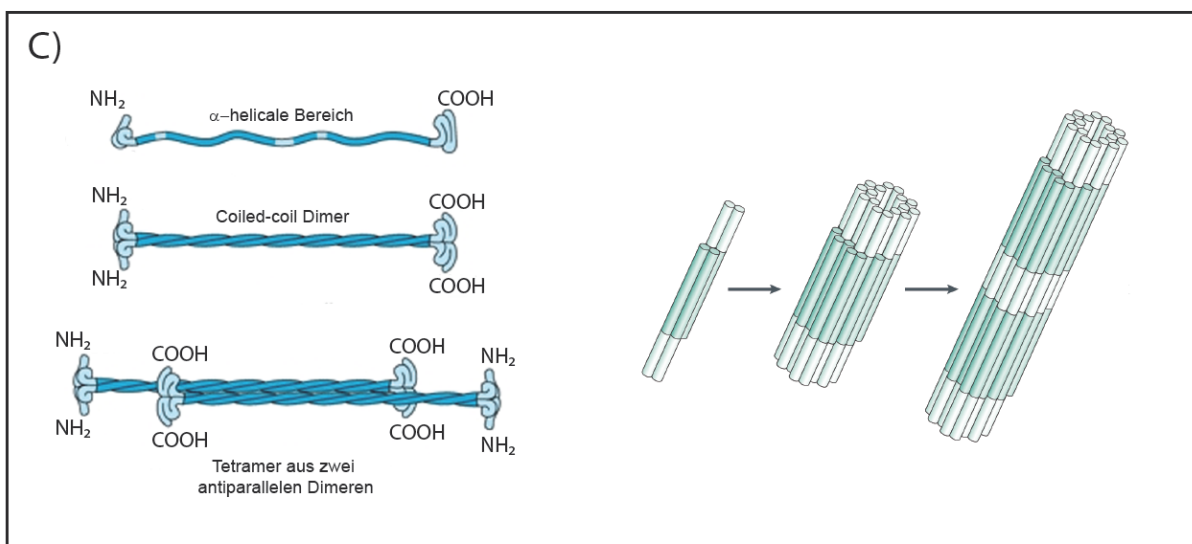
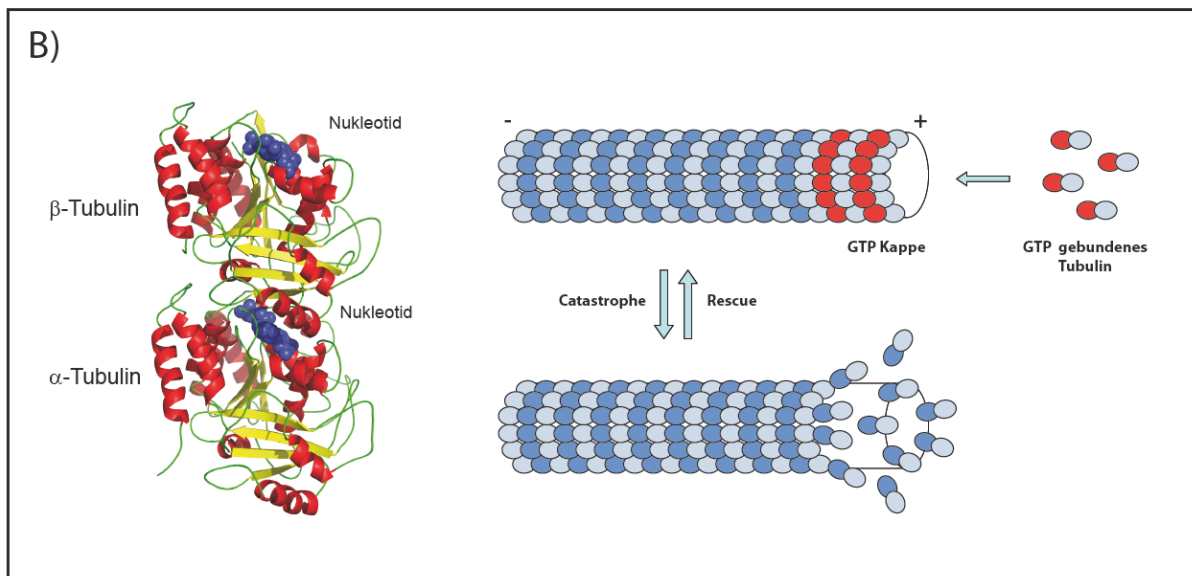
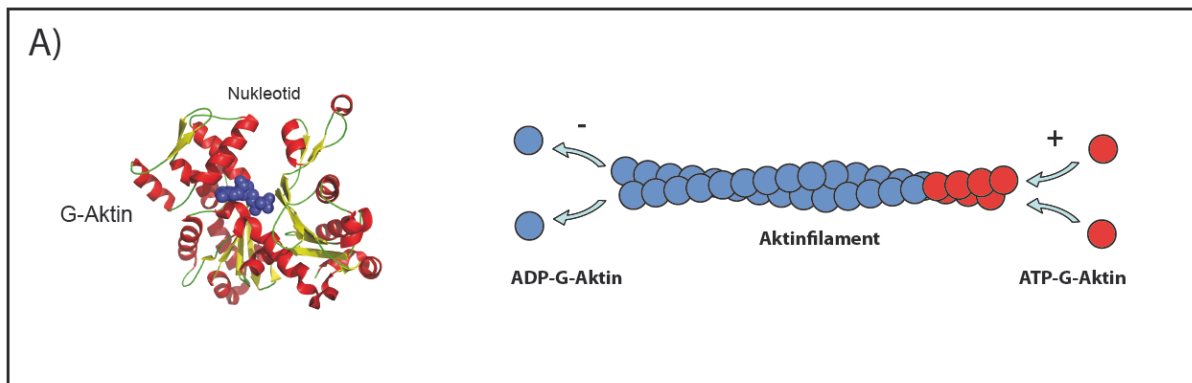


Abb. 1.1 Drei Haupt-Filamenttypen des Cytoskeletts. A) Aktinfilamente, Struktur des G-Aktins (PDB-ID: 1J6Z) und der Tretmühlen-Mechanismus. B) Mikrotubuli, Struktur des Tubulin-Dimers (PDB-ID: 1TUB) und die dynamische Instabilität eines Mikrotubulus. C) Modell für den Aufbau der Intermediärfilamente. Modifiziert nach Herrmann *et al.*, 2007 und Bruce Alberts *et al.*, *Molekularbiologie der Zelle*. 4. Auflage. Wiley-VCH., Weinheim 2003

Die Intermediärfilamente, seilähnliche Fasern mit einem Durchmesser von etwa 10 nm, bilden den dritten Haupttyp der Cytoskelettfilamente. Im Vergleich zu Aktin und Tubulin, welche in allen eukaryotischen Zellen enthalten sind, kommen die Intermediärfilamente vor allem in Tieren mit weichen Körpern vor, wie Nematoden und Vertebraten, die kein Exoskelett besitzen. Jedoch auch in diesen Organismen werden die Intermediärfilamente nicht in allen Zelltypen gleichermaßen benötigt. Sie treten besonders bei Zellen auf, welche einem mechanischen Stress unterliegen. Die Intermediärfilamente lassen sich in verschiedene Familien gliedern, welche in den unterschiedlichen Zellarten expremiert werden. Am weitesten verbreitet und vermutlich die ersten Intermediärfilamente, die im Laufe der Evolution entstanden sind, sind die Kernlamine. Die Lamine des Kerns sind filamentförmige Proteine, die bei Eukaryoten ein Netzwerk unter der inneren Membran der Kernhülle bilden. Die facettenreichsten Familien der Intermediärfilamente sind die der sauren und basischen Keratine. In den Epithelzellen des Menschen können etwa 20 unterschiedliche Arten gefunden werden, etwa 10 weitere sind spezifisch für Haare und Nägel.

Die einzelnen Polypeptide der Intermediärfilamente sind gestreckte Moleküle mit einer verlängerten zentralen α -helikalen Domäne, welche mit einem anderen Monomer einen parallelen Doppelwendel (engl. *coiled-coil*) bildet. Ein Paar Dimere lagert sich in antiparalleler Weise an und bildet ein gestaffeltes Tetramer (Abb. 1.1). Dieses Tetramer stellt die lösliche Untereinheit der Intermediärfilamente dar, analog zum α - β -Tubulindimer oder zum G-Aktinmonomer.

Weil die tetramere Untereinheit aus zwei in entgegen gesetzter Richtung weisenden Dimeren aufgebaut ist, sind ihre beiden Enden gleich. Dem zusammengesetzten Intermediärfilament fehlt daher die strukturelle Gesamtpolarität, welche für die Funktion der Aktinfilamente und Mikrotubuli so entscheidend ist. Die Tetramere lagern sich mit ihren Seiten so aneinander, dass jeweils acht parallele Protofilamente ein Intermediärfilament bilden. Jedes einzelne Intermediärfilament weist daher im Querschnitt 32 einzelne α -helikale Wendeln auf (Abb. 1.1). Diese Struktur verleiht den Intermediärfilamenten ihre seilartige Eigenschaft. Sie können leicht gekrümmt werden, aber sind äußerst schwer zu zerreißen.

Weil die Intermediärfilamente die Zugkräfte aufnehmen, scheinen sie also im Allgemeinen als Bänder der Zelle zu dienen, während die Mikrotubuli und Aktinfilamente als Knochen bzw. Muskeln der Zelle bezeichnet werden können.

1.1.2. Polymerisation und Dynamik der Cytoskelettfilamente

Die Cytoskelettsysteme sind dynamisch und anpassungsfähig. Die Großstruktur des Cytoskellets kann über eine weite Zeitspanne von weniger als einer Minute bis zur gesamten Lebensdauer einer Zelle bestehen bleiben oder sich je nach Bedarf ändern. Die Filamente des Cytoskellets werden durch wiederholte Aneinanderreihung einer großen Anzahl kleiner Untereinheiten aufgebaut. Diese Untereinheiten können aufgrund ihrer geringen Größe im Cytosol rasch diffundieren. Dadurch wird eine schnelle strukturelle Umorganisation der Zelle möglich, indem die Filamente an einer Stelle abgebaut und an einer anderen Stelle wieder aufgebaut werden.

Die Polymerisation von Aktin und Tubulin ist detailliert untersucht worden. Die Bildung eines neuen Filaments beginnt mit dem Prozess der Keimbildung bzw. der Nukleation, wobei zunächst mehrere Untereinheiten zu einer Anfangsstruktur assemblieren müssen. Diese Struktur ist durch viele wechselseitige Bindungen zwischen den Untereinheiten stabilisiert und kann anschließend durch die Anlagerung weiterer Untereinheiten schnell verlängert werden. Im Vergleich zum Wachsen des Filaments ist der Prozess der Keimbildung deutlich langsamer und gilt somit als geschwindigkeitsbestimmender Schritt der Polymerisation von Cytoskelettfilamenten.

Vor allem bei Aktinfilamenten wird die Keimbildung für die Regulation eingesetzt. Dabei wird der Arp2/3-Komplex als Nukleationskeim verwendet, der seinerseits durch die WASP-Proteine (*Wiskott-Aldrich syndrom family proteins*) aktiviert wird (Goley und Welch, 2006). Als Nukleationskeim bei Mikrotubuli dient das MOC.

Sowohl Aktinfilamente als auch Mikrotubuli weisen eine strukturelle Polarität auf, die aus der geordneten Orientierung der Untereinheiten hervorgeht. Neben den strukturellen Unterschieden besitzen die beiden Enden unterschiedliche Wachstumsgeschwindigkeiten. Das schnell wachsende Ende wird dabei als Plus-Ende, das langsam wachsende Ende hingegen als Minus-Ende bezeichnet.

Die Hydrolyse des Nukleotids erfolgt an der freien Untereinheit relativ langsam, wird aber durch den Einbau in das Filament beschleunigt. Hierbei setzen die Aktin- bzw. Tubulin-Untereinheiten kurz nach der Einlagerung in das Filament ein Phosphat frei und gehen somit aus einem Triphosphatzustand in einen Diphosphatzustand über. Die Hydrolyse des Nukleotids erniedrigt jedoch gleichzeitig die Bindungsstärke zwischen den Filamentuntereinheiten. Daher lagern sich die Untereinheiten meist in der Triphosphatform (T-Form) in das Filament ein, wohingegen sie in der

Diphosphatform (D-Form) von dem Filament abdissoziieren (Abb. 1.1). Ist die Geschwindigkeit der Anlagerung der neuen Untereinheiten schneller als die Nukleotidhydrolyse, bildet sich an einem Ende des Filaments eine Kappe aus den Untereinheiten in der T-Form. Bei Aktinfilamenten wird diese als ATP-Kappe, bei Mikrotubuli als GTP-Kappe bezeichnet. Die höhere Bindungsaffinität der Untereinheiten im Triphosphatzustand schützt das Filament vor dem Abbau.

Bei den Cytoskelettfilamenten werden zwei Prozesse beobachtet, die beide auf der Nukleotidhydrolyse basieren: der Tretmühleneffekt bei den Aktinfilamenten und die dynamische Instabilität der Mikrotubuli (Abb. 1.1). Unter dem Tretmühleneffekt versteht man einen dynamischen Gleichgewichtszustand, bei dem die Assoziation von ATP-gebundenen G-Aktinmonomeren an das Plus-Ende des Aktinfilamentes genau so schnell verläuft wie die Dissoziation des ADP-gebundenen G-Aktins vom Minus-Ende. Als dynamische Instabilität wird hingegen eine zyklische Abwechslung zwischen dem schnellen Wachstum und Schrumpfen des Plus-Endes bei den Mikrotubuli bezeichnet.

Den Regulationsmechanismus für die Auf- und Abbau der Intermediärfilamente kennt man weniger gut als den der Aktinfilamente und Mikrotubuli. Es ist allerdings klar, dass sie in den meisten Zellarten hoch dynamische Strukturen darstellen. Für die Kernlaminae wurde gezeigt, dass eine Phosphorylierung durch Cyclin-abhängige Kinase 1 für den Filamentabbau während der Zellteilung verantwortlich ist (Peter *et al.*, 1991). Auch bei anderen Typen der Intermediärfilamente wird die Dynamik durch Proteinphosphorylierung reguliert (Hyder *et al.*, 2008).

Für die Fähigkeit einer schnellen strukturellen Anpassung der Aktin- und Tubulinnetzwerke nimmt die Zelle den hohen Energieverbrauch in Form von ATP- bzw. GTP-Hydrolyse in Kauf. Bei den Intermediärfilamenten, die für die langfristige Stabilisierung der Zelle eingesetzt werden, wird die Energie hingegen gezielt beim Abbau der bestehenden Strukturen eingesetzt.

1.2 Guaninnukleotid-bindende Proteine (GNBPs)

Die Guaninnukleotid-bindende Proteine (GNBPs) sind an der Regulation vieler grundlegender zellulärer Prozesse beteiligt, wobei sie einen gemeinsamen nukleotid-abhängigen Zyklus der GTP-Bindung und GTP-Hydrolyse durchlaufen (Abb.1.2) (Vetter und Wittinghofer, 2001). Basierend auf Sequenz- und Strukturvergleichen werden die GNBPs entweder in die TRAFAC-Klasse (*translation factors*) oder in die SIMIBI-Klasse (*signal recognition, MinD, and BioD*) eingeteilt (Leipe *et al.*, 2002). Die TRAFAC-Klasse enthält neben den Translationsfaktoren auch noch die an der Signaltransduktion beteiligte Ras-Superfamilie, die Myosin-Kinesin-Superfamilie der Motorproteine sowie die OBG-HflX-Superfamilie und die MnmE-Era-EngA-YihA-Septin-Superfamilie.

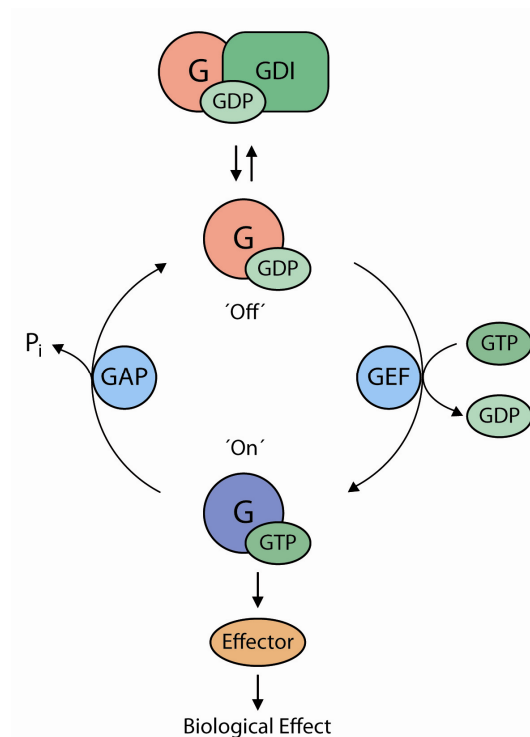


Abb. 1.2 Der nukleotid-abhängige Zyklus der kleinen GNBPs.

1.2.1 Die Ras-Superfamilie

Die Proteine der Ras-Superfamilie bestehen meist nur aus einer GTPase-Domäne und werden daher als kleine G-Proteine bezeichnet. Im menschlichen Genom findet man über 150 Vertreter der Ras-Superfamilie, welche in verschiedene Unterklassen klassifiziert werden (Wennenberg *et al.*, 2005). Die Proteine der Ras Unterklasse (*rat sarcoma*) sind an der Kontrolle von Zellproliferation, Zelldifferenzierung und Apoptose beteiligt. Die Vertreter der Rho-Unterklasse (*Ras Homologous*) regulieren die Organisation des Cytoskellets und das Zellwachstum. Die Rab-Unterklasse (*Ras-*

like protein in brain) und Arf-Unterklasse (ADP-riboseylation factor) sind für die Regulation des intrazellulären Vesikeltransports essentiell. Das Protein Ran (Ras related nuclear factor) reguliert hingegen den Import und den Export in und aus dem Zellkern.

1.2.2 Die strukturellen Motive der GNBPs

Der Prototyp einer minimalen G-Domäne der TRAFAC-Klasse ist das Protein Ras. Die Kernstruktur dieser G-Domäne besteht aus einem sechssträngigen gemischten β -Faltblatt und fünf α -Helices (Abb.1.3). Die Topologie der minimalen G-Domäne wird bei vielen GNBPs durch Insertion von zusätzlichen Sekundärstrukturelementen erweitert. Für die Funktion der G-Domäne sind fünf konservierte Sequenzbereiche essentiell, welche an der Bindung des Guaninnukleotids beteiligt sind und als G1- bis G5-Motive bezeichnet werden (Wittinghofer und Vetter, 2011).

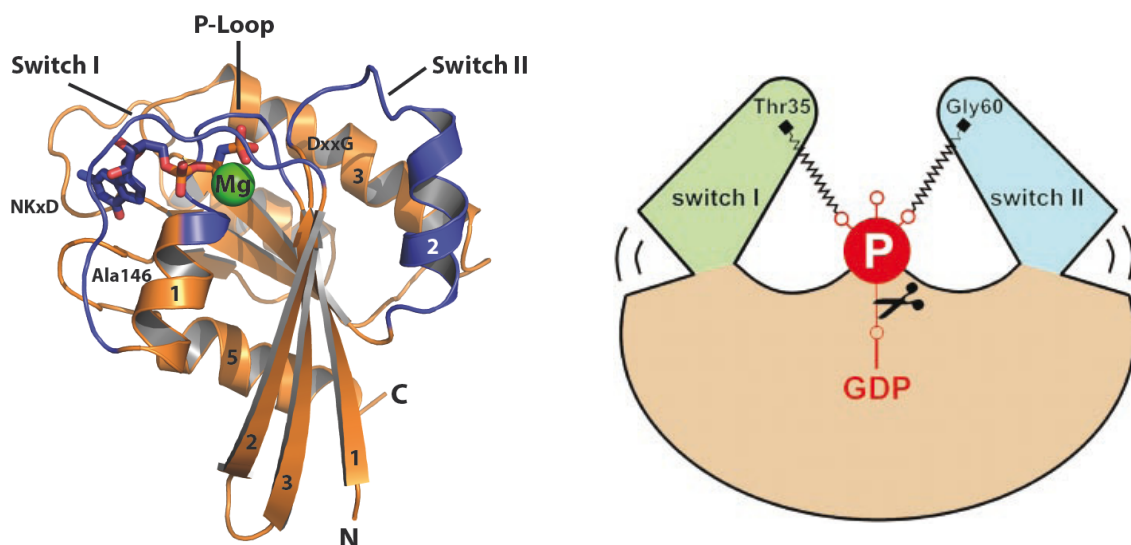


Abb. 1.3 G-Domäne. A) Ribbon-Darstellung der Struktur der minimalen G-Domäne (H-Ras PDB-ID: 5P21) die *switch* Bereiche sind mit blauer Farbe hervorgehoben. B) Schematische Darstellung des für die GNBPs universellen *spring loaded* Mechanismus. Modifiziert nach Vetter und Wittinghofer, 2001.

Das G1-Motiv enthält eine Konsensussequenz GxxxGK(S/T) (Aminosäuren 10-17 in Ras). Über dieses Sequenzmotiv binden die GNBPs an die Phosphatgruppen des Nukleotids, daher wird diese auch als Phosphat-bindende Schleife oder *P-loop* bezeichnet. Dabei sind die konservierten Glycin-Reste für die strukturelle Konformation des *P-loops* essentiell. Die direkte Interaktion mit den Phosphatgruppen des Nukleotids findet mittels der Amidgruppen der Hauptkette und γ -Aminogruppe des Lysinrestes (Lys16^{Ras}) statt. Zudem koordiniert der Serin- bzw.

Threonin-Rest (Ser17^{Ras}) das Magnesium-Ion, welches bei der Stabilisierung der Phosphatgruppen beteiligt und somit für die hohe Affinität der Nukleotidbindung essentiell ist.

Das G2-Motiv befindet sich zwischen α 1-Helix und β 2-Strang und wird meist als *switch* I bezeichnet (Aminosäuren 30-38 in Ras), weil es seine Konformation in Abhängigkeit von dem gebundenen Nukleotid ändert. Der einzige hoch konservierte Rest in diesem Motiv ist das Threonin (Thr35^{Ras}). In dem GTP-gebundenen Zustand bindet die Amidgruppe des Threonin an das γ -Phosphat des Nukleotids. Außerdem koordiniert die Hydroxygruppe der Threoninseitenkette das Magnesium-Ion. Diese beiden Bindungen stabilisieren die GTP-induzierte Konformation von *switch* I.

Das G3-Motiv besteht aus der Aminosäurenabfolge DxxG und befindet sich zwischen β 3-Strang und α 2-Helix. Das Glycin gehört zu dem so genannten *switch* II Bereich (Aminosäuren 59-67 in Ras), welcher abhängig von dem gebundenen Nukleotid seine Konformation ändern kann. Während das Aspartat (Asp57^{Ras}) mit seiner Seitenkette das Magnesium-Ion indirekt über ein Wassermolekül koordiniert, bindet die Amidgruppe des konservierten Glycin (Gly60^{Ras}) an das γ -Phosphat des Nukleotids.

Das G4-Motiv beinhaltet die Konsensussequenz (N/T)KxD und ist für die spezifische Bindung des Guaninnukleotids verantwortlich. Dabei ist der Aspartat-Rest (Asp119^{Ras}) für die Erkennung der Guaninbase essentiell. Die Carboxylgruppe der Aspartatseitenkette bildet die Wasserstoffbrücken zur N1-Amid- und N2-Amino-Funktion der Guaninbase. Diese Wechselwirkungen führen zu einer höheren Affinität zum Guaninnukleotid im Vergleich zum Adeninnukleotid.

Das G5-Motiv ist im Vergleich zu den anderen Motiven weniger stark konserviert. Die SA(K/L)-Sequenz sorgt für eine weitere Stabilisierung der Wechselwirkungen zwischen Nukleotid und Protein, indem die Hauptkette des Alanins über eine Wasserstoffbrücke den O6-Sauerstoff der Guaninbase bindet. Diese Wechselwirkung führt somit ebenfalls zu einer stärkeren Bindung des Guaninnukleotids im Vergleich zum Adeninnukleotid.

Wie bereits erwähnt leisten die G4- und G5-Motive durch die Bindung der Guaninbase und der *P-loop* durch die Bindung an das β -Phosphat die wichtigsten Beiträge zu der starken Bindung des Nukleotids. Die *switch* Bereiche sind dagegen sehr flexibel. Nur im GTP-gebundenen Zustand führt die Bindung der *switch* Bereiche an das γ -Phosphat zur Stabilisierung ihrer Konformationen. Diese

gespannte definierte Konformation der *switch* Bereiche ermöglicht die Wechselwirkung der GNBPs mit den Effektoren. Ein Beispiel für Ras-Effektoren sind Proteine mit Ras-Bindungs-Domäne (RBD) wie z.B. die Raf-Kinasen. Die Abspaltung des γ -Phosphats bei der GTP-Hydrolyse führt zur Relaxation der gespannten Konformationen. Diese Nukleotid-abhängige Konformationsänderung wird als *loaded spring* Mechanismus bezeichnet (Abb. 1.3). In dem GDP-gebundenen Zustand weisen die *switch* Bereiche eine höhere strukturelle Flexibilität auf, was eine Schwächung der Wechselwirkungen zwischen den GNBPs und den Effektor-Proteinen zur Folge hat.

1.2.3 Die Regulation der GNBPs

Die Funktion der GNBPs als molekulare Schalter basiert darauf, dass sowohl die intrinsische Aktivierung als auch die Inaktivierung sehr langsam ablaufen. Daher sind die beiden Zustände, die GTP-Form und die GDP-Form, auf der Zeitskala der zellulären Prozesse lange stabil. Die Überführung der GNBPs in den gewünschten Zustand wird daher durch die regulatorischen Proteine GEFs und GAPs gesteuert (Bos *et al.*, 2007).

Der Austausch der gebundenen Nukleotide ist bei GNBPs wegen der starken Bindung sehr langsam ($k_{\text{Ras}} = 1,2 \cdot 10^{-5} \text{ s}^{-1}$). Guaninnukleotidaustauschfaktoren (engl. *guanin nucleotide exchange factors*, GEFs) beschleunigen die Dissoziation des gebundenen Nukleotids um bis zu fünf Zehnerpotenzen (Lenzen *et al.*, 1998) und regulieren hierdurch die Aktivierung von GNBPs.

Obwohl die GEFs der einzelnen Unterfamilien von GNBPs keine Homologie untereinander aufweisen, zeigten die strukturellen Analysen der GEF-GNBPs-Komplexe, dass der Mechanismus der Aktivierung bei allen GEFs Gemeinsamkeiten aufweist. Die GEF-katalysierte Reaktion ist die schrittweise Verdrängung des Nukleotids, welche über einen trimeren GEF-GNBPs-Nukleotid-Komplex verläuft (Bos *et al.*, 2007). Die Bindung von GEF an die GNBPs induziert eine allosterische Destabilisierung der Nukleotidbindung (Goody, 2002). Dies geschieht einerseits durch das Verdrängen des Mg^{2+} -Ions aus der Nukleotidbindungsstelle, welches für die hohe Nukleotidaffinität essentiell ist. Andererseits werden die Wechselwirkungen zwischen dem *P-loop* und den Phosphatgruppen des Nukleotids geschwächt, indem das konservierte Lysin des *P-loops* durch einen sauren Rest gebunden wird. Dies geschieht entweder durch ein konserviertes Glutamat aus *switch II* der GNBPs

(Gasper *et al.*, 2008) oder durch ein Glutamat bzw. Aspartat des GEF's (Beraud-Dufour *et al.*, 1998; Delprato und Lambright, 2007). Alle Schritte der GEF-Reaktion sind reversibel, so dass die erneute Bindung des Nukleotids zur Freisetzung des GEF's führt. Aufgrund der höheren intrazellulären GTP-Konzentration, die etwa 10-fach höher als die GDP-Konzentration ist, führt die erneute Nukleotidbindung zur überwiegenden Beladung mit GTP und somit zur Aktivierung von GNBPs.

Die Gegenspieler für die GEFs sind GTPase-aktivierende Proteine (engl. *GTPase-activating proteins*, GAPs). Die GAPs sind für die Inaktivierung der GNBPs verantwortlich, indem sie die langsame intrinsische GTP-Hydrolyse beschleunigen ($k_{\text{Ras}} = 4,7 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$), z.B. im Falle von Ras um das 10^5 -fache (Gideon *et al.*, 1992).

Der Mechanismus der GAP katalysierten GTP-Hydrolyse wurde über die strukturelle Charakterisierung verschiedener GNBPs-GAP-Komplexe erklärt. Die Spaltung von GTP erfolgt durch einen nukleophilen Angriff eines Wassermoleküls auf die γ -Phosphatgruppe. Die Effizienz dieses Prozesses hängt von mehreren Faktoren ab. Neben der optimalen Orientierung und Polarisierung des angreifenden Wassermoleküls muss auch die im Übergangszustand auftretende negative Ladung neutralisiert werden. Die katalytischen Zentren verschiedener GNBPs zeigen leichte Unterschiede. Für die optimale Katalyse der GTP-Hydrolyse benutzen die zugehörigen GAPs daher unterschiedliche Wege zur Komplementierung des aktiven Zentrums. Die GAPs von Ras und Rho verwenden dabei ein invariantes Arginin, das als „Arginin-Finger“ bezeichnet wird. Das Einbringen des positiv geladenen Arginins in das aktive Zentrum führt einerseits zur Neutralisierung der negativen Ladung der Phosphatgruppen und andererseits zur Stabilisierung der Position des katalytischen Glutamins (Gln61^{Ras}), was die optimale Positionierung des Wassers für den nukleophilen Angriff zur Folge hat (Scheffzek *et al.*, 1997).

Die parallelen Arbeiten an RhoGAP zeigten, dass die RhoGAPs trotz der strukturellen Unterschiede zu RasGAP den gleichen Mechanismus für die Katalyse der GTP-Hydrolyse verwenden (Rittinger *et al.*, 1997a; Rittinger *et al.*, 1997b). Bei RanGAP wird das katalytische Glutamin von Ran durch ein invariantes Asparagin aus RanGAP stabilisiert. An der Stelle des Argininfingers von Ras / RhoGAPs findet man in der Kristallstruktur von Ran-RanGAP dagegen das konservierte Tyrosin von Ran (Seewald *et al.*, 2002). Ob dieses allerdings die Funktion des Argininfingers übernimmt, ist umstritten, weil die Mutation des Tyrosins zum Alanin nur einen geringen Effekt auf die Hydrolyse hat (Brucker *et al.*, 2010). Das kleine G-Protein

Rap besitzt anstelle des katalytischen Glutamins ein Threonin. Die Positionierung und Polarisierung des angreifenden Wassers wird daher von dem konservierten Asparagin aus RapGAP übernommen, welches eine ähnliche Position wie das katalytische Glutamin in Ras einnimmt (Daumke *et al.*, 2004). Beim RabGAP kommt ein *dual-finger* Mechanismus mit zwei wichtigen Resten, einen Arginin und einen Glutamin, zum Einsatz. Sowohl der Argininfinger, welcher für die Neutralisierung der negativen Ladung verantwortlich ist, als auch das katalytische Glutamin, welches das angreifende Wasser koordiniert, kommen beide aus RabGAP und werden in das aktive Zentrum von Rab inseriert (Pan *et al.*, 2006).

Neben der Regulierung des Nukleotidzustandes werden die GNBPs auch über die Kontrolle der intrazellulären Lokalisation reguliert. Viele GNBPs der Ras-Superfamilie besitzen an ihrem C-Terminus ein konserviertes Motiv, welches als CaaX-Box bezeichnet wird (C – Cystein, a – aliphatische und X – beliebige Aminosäuren). Die CaaX-Sequenz wird durch Farnesyl- oder Geranylgeranyltransferasen erkannt. Diese beiden Enzyme katalysieren den Transfer des entsprechenden Prenylrestes an das Cystein unter Bildung einer Thioetherbindung. Die weiteren Lipidmodifikationen wie z.B. die Palmitoylierung eines Cysteins, das N-terminal zur CaaX-Box liegt, können die Affinität der GNBPs zur Lipidmembran erhöhen. Dieser Vorgang ist reversibel, denn der Palmitoylrest kann durch die Acyl-Protein-Thioesterasen wieder gespalten werden. Dies ermöglicht eine Regulation der intrazellulären Verteilung von GNBPs (Rocks *et al.*, 2005). Der intrazelluläre Transport der GNBPs zwischen verschiedenen Membrankompartimenten wird durch Guaninnukleotiddissoziationsinhibitoren (GDI) (DerMardirossian und Bokoch, 2005; Goody *et al.*, 2005) oder durch GDI-ähnliche Faktoren wie PDE δ und Hrg4 vermittelt (Ismail *et al.*, 2011). Während der Transport durch die GDI-ähnlichen Faktoren unabhängig von dem Nukleotidzustand der Fracht erfolgt, werden die Rabs und Rhos hingegen nur in GDP-Form durch GDIs transportiert.

1.2.4 Die dimerisierenden G-Proteine

Neben den GNBPs der Ras-Superfamilie sind einige G-Proteine bekannt, bei denen das Modell des Schalterzykluses mit Regulation durch GEFs und GAPs nicht angewandt werden kann.

Diese G-Proteine wurden als GADs klassifiziert. Die charakteristische Eigenschaft der GAD-Proteine stellt die Nukleotid-abhängige Dimerisierung (*G-proteins activated*

by *dimerization*) dar (Gasper *et al.*, 2009). Außerdem besitzen sie eine geringe Nukleotidaffinität im mikromolaren Bereich. Die schnelle intrinsische Nukleotiddissoziation führt dazu, dass diese G-Proteine keine GEFs benötigen. Obwohl die Interaktionsoberflächen für die Dimerisierung je nach GAD variieren, sind dabei immer *switch* Regionen von GADs beteiligt. Daher wird angenommen, dass die biologische Funktion der GADs auf ihrer dimeren Form basiert (Abb. 1.4). Zudem wird die Hydrolyse von GTP durch die Komplementierung des aktiven Zentrums in Folge der Dimerisierung aktiviert. Allerdings ist die mechanistische Rolle der GTP-Hydrolyse für die biologischen Funktionen der GADs in vielen Fällen noch nicht vollständig verstanden.

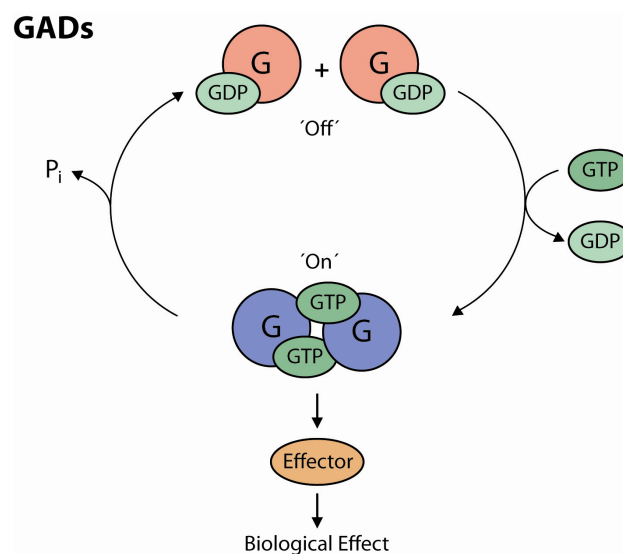


Abb. 1.4 Der postulierte nukleotid-abhängige Zyklus von GADs. Modifiziert nach Gasper *et al.*, 2009.

Die GADs können anhand der Art der Dimerisierung in drei Kategorien unterteilt werden (Gasper *et al.*, 2009). Während der „Pseudo-*Trans*-Homodimerisierung“ erfolgt die Bindung zwischen unterschiedlichen GNBP der selben Familie, wie z.B. beim Signalerkennungspartikel (SRP) und seinem Rezeptor (SR) (Egea *et al.*, 2004). Als „*Trans*-Homodimerisierung“ wird hingegen die Bindung zwischen zwei gleichen GNBP bezeichnet. Diese Dimerisierungsart findet man z.B. bei hGBP1, dem Protein der Dynamin-Superfamilie (Prakash *et al.*, 2000a; 2000b) und HypB (Gasper *et al.*, 2006). Bei der „*Cis*-Homodimerisierung“ sind zwei gleiche GNBP über zusätzliche Domänen konstitutiv aneinander gebunden. Die nukleotid-abhängige Wechselwirkung zwischen den G-Domänen tritt zusätzlich auf. Dieser Mechanismus wurde z.B. bei MnmE (Scrima und Wittinghofer, 2006) beobachtet und bei Roco-Protein LRRK2 vermutet (Gotthardt *et al.*, 2008).

1.2.5 Die Funktion und die Hydrolyse-Mechanismen der GADs

Die am besten untersuchten GADs bilden einen Komplex bestehend aus dem Signalerkennungspartikel (SRP) und seinem Rezeptor (SR). Dieser Komplex reguliert die Translokation von sekretorischen Proteinen und die Insertion der Membranproteine in das endoplasmatische Retikulum bei Eukaryonten bzw. in die Plasmamembran der prokaryotischen Zellen (Egea *et al.*, 2005). Die Bindung von SRP an die Signalsequenz der naszierenden Polypeptidkette führt zur Bildung des RNC (*ribosome nascent chain complex*) und zur Inhibition der Translation. Die GTP-abhängige Dimerisierung von SRP und SR vermittelt anschließend die Bindung von RNC an das Translokon in der Membran. Die GTP-Hydrolyse bewirkt die Dissoziation des SPR-SR-Komplexes und die Freisetzung des Ribosoms. Dadurch kann das am Translokon gebundene Ribosom die Elongation der Polypeptidkette fortsetzen.

Sowohl SPR als auch SR enthalten eine sogenannte NG-Domäne, eine G-Domäne mit der SIMIBI-Topologie. Da die beiden NG-Domänen homolog aber nicht identisch sind, handelt es sich um eine Pseudo-*Trans*-Homodimerisierung. Die Kristallstruktur der bakteriellen Homologa Ffh (SPR) und FtsY (SR) im Triphosphatzustand zeigt ein Heterodimer mit einer *pseudo*-zweifachen Symmetrie. Die G-Domänen nehmen dabei eine antiparallele Anordnung an, so dass die 3'-OH-Gruppen der Ribose an das γ -Phosphat der jeweils anderen Nukleotide binden. Durch die Dimerisierung wird die GTP-Hydrolyse aktiviert, indem die katalytischen Aspartat- und Arginin-Reste der konservierten I-Box, α - β - α -Insertion im *switch I*, stabilisiert werden. Während Asp135^{Ffh} bzw. Asp139^{FtsY} die nukleophil angreifenden Wassermoleküle aktivieren, übernehmen Arg138^{Ffh} bzw. Arg142^{FtsY} die Funktion des Argininfingers der konventionalen GAPs.

Trans-Homodimerisierung findet man bei Proteinen der Dynamine-Superfamilie welche neben den Dynaminen auch Mitofusine, Atlastine und GBPs enthält. Diese Proteine sind unter Anderem an der Cytokinese, der Organellteilung und der Organellfusion, sowie an der Abschnürung der Transport-Vesikel beteiligt (Praefcke und McMahon, 2004). Im Vergleich zu den Proteinen der Ras-Superfamilie handelt es sich bei ihnen eher um Motorproteine, welche die GTP-Hydrolyse für die Krafterzeugung verwenden, die für die Abschnürung erforderlich ist. Die Dynamine enthalten eine N-terminale G-Domäne, eine Mitteldomäne und eine GTPase-Effektor-Domäne (GED). Durch Insertionen am N-Terminus und zwischen β 6- und α 5

enthalten die Dynamine eine große G-Domäne mit insgesamt acht β -Strängen und neun α -Helices. Die klassischen Dynamine bilden ein konstitutives Dimer durch Wechselwirkungen zwischen den Stängeln (*stalk*), die aus der Mitteldomäne und der GED-Domäne zusammengesetzt sind (Ford *et al.*, 2011; Faelber *et al.*, 2011).

Die Charakterisierung von hGBP1 (*GTP-binding protein 1*) zeigte eine GTP-abhängige Dimerisierung. Zudem besitzt das hGBP1 die ungewöhnliche Fähigkeit, das GDP, welches nach der GTP-Hydrolyse entstanden ist, weiter zu GMP zu hydrolysieren, wobei die Geschwindigkeit der beiden Prozesse von der Konzentration des Proteins abhängt. Diese beiden Vorgänge konnten durch strukturelle Analysen aufgeklärt werden (Ghosh *et al.*, 2006). Die Dimerisierung der G-Domäne erfolgt über die Nukleotidbindungsstelle, wobei hierbei sowohl *switch I* als auch *switch II* Bereiche involviert sind. Außerdem stabilisiert die Dimerisierung das Arg-48 des *P-loop*, welches die Rolle des Arginin-Fingers übernimmt, und das Ser-78 in *switch I*, welches das nukleophil angreifende Wassermolekül koordiniert. Die GDP-Hydrolyse verläuft mechanisch analog, indem das β -Phosphat durch die leichte Verschiebung des Nukleotids an die Stelle des γ -Phosphat positioniert wird (Ghosh *et al.*, 2006).

Ein Beispiel für *Cis*-Homodimerisierung ist das Protein MnmE (Methylaminomethyl E). Es kommt in Bakterien und eukaryotischen Mitochondrien vor und vermittelt zusammen mit GidA (*glucose-inhibited division protein A*) die Nukleosidmodifikation im Anticodon der tRNAs. Außer der c-terminalen G-Domäne enthält das MnmE eine n-terminale Formyltetrahydrofolat-Bindungsdomäne und eine zentrale helikale Domäne. Während die n-terminale Formyltetrahydrofolat-Bindungsdomäne für die enzymatische Aktivität verantwortlich ist, sorgt die zentrale helikale Domäne für die konstitutive Dimerisierung zweier MnmE-Monomere. Die beiden G-Domänen des Dimers sind mit ihrer Nukleotidbindungsstelle einander zugewandt und zeigen eine Nukleotid-abhängige *Cis*-Homodimerisierung, die zudem durch ein Kalium-Ion unterstützt wird. Die Koordination des Kalium-Ions erfolgt durch den *K-loop*, einen verlängerten Bereich von *switch I*. Dabei nimmt das Kalium-Ion die gleiche Position wie der Arginin-Finger in der Ras-RasGAP-Struktur ein. Die positive Ladung des Kalium-Ions stabilisiert die negativen Ladungen der Phosphatgruppen und beschleunigt dadurch die GTP-Hydrolyse um das 10-fache. (Scrima und Wittinghofer, 2006). Die GTP-abhängige Dimerisierung der G-Domäne bewirkt eine starke Konformationsänderung im ganzen Protein und ist für die tRNA-Modifikation

essentiell (Scrima und Wittinghofer, 2006; Meyer *et al.*, 2009). Dabei wird die GTP-Hydrolyse an eine enzymatische Reaktion gekoppelt, wobei die genaue Rolle der Hydrolyse für die ablaufenden chemischen Reaktionen weiterhin unbekannt ist.

Neben den oben beschriebenen GADs wurde auch bei den strukturellen Untersuchungen von Roco-Proteinen (Gotthardt *et al.*, 2008), HypB (Gasper *et al.*, 2006), Toc (Sun *et al.*, 2002) und humanen GTPsen GIMAPs (Schwefel *et al.*, 2010) die Nukleotid-abhängige Dimerisierung nachgewiesen. Auch die Septine konnten als GADs klassifiziert werden.

1.3 Septine

1.3.1 Entdeckung

Ursprünglich wurden die Septine zusammen mit weiteren sogenannten CDC-Genen, *cell-division-cycle genes*, durch Mutationsexperimente in *Saccharomyces cerevisiae* (Bäckerhefe) identifiziert (Hartwell, 1971). Mit Hilfe von elektronenmikroskopischen Untersuchungen wurde kurz darauf eine Serie von konzentrischen Ringen aus 10 nm-dicken, membranassoziierten Filamenten entdeckt, die am Knospenansatz zwischen der Mutter- und Tochterzelle lokalisiert sind (Abb. 1.5) (Byers und Goertsch, 1976). Bereits damals wurde erkannt, dass manche Hefe-Mutanten, die Fehler bei den Zellteilungsmechanismen aufweisen auch über keine Ringfilamente am Knospenansatz verfügen. Aber erst Immunfluoreszenz-Untersuchungen und *in vitro* Studien mehr als zehn Jahre später zeigten, dass diese Filamente aus den vier Septinen CDC3, CDC10, CDC11 und CDC12 aufgebaut sind (Haarer und Pringle, 1987).

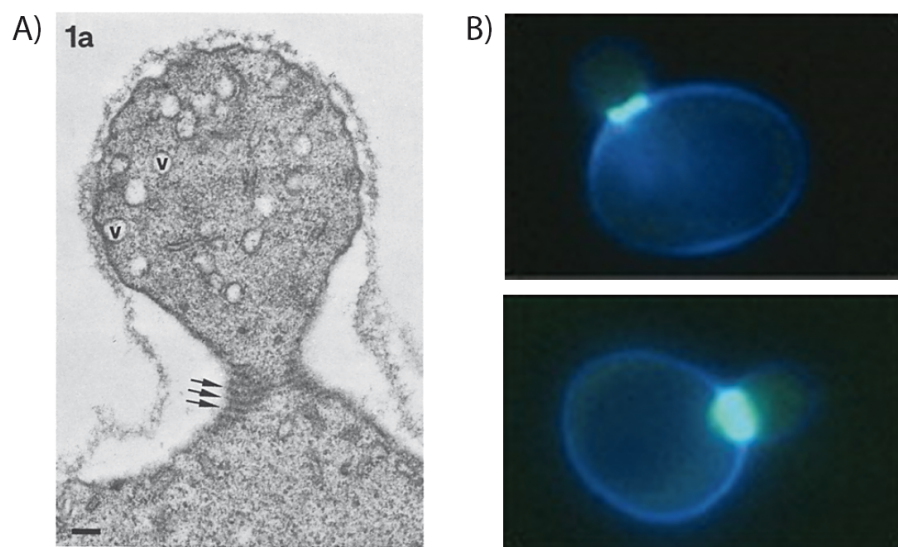


Abb. 1.5 Elektronenmikroskopische Aufnahme und Fluoreszenzbilder der Septine in *S. cerevisiae*. A) Die ersten elektronenmikroskopischen Aufnahmen der Septinringe durch Byers und Goertsch, 1976. B) Lokalisation von CDC12 mittels Fluoreszenzmikroskopie Versele *et al.* 2004.

1.3.2 Genomvergleich

Anfänglich wurden die Septinfilamente am Knospenansatz der Hefe als ein besonderes Merkmal dieses Organismus betrachtet. Dies änderte sich mit der Identifizierung des ersten Septins in *Drosophila melanogaster* (Neufeld und Rubin, 1994) und später auch im Menschen. Die Genomanalysen verschiedener

Organismen zeigten, dass die Septine sowohl bei den Pilzen als auch im Tierreich konserviert sind. Sowohl in der Knospungshefe *S. cerevisiae* als auch in der Spaltheefe *Schizosaccharomyces pombe* wurden je sieben Septingene gefunden. Im Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* wurden hingegen nur zwei, in der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* nur fünf und bei den Pflanzen dagegen keine Septingene gefunden (Kinoshita, 2003; Pan *et al.*, 2007). Der neuen einheitlichen Nomenklatur zur Folge, welche von Macara *et al.* 2002 vorgeschlagen wurde, werden die dreizehn Septingene des humanen Genoms als SEPT1 - SEPT12 und SEPT14 bezeichnet. Das ursprünglich als SEPT13 bezeichnete Gen wurde nach neueren Untersuchungen als eines von mehreren Pseudogenen identifiziert (Russell und Hall, 2011). Die phylogenetische Analyse der verfügbaren Septinsequenzen führte zur Klassifizierung einzelner Septine in verschiedene Gruppen anhand ihrer Aminosäuresequenz (Pan *et al.*, 2007). Dabei werden die humanen Septine Sept1, Sept2, Sept4 und Sept5 zur Gruppe 2, Sept6, Sept8, Sept10, Sept11 und Sept14 zur Gruppe 6 und Sept3, Sept9 und Sept12 zur Gruppe 3 zugeordnet. Sept7 ist der einzige Vertreter der Gruppe7 (Tab. 1.3).

Tab. 1.1 Klassifikation der Septine in Gruppen.

Modifiziert nach Kinoshita, 2003 und Pan *et al.*, 2007.

Organismus	Gr. 2	Gr. 3	Gr. 6	Gr. 7
<i>C. elegance</i>	-	-	Unc61	Unc59
<i>D. melanogaster</i>	Sep1 Sep4	-	Sep2 Sep5	Pnut
<i>Danio Rerio</i>	Sept2 Sept4 Sept5	Sept3 Sept9	Sept6 Sept8 Sept10	Sept7
<i>Homo sapiens</i>	Sept1 Sept2 Sept4 Sept5	Sept3 Sept9 Sept12	Sept6 Sept8 Sept10 Sept11 Sept14	Sept7

1.3.3 Biologische Funktion der Septine

Funktion in Hefe

Die detailliertesten Untersuchungen zur Funktion der Septine wurden in der Hefe *S. cerevisiae* gemacht. Wie bereits erwähnt wurde, sind die Septine am Zellzyklus beteiligt. Dabei dienen die Septin-Strukturen am Knospenansatz als Gerüst für die Rekrutierung vieler verschiedener Proteine, welche sowohl in die Synthese von Chitin und Septum, als auch in den Aufbau des kontraktilen Rings involviert sind (Gladfelder *et al.*, 2001). Der richtige Zusammenbau und die Aufrechterhaltung der Septin-Strukturen wird dabei über einen Komplex kontrolliert, bei dem die Septin-assoziierte Gin4-Kinase eine zentrale Stellung einnimmt (Mortensen *et al.*, 2002). Eine weitere Septin-assoziierte Kinase in dem Hsl1/Hsl7-Komplex stellt dabei die Verbindung zu den Regulationsmechanismen des Zellzyklus (Shulewitz *et al.*, 1999). Die Assoziation mit den Septinfilamenten führt zur Aktivierung der Hsl1-Kinase und somit zur Phosphorylierung und Inaktivierung der Swe1-Tyrosinkinase, die den Übergang von der G2-Phase zur Mitose blockiert.

Außerdem stellen die Septinstrukturen eine physikalische Barriere zwischen der Mutterzelle und der Knospe dar. Sie verhindern die laterale Diffusion der Membranproteine, welche an die innere Plasmamembran assoziiert sind, und sorgen somit für die asymmetrische Verteilung des Materials zwischen den beiden Zellen. Dies verhindert unter Anderem die Weitergabe von defekten Komponenten, die während des Alterungsprozesses der Mutterzelle angesammelt werden, an die Nachkommengeneration (Dobbelaere und Barral, 2004).

Funktion in Tieren

Auch in mehrzelligen Organismen sind die Septine in der Cytokinese involviert. Sowohl bei *C. elegans*, bei *Drosophila*, als auch bei humanen Zellen wird die Lokalisierung der Septine zur Teilungsfurche hin beobachtet (Nquyen *et al.*, 2000; Fares *et al.*, 1995; Schmidt und Nichols, 2004). Die Unterdrückung der Expression von Sept2, Sept7 und Sept11 mittels RNAi in Hela-Zellen führt zu einer ungenauen bzw. unvollständigen Kontraktion der Teilungsfurche und gleichzeitig zur Instabilität des kontraktilen Rings, was wiederum eine erhöhte Zahl von binuklearen Zellen zur Folge hat. Die Unterdrückung der Expression von Sept9 führt hingegen zu Störungen in der späten Telophase während des Abschnürungsprozesses. Dabei wird der Mittelkörper (engl. *midbody*) aus den polaren Mikrotubuli nicht vollständig abgebaut,

was eine dauerhafte Verbindung zwischen den Zellen zur Folge hat (Kim *et al.*, 2011). Genau wie bei *S. cerevisiae* wurde eine Diffusionsbarriere in der Plasmamembran zwischen den Säugertierzellen während der Zellteilung nachgewiesen (Schmidt und Nichols, 2004).

In der Interphase sind die meisten Septine in den Filamenten entlang der Fibrillenbündeln aus Aktin (engl. *stress fibers*) lokalisiert, wobei die Wechselwirkungen nicht direkt sind, sondern über Myosin II vermittelt werden (Joo *et al.*, 2007).

Auch in ausdifferenzierten eukaryotischen Zellen wurden viele Prozesse beschrieben, bei denen Septine eine Rolle spielen. Die Septine bilden z.B. die Abgrenzung zwischen dem Mittelstück und dem beweglichen Schwanzteil der Spermien (Ihara *et al.*, 2005). Zudem sind sie an den Ansätzen der Spines von Neuronen (Xie *et al.*, 2007, Tada *et al.*, 2007) und des primären Ciliums (Hu *et al.*, 2010) lokalisiert (Abb. 1.6). In all diesen Fällen dienen Septine zum Aufbau lateraler Diffusionsbarrieren auf der Innenseite der Plasmamembran ähnlich wie während der Zellteilung (Caudron und Barral, 2009). Diese Funktion der Septine scheint somit für alle Organismen konserviert zu sein.

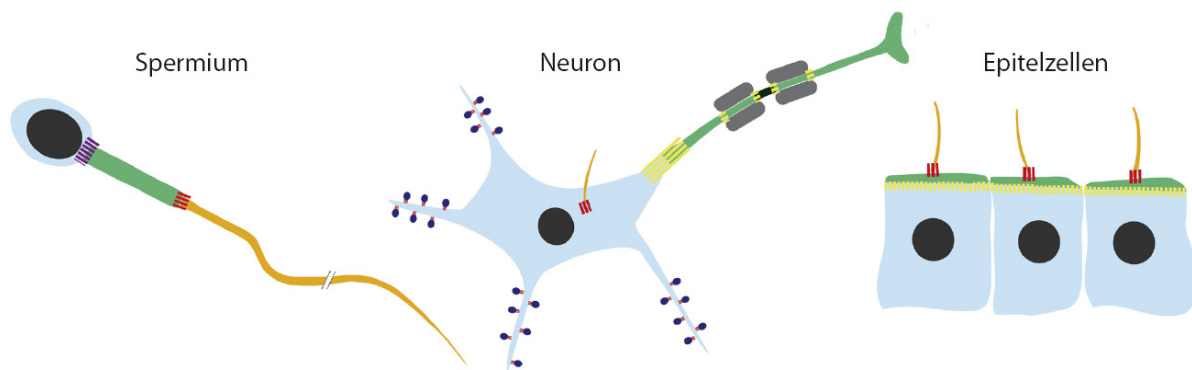


Abb. 1.6 Funktion der Septine in ausdifferenzierten humanen Zellen. Schematische Darstellung der Septinlokalisierung in ausdifferenzierten eukaryotischen Zellen, wo die Septine als Diffusionsbarriere dienen, dargestellt in rot. Modifiziert nach Caudron und Barral, 2009.

Neben den oben beschriebenen Septin-Funktionen wurden auch ein paar Prozesse beschrieben, an denen unerwarteterweise die Septine eine entscheidende Rolle spielen. Tooley *et al.*, 2009 haben z.B. eine überraschende Rolle der Septine bei der Regulation der Zellform, der Mobilität und der Migration von T-Zellen entdeckt. In den amöboiden beweglichen T-Zellen konzentrieren sich die Septine nahe dem Zellkortex. Dabei assemblieren sie zu langen Filamenten senkrecht zur Migrationsachse und bilden somit eine Korsett-ähnliche Struktur um die Zelle. Die Unterdrückung der

Sept7-Expression mittels shRNA resultiert in einer geringeren Geschwindigkeit der Zellmigration. Andererseits wird aber gleichzeitig die Migration der Zellen durch einen Filter mit sehr kleinen Poren verbessert.

1.3.4 Die strukturellen Ebenen der Septin-Organisation

Im Vergleich zu den monomeren Guaninnukelotid-bindenden Proteinen der Ras-Superfamilie binden die Septine aneinander und bilden dadurch lange Filamente. Die Grundeinheit der Septinfilamente sind in allen Organismen die oligomeren Komplexe. Die Anzahl der Septin-Untereinheiten, die für die Bildung eines solchen Komplexes notwendig sind, ist von Organismus zu Organismus verschieden. Der Septinkomplex in *S. cerevisiae* besteht meist aus Cdc3, Cdc10, Cdc11 und Cdc12, der Komplex von *Drosophila* hingegen aus Sep1, Sep2 und Pnut und der Komplex von *C. elegans* nur aus Unc59 und Unc61. Im Vergleich dazu liefert die Isolierung der nativen Septinkomplexe aus den Lysaten von Säugetierzellen mehrere Proteine. Diese weisen aber keine eindeutige Stöchiometrie auf (Kinoshita *et al.*, 2002), was auf eine Mischung aus mehreren Septinkomplexen mit unterschiedlichen Zusammensetzungen hindeutet. Auf der Basis verschiedener Untersuchungen wurde ein Komplex aus Sept2, Sept6 und Sept7 als Modell für einen Septinkomplex der Säugetierzellen etabliert (Joberty *et al.*, 2001; Kinoshita *et al.*, 2002) und für weitere biochemische und strukturelle Untersuchungen verwendet (Sirajuddin *et al.*, 2007).

Mit Hilfe der Elektronenmikroskopie wurden die Septinkomplexe aus *S. cerevisiae* (Bertin *et al.*, 2008), *C. elegans* (John *et al.*, 2007) und aus humanen Zellen untersucht (Sirajuddin *et al.*, 2007). Dabei wurde festgestellt, dass alle untersuchten Septinkomplexe eine gestreckte, lineare Struktur aufweisen. Die Reihenfolge der Untereinheiten im oligomeren Komplex wurde durch Klonieren von Fusionsproteinen wie GFP oder MBP an die unterschiedlichen Untereinheiten aufgeklärt. Der Komplex aus *C. elegans* ist ein Tetramer mit der Reihenfolge Unc59-Unc61-Unc61-Unc59; der Komplex aus *S. cerevisiae* dagegen ein Octamer Cdc11-Cdc12-Cdc3-Cdc10-Cdc10-Cdc3-Cdc12-Cdc11 und der klassische humane Komplex hat die Reihenfolge Sept7-Sept6-Sept2-Sept2-Sept6-Sept7 (Abb. 1.7). Alle Komplexe beinhalten somit immer jeweils zwei Moleküle von allen Untereinheiten.

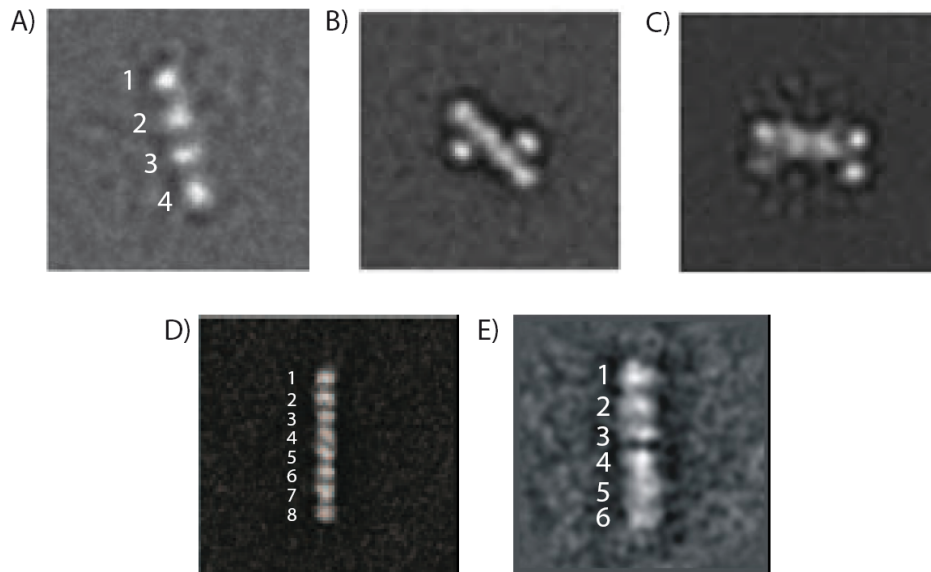


Abb. 1.7 Elektronenmikroskopische Einzelpartikelanalyse der Septinkomplexe. A) Nativer Komplex aus *C. elegans* B) mit Fusionsprotein GFP-Unc61 und C) mit Fusionsprotein GFP-Unc59 John *et al.*, 2007 D) Komplex aus *S. cerevisiae*, Bertin *et al.*, 2008 E) Humaner Komplex, Sirajuddin *et al.*, 2007.

1.3.4.1 Struktur der G-Domäne von Septin

In der Arbeit von Sirajuddin *et al.*, 2007 wurde die Kristallstruktur der G-Domäne des humanen Sept2 aufgeklärt. Ähnlich der Struktur eines Guaninukleotid-bindenden Proteins der Ras-Superfamilie haben die Septine eine kanonische G-Protein-Faltung bestehend aus fünf α -Helices und sechs β -Strängen. Im Vergleich zu Ras besitzen die Septine allerdings vier zusätzliche spezifische topologische Elemente: eine N-terminale α_0 -Helix, eine α_5' -Helix, die zwischen der α_4 -Helix und dem β_6 -Strang integriert ist, ein zweisträngiges, antiparalleles β -Faltblatt (β_7 , β_8), das nach dem β_6 -Strang lokalisiert ist, und eine C-terminale α_6 -Helix (Abb. 1.8).

Die Nukleotidbindung wird ähnlich wie bei den anderen GNBPs über den P-loop, über die Seitenkette des Aspartats im G4-Motiv und über die Hauptkette im G5-Motiv vermittelt. Außerdem zeigt die Struktur von Sept2 eine zusätzliche Bindung zwischen der Hydroxygruppe von Tyr-258 und der N2-Aminogruppe der Guaninbase, sowie Stapel-Wechselwirkungen (engl. *stacking interactions*) zwischen dem Arg-256 und dem π -System der Guaninbase. Diese Reste sind in den meisten Septinen konserviert. Ausnahmen sind die Vertreter der Gruppe 3 und Cdc10 in *S. cerevisiae*, bei denen das Tyrosin in der entsprechenden Position durch ein Threonin substituiert ist.

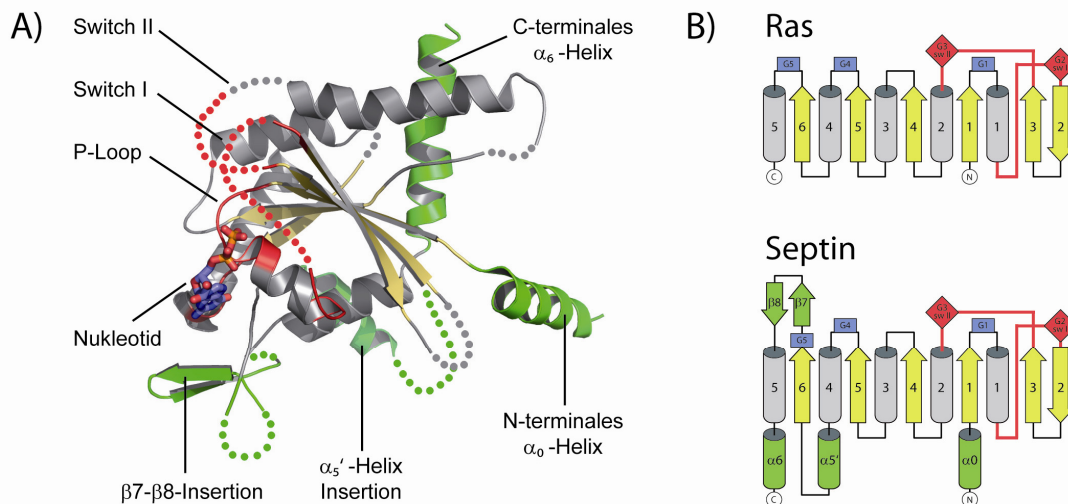


Abb. 1.8 Struktur der G-Domäne der Septine. A) Die Ribbon-Darstellung der G-Domäne von Sept2. Die in der Kristallstruktur nicht aufgelösten Schleifenbereiche wurden mit punktierten Linien vervollständigt. B) Schematische Darstellung der Topologie von Ras (oben) und Septinen (unten). In allen Abbildungen wurden *P-loop* und die *switch* Bereiche in roter Farbe, sowie die septin-spezifischen topologischen Elemente in grüner Farbe dargestellt. Modifiziert nach Sirajuddin *et al.*, 2007, PDB-ID: 2QA5.

1.3.4.2 G- und NC-Interface

Die einzelnen Septin2-Moleküle ordnen sich in der Kristallpackung zu linearen Filamenten an und liefern somit Informationen über die Mechanismen der Filamentbildung. Jede G-Domäne bindet dabei an zwei weitere G-Domänen und benutzt hierfür zwei gegenüberliegende Interaktionsoberflächen, die als G-Interface und NC-Interface bezeichnet werden (Abb. 1.9). Das G-Interface beinhaltet Guaninnukleotid-bindende Motive und septin-spezifische zweisträngige, antiparallele β -Faltblätter beider G-Domänen. Das gegenüberliegende NC-Interface setzt sich aus dem c-terminalen Ende der α_2 -Helix und den beiden N- und c-terminalen Helices (α_0 und α_6) zusammen. Die meisten Septine enthalten außerdem lange c-terminalen Bereiche, die in den bekannten Strukturen nicht aufgelöst sind. Auch ohne diese Bereiche sind die G-Domänen der Septine dazu in der Lage stabile Komplexe zu formen (Sirajuddin *et al.*, 2007). Die relative Anordnung der α_6 -Helices und die biochemischen Untersuchungen weisen allerdings darauf hin, dass diese zusätzlichen Bereiche eine parallele *coiled-coil* Struktur mit einer Bindungsaffinität im nanomolaren Bereich bilden und somit zur Stabilität von NC-Interface beitragen (Low *et al.*, 2006; Marques *et al.*, 2012).

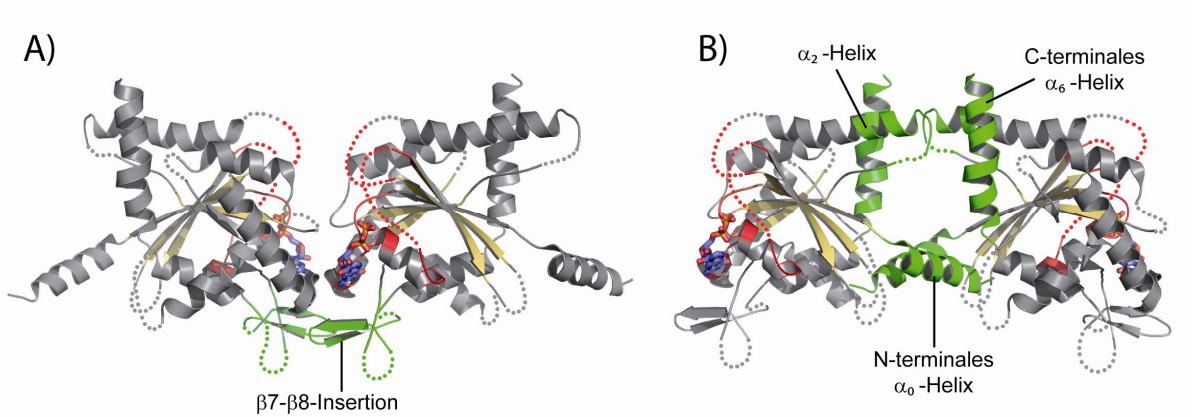


Abb. 1.9 Interaktionsoberflächen, zwischen den G-Domänen der Septine. A) G-Interface. B) NC-Interface. Die in der Struktur nicht aufgelösten Schleifen-Bereiche wurden durch die punktierten Linien vervollständigt. Modifiziert nach Sirajuddin *et al.*, 2007, PDB-ID: 2QA5.

1.3.4.3 Hexamer

Die Kristallstruktur des heterotrimeren Sept2-Sept6-Sept7-Komplexes zeigt einen linear angeordneten, hexameren Komplex mit der Abfolge Sept7-Sept6-Sept2-Sept2-Sept6-Sept7 (Abb.1.10). Die einzelnen Hexamere lagern sich in dem Kristall zu kontinuierlichen, linearen Filamenten zusammen (Sirajuddin *et al.*, 2007). Die Analyse der Elektronendichte weist darauf hin, dass Sept2 und Sept7 beide mit GDP beladen sind. Sept6 hingegen enthält als einzige Untereinheit das GTP. Innerhalb des hexameren Komplexes wird die NC-Dimerisierung zwischen zwei Sept2-Untereinheiten sowie zwischen einer Sept6- und einer Sept7-Untereinheit beobachtet. Die Dimerisierung über das G-Interface findet man hingegen zwischen zwei GDP-gebundenen Sept7-Untereinheiten sowie zwischen einer GTP-gebundenen Sept6- und einer GDP-gebundenen Sept2-Untereinheit (Sirajuddin *et al.*, 2007).

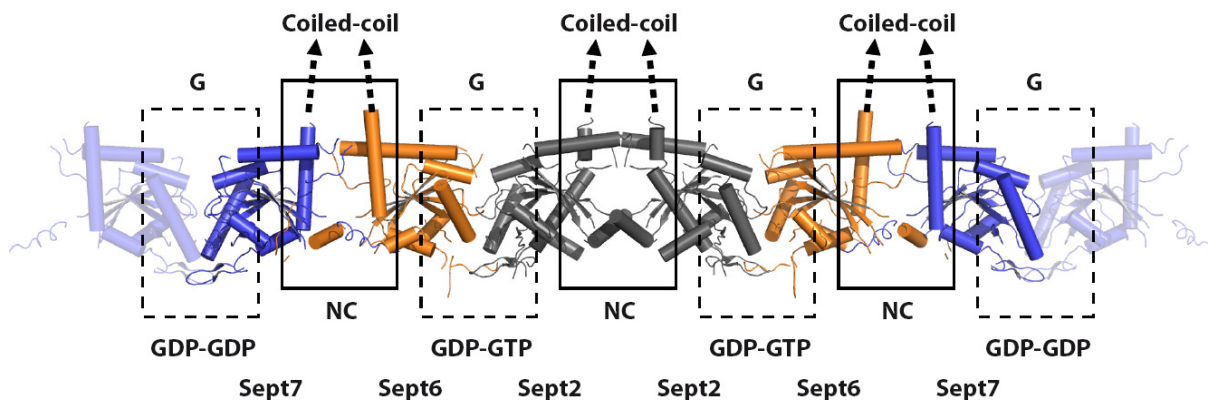


Abb. 1.10 Die Struktur des humanen hexameren Komplexes. Die einzelnen Untereinheiten sind in unterschiedlichen Farben dargestellt, Sept2 in grau, Sept6 in orange und Sept7 in blau. Deutlich erkennbar ist die alternierende Abfolge von G- und NC-Interfaces. Modifiziert nach Sirajuddin *et al.*, 2007, PDB-ID: 2QAG.

Auf Grund der starken Sequenzhomologie zwischen den Vertretern derselben Septingruppe wurde vermutet, dass die einzelnen Untereinheiten des hexameren Septinkomplexes der Säuger durch Vertreter derselben Septingruppe ersetzt werden können. Diese Vermutung wird durch aktuelle *Yeast-Two-Hybrid* und *Yeast-Three-Hybrid* Experimente unterstützt (Sandrock *et al.*, 2011, Nakahira *et al.*, 2011). Die Ergebnisse dieser Studien zeigen die gruppenspezifischen Bindungspräferenzen. Die Vertreter der Gruppe 2 binden demnach bevorzugt an Vertreter derselben Gruppe sowie an Vertreter der Gruppe 6. Bei den Mitgliedern der Gruppe 6 wurden Bindungen zu allen Septinen beobachtet außer zu Mitgliedern derselben Gruppe, wobei die Wechselwirkungen mit Gruppe 2 am stärksten waren. Sept7 zeigte Wechselwirkungen mit Gruppe 6 und Sept9. Diese Ergebnisse stimmen mit den Wechselwirkungen überein, die in der Kristallstruktur identifiziert wurden. Nur die homotypische Bindung zwischen zwei Sept7-Untereinheiten konnte in keinem Experiment beobachtet werden.

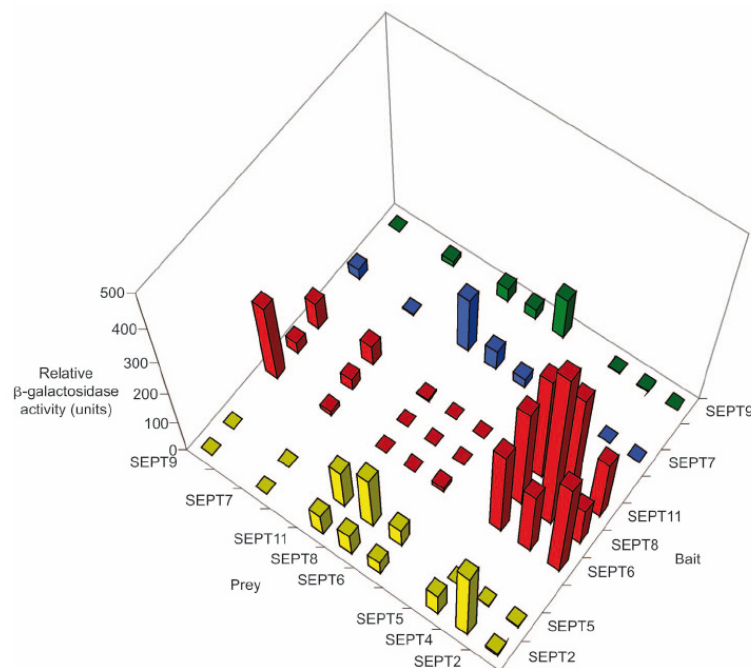


Abb. 1.11 Interaktionen zwischen humanen Septinen. Die Stärke der Wechselwirkungen zwischen einzelnen humanen Septinen im Yeast-Two-Hybrid. Sandrock *et al.*, 2011.

1.3.4.4 Die Rolle von Sept9 und anderen Vertretern der Gruppe 3

Im Vergleich zu den anderen Septinen schien die Rolle der Vertreter der Gruppe 3 lange Zeit nicht klar zu sein. Obwohl Sept9 in allen Säugertierzellen expremiert wird, sind die Wechselwirkungen zwischen Sept9 und den anderen Septinen vergleichs-

weise schwach. Die Isolierung der Septinkomplexe aus Säugertierzellen liefert nur die substöchiometrische Menge an Sept9. Zwei aktuelle Studien liefern nun detaillierte Informationen über die Rolle von Sept9 stellvertretend für die Gruppe 3 (Kim *et al.*, 2011; Sellin *et al.*, 2011).

Mikroskopische Untersuchungen in HeLa-Zellen zeigten, dass Sept9 zusammen mit den anderen Septinen in Filamenten entlang des F-Aktins oder in Abwesenheit der Aktinfilamente (nach dem Abbau durch Cytochalasin D oder Latrunculin B) in Septinringen lokalisiert sind. Der Abbau von Sept9 mittels shRNA hat keine Auswirkungen auf die Septinfilamente an sich, lediglich der Durchmesser der Ringe wird um ca. 25% von 0,45 μm auf 0,35 μm verringert. Die Überexpression und die anschließende Reinigung der verschiedenen Kombinationen von Septinkomplexen zeigte, dass Sept9 eine direkte Bindung zu Sept7, jedoch zu keinem anderen Septin auszubilden scheint. Dabei binden die beiden Proteine über das G-Interface aneinander. Interessanterweise führt die Überexpression des Sept9-Konstruktes ohne die α 0-Helix zu einer Störung der Bildung von Septinfilamenten in der Interphase und zu Defekten während der Cytokinese. Diese Beobachtung deutet also auf die entscheidende Rolle des NC-Interface von Sept9 für die Septinfilamente hin (Kim *et al.*, 2011).

In einer parallelen Studie wurden die Sedimentationskoeffizienten der aus den Säugertierzellen isolierten Septinkomplexe bestimmt. Diese hydrodynamischen Daten zeigten, dass die einzelnen Septine ausschließlich als Teil von stabilen hexameren oder oktameren Komplexen existieren. Auch die elektronenmikroskopische Analyse der Partikelgröße, bestätigte die Existenz von zwei Partikelpopulationen mit durchschnittlichen Längen von 26-28 nm und 34-35 nm (Abb. 1.12). Die hexameren Komplexe beinhalten dabei Sept7 und die Vertreter der Gruppe 2 und der Gruppe 6. Sept9 hingegen wurde nur in den oktameren Komplexen identifiziert. Wird die Expression von Sept9 unterdrückt, dann werden aus den Zellen überwiegend hexamere Komplexe isoliert. Die Autoren identifizierten ebenfalls Sept7 als direkten Interaktionspartner von Sept9 (Sellin *et al.*, 2011).

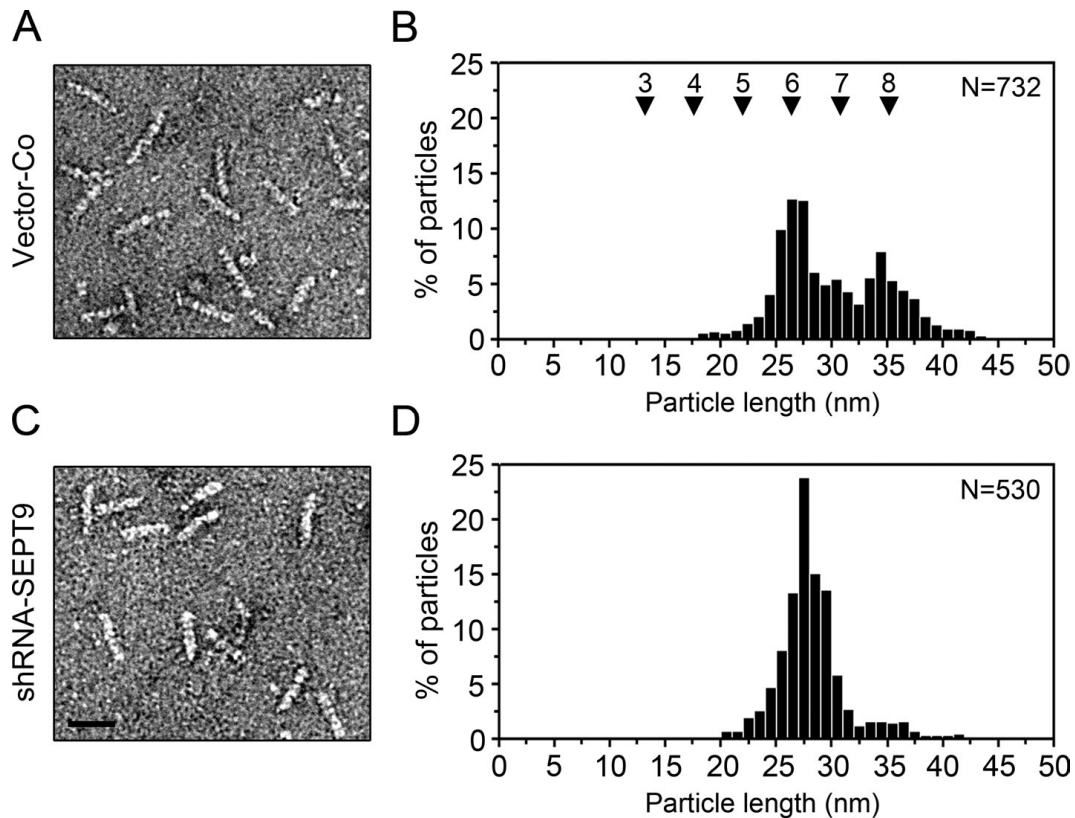


Abb. 1.12 Größenverteilung der aus den Säugertierzellen isolierten Septinkomplexe

A) Elektronenmikroskopische Aufnahme und B) Größenverteilung der Partikel aus den Kontrollzellen. C) Elektronmikroskopische Aufnahme und D) Größenverteilung der Partikel nach der Unterdrückung der Sept9-Expression. Die Anzahl der oktameren Komplexe ist stark verringert. Sellin *et al.*, 2011.

1.3.4.5 Übergeordnete Strukturen

Zahlreiche Untersuchungen weisen auf eine starke Affinität der Septine zu Phosphatidylinositolphosphaten mit starker Präferenz zu PI(4,5)P₂ hin. Experimente mit Lipidmonolayern (Bertin *et al.*, 2010) und Liposomen (Tanaka-Takiguchi *et al.*, 2009), die PI(4,5)P₂ beinhalten, zeigen eine starke Rekrutierung der Septine zur Lipidoberfläche und eine erhöhte Polymerisation von Septinkomplexen in den Filamenten. Auch *in vivo* werden die Septine durch PI(4,5)P₂ reguliert. Sowohl Septine als auch PI(4,5)P₂ sind am Knospenansatz der Hefe (Garrenton *et al.*, 2010) und in der Teilungsfurche von Säugertierzellen lokalisiert (Field *et al.*, 2005). Zudem führt die experimentelle Umwandlung von PI(4,5)P₂ in PI(3,4,5)P₃ durch die Überexpression von PI3K zur Auflösung der Septinringe am Knospenansatz und zur anschließenden Umverteilung der Septine über die ganze Plasmamembran der Hefe (Rodriguez-Escudero *et al.*, 2005). Alle diese Studien weisen auf die entscheidende Rolle von PI(4,5)P₂ für die Rekrutierung der Septine zur Plasmamembran und die Bildung der Septinfilamente hin.

Neben der Filamentbildung reguliert PI(4,5)P2 auch die relative Anordnung der Septinfilamente zueinander. In elektronenmikroskopischen Aufnahmen wird oft die Paarung parallel verlaufender Septinfilamente mit regelmäßigem Abstand zueinander beobachtet. Im Vergleich dazu zeigt Abb. 1.13, dass auf dem Lipidmonolayer, welches PI(4,5)P2 enthält, die parallelen Filamente dichter aneinander gereiht liegen und Schichten bilden. Für die dichte Anordnung der Filamente ist vor allem der c-terminale *coiled-coil* Bereich von Cdc11 verantwortlich (Tanaka-Takiguchi *et al.*, 2009; Bertin *et al.*, 2010).

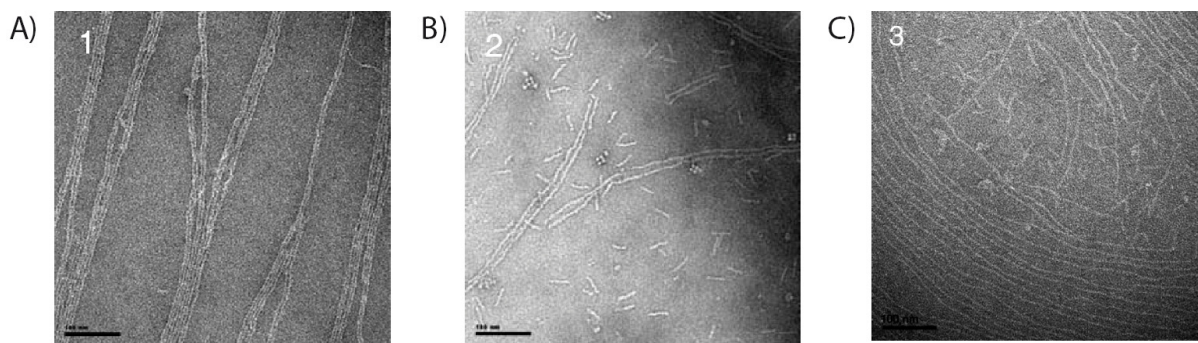


Abb. 1.13 Einfluss des Lipidmonolayer auf die Organisation der Septinfilamente. Elektronenmikroskopische Aufnahmen der Septinfilamente aus Hefe A) mit oder B) ohne das Lipidmonolayer bestehend aus PI(4,5)P2 und Phosphatidylcholin. C) Septinfilamente aus Hefe mit Cdc11 Δ acc auf dem Lipidmonolayer aus PI(4,5)P2 und Phosphatidylcholin. Bertin *et al.*, 2010.

1.3.5 Dynamik der Septine

Die meisten detaillierten Informationen über die Dynamik der Septine und deren Regulation wurden für *S. cerevisiae* zusammengetragen. Die Position und die supra-molekulare Architektur der aus Septinen aufgebauten Strukturen machen in der Hefe dynamische Änderungen durch. Diese Änderungen sind an Vorgänge gekoppelt, welche für den Ablauf des Zellteilungszykluses erforderlich sind. Die unterschiedlichen Septin-basierten Strukturen reflektieren dabei die stadien-spezifischen Funktionen, die diese Strukturen ausüben.

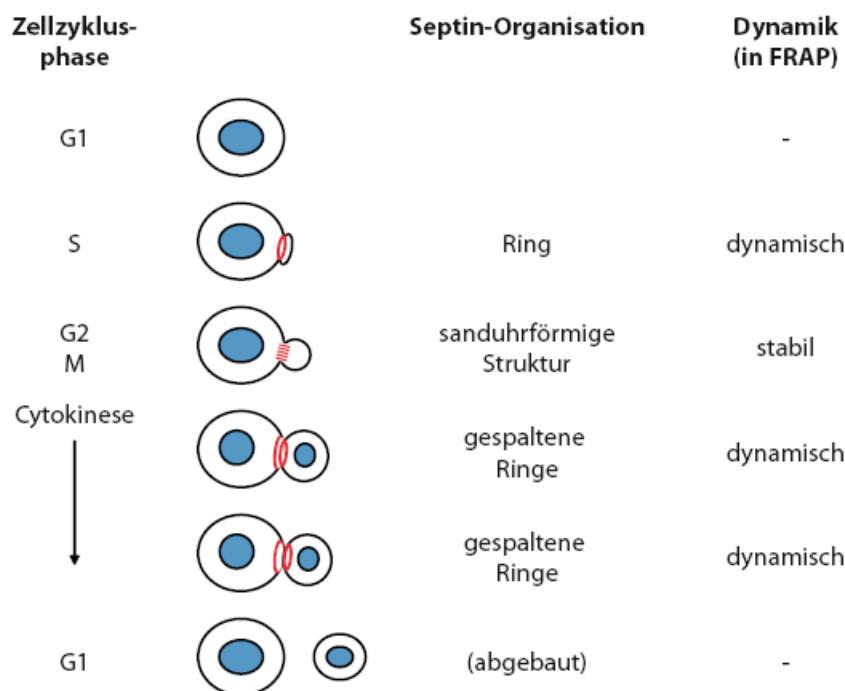


Abb. 1.14 Septinstrukturen in *S. cerevisiae* im Laufe der Zellteilung. Schematische Darstellung der Morphologie und Dynamik von Septinstrukturen in *S. cerevisiae* im Laufe der Zellteilung. Modifiziert nach Kinoshita 2006.

Die Beobachtung der Wiederherstellung der Fluoreszenz nach dem Photobleaching (engl. *fluorescence recovery after photobleaching*, FRAP) in Hefe-Zellen, die fluoreszenz-markierte Septine exprimieren, zeigten, dass die Septinringe zwischen zwei Phasen oszillieren (Abb. 1.14). Eine kurze dynamische „fluide“ Periode, charakterisiert durch einen schnellen Austausch an Untereinheiten, wechselt sich mit einer immobilen „eingefrorenen“ Phase ab, während der die Septine innerhalb des Ringes unbeweglich bleiben (Dobbelaere *et al.*, 2003). Während des frühen Stadiums der Assemblierung der sanduhrförmigen Struktur, die als *collar* bezeichnet wird, sind die Septine innerhalb des neu gebildeten Knospenansatzes sehr mobil. Wenn die Knospe erst einmal gebildet ist, werden die Septine am Knospenansatz „eingefroren“. Diese Fixierung erfolgt wahrscheinlich durch die Assemblierung der mobilen, hetero-oligomeren Baueinheiten in starre Filamente. Die eingefrorene Phase dominiert während des Knospenwachstums bis zum Ende der Telophase. Die Zellteilung endet mit der Cytokinese. Um Platz für den kontraktilen Ring zu schaffen, wird die *collar*-Struktur umgebaut. Dabei werden die Septine größtenteils wieder mobil. Die Septine in dem verbliebenen gespaltenen Ring bleiben jedoch bis zur Abschnürung der Tochterzelle weiterhin immobil.

Um genauere Einblicke in die Dynamik der Septinfilamente in den lebendigen Hefe-Zellen zu bekommen, wurde neben FRAP-Experimenten auch die Polarisations-

Fluoreszenz-Mikroskopie angewandt. Die dabei verwendeten GFP-markierten Septinkonstrukte zeigten eine stark polarisierte Fluoreszenz während der immobilen Phase, was mit dem statischen Verhalten in dem oben beschriebenen FRAP-Experiment übereinstimmt. Die Filamente sind hierbei entlang der Verbindungsachse zwischen Mutterzelle und Knospe orientiert. Am Anfang der Cytokinese machen die Septinfilamente eine Rotation um 90° durch und ordnen sich in zwei Ringen an, die sich parallel zur Furchungsebene und senkrecht zur Verbindungsachse zwischen Mutterzelle und Knospe orientieren (Vrabioiu und Mitchison, 2006). Der Mechanismus für diese bedeutende morphologische Veränderung ist allerdings noch nicht bekannt.

Neuere Untersuchungen, bei denen die Septine mit ^{15}N oder mittels SNAP-tagTM markiert wurden, zeigen, dass die einzelnen Septin-Untereinheiten eine lange Lebenszeit *in vivo* besitzen (Vrabioiu *et al.*, 2004; McMurray und Thorner, 2008). Sie bleiben über mehrere Zellgenerationen stabil und führen ihre normale Funktion aus, indem sie zusammen mit neu-synthetisierten Molekülen an der Knospenbildung beteiligt sind.

Nähere Untersuchungen der hetero-oligomeren Baueinheiten mittels SNAP-TagTM zeigten außerdem, dass die Zusammensetzung des Hetero-Oktamers Cdc11-Cdc12-Cdc3-Cdc10-Cdc10-Cdc3-Cdc12-Cdc11 sehr dynamisch ist. Die Komplexe, die hierbei isoliert wurden, bestanden aus einer Mischung von alten, mit Biotin markierten Untereinheiten sowie aus neu-synthetisierten Untereinheiten. Diese Beobachtung deutet darauf hin, dass die hetero-oligomeren Septinkomplexe im Gegensatz zu den Tubulin-Dimeren keine stabilen Baueinheiten für die Filamente darstellen. Sie können je nach Anforderung neu durchmischt werden.

Bei Stickstoffmangel und schlechtem Kohlenstoffangebot können diploide Hefe-Zellen sporulieren. Genau wie bei der Zellteilung sind die Septine auch an der Sporenbildung beteiligt. Das Cdc10 bleibt bei diesem Prozess stabil und wird bei der nächsten mitotischen Teilung wieder in die Septin-Strukturen am Knospenansatz integriert. Das Cdc12 wird dagegen aus den Septin-Strukturen ausgeschlossen und durch das Spr3-Protein ersetzt, das nur während der Sporulation expremiert wird (McMurray und Thorner, 2008). Dies ist ein weiterer Beweis für das dynamische Verhalten der Septinkomplexe.

Nur wenige Studien beschreiben die Dynamik der Septine in Säugertierzellen. In NIH3T3-Fibroblastzellen scheinen die Septine in der Interphase recht dynamisch zu

sein. Sie binden an Aktinfilamente, wobei die Wechselwirkungen nicht direkt sind, sondern über Myosin II vermittelt werden. Die Störung der Aktinorganisation mittels Cytochalasin D (Depolymerisation von Aktinfilamenten) führt zu einem Zusammenrollen der linearen Septin-Bündel zu uniformen Ringen mit einem Durchmesser von $0,66 \pm 0,08 \mu\text{m}$. Dieser Prozess ist reversibel, weil durch das Auswaschen von Cytochalasin D innerhalb kürzester Zeit die erneute Anlagerung der Septine an die Aktinbündel induziert wird (Kinoshita *et al.*, 2002).

Weitere Beweise für das dynamische Verhalten der Septine in humanen Zellen während der Interphase sind die Wechselwirkungen zwischen Aktinfilamenten und Septinen bei der Bildung des Septinkäfigs um pathogene Bakterien und bei der Bewegung von T-Zellen (Tooley *et al.*, 2009; Mostowy und Cossart, 2011).

Bei *Homo sapiens*, welcher 13 verschiedene Septingene und zahlreiche Splicing-Varianten besitzt, ist das Potenzial für die kombinatorische Diversität bezüglich der Septinkomplexe noch größer als bei der Hefe. Über die Dynamik der humanen Septinkomplexe ist allerdings noch nichts bekannt.

1.3.6 Regulation der Septin-Polymerisation

Phosphorylierung / Dephosphorylierung

Die Gin4-Kinase, die mit der AMPK-Kinasefamilie verwandt ist, assoziiert früh während der Assemblierung an die Septinstrukturen am Knospenansatz und dient als Gerüst für die Rekrutierung vieler weiterer Proteine. Nach dem korrekten Zusammenbau des *collar* wird die Gin4-Kinase hyperphosphoryliert. Infolge dessen phosphoryliert sie spezifisch das Septin Shs1 (Mortensen *et al.*, 2002). Dieser Prozess scheint entscheidend für die Überführung der Septine in die immobile, „eingefrorene“ Phase zu sein. Vor Beginn der Cytokinese wird die regulatorische Untereinheit Rts1 der Protein Phosphatase 2A an den Knospenansatz rekrutiert. Dies führt zur Dephosphorylierung von Shs1. Dieser Prozess ist essentiell für die erneute Mobilisierung der Septine und für die Spaltung von *collar* in zwei Ringe (Dobbelaere *et al.*, 2003).

Die Septine in *S. cerevisiae* werden außerdem durch die Kinasen Cla4 (verwandt mit der *p21-activated protein kinase* PAK1, Effektor von Cdc42) und Cdc28 (homolog zur Cdk1-kinase in Hefe) phosphoryliert. Diese Modifikationen haben ebenfalls Einfluss auf die Septin-Architektur (Versele und Thorner, 2004).

Es gibt auch zahlreiche Berichte über die Septin-Phosphorylierung in höheren Eukaryoten. Die meisten wurden aber in groß angelegten Proteomik-Studien entdeckt und sind nicht so genau untersucht wie die in *S. cerevisiae*. Erwähnenswert ist aber eine Studie von Yu *et al.*, 2009, welche über die Casein Kinase II abhängige Phosphorylierung des humanen Sept2 am Ser-218 berichtet. Die Position des Ser-218 scheint ein spezifisches Merkmal der Gruppe 2 zu sein. Sie liegt vor der $\alpha 5'$ -Helix und ist in allen Vertretern dieser Gruppe von *Drosophila* bis zum Menschen konserviert. Obwohl diese Position nahe am NC-Interface lokalisiert ist, wurde der Effekt dieser Phosphorylierung auf die Septin-Polymerisation bisher nicht untersucht.

SUMOylierung

Die Septine Cdc3, Cdc11 und Shs1 wurden als SUMO-substrate in *S.cerevisiae* identifiziert. Das SUMO ist zu 18% homolog mit dem Ubiquitin, weshalb der Name SUMO stellvertretend für *small Ubiquitin related modifier* steht. Analog zur Ubiquitinierung findet die Modifikation mit SUMO über eine Isopeptidbindung zwischen dem C-Terminus von SUMO und der ϵ -Aminogruppe eines Akzeptorlysins im Zielprotein statt. In *S. cerevisiae* ist die Sumoylierung von enormer Bedeutung. In Zellen mit Defekten bei der SUMO-Konjugation wird der Zellzyklus vor der Anaphase angehalten.

Die Sumoylierung von Septinen findet spezifisch während der Mitose kurz vor Beginn der Anaphase statt und wird in der Cytokinese abrupt wieder aufgelöst. Die Modifikationen finden bei Cdc3 an drei Positionen im N-terminalen Bereich vor der G-Domäne statt, bei Cdc11 an einer Position und bei Shs1 an zwei Positionen in den c-terminalen *coiled-coil* Bereichen. Mutationen der Sumoylierungsstellen führen zu Defekten beim Abbau der Septinringe am Ende der Zellteilung, so dass diese bei den nachfolgenden Teilungszyklen neben den neu gebildeten Strukturen stabil bestehen bleiben (Johnson und Blobel, 1999). Die SUMO-Konjugation scheint somit eine Rolle bei der Regulation der Dynamik von Septinringen während des Zellzykluses zu spielen.

Borgs bei Säugetieren

Die ersten identifizierten Proteine, welche in tierischen Zellen an die Septine binden und dadurch Auf- und Abbau der Filamente regulieren, waren Borg1 - Borg5 (*Binder of Rho GTPases*). Sie werden so bezeichnet, weil es sich um Effektorproteine der

RhoGTPase Cdc42 handelt (Joberty *et al.*, 1999; Joberty *et al.*, 2001). Die Domänenarchitektur der Borgs besteht aus einem CRIB-Motiv (Cdc42/Rac-interaction binding), prolin-reichen Bereichen und BD1 - BD3-Domänen (Borg homology domains). Dabei ist die BD3-Domäne für die Bindung an den humanen Septinkomplex aus Sept2, Sept6 und Sept7 verantwortlich. Auf Seite des Komplexes sind für die Bindung die c-terminalen *coiled-coil* Bereiche von Sept6 und Sept7 essentiell (Sheffield *et al.*, 2003) Die Wechselwirkungen zwischen Borgs und Septinen lassen sich durch die Bindung von Cdc42 im aktiven GTP-Zustand an das CRIB-Motiv der Borgs inhibieren.

In *S. cerevisiae* findet man Gic1 und Gic2, die zusammen mit Cdc42 in die Kontrolle der Zellpolarität und die Initiation der Knospenbildung involviert sind. Sie besitzen ebenfalls ein CRIB-Motiv, einen prolin-reichen Bereich und ein c-terminales Motiv, welches homolog zur BD3-Domäne ist. Aktuelle Untersuchungen der Gics *in vitro* weisen darauf hin, dass diese sich ähnlich wie die Borgs verhalten (Raunzer *et al.*, nicht veröffentlicht).

Orc6 in Drosophila

Neben Borg scheint auch Orc6 in der Regulation der Septine involviert. Orc6 ist die kleinste Untereinheit des ORC-Komplexes (oririgin replication complex), welcher für die Initiation der DNA-Replikation im Zellkern verantwortlich ist. Sowohl in *Drosophila* als auch in humanen Zellen ist Orc6 zudem in der Teilungsfurche lokalisiert, wo es für die fehlerfreie Cytokinese essentiell ist (Prasanth *et al.*, 2002). Orc6 besteht aus einer n-terminalen DNA-Bindungsdomäne, welche homolog zum Transkriptionsfaktor TFIIB ist, und einem c-terminalen 30-Aminosäure langen Bereich, welcher die Bindung an den c-terminalen *coiled-coil* Bereich des *Drosophila*-Septins Pnut vermittelt (Chesnokov *et al.*, 2003). Die Entfernung dieses Bereiches führt zu Defekten während der Cytokinese. *In vitro* ist Orc6 in der Lage die Filamentbildung der Septinkomplexe aus *Drosophila* zu induzieren. Wird anschließend GTP zugegeben führt dies aber interessanterweise zum Abbau der Filamente (Huijbregts *et al.*, 2009).

1.3.7 GTP-Hydrolyse

Die starke Konservierung der G-Domäne bei allen Septinen spricht für eine wichtige Rolle der Nukleotidbindung und Hydrolyse für die Funktion dieser Proteine. Die

Identifizierung des G-Interface als Nukleotid-abhängige Interaktionsoberfläche erklärte zumindest die Bedeutung der Nukleotidbindung für die Filamentbildung der Septine. Die genaue Rolle der GTP-Hydrolyse bleibt aber weiterhin ungeklärt.

Alle aus den Zellen isolierten Komplexe sind bevorzugt mit GDP beladen. Ein Septinkomplex aus *S. cerevisiae* bindet die Nukleotide sehr stark mit einer Polypeptid / Nukleotid-Stöchiometrie von 1:1. Die GTP-Hydrolyserate ist in einem *Multi-turnover*-Experiment mit $k_{\text{cat}} = 0,005 \text{ min}^{-1}$ sehr langsam. Ein dimerer Komplex aus Cdc3 und Cdc12 hat dagegen eine deutlich niedrigere Nukleotid-affinität mit $K_{\text{D}}(\text{GDP}) = 2,1 \text{ }\mu\text{M}$ und $K_{\text{D}}(\text{GTP}\gamma\text{S}) = 1,6 \text{ }\mu\text{M}$. Die GTP-Hydrolyserate von diesem Komplex ist mit $k_{\text{cat}} = 0,019 \text{ min}^{-1}$ schneller und somit vergleichbar mit $k_{\text{cat}} = 0,02 \text{ min}^{-1}$ beim Ras (Farkasovsky *et al.*, 2005, Neal *et al.*, 1988).

Die Analyse des humanen Sept2 weist ähnlich niedrige Nukleotidaffinitäten mit $K_{\text{D}}(\text{GDP}) = 1,75 \text{ }\mu\text{M}$ und $K_{\text{D}}(\text{GTP}\gamma\text{S}) = 0,26 \text{ }\mu\text{M}$ auf. Auch die gemessene Hydrolyserate mit $k_{\text{cat}} = 0,0162 \text{ min}^{-1}$ lag im gleichen Bereich wie bei dem dimeren Komplex aus Cdc3 und Cdc12. Unerwartet langsam für solch niedrige Affinitäten waren aber die Geschwindigkeitskonstanten beim Nukleotidaustausch mit $k(\text{GTP}\gamma\text{S}) = 7 \cdot 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ und $k(\text{GDP}) = 5 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ (Huang *et al.*, 2006).

1.3.8 Die Struktur von Sept2 im GppNHp-Zustand

Für die Aufklärung der GTP-induzierten strukturellen Änderungen wurde die Struktur der G-Domäne des humanen Sept2 im Triphosphatzustand gelöst (Sirujuddin *et al.*, 2009). Auch im GppNHp-gebundenen Zustand findet man in der Kristallstruktur G-Dimere. Allerdings ist die Geometrie des G-Interface leicht verändert. Die Untereinheiten sind um die Dimerverbindungsachse gegeneinander verdreht, wobei die septin-spezifischen $\beta 7$ - und $\beta 8$ -Stränge in der gleichen Position bleiben, die $\alpha 2$ - und $\alpha 3$ -Helices hingegen um ca. 4,5 Å verschoben sind.

Im Vergleich zur Struktur des Sept2 im GDP-Zustand ist die Elektronendichte der *switch* Bereiche im GppNHp-gebundenen Zustand gut definiert (Abb. 1.15). Für die Konformation des *switch I* Bereiches ist das konservierte Threonin (Thr-78) verantwortlich. Während die Hydroxygruppe der Seitenkette dabei in die Koordinierung des Mg^{2+} -Ions involviert ist, bindet die Amidgruppe der Hauptkette direkt an die γ -Phosphatgruppe des Nukleotids. Außerdem enthält der *switch I* Bereich einen Argininrest (Arg-77), der in drei von vier G-Domänen der asymmetrischen Einheit die gleiche Position wie der Argininfinger in der

Ras-RasGAP-Struktur einnimmt. Er könnte die Neutralisation der negativen Ladung der Phosphatgruppen während der GTP-Hydrolyse übernehmen. Allerdings zeigte die Mutation dieses Restes zum Alanin nur eine geringe Auswirkung auf die Geschwindigkeit der Hydrolyse.

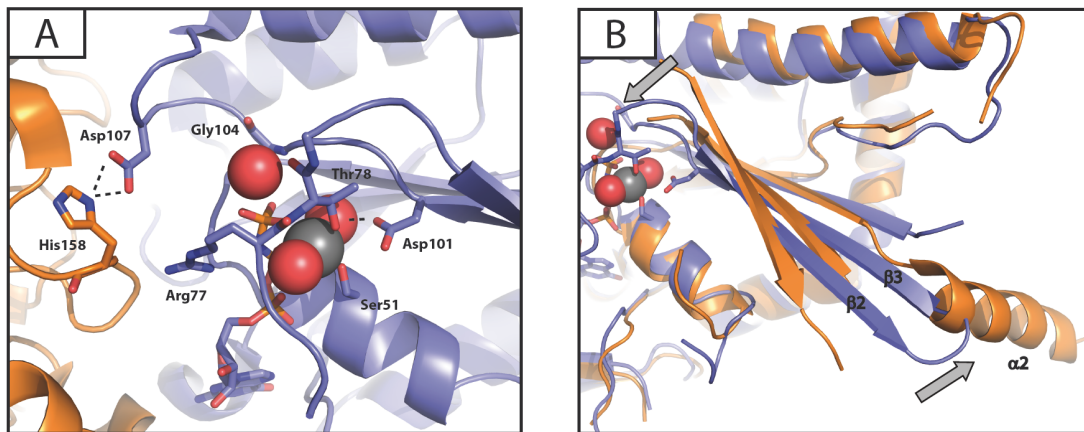


Abb. 1.15 Sept2 im GppNHp-Zustand. A) Konformationen der *switch* Bereiche in der Struktur von Sept2 im GppNHp-gebundenen Zustand. Die wichtigen Aminosäurereste sind im Stäbchen-Modell dargestellt. Die Seitenkette von Thr-78 aus dem *switch* I Bereich ist zusammen mit Ser-51 und Asp-100 aus dem G4-Motiv in die Koordination des Mg^{2+} -Ions involviert. Arg-77 dient als möglicher Arginin-Finger. Die Bindung zwischen Asp-107 aus dem *switch* II Bereich und His-158 ist Teil des G-Interface. Die unterschiedlichen G-Domänen sind mit gelb bzw. blau dargestellt. B) Bindung von Thr-78 an das γ -Phosphat induziert die Konformationsänderung der $\beta 2$ - und $\beta 3$ -Stränge im NC-Interface. Modifiziert nach Sirajuddin *et al.*, 2009, PDB-ID 3FTQ.

Auch die Wechselwirkungen des *switch* II Bereiches mit der γ -Phosphatgruppe des Nucleotids sind mit den Strukturen der anderen GNBPs vergleichbar. Während die Seitenkette des Aspartats (Asp-101) in die Koordinierung des Mg^{2+} -Ions involviert ist, bildet die Amidgruppe des Glycins (Gly-104) eine direkte Bindung zum γ -Phosphat aus. Außerdem bildet das stark konservierte Aspartat (Asp-107) des *switch* II Bereiches Wasserstoffbindungen zum konservierten Histidin (His-156) der anderen Untereinheit aus und trägt somit zur Stabilität des G-Interfaces bei.

In der Kristallstruktur des Sept2 im GppNHp-Zustand wurde eine weitere Konformationsänderung im Vergleich zum GDP-Zustand beobachtet (Abb. 1.15). Dabei nehmen die Bereiche der $\beta 2$ - und $\beta 3$ -Stränge, welche dem NC-Interface näher sind, die Position der $\alpha 0$ -Helix im GDP-Zustand an. Weil die G-Domäne in der Struktur immer noch ein G-Dimer ausbildet, wurde diese Konformationsänderung der $\beta 2$ - und $\beta 3$ -Stränge als GTP-induzierter Einfluss auf das NC-Interface diskutiert.

2. Zielsetzung

Die Aufklärung der Kristallstruktur des Septinkomplexes bestehend aus Sept2, Sept6 und Sept7 hat unser Verständnis über die mechanistische Funktionsweise der Septine entscheidend vorangebracht. Viele Aspekte blieben aber weiterhin ungeklärt, wie z.B. der Grund, warum in dem Komplex die Sept2- und Sept7-Untereinheiten im GDP-gebundenen Zustand vorliegen, während die Sept6-Untereinheit hingegen das GTP-Nukleotid enthält.

Die Charakterisierung der Septine wurde bisher besonders dadurch erschwert, dass die Reinigung der stabilen Septin-Monomere nur in Ausnahmefällen, wie z.B. beim humanen Sept2, erfolgreich war. Daher sollen zu Beginn dieser Arbeit neue stabile Konstrukte von humanen Septin-Monomeren, welche sich für die weiteren biochemischen und strukturellen Untersuchungen eignen, identifiziert und gereinigt werden.

Die biochemische Charakterisierung in Kombination mit verschiedenen strukturellen Untersuchungen soll anschließend helfen, die Gemeinsamkeiten und Unterschiede bei Vertretern der einzelnen Septin-Gruppen zu identifizieren. Dabei sollen besonders die Nukleotidbindung, die GTP-Hydrolyse und die Dimerisierung der Septine sowohl innerhalb derselben Gruppe als auch zwischen den Vertretern verschiedener Septin-Gruppen mechanistisch untersucht werden.

Die Identifizierung des G-Interface als nukleotid-abhängige Interaktionsoberfläche erklärt die Bedeutung der Nukleotidbindung für die Filamentbildung der Septine. So ist für die Dimerisierung der Sept2-Monomere über das G-Interface die Bindung eines Nukleotids an jede Untereinheit erforderlich. Die Art der Nukleotide scheint dabei keine Rolle zu spielen. Die Sept2-Untereinheiten dimerisieren sowohl im GDP- als auch im GppNHp-gebundenen Zustand. Die Beobachtungen, dass isolierte Septine überwiegend GDP-Nukleotid enthalten und dass bei den meisten Septinen eine funktionale intrinsische GTP-Hydrolyse gemessen werden kann, sprechen aber für eine wichtige Rolle der Hydrolyse für die Funktion der Septine.

In diesem Zusammenhang soll im Rahmen dieser Arbeit das besondere Augenmerk auf die Auswirkungen des Nukleotidzustandes auf die Eigenschaften der Septine gerichtet werden.

3. Materialien und Methoden

3.1 Materialien

3.1.1 Puffer und Lösungen

Acrylamid-Lösung	30% (w/v) Acrylamid 0,8% (w/v) Bisacrylamid
Blockierungslösung	BSA in PBS
6x DNA-Probenpuffer	10 mM Tris HCl 25 mM EDTA 30% (v/v) Glycerin 0,4% (w/v) Orange G
dNTP-Lösung	0,5 mM dATP 0,5 mM dCTP 0,5 mM dGTP 0,5 mM dTTP
Färbelösung für SDS-Gele	40% (v/v) Methanol 10% (v/v) Essigsäure 4 g/L Coomassie Brilliant Blue R250 4 g/L Coomassie Brilliant Blue RG250
Gelfiltrationspuffer	20 mM Tris HCl pH 7,8 100 mM bzw. 500 mM NaCl 5 mM MgCl ₂ 5 mM DTE
GSH-Puffer	20 mM Tris HCL pH 7,8 200 mM NaCl 5 mM MgCl ₂ 20 mM Glutathion
HPLC-Puffer	100 mM Kaliumphosphat pH 6,5 10 mM Tetrabutylammoniumbromid 7,5% (v/v) Acetonitril
IMAC-Puffer	20 mM Tris HCl pH 7,8 200 mM NaCl 5 mM MgCl ₂ 250 mM Imidazol
5x Laemmli Probenpuffer	50 mM Tris HCl 50% (v/v) Glycerin 500 mM DTT 10% (w/v) SDS 0,5% (w/v) Bromphenolblau
Lyse-Puffer	20 mM Tris HCl pH 7,8 200 mM NaCl 5 mM MgCl ₂
PBS-Puffer	8,0 g NaCl 0,2 g KCl 1,42 g Na ₂ HPO ₄ 0,27 g KH ₂ PO ₄

SDS-Laufpuffer	25 mM Tris 192 mM Glycin 2% (w/v) SDS
SDS-Samelgelpuffer	500 mM Tris H ₃ PO ₄ pH 6,8 4% (w/v) SDS
SDS-Trenngelpuffer	500 mM Tris H ₃ PO ₄ pH 8,8 4% (w/v) SDS
SPR-Laufpuffer	10 mM HEPES pH 7,4 150 mM NaCl 5 mM MgCl ₂ 0,2 mM GDP bzw. GppNHp

3.1.2 Geräte

Stopped-flow-Apparatur SX-18 MV	Applied Photophysics (UK)
Detektor MAR345 Image Plate System	X-Ray Research GmbH (Norderstedt)
DNA-Gelelektrophoresekammer	Werkstatt MPI Dortmund
FluoroMax 4-Spektrofluorimeter	HORIBA Jobin Yvon GmbH (Unterhaching)
FPLC (ÄTKA Prime)	Amersham Pharmacia (Freiburg)
HPLC (System Gold 166)	Beckman (München)
PCR Thermocycler T3000	Biometra (Goettingen)
Phönix-Robotor	Art Robbins Instruments (USA)
pH-Meter 766 Calimatic	Knick (Berlin)
Photometer BioPhotometer	Eppendorf (Hamburg)
Pipetten	Gibson (Langenfeld), Eppendorf (Hamburg)
Präzisions-Quarzküvetten	Hellma-Analytics (Müllheim)
Sonifier 450	G. Heinemann (Schwäbisch Gmünd)

Chromatographiesäulen

HiTrap Desalting	GE Healthcare
Superdex 75	GE Healthcare
Superdex 200	GE Healthcare

Verbrauchsmaterialien und Chemikalien

GDP	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
GTP	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
GppNHp	Jena Biosciences (Jena)
mGDP	Jena Biosciences (Jena)
mGTP	Jena Biosciences (Jena)
mGppNHp	Jena Biosciences (Jena)
Agarose	Invitrogen (Carlsbad, USA)
N-(5-Aminopentyl)biotinamid	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
DTE	Gerbu (Wieblingen)
L-Glutathion	Roth (Karlsruhe)
Imidazol	Merck (Darmstadt)
Isopropyl-D-thiogalactosid	AppliChem (Darmstadt)
SDS	Serva (Heidelberg)
Alkalische Phosphatase	Roche (Mannheim)
BSA	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
DNase	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Phusion-Polymerase	New England Biolab (Ipswich, USA)
Precission	MPI Dortmund
Restriktionsendonukleasen	New England Biolab (Ipswich, USA)
Taq-Polymerase	Qiagen (Hilden)
Transglutaminase from guinea pig liver	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)

Proteinstandard SDS7(Sigma) mit 66/45/36/29/24/20/14,2 kDa
 Nukleinstandard GeneRuler 1kb DNA Ladder (Fermentas) mit 250 - 10000 bp

Alle weiteren Chemikalien wurden von den Firmen Fluka, Merck, Roth, Serva, Sigma-Aldrich oder Riedel de Haen bezogen

Kits

QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen (Hilden)
QIAquick Gel-Extraktion Kit	Qiagen (Hilden)
Rapid DNA Ligation Kit	Roche (Mannheim)
BigDye Terminator Sequencing Kit	Applied Biosystems (Langen)
Biotin CAPture Kit	GE Healthcare (Uppsala, Schweden)

Kristallographie-Screens

JCSG Core Suite I	Qiagen (Hilden)
JCSG Core Suite II	Qiagen (Hilden)
JCSG Core Suite III	Qiagen (Hilden)
JCSG Core Suite IV	Qiagen (Hilden)
EasyXtal Protein Complex Suite	Qiagen (Hilden)
EasyXtal Protein Classics Suite	Qiagen (Hilden)
EasyXtal Protein Classics Suite II	Qiagen (Hilden)
Additive Screen	Hampton Research (Aliso Viejo, USA)

Medien und Antibiotika

Luria-Bertani (LB) (1L)	10 g Bacto-Tryptone, 10 g NaCl, 5 g Hefeextrakt
Terrific-Broth (TB) (1L)	2 g Bacto-Tryptone, 24 g Hefeextrakt, 0,4% (v/v) Glycerin, 2,31 g KH ₂ PO ₄ , 12,54 K ₂ HPO ₄
LB-Agarplatten (1L)	10 g Bacto-Tryptone, 10 g NaCl, 5 g Hefeextrakt, 16 g Bacto-Agar
Antibiotika-Zusätze	Ampicilin 100 mg/ml Chloramphenicol 25 mg/mL Kanamycin 25 mg/ml

Die verwendeten Medien wurden in der zentralen Einrichtung Biotechnologie des MPI für molekulare Physiologie vorbereitet und autoklaviert.

Plasmide

pET28a	Novagen	His6, T7, Kan ^r
pGEX4T1	Amersham	GST, tac, Amp ^r
pGEX6P1	Amersham	GST, tac, Amp ^r

Mikroorganismen

DH5 α	<i>F</i> ⁻ <i>deoR endA1 glnV gyrA96 nupG recA1 relA1 thi-1</i> Δ (<i>argF-lacZ</i>)U169 ϕ 80 Δ / <i>lacZ</i> Δ M15 <i>hsdR17</i> (<i>r</i> _K ⁻ <i>m</i> _K ⁺), λ ⁻
BL21(DE3)	<i>F dcm gal lon ompT hsdS</i> (<i>r</i> _B ⁻ <i>m</i> _B ⁻) λ (DE3)

Oligonukleotide

Die verwendeten Oligonukleotide wurden von den Firmen Sigma-Aldrich Biochemie GmbH (Hamburg) oder Eurofins MWG Operon (Ebersberg) synthetisiert.

Tab. 3.1 Verwendeten Oligonukleotide

Primername	Sequenz (5'-3')	Restriktions- enzym	Anwendung
EZ-09-028	ATATAT GGATCC GGTTTTGAATTCACGCTTATGG TAGTGGG	BamHI	FP-Sept7 ($\Delta\alpha 0$, Δcc)
EZ-09-029	ATATAT CTCGAG TCAAGCTGCAAGTTTTCTGCTT CTGTAGTTC	XhoI	RP-Sept7 ($\Delta\alpha 0$, Δcc)
EZ-09-032	ATAT CCATGG GCTTCTGCTTCAACATCCTGTGCG	NcoI	FP-Sept6 ($\Delta\alpha 0$, Δcc)
EZ-09-033	ATAT GCGGCCGC TCA ATGATGATGATGATGATG GGATCCACGCGGAACCAGCTCCTCCAGCTTACA GCGGCCGATA	NotI	RP-Sept6 ($\Delta\alpha 0$, Δcc)_Thmobi- site_ His6
EZ-09-034	ATAT CCATGG GTTTTGAATTCACGCTTATGGTAG TGGG	NcoI	FP-Sept7 ($\Delta\alpha 0$, Δcc)
EZ-09-035	ATAT GCGGCCGC TCA ATGATGATGATGATGATG GGATCCACGCGGAACCAGAGCTGCAAGTTTTCT GCTTCTGTAGTTCTCA	NotI	RP-Sept7 ($\Delta\alpha 0$, Δcc) _Thmobi- site_ His₆
EZ-09-040	GAT ACC CCA GGA TTT GGA GAT CAA GTG GAT AAT AGT AAT TGC TGG CAG	Mutagenese	FP Sept7_ A101Q
EZ-09-041	ACCCAGGATTTGGAGATGCAG GAC GATAATAGT AATTGCTGGCAGCCT	Mutagenese	FP Sept7_ V102D
EZ-09-042	TTTGGAGATGCAGTGGATAAT GATA AATTGCTGG CAGCCTGTTATCGACTAC	Mutagenese	FP Sept7_ S105D
EZ-09-049	TGTTTATACTTCATTGCTCCT TTT GGACATGGAC TTAAACCATTGGAT	Mutagenese	FP Sept7_ S149F
EZ-09-050	TGTTTATACTTCATTGCTCCT GAC GGACATGGAC TTAAACCATTGGAT	Mutagenese	FP Sept7_ S149D
EZ-09-052	AATGCAGAATCACGAGTGAAC GAC CGTCAGATG CCTGATAACAGG	Mutagenese	FP Sept7_ R131D
EZ-09-053	CCAGGATTTGGAGATGCAGTGG GCTA ATAGTAATT GCTGGCAGCCTGTT	Mutagenese	FP Sept7_ D103A
EZ-10-065	AAAGCAGACACACTCACACCAGAG GCA TGCCAACAGTTTAAAAAACAGATA	Mutagenese	FP Sept7_ E184A
EZ-10-068	GGTCCTTCTCATAGAATTA AAAA GGCT GTACAGG TGGAACAATCCAAAGTT	Mutagenese	FP Sept7_ T71A
EZ-10-077	ATATAT GAATTC GAGTTCAACATCATGGTGGTTCG GG	EcoRI	FP-Sept9 ($\Delta\alpha 0$, Δcc)
EZ-10-078	ATATAT CTCGAG GCGCTTCACACGGTACGCCTC	XhoI	RP-Sept9 ($\Delta\alpha 0$, Δcc)
EZ-11-135	ATAT CTCGAG TGAC CATGAATTGTTGTGGGTTTGG AGCTGCAAGTTTTCTGCTTCTGTAGTTC	XhoI	RP-Sept7($\Delta\alpha 0$, Δcc)- Q-tag

3.1.3 Konstrukte

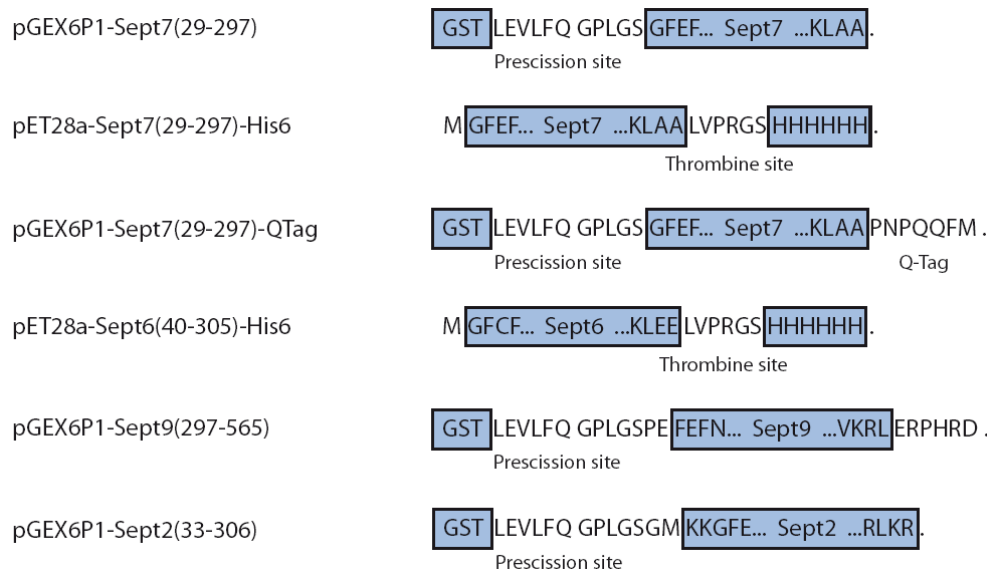


Abb. 3.1 Verwendete Konstrukte. Schematische Darstellung der verwendeten Konstrukten.

3.2 Methoden

3.2.1 Molekularbiologische Methoden

Für die Konstruktion der Expressionsplasmide wurden die entsprechenden Genfragmente durch Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) amplifiziert. Hierfür wurde die Phusion Polymerase (New England Biolabs) nach Angaben des Herstellers verwendet. 10 μ L des PCR-Produktes wurde für die Kontrolle mittels Agarosegelelektrophorese benutzt. Die restlichen 40 μ L wurden direkt mit Hilfe des QIAquick Gel Extraction Kits (Qiagen, Hilden) gereinigt. Für den Restriktionsverdau der gereinigten PCR-Produkte und der entsprechenden Expressionsvektoren (pET28a, Invitrogen bzw. pGEX4T1 oder pGEX6P1, GE Healthcare) wurden Restriktionsendonukleasen zusammen mit ihren mitgelieferten Puffern (New England Biolabs) verwendet. Nach der Reinigung der verdauten DNA-Fragmente mit Hilfe des QIAquick Gel Extraction Kits (Qiagen, Hilden) wurden sie mit einer T4 DNA Ligase aus dem Rapid DNA Ligation Kit (Roche) 10 min bei RT ligiert. Die Ligationsansätze wurden nach der Hitzeschock-Methode in chemisch kompetente *E. coli* DH5 α -Zellen transformiert und auf LB-Agarplatten mit einem entsprechendem Antibiotikum bei 37 °C über Nacht selektiert.

Standard-PCR-Ansatz		Standardansatz für Restriktionsverdau		Standard-Ligationsansatz	
2,5 µL	FP-Primer	40 µL	PCR-Produkt	14 µL	PCR-Produkt
2,5 µL	RP-Primer	5 µL	10xPuffer	2 µL	Expressionsvektor
5 µL	dNTPs	je 1 µL	Endonuklease	2 µL	10xLigationspuffer
1 µL	Templatt-DNA	1 µL	100xBSA	2 µL	T4-Ligase
3 µL	DMSO				
10 µL	HF-Puffer				
25 µL	H ₂ O				
0,5 µL	Phusion Polymerase				

Zur Kontrolle der positiven Ligation der PCR-Produkte in die Expressionsvektoren wurde zunächst eine Kolonie-PCR durchgeführt. Hierfür wurden einzelne Kolonien mit einer Pipettenspitze von der Kulturplatte gepickt und in einem PCR-Reaktionsgefäß abgestreift. Mit derselben Pipettenspitze wurde anschließend eine Minikultur mit 4 mL LB-Medium angeimpft. Die Kolonie im Reaktionsgefäß lieferte Templatt-DNA für einen 10 µL PCR-Ansatz. Hierbei wurde eine Taq-Polymerase gemäß Angaben des Herstellers und dieselben Primer wie bei der Amplifizierung der jeweiligen Genfragmente verwendet. Von den Kolonien, welche eine erfolgreiche Amplifikation aufwiesen, wurden die Minikulturen für die Plasmidpräparation verwendet. Diese erfolgte mittels QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Hilden).

Präparation chemisch kompetenter Zellen und Hitzeschock-Transformation

Für die Präparation chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen wurde 100 mL LB-Medium mit 1 mL einer Übernachtskultur des zu transformierenden Stammes inokuliert. Falls der Stamm bereits ein Plasmid enthielt, wurde noch ein entsprechendes Antibiotikum hinzugegeben. Die Kultur wurde bis zum Erreichen einer optischen Dichte (OD_{600}) von 0,6 bei 37 °C kultiviert. Anschließend wurde der Kolben weitere 10 min auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (4000 rpm, 10 min) bei 4 °C pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 30 mL TB-Puffer resuspendiert. Nach 10 min Inkubation auf Eis wurden die Zellen erneut durch Zentrifugation (4000 rpm, 10 min) bei 4 °C pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 5 mL TB-Puffer resuspendiert. Die Zellsuspension wurde mit Glycerol versetzt, aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Verwendung bei -80 °C gelagert.

Für die Transformation wurde 100 μL Zellsuspension mit 10 μL des Ligationsansatzes oder 5 μL der gereinigten Plasmid-DNA versetzt und 15 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde die Zellsuspension 2 min bei 42 °C inkubiert (Hitzeschock), mit 800 μL LB-Medium versetzt und zur Ausbildung der Antibiotikumresistenz 60 min bei 37 °C kultiviert. Die Zellen wurden mittels Zentrifugation (13000 rpm, 60 s) pelletiert und der Überstand bis auf 100 μL verworfen. Das Zellpellet wurde im Restvolumen resuspendiert und auf LB-Agarplatten mit einem entsprechenden Antibiotikum bei 37 °C über Nacht selektiert.

Quick-Change Mutagenese-PCR

Die Mutagenese einzelner Aminosäurepositionen erfolgte mit Hilfe der *Quick-Change* Mutagenese-PCR. Dabei werden die Plasmide mit dem zu mutierenden Fragment amplifiziert. Die Mutationen werden spezifisch durch die Verwendung von Mutagenese-Primern eingeführt, welche an der gewünschten Position eine veränderte Basenabfolge enthalten.

Nach der PCR erfolgte ein Restriktionsverdau der Vorlage-DNA durch das Restriktionsenzym *DpnI*. Das Enzym erkennt spezifisch die methylierte Plasmid-DNA, die aus *E. coli* isoliert wurde. Nach der Inkubation mit *DpnI* (1h, 37°C) wurden 5 - 10 μL des Ansatzes nach der Hitzeschock-Methode in die chemisch kompetenten *E. coli* DH5 α -Zellen transformiert.

Sequenzierung

Alle Konstrukte wurden durch eine DNA-Sequenzierung basierend auf der Didesoxymethode von Sanger (Sanger *et al.*, 1977) verifiziert. Ein Sequenzierungsansatz mit einem Volumen von 20 μL setzte sich aus 500 ng Plasmid-DNA mit 10 pmol Sequenzierungsprimer und 3 μL Terminator-Mix aus dem Big-Dye-Terminator Kit (Applied Biosystems) zusammen. Die Sequenzierungs-PCR und die DNA-Fällung wurden nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Sequenzierungsfragmente wurden anschließend in der zentralen Einrichtung der Biotechnologie des MPI für molekulare Physiologie mithilfe eines ABI PRISM 3700 DNA-Analysators (Applied Biosystems) analysiert.

Lagerung

Alle DNA-Lösungen wurden bei -20 °C gelagert. Die Bakterienkulturen wurden hingegen als *Glycerinstocks* bei -80 °C aufbewahrt, indem 500 µL der Kultur mit 500 µL Glycerin (50% v/v) versetzt wurden.

3.2.2 Proteinbiochemische Methoden

3.2.2.1 Überexpression

Für die Proteinexpression wurden die verifizierten Plasmide in die chemisch kompetenten *E. coli* BL21 (DE3)-Zellen transformiert. Um die Koexpression mehrerer Proteine von verschiedenen Plasmiden zu gewährleisten, wurden Zellen, welche bereits einen der Plasmide enthielten, erneut chemisch kompetent gemacht und danach ein zweites Plasmid in sie transformiert. Die Expressionen wurden durchgeführt, indem in zwei 5 L Kulturkolben jeweils 2,5 L TB Medium (50 µg/mL Kanamycin bei Konstrukten im pET28a-Vektor bzw. 100 µg/mL Ampicillin bei Konstrukten in pGEX-Vektoren) mit je 25 mL einer Übernachtskultur des Expressionsstammes inokuliert wurden. Die inokulierten Kulturkolben wurden bis zu einer optischen Dichte (OD_{600}) von 0,6 bei 37 °C und 400 rpm kultiviert. Anschließend wurde die Temperatur auf 20 °C reduziert und die Proteinexpression durch Zugabe von 0,1 mM IPTG induziert. Die induzierten Kulturen wurden ca. 18 h bei 20 °C und 400 rpm kultiviert und anschließend mittels Zentrifugation (4000 rpm, 15 min, 4 °C) pelletiert. Die vereinten Pellets wurden in einem Lysepuffer (20 mM Tris, 200 mM NaCl, 5 mM $MgCl_2$, pH 7,8) resuspendiert und entweder direkt weiterverarbeitet oder bei -20 °C gelagert.

3.2.2.2 Zellaufschluss

Der Aufschluss der Zellsuspensionen erfolgte durch Ultraschall mittels des Ultraschall-Desintegrators Sonifier W-450 (G. Heinemann, Schwäbisch Gmünd). Hierfür wurde die Zellsuspension erst mit einer DNase (50 µL mit 100 mg/mL) versetzt und dann dreimal je 60 sec mit Ultraschall behandelt. Unlösliche Bestandteile und Zelltrümmer wurden anschließend mittels Zentrifugation (25000 rpm, 30 min, 4 °C) abgetrennt und der Überstand weiter für die Proteinreinigung verwendet.

3.2.2.3 Proteinreinigung mittels Affinitätschromatographie

Als erster Schritt zur Reinigung der Proteine wurde eine Affinitätschromatographie unter Verwendung von FPLC (*fast protein liquid chromatographie*) eingesetzt. Für Proteine mit N-terminalen Glutathion-S-Transferase (GST)-Fusionsproteinen wurde Glutathion-Sepharose 4 FastFlow (GE Healthcare) als Affinitätsmatrix verwendet. Die Chromatographiesäule wurde mit einem Lysepuffer (20 mM Tris, 200 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, pH 7,8) äquilibriert. Anschließend wurde der Überstand des Zellaufschlusses mit einer Flussrate von 3 mL/min auf die Säule aufgetragen und mit dem Lysepuffer bis zum Erreichen der konstanten Basislinie für die UV-Absorption des Eluates bei 280 nm gewaschen. Zur Elution der an die Säule gebundenen GST-Fusionsproteine wurde GSH-Puffer verwendet. Das Eluat wurde dabei in Fraktionen von 10 mL aufgefangen und mittels SDS-PAGE analysiert. Die Fraktionen mit den GST-Fusionsproteinen wurden vereint und ankonzentriert. Für die Abspaltung des GST wurde die Proteinlösung mit einer Precision-Protease über Nacht bei 4°C inkubiert.

Für Proteine mit C-terminalen His-Tag wurde Ni-NTA-Agarose (Qiagen, Hilden) als Affinitätsmatrix verwendet. Nach dem Äquilibrieren der Chromatographiesäule mit einem Lysepuffer wurde der Überstand des Zellaufschlusses mit einer Flussrate von 3 mL/min auf die Säule aufgetragen. Die Säule wurde anschließend mit Lysepuffer bis zum Erreichen der konstanten Basislinie für die UV-Absorption des Eluates bei 280 nm gewaschen. Die an die Säule gebundenen Proteine wurden mit Hilfe eines Imidazol-Gradienten (Linearer Gradient des Lysepuffers zum IMAC-Puffer mit 250 mM Imidazol) eluiert und in Fraktionen von 10 mL aufgefangen. Anschließend wurden die Eluat-Fraktionen mittels SDS-PAGE analysiert. Die Fraktionen, welche das gewünschte Protein enthielten, wurden vereint und ankonzentriert.

3.2.2.4 Proteinreinigung mittels Größenausschlusschromatographie

Im Anschluss an die Affinitätschromatographie wurden die Proteine zusätzlich mittels Größenausschlusschromatographie (Gelfiltration) gereinigt. Dieser Schritt ist vor allem zur Abtrennung von falsch gefalteten Proteinen erforderlich, welche im Ausschlussvolumen von der Säule eluieren. Für die Proteinreinigung wurden die Säulen Superdex 75 und Superdex 200 (GE Healthcare) eingesetzt. Jede der Säulen wurde zuerst mit Gelfiltrationspuffer äquilibriert, welcher zuvor filtriert und entgast wurde. Die ankonzentrierte Proteinlösung aus der Affinitätschromatographie wurde

auf die Säule aufgetragen und mit einer Flussrate von 2 mL/min eluiert. Dabei wurden Eluat-Fraktionen von 5 mL aufgefangen und später mittels SDS-PAGE analysiert.

3.2.2.5 Konzentration der Proteine

Die Proteinlösung wurde mittels Zentrifugation in Ultrafiltrationseinheiten (Amicon Ultra, Millipore) bis zum gewünschten Volumen oder bis zur gewünschten Konzentration aufkonzentriert.

3.2.2.6 Nukleotidbefreiung und Nukleotidaustausch

Die Nukleotidbefreiung bzw. der Nukleotidaustausch erfolgte mit Hilfe einer alkalischen Phosphatase. Hierfür wurde die Proteinlösung mit 50 mM Ammoniumsulfat, 0,25 mM ZnCl₂ sowie einer alkalischen Phosphatase (1 U auf 1 mg Protein) versetzt. Für den Nukleotidaustausch wurde zudem noch 1 mM GppNHp hinzugefügt, welches einem nicht hydrolysierbaren Analogon von GTP entspricht. Nach einstündiger Inkubation auf Eis wurde die Reaktion mit Hilfe einer Größenausschlusschromatographie über Hi-TrapTM-Entsalzungssäulen (GE Healthcare) beendet. Dabei werden neben den Abbauprodukten des Nukleotids auch Zn²⁺-Ionen entfernt, welche für die enzymatische Aktivität der alkalischen Phosphatase erforderlich sind.

3.2.3 Biophysikalische Methoden

3.2.3.1 Analytische Gelfiltration

Bei der Gelfiltration werden Proteine nach ihrem hydrodynamischen Radius aufgetrennt, welcher in erster Linie mit ihrer Größe und Form korreliert. Die Größe des zu untersuchenden Proteins lässt sich durch den Vergleich des Elutionsvolumens mit Proteinen bekannter Größe bestimmen. Daher kann diese Methode zur Untersuchung der Protein-Protein-Interaktionen und der Proteinoligomerisierung angewandt werden. In dieser Arbeit wurden für die analytische Gelfiltration die Säulen Superdex 75 10/30 und Superdex 200 10/30 (GE Healthcare) eingesetzt. Für die Analyse wurde ca. 1mg Protein, gelöst in 200 µL Gelfiltrationspuffer, auf die Säule aufgetragen und mit einer Flussrate von 0,4 mL/min eluiert.

3.2.3.2 Nukleotidbestimmung mittels HPLC

Zur Auftrennung und Quantifizierung der Nukleotide wurde die Methode nach Tucker *et al.* 1986 verwendet. Hierbei werden die Nukleotide mittels Umkehrphasen-Hochdruck-Flüssigchromatographie (*high pressure liquid chromatography*, HPLC) unter isokratischer Verwendung eines Laufpuffers, zusammengesetzt aus 100 mM Kaliumphosphat (pH 6,5), 10 mM Tetrabutylammoniumbromid (TBAB) und 7,5% (v/v) Acetonitril, aufgetrennt und quantifiziert. Das im Laufpuffer vorhandene TBAB bindet dabei an die Phosphatgruppen der Nukleotide und steigert somit deren Hydrophobizität proportional zur Anzahl ihrer Phosphatgruppen. Dadurch können Guanosin, GMP, GDP und GTP aufgrund ihrer Wechselwirkungen mit der hydrophoben Säulenmatrix aufgetrennt und quantifiziert werden. Für die Messung wurden 30 µL Proteinlösung für 1 min bei 95 °C inkubiert. Das denaturierte Protein wurde mittels Zentrifugation (13000 rpm, 60 s) abgetrennt. 20 µL des Überstandes wurden mit Hilfe des HPLC-Systems Gold 166 (Beckman, Palo Alto, USA) mit einer Umkehrphasen-Säule Ultrasphere ODS (Hichrom, Theale, UK) analysiert.

3.2.3.3 Fluoreszenzmethoden

Bei den Fluoreszenzspektroskopischen Methoden wird der Reaktionsablauf mit Hilfe von verschiedenen Fluoreszenzeigenschaften eines Fluorophores verfolgt, welches an einen der Reaktionspartner gebunden ist. Als Messgröße können je nach Versuchsanordnung die Fluoreszenzintensität, die Fluoreszenzpolarisation oder die Fluoreszenzlebensdauer verwendet werden.

Für die Charakterisierung der GNBP's haben sich die mit mant-Fluorophor (2'(3')-O-(N-Methyl)anthraniloyl) markierten Nukleotid-Analoga wie z.B. mGDP, mGTP und mGppNHp, bewährt. Die mant-Gruppe zeigt eine Fluoreszenz mit einer maximalen Anregung bei ca. 360 nm und ein Emissionsmaximum bei ca. 450 nm. Ihre Fluoreszenzintensität hängt von der Polarität der Umgebung ab und steigt meist signifikant nach der Bindung an das Protein an. Außerdem ist die mant-Gruppe sehr klein, weshalb sie meistens die Funktion der Proteine nicht beeinflusst.

Fluoreszenztitration

Die Fluoreszenztitration sowie die kinetischen Messungen langsamer Dissoziationen wurden an dem Spektrofluorometer Fluomax IV (HORIBA Jobin Yvon GmbH, Deutschland) durchgeführt.

Die Bestimmung der Dissoziationsgleichgewichtskonstante erfolgte durch die Anpassung einer quadratischen Bindungsfunktion (Gleichung 1) an die Messdaten (Ahmadian *et al.*, 2002). Hierfür wurde das Programm Graphit 5.0 (Erithacus Software Ltd., Horley, UK) verwendet.

$$F = F_0 + \Delta F_{\max} \cdot \frac{c(A) + c(B) + K_D - \sqrt{(c(A) + c(B) + K_D)^2 - 4 \cdot c(A) \cdot c(B)}}{2 \cdot c(A)} \quad \text{Gleichung 1}$$

mit	F	Fluoreszenz
	F_0	Anfangsfluoreszenz
	ΔF_{\max}	maximale Fluoreszenzänderung
	$c(A)$	Gesamtkonzentration des vorgelegten Reaktionspartners A
	$c(B)$	Gesamtkonzentration des hinzugefügten Reaktionspartners B
	K_D	Dissoziationsgleichgewichtskonstante

Stopped-Flow Messungen

Für die Messung der Fluoreszenzänderung schneller Reaktionen wurde die *Stopped-Flow*-Apparatur SX18MV (Applied Photophysics, United Kingdom) verwendet. Hierbei werden die beiden zu untersuchenden Reaktionspartner aus zwei Kolben in eine Mischkammer injiziert. Der Reaktionsverlauf wurde über die Messung der Fluoreszenzintensität verfolgt. Die Anregung erfolgte durch monochromatisches Licht mit einer Wellenlänge von 366 nm. Für die Fluoreszenzdetektion wurde ein Kantenfilter mit einem Absorptionsbereich unterhalb von 408 nm verwendet.

Für die Messung der Assoziation zwischen mGppNHp und Sept7-Konstrukten wurden 0,2 μM Nukleotidlösung und verschiedene Konzentrationen der nukleotidfreien Proteinlösung in zwei separate Kolben der *Stopped-Flow*-Apparatur gefüllt, wobei immer ein großer Überschuss an Protein verwendet wurde. Die Versuchsanordnung erfüllt die Bedingungen für eine reversible Reaktion pseudo-erster Ordnung. Die Auswertung erfolgte demnach durch die Anpassung einer einfach-exponentiellen Funktion. Aufgrund der Messung der Geschwindigkeitskonstanten (k_{obs}) bei verschiedenen Proteinkonzentrationen ($c(\text{Protein})$) lassen sich Assoziationsrate (k_{ass}) und Dissoziationsrate (k_{diss}) mit Hilfe der Gleichung 2 ermitteln.

$$k_{\text{obs}} = k_{\text{ass}} \cdot c(\text{protein}) + k_{\text{diss}} \quad \text{Gleichung 2}$$

3.2.3.4 Oberflächenplasmonresonanz

Die Oberflächenplasmonresonanz (*surface plasmon resonance*, SPR) ist eine weitere Methode für die quantitative Analyse von Proteininteraktionen. Sie beruht auf

der Detektion sehr kleiner Änderungen des Brechungsindex in der Nähe einer Metalloberfläche. Während der Messung wird das polarisierte Licht mittels eines Prismas auf die Metalloberfläche des Sensor-Chips fokussiert. Das reflektierte Licht wird mit Hilfe einer Diodenarray gemessen. Ein Teil des Lichtes dringt in die Metallschicht ein, was zur Anregung der Leitungselektronen auf der Metalloberfläche führt. Die Resonanzbedingungen sind allerdings nur unter bestimmten Einfallswinkeln möglich. Dabei weist das reflektierte Licht unter einem entsprechenden Reflektionswinkel (Ausfallswinkel) ein Intensitätsminimum auf. Der Resonanzwinkel hängt dabei unter anderem vom Brechungsindex des Mediums in unmittelbarer Nähe der Metalloberfläche ab.

Die Metalloberfläche entspricht dabei einer Wand der Messzelle. Für die Messung wird einer der beiden Interaktionspartner auf der Oberfläche des Sensor-Chips immobilisiert. Die Bindung des anderen Interaktionspartners resultiert in einer Massenzunahme und einer Änderung des Brechungsindex. Dies führt wiederum zur Änderung des Resonanzwinkels, bei dem die minimale Intensität des reflektierten Lichtes gemessen wird. Die Winkeländerung ist hierbei proportional zur molaren Masse des Interaktionspartners und wird in RU-Einheiten angegeben (*responce unit*, 10000 RU entsprechen dabei einem Winkelgrad)

Biotin CAPture Kit der Firma GE-Healthcare

Für die Immobilisierung der Septine auf der Oberfläche des Sensor-Chips wurde der Biotin CAPture Kit der Firma GE-Healthcare ausgewählt. Im Vergleich zu anderen Methoden kombiniert der Biotin CAPture Kit eine schnelle und einfache Immobilisierung eines mit Biotin markierten Moleküls mit der Möglichkeit einer schnellen Regeneration der Oberfläche des Sensor-Chips.

Die Oberfläche des Sensor-Chips trägt kovalent gebundene einzelsträngige DNA-Moleküle. Das im Kit mitgelieferte Streptavidin ist ebenfalls mit einem einzelsträngigen DNA-Molekül markiert, welches komplementär zum DNA-Strang auf der Oberfläche des Sensor-Chips ist. Die DNA-Paarung ermöglicht eine schnelle Immobilisierung des Streptavidins mit sehr hoher Affinität. Da die Bindungen zwischen den DNA-Strängen jedoch nicht kovalent sind, lassen sie sich mit Hilfe eines basischen Puffers leicht wieder lösen, was eine schnelle Regeneration der Chip-Oberfläche erlaubt.

Biotinmarkierung mittels Transglutaminase

Der Einsatz des Biotin CAPture Kits erfordert einen mit Biotin markierten Interaktionspartner. Die Markierung der Septine mit Biotin erfolgte mittels einer durch Transglutaminase katalysierten Reaktion (Lin *et al.*, 2006). Die Transglutaminase katalysiert dabei eine Transferreaktion, bei der eine Acyl-Gruppe der Glutaminseitenkette auf primäre Amine übertragen wird. Die eingesetzte Transglutaminase (gpTGase aus dem Meerschweinchen, Sigmaaldrich) besitzt eine hohe Substratspezifität zum Heptapeptid mit der Sequenz PNPQQFM, welches als Q-Tag bezeichnet wird. Gleichzeitig weist sie aber auch eine breite Toleranz für die Struktur des primären Amins auf. Der Einsatz eines Überschusses an N-(5-Aminopentyl)-Biotinamid führte zur selektiven Markierung eines Proteins mit einem Biotinmolekül und sollte gleichzeitig die Nebenreaktionen mit anderen Aminen unterdrücken. Vor allem eine Reaktion mit ϵ -Aminogruppen der Lysinreste kann zu unerwünschten intra- oder intermolekularen Querverbindungen führen.

Für die Markierung mittels gpTGase wurde die Sequenz des Q-Tag's an den c-Terminus der jeweiligen Septinkonstrukte kloniert. Der Q-Tag zeigte keinerlei Auswirkungen auf die Stabilität der Konstrukte, die Proteine konnten also analog zu Sept7 (29 - 297) mit ähnlich guten Ausbeuten rekombinant hergestellt und gereinigt werden.

Für die Biotinylierung wurde ein Reaktionsansatz aus 50 μ M Protein, 1 mM N-(5-Aminopentyl)-Biotinamid und 10 mM CaCl_2 in Gelfiltrationspuffer vorbereitet. Zuletzt wurde die gpTGase-Lösung im Verhältnis Septin : gpTGase von 70 : 1 zugegeben und bei 4 °C zwei Stunden lang inkubiert. Die Reaktion wurde mittels einer Größenausschlusschromatographie über Hi-TrapTM-Entsalzungssäulen beendet. Dabei wurde zum Einem das überschüssige, nicht-gebundene Biotin und zum Anderen Ca^{2+} -Ionen, welche für die Enzymaktivität der gpTGase essentiell sind, entfernt. Der Erfolg der Markierung wurde mit Hilfe eines Western Blots kontrolliert.

SPR-Messungen mit Septinen

Alle SPR-Messungen dieser Arbeit wurden am BIAcore 1000-Gerät (GE Healthcare, Uppsala, Schweden) in der Arbeitsgruppe von Prof. Winter an der TU-Dortmund durchgeführt. Jede SPR-Messung begann mit der Immobilisierung eines frischen Streptavidin durch Injektion von 10 μ L Biotin CAPture-Reagenz aus dem Kit. Anschließend wurde die Oberfläche mit SPR-Laufpuffer (10 mM HEPES pH 7,4,

150 mM NaCl, 5 mM MgCl₂ und 0,2 mM GDP bzw. 0,2 mM GppNHp) äquibriert. Für die Messung der Dissoziation bei Sept7-Dimeren wurde eine Mischung aus Sept7-Biotin und Sept7 ohne Markierung im Verhältnis 1:10 vorbereitet. Für die Messungen im GppNHp-Zustand wurde zusätzlich noch ein Nukleotidaustausch vorgenommen. 10 µL der vorbereiteten Mischung wurden mit einer Flussrate von 10 µL/min auf den Sensor-Chip injiziert. Die Messung der Dimerdissoziation erfolgte beim Spülen des Sensor-Chips mit dem Laufpuffer. Die Messdauer richtete sich nach den erwarteten Geschwindigkeitskonstanten und umfasste einen Zeitraum von 10 min bis zu 24 Stunden.

3.2.4 Röntgenkristallographische Methoden

3.2.4.1 Kristallisation

Die Röntgenstrukturanalyse ist die am häufigsten angewandte Methode zur Aufklärung von Proteinstrukturen. Hierfür sind allerdings Proteinkristalle erforderlich. Die Kristallbildung und das Kristallwachstum finden hierbei in einer übersättigten Lösung statt.

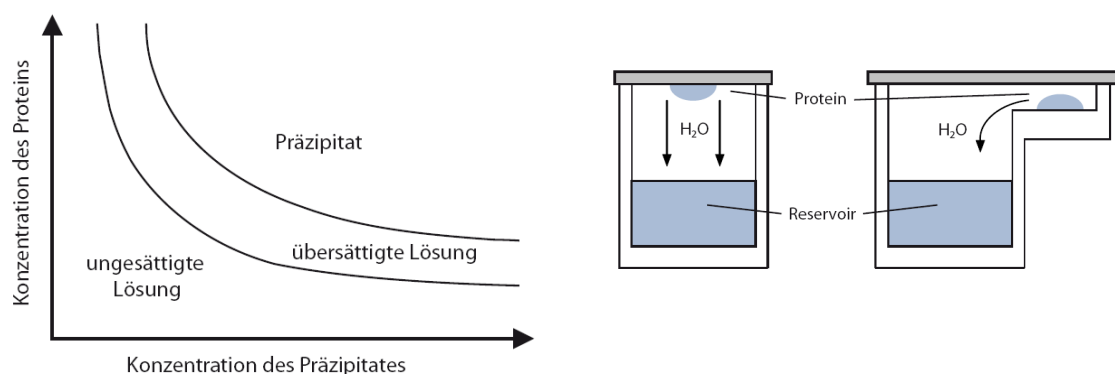


Abb. 3.2 Kristallisation der Proteine. Rechts, Phasendiagramm der Proteinlösung als Funktion der Protein- und der Präzipitanzkonzentration. Links, schematische Darstellung der Versuchsanordnung bei der „sitting drop“ und „hanging drop“ Methode.

Zur Erzeugung einer übersättigten Proteinlösung wurden in dieser Arbeit zwei Versuchsanordnungen verwendet: die des sitzenden und die des hängenden Tropfens (*sitting / hanging drop*). Bei beiden wird jeweils ein Tropfen, bestehend aus 1 µL der Protein- und 1 µL der Präzipitanzlösung, in einer verschlossenen Kammer mit einem großen Reservoir (1000 µL), das mit Präzipitanzlösung gefüllt ist, platziert. Beide Methoden beruhen auf einer langsamen Erhöhung der Präzipitanzkonzentration durch Dampfdiffusion. Die Dampfdiffusion der Wassermoleküle aus dem Tropfen hin zur Reservoirlösung führt langsam zum Ausgleich der Konzentrationen in beiden Lösungen. Die Verringerung des Tropfenvolumens führt

zu einer Steigerung der Proteinkonzentration und somit zur Übersättigung der Lösung. Im Idealfall kommt es dabei zur Nukleation mit anschließendem Wachstum der Proteinkristalle.

Neben der Kristallisation kann aber auch Präzipitation stattfinden. Die Faktoren, welche für die Kristallisation geeignet sind, müssen für jedes Protein einzeln bestimmt werden. Zur Ermittlung der idealen Kristallisationsbedingungen wurden viele verschiedene Zusammensetzungen der Präzipitanzlösung, welche in kommerziellen Kristallisationsscreens von Qiagen und Hampton Research zusammengefasst sind, in 96-well-Platten getestet. Zum Pipettieren des Tropfens, bestehend aus 100 nL Proteinlösung und 100 nL Präzipitanzlösung sowie eines Reservoirvolumens von 70 μ L, wurde ein Phoenix-Roboter (Art Robbins Instruments, USA) eingesetzt. Die Platten wurden anschließend mit Parafilm verschlossen und mit Hilfe des automatischen Bildgebungssystems Rock-Imager (Formulatrix, USA) protokolliert. Die so ermittelten Kristallisationsbedingungen wurden durch leichte Änderungen der pH-Werte sowie der Präzipitanzkonzentrationen in 24-well-Platten optimiert.

3.2.4.2 Grundlagen der Röntgenstrukturanalyse

Bei der Bestrahlung eines Kristalls mit Röntgenstrahlen kommt es zur Streuung der elektromagnetischen Wellen an den Elektronen der Atome im Kristall. Die Interferenz der gestreuten Strahlung führt zur Entstehung von getrennten Beugungsreflexen. Die Bragg'sche Gleichung beschreibt dabei die Bedingungen für konstruktive Interferenz:

$$n \cdot \lambda = 2 \cdot d \cdot \sin \Theta \quad \text{Gleichung 3}$$

mit λ Wellenlänge der Röntgenstrahlung
 n Beugungsordnung
 d Abstand zwischen den Netzebenen im Kristallgitter
 Θ Bragg'scher Winkel

Die Röntgenbeugung wird dabei als Reflexion von Röntgenstrahlung an Netzebenen des Translationsgitters beschrieben, welche mit dem Miller'schen-Indexes hkl bezeichnet werden. Die Geometrie der Einheitszelle des Kristalls bestimmt somit die Positionen der Beugungsreflexe.

Die Streuwelle einzelner hkl -Reflexe entsteht durch die Überlagerung der Streuwellen aller n Atome in der Elementarzelle unter Berücksichtigung ihrer individuellen Phasenverschiebungen. Die Intensität der hkl -Reflexe hängt daher von der Anordnung der einzelnen Atome in der Einheitszelle ab.

3.2.4.3 Datensammlung

Die Aufnahmen der hochauflösenden Datensätze wurden an der Synchrotronquelle *Swiss Light Source* (SLS) am Paul Scherrer Institut (Villingen, Schweiz) durchgeführt. Für Indizierung der Reflexe, Integration der Beugungsintensitäten und Daten-reduktion wurde das Programmpaket XDS eingesetzt (Kabsch, 1993).

3.2.4.4 Phasenproblem

Die gesamte Struktur der Streuwelle einzelner hkl-Reflexe wird als Strukturfaktor F_{hkl} bezeichnet. Beim Strukturfaktor F_{hkl} handelt es sich um einen komplexen Vektor, welcher in Polarkoordinaten durch die folgende Gleichung beschrieben wird:

$$F_{hkl} = |F_{hkl}| \cdot \exp(2\pi i \alpha_{hkl}) \quad \text{Gleichung 4}$$

In dieser Form setzt sich der Vektor aus dem Betrag des Strukturfaktors $|F_{hkl}|$ und dem Phasenwinkel α_{hkl} zusammen.

Für die Berechnung der Elektronendichte $\rho(xyz)$ an der x,y,z-Position des kartesischen Koordinatensystems der Einheitszelle sind nach Gleichung 5 Informationen über die Strukturfaktorbeträge $|F_{hkl}|$ und die Phasen α_{hkl} erforderlich:

$$\rho(xyz) = \frac{1}{V} \sum |F_{hkl}| \cdot \exp(-2\pi i(hx + ky + lz) + i\alpha_{hkl}) \quad \text{Gleichung 5}$$

Die Intensität I_{hkl} der einzelnen Beugungsreflexe hkl ist proportional zum Betragsquadrat der Strukturfaktoren:

$$I_{hkl} \propto |F_{hkl}|^2 \quad \text{Gleichung 6}$$

Aus den Messdaten der Beugungsexperimente lassen sich demnach nur die Beträge der Strukturfaktoren bestimmen. Die Information über die Phasen hingegen ist experimentell nicht zugänglich. Diese Tatsache wird als das „Phasenproblem“ bezeichnet. Für die Lösung dieses Problems stehen vier Methoden zur Verfügung: direkte Phasierung, molekularer Ersatz, multiple anomale Dispersion und multipler isomorpher Ersatz.

Für die Bestimmung der initialen Phasen wurde in dieser Arbeit ausschließlich die Methode des molekularen Ersatzes (*molecular replacement*) angewandt. Nach dieser Methode werden die Phasen des kristallisierten Proteins durch Phasen eines Modells angenähert. Hierbei wird das Modell durch Rotation und Translation in die Einheitszelle positioniert. Als Modell dient dabei die Struktur eines homologen

Proteins. In dieser Arbeit wurde hierfür das automatische Programm MOLREP (Vagin und Teplyakov, 1997) eingesetzt.

3.2.4.5 Modellbau und Strukturverfeinerung

Die Karte der Elektronendichte, welche mit Hilfe der initialen Phasen berechnet wurde, wird für die anschließende Strukturverfeinerung verwendet. In iterativen Zyklen wurden hierbei die nicht enthaltenen Bereiche hinzugefügt und die sichtbaren Abweichungen korrigiert. Nach jedem Verfeinerungsschritt wurde die Qualität des Modells abgeschätzt, indem die aus dem Modell berechneten Beträge der Struktur-faktoren F_{calc} mit den beobachteten Beträgen der Struktur-faktoren F_{obs} verglichen wurden. Als Maß diente dabei der kristallographische R-Faktor R_{work} :

$$R_{\text{work}} = \frac{\sum \left| |F_{\text{obs}}| - |F_{\text{calc}}| \right|}{\sum |F_{\text{obs}}|} \quad \text{Gleichung 7}$$

Die Strukturverfeinerung erfolgte mit Hilfe des Programmes Coot (Emsley and Cowtan, 2004) und des Programmpakets CCP4. Für die Darstellung der Proteinstrukturen wurde das Programm Pymol (DeLano, 2002) verwendet.

4. Ergebnisse

4.1 Konstrukte

In der vorangegangenen Arbeit von Minhajuddin Sirajuddin wurden die Kristallstrukturen des humanen Sept2 und des Komplexes aus Sept2-Sept6-Sept7, das als Grundeinheit der Septinfilamente in Säugetierzellen etabliert ist, aufgeklärt. Diese Studien verwendeten sowohl Konstrukte in ihrer Gesamtlänge als auch Konstrukte, bei denen die c-terminalen *coiled-coil* Bereiche entfernt wurden. Obwohl die Ergebnisse dieser Untersuchungen unser Verständnis über die Funktionsweise der Septine entscheidend vorangebracht haben, blieben immer noch viele Aspekte unaufgeklärt. Vor allem die Funktion der *switch* Bereiche und des Nukleotidzykluses inklusive der konservierten GTP-Hydrolyse sind immer noch nicht verstanden.

Zuerst muss die Auswahl der Modellkonstrukte für weitere Studien kritisch analysiert werden. Zwar lieferte Sept2 als Modell für die Filamentbildung entscheidende Informationen über die Wechselwirkungen zwischen den G-Domänen. Im Sept2-Sept6-Sept7-Komplex, welcher die physiologische Grundeinheit der Septinfilamente besser repräsentiert, findet man jedoch keine homotypischen Interaktionen zwischen zwei Sept2-Untereinheiten über das G-Interface.

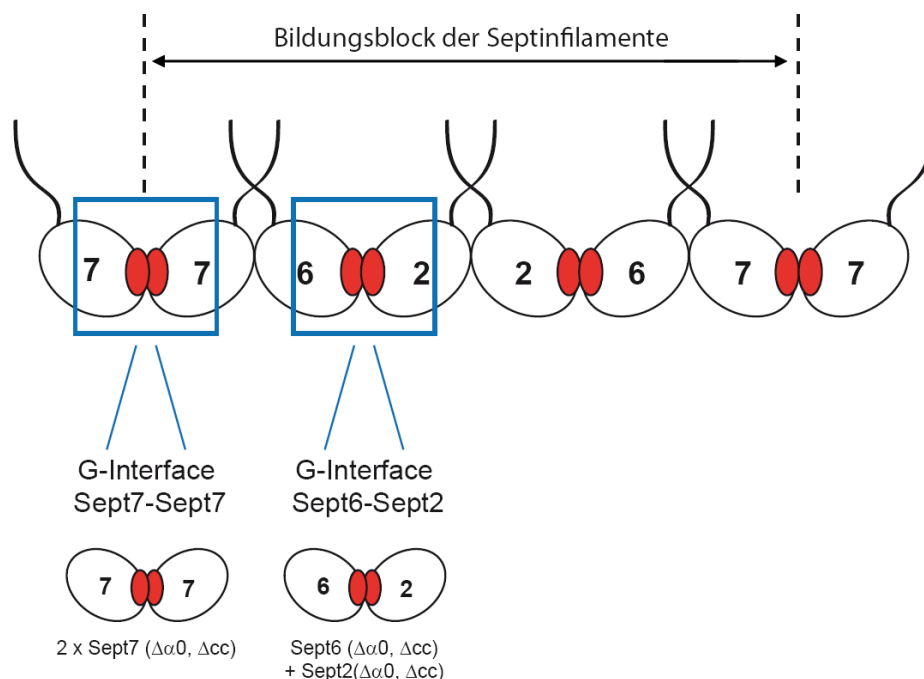


Abb. 4.1 Auswahl neuer Konstrukte. Schematische Darstellung des Septinkomplexes einer Säugetierzelle. Die beiden G-Interface-Varianten sind hervorgehoben.

Im Vergleich zu Sept2 scheint der Komplex aus Sept2-Sept6-Sept7 demnach ein besseres Modell zu sein. Auf der anderen Seite enthält der Komplex aber sechs Proteinuntereinheiten und sechs Nukleotidmoleküle, die zu zwei verschiedenen G-Interfaces zusammengefügt sind. Diese Tatsache macht dieses Modell zu komplex und seine Manipulierbarkeit zu schwierig.

In dem Komplex aus Sept2-Sept6-Sept7 findet man zwei unterschiedliche Typen des G-Interface, eines im homotypischen Dimer aus zwei Sept7-Untereinheiten und ein weiteres im Heterodimer zwischen Sept2 und Sept6. Als einfachere und leichter manipulierbarere Modelle für die beiden G-Interface-Typen würden sich daher die Konstrukte der entsprechenden G-Domänen anbieten (Abb. 4.1).

Im Folgenden wird zunächst die Charakterisierung der G-Domäne von Sept7 behandelt. Um Gemeinsamkeiten und Unterschiede zwischen den Septingruppen zu untersuchen, werden anschließend die Ergebnisse der Charakterisierung der G-Domänen von Sept2, Sept6 und Sept9 gegenübergestellt.

4.2 Die G-Domäne des humanen Sept7

4.2.1 Konstruktherstellung und Reinigung der G-Domäne von Sept7

Für die rekombinante Herstellung der G-Domäne des humanen Sept7 in *Escherichia coli* wurde zuerst ein Sept7-Konstrukt ohne c-terminalen *coiled-coil* Bereich hergestellt, so dass dieses lediglich die Aminosäuren 10 - 297 enthielt. Dieses Sept7-Konstrukt wurde jeweils in die Vektoren pET28a (Novagen) und pGEX4T1 (GE Healthcare) kloniert. Obwohl in beiden Fällen eine gute Überexpression beobachtet wurde, waren die Proteine leider nicht löslich.

Um die Löslichkeit der Proteine zu verbessern, wurde in einem neuen Konstrukt neben dem c-terminalen *coiled-coil* Bereich zusätzlich noch die N-terminale $\alpha 0$ -Helix entfernt. Das resultierende Konstrukt Sept7 $\Delta\alpha 0, \Delta cc$, welches nur noch die Aminosäuren 29 - 297 enthielt, wurde erneut in die beiden Vektoren pET28a (Novagen) und pGEX4T1 (GE Healthcare) kloniert.

Das in den pET28a-Vektor klonierte Konstrukt zeigte in *E. coli* BL21(DE3) Zellen eine gute Überexpression. Auch die Ausbeute nach der Affinitätschromatographie mittels einer Ni-NTA-Säule und der anschließenden Gelfiltration war gut. Beim Ankonzentrieren der Elutionsfraktionen nach der Gelfiltration präzipitierte allerdings das Protein bei einer Konzentration von ca. 3 mg/mL.

Für das Konstrukt im pGEX4T1-Vektor wurde ebenfalls eine sehr gute Überexpression beobachtet. Auch die Reinigung über einer GSH-Säule lieferte eine gute Ausbeute. Allerdings war die Abspaltung des GST-Fusionsproteins durch eine Thrombin-Protease nicht erfolgreich.

Wegen der Probleme bei der Abspaltung von GST wurde das Konstrukt zuletzt in einen pGEX6P1-Vektor umkloniert. Dieser Vektor enthält nach dem GST-Protein die Erkennungssequenz für die Prescission-Protease. Zudem ist der Linker zwischen GST und dem klonierten Konstrukt im Vergleich zum pGEX4T1-Vektor um drei Aminosäuren länger.

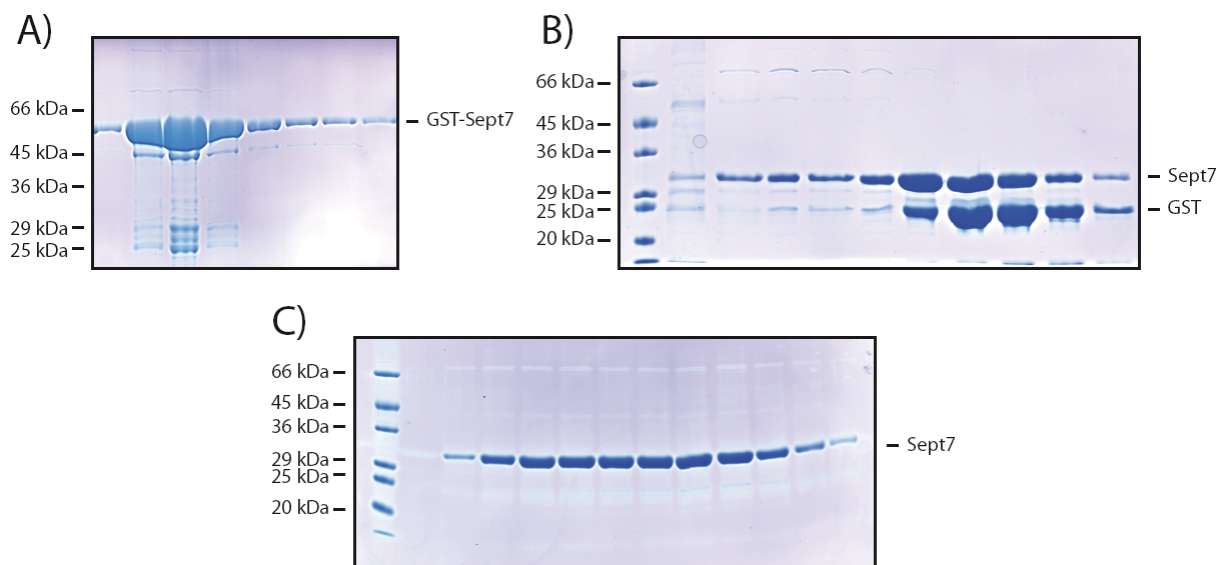


Abb. 4.2 Reinigung von Sept7(29 - 297). Sept7(29 - 297) wurde als GST-Fusionsprotein in *E. coli* exprimiert und anschließend in drei Schritten gereinigt. A) Elutionsfraktionen nach der GSH-Säule. B) Nach der Abspaltung von GST durch eine Prescission-Protease erfolgte eine Gelfiltration über eine Superdex S200 26/60 Säule im Niedrigsalzpuffer (100mM NaCl). C) Filtration über eine GSH-Säule zur Abtrennung von GST.

Die Abb. 4.2 zeigt die einzelnen Schritte bei der Reinigung von Sept7(29 - 297). Das im pGEX6P1-Vektor klonierte Konstrukt wurde in *E. coli* BL21(DE3) Zellen über-exprimiert und zunächst mit Hilfe der Affinitätschromatographie über eine GSH-Säule gereinigt. Die Elutionsfraktionen enthielten das relativ saubere Fusionsprotein in guter Ausbeute. Nach der erfolgreichen Abspaltung des GST-Fusionsproteins mit Hilfe einer Prescission-Protease wurde die Proteinlösung anschließend mittels Gelfiltration über einer Superdex S200 26/60 Säule gereinigt. Das Protein eluierte deutlich nach dem Ausschlussvolumen. Die Elutionsfraktionen enthielten jedoch neben Sept7 noch das GST-Protein und eine kleine Menge des nicht gespaltenen Fusionsproteins GST-Sept7. Zur Abtrennung des GST wurden Fraktionen, welche Sept7 enthielten, vereint und über eine GSH-Säule filtriert. Die SDS-PAGE der

Durchflussfraktionen zeigte danach nur noch die Bande von Sept7 und kein GST mehr. Insgesamt wurden aus einer 5 L TB-Kultur ca. 20 mg Protein erhalten.

4.2.2 Biochemische Charakterisierung der G-Domäne von Sept7

Der Oligomerisierungszustand des isolierten Sept7-Konstruktes wurde in analytischen Gelfiltrationsläufen über einer kalibrierten Superdex S75 HR 10/30 Säule bestimmt. Das Laufverhalten des Proteins wurde hierbei sowohl unter Niedrigsalz- als auch unter Hochsalzbedingungen (100 mM NaCl bzw. 500 mM NaCl) analysiert.

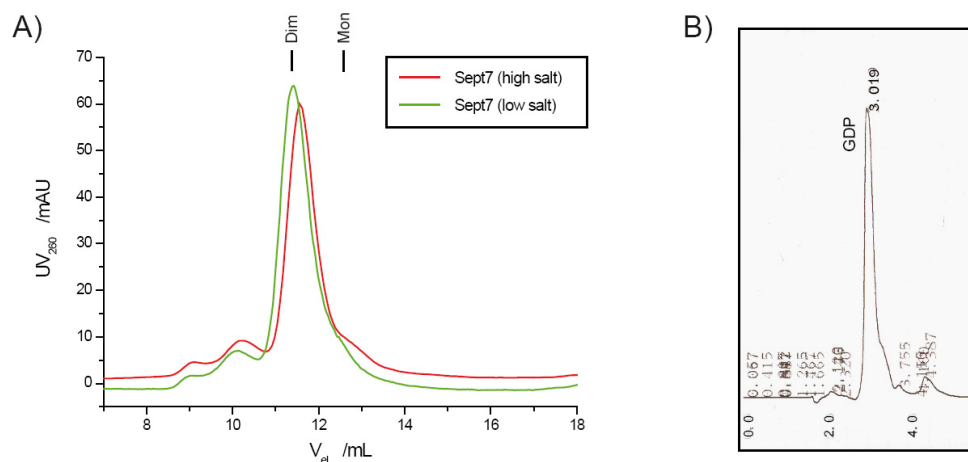


Abb. 4.3 Charakterisierung des Sept7(29 - 297). A) Elutionschromatogramm während der analytischen Gelfiltrationschromatographie über eine Superdex S75 10/30 Säule von Sept7(29 - 297) unter Niedrigsalz- und Hochsalzbedingungen (100 mM bzw. 500 mM NaCl). B) Chromatogramm der Umkehrphasen-HPLC bei der Analyse der Nukleotidbeladung des gereinigten Proteins. Der Peak bei einer Retentionszeit von $t_R = 3,02$ min entspricht GDP.

Sowohl im Niedrigsalz- als auch im Hochsalzpuffer wurde für das Protein ein Elutionsvolumen von 11,5 mL detektiert (Abb. 4.3). Die daraus berechnete Größe des Proteins deutet auf einen dimeren Komplex hin. Die Salzkonzentration scheint dabei keinen Einfluss auf die Stabilität der Dimerisierung zu haben.

Nach der Reinigung wurde mittels Umkehrphasen-HPLC die Nukleotidbeladung des Proteins bestimmt. Die Ergebnisse zeigten, dass das Sept7(29 - 297)-Protein vollständig und ausschließlich mit GDP beladen ist (Abb. 4.3).

4.2.3 Kristallisation und Strukturlösung der G-Domäne des Sept7 im GDP-gebundenen Zustand

Die initialen Kristallisationsbedingungen für das aufgereinigte Protein Sept7(29 - 297) wurden in Gegenwart von GDP mithilfe kommerzieller Kristallisationsscreens (Nextal,

Qiagen, Hilden, Deutschland; Hampton Research, Aliso Viejo CA, USA) gesucht. Dabei konnten mehrere initiale Kristallisationsbedingungen identifiziert werden.

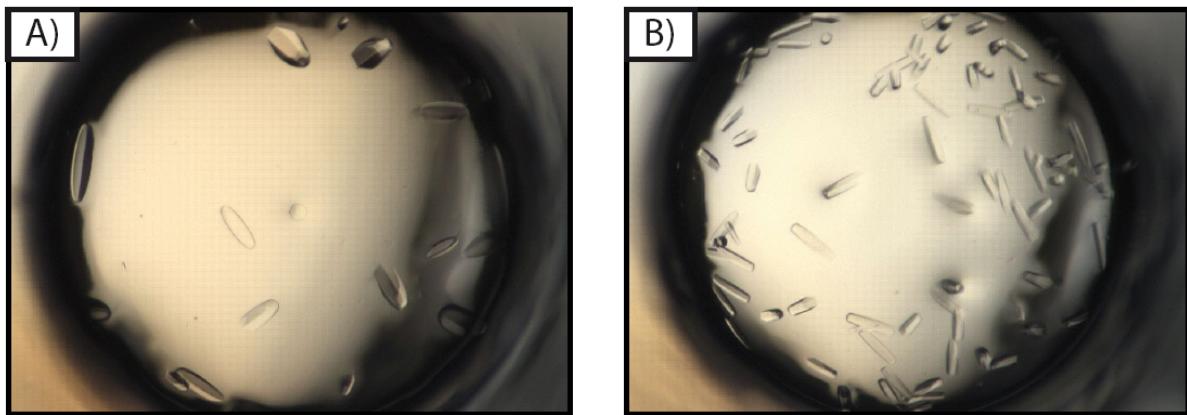


Abb. 4.4 Initiale Kristalle von Sept7(29-297) beladen mit GDP.

Die Optimierung der Kristallisationsbedingungen lieferte Kristalle, die an einer Kupferanode Beugungsreflexe bis zu 4,0 Å zeigten. Die endgültige Zusammensetzung des Kristallisationstropfens bestand aus 1 µL Sept7(29 - 297) mit einer Konzentration von 10 mg/ml in 20 mM Tris-HCl (pH = 8,0), 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 5 mM DTE und 1 mM GDP gemischt mit 1 µL der Reservoir-Lösung aus 100 mM CHES (pH = 9,5), 1,1 M Ammoniumsulfat und 200 mM NaCl. Zum Kryoschutz wurde die Reservoir-Lösung zusätzlich mit 20% Glycerol versetzt.

Von diesen Kristallen wurde am Synchrotron (SLS, Villingen) ein Datensatz bis zu einer Auflösung von 3,3 Å aufgenommen. Für die Indizierung, Integration und Skalierung der gemessenen Daten wurde das XDS-Programmpaket verwendet (Kabsch, 1993). Die Ergebnisse der Reflexindizierung wiesen auf ein primitives hexagonales Gitter hin, welches später der Raumgruppe P6₁ zugeordnet wurde.

Die initialen Phasen für die Strukturlösung wurden durch einen molekularen Ersatz erzeugt. Hierfür wurde die Struktur der G-Domäne des Sept2 als Suchmodell verwendet (PDB ID 2QA5, Sirajuddin *et al.*, 2007). Dieser Ansatz lieferte als Ergebnis eine asymmetrische Einheit mit zwei Proteinmolekülen. Die Tatsache, dass die beiden Untereinheiten einander über das G-Interface kontaktieren und die zusätzliche Elektronendichte in den Nukleotidbindungstaschen beider Untereinheiten sprachen dafür, dass die gefundene Lösung kristallographisch und physiologisch richtig ist.

Ausgehend von diesem Modell wurde die Struktur in iterativen Zyklen durch manuelles Hinzufügen der nicht enthaltenen Bereiche und durch die Korrektur der sichtbaren Abweichungen verfeinert. Die Verfeinerung erfolgte mit Hilfe des Programms Coot (Emsley and Cowtan, 2004) und des Programmpakets CCP4 bis zu R_{work} - und R_{free} -Werten von 24% bzw. 30% für das finale Strukturmodell.

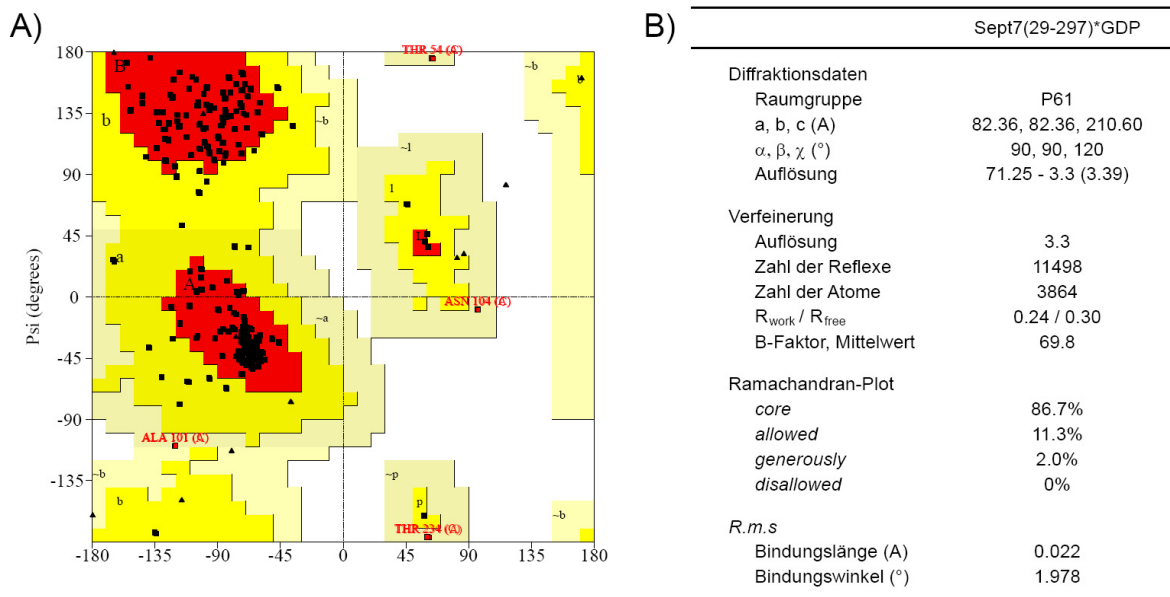


Abb. 4.5 Ramachandran-Diagramm und Verfeinerungsstatistik des finalen Modells. A) Das Ramachandran-Diagramm wurde mit PROCHECK erstellt.

In Abb. 4.5 sind die Verfeinerungsstatistik und das Ramachandran-Diagramm für das finale Modell der Kristallstruktur von Sept7(29 - 297) dargestellt. Es zeigt, dass die Torsionswinkel aller Reste innerhalb des erlaubten Bereichs des Ramachandran-Diagramms liegen, und veranschaulicht somit die gute Geometrie des Modells. Die finalen atomaren Koordinaten des Strukturmodells von Sept7(29 - 297) wurden in der Protein Data Bank mit der Eintragsnummer PDB-ID 3T5D hinterlegt.

4.2.4 Die Struktur von Sept7(29-297)

Die asymmetrische Einheit der Kristallstruktur enthält zwei Sept7-Moleküle, die einander mit der Nukleotidbindungsstelle zugewandt sind und somit einen G-Dimer ausbilden (Abb. 4.9). Die Gesamtstruktur der G-Domäne von Sept7 ähnelt sehr der Struktur von Sept2. Obwohl im kristallisierten Konstrukt die für das NC-Interface essentiellen Elemente wie z.B. die $\alpha 0$ -Helix und der c-terminale *coiled-coil* Bereich entfernt wurden, bildete das Protein in den Kristallen trotzdem lange lineare

Filamente (Abb. 4.6) ähnlich wie Sept2 Δ cc (PDB-ID 2QA5). Das steht in offenkundigem Widerspruch zum Verhalten des Proteins in Lösung, wo es unter den getesteten Bedingungen als Homodimer vorliegt. Es scheint, dass unter Kristallisationsbedingungen die Bildung von Filamenten bevorzugt wird, was sich wahrscheinlich auf die hohen lokalen Proteinkonzentrationen zurückführen lässt.

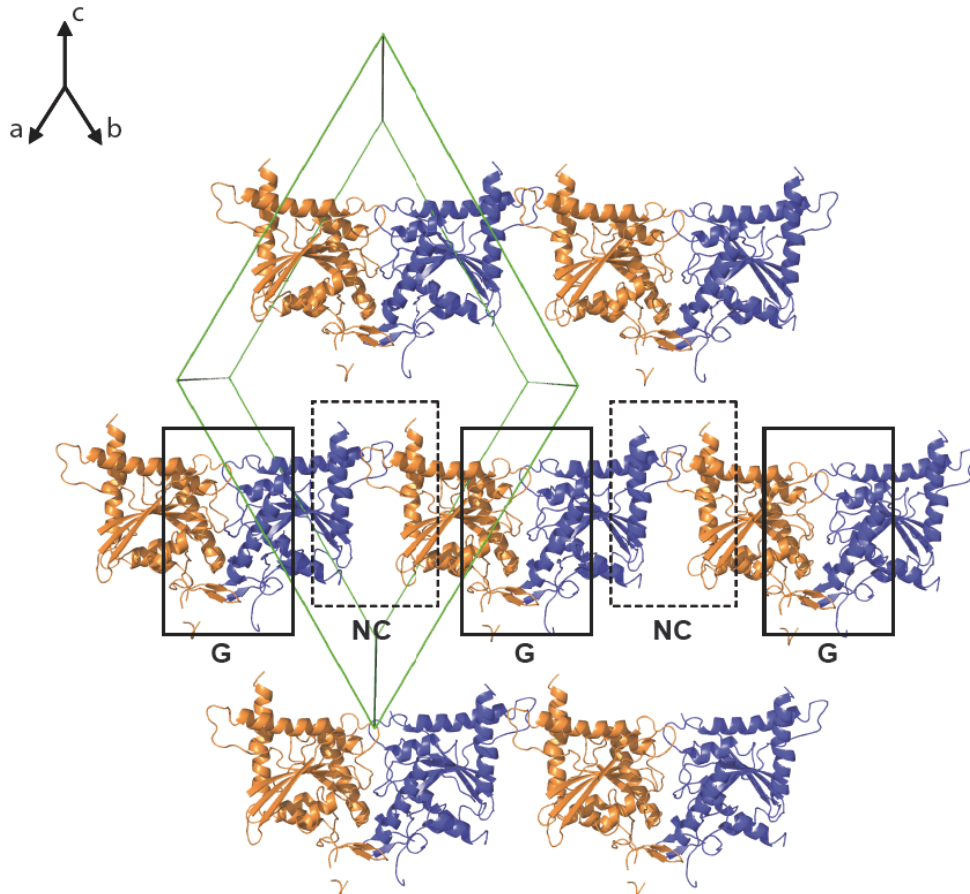


Abb. 4.6 Die Kristallpackung von Sept7(29 - 297). In der Kristallpackung sind die parallelen linearen Filamente aus den G-Domänen von Sept7 mit Abwechslung von G- und NC-Interface gut erkennbar.

In die Bindungen des NC-Interface sind aus jedem Monomer nur je vier Aminosäurereste involviert. Dabei tritt Arg-131, welches in der Schleife zwischen der α 2-Helix und dem β 4-Strang lokalisiert ist, in elektrostatische Wechselwirkungen mit Glu-126 und Glu-288, die auf den α 2- bzw. α 6-Helices der anderen G-Domäne lokalisiert sind. Außerdem bildet Arg-291 des einen Moleküls mehrere Wasserstoffbrücken zur Hauptkette der Aminosäuren 126-129 des anderen Moleküls aus. Diese Aminosäurereste sind in allen Septinen konserviert und wurden bereits früher innerhalb der Struktur des Sept2 Δ cc beobachtet (Sirajuddin *et. al.*, 2007). Um auszuschließen, dass das Protein in der Lösung nicht in Form eines NC-Dimers vorliegt, wurde zur Kontrolle Arg-131 zum Aspartat mutiert. Die Mutante wurde nach

demselben Protokoll analog zum Wildtyp-Konstrukt in ähnlich guter Ausbeute und Reinheit gewonnen. Anschließend wurde das gereinigte Protein mittels einer analytischen Gelfiltration untersucht. Das in Abb. 4.7 dargestellte Chromatogramm zeigt, dass die Ladungsumkehrmutation keinerlei Auswirkungen auf die Dimerisierung von Sept7(29-297) in der Lösung hat. Allerdings verhindert sie die Kristallisation des Proteins unter allen getesteten Bedingungen.

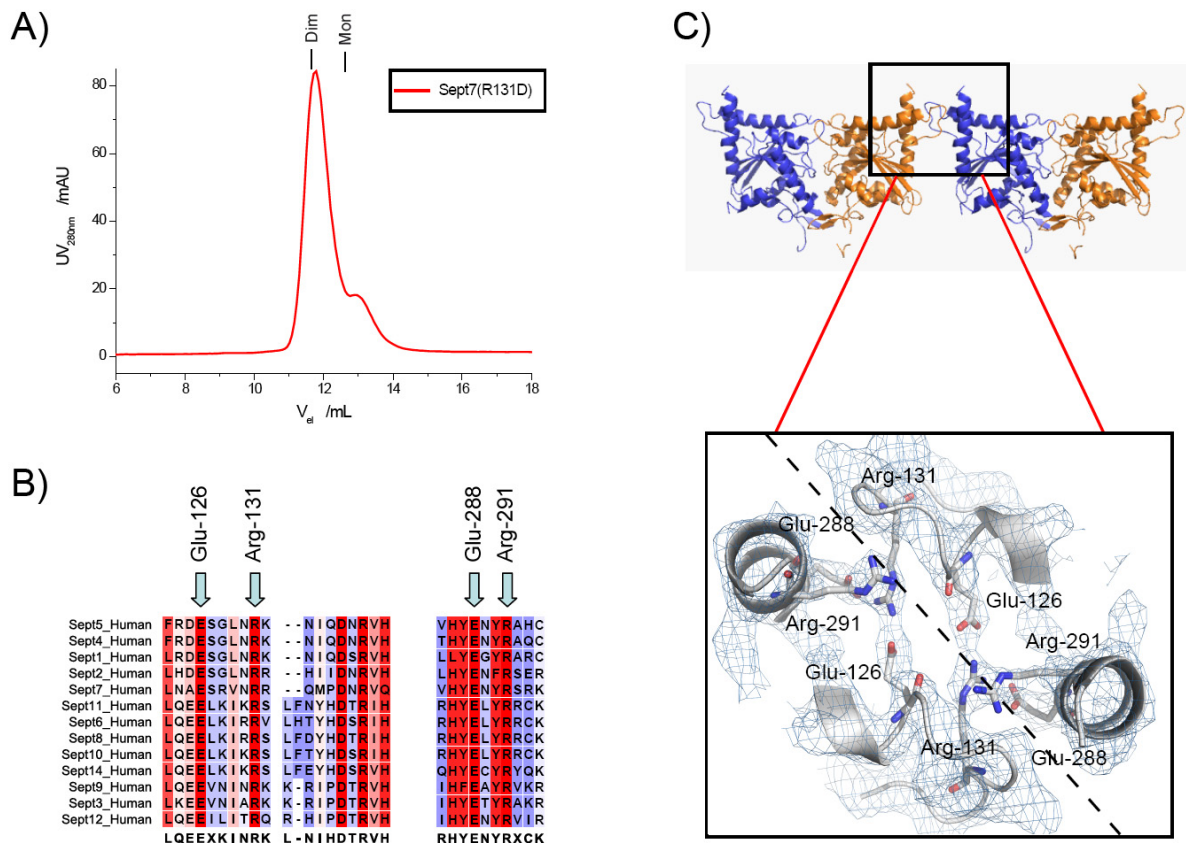


Abb. 4.7 Wechselwirkungen am NC-Interface. A) Elutionschromatogramm von Sept7(R131D) während der analytischen Gelfiltrationschromatographie über eine Superdex S75 10/30 Säule. B) Vergleich der Aminosäuresequenzen der humanen Septine. Dargestellt sind die Bereiche mit den Resten, welche in Wechselwirkungen am NC-Interface involviert sind. C) Struktur und Elektronendichte des NC-Interface. Die Reste des NC-Interface sind im Stäbchen-Modell dargestellt. Die gestrichelte Linie markiert die Grenze zwischen den Monomeren.

Die vielzähligen Wechselwirkungen, die zur Ausbildung des G-Interface in der Sept2-Struktur beschrieben wurden, findet man auch in der Struktur von Sept7(29 - 297)·GDP wieder (Abb. 4.8). So entsprechen die Wechselwirkungen zwischen den Resten Trp-250, Ala-253 und His-260 in der Struktur von Sept7 den bereits beschriebenen Interaktionen zwischen Trp-260, Val-253 und His-270 im Sept2. Ebenfalls konserviert sind in den Strukturen von Sept2 und Sept7 die elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen dem Glu-184 einer Untereinheit und

dem Arg-244 der anderen Untereinheit, sowie die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen dem Glu-184 einer Untereinheit und der Ribose des Nukleotids, welches an die andere Untereinheit gebunden ist. Alle diese Aminosäurereste sind in den meisten Septinen konserviert und scheinen somit einen gemeinsamen grundlegenden Bestandteil des G-Interface darzustellen (Abb. 4.8).

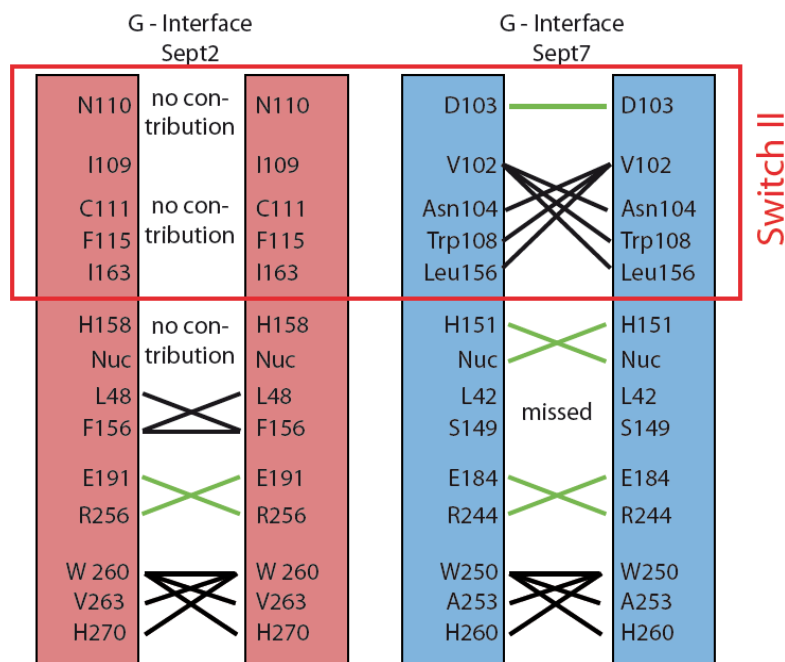


Abb. 4.8 Vergleich der G-Interface von Sept2 und Sept7. Schematische Darstellung der Bindungen im G-Interface, die in der Sept2 Δ acc-Struktur beobachtet wurden, (links, PDB ID: 2QA5), verglichen mit Bindungen im homotypischen G-Dimer bestehend aus zwei Sept7-Untereinheiten (rechts). Wasserstoffbrücken sind mit grünen Linien, hydrophobe Wechselwirkungen mit schwarzen Linien dargestellt.

Allerdings weisen beide Strukturen auch einige bemerkenswerte Unterschiede auf, die in Abb. 4.8 schematisch zusammengefasst sind. Eine Wechselwirkung, die für das G-Interface von Sept7 spezifisch zu sein scheint, ist die Bindung zwischen dem His-151 der einen Untereinheit und den α - und β -Phosphatgruppen des Nukleotids der anderen Untereinheit. Das erwähnte Histidin ist zwar auch in allen anderen Septinen konserviert, allerdings beträgt der Abstand zum Nukleotid in der Sept2-Struktur 5,2 - 6,0 Å und ist somit für eine direkte Bindung zu lang.

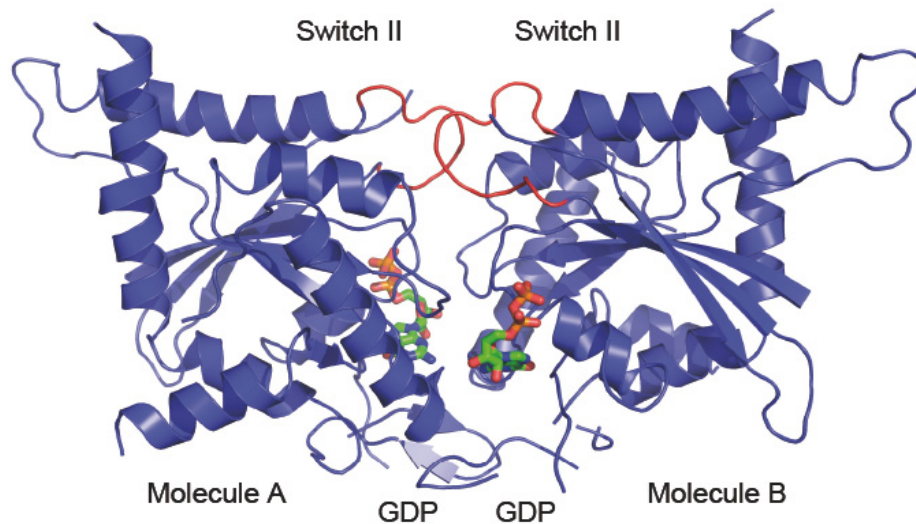


Abb. 4.9 Struktur des G-Dimers von Sept7(29 - 297). Die asymmetrische Einheit der Kristallstruktur von Sept7(29 - 297) enthält zwei Moleküle Sept7, welche mit je einem GDP-Molekül beladen sind und über das G-Interface aneinander binden. Die *switch II* Bereiche sind in rot dargestellt.

Der *switch I* Bereich (Aminosäuren 56 - 73) ist im GDP-Zustand ungeordnet und dadurch weder in der Struktur von Sept2 noch in der von Sept7 sichtbar. Die Elektronendichte des *switch II* Bereiches (Aminosäuren 94 - 108) ist hingegen in der Struktur von Sept7(29 - 297) sehr gut definiert. Die *switch II* Bereiche der beiden Untereinheiten bilden dabei gegenseitige Kontakte aus und sind somit ein Teil des G-Interface. Die Anordnung der Strukturelemente führt zur Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Asp-103 der beiden Untereinheiten in Form eines Carbonsäuredimers. In anderen Septinen findet man an der entsprechenden Stelle entweder ein Aspartat oder ein Asparagin. Beide Aminosäuren sind sich sehr ähnlich und dadurch zur Ausbildung derselben Bindungsart fähig. Zudem kontaktiert das Val-102 der einen Untereinheit die hydrophobe Tasche der anderen Untereinheit, die durch Asn-104, Trp-108 und Leu-156 geformt wird. Auch diese hydrophobe Wechselwirkung scheint in allen Septinen konserviert zu sein (Abb. 4.10).

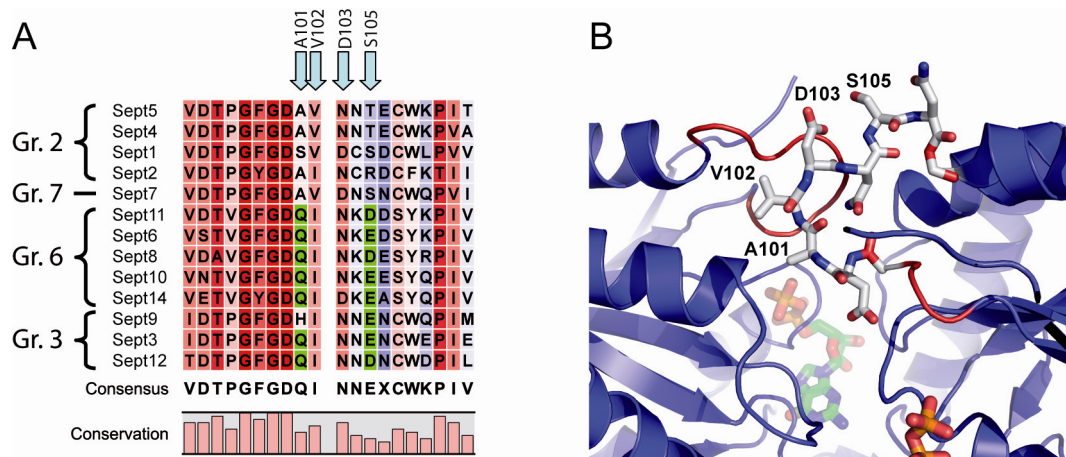


Abb. 4.10 Der switch II Bereich – ein Teil des G-Interface. A) Vergleich der Aminosäuresequenzen der humanen Septine im *switch* II Bereich. Mit rot sind konservierte und mit blau nicht konservierte Aminosäurereste gekennzeichnet. Unterschiede zwischen Sept 7 und Vertretern der Gruppe 3 und 6 sind mit grün hervorgehoben. B) Die Struktur der *switch* II Schleife. Die Aminosäuren 101 - 106 sind im Stäbchen-Modell dargestellt.

4.2.5 Analyse der Unterschiede im G-Interface zwischen Sept2 und Sept7

Die Sequenzanalyse von Sept2 und Sept7 zeigte, dass die Aminosäurereste, welche in die für Sept7 spezifischen Bindungen im G-Interface involviert sind, auch bei allen Vertretern der Gruppe 2 konserviert sind. Allerdings bilden sie dort keine entsprechenden Bindungen aus. Die Überlagerung der Strukturen beider G-Domänen von Sept2 (PDB ID: 2QA5) und Sept7 zeigt, dass die Grundstruktur der beiden Monomere sehr ähnlich ist. Hiervon ausgenommen ist die $\alpha 0$ -Helix, die im Sept7(29 - 297)-Konstrukt entfernt wurde. Werden dagegen die Strukturen der G-Dimere übereinander gelegt, dann werden Unterschiede in der relativen Orientierung der Monomere deutlich (Abb. 4.11).

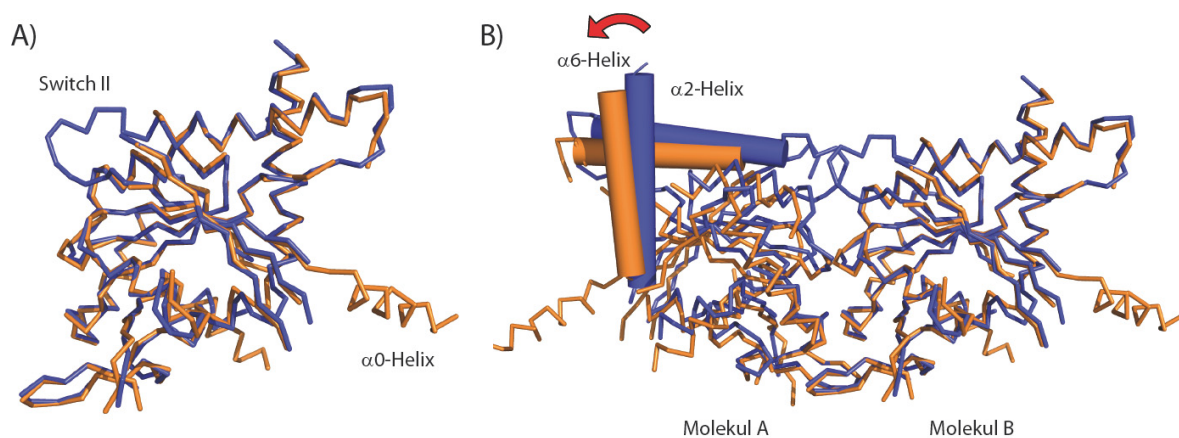


Abb. 4.11 Vergleich der Strukturen von Sept2 und Sept7. A) Vergleich der G-Domänen von Sept2 Δ cc (orange, PDB ID 2QA5) und Sept7(29 - 297) (blau). Die beiden Strukturen sind in der Ribbon-Darstellung präsentiert. B) Überlagerung der G-Dimere von Sept2 Δ cc (orange) und Sept7(29-297) (blau). Die beiden Strukturen sind in der Ribbon-Darstellung präsentiert. Die $\alpha 2$ - und $\alpha 6$ -Helices der linken Untereinheiten sind als Zylinder hervorgehoben.

Im Falle von Sept2 sind die beiden Untereinheiten auseinander gekippt, so dass vor allem die α 2-Helices der beiden Untereinheiten sich um ca. 2 Å voneinander entfernen (Abb. 4.11). Im Vergleich dazu liegen die α 2-Helices des Sept7-Dimers näher beieinander, was die gegenseitigen Kontakte zwischen den *switch* II Bereichen ermöglicht.

Bei der früheren Untersuchung von Sept2 wurde gefunden, dass Phe-156 einen wichtigen Beitrag zur Stabilität des G-Interface im Sept2-Dimer leistet, indem die Phe-156 der beiden Untereinheiten des G-Dimers gegenseitige hydrophobe Wechselwirkungen ausbilden (Sirajuddin *et. al.* 2007). Dieser sperrige Aminosäurerest ist in allen Vertretern der Gruppe 2 konserviert. Bei den anderen Septinen befinden sich hingegen auf dergleichen Position die kleineren Aminosäuren Serin oder Threonin (Abb. 4.12). In der Struktur des Sept7 bildet die Hydroxygruppe des Ser-149 eine Wasserstoffbrücke zum Ring-Sauerstoffatom der Ribose des Nukleotids aus, welches an die andere Untereinheit des G-Dimers gebunden ist.

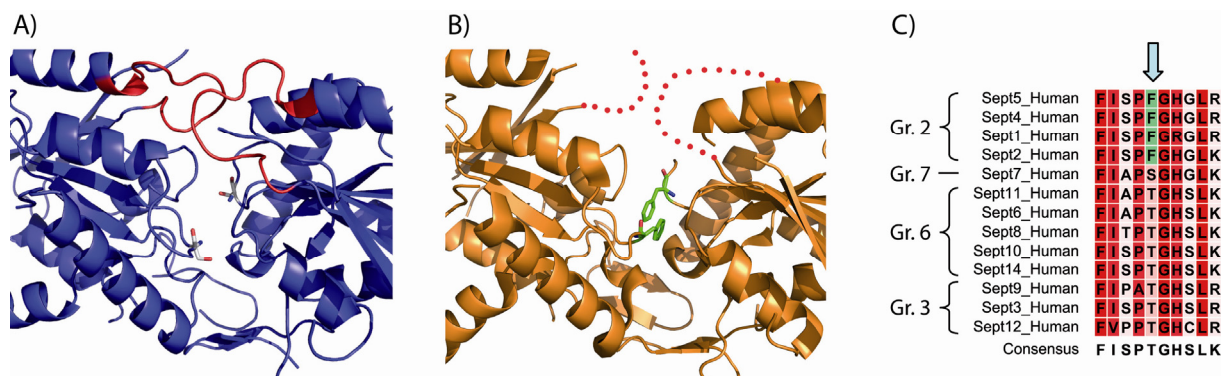


Abb. 4.12 Unterschiede zwischen Sept2 und Sept7. A) Die Struktur des G-Interface von Sept7(29-297) ist in der Ribbon-Darstellung präsentiert. Die *switch* II Bereiche sind in rot markiert. Ser-149 ist im Stäbchen-Modell dargestellt. B) Die Struktur des G-Interface von Sept2 Δ acc (PDB ID 2QA5) ist in der Ribbon-Darstellung präsentiert. Die nicht aufgelösten *switch* II Bereiche sind mit roten Punkten veranschaulicht. Phe-156 ist im Stäbchen-Modell dargestellt. C) Vergleich der Aminosäuresequenzen der humanen Septine. Dargestellt sind die Bereiche, welche dem Phe-156 von Sept2 entsprechen.

Es ist vorstellbar, dass das sperrige Phe-156 für das Auseinanderdrücken der Untereinheiten im Sept2-Dimer verantwortlich ist. Um diese Vermutung zu überprüfen, wurde die entsprechende Position im Sept7 zum Phenylalanin mutiert. Die Sept7(S149F)-Mutante wurde analog zum Wildtyp-Konstrukt exprimiert, gereinigt und anschließend mit Hilfe der analytischen Gelfiltration untersucht.

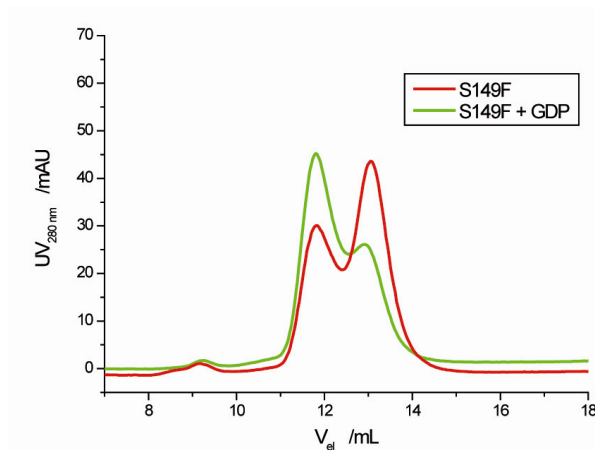


Abb. 4.13 Analytische Gelfiltration von Sept7(S149F). Elutionschromatogramme einer Sept7(S149F)-Mutante während der analytischen Gelfiltrationschromatographie über eine Superdex S75 10/30 Säule direkt nach der Reinigung (rot) und nach Inkubation mit einem Überschuss an GDP (grün).

Das in Abb. 4.13 dargestellte Elutionschromatogramm zeigt, dass Sept7(S149F) partiell monomer ist. Die Inkubation mit einem Nukleotid führt nur zu einer leichten Steigerung der dimeren Fraktion. Ein ähnliches Verhalten wurde auch für Sept2 beschrieben. Diese Ergebnisse bestätigen, dass die Einführung einer sperrigen Aminosäure auf dieser Position das G-Interface destabilisiert und als entscheidender Unterschied im G-Interface zwischen Sept7 und den Vertretern der Gruppe 2 angesehen werden kann.

4.2.6 Stabilisierung des G-Interface durch den *switch II* Bereich

Die Analyse der Aminosäuresequenzen der *switch II* Bereiche (Abb. 4.10) der humanen Septine zeigte, dass einige Stellen wie z.B. Val-102 und Asp-103 in allen Septinen konserviert sind. Um den Beitrag dieser Reste zur Stabilität des G-Interface zu untersuchen, wurde Asp-103 zum Alanin und Val-102 zum Aspartat mutiert, um Wasserstoffbindungen bzw. hydrophobe Wechselwirkungen zu verhindern. Andere Reste wie z.B. Ala-101 oder Ser-105 variieren zwischen verschiedenen Septin-Gruppen dagegen deutlicher, innerhalb derselben Gruppe sind diese Reste aber stark konserviert. Diese Reste können daher für die zum Teil unterschiedlichen gruppenspezifischen Eigenschaften der Septine verantwortlich sein. Zur Kontrolle wurde Ala-101 zum Glutamin und Ser-105 zum Aspartat mutiert. Beide Substitutionen repräsentieren die Unterschiede im *switch II* Bereich zwischen Sept7 und den Septin-Gruppen 6 und 9.

Die Reinigung der entsprechenden *switch II* Mutanten erfolgte nach demselben Protokoll analog zum Wildtyp-Konstrukt und lieferte Proteine mit ähnlich guter Ausbeute und Reinheit. Der Dimerisierungszustand der gereinigten Proteine wurde anschließend mit Hilfe einer analytischen Gelfiltration untersucht und die Nukleotidbeladung der Proteine mittels Umkerphasen-HPLC analysiert.

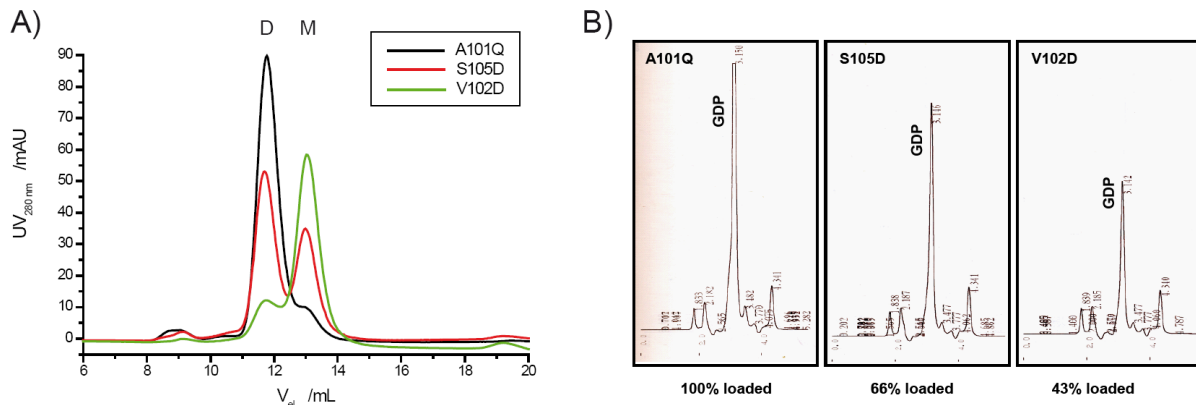


Abb. 4.14 Analyse der *switch II* Mutanten. A) Elutionschromatogramme der verschiedenen Sept7-Mutanten während der analytischen Gelfiltrationschromatographie über eine Superdex S75 10/30 Säule. B) Chromatogramme der Umkehrphasen-HPLC zur Analyse der Nukleotidbeladung der gereinigten Sept7-Mutanten.

Das in Abb. 4.14 gezeigte Elutionschromatogramm zeigt, dass Sept7(A101Q) genau wie das Wildtyp-Konstrukt eluiert und somit in Lösung ebenfalls ein Dimer bildet. Im Vergleich dazu führen die anderen analysierten Mutationen entweder wie bei Sept7(S105D) zu einer partiellen oder wie bei Sept7(V102D) zu einer vollständigen Verhinderung der Dimerisierung.

Bei der Analyse des Nukleotidgehalts der gereinigten *switch II* Mutanten wurde eine partielle Dissoziation des Nukleotids während der Reinigung der Proteine festgestellt (Abb. 4.14). Dabei ist eine Korrelation zwischen den Ergebnissen der analytischen Gelfiltration und der Nukleotidbeladung der *switch II* Mutanten erkennbar. Die Konstrukte mit der stärkeren Tendenz zur Dimerisierung zeigen auch den größeren Nukleotidgehalt. Im Vergleich dazu verlieren die monomeren Konstrukte während der Reinigung das Nukleotid schneller.

Um die gegenseitige Beeinflussung zwischen Nukleotidbeladung und Dimerisierung zu überprüfen wurden die gereinigten Proteine von Sept7(V102D) und Sept7(S105D) mit 1 mM GDP inkubiert und anschließend mit Hilfe der analytischen Gelfiltration untersucht (Abb. 4.15).

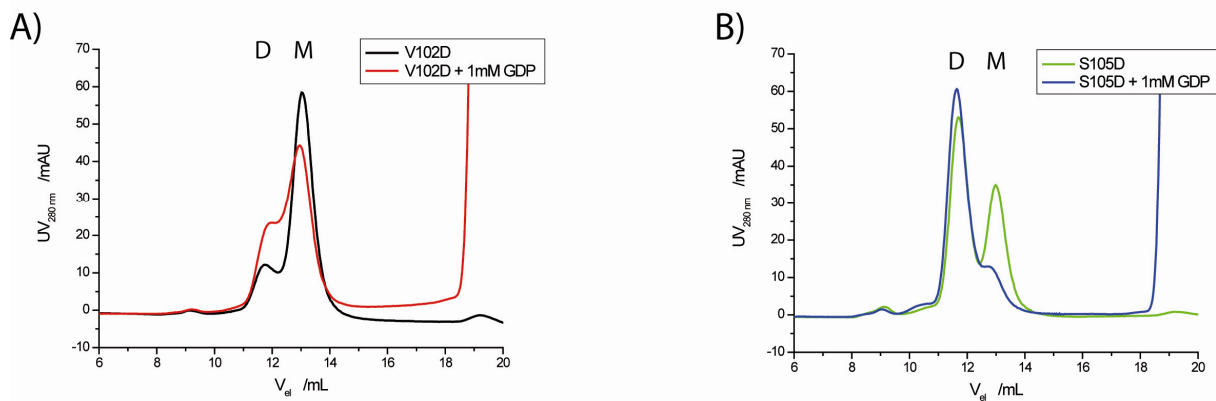


Abb. 4.15 Einfluss der Nukleotidbeladung auf die Dimerisierung der *switch II* Mutanten.
 Elutionschromatogramme während der analytischen Gelfiltrationschromatographie über eine Superdex S75 10/30 Säule von A) Sept7(V102D) und B) Sept7(S105D), direkt nach der Reinigung (schwarz bzw. grün) und nach Inkubation mit einem Überschuss an GDP (rot bzw. blau).

Im Falle der Sept7(S105D)-Mutante, die nur partiell monomer ist, führt die Zugabe von GDP zur Dimerisierung des überwiegenden Teils des Proteins. Bei Sept7(V102D) ist dieser Effekt hingegen deutlich schwächer. Der überwiegende Teil des Proteins bleibt weiterhin monomer.

4.2.7 Die Bindung zwischen dem Nukleotid und der G-Domäne von Sept7

Die starke Tendenz von Sept7 zur Dimerisierung über das G-Interface stellte sich als ein deutliches Hindernis für die Charakterisierung des Proteins heraus. Dies wurde bereits bei der Bestimmung der Bindungsaffinitäten zwischen Sept7 und den Nukleotiden bemerkbar.

Bei den meisten GNBP's erfolgte die Bestimmung der Bindungsaffinitäten entweder direkt durch die Gleichgewichtstitration eines nukleotidfreien Proteins zu fluoreszierenden Nukleotid-Analoga oder indirekt aus den kinetischen Daten der Assoziation und Dissoziation, die mit der *Stopped-flow* Methode bestimmt wurden. In beiden Fällen ist ein nukleotidfreies Protein erforderlich.

Nach der Inkubation des Wildtyp-Proteins von Sept7(29 - 297) mit einer alkalischen Phosphatase blieb das zu Guanosin abgebaute Nukleotid unerwartet an das Protein gebunden. Im Falle der Mutanten Sept7(V102D), Sept7(D103A) und Sept7(E184A), bei denen der Dimerisierungsgrad über das G-Interface schwächer ist, ließen sich die Proteine jedoch durch Inkubation mit einer alkalischen Phosphatase von ihrem Nukleotid befreien. Die Mutationsstellen liegen weit von der Nukleotidbindungsstelle entfernt und sollten somit keinen Einfluss auf die Bindungsstärke zum Nukleotid

haben. Deshalb wurden diese Konstrukte für die Charakterisierung der Wechselwirkung zwischen Sept7 und den Nukleotiden verwendet.

Für die Charakterisierung der GNBP's haben sich die mit mant-Fluorophor (mant = 2'(3')-O-(N-Methyl)anthraniloyl) markierten Nukleotid-Analoga, z.B. mGDP, mGTP und mGppNHp, bewährt. Die mant-Gruppe ist sehr klein, weshalb sie meist die Funktion der Proteine nicht beeinflusst. Außerdem ist ihre Fluoreszenzintensität von ihrer chemischen Umgebung abhängig und steigt deshalb signifikant nach der Bindung an das Protein an.

Zunächst erfolgte die Charakterisierung der Wechselwirkungen zwischen Sept7 und den Nukleotiden über die *Stopped-flow* Methode. Dabei wird eine Fluoreszenzänderung in der Messzelle nach der schnellen Mischung der beiden Interaktionspartner beobachtet. Eine äußerst zügige Vermischung ermöglicht dabei die Charakterisierung sehr schneller Reaktionen im Bereich von Millisekunden.

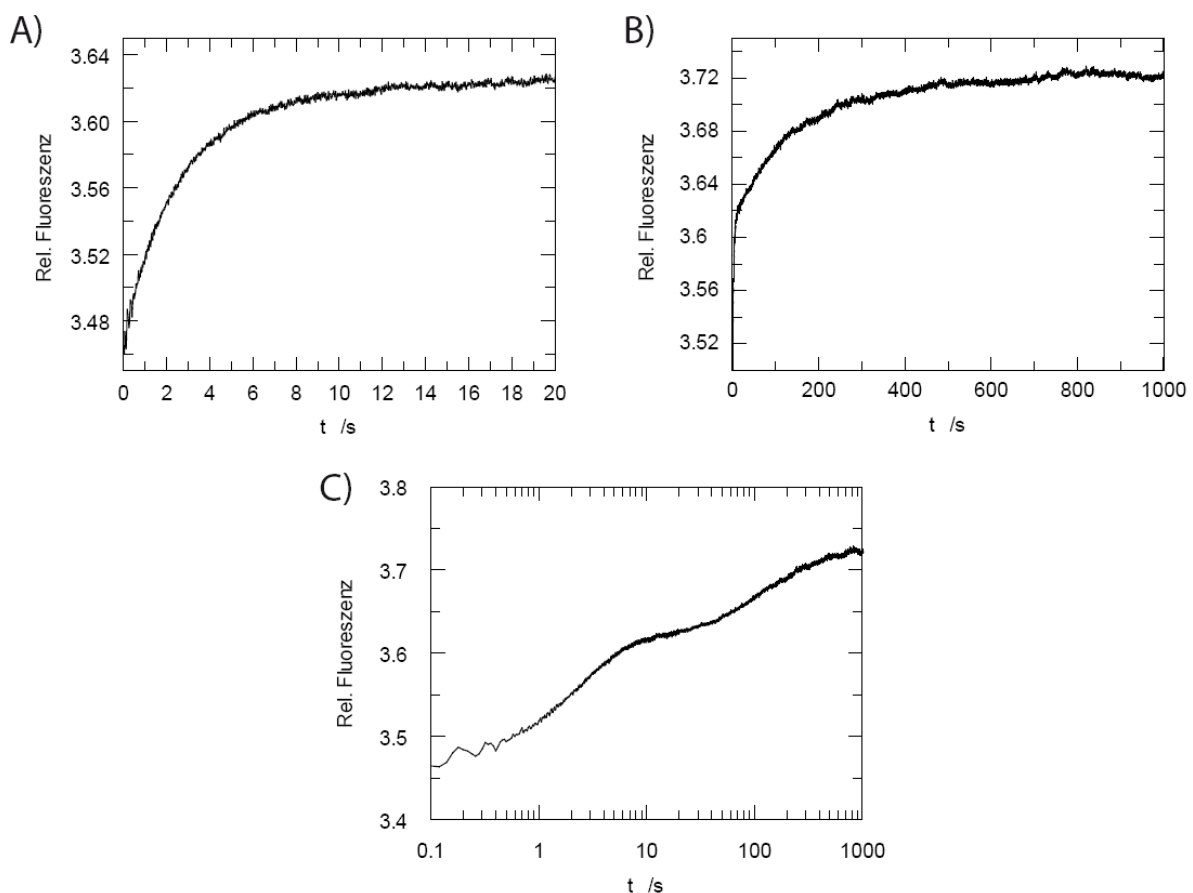


Abb. 4.16 Stopped-Flow Messung der Nukleotidbindung mittels Fluoreszenz. Der Reaktionsverlauf zwischen mGppNHp und Sept7(V102D) wird durch die Messung der Fluoreszenz bei einer Anregung von 366 nm und einer Emission >408 nm verfolgt. A) Fluoreszenzverlauf während der ersten 20 s. B) Gesamtverlauf der Reaktion. C) In der logarithmischen Darstellung der Zeitachse sind die zwei Reaktionsschritte deutlicher erkennbar.

Der in Abb. 4.16 dargestellte Reaktionsverlauf zwischen dem mGppNHp-Nukleotid und einem Überschuss an nukleotidfreiem Sept7 zeigt eine zweistufige Reaktion. Im ersten Reaktionsschritt wird das Gleichgewicht bereits nach ca. 10 sec erreicht. Der zweite Schritt ist deutlich langsamer und erst nach ca. 600 sec abgeschlossen.

Beim Abtasten der Anregungsfrequenz wurden zwei Maxima mit einer Fluoreszenz größer als 408 nm gefunden. Das erste Maximum liegt bei 365 nm und entspricht der Anregungsfrequenz des mant-Fluorophor. Das zweite Maximum liegt bei 290 nm, was typisch für die Absorption des Tryptophan ist und auf ein FRET-Signal zwischen dem mant-Fluorophor und dem Tryptophanrest des Proteins hinweist. Da Sept7(29 - 297) zwei Tryptophanreste besitzt, wurde die Messung des Reaktionsverlaufes zwischen mGppNHp und Sept7 bei einer Anregungsfrequenz von 290 nm wiederholt.

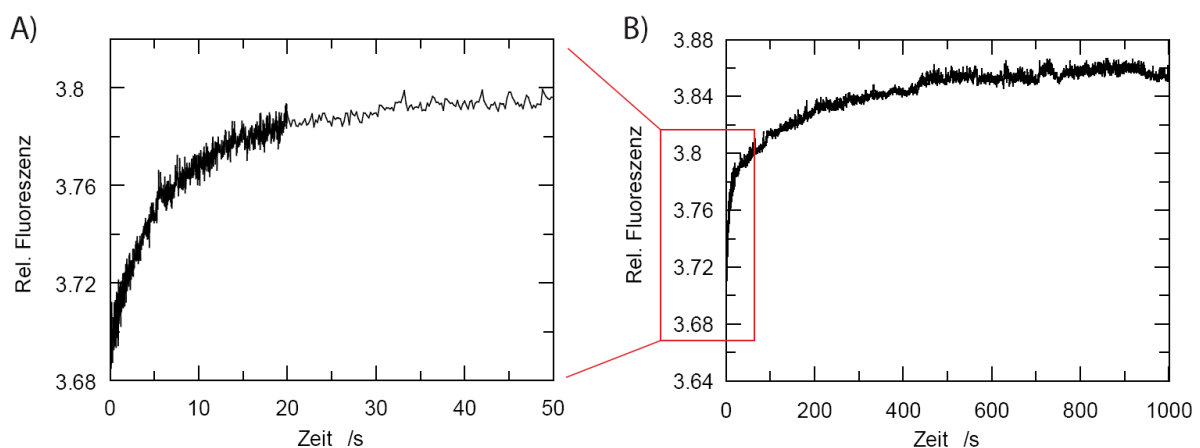


Abb. 4.17 Stopped-Flow Messung der Nukleotidbindung mittels FRET. Der Reaktionsverlauf zwischen mGppNHp und Sept7(V102D) wird durch die Messung des FRET-Signals bei einer Anregung von 290 nm und einer Emission >408 nm verfolgt. A) Fluoreszenzverlauf während der ersten 50 s. B) Gesamtverlauf der Reaktion.

Der in Abb. 4.17 dargestellte zeitliche Verlauf des FRET-Signals zeigt eine zweistufige Reaktion ähnlich der Fluoreszenzmessung in Abb. 4.16. Die beiden Schritte der Reaktion basieren somit auf der direkten Wechselwirkung zwischen Protein und Nukleotid.

Um die beobachteten Reaktionsschritte zuordnen zu können wurde zunächst eine Versuchsreihe durchgeführt, in der die Konzentration von Sept7(V102D) bei gleichbleibender Nukleotidkonzentration variiert wurde.

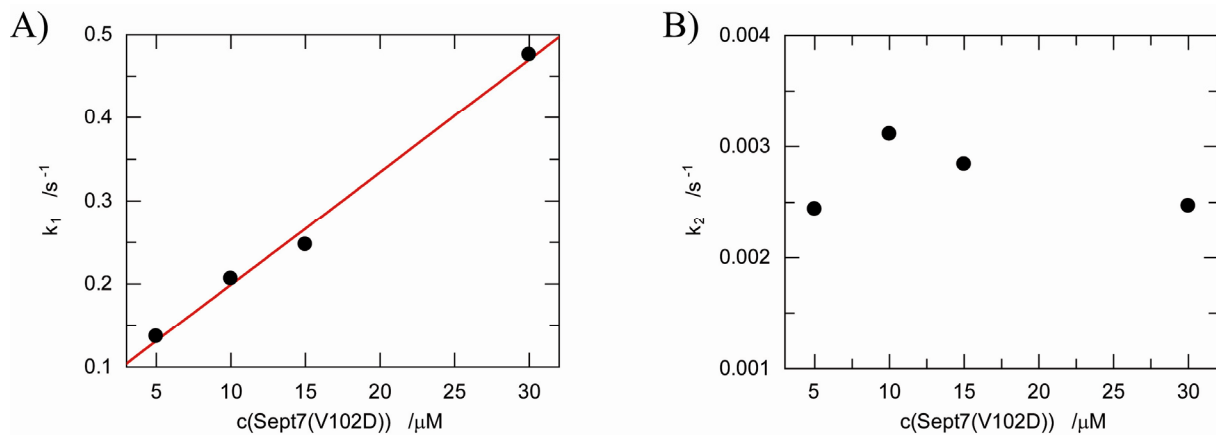


Abb. 4.18 Einfluss der Proteinkonzentration. *Stopped-flow* Messungen der Bindung zwischen mGppNHp und Sept7(29 - 297, V102D). A) Die Erhöhung der Proteinkonzentration führt zur linearen Steigung der beobachteten Geschwindigkeitskonstante im ersten Reaktionsschritt. B) Die Geschwindigkeit des zweiten Reaktionsschrittes bleibt dagegen nahezu konstant.

Die Auswertung der Experimente erfolgte durch das Anpassen einer einfach-exponentiellen Funktion an den Fluoreszenzverlauf während des ersten Reaktionsschrittes, d.h. innerhalb der ersten 20 s. Die Auftragung der beobachteten Geschwindigkeitskonstanten gegen die Proteinkonzentration zeigt eine lineare Abhängigkeit (Abb. 4.18). Dieses Ergebnis weist darauf hin, dass es sich beim ersten Schritt der Reaktion um die Bindung des Nukleotids an Sept7 handelt. Die Anpassung einer Ausgleichsgeraden an die beobachteten Geschwindigkeitskonstanten lieferte die Werte für die Assoziationsrate $k_{\text{ass}} = 0,0135 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ und die Dissoziationsrate $k_{\text{diss}} = 0,0635 \text{s}^{-1}$. Daraus wurde ein K_D -Wert von $4,7 \mu\text{M}$ für die Bindungsaffinität zwischen mGppNHp und Sept7 bestimmt.

Die Geschwindigkeitskonstanten, die durch die Anpassung einer einfach-exponentiellen Funktion an den Fluoreszenzverlauf des zweiten Reaktionsschrittes, d.h. innerhalb einer Zeitspanne von 20-1000 s, bestimmt wurden, bleiben hingegen in allen Messungen nahezu konstant.

Beim zweiten Schritt der Reaktion kann es sich entweder um eine Konformationsänderung oder um die Dimerisierung von Sept7 handeln. Zum Nachweis einer dieser beiden möglichen Prozesse wurde eine weitere Versuchsreihe durchgeführt. Diesmal wurde bei gleichbleibender Proteinkonzentration die Nukleotidkonzentration variiert.

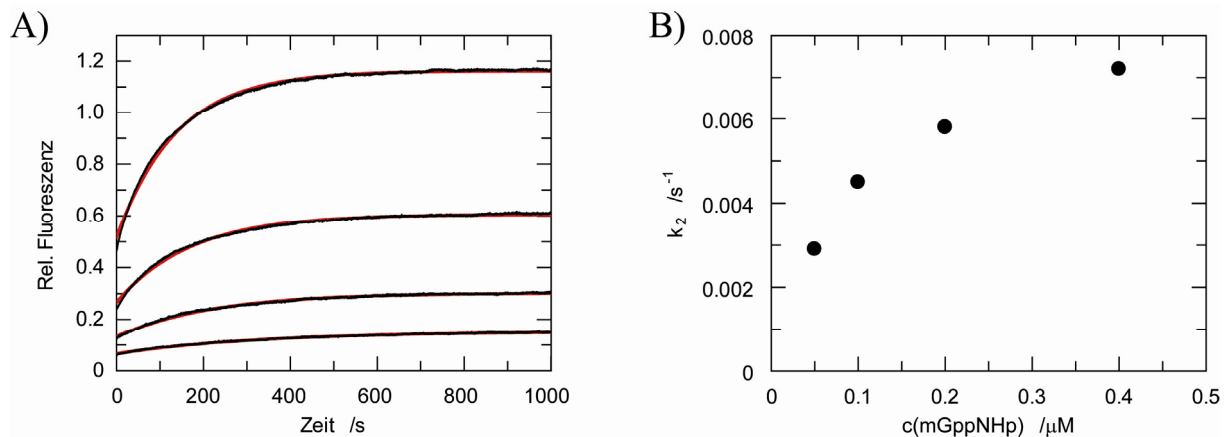


Abb. 4.19 Einfluss der Nukleotidkonzentration. *Stopped-flow* Messungen der Bindung zwischen mGppNHp und Sept7(29 - 297, V102D). A) Die Erhöhung der Konzentration des fluoreszierenden mGppNHp resultiert in höheren Fluoreszenzamplituden B) Die Erhöhung der Nukleotidkonzentration führt zur nicht linearen Steigung der beobachteten Geschwindigkeitskonstante im zweiten Reaktionsschritt (rechts). Die Geschwindigkeit des ersten Reaktionsschrittes bleibt dagegen nahezu konstant.

Zunächst wurde die Möglichkeit einer Konformationsänderung überprüft. Hierfür wurden die Reaktionsverläufe im zweiten Reaktionsschritt, d.h. innerhalb einer Zeitspanne von 50 - 1000 s, mit einer einfach-exponentiellen Funktion gefittet. Die daraus berechneten Geschwindigkeitskonstanten des zweiten Reaktionsschrittes werden mit steigender Nukleotidkonzentration größer, wobei die Abhängigkeit nicht linear ist (Abb. 4.19). Dieses Ergebnis spricht gegen eine Konformationsänderung, deren Geschwindigkeitskonstante konzentrationsunabhängig sein sollte. Die Geschwindigkeit der Dimerisierung über das G-Interface sollte hingegen von der Konzentration der mit Nukleotid beladenen Septinmonomere abhängen und daher mit steigender Nukleotidkonzentration ebenfalls steigen. Die Ergebnisse in Abb. 4.19 deuten also darauf hin, dass es sich beim zweiten Reaktionsschritt um eine Dimerisierung der mit Nukleotid beladenen Sept7(V102D)-Monomere handelt.

Mit der *Stopped-flow* Methode wurden auch die Interaktionen zwischen mGppNHp und der Sept7(D103A)-Mutante sowie der Sept7(E184A)-Mutante analysiert. Die Messung mit Sept7(D103A) ähnelt den oben dargestellten Messungen mit Sept7(V102D). Die Variation der Proteinkonzentration lieferte auch vergleichbare Werte für die Assoziationsrate $k_{\text{ass}} = 0,0164 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ und die Dissoziationsrate $k_{\text{diss}} = 0,0712 \text{s}^{-1}$. Daraus wurde ein K_D -Wert von $4,3 \mu\text{M}$ für die Bindungsaffinität zwischen mGppNHp und Sept7(D103A) bestimmt.

Im Vergleich dazu zeigt der in Abb. 4.20 dargestellte Fluoreszenzverlauf der Bindung zwischen Sept7(E184A) und mGppNHp eine einstufige Reaktion mit einer schnellen Nukleotidbindung ohne anschließende Dimerisierung. Diese Beobachtung zeigt, dass die E184A-Mutation einen stärkeren Effekt auf die Dimerisierung des Sept7 über das G-Interface hat als die Mutationen V102D und D103A.

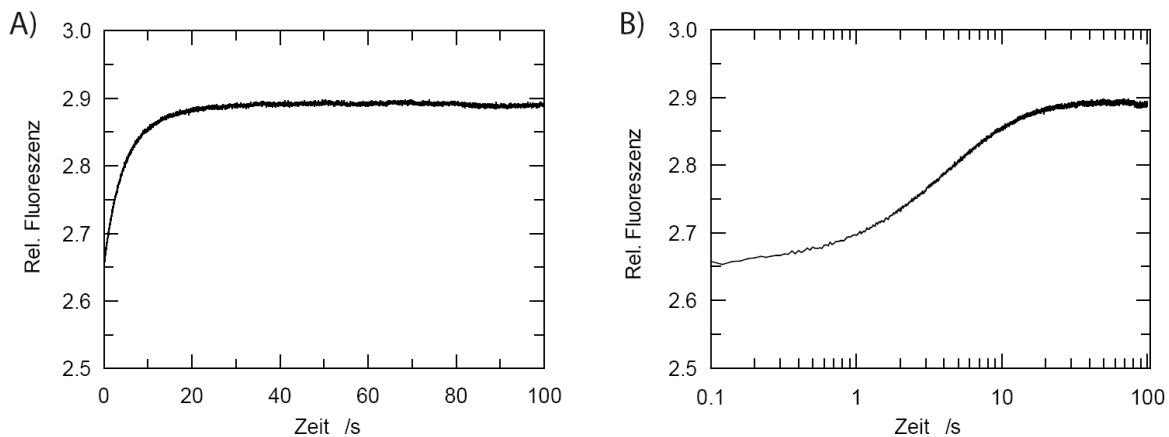


Abb. 4.20 Stopped-flow Messung der Bindung zwischen mGppNHp und Sept7(E184A). A) Der Reaktionsverlauf wird durch die Messung der Fluoreszenz bei einer Anregung von 366 nm und einer Emission >408 nm verfolgt. Erkennbar ist eine schnelle Bindung des Nukleotids ohne anschließende Dimerisierung. B) Auch die logarithmische Darstellung der Zeitachse zeigt eine einstufige Reaktion.

Auch hier wurde bei gleichbleibender Nukleotidkonzentration die Proteinkonzentration variiert. Daraus wurden die Assoziations- und Dissoziationsgeschwindigkeitskonstanten für die Nukleotidbindung $k_{\text{ass}} = 0,019 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ bzw. $k_{\text{diss}} = 0,109 \text{s}^{-1}$ und ein K_D -Wert von $5,74 \mu\text{M}$ berechnet. Diese Werte stimmen mit den Ergebnissen von Sept7(V102D) gut überein.

4.2.8 Bestimmung der Nukleotidaffinitäten mit Hilfe der Gleichgewichtstitration

Hierbei wurden die Bindungsaffinitäten zum Nukleotid direkt mittels einer Gleichgewichtstitration von nukleotidfreien Sept7-Mutanten zu mit mant-Fluorophor markierten Nukleotidanaloga bestimmt. Die starke Destabilisierung des G-Interface durch die E184A-Mutation eliminierte die Effekte der Dimerisierung und ermöglichte somit die direkte Bestimmung der Affinität zwischen Sept7 und den Nukleotiden. Daher werden zuerst die Ergebnisse der Messung mit der Sept7(E184A)-Mutante präsentiert.

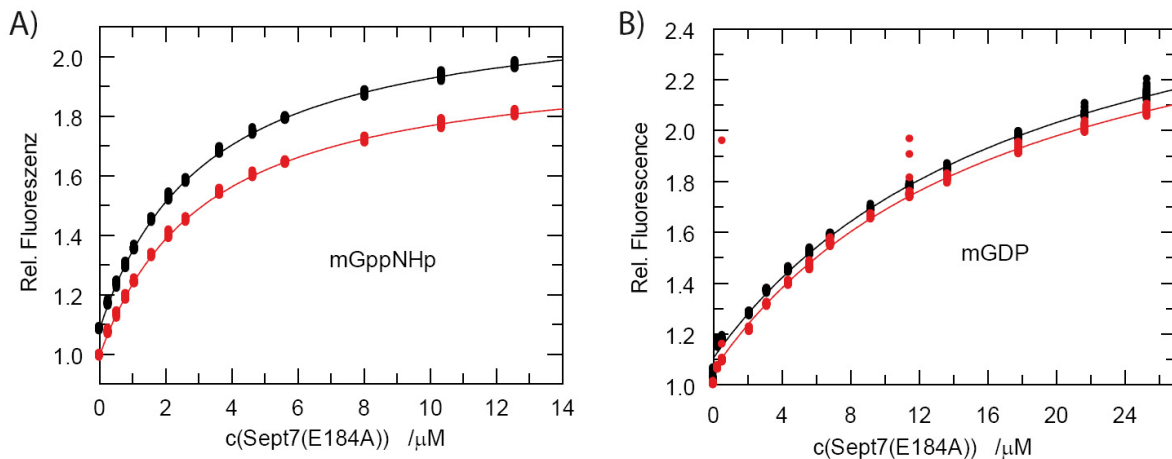


Abb. 4.21 Gleichgewichtstitration von mGppNHp bzw. mGDP mit Sept7(E184A). Der Verlauf der Titration wurde durch die Messung der Fluoreszenz bei einer Anregung von 366 nm und einer Emission von 450 nm verfolgt. A) mGppNHp-Titration. B) mGDP-Titration. Die Auswertung lieferte folgende K_D -Werte: $K_D(\text{mGppNHp}) = 3,16 \mu\text{M}$ und $K_D(\text{mGDP}) = 17,7 \mu\text{M}$.

Die Messung der Bindungsaffinität wurde für jedes Nukleotid in zwei parallelen Experimenten durchgeführt (Abb. 4.21). Wie anhand der *Stopped-flow* Messungen (Abb. 4.20) erwartet wurde, konnten keine Hinweise auf eine Dimerisierung beobachtet werden. Im Vergleich zur Sept7(D103A)-Mutante (siehe unten), stellte sich das Gleichgewicht daher während jedes einzelnen Titrationsschrittes schnell ein. Die Auswertung der Messdaten lieferte K_D -Werte von $K_D(\text{mGDP}) = 17,7 \mu\text{M}$ und $K_D(\text{mGppNHp}) = 3,16 \mu\text{M}$.

Im Falle der Sept7(D103A)-Mutante wurde während der *Stopped-flow* Messungen neben der Nukleotidbindung zusätzlich noch eine Dimerisierung beobachtet. Wegen der langsamen Kinetik bei der Einstellung des Gleichgewichtes aufgrund der Dimerisierung wurden die Messungen der verschiedenen Konzentrationen getrennt voneinander in vier einzelnen Küvetten durchgeführt. Die Einstellung des Gleichgewichtes dauerte bei den niedrigeren Konzentrationen bis zu 2,5 Stunden. Bei den höheren Konzentrationen stellte sich das Gleichgewicht hingegen schneller ein.

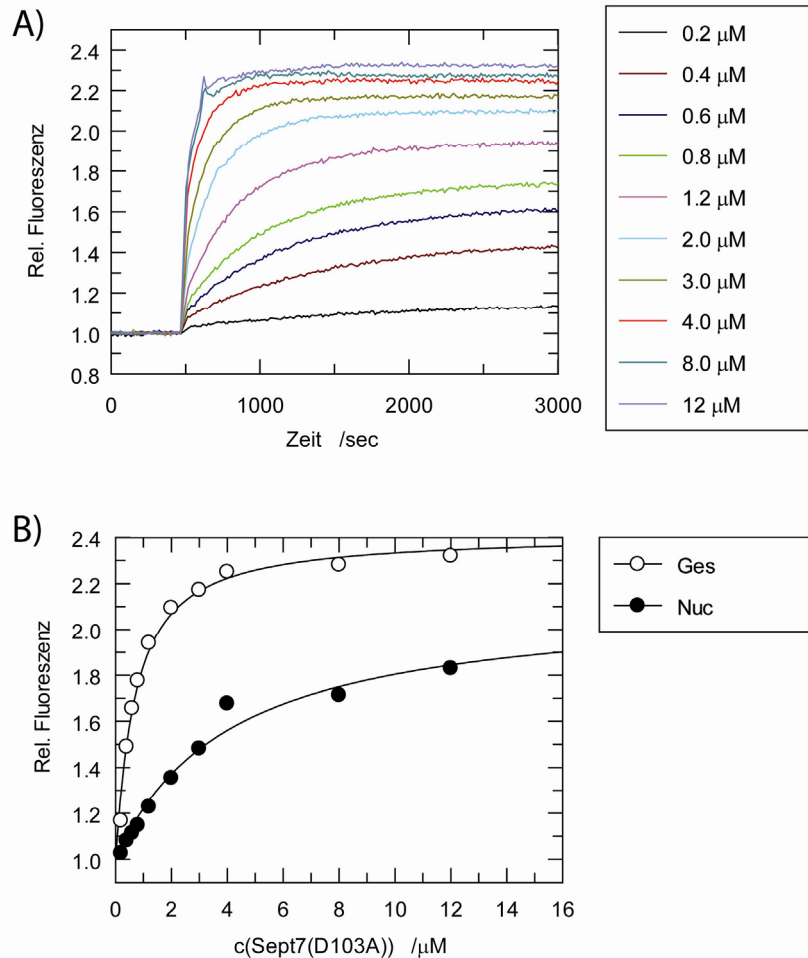


Abb. 4.22 Gleichgewichtstitration von mGppNHp mit Sept7(D103A). A) Der Verlauf der Titration von mGppNHp mit Sept7(D103A) wurde durch die Messung der Fluoreszenz bei einer Anregung von 366 nm und einer Emission von 450 nm verfolgt. Die Einstellung des Gleichgewichtes dauerte bei niedrigeren Proteinkonzentrationen bis zu 2,5 Stunden (9000 s). B) Die Auswertung der Messwerte lieferte folgende K_D -Werte: $K_D(\text{Nuc}) = 3,92 \mu\text{M}$ und nach der Dimerisierung $K_D(\text{Ges}) = 0,60 \mu\text{M}$

Für die Auswertung wurden neben den Fluoreszenzwerten nach Einstellung des Gleichgewichtes auch die ersten Messwerte direkt nach Zugabe des Proteins verwendet (Abb. 4.22). Die Zugabe des Proteins und das anschließende Durchmischen der Probe dauerten zusammen ca. 20 s. Diese Zeit sollte laut *Stopped-flow* Messungen (Abb. 4.16) für die Einstellung des Gleichgewichtes zwischen dem Nukleotid und dem Protein ausreichen. Daher repräsentieren die ersten Messwerte die Situation nach dem ersten Reaktionsschritt, während dem die Nukleotidbindung stattfindet. Die Endwerte hingegen veranschaulichen das Gesamtgleichgewicht, welches sich aus zwei Reaktionsschritten, der Nukleotidbindung und der Dimerisierung, zusammensetzt.

Die Auswertung der Messdaten lieferte bei mGppNHp für die Gesamtreaktion einen K_D -Wert von $K_D(\text{mGppNHp}) = 0,60 \mu\text{M}$, für das monomere Protein hingegen einen

K_D -Wert von $K_D(\text{mGppNHp}) = 3,92 \mu\text{M}$. Die ermittelten K_D -Werte zeigen den Effekt der Dimerisierung auf die Bindung des Nukleotids. Die nach der Nukleotidbindung folgende Dimerisierung der Proteine über das G-Interface verschiebt das Gleichgewicht auf die Seite des Nukleotid-Protein-Komplexes und verstärkt dadurch die apparente Affinität zwischen Sept7 und den Nukleotiden.

Nach der gleichen Methode wurde auch die Gleichgewichtstitration von mGDP mit Sept7(D103A) durchgeführt.

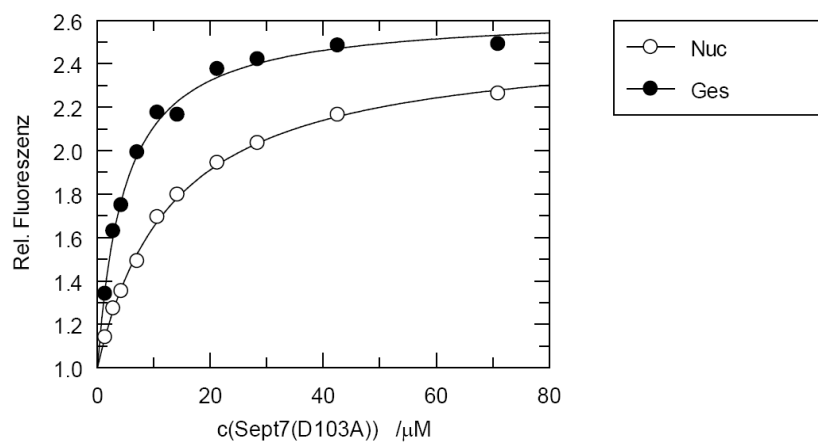


Abb. 4.23 Gleichgewichtstitration von mGDP mit Sept7(D103A). Der Verlauf der Titration von mGDP mit Sept7(D103A) wurde durch die Messung der Fluoreszenz bei einer Anregung von 366 nm und einer Emission von 450 nm verfolgt. Die Auswertung der Messwerte lieferte K_D -Werte von $K_D(\text{Nuc}) = 13,2 \mu\text{M}$ und nach Dimerisierung $K_D(\text{Ges}) = 4,63 \mu\text{M}$.

Auch hier wurde ein Effekt der Dimerisierung auf die Bindung des Nukleotids beobachtet (Abb. 4.23). Für das mGDP ist der K_D -Wert der Gesamtreaktion mit $K_D(\text{mGDP}) = 4,63 \mu\text{M}$ kleiner als die direkte Affinität zwischen Sept7 und dem Nukleotid mit einem K_D -Wert von $K_D(\text{mGDP}) = 13,2 \mu\text{M}$.

Die Dissoziationsraten wurden mit Hilfe der *Stopped-flow* Methode nur indirekt ermittelt und sind daher ungenau (Abb. 4.18). Deshalb wurde eine direkte Messung der Nukleotiddissoziation durchgeführt. Hierfür wurden zuerst in einem Reaktionsgefäß 50 μL einer 60 μM Sept7(D103A)-Lösung ohne Nukleotid mit 50 μL einer 50 μM mGDP- bzw. mGppNHp-Lösung versetzt und 30 min inkubiert. Für die Messung wurde 100 μM nicht markiertes Nukleotid GDP bzw. GppNHp in Küvetten vorgelegt und anschließend die vorbereitete Lösung des Proteins mit mant-Nukleotid

bis zu einer Endkonzentration von $0,1 \mu\text{M}$ zugegeben und schnell vermischt. Die Messung der Fluoreszenzänderung wurde direkt nach der Zugabe gestartet.

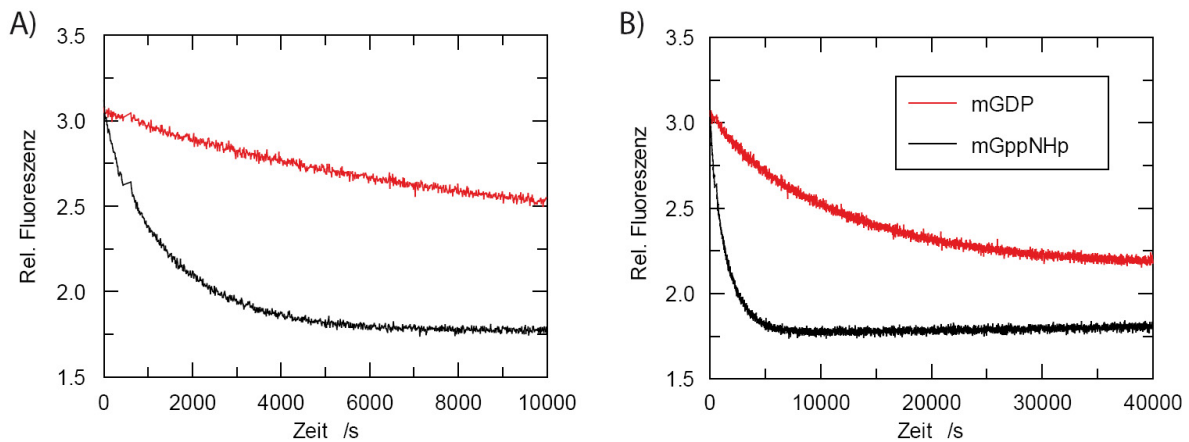


Abb. 4.24 Direkte Messung der Nukleotid-Dissoziation. Messverlauf der Fluoreszenz bei einer Anregung von 366 nm und einer Emission von 450 nm. A) Vergrößerung der ersten 10000 s. B) Gesamter Messverlauf.

Ein Überschuss an nicht fluoreszierendem Nukleotid macht die Dissoziation praktisch irreversibel, so dass sie als eine Reaktion erster Ordnung betrachtet werden kann. Durch die Anpassung einer einfach-exponentiellen Funktion an die Messdaten in Abb. 4.24 wurde für mGDP eine Dissoziationsrate von $k_{\text{obs}} = 9 \cdot 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ und für mGppNHp eine Dissoziationsrate von $k_{\text{obs}} = 7,4 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ ermittelt. Diese Werte sind etwa 100 - 1000-fach geringer als die mittels *Stopped-flow* Experimenten bestimmten Dissoziationsrate von $k_{\text{off}}(\text{mGppNHp}) = 0,063 \text{ s}^{-1}$ (Abb. 4.18). Außerdem ist die Dissoziation von mGDP langsamer als die von mGppNHp, obwohl die Affinität des Sept7 zu mGDP kleiner ist als zu mGppNHp. Die ermittelten Geschwindigkeitskonstanten spiegeln dabei wahrscheinlich nicht die Dissoziation des Nukleotids wider, sondern die Dimerdissoziation und deuten somit auf die unterschiedliche Dynamik des G-Interface hin, welche abhängig vom gebundenen Nukleotid ist.

4.2.9 Die intrinsische GTP-Hydrolyse

Die Fähigkeit ein Nukleotid zu binden und zu hydrolysieren ist eine wichtige Eigenschaft für die Funktion von GNBP. Daher wurde im nächsten Schritt die intrinsische GTP-Hydrolyse von Sept7 untersucht. Zuerst wurde die GTP-Hydrolyseraten des Wildtyp-Konstruktes und der verschiedenen G-Interface-Mutanten in parallelen Experimenten unter Sättigungsbedingungen, d.h. mit hoher Substratkonzentration, gemessen (*multi-turnover*). Der Verbrauch des GTP und die

Bildung von GDP wurden dabei mittels HPLC verfolgt. Die Ergebnisse dieser Experimente sind in Abb. 4.25 dargestellt.

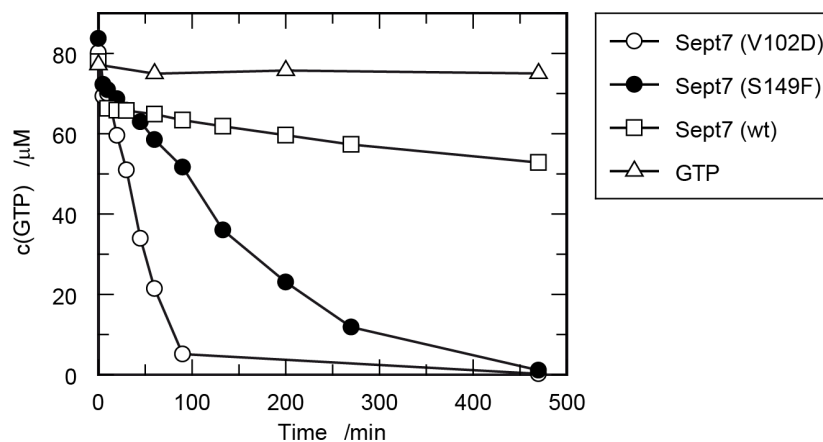


Abb. 4.25 GTP-Hydrolyse der verschiedenen Sept7-Konstrukte. A) GTP-Konzentration und B) GDP-Konzentration im Verlauf der Hydrolyse durch verschiedene Mutanten von Sept7(29 - 297). Alle Messungen wurden parallel durchgeführt. Dabei wurden bei Raumtemperatur 100 μM GTP mit 50 μM Protein inkubiert. Nach definierten Zeitabständen wurden 40 μL Proben entnommen und mittels Umkehrphasen-HPLC analysiert. Im Kontrollexperiment, wo GTP ohne Proteine inkubiert wurde, wurde keine GTP-Hydrolyse beobachtet. $k_{\text{cat}}(\text{Sept7}_{\text{V102D}}) = 2,14 \cdot 10^{-2} \text{ min}^{-1}$, $k_{\text{cat}}(\text{Sept7}_{\text{S149F}}) = 5,65 \cdot 10^{-3} \text{ min}^{-1}$ und $k_{\text{cat}}(\text{Sept7}_{\text{WT}}) = 7,29 \cdot 10^{-4} \text{ min}^{-1}$.

Beim Wildtyp-Konstrukt wurde eine sehr langsame GTP-Hydrolyse beobachtet, mit $k_{\text{cat}}(\text{Sept7}_{\text{WT}}) = 7,29 \cdot 10^{-4} \text{ min}^{-1}$. Die G-Interface-Mutanten zeigten hingegen eine höhere Hydrolyserate, wobei beim monomeren Konstrukt Sept7(V102D) die GTP-Hydrolyse am schnellsten verläuft. Die kalkulierte Hydrolyserate von Sept7(V102D) mit $k_{\text{cat}}(\text{Sept7}_{\text{V102D}}) = 0,0214 \text{ min}^{-1}$ oder $k = 3,3 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ ist dabei der intrinsischen Hydrolyserate von Ras $k_{\text{cat}}(\text{Ras}) = 0,02 \text{ min}^{-1}$ sehr ähnlich (Neal *et. al.* 1988).

In einem *multi-turnover* Experiment wird eine komplexe Reaktion bestehend aus Bindung, Hydrolyse und Freisetzung des Nukleotids analysiert, wobei jeder dieser Schritte geschwindigkeitsbestimmend sein kann. Aus diesem Grund wurde anschließend eine *single-turnover* Messung der GTP-Hydrolyse durchgeführt. Hierfür wurde in einer *Stopped-flow* Apparatur der Verlauf der Reaktion von 0,2 μM mGTP mit 10 μM nukleotidfreiem Sept7(D103A) verfolgt.

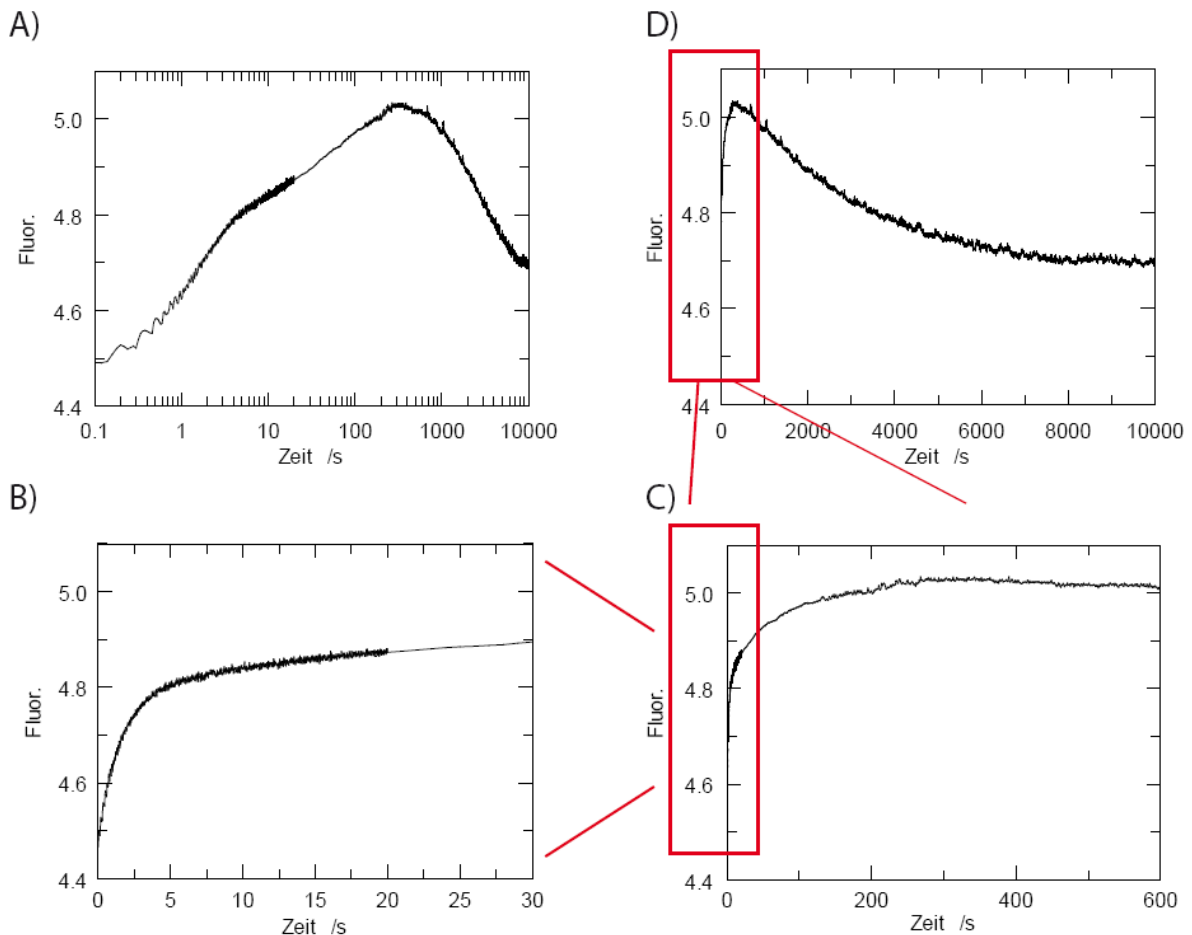


Abb. 4.26 Stopped-Flow Messung der intrinsischen GTP-Hydrolyse von Sept7(D103A).

Dargestellt ist der Reaktionsverlauf zwischen mGTP und Sept7(D103A). Der Reaktionsverlauf wird dabei durch die Messung der Fluoreszenz bei einer Anregung von 366 nm und einer Emission >408 nm verfolgt. A) Die logarithmische Darstellung der Zeitachse verdeutlicht die drei Schritte der Reaktion. B) Nukleotidbindung, 0-10 s. C) Dimerisierung der mit mGTP beladenen Proteine, 10-300 s. D) Hydrolyse von mGTP und partielle Freisetzung von mGDP, 300-10000 s.

Der in Abb. 4.26 dargestellte Messverlauf zeigt eine dreistufige Reaktion. Die ersten beiden Reaktionsschritte repräsentieren Nukleotidbindung und Proteindimerisierung, ähnlich wie bei der Messung mit dem nicht hydrolysierbaren mGppNHp (Abb. 4.16). Der Fluoreszenzabfall während des letzten Reaktionsschrittes, d.h. innerhalb einer Zeitspanne von 600 s - 10000 s, resultiert aus der Freisetzung des Nukleotids nach der Hydrolyse. Dabei kann zwischen der Hydrolyse und der Dissoziation von mGDP nicht unterschieden werden. Beide Reaktionen können als geschwindigkeitsbestimmender Schritt angesehen werden. Die Anpassung einer einfach-exponentiellen Funktion an den Fluoreszenzverlauf des dritten Reaktionsschrittes, d.h. innerhalb einer Zeitspanne von 600 s - 10000 s, lieferte eine Geschwindigkeitskonstante von $k_{\text{obs}} = 3,54 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$. Dieser Wert stimmt mit der Hydrolyserate $k_{\text{cat}} = 3,33 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ des Sept7(V102D) sehr gut überein.

Mit Hilfe der *Stopped-flow* Methode wurde auch die intrinsische GTP-Hydrolyse bei der Sept7(E184A)-Mutante untersucht.

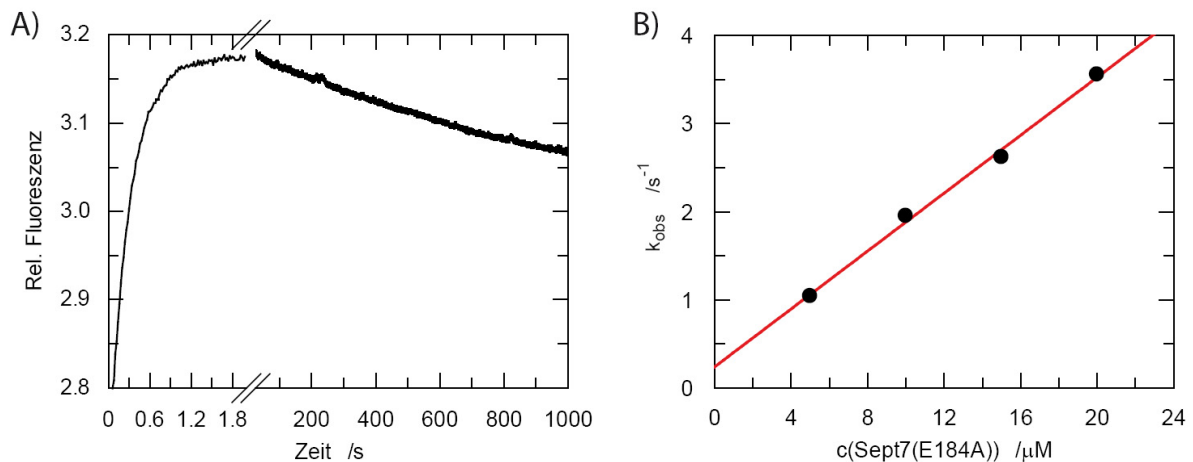


Abb. 4.27 Stopped-Flow Messung von mGTP mit Sept7(E184A). A) Reaktionsverlauf zwischen mGTP und Sept7(E184A). Der Reaktionsverlauf wird durch die Messung der Fluoreszenz bei einer Anregung von 366 nm und einer Emission >408 nm verfolgt. Die Spaltung der Zeitachse verdeutlicht die beiden Schritte der Reaktion. (1) Nukleotidbindung, 0-2 s. (2) Hydrolyse von mGTP und partielle Freisetzung von mGDP, 2-1000 s. B) Abhängigkeit der gemessenen Geschwindigkeitskonstante von der Konzentration des Sept7(E184A), $k_{\text{on}} = 0,164 \mu\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ und $k_{\text{off}} = 0,240 \text{s}^{-1}$.

Der Fluoreszenzverlauf in Abb. 4.27 zeigt eine zweistufige Reaktion mit Bindung und anschließender Hydrolyse des Nukleotids. Wie bei der Messung mit mGppNHp (Abb. 4.20) wurde auch hier keine Dimerisierung beobachtet. Die Anpassung einer einfach-exponentiellen Funktion an die Messdaten während der Hydrolyse, d.h. innerhalb einer Zeitspanne von 200-1000 s, lieferte eine Geschwindigkeitskonstante von $k_{\text{obs}} = 7,88 \cdot 10^{-4} \text{s}^{-1}$. Da während der Messung keine Dimerisierung beobachtet werden konnte, entspricht die Geschwindigkeitskonstante der Rate der intrinsischen Hydrolyse. Der Wert liegt in dergleichen Größenordnung wie derjenige der Sept7(D103A)-Mutante und verdeutlicht, dass die Dimerisierung der G-Domäne keine signifikante Auswirkung auf die GTP-Hydrolyse hat.

Die Hydrolyse von mGTP ist recht langsam. Daher war es möglich, die Bindungsaffinität zwischen Sept7(E184A) und mGTP mit Hilfe der *Stopped-flow* Methode direkt zu bestimmen, indem die Konzentration des Proteins variiert wurde (Abb. 4.27). Die Auswertung der gemessenen Geschwindigkeitskonstanten lieferte eine Assoziationsrate von $k_{\text{ass}} = 0,164 \mu\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ und eine Dissoziationsrate von $k_{\text{diss}} = 0,240 \text{s}^{-1}$, sowie einen K_{D} -Wert von $1,46 \mu\text{M}$. Sowohl die Bindung als auch die Dissoziation ist beim mGTP schneller als beim mGppNHp, was auf geringe Unterschiede zwischen mGTP und seinem nicht hydrolysierbaren Analogon mGppNHp hindeutet.

Das konservierte Threonin im *switch* I Bereich ist die einzige Aminosäure, für die gezeigt wurde, dass sie bei Sept2 direkt an der GTP-Hydrolyse beteiligt ist (Sirajuddin *et al.*, 2009). Die Seitenkette des Threonins ist dabei in die Koordinierung des Mg^{2+} -Ions involviert, welches für die Nukleotidhydrolyse bei GNBPs essentiell ist. Als Nächstes wurde daher untersucht, ob das entsprechende Threonin auch bei Sept7 für die GTP-Hydrolyse von Bedeutung ist.

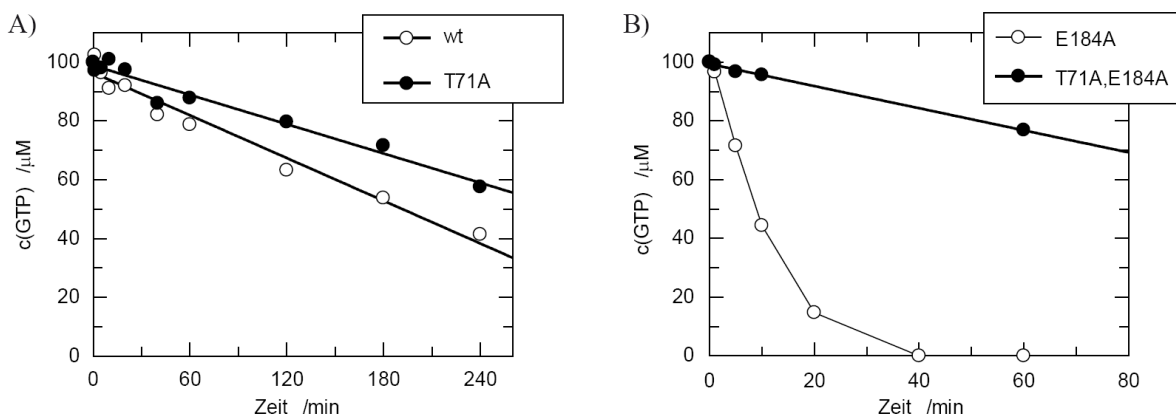


Abb. 4.28 Funktion des Thr-71 bei der GTP-Hydrolyse in Sept7-Konstrukten. GTP-Konzentration im Verlauf der Hydrolyse durch verschiedene Mutanten von Sept7(29 - 297). Alle Messungen wurden parallel durchgeführt. Dabei wurden bei Raumtemperatur 100 μ M GTP mit 50 μ M Protein inkubiert. Nach definierten Zeitabständen wurden 40 μ L Proben entnommen und mittels Umkehrphasen-HPLC analysiert. A) Vergleich des Wildtyp-Konstrukts mit der Sept7(T71A)-Mutante. B) Vergleich des Sept7(E184)-Konstrukts mit der Sept7(T71A, E184A)-Mutante. k_{cat} (Sept7(T71A)) = $1,66 \cdot 10^{-3} \text{ min}^{-1}$ und k_{cat} (Sept7(T71A,E184A)) = $3,76 \cdot 10^{-3} \text{ min}^{-1}$.

Im Vergleich zum Wildtyp-Konstrukt scheint die T71A-Mutation keinen starken Einfluss auf die intrinsische GTP-Hydrolyse zu haben. Oben wurde aber gezeigt, dass aufgrund der Dimerisierung die gemessenen Geschwindigkeitskonstanten unter Sättigungsbedingungen (*multi-turnover*) nicht durch die Hydrolyse, sondern durch die Nukleotidfreisetzung bestimmt werden. Um Dimerisierungseffekte auszuschließen wurde zusätzlich der Effekt der T71A-Mutation beim monomeren Sept7(E184A)-Konstrukt untersucht. Die Ergebnisse der Messung (Abb. 4.28) zeigen, dass die Einführung der T71A-Mutation in das monomere Sept7(E184A)-Konstrukt zu einer starken Verlangsamung der GTP-Hydrolyse führt.

4.3 Funktion der GTPase-Reaktion für die Septine

Die Analyse der *switch* II Mutanten von Sept7 mittels analytischer Gelfiltration zeigte einen signifikanten Beitrag der *switch* II Schleife zur Stabilität des G-Interface. Die

üblicherweise nukleotid-abhängige Konformationsänderung der *switch* Bereiche in anderen GNBPs lässt vermuten, dass bei Septinen die Stabilität des G-Interface vom Nukleotidzustand abhängig ist.

4.3.1 Charakterisierung der Sept7-Dimere über Oberflächenplasmonresonanz

Um Aussagen über den Einfluss des Nukleotidzustandes auf die Stabilität des G-Interface treffen zu können, sind Kenntnisse der thermodynamischen Affinitäten der Septin-Septin-Interaktionen in beiden Nukleotidzuständen erforderlich. Die direkte Bestimmung der Dimerisierungsaffinität der Septine war nicht möglich. Dies lag daran, dass die Proteine nach der Fluoreszenzmarkierung nicht mehr stabil waren und präzipitierten. Der Einsatz der fluoreszierenden Nukleotidanaloga, die sich sehr gut bei Studien über die Ras-ähnlichen GNBPs bewährt haben, war wegen der geringen Nukleotidaffinitäten nicht möglich.

Rückschlüsse über die thermodynamische Affinität der Protein-Protein-Wechselwirkungen lassen sich auch aus kinetischen Daten gewinnen. Bei Wechselwirkungen zwischen Proteinen ist in den meisten Fällen die Dissoziationsrate der entscheidende Faktor.

Die Bestimmung der kinetischen Daten für die Septindimerisierung erfolgte mit Hilfe der Oberflächenplasmonresonanz-Methode (engl. SPR - *surface plasmon resonance*). Für die Immobilisierung der Septine auf der Oberfläche des Sensor-Chips wurde das Biotin CAPture Kit der Firma GE-Healthcare ausgewählt. Im Vergleich zu anderen Methoden kombiniert das Biotin CAPture Kit eine schnelle und einfache Immobilisierung eines mit Biotin markierten Moleküls mit der Möglichkeit einer schnellen Regeneration der Oberfläche des Sensor-Chips.

Die Markierung der Proteine mit Biotin erfolgte in einer Reaktion, welche durch eine Transglutaminase katalysiert wurde (Lin *et al.*, 2006). Transglutaminasen katalysieren Transferreaktionen, bei denen eine Acyl-Gruppe einer Glutaminseitenkette auf primäre Amine übertragen wird. Die hier eingesetzte Transglutaminase (gpTGase aus dem Meerschweinchen, Sigmaaldrich) besitzt eine hohe Substratspezifität zu einem Heptapeptid mit der Sequenz PNPQQFM, das als Q-Tag bezeichnet wird. Gleichzeitig weist sie aber auch eine breite Toleranz für die Struktur des primären Amins auf. Der Einsatz eines Überschusses an N-(5-Aminopentyl)-Biotinamid führt zur selektiven Markierung des Proteins mit einem Biotinmolekül und

soll gleichzeitig Nebenreaktionen mit anderen Aminen, wie z.B. mit ϵ -Aminogruppen der Lysinreste, unterdrücken (Abb. 4.29).

Der Q-Tag wurde an den c-Terminus der in pGEX6P1 klonierten Sept7-Konstrukte kloniert. Der Q-Tag hatte keinerlei Auswirkungen auf die Stabilität der Konstrukte, demnach konnten die Proteine analog zu Sept7(29 - 297) mit ähnlich guten Ausbeuten rekombinant hergestellt und gereinigt werden.

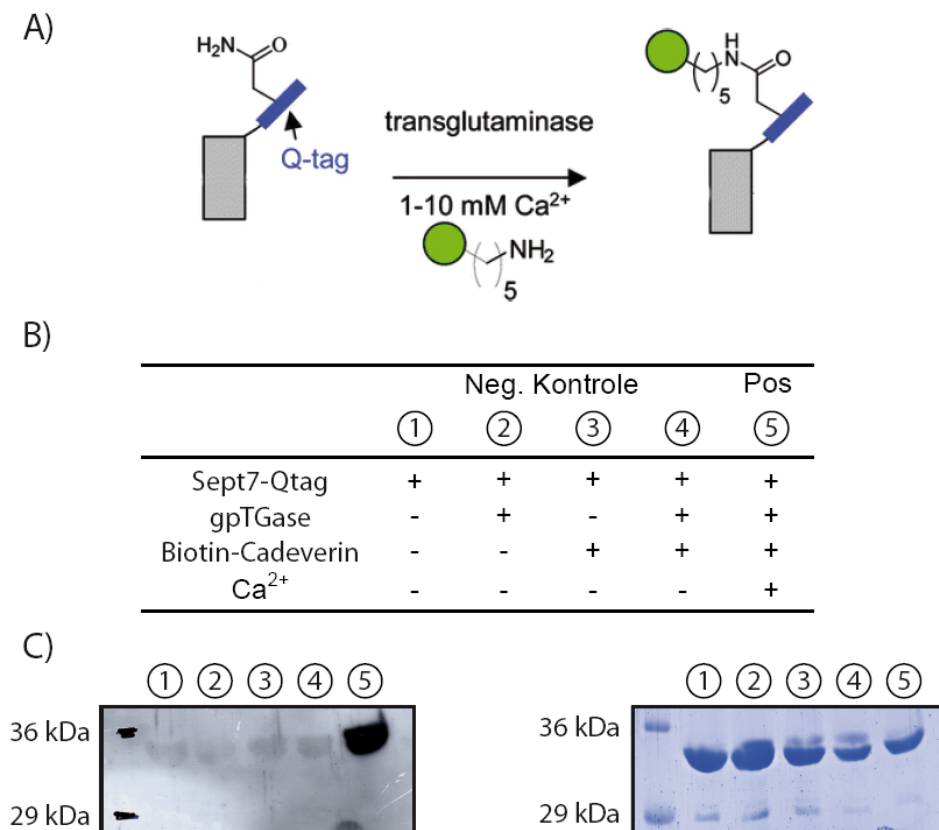


Abb. 4.29 Biotinmarkierung in einer gpTGase katalysierten Reaktion. A) Schematische Darstellung der durch die Transglutaminase katalysierten Reaktion. B) Die Tabelle zeigt die Zusammensetzung der verschiedenen Ansätze bei der Testreaktion. C) Western Blot mit Anti-Biotin-Antikörpern (links) und das entsprechende mit Coomassie-Blau gefärbte Gel (rechts).

In einer Testreaktion wurde zuerst die selektive Markierung des gereinigten Proteins Sept7(29-297)-Qtag mit Biotin durch die gpTGase überprüft. Das in Abb. 4.29 dargestellte Western-Blot zeigt eine positive Bande nur bei der Reaktion, die alle erforderlichen Komponenten enthält. Anschließend wurden Sept7(D103A)-Qtag und Sept7(E184A)-Qtag nach demselben Protokoll mit Biotin markiert. Der Erfolg der Markierung wurde ebenfalls mittels eines Western-Blots bestätigt.

Die ersten SPR-Messungen wurden mit der Sept7(E184A)-Mutante durchgeführt. Bei jedem Experiment wurde zuerst die Chipoberfläche mit dem im Kit mitgelieferten

frischen Streptavidin über einen Einzelstrang-DNA-Linker beladen. Der Vergleich des Signalverlaufs mehrerer Messungen zeigte, dass der Signalanstieg und somit auch die Menge des an die Chipoberfläche gebundenen Streptavidins über mehrere Experimente konstant geblieben war.

Die Messungen begannen mit der Injektion einer konstanten Menge des mit Biotin markierten Proteins auf den Sensor-Chip, der anschließend mit Laufpuffer gewaschen wurde (Schritt 1 und 2 in Abb. 4.30). Dann wurde das Protein ohne Biotinmarker zugegeben (Schritt 3). Anschließend wurde die Dissoziation des nicht markierten Proteins beim Waschen der Chipoberfläche mit dem Laufpuffer verfolgt (Schritt 4). Die Messungen wurden anschließend mehrmals wiederholt, wobei bei Schritt 3 die Konzentration des Proteins ohne Biotinmarker variiert wurde.

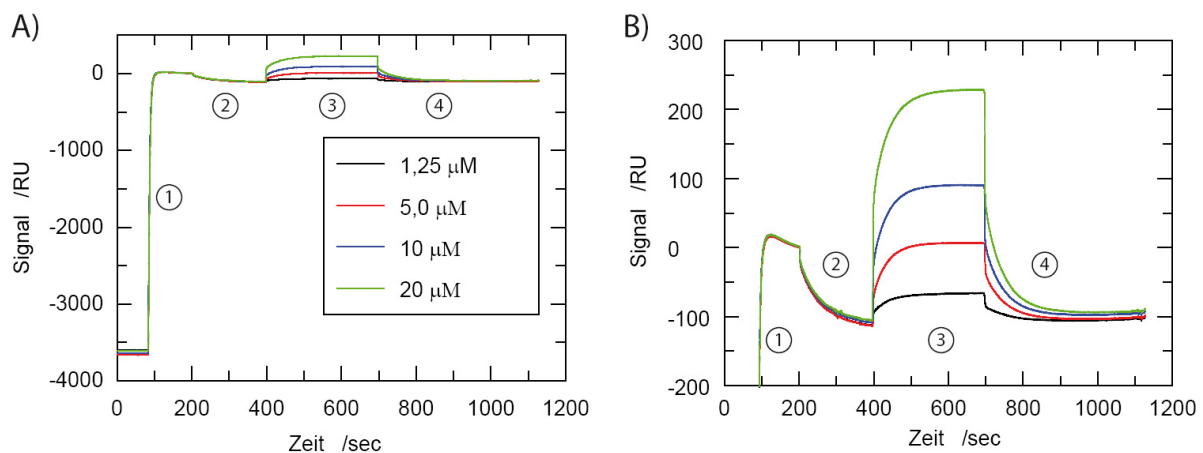


Abb. 4.30 Die SPR-Messungen von Sept7(E184A). A) Gesamter Messverlauf aller Messungen B) Vergrößerung der Schritte 2 - 4. (1) Immobilisierung des Sept7(E184A)-Biotin am Chip. (2) Dissoziation des ungebundenen Proteins durch Waschen mit Laufpuffer. (3) Injektion des nicht markierten Sept7(E184A). (4) Anschließende Dissoziation.

Die Anpassung einer einfach-exponentiellen Funktion an die Messwerte (Abb. 4.30) während der einzelnen Schritte der Messung zeigte, dass die berechneten Geschwindigkeitskonstanten beim Äquilibrieren der Chipoberfläche nach der Immobilisierung des Sept7-Biotin (Schritt 2) mit $k_{\text{obs}} = 0,0173 \text{ s}^{-1}$, bei der Bindung des nicht markierten Protein (Schritt 3) mit $k_{\text{obs}} = 0,0225 \text{ s}^{-1}$ und bei der anschließenden Dissoziation (Schritt 4) mit $k_{\text{obs}} = 0,0208 \text{ s}^{-1}$ fast gleich sind. Die Steigerung der Konzentration des nicht markierten Sept7(E184A) führte zwar zu höheren Signalamplituden während der Bindung, hatte aber keinen Einfluss auf die Geschwindigkeitskonstanten der Assoziation ($k_{\text{obs}} = 0,0240 \pm 0,0021 \text{ s}^{-1}$). Diese Beobachtungen lassen sich durch die Dimerisierung der an die Chipoberfläche

immobilisierten Sept7-Moleküle erklären. Wenn die Sept7-Moleküle als Dimere vorliegen, müssen sie erst in Monomere dissoziieren, bevor sie die Sept7-Moleküle aus der mobilen Phase binden können. Bei der Dissoziation der Dimere handelt es sich demzufolge um den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt während der Messung der Assoziation.

Da die Messung der Assoziationsrate aufgrund der Dimerisierung nicht möglich war, wurde das Experiment so verändert, dass nur die Dissoziationsrate der Dimere gemessen werden konnte. Hierfür wurde vor der SPR-Messung eine Mischung aus Sept7(E184A)-Biotin und nicht markiertem Sept7(E184A) im Verhältnis 1:10 vorbereitet. Der Überschuss an nicht markiertem Protein stellte sicher, dass bei 90% der in Lösung vorliegenden dimeren Komplexe nur jeweils eine Untereinheit mit Biotin markiert ist. Diese Proteinlösung wurde nun auf den Sensor-Chip injiziert, was zur Bindung des Komplexes auf die mit Streptavidin beladene Oberfläche führte. Die Massenzunahme auf der Oberfläche resultierte in einer Steigerung der Signalintensität. Beim anschließenden Waschen mit dem Laufpuffer konnte die Untereinheit des Komplexes, die keinen Biotin-Marker enthielt, von der Oberfläche abdissoziieren. Die durch die Dissoziation bewirkte Massenabnahme auf der Chipoberfläche wurde durch die abnehmende Signalintensität verfolgt.

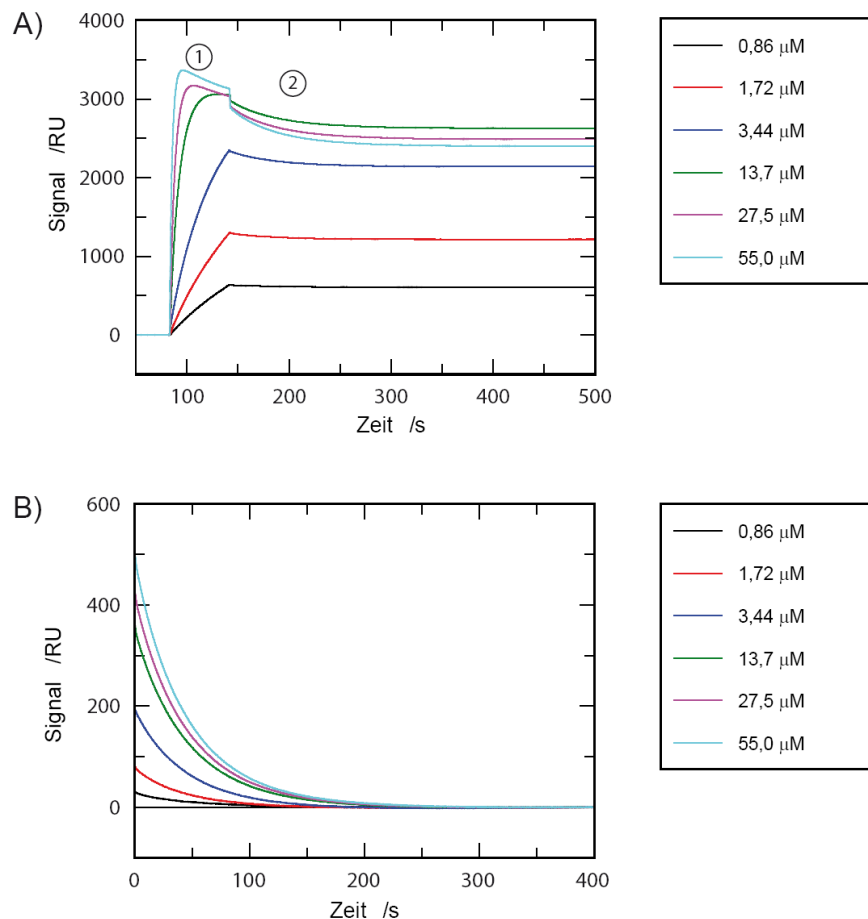


Abb. 4.31 Die SPR-Messungen der Dissoziation von Sept7(E184A) im GDP gebundenen Zustand. A) SPR-Sensorgramme der Messungen von Sept7(E184A) (1) Immobilisierung des Sept7(E184A)-Dimers am Chip. (2) Dissoziation der nicht markierten Untereinheit durch Waschen mit Laufpuffer. B) Vergrößerung des Dissoziationsschrittes. Die SPR-Sensorgramme wurden ausgerichtet, indem die Endwerte auf Null gesetzt wurden.

Die SPR-Messungen der Dissoziation von Sept7(E184A) wurden mit mehreren verschiedenen Proteinkonzentrationen wiederholt. Bei allen Experimenten wurden unabhängig von der Menge an immobilisiertem Material sehr ähnliche Dissoziationsgeschwindigkeitskonstanten ermittelt. Die Dissoziationsrate im GDP gebundenen Zustand beträgt $k_{\text{dis}}(\text{E184A, GDP}) = 0,0211 \pm 0,0016 \text{ s}^{-1}$.

Auf die gleiche Weise wurde die Geschwindigkeitskonstante für die Dissoziation von Sept7(D103A) im GDP-gebundenen Zustand ermittelt.

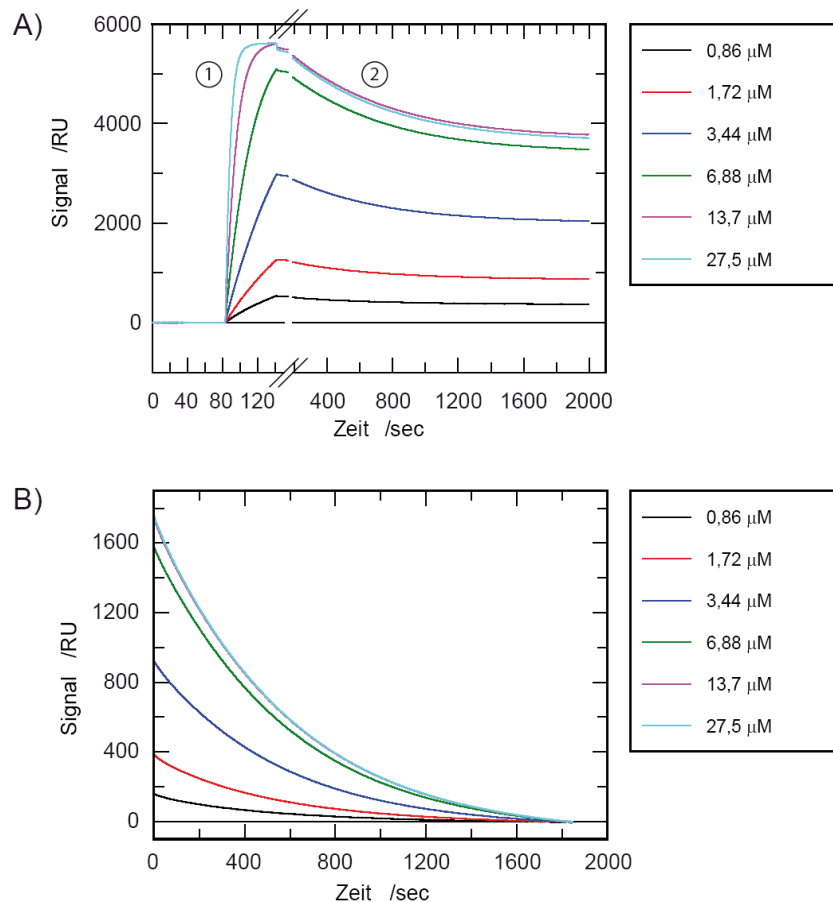


Abb. 4.32 Die SPR-Messungen der Dissoziation von Sept7(D103A) im GDP gebundenen Zustand. A) SPR-Sensorgramme der Messungen von Sept7(D103A) (1) Immobilisierung des Sept7(D103A)-Dimers am Chip. (2) Dissoziation der nicht markierten Untereinheit durch Waschen mit Laufpuffer. B) Vergrößerung des Dissoziationsschrittes. Die SPR-Sensorgramme wurden ausgerichtet, indem die Endwerte auf Null gesetzt wurden.

Auch bei den SPR-Messungen mit Sept7(D103A) waren die ermittelten Dissoziationsgeschwindigkeitskonstanten unabhängig von der Menge an immobilisiertem Material (Abb. 4.32). Die Dissoziationsrate im GDP-gebundenen Zustand ist mit $k_{\text{dis}}(\text{D103A, GDP}) = 0,00201 \pm 0,00009 \text{ s}^{-1}$ etwa 10-mal langsamer als die entsprechende Dissoziationsrate von Sept7(E184A). Diese Ergebnisse bestätigen somit ebenfalls, dass die Mutation E184A einen stärkeren Effekt auf die Dimerisierung hat als die D103A-Mutation, was bereits bei der Charakterisierung der Wechselwirkungen mit den Nukleotiden beobachtet werden konnte (Abb. 4.20).

Um den Effekt des Nukleotidzustandes auf die Stabilität des G-Interface zu untersuchen, wurden anschließend die gleichen SPR-Messungen mit Sept7(E184A) und Sept(D103A) im GppNHp-gebundenen Zustand durchgeführt. Für die beiden Messungen wurden zuerst Mischungen aus mit Biotin markierten Proteinen und nicht

markierten Proteinen im Verhältnis 1:10 vorbereitet. Danach wurde ein Nukleotidaustausch mit Hilfe der alkalischen Phosphatase durchgeführt.

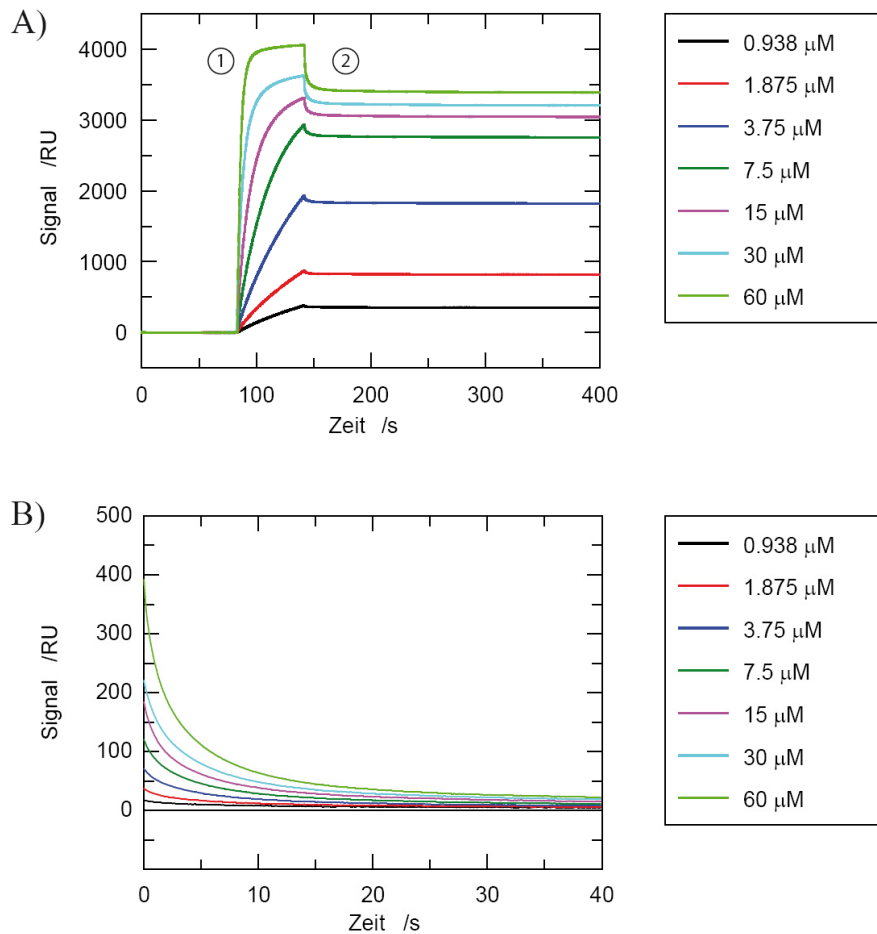


Abb. 4.33 Die SPR-Messungen der Dissoziation von Sept7(D103A) im GppNHp gebundenen Zustand. A) SPR-Sensorgramme der Messungen von Sept7(D103A) im GppNHp gebundenen Zustand (1) Immobilisierung des Sept7(D103A)-Dimers am Chip. (2) Dissoziation der nicht markierten Untereinheit durch Waschen mit Laufpuffer. B) Vergrößerung des Dissoziationsschrittes. Die SPR-Sensorgramme wurden ausgerichtet, indem die Endwerte auf Null gesetzt wurden.

Die Auswertung der Messdaten (Abb. 4.33) lieferte eine Dissoziationsrate von $k_{\text{dis}}(\text{D103A}, \text{GppNHp}) = 0,246 \pm 0,039 \text{ s}^{-1}$. Im Vergleich zur Dissoziationsrate im GDP-gebundenen Zustand ist die Dissoziation der Sept7(D103A)-Dimere im GppNHp-gebundenen Zustand ca. 120-fach schneller.

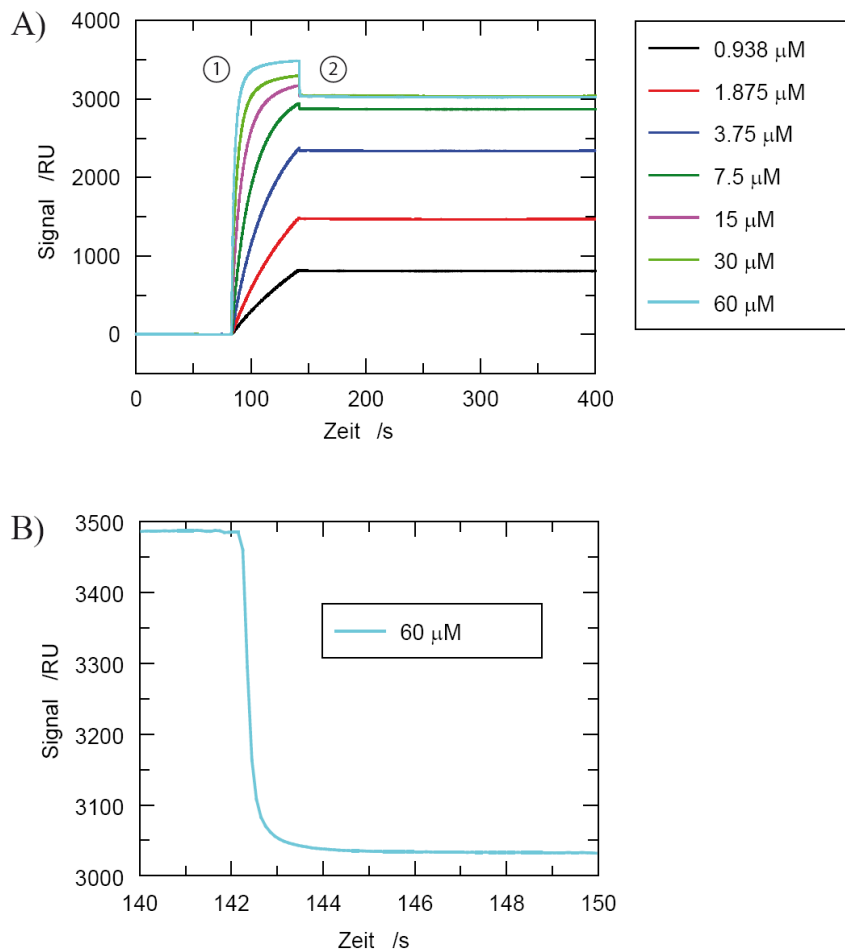


Abb. 4.34 Die SPR-Messungen der Dissoziation von Sept7(E184A) im GppNHp gebundenen Zustand. A) SPR-Sensorgramme der Messungen von Sept7(E184A) im GppNHp gebundenen Zustand (1) Immobilisierung des Sept7(E184A)-Dimers am Chip. (2) Dissoziation der nicht markierten Untereinheit durch Waschen mit Laufpuffer. B) Vergrößerung des Dissoziationsschrittes für die Messung bei einer Gesamtproteinkonzentration von 60 μM.

Die Auswertung der Messdaten (Abb. 4.34) lieferte eine Dissoziationsrate von $k_{\text{dis}}(\text{E184A}, \text{GppNHp}) = 2,47 \text{ s}^{-1}$. Die Dissoziationskinetik von Sept7(E184A) im GppNHp-gebundenen Zustand ist für eine verlässliche Auswertung allerdings zu schnell, weil sie nicht von den Effekten beim Puffer-Wechsel zu unterscheiden ist. Die tatsächliche Dissoziationsrate könnte sogar noch schneller sein. Verglichen mit der Kinetik im GDP-gebundenen Zustand sind die relativen Unterschiede zwischen beiden Nukleotidzuständen ähnlich wie bei Sept7(D103A).

Zuletzt wurde auch Sept7(wt) im GDP-gebundenen Zustand mit Hilfe der SPR-Methode untersucht. Wegen der sehr langsamen Dissoziationskinetik wurde allerdings nur eine Messung mit einer Messdauer von 25 Stunden durchgeführt.

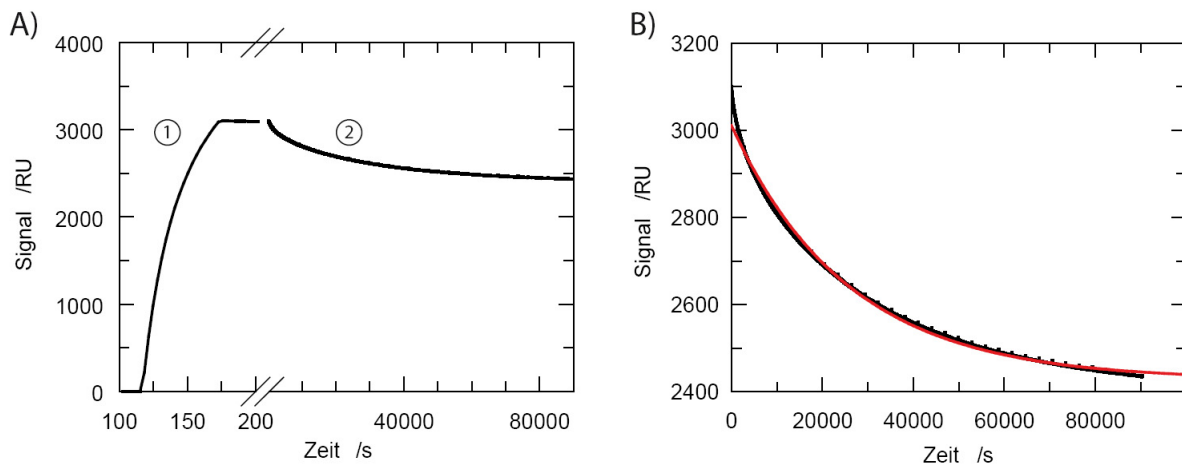


Abb. 4.35 Die SPR-Messungen der Dissoziation von Sept7(wt). A) SPR-Sensorgramm der Messung von Sept7(wt) (1) Immobilisierung des Sept7(wt)-Dimers am Chip. (2) Dissoziation der nicht markierten Untereinheit durch Waschen mit Laufpuffer. B) Vergrößerung des Dissoziationsschrittes.

Die Abb. 4.35 zeigt die Ergebnisse der SPR-Messung von Sept7(wt). Die Anpassung einer einfach-exponentiellen Funktion an die Messdaten lieferte eine Dissoziationsrate von $k_{\text{dis}}(\text{WT, GDP}) = 3,87 \cdot 10^{-5} \text{ s}^{-1}$. Die Dissoziation beim Wildtyp ist somit ca. 50-mal langsamer als bei der D103A-Mutante und sogar 570-mal langsamer als bei der E184A-Mutante. Außerdem liegt dieser Wert in derselben Größenordnung wie die gemessene GTP-Hydrolyserate mit $k_{\text{cat}} = 1,22 \cdot 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ (Abb. 4.25). Auch beim Wildtyp-Konstrukt scheint somit während der Hydrolyse die Dimerdissoziation der geschwindigkeitsbestimmende Schritt zu sein.

4.3.2 Kristallisation und Strukturlösung der G-Domäne von Sept7 im GppNHp-gebundenen Zustand

Die oben dargestellten Ergebnisse deuten auf Unterschiede bei der Stabilität des G-Interface zwischen GDP- und GppNHp-gebundenen Zuständen hin. Deshalb wären strukturelle Informationen über die möglichen Konformationsänderungen im G-Interface interessant. Aufgrund der Schwierigkeiten beim Austausch des gebundenen GDP-Nukleotides beim Wildtyp-Konstrukt des Sept7(29 - 297) wurden für die Kristallisation verschiedene Konstrukte mit Mutationen im G-Interface verwendet. Es wurden die Mutationen Asp-103 zu Alanin, Ser-149 zu Phenylalanin und Glu-184 zu Aspartat ausgewählt. Diese Mutationen schwächen die Bindungsstärke des G-Interface und ermöglichen dadurch den Austausch des gebundenen GDP durch GppNHp.

4.3.3 Kristallisation von Sept7(29-297)-Mutante im GppNHp-gebundenen Zustand

Zustand

Zur Ermittlung der initialen Kristallisationsbedingungen für die Sept7(29-297)-Mutanten im GppNHp-gebundenen Zustand wurden viele verschiedene Präzipitanzlösungen, welche in kommerziellen Kristallisationsscreens zusammengefasst sind (Nextal, Qiagen, Hilden, Deutschland; Hampton Research, Aliso Viejo CA, USA), in 96-*well*-Platten getestet. Bei allen drei Mutanten, Sept7(D103A) / Sept7(S149F) / Sept7(E184A), konnten dabei nur wenige initiale Kristallisationsbedingungen identifiziert werden.

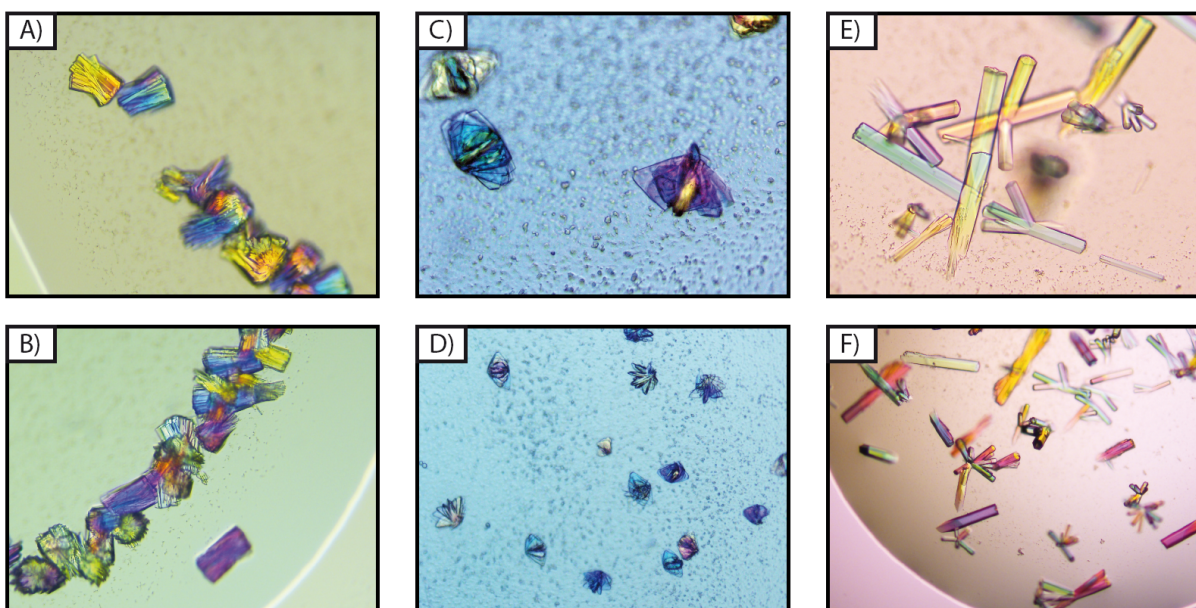


Abb. 4.36 Optimierte Kristalle von Sept7(29-297) beladen mit GppNHp. A) und B) Kristalle von Sept7(E184A), C) und D) Kristalle von Sept7(D103A), E) und F) Kristalle von Sept7(S149F).

Die initialen Kristallisationsbedingungen wurden anschließend in 24-*well*-Platten optimiert, indem pH-Werte und Konzentration der Präzipitanzlösungen variiert wurden. Die optimierten Kristalle zeigten allerdings nur im Falle von Sept7(29 - 297, S149F) eine Beugungsqualität, welche für die Strukturlösung ausreichend war. Die endgültige Zusammensetzung des Kristallisationstropfens nach Optimierung der Kristallisationsbedingungen für Sept7(S149F)-GppNHp bestand aus 1 μ L Sept7(29 - 297, S149F)-GppNHp mit einer Konzentration von 10 mg/ml in 20 mM Tris-HCl (pH = 8,0), 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 5 mM DTE und 1 mM GppNHp gemischt mit 1 μ L der Reservoir-Lösung aus 100 mM HEPES (pH = 7,2), 1,6 M Ammoniumsulfat und 100 mM NaCl. Als Kryoschutz wurde die Reservoir-

Lösung zusätzlich mit 20% Glycerol versetzt. Die Kristalle (Abb. 4.36) zeigten an der Kupferanode Beugungsreflexe bis 3,5 Å und lieferten am Synchrotron (SLS, Villingen) einen Datensatz mit einer Auflösung von 2,9 Å.

Die Indizierung, Integration und Skalierung der gemessenen Daten mittels eines XDS-Programmpakets (Kabsch, 1993) ergaben ein primitives hexagonales Gitter mit der Raumgruppe $P3_121$. Die Kristallstruktur wurde mit Hilfe der Methode des molekularen Ersatzes gelöst, indem die Struktur des Sept7(29 - 297) im GDP-gebundenen Zustand als Modell verwendet wurde.

4.3.4 Struktur von Sept7(29 - 297, S149F)·GppNHp

Die asymmetrische Einheit der Kristallstruktur enthält zwei Sept7-Moleküle, die einander mit der Nukleotidbindungsstelle zugewandt sind und somit einen G-Dimer ausbilden (Abb. 4.37). Die Gesamtstruktur des G-Dimers ähnelt dabei sehr der Struktur von Sept2 im GppNHp-gebundenen Zustand (PDB ID 3FTQ).

Im Vergleich zur Struktur von Sept7 im GDP-gebundenen Zustand sind die Untereinheiten des G-Dimers ähnlich wie bei Sept2·GppNHp entlang der Dimerverbindungsachse gegeneinander verdreht. Während die septin-spezifischen β 7- und β 8-Stränge an der gleichen Position wie im GDP-gebundenen Zustand bleiben, entfernen sich die α 2-Helices um ca. 5,8 Å voneinander. Diese Änderung der relativen Anordnung der Untereinheiten im G-Interface kann entweder auf den veränderten Nukleotidzustand oder aber auf die S149F-Mutation zurückgeführt werden.

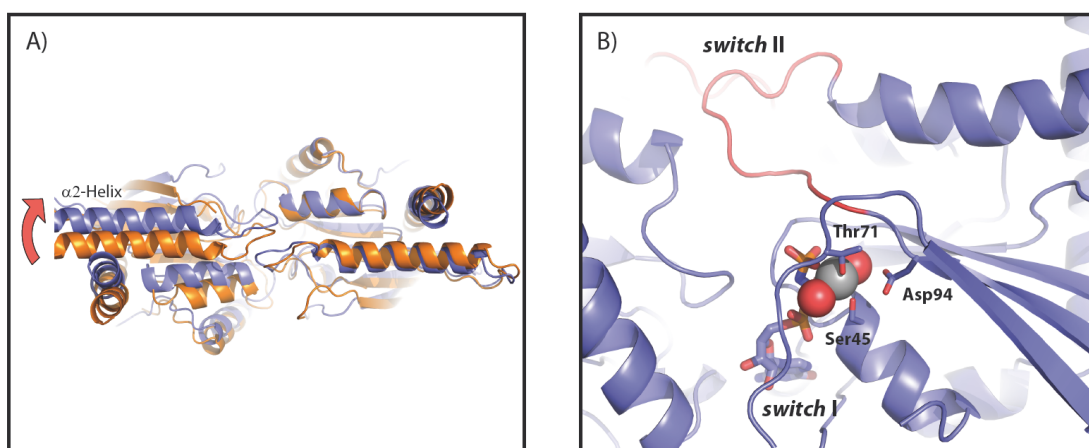


Abb. 4.37 Struktur von Sept7(29-297, S149F)·GppNHp. A) Vergleich der Strukturen von Sept7(29-297)·GDP (gelb) und Sept7(29-297, S149F)·GppNHp (blau). Erkennbar ist eine deutliche Verschiebung der linken Untereinheit. B) Konformation der *switch I* und *switch II* Bereiche. Aminosäuren, welche in die Koordination des Mg^{2+} -Ions involviert sind, sind in Stäbchen-Modell dargestellt.

Analog zu anderen GNBPs bindet der *switch* I Bereich über das konservierte Threonin Thr-71 an das γ -Phosphat des Nukleotids und nimmt dabei eine ähnliche Konformation wie Sept2 im GppNHp-gebundenen Zustand ein. Trotz der Verschiebung der α 2-Helices bilden die *switch* II Bereiche der beiden G-Domäne weiterhin gegenseitige Kontakte aus. Die Wechselwirkungen werden dabei vor allem durch Val-102 und Asp-103 vermittelt, ähnlich wie in der Struktur des Sept7 im GDP-gebundenen Zustand. Zusammen genommen liefert diese Struktur keine offensichtlichen Informationen für die Erklärung der nukleotid-abhängigen Unterschiede bei der Dimerdissoziation, die bei den SPR-Messungen beobachtet wurden.

4.4 Charakterisierung von Vertretern anderer Septin-Gruppen

Die dreizehn Septine des menschlichen Genoms werden aufgrund von Ähnlichkeiten in der Aminosäuresequenz in vier Gruppen unterteilt: Gruppe 2 (Sept1, Sept2, Sept4 und Sept5), Gruppe 3 (Sept3, Sept9 und Sept12), Gruppe 6 (Sept6, Sept8, Sept10, Sept11 und Sept14) und Gruppe 7 (Sept7). Für die Bildung des Septin-Komplexes werden in humanen Zellen drei oder vier Untereinheiten aus verschiedenen Gruppen benötigt. Allerdings ist die Rolle der einzelnen Septine im Komplex und ihre physiologische Funktion bisher nicht bekannt. Um die Eigenschaften der verschiedenen Septin-Gruppen vergleichen zu können, wurde jeweils ein Vertreter aus jeder Gruppe der humanen Septine für die Charakterisierung ausgewählt. Neben Sept7 standen bereits Konstrukte von Sept2 zur Verfügung. Als Vertreter der beiden anderen Gruppen wurden Sept6 und Sept9 gewählt.

4.4.1 Herstellung und Reinigung der Konstrukte der G-Domänen von Sept2, Sept6 und Sept9

Die Konstrukte der G-Domäne ohne die N-terminale α 0-Helix und ohne den c-terminalen *coiled-coil* Bereich haben sich bei der Charakterisierung von Sept2 und Sept7 bewährt, daher wurde dieselbe Strategie auch bei der Herstellung der Konstrukte der G-Domäne von Sept6 und Sept9 angewandt.

Die G-Domäne des Sept6, Aminosäuren 40 - 305, wurde parallel in die beiden Vektoren pGEX6P1 und pET28a kloniert. Während die Expression des pGEX6P1-Konstruktes ein unlösliches Fusionsprotein lieferte, war die Expression der G-Domäne des Sept6, welches in den pET28a-Vektor kloniert wurde und daraufhin ein c-terminales His₆-Tag enthielt, erfolgreich.

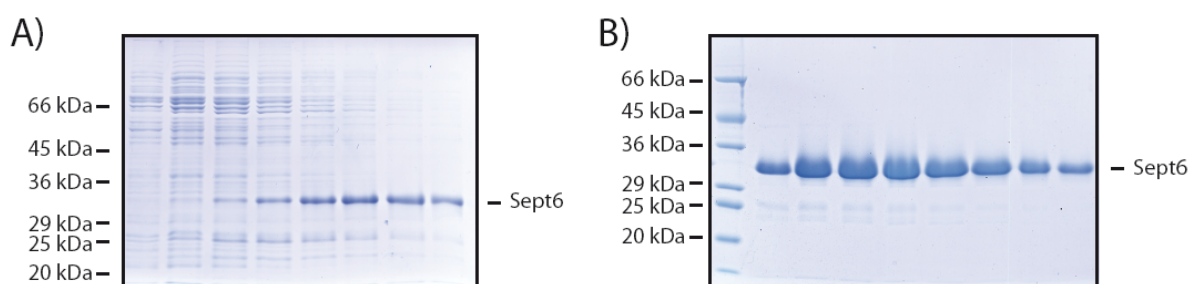


Abb. 4.38 Reinigung von Sept6(40-305). Sept6(40-305) wurde als His₆-Fusionsprotein in *E. coli* exprimiert und anschließend in zwei Schritten gereinigt. A) Elution über eine Ni-NTA-Säule mit einem Imidazol-Gradient von 0-250 mM in 150 mL. B) Gelfiltration über eine Superdex S200 26/60 Säule im Niedrigsalzpuffer (100 mM NaCl).

Die einzelnen Schritte der Reinigung von Sept6(40 - 305) sind in Abb. 4.38 dargestellt. Das Protein wurde dabei zuerst mit Hilfe der Affinitätschromatographie über einer Ni-NTA-Säule gereinigt. Die Elution mittels eines Imidazol-Gradienten lieferte ein relativ sauberes Protein in guter Ausbeute. Die Proteinlösung wurde anschließend mit Hilfe der Gelfiltration über einer Superdex S200 26/60 Säule gereinigt. Die SDS-PAGE der Elutionsfraktionen zeigte nur eine Bande von Sept6 und das Elutionsvolumen deutete auf eine monomere G-Domäne hin. Aus einer 5L TB-Kultur wurden ca. 10 mg Protein erhalten.

Bei der Analyse der Nukleotidbeladung des gereinigten Proteins mittels HPLC stellte sich heraus, dass nur ca. 12% des Proteins mit GTP beladen ist. Das restliche Protein wies kein gebundenes Nukleotid auf.

Im Falle von Sept9 wurde das Konstrukt ohne den N-terminalen Bereich und ohne die $\alpha 0$ -Helix, Aminosäuren 297 - 565 von Isoform 1, in den pGEX6P1-Vektor kloniert. Die Expression in *E. coli* BL21(DE3)-Zellen und die anschließende Reinigung erfolgte analog zu Sept7(29 - 297).

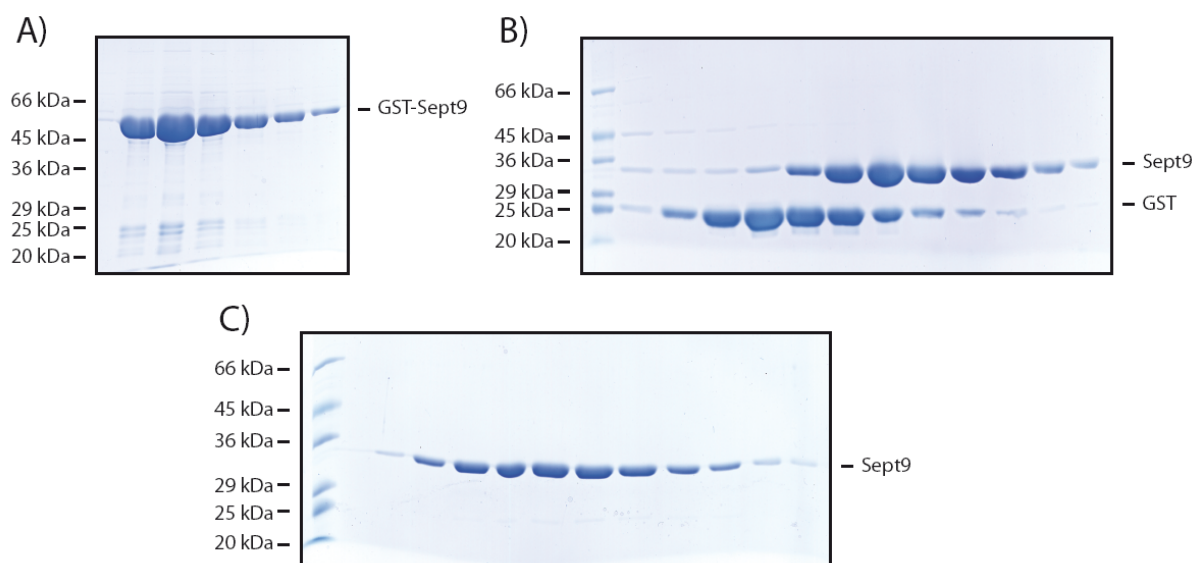


Abb. 4.39 Reinigung von Sept9(297-565). Sept9(297-565) wurde als GST-Fusionsprotein in *E. coli* exprimiert und anschließend in drei Schritten gereinigt. A) Elution über eine GSH-Säule mit 20mM Glutathion (ca. 100mL). B) Nach der Abspaltung von GST durch eine Precision-Protease erfolgte eine Gelfiltration über eine Superdex S200 26/60 Säule im Niedrigsalzpuffer (100mM NaCl). C) Filtration über eine GSH-Säule zur Abtrennung von GST.

Die Abb. 4.39 zeigt die einzelnen Schritte bei der Reinigung von Sept9(297 - 565). Die Elutionsfraktionen nach Reinigung über einer GSH-Säule enthielten das recht saubere Fusionsprotein in guter Ausbeute. Das GST-Fusionsprotein wurde

erfolgreich mit Hilfe einer Precision-Protease abgespalten. Anschließend wurde die Proteinlösung mittels Gelfiltration über eine Superdex S200 26/60 Säule gereinigt. Sept9(297 - 565) eluierte etwas später als das GST-Protein, was auf eine monomere G-Domäne hinweist. Zur Abtrennung von GST wurden die Sept9 enthaltenden Fraktionen vereint und über eine GSH-Säule filtriert. Die Kontrolle der Durchflussfraktionen mit SDS-PAGE zeigte nur eine Bande bei Sept9(297 - 565) und kein GST mehr. Insgesamt wurden aus einer 5L TB-Kultur ca. 15 mg Protein erhalten.

Das Wildtyp-Konstrukt des Sept2(33 - 306) sowie die Mutanten Sept2(T78G) und Sept2(F156D) wurden von M. Sirajuddin hergestellt (Sirajuddin *et al.*, 2009). Die Expression und Reinigung der Konstrukte erfolgte analog zu Sept7(29 - 297) und lieferte Proteine in guter Ausbeute und Reinheit.

4.4.2 Charakterisierung der G-Domänen von Sept2, Sept6 und Sept9

Die Untersuchungen von Sept7 zeigten, dass die Dimerisierung der G-Domäne über das G-Interface die Ergebnisse der biochemischen Charakterisierung beeinflusst. Daher wurde als Erstes die Oligomerisierungsfähigkeit der gereinigten G-Domänen des Sept6 und Sept9 mit Hilfe der analytischen Gelfiltration untersucht.

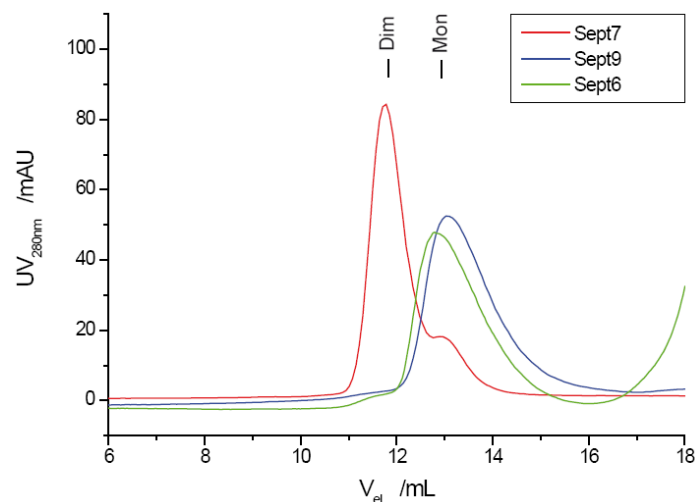


Abb. 4.40 Analytische Gelfiltration von Sept6 und Sept9. Die Elutionschromatogramme während der analytischen Gelfiltrationschromatographie über eine Superdex S75 10/30 Säule von Sept6(40-305) und Sept9(297-565).

In der Abb. 4.40 ist das Laufverhalten der Proteine über eine Superdex S75 10/30 Säule im Niedrigsalzpuffer (100 mM NaCl) dargestellt. Zum Vergleich wurde eine Gelfiltration des Sept7-Dimers parallel durchgeführt. Die Elutionschromatogramme

zeigen eindeutig, dass sowohl Sept6(40 - 305) als auch Sept9(297 - 565) in der Lösung nicht oligomerisieren, sondern monomer bleiben. Dies stimmt auch mit Beobachtungen überein, welche während der Reinigung gemacht wurden.

4.4.3 Analyse der intrinsischen GTP-Hydrolyse mittels Umkehrphasen-HPLC

Als Nächstes wurde bei den Proteinen die Fähigkeit zur intrinsischen GTP-Hydrolyse untersucht. Hierfür wurde die Reaktion von 100 μM GTP mit 50 μM Protein mittels Umkehrphase-HPLC verfolgt.

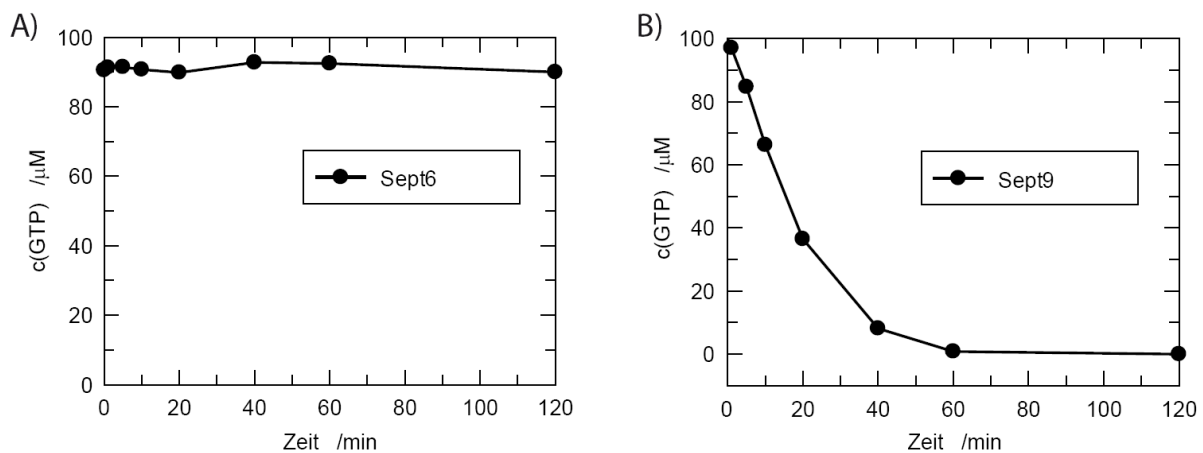


Abb. 4.41 Intrinsische GTP-Hydrolyse von Sept6 und Sept9. A) GTP-Konzentration im Verlauf der Reaktion mit Sept6(40-305). B) Verlauf der GTP-Konzentration während der Hydrolyse durch Sept9(297-565). Dabei wurden bei Raumtemperatur 100 μM GTP mit 50 μM Protein inkubiert. Nach definierten Zeitabständen wurden 40 μL Proben genommen und mittels Umkehrphasen-HPLC analysiert. k_{cat} (Sept9) = 0,064 min^{-1} .

Die Verläufe der GTP-Konzentration während der Reaktionen sind in Abb. 4.41 dargestellt. Bei der Reaktion von Sept6 findet während der Messzeit von zwei Stunden keine signifikante Änderung der GTP-Konzentration statt. Dies deutet darauf hin, dass Sept6 zu keiner intrinsischen Hydrolyse fähig ist. Zudem erklärt dies auch die Beobachtung, dass in der Kristallstruktur des humanen Komplexes Sept6 im Vergleich zu Sept7 und Sept2, die mit GDP beladen sind, als einzige Untereinheit ein GTP-Molekül gebunden hat. Bei Sept9 beobachtet man hingegen eine relativ schnelle GTP-Hydrolyse mit $k_{\text{cat}} = 0,064 \text{ min}^{-1}$. Dieser Wert ist mit der Hydrolyserate des monomeren Sept7(E184A)-Konstrukts mit $k_{\text{cat}} = 0,047 \text{ min}^{-1}$ vergleichbar (Abb. 4.27).

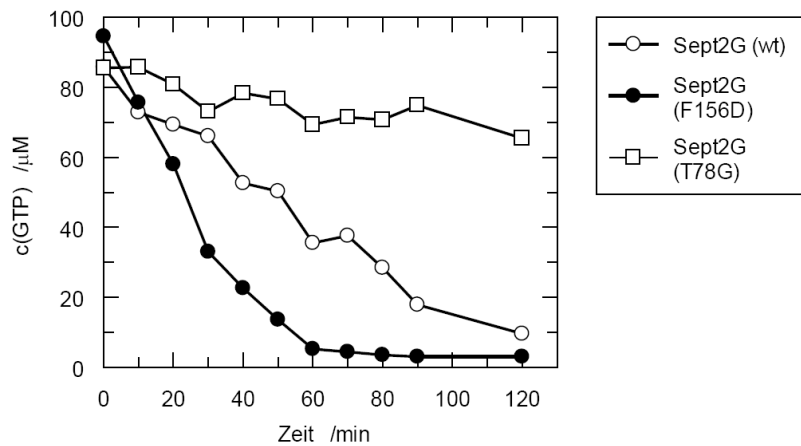


Abb. 4.42 Intrinsische GTP-Hydrolyse von Sept2-Konstrukten. GTP-Konzentration im Verlauf der Reaktion mit verschiedenen Konstrukten von Sept2(33-306). Dabei wurden bei Raumtemperatur 100 μM GTP mit 50 μM Protein inkubiert. Nach definierten Zeitabständen wurden 40 μL Proben genommen und mittels Umkehrphasen-HPLC analysiert. k_{cat} (WT) = 0,0142 min^{-1} , k_{cat} (F156D) = 0,0155 min^{-1} und k_{cat} (T78G) = 0,0031 min^{-1} .

Der Reaktionsverlauf der GTP-Hydrolyse durch Sept2-Konstrukte ist in Abb. 4.42 dargestellt. Die daraus ermittelte Hydrolyserate $k_{\text{cat}}(\text{Sept2}_{\text{wt}}) = 0,0142 \text{ min}^{-1}$ des Wildtyp-Konstruktes, welche bei der Gelfiltration eine partielle Dimerisierung zeigte, ist etwas langsamer als die Hydrolyserate $k_{\text{cat}}(\text{Sept2}_{\text{F156D}}) = 0,0373 \text{ min}^{-1}$ der monomeren Mutante Sept2(F156D). Das Sept2(T78G)-Konstrukt, bei dem das für die GTP-Hydrolyse essentielle Threonin mutiert wurde, zeigte die langsamste Hydrolyse mit $k_{\text{cat}}(\text{Sept2}_{\text{T78G}}) = 0,0031 \text{ min}^{-1}$. Ähnliche Beobachtungen wurden auch bei der Charakterisierung von Sept7 gemacht (Abb. 4.25).

4.4.4 Wechselwirkungen zwischen den G-Domänen von Sept2 und Sept6

In der Kristallstruktur des humanen Septin-Komplexes wurde die Bindung zwischen Sept2 und Sept6 über das G-Interface beobachtet. Daher wurden als Nächstes die Wechselwirkungen zwischen Sept2(33 - 306) und Sept6(40 - 305) untersucht. Hierfür wurde zunächst ein *Pulldown*-Experiment mit den nicht gespaltenen Fusionsproteinen GST-Sept2(33 - 306) und Sept6(40 - 305) durchgeführt.

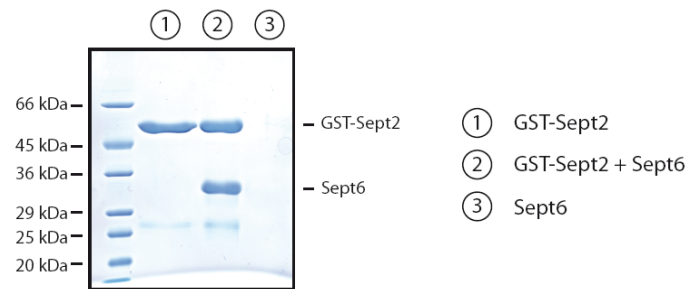


Abb. 4.43 Pulldown-Experiment mit GST-Sept2(33-306) und Sept6(40-305). Dargestellt ist das mit Coomassie-Blau gefärbte SDS-PAGE-Gel der drei Ansätze.

Die Analyse des Pulldown-Experiments mittels SDS-PAGE zeigt, dass die Fusionsproteine GST-Sept2(33 - 306) und Sept6(40 - 305) einen äquimolaren Komplex bilden (Abb. 4.43).

Für die Charakterisierung dieses Komplexes wurde Sept2(33 - 306), welches in einem pGEX6P1-Vektor kloniert vorliegt, mit Sept6(40 - 305), welches in einem pET28a-Vektor kloniert vorliegt, zusammen in *E. coli* BL21(DE3)-Zellen exprimiert und anschließend gereinigt.

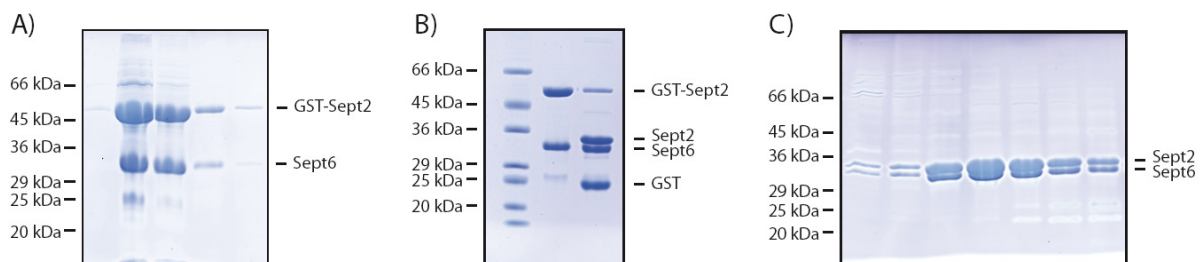


Abb. 4.44 Koexpression von GST-Sept2(33-306) und Sept6(40-305). Der Proteinkomplex wurde in *E. coli* exprimiert und anschließend in drei Schritten gereinigt. A) Elution über eine GSH-Säule mit 20mM Glutathion B) Abspaltung von GST durch eine PreScission-Protease C) Nach der Filtration über eine GSH-Säule erfolgte eine Gelfiltration über eine Superdex S200 26/60 Säule im Niedrigsalzpuffer (100mM NaCl).

Die einzelnen Schritte der Reinigung sind in Abb. 4.44 dargestellt. Als erster Reinigungsschritt wurde eine Affinitätschromatographie über einer Ni-NTA-Säule durchgeführt. Die Elutionsfraktionen enthielten sowohl Sept6(40 - 305)-His6 als auch das Fusionsprotein GST-Sept2(33 - 306). Nach Abspaltung des GST-Proteins durch Inkubation mit einer PreScission-Protease wurde die Proteinlösung über eine GSH-Säule filtriert, um das GST-Protein und das nicht gespaltene Fusionsprotein GST-Sept2(33 - 306) zu entfernen. Die Durchflussfraktionen wurden konzentriert und anschließend mittels Gelfiltration über einer Superdex S200 26/60-Säule gereinigt.

Beide Proteine eluieren dabei zusammen als äquimolarer Komplex. Insgesamt wurden aus einer 5 L TB-Kultur ca. 10 mg Protein erhalten.

Zur Charakterisierung des gereinigten Komplexes wurde dessen Oligomerisierungszustand mit Hilfe einer analytischen Gelfiltration und dessen Nukleotidbeladung mittels Umkehrphasen-HPLC analysiert.

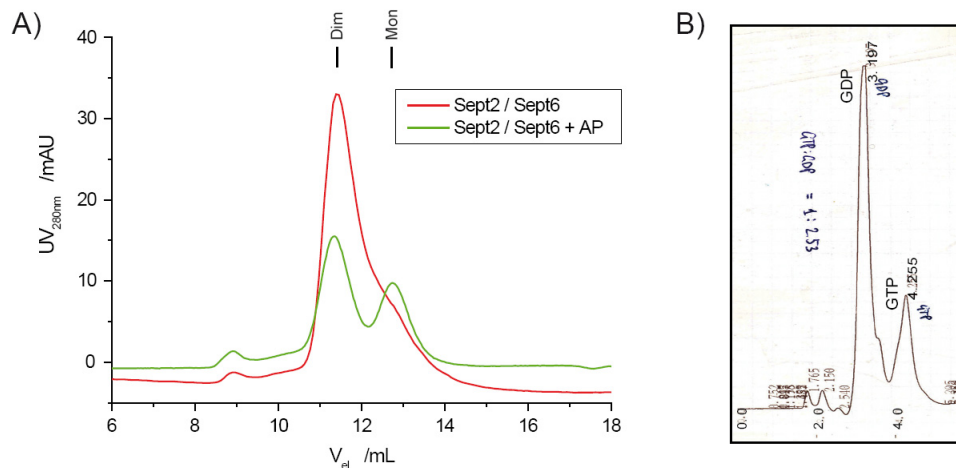


Abb. 4.45 Charakterisierung des Komplexes aus Sept2(33-306) und Sept6(40-305).

A) Elutionschromatogramm während der analytischen Gelfiltrationschromatographie über eine Superdex S75 10/30 Säule von Sept7(29-297) B) Chromatogramm der Umkehrphasen-HPLC bei der Analyse der Nukleotidbeladung des gereinigten Proteinkomplexes. Peak mit Retentionszeit von $t_R = 3,20$ min entspricht GDP und $t_R = 4,26$ min entspricht GTP.

Das Elutionsvolumen des Komplexes weist auf ein Dimer aus Sept2 und Sept6 hin. Die Inkubation des Komplexes zusammen mit einer alkalischen Phosphatase führte zur partiellen Monomerisierung des Komplexes. Diese Beobachtung bestätigt, dass beide Proteine über das G-Interface aneinander binden. Die Analyse der Nukleotidbeladung des gereinigten Komplexes zeigte, dass 70% der Proteine GDP- und 30% GTP-Nukleotide enthielten (Abb. 4.45).

Zudem wurde noch die intrinsische GTP-Hydrolyse des Komplexes untersucht, indem die Reaktion von 100 μ M GTP mit 50 μ M Protein mittels Umkehrphasen-HPLC verfolgt wurde.

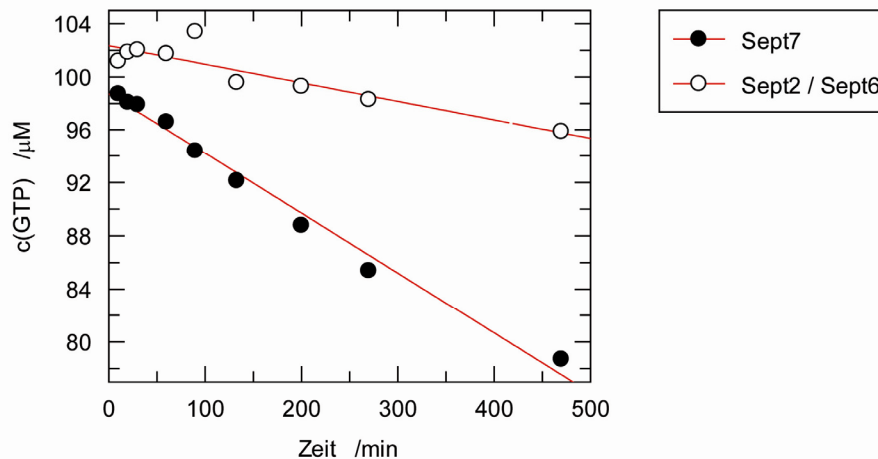


Abb. 4.46 Intrinsische GTP-Hydrolyse des Sept2/Sept7-Komplexes. GDP-Konzentration im Verlauf der GTP-Hydrolyse durch den Sept2(33-306)/Sept6(40-305)-Komplex und durch Sept7(29-297) zum Vergleich. Dabei wurden bei Raumtemperatur 100 μM GTP mit 50 μM Protein inkubiert. Nach definierten Zeitabständen wurden 40 μL Proben genommen und mittels Umkehrphasen-HPLC analysiert. k_{cat} (Sept2/Sept6) = $2,8 \cdot 10^{-4} \text{ min}^{-1}$.

Die Auswertung der Messdaten lieferte für den Komplex eine Hydrolyserate von k_{cat} (Sept2/Sept6) = $2,8 \cdot 10^{-4} \text{ min}^{-1}$ (Abb. 4.46). Im Vergleich zur Hydrolyserate des Sept2(wt) ist die Hydrolyse des Komplexes etwa 100-mal langsamer. Dies zeigt, dass ähnlich wie bei der Dimerisierung des Sept7 (Abb. 4.25) die Komplexbildung zwischen Sept2 und Sept6 zur langsameren Nukleotidfreisetzung und somit auch zu einer langsameren Hydrolyserate im *multi-turnover* Experiment führt.

Versuche, initiale Kristallisationsbedingungen für den Komplex aus Sept2(33 - 306) und Sep6(40 - 305) zu identifizieren, waren nicht erfolgreich.

4.4.5 Wechselwirkungen zwischen den G-Domänen von Sept7 und Sept9

Die aktuellen Untersuchungen deuten darauf hin, dass Sept9 in Säugetierzellen bei der Bildung oktamerer Komplexe involviert ist, indem es an die terminalen Sept7-Untereinheiten des hexameren Komplexes über das G-Interface bindet (Kim *et al.*, 2011; Sellin *et al.*, 2011). Um diese These zu überprüfen, wurde zunächst das gereinigte Konstrukt der G-Domäne von Sept9 zusammen mit Sept7(29 - 297) inkubiert. Anschließend wurde diese Proteinlösung mittels analytischer Gelfiltration analysiert.

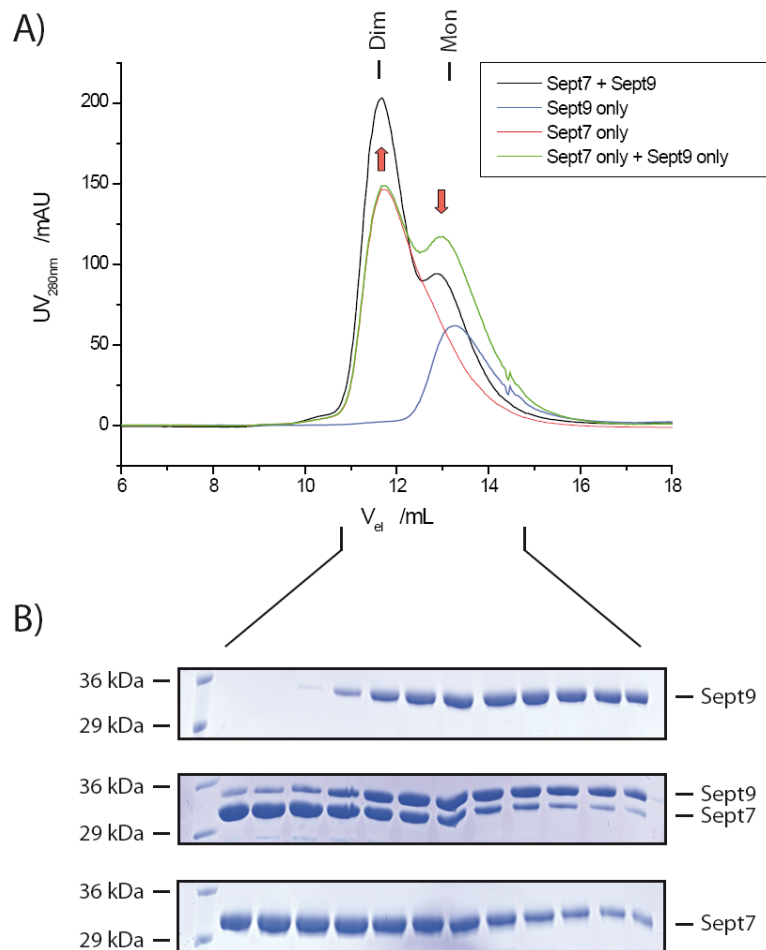


Abb. 4.47 Wechselwirkungen zwischen Sept7 und Sept9. Analytische Gelfiltration über eine Superdex S75 10/30 Säule. Die grüne Kurve zeigt die theoretische Summe der einzelnen Läufe von Sept7 und von Sept9 und dient als Referenz für den Lauf der Mischung aus Sept7 und Sept9. B) SDS-PAGE der korrespondierenden Elutionsfraktionen der einzelnen Läufe.

Falls die beiden Proteine dimerisieren, sollte das ansonsten monomere Sept9 zusammen mit Sept7 früher von der Säule eluieren. Die Elutionschromatogramme in Abb. 4.47 zeigen für die Mischung aus Sept7 und Sept9 nur eine leichte Zunahme der Proteinmenge in den dimeren Fraktionen und eine gleichzeitige Abnahme in den monomeren Fraktionen. Die Analyse der Elutionsfraktionen mittels SDS-PAGE zeigt, dass Sept9, welches alleine ausschließlich monomer ist, in Anwesenheit von Sept7 auch in dimeren Fraktionen detektierbar ist. Die Menge an Sept9 in den dimeren Fraktionen ist allerdings sehr klein, der überwiegende Teil des Sept9 blieb monomer. Deshalb wurde versucht die beiden Proteine, analog zum Komplex aus Sept2 und Sept6, in *E. coli* BL21(DE3)-Zellen zusammen zu exprimieren und anschließend mit Hilfe der Affinitätschromatographie über einer GSH-Säule zu reinigen.

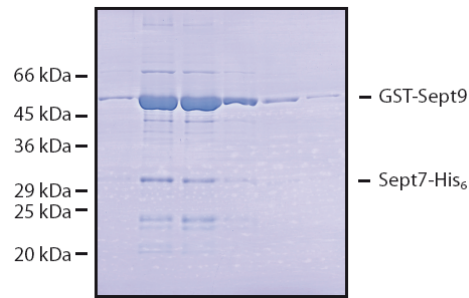


Abb. 4.48 Koexpression von GST-Sept9(297-565) und Sept7(29-297)-His6. Der Proteinkomplex wurde in *E. coli* exprimiert und mittels Affinitätschromatographie über eine GSH-Säule gereinigt.

Die Elutionsfraktionen nach der Affinitätschromatographie (Abb. 4.48) enthielten große Mengen des Fusionsprotein GST-Sept9. Die Menge an Sept7 war hingegen sehr gering, was auf schwache Wechselwirkungen zwischen beiden Proteinen hindeutet.

4.5 Analyse des humanen Septinkomplexes

Die Charakterisierung der G-Domäne von Sept7 zeigte, dass die Bindungsaffinität für die Dimerisierung über das G-Interface sehr hoch ist und auch durch Zugabe hoher Salzkonzentrationen nicht signifikant beeinflusst wird. Diese Beobachtungen stehen im offensichtlichen Widerspruch zu dem Modell von Sirajuddin *et al.* 2007, wo Sept7 als terminale Untereinheiten des Septinkomplexes mit einer relativ schwachen Tendenz zur Dimerisierung vermutet werden.

Daher wurde der Komplex aus His₆-Sept7 Δ cc und Sept6 Δ cc, deren Untereinheiten keine c-terminalen *coiled-coil* Bereiche enthielten, exprimiert und gereinigt. Hierfür wurden beide Proteine von einem bicistronischen Plasmid, welches von M. Sirajuddin hergestellt wurde (Sirajuddin *et al.*, 2007), in *E. coli* BL21(DE3)-Zellen exprimiert. Anschließend wurde der Proteinkomplex mit Hilfe der Affinitätschromatographie über einer Ni-NTA-Säule und mittels Gelfiltration über einer Superdex S200 16/60-Säule gereinigt. Dabei wurden insgesamt nur ca. 2 mg Protein erhalten.

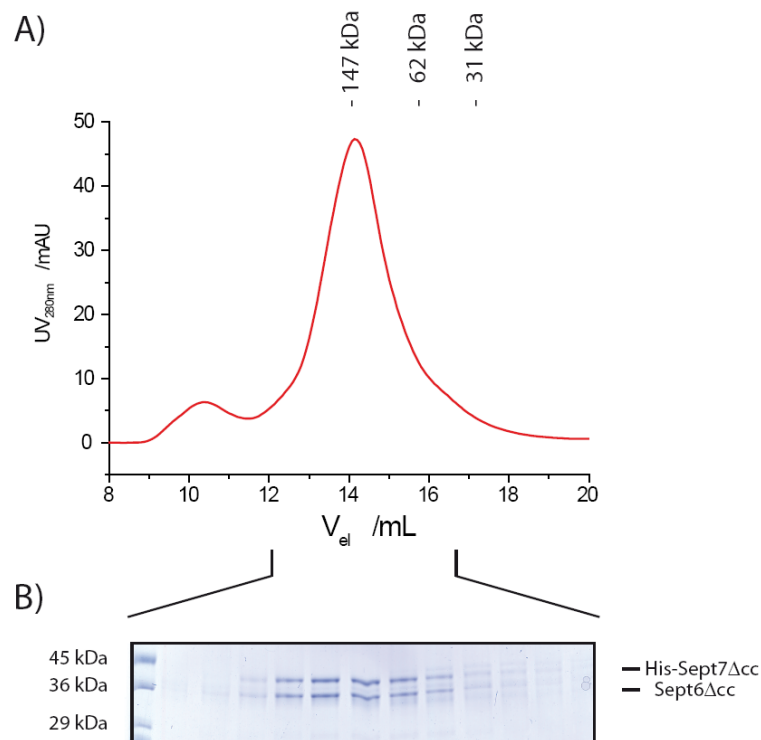


Abb. 4.49 Analytische Gelfiltration von Sept6 Δ cc/Sept7 Δ cc. A) Elutionschromatogramm während der analytischen Gelfiltration von Komplex aus Sept6 Δ cc und Sept7 Δ cc über eine Superdex S200 10/30 Säule im Niedrigsalzpuffer (100mM NaCl). Das Elutionsvolumen entspricht einer Größe von ca. 147 kDa und weist auf einen tetrameren Komplex hin. B) Die SDS-PAGE der Elutionsfraktionen zeigt einen äquimolaren Komplex aus Sept6 Δ cc und Sept7 Δ cc.

Der gereinigte Komplex aus Sept6 Δ cc und Sept7 Δ cc wurde mit Hilfe der analytischen Gelfiltration über einer Superdex S200 10/30 Säule untersucht (Abb. 4.49). Die aus dem Elutionsvolumen kalkulierte Größe von 142 kDa weist auf einen tetrameren Komplex aus zwei Sept7- und zwei Sept6-Untereinheiten hin. Zusammen mit den Resultaten der Charakterisierung der G-Domänen von Sept6 und Sept7 sprechen die Ergebnisse für einen tetrameren Komplex mit der Reihenfolge: Sept6-Sept7-Sept7-Sept6. Basierend darauf wäre die Reihenfolge Sept2-Sept6-Sept7-Sept7-Sept6-Sept2 für den humanen Septinkomplex wahrscheinlicher.

5. Diskussion

Im Folgenden sollen die Ergebnisse der Charakterisierung der Septine diskutiert werden, um anschließend ein Modell entwickeln zu können, welches die Rolle der GTPase-Aktivität für die Funktion der Septine erklären würde.

5.1 Dimerisierung über das G-Interface

Die Aufklärung der Kristallstrukturen des humanen Sept2 und des Komplexes aus Sept2-Sept6-Sept7 lieferte die Grundlage für das Verständnis der Oligomerisierung der G-Domänen von Septinen. Die Rolle des Nukleotidzustandes für die Funktion der Septine blieb aber weiterhin unverstanden.

5.1.1 *Switch II* als Teil des G-Interface

In dieser Arbeit wurde die Kristallstruktur des Sept7 im GDP-gebundenen Zustand aufgeklärt, welche in der asymmetrischen Einheit ein G-Dimer bestehend aus zwei Sept7-Untereinheiten enthält. Die vielzähligen Wechselwirkungen, die zur Ausbildung des G-Interface in der Kristallstruktur von Sept2 beschrieben wurden, findet man auch in der Struktur von Sept7(29 - 297)·GDP wieder (Abb. 4.8).

Im Vergleich zu den früher gelösten Strukturen ist die Elektronendichte des *switch II* Bereiches (Aminosäuren 94 - 108) in der Struktur von Sept7(29 - 297) sehr gut definiert. Dabei bilden die *switch II* Bereiche der beiden Untereinheiten gegenseitige Kontakte aus und stellen somit einen Teil des G-Interface. Diese Wechselwirkungen werden dabei überwiegend durch die Seitenketten zweier Aminosäuren vermittelt. Zum Einen bilden die zwei Asp-103 der beiden Untereinheiten gegenseitige Wasserstoffbrückenbindungen. Zum Anderen kontaktiert Val-102 der einen Untereinheit die hydrophobe Tasche der anderen Untereinheit, die durch Asn-104, Trp-108 und Leu-156 geformt wird. Mit Hilfe der Mutationsstudien in Kombination mit der analytischen Gelfiltration wurde gezeigt, dass die Mutationen Sept7(V102D) und Sept7(D103A) jeweils zu einer starken Schwächung der Dimerisierung führen. Dieses Ergebnis weist daraufhin, dass der *switch II* Bereich einen wichtigen Beitrag zur Stabilität des G-Interface leistet.

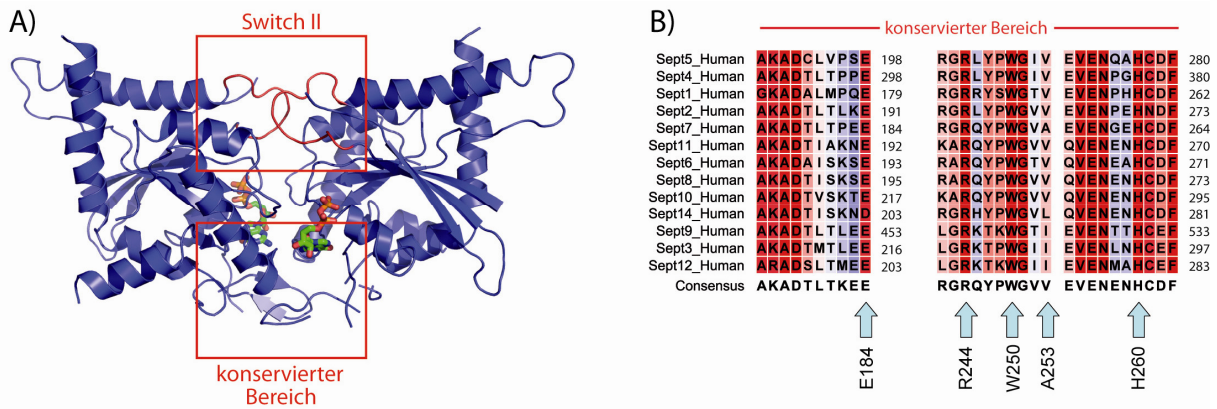


Abb. 5.1 Aminosäurereste des G-Interface. A) Lokalisation des *switch II* Bereiches und des konservierten Bereiches in der Struktur des G-Dimers von Sept7. B) Alignment der Aminosäuresequenzen der humanen Septine im konservierten Bereich. Mit rot sind konservierte und mit blau nicht konservierte Aminosäurereste gekennzeichnet.

Weder in der Struktur von Sept2 noch in der niedrig aufgelösten Struktur des humanen Septinkomplexes bestehend aus Sept2, Sept6 und Sept7 ist die Elektronendichte des *switch II* Bereiches klar definiert. Der Vergleich der Aminosäuresequenz in allen Septinen von der Hefe bis hin zum Menschen zeigt aber eine starke Konservierung der Positionen, welche dem Val-102 und dem Asp-103 in Sept7 entsprechen (Abb. 5.3). So findet man in allen Septinen an der Position, welche dem Asp-103 im Sept7 entspricht, entweder ebenfalls ein Aspartat oder ein Asparagin. Beide Aminosäuren sind sich sehr ähnlich und dadurch zur Ausbildung derselben Bindungsart fähig. Auch die hydrophoben Wechselwirkungen von Val-102 scheinen in allen Septinen konserviert zu sein, denn in anderen Septinen kommen in der entsprechenden Position neben Valin entweder Leucin, Isoleucin oder Methionin vor. Dies spricht dafür, dass die Wechselwirkungen des *switch II* Bereiches analog zum Sept7 für die Funktion aller Septine essentiell sind.

5.1.2 Unterschiede zwischen den Septin-Gruppen.

Trotz der Konservierung der meisten Aminosäurereste, welche in die Bindungen des G-Interface involviert sind, wurden bei der Charakterisierung der Vertreter verschiedener Septin-Gruppen signifikante Unterschiede bei der Homodimerisierung über das G-Interface identifiziert. Bei Sept2 wurde die Dimerisierung über das G-Interface, welche bereits früher beobachtet werden konnte (Sirajuddin *et al.*, 2007), bestätigt, allerdings ist sie deutlich schwächer im Vergleich zum starken G-Dimer des Sept7.

Der Vergleich der Aminosäuresequenz von Sept7 mit Vertretern der Gruppe 2 zeigte, dass die Aminosäurereste, welche bei Sept7 für die Wechselwirkungen im G-Interface verantwortlich sind, stark konserviert sind. Der einzige signifikante Unterschied zwischen Sept7 und den Vertretern der Gruppe 2 ist die Position, welche der Aminosäure Ser-149 in Sept7 entspricht. Bei den meisten Septinen befinden sich auf dieser Position kleinere Aminosäuren wie z.B. Serin oder Threonin (Abb. 4.12). Sept2 weist hingegen auf dieser Position ein sperriges Phenylalanin auf. Bei früheren Untersuchungen des Sept2 wurde das Phe-156 als ein bedeutender Teil des G-Interface identifiziert, welcher einen wichtigen Beitrag zur Stabilität des G-Interface im Sept2-Homodimer leistet (Sirajuddin *et. al.*, 2007). Auch bei allen anderen Vertretern der Gruppe 2 von *Drosophila* bis hin zum Menschen ist das sperrige Phenylalanin in dieser Position evolutionär konserviert und scheint somit ein wichtiges Merkmal dieser Gruppe zu sein (Abb. 4.12).

Mutationsstudien (Abb. 4.13) an Sept7 verdeutlichten, dass die Substitution des Ser-149 durch ein sperriges Phenylalanin eine partielle Monomerisierung zur Folge hat, was auf eine Destabilisierung des G-Dimers hinweist. Der Vergleich der Kristallstrukturen von Sept2 und Sept7 im GDP-gebundenen Zustand (Abb. 4.11) spricht dafür, dass im Sept2-Homodimer das sperrige Phe-156 die Untereinheiten so weit auseinander schiebt, dass die *switch* II Bereiche keine gegenseitigen Kontakte mehr ausbilden können. Die daraus resultierende Schwächung des G-Interface wird durch die partielle Dimerisierung des Sept2 mit Hilfe der analytischen Gelfiltration sichtbar. Die Bindung zwischen Sept2 und Sept6 wird durch diese Substitution allerdings nicht beeinflusst (Abb. 4.45).

Bei den G-Domänen des Sept6 und Sept9 wurde hingegen keine Homodimerisierung festgestellt. Alle Ergebnisse deuten eher darauf hin, dass die G-Domänen von Sept6 und Sept9 monomer sind (Abb. 4.40). Beim Vergleich der Aminosäuresequenzen zwischen Sept7 und Vertretern der Gruppen 3 und 6 konnten allerdings keine offensichtlichen Unterschiede in der Aminosäuresequenz im G-Interface identifiziert werden, welche eine Verhinderung der Dimerisierung über das G-Interface bei Sept6 und Sept9 erklären würden.

5.2 Eigenschaften der G-Domäne des Sept7

Das wichtigste Merkmal der GNBPs und somit auch der Septine ist die Fähigkeit Guaninnukleotid zu binden und zu hydrolysieren. Frühere Untersuchungen der Septine lieferten oft unterschiedliche und teils widersprüchliche Werte für die Nukleotidaffinitäten und Hydrolyseraten. Die Ergebnisse variierten dabei je nach Zusammensetzung des untersuchten Komplexes.

Die Charakterisierung des hetero-oktameren Septin-Komplexes aus *S. cerevisiae* deutet auf eine starke Nukleotidbindung mit einer Polypeptid / Nukleotid-Stöchiometrie von 1 : 1 hin. Bei Teilkomplexen, wie z.B. dem dimeren Komplex aus Cdc3 und Cdc12, wurden hingegen deutlich niedrigere Nukleotidaffinitäten mit $K_D(\text{GDP}) = 2,1 \mu\text{M}$ und $K_D(\text{GTP}\gamma\text{S}) = 1,6 \mu\text{M}$ gemessen (Farkasovsky *et. al.*, 2005). Auch beim humanen Sept2 wurden ähnlich niedrige Nukleotidaffinitäten mit $K_D(\text{GDP}) = 1,75 \mu\text{M}$ und $K_D(\text{GTP}\gamma\text{S}) = 0,26 \mu\text{M}$ identifiziert (Huang *et al.*, 2006). In dieser Hinsicht ähneln sie den GADs-Proteinen, welche eine Nukleotidaffinität im mikromolaren Bereich aufweisen. In allen Fällen enthielten die Komplexe nach der Isolierung mehr GDP als GTP. Beim oktameren Komplex aus *S. cerevisiae* wurde jedoch nur eine sehr langsame GTP-Hydrolyserate mit $k_{\text{cat}} = 0,005 \text{ min}^{-1}$ gemessen. Beim dimeren Cdc3-Cdc12 Komplex und beim humanen Sept2 waren die GTP-Hydrolyseraten mit $k_{\text{cat}} = 0,019 \text{ min}^{-1}$ bzw. $k_{\text{cat}} = 0,0162 \text{ min}^{-1}$ hingegen etwas schneller.

Daher wurden in dieser Arbeit die Wechselwirkungen zwischen den Nukleotiden und Sept7 genauer charakterisiert. Die Versuche, ein nukleotidfreies Wildtyp-Konstrukt zu erzeugen, waren nicht erfolgreich, daher wurden für die Charakterisierung unterschiedliche Sept7-Konstrukte verwendet, welche Mutationen im G-Interface aufwiesen. Die Mutationen schwächten die Dimerisierung über das G-Interface und ermöglichten dadurch Präparationen der nukleotidfreien Proteine. Da die Mutationsstellen weit von der Nukleotidbindungsstelle entfernt lagen, sollten sie keinen Einfluss auf die Wechselwirkungen zwischen dem Protein und dem Nukleotid haben.

5.2.1 Nukleotidbindung

Die kinetischen Eigenschaften der Wechselwirkungen zwischen Sept7 und den Nukleotiden wurden mit einer *Stopped-flow* Apparatur untersucht. Zudem wurden die Bindungsaffinitäten direkt durch Titrationsmessungen bestimmt. Die Ergebnisse

der Charakterisierung sind in Tab. 5.1 zusammengefasst. Hierbei konnte ein Einfluss der Dimerisierung auf die gemessenen Nukleotidaffinitäten nachgewiesen werden.

Tab. 5.1 Charakterisierung der Wechselwirkungen zwischen Sept7 und Nukleotiden.

		V102D	D103A	E184A
<i>Stopped-flow</i> mGppNHp	k_{ass}	$0,0135 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$	$0,0164 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$	$0,019 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$
	k_{dis}	$0,0635 \text{s}^{-1}$	$0,0712 \text{s}^{-1}$	$0,109 \text{s}^{-1}$
	K_{D}	$4,70 \mu\text{M}$	$4,34 \mu\text{M}$	$5,74 \mu\text{M}$
Titration	$K_{\text{D}}(\text{mGDP})$		$13,2 \mu\text{M}$	$17,7 \mu\text{M}$
	$K_{\text{D,Ges}}(\text{mGDP})$		$4,63 \mu\text{M}$	
	$K_{\text{D}}(\text{mGppNHp})$		$3,92 \mu\text{M}$	$3,16 \mu\text{M}$
	$K_{\text{D,Ges}}(\text{mGppNHp})$		$0,60 \mu\text{M}$	

Sowohl die kinetischen Messungen mit der *Stopped-flow* Apparatur als auch die Titration mit Sept7(E184A), das keinerlei Anzeichen einer Dimerisierung aufwies, zeigten, dass die Sept7-Konstrukte relativ niedrige Nukleotidaffinität im mikromolaren Bereich haben, und in dieser Hinsicht den GADs-Proteinen ähnlich sind (Gasper *et al.*, 2009). Dabei ist die Affinität zu GppNHp mit $K_{\text{D}}(\text{mGppNHp}) = 3,16 - 5,74 \mu\text{M}$ etwas größer als zu GDP mit $K_{\text{D}}(\text{mGDP}) = 13,2 - 17,7 \mu\text{M}$. Zusammen mit zehnfachem Konzentrationsüberschuss von GTP über GDP *in vivo* sollte es einen effizienten Nukleotidaustausch mit der überwiegenden GTP-Beladung ermöglichen. Bei den Titrationsexperimenten mit Sept7(D103A) wurde zudem ein direkter Einfluss der Dimerisierung der Septine auf die gemessene Bindungsaffinität nachgewiesen. Die Auswertung der Messdaten lieferte im Falle von mGppNHp für die Gesamtreaktion bestehend aus Nukleotidbindung und Dimerisierung einen K_{D} -Wert von $K_{\text{D}}(\text{mGppNHp}) = 0,60 \mu\text{M}$, für die Nukleotidbindung allein hingegen einen K_{D} -Wert von $K_{\text{D}}(\text{mGppNHp}) = 3,92 \mu\text{M}$. Eine ähnliche Beobachtung wurde auch im Falle von mGDP gemacht, wo für die Gesamtreaktion ein K_{D} -Wert von $K_{\text{D}}(\text{mGDP}) = 4,63 \mu\text{M}$, für die Nukleotidbindung allein hingegen ein K_{D} -Wert von $K_{\text{D}}(\text{mGDP}) = 13,2 \mu\text{M}$ gemessen wurde. Diese Beobachtungen zeigen, dass die nach der Nukleotidbindung folgende Dimerisierung der Proteine über das G-Interface die Affinität zwischen Sept7 und den Nukleotiden verstärkt, indem sie das Gleichgewicht auf die Seite des Nukleotid-Protein-Komplexes verschiebt (Abb. 5.2).

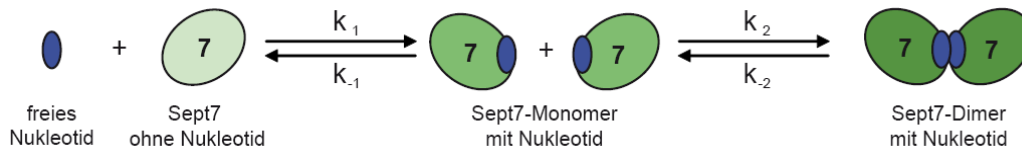


Abb. 5.2 Reaktionen bei Nukleotidbindung. Neben dem normalen Bindungsgleichgewicht zwischen Protein und Nukleotid weisen Septine noch Dimerisierung der mit Nukleotid beladenen Proteine auf.

Der Einfluss der Dimerisierung wurde auch indirekt bei der Analyse des Nukleotidgehalts der gereinigten *switch II* Mutationen des Sept7 beobachtet. Dabei wurde eine partielle Dissoziation des Nukleotids während der Reinigung der Proteine festgestellt, wobei eine Korrelation zwischen der Dimerstabilität und der Nukleotidbeladung der *switch II* Mutanten erkennbar war (Abb. 4.14). Konstrukte mit einer stärkeren Tendenz zur Dimerisierung zeigen dabei einen größeren Nukleotidgehalt. Im Vergleich dazu weisen die monomeren Konstrukte eine niedrigere Nukleotidaffinität auf, was zu einem schnelleren Verlust des Nukleotids während der Reinigung führte.

Der hier beobachtete Einfluss der Dimerisierung auf die Nukleotidaffinität erklärt auch die unterschiedlichen Ergebnisse bei früheren Untersuchungen (Farkasovsky *et. al.*, 2005). Wenn die Untereinheiten des untersuchten Komplexes starke Kontakte über das G-Interface ausbilden, dann erhöht die Dimerisierung die gemessene Nukleotidaffinität, indem sie das Gesamtgleichgewicht zugunsten des gebundenen Nukleotids verschiebt. Steht hingegen kein geeigneter Interaktionspartner zur Verfügung zeigt das Protein eine niedrigere Nukleotidaffinität im mikromolaren Bereich.

5.2.2 Intrinsische Hydrolyse von GTP

Die Dimerisierung der Septine beeinflusste auch die Messergebnisse der GTP-Hydrolyse in den *multi-turnover* Experimenten. So zeigten die Sept7-Konstrukte mit den Mutationen im G-Interface unterschiedliche Hydrolyseraten, wobei beim Wildtyp-Konstrukt der niedrigste und bei der monomeren E184A-Mutante der höchste Wert beobachtet wurde (Tab. 5.2). In den *multi-turnover* Experimenten wird jedoch eine komplexe Reaktion bestehend aus Bindung, Hydrolyse und Freisetzung des Nukleotids analysiert. Im Falle der Septine ist dabei die Nukleotidfreisetzung der geschwindigkeitsbestimmende Schritt. Genauer gesagt bestimmt die Dissoziation der Dimere die Geschwindigkeit der Gesamtreaktion in den *multi-turnover* Experimenten. Die starke Dimeraffinität resultiert in einer langsamen Dimerdissoziation und somit auch in einer langsamen GTP-Hydrolyse. Dieser Vorgang beschränkt sich nicht nur

auf Sept7, sondern wurde auch bei der Messung der GTP-Hydrolyse des partiell dimeren Sept2(wt) und des monomeren Sept2(F156D) beobachtet (Tab. 5.2). Außerdem wurde beim Komplex aus Sept2 und Sept6 eine 50-fach langsamere Hydrolyserate als beim Sept2 alleine gemessen. Auch frühere Messungen der langsameren GTP-Hydrolyse des Septin-Komplexes aus *S. cerevisiae* im Vergleich zum Teilkomplex aus Cdc3 und Cdc12 lassen sich durch den Einfluss der Dimerisierung erklären (Farkasovsky *et. al.*, 2005). So bilden im Falle des hetero-oktameren Komplexes aus *S. cerevisiae* alle Untereinheiten untereinander starke Kontakte über das G-Interface aus. Dies führt zu einer langsameren Nukleotid-dissoziation und in Folge dessen auch zu einer langsameren GTP-Hydrolyse. Steht hingegen kein geeigneter Interaktionspartner für ein G-Dimer zur Verfügung, wie im Falle des dimeren Komplexes aus Cdc3 und Cdc12, dessen Untereinheiten über das NC-Interface aneinander binden, so hat dies eine schnellere Nukleotiddissoziation und somit auch eine schnellere GTP-Hydrolyse zur Folge.

Tab. 5.2 Hydrolyserate in den *multi-turnover*-Experimenten.

Protein	k_{cat}	Protein	k_{cat}
Sept7 _{WT}	$0,073 \cdot 10^{-2} \text{ min}^{-1}$	Sept2 _{WT}	$1,42 \cdot 10^{-2} \text{ min}^{-1}$
Sept7 _{S149F}	$0,57 \cdot 10^{-2} \text{ min}^{-1}$	Sept2 _{F156D}	$3,73 \cdot 10^{-2} \text{ min}^{-1}$
Sept7 _{V102D}	$2,14 \cdot 10^{-2} \text{ min}^{-1}$	Sept2 _{T78G}	$0,31 \cdot 10^{-2} \text{ min}^{-1}$
Sept7 _{E184A}	$4,73 \cdot 10^{-2} \text{ min}^{-1}$		
Sept7 _{T71A}	$0,17 \cdot 10^{-2} \text{ min}^{-1}$	Sept9 _{WT}	$6,4 \cdot 10^{-2} \text{ min}^{-1}$
Sept7 _{T71A,E184A}	$0,38 \cdot 10^{-2} \text{ min}^{-1}$	Sept6 _{WT}	-

Die direkte Messung der Hydrolyserate erfolgte in *single-turnover* Experimenten mit Hilfe einer *Stopped-flow* Apparatur. Sowohl für Sept7(D103A), wo eine dreistufige Reaktion mit einer Dimerisierung beobachtet wurde, als auch für Sept7(E184A), wo nur eine zweistufige Reaktion ohne einen Hinweis auf eine Dimerisierung beobachtet wurde, konnten sehr ähnliche Hydrolyseraten ermittelt werden. $k_{cat}(\text{Sept7}_{D103A}) = 3,33 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ und $k_{cat}(\text{Sept7}_{E184A}) = 7,88 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ liegen dabei in der gleichen Größenordnung wie die intrinsische Hydrolyserate von Ras.

Ein Charakteristikum der Klasse der dimerisierenden G-Proteine, GADs (*G-proteins activated by nucleotide-dependent dimerization*), ist die Aktivierung der GTPase durch die reziproke Komplementierung ihres aktiven Zentrums in der dimeren Form (Gasper *et al.*, 2009). Bei den Septinen wurden allerdings keine Hinweise auf eine

GTPase-Aktivierung durch die Dimerisierung nachgewiesen, was eher gegen eine Klassifizierung der Septine zu den GADs spricht.

Die GTPase-Aktivität wurde neben Sept7 auch bei Sept2, Sept6 und Sept9, welche jeweils verschiedene Septin-Gruppen repräsentieren, untersucht. Dabei wurde bei allen Septinen außer bei Sept6 die intrinsische GTP-Hydrolyse gemessen (Tab. 5.2). Die Ergebnisse stimmen mit der Nukleotidbeladung der einzelnen Untereinheiten überein, welche in der Kristallstruktur des humanen Septinkomplexes aus Sept2, Sept6 und Sept7 identifiziert wurden, wobei Sept6 dabei als einzige Untereinheit das GTP-Nukleotid enthielt (Sirajuddin *et al.*, 2007). Darüber hinaus ist die Hydrolyserate von Sept9, welches keine Homodimere über das G-Interface ausbildet, dabei mit $k_{cat}(\text{Sept9}) = 6,4 \cdot 10^{-2} \text{ min}^{-1}$ der Hydrolyserate der monomeren Sept7(E184A)-Mutante sehr ähnlich.

	P-loop		Switch I		Switch II					
Sept1_Human	GESGLGKSTL	INS	LFLTN	LYE - DRQVPE	ASARLTQTLA	IERRGVEI	VDTPGFQD	SV	DCS - DCWL	PV
Sept2_Human	GESGLGKSTL	INS	LFLTD	LYP - ERVIPG	AAEKIERTVQ	IEASTVEI	VDTPGFQDAI	NCR - DCFK	TI	
Sept4_Human	GESGLGKSTL	VNS	LFLTD	LYR - DRKLLG	AEERIMQTV	ITKHAVDI	VDTPGFQDAV	NNT - ECWK	PI	
Sept5_Human	GESGLGKSTL	VHS	LFLTD	LYK - DRKLLS	AEERISQTV	ILKHTVDI	VDTPGFQDAV	NNT - ECWK	PI	
Sept7_Human	GESGLGKSTL	INS	LFLTD	LYS - PE - YPG	PSHRIKKTIVQ	VEQSKVLI	VDTPGFQDAV	DNS - NCWQ	PV	
Sept6_Human	GETGLGKSTL	MDT	LFNTK	FEG - - - - - E	PATHTQPGVQ	LQSNITYDL	VSTVGFQDQI	NKE - DSYK	PI	
Sept8_Human	GETGIKSTL	MNT	LFNTT	FET - - - - - E	EASHHEACVR	LRPQTYDL	VDAVGFQDQI	NKD - ESYR	PI	
Sept11_Human	GETGIKSTL	MDT	LFNTK	FES - - - - - D	PATHNEPQVR	LKARSYEL	VDTVGFQDQI	NKD - DSYK	PI	
Sept10_Human	GETGIKSTL	IDT	LFNTN	FED - - - - - Y	ESSHFQPNVK	LKAQTYEL	VNTVGFQDQI	NKE - ESYQ	PI	
Sept14_Human	GETGIKSTL	IDT	LFNTN	LKD - - - - - N	KSSHFYSNVG	LQIQTYEL	VETVGFQDQI	DKE - ASYQ	PI	
Sept3_Human	QSGGLGKSTL	VNT	LFKSQ	VSRKASS - WN	REEKIPKTV	IKAIIGHVI	IDTPGFQDQI	NNE - NCWE	PI	
Sept9_Human	QSGGLGKSTL	INT	LFKSK	ISRKSVQ - PT	SEERIPKTI	IKSI THDI	IDTPGFQDHI	NNE - NCWQ	PI	
Sept12_Human	QSGGLGKSTM	VNT	LFKSK	VW - KSNP - PG	LGVPTPQTLQ	LHSLTHVI	TDTPGFQDQI	NND - NCWD	PI	
Unc-59_C.eleg	GRSGLGKSTF	INT	LF LAE	INN LNEKESA	PTHHPHSTVR	VEEKLVKL	VDTPGFQDAV	NNS - KCWE	PI	
Unc-61_C.eleg	GETGTGKTTL	IES	LFNMK	LDF - - - - - E	PCNHELKTV	LRTCTKDV	VETAGFQDQL	DKD - KSAK	VI	
Sep1_Dros	GESGLGKSTL	VNS	LFLTD	LYP - ERIIPD	AIEKQKQTVK	LEASTVEI	VDTPGFQDAI	DNS - NSF	GAI	
Sep4_Dros	GESGLGKSTL	INS	LF LGD	LYK - NRQMPN	VEERIEKTTK	VEKKTMDI	VDTPGFQDAI	NCE - DSWR	VC	
Pnut_Dros	GASGLGKSTL	INS	LF LSD	IYN - AEQYPG	PSLRKKTVA	VEATKVML	VDTPGFQDAV	DNS - NCWV	PI	
Sept2_Dros	GETGLGKSTL	MDT	LFNTS	FES - - - - - T	PSPHTLPSVK	LKAHTYEL	CDTVGFQDQI	NKD - DS	FKA	
Sep5_Dros	GETALGKSTL	MDT	LFNTS	FGS - - - - - T	PSPHNLPSVK	LKANTYEL	CDTIGVGDQV	NKA - DSY	KAL	
Cdc3_yeast	GPDGIKSTTL	MKT	LFNND	EEGQGEHEN	QSQEQRHKVK	IKSYESVI	IDTEGFQDFL	NNDQK	SWDPI	
Cdc10_yeast	QSGGLGKSTL	INT	LFASH	LIDSATGDDI	SALPVTKTE	MKISTHTL	IDTPGFQDFI	DNS - KAW	EP	
Cdc11_yeast	QSGSGRSTF	INT	LCGQQ	- - - - -	TDTSTEIDLQ	LRREETVEL	IDTPGFQDSL	DNS - SF	EII	
Cdc12_yeast	GESGLGKSTL	INT	LFQTV	LKRADGQQ - H	RQEP I RKTVE	IDITRALL	IDTPGFQDNV	NNN - KAW	QPL	
Shs1_yeast	GPAGTGTAF	ANN	LFETK	IPSYVSEFDP	MRANLEPGIT	ITSTLEL	IMTHGIGENL	DDSL - CS	EEV	
Spr3_yeast	QSGGLGKSTF	INS	LFSTS	- - - - - D	DIKENKPIR	YKS - - - - I	IDTPGFQGNM	DNAF - TW	RTM	
Spr28_yeast	GEKSGKSTF	LNN	LCGQD	- - - - -	KTAHLSPLGL	LVTRRVYL	ILFPGCQDNV	DNSQS - V	VI	

Abb. 5.3 Vergleich der Aminosäuresequenzen der Septine. Dargestellt sind die P-loop, sowie der switch I und switch II Bereich der Septine von Mensch, *C. elegans*, *Drosophila* und *S. cerevisiae*. Mit rot sind konservierte und mit blau nicht konservierte Aminosäurereste gekennzeichnet. Das Threonin im switch I Bereich, welches an der Koordinierung des Mg^{2+} -Ions beteiligt ist, wurde grün markiert.

Der Mechanismus der Nukleotidhydrolyse ist bei Septinen bisher noch nicht verstanden. Die Septine weisen z.B. kein Glutamin auf, welches in Ras das nukleophil angreifende Wasser positioniert. Die einzige Aminosäure, welche nachgewiesenermaßen direkt in die Nukleotidhydrolyse der Septine involviert ist, ist ein konserviertes Threonin im switch I Bereich (Sirajuddin *et al.*, 2009). Auch die

Struktur von Sept7(S149F) im GppNHp gebundenen Zustand zeigt, dass Thr-71, welches dem Thr-78 in Sept2 entspricht, an der Koordinierung des Mg^{2+} -Ions beteiligt ist. Zudem wurde während der Messungen der GTP-Hydrolyse bei Sept7(T71A) eine langsamere GTP-Hydrolyse beobachtet.

Die Anwesenheit des konservierten Threonins im *switch* I Bereich kann auch auf die intrinsische GTP-Hydrolyse bei den anderen Septine hinweisen. Wie die Charakterisierung der Vertreter der einzelnen Septin-Gruppen gezeigt hat, weisen alle humanen Septine, mit Ausnahme der Vertreter der Gruppe 6, die Fähigkeit zur intrinsischen GTP-Hydrolyse auf. Gleichzeitig haben nur die Vertreter der Gruppe 6 kein konserviertes Threonin im *switch* I Bereich. Im Falle der Septine aus *S. cerevisiae* wurde nur bei Cdc10 und Cdc12 die intrinsische GTP-Hydrolyse nachgewiesen (Versele und Thorner, 2004). Diese Septine sind auch die einzigen, welche ein Threonin in der erwarteten Position im *switch* I Bereich aufweisen.

Der Vergleich der Aminosäuresequenz der Septine aus anderen Organismen zeigt, dass bei *C. elegans* beide Septine, Unc-59, welches zum humanen Sept7 homolog ist, und Unc-61, welches in die Gruppe 6 eingeteilt wird, einen Threonin-Rest im *switch* I Bereich besitzen. Der rekombinant hergestellte Komplex aus Unc-59 und Unc-61 enthielt ausschließlich GDP und kein GTP, was die Vermutung unterstützt, dass beide Septine zur Nukleotidhydrolyse fähig sind (John *et al.*, 2007). In höher entwickelten Organismen wie z.B. *Drosophila*, *Danio Rerio* oder *Xenopus tropicalis* weisen ähnlich wie beim Menschen nur die Vertreter der Gruppe 6 kein konserviertes Threonin im *switch* I Bereich auf. Dies lässt vermuten, dass der Verlust der Fähigkeit der intrinsischen GTP-Hydrolyse bei den Vertretern der Gruppe 6 von den Insekten bis hin zum Menschen konserviert ist und ein wichtiges Merkmal dieser Gruppe darstellt. Der Grund hierfür bleibt aber weiterhin zu klären.

Die Analyse der Aminosäuresequenz zeigt zudem ein weiteres Merkmal bei Vertretern der Gruppe 6. Im Vergleich zu den anderen Septinen weisen sie einen um 5-6 Aminosäuren kürzeren *switch* I Bereich auf (Abb. 5.3). Weil bis jetzt jedoch keine Informationen über die Funktion des *switch* I Bereiches der Septine vorhanden ist, lässt sich nicht sagen, welche Auswirkungen diese Deletion auf die Eigenschaften von Vertretern der Gruppe 6 hat.

5.3 Einfluss des Nukleotidzustandes auf die Stabilität des G-Dimers

Bei der Charakterisierung der Mutanten des Sept7(29 - 297) wurde ein signifikanter Beitrag des *switch* II Bereiches zur Stabilität des G-Interface nachgewiesen. Die nukleotid-abhängige Konformationsänderung der *switch* Bereiche in anderen GNBP's lässt vermuten, dass die Stabilität des G-Interface bei Septinen vom Nukleotid-zustand abhängig ist.

Für die Überprüfung dieser Vermutung wurden die kinetischen Eigenschaften bezüglich der Dimerisierung der Septine mit Hilfe von SPR-Messungen untersucht. Dabei konnten jedoch nur die Dissoziationsraten der Dimere gemessen werden. Bei vielen Protein-Protein-Interaktionen ist die Assoziationsrate durch Diffusion und Struktur der Proteine limitiert und liegt typischerweise im Bereich $10^5 - 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, wie z.B. bei Bindungen zwischen Antikörpern und ihren Antigenen (Foote J. und Eisen H.N, 1995) oder zwischen den Interferonen und ihren Rezeptoren (Piehler und Schreiber, 1999). Die Dissoziationsrate hängt hingegen von der Stärke der direkten Wechselwirkungen in der Kontaktfläche der Komplexe ab und bestimmt daher in erster Näherung die Stabilität der Komplexe (Janin, 1995).

Der Vergleich der gemessenen Dissoziationsraten der Sept7-Dimere beim Wildtyp-Konstrukt und bei den Mutanten Sept7(D103A) und Sept7(E184A) im GDP-gebundenen Zustand zeigte, dass die Dissoziation beim Wildtyp ca. 50-mal langsamer als bei der D103A-Mutante und sogar 570-mal langsamer als bei der E184A-Mutante verlief. Dies stimmt mit anderen Experimenten, wie z.B. der analytischen Gelfiltration sowie den Versuchen zur Wechselwirkung mit den Nukleotiden, überein. Alle diese vorherigen Experimente identifizierten das Wildtyp-Konstrukt als das stärkste und die E184A-Mutante als das schwächste G-Dimer. Diese Ergebnisse unterstützen die Vermutung, dass die jeweiligen Dissoziationsraten die Stabilität der entsprechenden Septindimere widerspiegeln. Daher können die Dissoziationsraten der Sept7-Dimere dafür verwendet werden, Rückschlüsse über die Stabilität des G-Interface in verschiedenen Nukleotidzuständen zu ziehen.

Tab. 5.3 Gemessene Dissoziationsraten der Sept7-Dimere.

Konstrukt	Dissoziationsrate der Dimere in	
	GDP-Zustand	GppNHp-Zustand
Sept7wt	$3,87 \cdot 10^{-5} \text{ s}^{-1}$	-
Sept7(D103A)	$2,01 \pm 0,09 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$	$0,246 \pm 0,039 \text{ s}^{-1}$
Sept7(E184A)	$2,11 \pm 0,16 \cdot 10^{-2} \text{ s}^{-1}$	$2,47 \text{ s}^{-1}$

Weil der Nukleotidaustausch beim Wildtyp-Konstrukt nicht erfolgreich war, konnten die Messungen der Dissoziationsraten der Sept7-Dimere im GppNHp-gebundenen Zustand nur bei den Mutanten Sept7(D103A) und Sept7(E184A) durchgeführt werden. Im Vergleich zur Dissoziationsrate im GDP-gebundenen Zustand ist die Dissoziation der Sept7(D103A)-Dimere im GppNHp-gebundenen Zustand ca. 120-fach schneller. Auch bei Sept7(E184A) sind die relativen Unterschiede zwischen beiden Nukleotidzuständen ähnlich wie bei Sept7(D103A). Diese Ergebnisse zeigen, dass die Stabilität des G-Dimers vom Nukleotidzustand seiner Untereinheiten abhängt. Liegen die Untereinheiten im Triphosphatzustand vor, so ist das G-Dimer deutlich instabiler verglichen mit der Situation im GDP-gebundenen Zustand.

Die Unterschiede der Dimeraffinitäten für verschiedene Nukleotidzustände zusammen mit dem Einfluss der Dimerisierung auf die Nukleotidaffinität können auch die Schwierigkeiten beim Nukleotidaustausch im Falle des Wildtyp-Konstrukts von Sept7 erklären. Die deutlich stärkere Dimeraffinität im GDP-gebundenen Zustand im Vergleich zum GppNHp-gebundenen Zustand führt dazu, dass beim Nukleotidaustausch das Gesamtgleichgewicht bestehend aus Nukleotidbindung und Dimerisierung zugunsten des gebundenen GDP-Nukleotids verschoben wird. Die Unterschiede innerhalb der Dimeraffinitäten sind dabei so stark, dass sie die niedrigere Affinität von GDP verglichen mit GppNHp und sogar den beim Nukleotidaustausch verwendeten Überschuss an GppNHp ausgleichen können.

5.4 Modell der nukleotid-abhängigen Stabilität des G-Interface

Basierend auf den Ergebnissen der Charakterisierung von Sept7 ist das folgende Modell über die Rolle des Nukleotidzustandes für die Funktion der Septine vorstellbar.

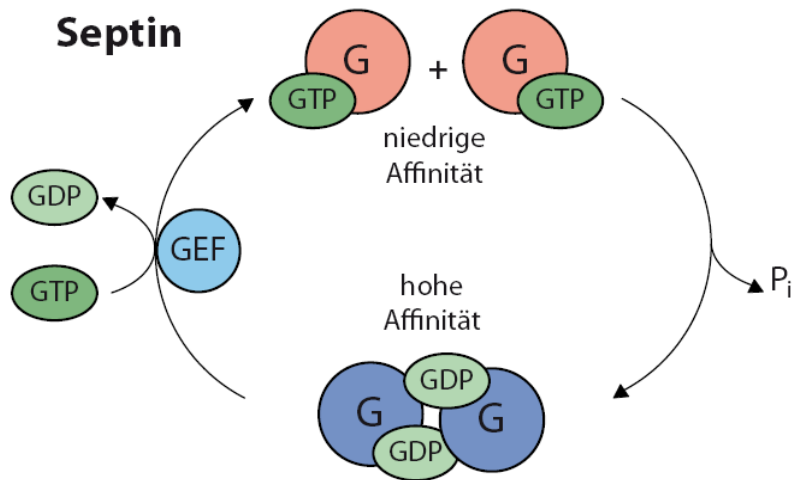


Abb. 5.4 Rolle der GTPase-Aktivität für die Funktion der Septine. Im GDP-gebundenen Zustand bilden die Septine stabile Kontakte über das G-Interface aus, was zur Bildung der Septinfilamente führt. Im GTP-gebundenen Zustand ist die Stabilität des G-Interface geringer, so dass die Untereinheiten sich neu ordnen können. Nach der GTP-Hydrolyse werden die bestehenden Kontakte verstärkt und die Septinstrukturen somit stabilisiert.

Im GDP-gebundenen Zustand bilden die *switch* II Bereiche der beiden Untereinheiten des G-Dimers gegenseitige Kontakte aus und stabilisieren dadurch das G-Interface. Diese Interaktion wird dabei vor allem durch die Aminosäurereste vermittelt, welche dem Val-102 und dem Asp-103 des humanen Sept7 entsprechen (Abb. 5.5). Die Konservierung dieser Positionen in allen Septinen von der Hefe bis hin zum Menschen spricht dafür, dass die Wechselwirkungen des *switch* II Bereiches für die Funktion aller Septine entscheidend sind.

Nach dem Austausch des gebundenen GDP-Nukleotids gegen GTP werden durch Gegenwart des γ -Phosphats Konformationsänderungen der *switch* I und II Bereiche induziert. In diesem Zustand kann der *switch* II Bereich wahrscheinlich nicht mehr zur Stabilität des G-Interface beitragen (Abb. 5.5). Wegen der geringen Stabilität des G-Interface können die Untereinheiten dissoziieren und sich neu anordnen.

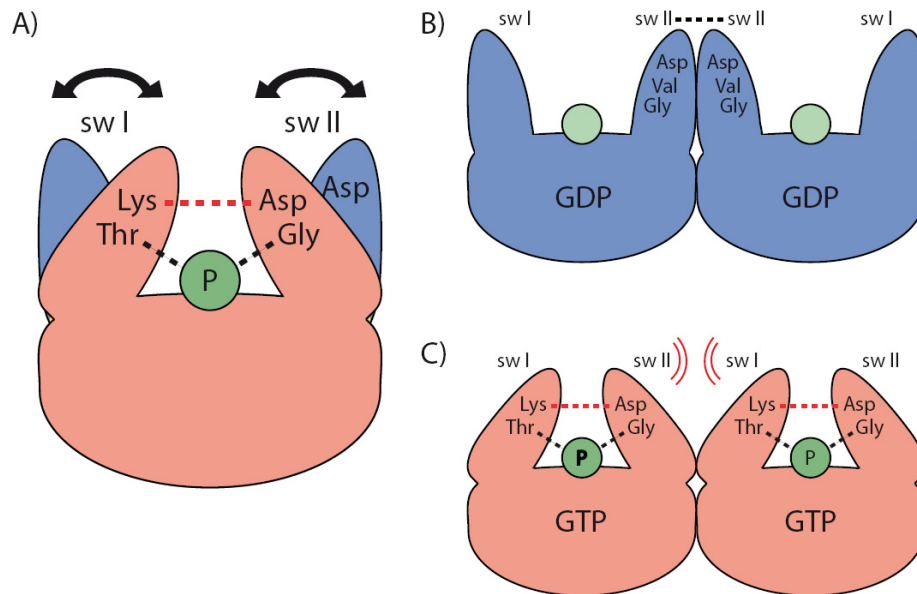


Abb. 5.5 Rolle des Nukleotids für Stabilität des G-Interface. A) Nukleotid-abhängige Konformationsänderungen der *switch* Bereiche. B) Im GDP-gebundenen Zustand bilden die *switch* II Bereiche der beiden Untereinheiten des G-Dimers gegenseitige Kontakte aus und stabilisieren dadurch das G-Interface. C) In Gegenwart von γ -Phosphat finden die Konformationsänderungen der *switch* Bereiche statt, so dass *switch* II Bereich nicht mehr zur Stabilität des G-Interfaces beiträgt.

Auch im Triphosphat-Zustand können die Septine wahrscheinlich lockere Filamente ausbilden, vor allem dann wenn ihre lokale Konzentration durch die Bindung an Proteine wie Borgs oder an eine Membran, welche PIP2-Lipide enthält, erhöht wird. Nach der GTP-Hydrolyse können die *switch* II Bereiche ihre ursprüngliche Konformation wieder einnehmen und zusätzliche gegenseitige Kontakte im G-Interface ausbilden. Dies führt dazu, dass die bestehenden Kontakte verstärkt und die Septinfilamente somit stabilisiert werden. Die GTP-Hydrolyse und die Nukleotiddissoziation stellen dabei einen Zeitgeber für den biologischen Effekt der Septine dar.

Vergleich mit Aktin und Tubulin

Auch Aktin und Tubulin nutzen die Nukleotidhydrolyse um ihre Dynamik zu steuern. Im Gegensatz zum oben vorgestellten Modell der Septine sind die Kontakte zwischen den Baueinheiten in Aktinfilamenten und Mikrotubuli im Triphosphatzustand stabiler als im Diphosphatzustand (Abb. 1.1). Bei diesen Proteinen führt die Nukleotid-hydrolyse zur Destabilisierung der Kontakte zwischen den Baueinheiten. Sie begrenzt die Dauer des Triphosphatzustandes und bestimmt somit wie lange die Filamente stabil bleiben. Dies ermöglicht eine schnelle kontinuierliche Umorganisation der Filamente.

Die Septinfilamente, die ihre Struktur über einen längeren Zeitraum beibehalten müssen (Abb. 1.6), sind hingegen im GDP-gebundenen Zustand stabiler. Da der GDP-Zustand nicht durch den zeitlichen Rahmen der Hydrolyse begrenzt ist, können die Septinfilamente lange stabil bleiben. Den zeitlich begrenzten GTP-Zustand nutzen sie hingegen nur um eine Veränderung der Anordnung vorzunehmen. In dieser Hinsicht ähneln sie den Intermädiärfilamenten. Diese können ebenfalls über einen langen Zeitraum stabil bleiben und werden nur durch transiente Phosphorylierung destabilisiert um sich neu zu ordnen.

Vergleich mit anderen GNBPs

In den meisten Fällen sind die GNBPs nur im GTP-gebundenen Zustand zur Bindung an ihre Interaktionspartner fähig. Diese Situation kommt z.B. bei der Bindung zwischen den GNBPs der Ras-Superfamilie und ihren Effektor-Proteinen (Abb. 1.2) oder bei der GTP-abhängigen Dimerisierung der GAD-Proteine vor (Abb. 1.4). Auch die Proteine des Cytoskeletts, Aktin und Tubulin, weisen im Triphosphatzustand stärkere Bindungsaffinitäten als im Diphosphatzustand auf. Es gibt hingegen nur wenige Beispiele für spezifische Wechselwirkungen zwischen GNBPs im GDP-gebundenen Zustand und ihren jeweiligen Interaktionspartnern (Abb. 5.6). Hier sind der inaktive $\alpha\beta\gamma$ -Komplex der heterotrimeren G-Proteine (Lambright *et al.*, 1996), sowie der Komplex zwischen Ran und NTF2 (Stewart *et al.*, 1998) als auch die Komplexe bestehend aus GNBPs der Rab- oder Rho-Familie zusammen mit ihren GDIs zu nennen (Rak *et al.*, 2003; Hoffman *et al.*, 2000).

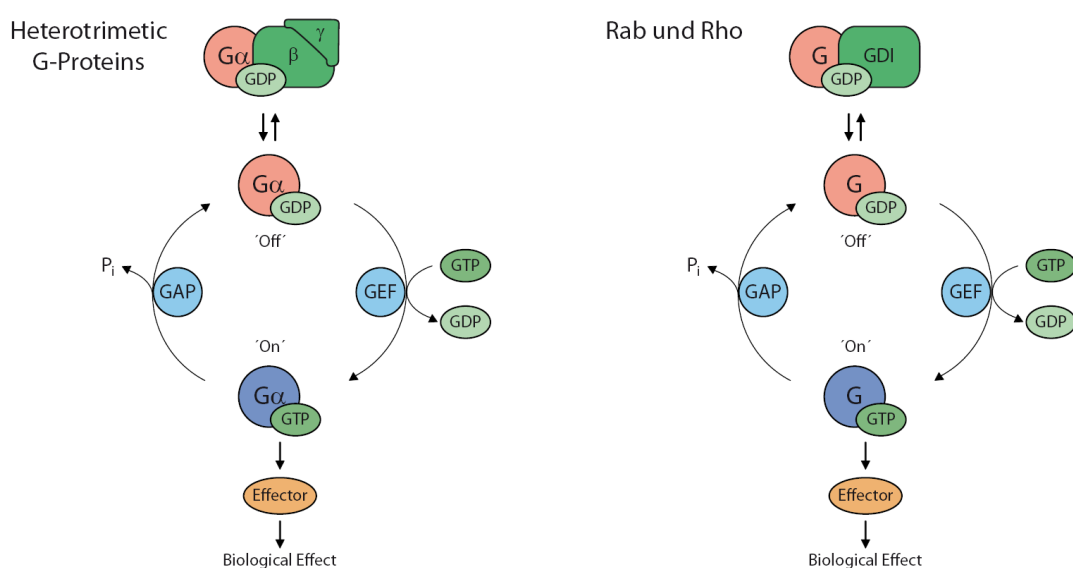


Abb. 5.6 Der nukleotid-abhängige Zyklus der heterotrimeren G-Proteine sowie der GNBPs Rho und Rab.

Die Komplexbildung zwischen Proteinen der Rab- bzw. Rho-Familie und ihren GDIs ist sehr wichtig für die Regulation der intrazellulären Lokalisation dieser GNBPs. Das Zusammenspiel von GEFs, GAPs und GDI ist z.B. für die scharfe Abgrenzung der Lokalisation verschiedener Rab-GNBPs von Bedeutung und stellt somit einen grundlegenden Mechanismus für die Kompartimentierung der Zelle dar (Rivera-Molina und Novick, 2009). GNBPs der Rab-Familie bilden im GDP-gebundenen Zustand Komplexe mit RabGDI, wobei RabGDI einerseits die G-Domäne und andererseits den c-terminalen Lipid-Anker der Rabs bindet (Abb. 5.7). Die beiden Kontaktflächen liegen dabei weit voneinander entfernt, wobei die *switch* Bereiche wichtige Teile der Kontaktfläche zwischen der G-Domäne und RabGDI bilden. Im Triphosphat-Zustand nehmen die *switch* I und II Bereiche hingegen eine neue Konformation ein, welche eine direkte Bindung zwischen der G-Domäne der Rabs und RabGDI verhindert (Rak et al., 2003, Eathiraj et al., 2005). Auch im Falle von Rho ist der *switch* II Bereich ein wichtiger Teil der Kontaktfläche zwischen GNBPs und GDI. Im GTP-gebundenen Zustand verhindert allerdings vor allem die Konformationsänderung des *switch* I Bereiches die Komplexbildung zwischen GDI und GNBPs.

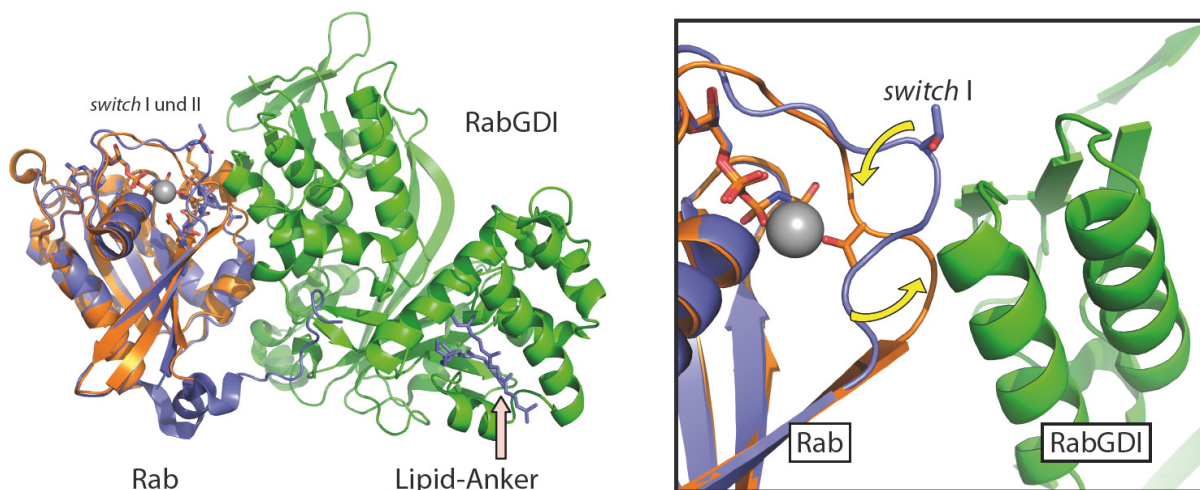


Abb. 5.7 Struktur von Rab mit RabGDI. A) Vergleich der Kristallstrukturen von Rab mit GppNHp und des Komplexes aus Rab und RabGDI im GDP-gebundenen Zustand, PDB-ID: 1YNZ bzw. 2BCG. B) Konformationsänderungen des *switch* I Bereiches in der Kontaktfläche zwischen Rab und RabGDI. Dabei ist Rab mit GppNHp orange, Rab mit GDP blau und RabGDI grün markiert.

Eine ähnliche Situation findet man auch bei heterotrimeren G-Proteinen. Im inaktiven Zustand, bei dem die $G\alpha$ -Untereinheit mit einem GDP-Nukleotid beladen ist, liegen die α , β - und γ -Untereinheiten in Form eines trimeren Komplexes vor. Dabei bildet der *switch* II Bereich der $G\alpha$ -Untereinheit, ähnlich wie bei Sept7, einen wichtigen Teil

der Kontaktfläche zwischen den $G\alpha$ - und $G\beta$ -Untereinheiten aus (Abb. 5.8) und leistet somit einen wichtigen Beitrag zur Stabilität des Komplexes (Lambright *et al.*, 1996). Nach dem Austausch des gebundenen GDP-Nukleotids gegen GTP, welcher durch einen G-Protein gekoppelten Rezeptoren induziert wird, führen die Konformationsänderungen des *switch II* Bereiches dazu, dass der heterotrimeren Komplex seine Stabilität verliert und in eine $G\alpha$ - und $G\beta\gamma$ -Untereinheit zerfällt (Noel *et al.*, 1993).

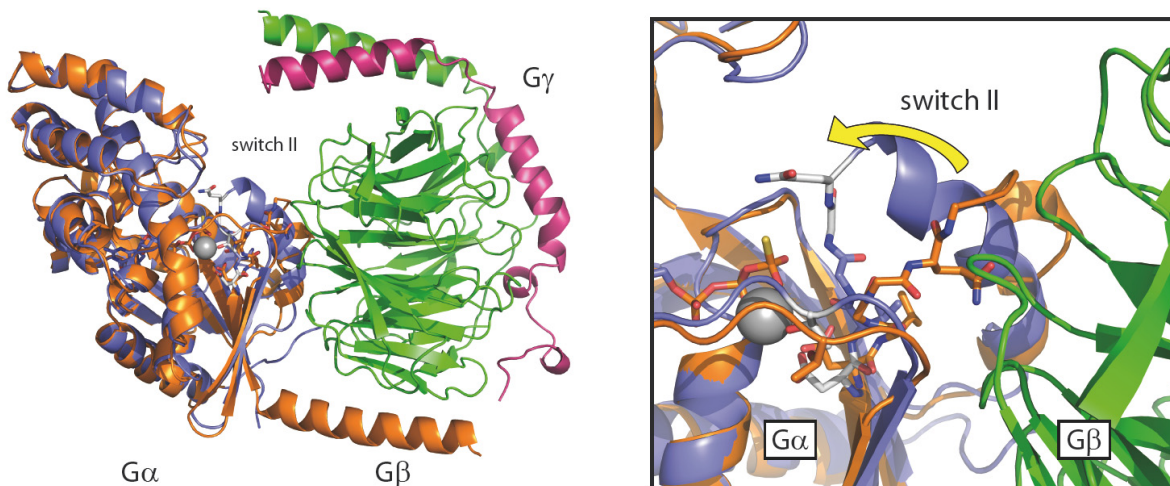


Abb. 5.8 Struktur der heterotrimeren G-Proteine. A) Vergleich der Kristallstrukturen von $G\alpha$ mit GTP γ S (blau) und von inaktivem $\alpha\beta\gamma$ -Komplex mit GDP, PDB-ID: 1TAG bzw. 1TND (gelb). B) Konformationsänderungen des *switch II* Bereiches in der Kontaktfläche zwischen der α - und β -Untereinheit. Dabei ist $G\alpha$ mit GTP γ S in blau, $G\alpha$ mit GDP in orange und $G\beta$ in grün markiert.

Im Unterschied zu Sept7 bildet die Nukleotidbindungstasche in den Strukturen der Komplexe von heterotrimeren G-Proteinen sowie von Rab mit RabGDI keinen Teil der Kontaktfläche zwischen den Untereinheiten. Im Falle der heterotrimeren G-Proteine erlaubt dies einen Nukleotidaustausch ohne die vorangehende Dissoziation des Komplexes. Die Reaktion wird dabei durch G-Protein gekoppelte Rezeptoren (*G protein-coupled receptor*, GPCR) katalysiert. Bei Ran, Rab und Rho müssen die GNBPs zuerst aus dem Komplex freigesetzt werden, bevor der Nukleotidaustausch durch die entsprechende GEFs vermittelt werden kann. Im Falle von Rab und Rho ist die spontane Dissoziation der GNBPs so langsam, dass dieser Prozess durch GDFs (*GDI displacement factors*) katalysiert werden muss. Weil die Septine ähnlich wie die GADs nur eine geringe Nukleotidaffinität aufweisen, benötigen sie keine klassischen GEFs für den Nukleotidaustausch. Wegen der starken Dimerisierung und der sehr langsamen Dissoziationsrate der Dimere sind für den Nukleotidaustausch bei Septinen allerdings GDF-ähnliche Faktoren notwendig,

welche die Dimerdissoziation aktiv beschleunigen. Die niedrige Nukleotidaffinität bei monomeren Septinen sorgt für den schnellen Nukleotidaustausch. Eine höhere Affinität zu GTP und eine höhere GTP-Konzentration *in vivo* sollten dann zu einer überwiegenden Beladung mit GTP führen.

Prinzipiell sieht das Modell keine strenge Notwendigkeit für ein GAP vor. Die Proteine wie Borgs oder eine hohe lokale Konzentration auf der Lipidmembran, welche PIP2-Lipide enthält, können wahrscheinlich die Septine solange zusammen halten, bis die intrinsische Hydrolyse stattgefunden hat. Allerdings dauert z.B. die gesamte Knospung der Hefe etwa 50 min, so dass eine Halbwertszeit von 30 min als relativ lang für einen intrazellulären Prozess angesehen werden kann.

5.5 Struktur von Sept7(S149F) im GppNHp-gebundenen Zustand

Das Modell der nukleotid-abhängigen Stabilität des G-Interface von Septinen wird vor allem durch die Kristallstruktur des Sept7(29-297) im GDP-gebundenen Zustand und durch unterschiedliche nukleotid-abhängige Dissoziationsraten der Sept7-Dimere in den SPR-Messungen gestützt. Die unterschiedlichen Dissoziationsraten weisen dabei auf Änderungen bei direkten lokalen Wechselwirkungen in der Kontaktfläche des Dimers und somit auf eine Konformationsänderung hin.

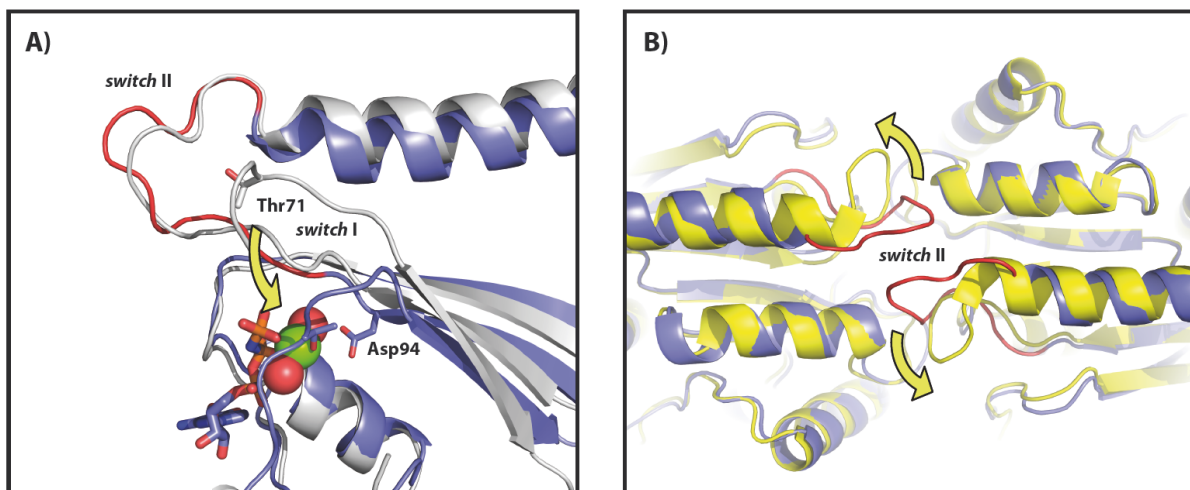


Abb. 5.9 Konformation des switch II Bereiches im GppNHp-gebundenen Zustand. A) Vergleich der Kristallstrukturen von Sept7(29-297, S149F)-GppNHp (blau) und Sept7(29-297)-GDP PDB-ID: 3T5D (grau) zeigt nur eine geringe Konformationsänderung des *switch II* Bereiches (rot). B) Vergleich der Kristallstrukturen von Sept7(29-297, S149F)-GppNHp (blau) und Sept2-GppNHp PDB-ID: 3FTQ (gelb).

In der Kristallstruktur von Sept7(29 - 297, S149F) im GppNHp-gebundenen Zustand wurde aber nur eine Konformationsänderung des *switch I* Bereiches beobachtet. Die

Konformation des *switch* II Bereiches ändert sich hingegen im Vergleich zum GDP-gebundenen Zustand kaum (Abb. 5.9). Die *switch* II Bereiche der beiden Untereinheiten, welche ein G-Dimer bilden, binden weiterhin über die Wasserstoffbrücken der beiden Asp-103 und über die hydrophoben Wechselwirkungen der beiden Val-102 aneinander.

Es ist vorstellbar, dass im Kristall die G-Domänen zuerst über die konservierten Bereiche des G-Interface fixiert werden (Abb. 5.1). Dabei nimmt der *switch* I Bereich eine definierte GTP-abhängige Konformation ein. Beim *switch* II Bereich hingegen kommt es zu einer Konkurrenz zwischen verschiedenen Konformationen. Der *switch* II Bereich kann einerseits eine GDP-ähnliche Konformation einnehmen, welche gegenseitige Wechselwirkungen zwischen den *switch* II Bereichen beider G-Domäne im G-Interface aufweist. Andererseits kann es aber auch zur Ausbildung einer hypothetischen „aktiven“ Konformation kommen, bei welcher der *switch* II Bereich an das γ -Phosphat des Nukleotids bindet und nicht mehr zur Stabilität des G-Interfaces beiträgt. Dabei scheint die GDP-ähnliche Konformation energetisch günstiger zu sein. Zum Einen kann die Kristallpackung diese Konformation begünstigen. In der Literatur gibt es zahlreiche Beispiele für die Stabilisierung inaktiver Konformationen über Kristallkontakte. Dies kann sowohl einzelne Bereiche des Proteins, wie z.B. bei der Kristallstruktur der inaktiven Konformation von M-Ras im GppNHp-gebundenen Zustand (PDB-ID 1X1S, Ye *et al.*, 2005), als auch die Orientierung ganzer Domänen, wie beim GAD-Protein MnmE (PDB-ID 3GEI, Meyer *et al.*, 2009), betreffen. Zum Anderen kann der Effekt der im Vergleich zu GTP niedrigeren Polarität des γ -Phosphats im verwendeten nicht hydrolysierbaren Nukleotidanalogen GppNHp hierfür verantwortlich sein (Geyer *et al.*, 1996; Spoerner *et al.*, 2005).

5.6 Bruchstellen der Septinfilamente

Momentan wird angenommen, dass die Septinfilamente aus einheitlich aufgebauten linearen Komplexen zusammengesetzt sind. Die elektronenmikroskopischen Einzelpartikel-Analysen der Septinkomplexe sowohl aus *C. elegans* als auch aus dem Menschen zeigten, dass die Komplexe als terminale Untereinheiten jeweils ein Septin aus der Gruppe 7, nämlich Unc59 bei *C. elegans* bzw. Sept7 beim Menschen, aufweisen (Abb. 1.7). Die Genomanalyse weiterer Organismen zeigte zudem, dass alle Organismen immer nur einen Vertreter der Gruppe 7 haben, was die herausra-

gende Stellung dieser Proteine unterstreicht (Tab. 1.3). Daher wurde die Vermutung aufgestellt, dass das G-Interface zwischen zwei Vertretern der Gruppe 7 eine Bruchstelle der Septinfilamente in allen mehrzelligen Organismen von *C. elegans* bis hin zum Menschen darstellt. Das hier postulierte Modell der nukleotid-abhängigen Stabilität der Septinfilamente würde daher sehr gut zum Gesamtbild passen.

Es ist auch vorstellbar, dass das G-Interface zwischen Sept2 und Sept6 eine Bruchstelle der Septinfilamente darstellt. Dabei würden aber keine einheitlich aufgebauten hexameren Komplexe, sondern Homodimere aus Sept2 und Heterotetramere mit der Reihenfolge Sept6-Sept7-Sept7-Sept6 entstehen (Abb. 5.10). Im Vergleich zur Spaltung über das Sept7-Sept7-G-Interface würde dieser Mechanismus jedoch eine leichtere Anpassung der Zusammensetzung der Septinfilamente ermöglichen, indem für den erneuten Filamentaufbau z.B. anstatt des Sept2 andere Vertreter der Gruppe 2 verwendet werden könnten.

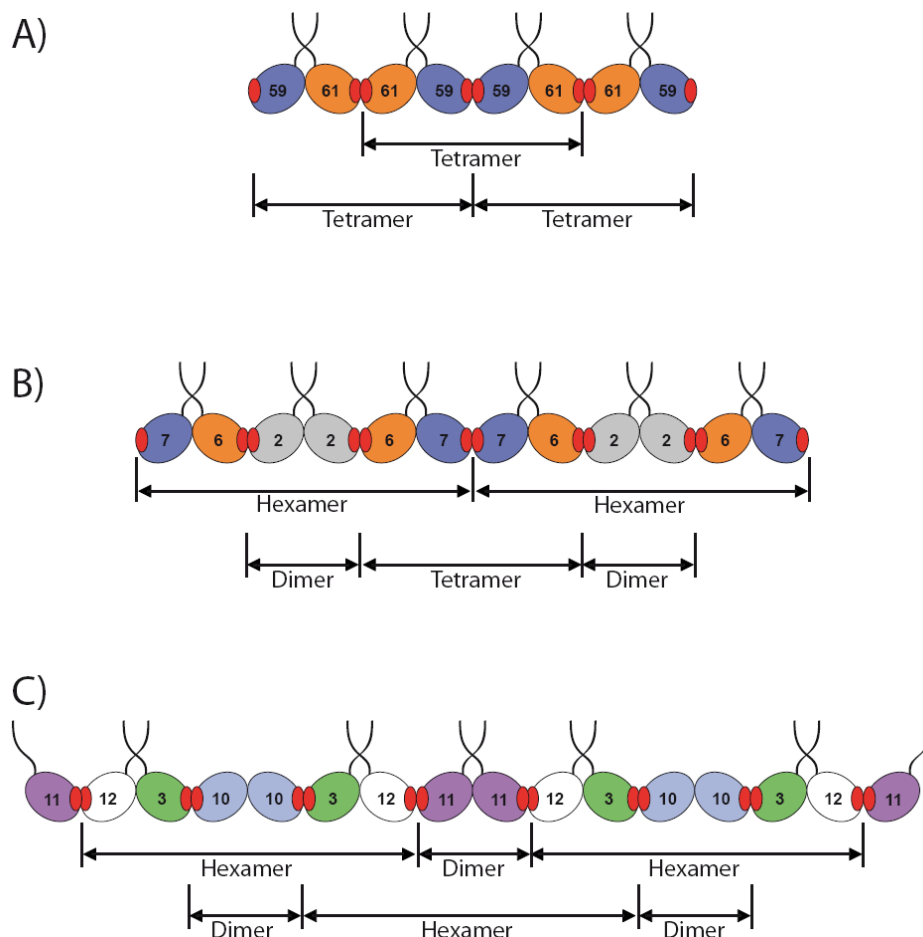


Abb. 5.10 Mögliche Septinkomplexe bei Bruchstellen über verschiedene G-Interface. Schematische Darstellung der Septinfilamente A) in *C. elegans* zusammengesetzt aus Unc59 und Unc61. B) im Menschen zusammengesetzt aus Sept2, Sept6 und Sept7, C) in *S. cerevisiae* zusammengesetzt aus Cdc3, Cdc10, Cdc11 und Cdc12. Dabei sind zudem die möglichen Bruchstellen der Septinfilamente über verschiedene G-Interface und daraus resultierende Komplexe gezeigt. Nukleotide sind mit rot dargestellt.

Betrachtet man die Septinfilamente in *S. cerevisiae*, sieht die Situation etwas komplexer aus. Die Septinfilamente in der Hefe lassen sich *in vitro* durch eine Erhöhung der Salzkonzentration (mehr als 200 mM NaCl) in einheitlich aufgebaute hetero-oktamere Komplexe mit der Reihenfolge Cdc11-Cdc12-Cdc3-Cdc10-Cdc10-Cdc3-Cdc12-Cdc11 spalten, allerdings erfolgt die Filamentdissoziation dabei über das NC-Interface zwischen zwei Cdc11-Untereinheiten. Angenommen dass *in vivo* eines der beiden G-Interface, entweder dasjenige zwischen Cdc3 und Cdc10 oder dasjenige zwischen Cdc11 und Cdc12, als Bruchstelle der Septinfilamente fungiert, so würden dabei stets zwei unterschiedliche Septinkomplexe, ein Dimer und ein Hexamer, entstehen. Bei einer Dissoziation zwischen Cdc3 und Cdc10 kommt es zur Bildung eines Homodimers bestehend aus zwei Cdc10-Untereinheiten und zur Bildung eines Hexamers mit der Reihenfolge Cdc3-Cdc12-Cdc11-Cdc11-Cdc12-Cdc3. Bei einer Dissoziation zwischen Cdc11 und Cdc12 hingegen werden die Filamente in Cdc11-Homodimere und in Hexamere mit der Reihenfolge Cdc12-Cdc3-Cdc10-Cdc10-Cdc3-Cdc12 zerlegt (Abb. 5.10). Einheitliche Septinkomplexe würden nur dann entstehen, wenn die Bruchstelle der Filamente über ein NC-Interface verläuft. Solch eine Situation kann *in vitro* beobachtet werden, wenn die Septinfilamente der Hefe hohen Salzkonzentrationen ausgesetzt werden.

Auch hier ermöglicht eine Spaltung über das G-Interface die Zusammensetzung der Septinfilamente leicht anzupassen. Interessanterweise zeigen Experimente mit einem SNAP-Tag, dass in der Hefe nach jeder Zellteilung die Untereinheiten des oktameren Komplexes durchmischt werden. Die Komplexe, die hierbei isoliert wurden, bestanden aus einer Mischung von alten und neu-synthetisierten Cdc12-Untereinheiten (McMurray und Thorner, 2008). Das würde man auch erwarten, wenn beim Abbau der Septinfilamente ein G-Interface zwischen Cdc3 und Cdc10 als Bruchstelle dient.

Obwohl Aktinfilamente und Mikrotubuli aus einheitlich aufgebauten Baueinheiten assembliert werden, würde es prinzipiell nichts dagegen Aufbau der Septinfilamente aus verschiedenen Komplexen sprechen.

6. Zusammenfassung

Bei den Septinen handelt es sich um Proteine, die als vierte Komponente des Cytoskellets angesehen werden. In einer früheren Arbeit wurde die Kristallstruktur eines Septinkomplexes bestehend aus dem humanen Sept2, Sept6 und Sept7 gelöst. Obwohl die Ergebnisse dieser Untersuchungen unser Verständnis über die Funktionsweise der Septine entscheidend vorangebracht haben, blieben immer noch viele Aspekte unaufgeklärt.

Das Ziel dieser Arbeit war es, Gemeinsamkeiten und Unterschiede bei Vertretern der einzelnen Septin-Gruppen zu identifizieren, wobei hierbei besonders auf die Auswirkungen des Nukleotidzustandes auf die Eigenschaften der Septine eingegangen wurde.

Sowohl in den kinetischen Messungen mittels *Stopped-flow* Apparatur als auch bei der Gleichgewichtstitration wurden für die Sept7-Konstrukte relativ niedrige Nukleotidaffinitäten im mikromolaren Bereich gemessen. Dabei ist die Affinität zu GppNHp etwas größer als zu GDP. In dieser Hinsicht ähneln die Septine den GADs-Proteinen. Die Charakterisierung der Vertreter der einzelnen Septin-Gruppen hat außerdem gezeigt, dass alle humanen Septine, mit Ausnahme der Vertreter der Gruppe 6, die Fähigkeit zur intrinsischen GTP-Hydrolyse aufweisen. Der Vergleich der Aminosäuresequenzen lässt gleichzeitig vermuten, dass der Verlust der Fähigkeit der intrinsischen GTP-Hydrolyse bei den Vertretern der Gruppe 6 von den Insekten bis hin zum Menschen konserviert ist und ein wichtiges Merkmal dieser Gruppe darstellt. Bei den Septinen wurden jedoch keine Hinweise auf eine GTPase-Aktivierung durch die Dimerisierung nachgewiesen, was eher gegen eine Einteilung der Septine innerhalb der Klasse der GADs spricht.

Außerdem wurde in dieser Arbeit die Kristallstruktur des Sept7 im GDP-gebundenen Zustand aufgeklärt. Die asymmetrische Einheit der Struktur enthält ein G-Dimer bestehend aus zwei Sept7-Untereinheiten im GDP-gebundenen Zustand. Im Vergleich zu den früher gelösten Strukturen ist die Elektronendichte des *switch II* Bereiches in der Struktur von Sept7(29 - 297) sehr gut definiert. Mit Hilfe von Mutationsstudien in Kombination mit der analytischen Gelfiltration konnte gezeigt werden, dass der *switch II* Bereich einen wichtigen Beitrag zur Stabilität des G-Interface leistet. Die Interaktionen werden dabei vor allem durch die Aminosäurereste vermittelt, welche dem Val-102 und dem Asp-103 des humanen

Sept7 entsprechen. Die Konservierung dieser Positionen in allen Septinen von der Hefe bis hin zum Menschen spricht dafür, dass die Wechselwirkungen des *switch* II Bereiches für die Funktion aller Septine entscheidend sind.

Des Weiteren wurden die kinetischen Eigenschaften für die Dimerisierung der Septine mit Hilfe von SPR-Messungen untersucht. Dabei konnten aber nur die Dissoziationsraten der Dimere gemessen werden. Der Vergleich der gemessenen Dissoziationsraten mit den Ergebnissen der anderen Experimente zeigte aber, dass die jeweiligen Dissoziationsraten die Stabilität der entsprechenden Septindimere widerspiegeln. Diese Erkenntnis erlaubt es, Rückschlüsse über die Stabilität des G-Interface in verschiedenen Nukleotidzuständen zu ziehen. Die SPR-Messungen von Sept7 zeigten, dass die Dissoziation der Dimere im GppNHp-gebundenen Zustand ca. 120-fach schneller ist als im GDP-gebundenen Zustand, was wiederum auf deutliche Unterschiede in der Stabilität des G-Interface zwischen den verschiedenen Nukleotidzuständen hinweist. Liegen die Untereinheiten im Triphosphatzustand vor, so ist das G-Dimer deutlich instabiler verglichen mit der Situation im GDP-gebundenen Zustand.

Basierend auf den strukturellen Daten in Kombination mit den Ergebnissen der biochemischen Charakterisierung wurde ein Modell entwickelt, welches die Rolle des Nukleotidzustandes für die Funktion der Septine beschreibt. Im GDP-gebundenen Zustand bilden die *switch* II Bereiche der beiden Untereinheiten des G-Dimers gegenseitige Kontakte aus und stabilisieren dadurch das G-Interface. Nach dem Austausch des gebundenen GDP-Nukleotids gegen GTP werden durch Gegenwart des γ -Phosphats Konformationsänderungen der *switch* Bereiche induziert. In diesem Zustand kann der *switch* II Bereich wahrscheinlich nicht mehr zur Stabilität des G-Interface beitragen. Wegen der geringen Stabilität des G-Interface können die Untereinheiten dissoziieren und sich neu anordnen. Nach der GTP-Hydrolyse können die *switch* II Bereiche ihre ursprüngliche Konformation wieder einnehmen, was zur Stabilisierung der Septinfilamente führt.

7. Literaturverzeichnis

- Ahmadian M.R., Wittinghofer A., Herrmann C. (2002). Fluorescence methods in the study of small GTP-binding proteins. *Methods Mol Biol.* **189**, 45-63.
- Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. *Molekularbiologie der Zelle*. 4. Auflage. Wiley-VCH., Weinheim 2003
- Allin C., Ahmadian M.R., Wittinghofer A., Gerwert K. (2001). Monitoring the GAP catalyzed H-Ras GTPase reaction at atomic resolution in real time. *PNAS* **98**, 7754-7759.
- Bertin A., McMurray M.A., Grob P., Park S.S., III G.G. Patawala I., Ng H.I., Alber T., Thorner J., Nogales E. (2008). Saccharomyces cerevisiae septins: Supramolecular organization of heterooligomers and the mechanism of filament assembly. *PNAS* **105**, 8274-8279.
- Beraud-Dufour S., Robineau S., Chardin P., Paris S., Chabre M., Cherfils J., Antony B. (1998). A glutamic finger in the guanine nucleotide exchange factor ARNA displaces Mg²⁺ and the beta-phosphate to destabilize CDP on ARF1. *EMBO J.* **17**, 3651-3659.
- Bertin A., McMurray M.A., Thai L., III G.G., Votin V., Grob P., Allyn T., Thorner J., Nogales E. (2010). Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate promotes Budding Yeast Septin Filament Assembly and Organization. *J Mol. Biol.* **404**, 711-731.
- Bos J.L., Rehmann H., Wittinghofer A. (2007). GEFs and GAPs: Critical Elements in the Control of Small G Proteins. *Cell* **129**, 865-877.
- Brucker S., Gerwert K., Kötting C. (2010). Tyr39 of Ran Preserves the Ran*GTP Gradient by Inhibiting GTP Hydrolysis. *J. Mol. Biol.* **401**, 1-6.
- Byers B., Goertsch L. (1976). A highly ordered ring of membrane-associated filaments in budding yeast. *J. Cell. Biol.* **69**, 717-721.
- Caudron F., Barral Y. (2009). Septins and the lateral compartmentalization of eukaryotic membranes. *Dev. Cell* **16**, 493-506.
- Chesnokov I.N., Chesnokova O.N., Botchan M. (2003). A cytokinetic function of Drosophila Orc6 protein resides in a domain distinct from its replication activity. *PNAS* **100**, 9150-9155.
- Daumke O., Weyand M., Chakrabarti P.P., Vetter I.R., Wittinghofer A. (2004). The GTPase-activating protein Rap1Gap uses a catalytic asparagine. *Nature* **429**, 197-201.
- DeLano, W.L. (2002). The pymol molecular graphics system. Available from <http://www.pymol.org>.
- Delprato A., Lambright D.G. (2007). Structural basis for Rab GTPase activation by VPS9 domain exchange factors. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **14**, 406-412.
- DerMardirossian C., Bokoch G.M. (2005). GDIs: central regulatory molecules in Rho GTPase activation. *Trends Cell. Biol.* **15**, 356-363.
- Dobbelaere J., Gentry M.S., Hallberg R.L., Barral Y. (2003). Phosphorylation-dependent regulation of septin dynamics during the cell cycle. *Dev. Cell* **4**, 345-357.

- Dobbelaere J., Barral Y. (2004). Spatial coordination of Cytokinetic Events by Compartmentalization of the Cell Cortex. *Science* **305**, 393-396.
- Eathiraj S., Pan X., Ritocco C., Lambright D.G. (2005). Structural basis of family-wide Rab GTPase recognition by rabenosyn-5. *Nature* **436**, 415-419.
- Egea P.F., Shan S.O., Napetschniq J., Savage D.F., Walter P., Stroud R.M. (2004). Substrate twinning activates the signal recognition particle and its receptor. *Nature* **427**, 215-221.
- Egea P.F., Stroud R.M., Walter P. (2005). Targeting proteins to membranes: structure of the signal recognition particle. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **15**, 213-220.
- Emsley, P. and Cowtan, K. (2004). COOT: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* **60**, 2126-2132.
- Fares H., Peifer M., Pringle J.R. (1995). Localization and possible functions of Drosophila septins. *Mol. Biol. Cell* **6**, 1843-1859.
- Farkasovsky M., Herter P., Voss B., Wittinghofer A. (2005). Nucleotide binding and filament assembly of recombinant yeast septin complexes. *Biol. Chem.* **386**, 643-656.
- Field S.J., Madson N., Kerr M.L., Galbraith K.A., Kennedy C.E., Tahiliani M., Wilkins A., Cantley L.C. (2005). PtdIns(4,5)P₂ functions at the cleavage furrow during cytokinesis. *Curr. Biol.* **15**, 1407-1412.
- Foot J. und Eisen H.N. (1995). Kinetic and affinity limits on antibodies produced during immune responses. *PNAS* **92**, 1254-1256.
- Garrenton L.S., Stefan C.J., McMurray M.A., Emr S.D., Thorner J. (2010). Pheromone-induced anisotropy in yeast plasma membrane phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate distribution is required for MAPK signalling. *PNAS* **107**, 11805-11810.
- Gasper R., Scrima A., Wittinghofer A. (2006). Structural insights into HypB, a GTP-binding protein that regulates metal binding. *J. Biol. Chem.* **281**, 27492-27502.
- Gasper R., Thomas C., Ahmadian M.R., Wittinghofer A. (2008). The Role of the Conserved Switch II Glutamate in Guanine Nucleotide Exchange Factor-Mediated Nucleotide Exchange of GTP-Binding Proteins. *J. Mol. Biol.* **379**, 51-63.
- Gasper R., Meyer S., Gotthardt K., Sirajuddin M., Wittinghofer A. (2009). It takes two to tango: regulation of G proteins by dimerization. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **10**, 423-429.
- Geyer M., Schweins T., Herrmann C., Prisner T., Wittinghofer A., Kalbitzer H.R. (1996). Conformational Transitions in p21ras and in Its Complexes with the Effector Protein Raf-RBD and the GTPase Activating Protein GAP. *Biochemistry* **35**, 10308-10320.
- Ghosh A., Praefcke G.J.K, Renault L., Wittinghofer A., Herrmann C. (2006). How guanylate-binding proteins achieve assembly-stimulated processive cleavage of GTP to GMP. *Nature* **440**, 101-104.
- Gideon P., John J., Frech M., Lautwein A., Clark R., Scheffler J.R., Wittinghofer A. (1992). Mutational and Kinetic Analysis of the GTPase-Activating Protein (GAP)-p21 Interaction: The C-Terminal Domain of GAP Is Not Sufficient for Full Activity. *Mol. Cell. Biol.* **12**, 2050.
- Gladfelter A.S., Pringle J.R., Lew D.J. (2001). The Septin cortex at the yeast mother-bud neck *Current Opinion in Microbiology*, **4**, 681-689.

- Goley E.D., Welch M.D. (2006). The ARP2/3 complex: an actin nucleator comes of age. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **7**, 713-726.
- Goody R.S., Hofmann-Goody W. (2002). Exchange factors, effectors, GAPs and motor proteins: common thermodynamic and kinetic principles for different functions. *Eur. Biophys. J.* **31**, 268-274.
- Goody R.S., Rak A., Alexandrov K. (2005). The structural and mechanistic basis for recycling of Rab proteins between membrane compartments. *Cell. Mol. Life Sci.* **62**, 1657-1670.
- Gotthardt K., Weyand M., Kortholt A., Van Haastert P.J., Wittinghofer A. (2008). Structure of the Roc-COR domain tandem of *C. tepidum*, a prokaryotic homologue of the human LRRK2 Parkinson kinase. *EMBO J.* **27**, 2239-2249.
- Haarer B.K., Pringle J.R. (1987). Immunofluorescence localization of the *Saccharomyces cerevisiae* CDC12 gene product to the vicinity of the 10-nm filaments in the mother-bud neck. *Mol. Cell. Biol.* **7**, 3678-3687.
- Hartwell L.H. (1971). Genetic control of the cell division cycle in yeast. IV. Genes controlling bud emergence and cytokinesis. *Exp. Cell Res.* **69**, 265-276.
- Herrmann H., Bär H., Kreplak L., Strelkov S.V., Aebi U. (2007). Intermediate filaments: from cell architecture to nanomechanics. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **8**, 562-573.
- Hoffman G.R., Nassar N., Cerione R.A. (2000). Structure of the Rho family GTP-binding protein Cdc42 in complex with the multifunctional regulator RhoGDI. *Cell* **100**, 345-356.
- Hu Q., Milenkovic L., Jin H., Scott M.P., Nachury M.V., Spiliotis E.T., Nelson W.J. (2010). A Septin Diffusion Barrier at the Base of the Primary Cilium maintains Ciliary Membrane Protein Distribution. *Science* **329**, 436-439.
- Huang Y.W., Surka M.C., Reynaud D., Pace-Asciak C., Trimble W.S. (2006). GTP binding and hydrolysis kinetics of human septin 2. *FEBS J.* **273**, 3248-3260.
- Huijbregts R.P.H., Svitin A., Stinnett M.W., Renfrow M.B., Chesnokov I. (2009). *Drosophila* Orc6 Facilitates GTPase Activity and Filament Formation of the Septin Complex. *Mol. Biol. Cell* **20**, 270-281.
- Hyder C.L., Pallari, H.M., Kochin, V., Eriksson J.E. (2008). Providing cellular signposts – Post-translational modifications of intermediate filaments. *FEBS Letters* **582**, 2140-2148.
- Ihara M., Kinoshita A., Yamada S., Tanaka H., Tanigaki A., Kitano A., Goto M., Okubo K., Nishiyama H., Ogawa O., Takahashi C., Itohara S., Nishimune Y., Noda M., Kinoshita M. (2005). Cortical Organization by the Septin Cytoskeleton Is Essential for Structural and Mechanical Integrity of Mammalian Spermatozoa. *Dev. Cell* **8**, 343-352.
- Ismail S.A., Chen Y.X., Rusinova A., Chandra A., Bierbaum M., Gremer L., Triola G., Waldmann H., Bastiaens P.I., Wittinghofer A. (2011). Arl2-GTP and Arl3-GTP regulate a GDI-like transport system for farnesylated cargo. *Nat. Chem. Biol.* **7**, 942-949.
- Iwase M., Okada S., Oquchi T., Toh-e A. (2004). Forchlorfenuron, a phenylurea cytokinin, disturbs septin organization in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Genet. Syst.* **79**, 199-206.

- Janin J. (1995) Principles of protein-protein recognition from structure to thermodynamics. *Biochimie* **77**, 497-505.
- Joberty G., Perlungher R.R., Macara I.G. (2001). The Borgs, a New Family of Cdc42 and TC10 GTPase-Interacting Proteins. *Mol. Cell. Biol.* **19**, 6585-6597.
- Joberty G., Perlungher R.R., Sheffield P.J., Kinoshita M., Noda M., Haystead T., Macara I.G. (2001). Borg proteins control septin organization and are negatively regulated by Cdc42. *Nat. Cell. Biol.* **3**, 861-866.
- John C.M., Hite R.K., Weirich C.S., Fitzgerald D.J., Jawhari H., Faty M., Schläpfer D., Kroschewski R., Winkler F.K., Walz T., Barral Y., Steinmetz M.O. (2007). The *Caenorhabditis elegans* septin complex is nonpolar. *EMBO* **26**, 3296-3307.
- Johnson E.S., Blobel G. (1999). Cell Cycle-Regulated Attachment of the Ubiquitin-Related Protein SUMO to the Yeast Septins. *Journal of cell Biology* **147**, 981-993.
- Joo E., Surka M.C., Trimble W.S. (2007). Mammalian SEPT2 Is Required for Scaffolding Nonmuscle Myosin II and Its Kinases. *Dev. Cell* **13**, 677-690.
- Kabsch, W. (1993). Automatic processing of rotation diffraction data from crystals of initially unknown symmetry and cell constants. *J. Appl. Crystallogr.* **26**, 795-800.
- Kim M.S., Froese C.D., Estey M.P., Trimble W.S. (2011). SEPT9 occupies the terminal positions in septin octamers and mediates polymerization-dependent functions in abscission. *J. Cell Biol.*, **195**, 815-826.
- Kinoshita M., Field C.M., Coughlin M.L., Straight A.F., Mitchison T.J. (2002). Self- and Actin-Templated Assembly of Mammalian Septins. *Developmental Cell*, **3**, 791-802.
- Kinoshita M. (2003). Assembly of Mammalian Septins. *J. Biochem.* **134**, 491-496.
- Kinoshita M. (2006). Diversity of septin scaffolds. *Curr. Opin. Cell. Biol.* **18**, 54-60.
- Lambright D.G., Sondek J., Böhm A., Skiba N.P., Hamm H.E., Sigler P.B. (1996). The 2.0 Å crystal structure of a heterotrimeric G protein. *Nature* **379**, 311-319.
- Leipe D.D., Wolf Y.I., Koonin E.V., Aravind L. (2002). Classification and evolution of P-loop GTPases and related ATPases. *J. Mol. Biol.* **317**, 41-72.
- Lenzen C., Cool R.H., Prinz H., Kuhlmann J., Wittinghofer A. (1998). Kinetic Analysis by Fluorescence of the Interaction between Ras and the Catalytic Domain of the Guanine Nucleotide Exchange Factor Cdc25^{Mm}. *Biochemistry* **37**, 7420-7430.
- Lin, C.W., Ting, A.Y. (2006) Transglutaminase-Catalyzed Site-Specific Conjugation of Small-Molecule Probes to Proteins in Vitro and on the Surface of Living Cells. *J Am Chem Soc.*, **128(14)**, 4542-4543
- Low C., Macara I.G. (2006). Structural Analysis of Septin 2, 6, and 7 Complexes *J Biol Chem.*, **281**, 30697-30706.
- Macara I.G., et al. (2002). Mammalian septins nomenclature. *Mol Biol. Cell* **13**, 4111-4113.
- Marques I.A., Valadares N.F., Garcia W., Damalio J.C.P., Macedo J.N.A., de Araujo A.P.U., Botello C.A., Andreu J.M., Garratt R.C. (2012) Septin C-Terminal Domain Interactions : Implications for Filament Stability and Assembly. *Cell Biochem Biophys*, **62**, 317-328.

- McMurray M.A., Thorner J. (2008). Septin stability and recycling during dynamic structural transitions in cell division and development. *Curr. Biol.* **18**, 1203-1208.
- Meyer S., Böhme S., Krüger A., Steinhoff H.J., Klare J.P., Wittinghofer A. (2009). Kissing G domains of MnmE monitored by X-ray crystallography and pulse electron paramagnetic resonance spectroscopy. *PLoS Biol.* **7**, e1000212.
- Mortensen E.M., McDonald H., Yates J.3rd, Kelloq D.R. (2002). Cell Cycle-dependent Assembly of a Gin4-Septin Complex. *Mol. Biol. Cell* **13**, 2091-2105.
- Mostowy S., Cossart P. (2011). Septins as key regulators of actin based processes in bacterial infection. *Biol. Chem.* **392**, 831-835.
- Nakahira M., Macedo J.N.A., Seraphim T.V., Cavalcante N., Souza T.A.C.B., Damalio J.C.P., Reyes L.F., Assmann E.M., Alborghetti M.R., Garratt R.C., Araujo A.P.U., Zanchin N.I.T., Barbosa J.A.R.G., Kobarg J. (2011). A Draft of the Human Septin Interactome. *PLoS ONE*, **5**, e13799.
- Neal, S.E., Eccleston, J.F., Hall, A., Webb, M.R. (1988). Kinetic analysis of the hydrolysis of GTP by p21N-ras: the basal GTPase mechanism. *J. Biol Chem* **263**, 19718-19722.
- Neufeld T.P., Rubin G.M. (1994). The *Drosophila* peanut gene is required for cytokinesis and encodes a protein similar to yeast putative bud neck filament proteins. *Cell* **77**, 371-379.
- Noel J.P., Hamm H.E., Sigler P.B. (1993). The 2.2 Å structure of transducin-alpha complexed with GTP gamma S. *Nature* **366**, 654-663.
- Nguyen T.Q., Sawa H., Okano H., White J.G. (2000). The *C. elegans* septin genes, *unc-59* and *unc-61*, are required for normal postembryonic cytokineses and morphogenesis but have no essential function in embryogenesis. *J. Cell. Sci.* **113**, 3825-3837.
- Pai E.F., Kabsch W., Krengel U., Holmes K.C., John J., Wittinghofer A. (1989). Structure of the guanine-nucleotide-binding domain of the Ha-ras oncogene product p21 in the triphosphate conformation. *Nature* **341**, 209-214.
- Pan X., Eathinraj S., Munson M., Lambright D.G. (2006). TBC-domain GAPs for Rab GTPases accelerate GTP hydrolysis by a dual-finger mechanism. *Nature* **442**, 303-306.
- Pan F., Malmberg R.L., Momany M. (2007). Analysis of septins across kingdoms reveals orthology and new motifs. *BMC Evol. Biol.* **7**, 103.
- Peter M., Heitlinger E., Häner M., Aebi U., Nigg E.A. (1991) Disassembly of *in vitro* formed lamin head-to-tail polymers by CDC2 kinase. *EMBO* **10**, 1535-1544.
- Piebler J. und Schreiber G. (1999). Mutational and Structural Analysis of the Binding Interface between Type I Interferons and their Receptor Ifnar2. *J. Mol. Biol.* **294**, 223-237.
- Praefcke G.L., McMahon H.T. (2004). The dynamin superfamily: universal membrane tabulation and fission molecules? *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **5**, 133-147.
- Prakash B., Praefcke G.J., Renault L., Wittinghofer A., Herrmann C. (2000). Structure of human guanylate-binding protein 1 representing a unique class of GTP-binding proteins. *Nature* **403**, 567-571.

- Prakash B., Renault L., Praefcke G.J., Herrmann C., Wittinghofer A. (2000). Triphosphate structure of guanylate-binding protein 1 and implications for nucleotide binding and GTPase mechanism. *EMBO J.* **19**, 4555-4564.
- Prasanth S.G., Prasanth K.V., Stillman B. (2002). Orc6 Involved in DNA Replication, Chromosome Segregation and Cytokinesis. *Science* **297**, 1026-1031.
- Rak A., Pylypenko O., Durek T., Watzke A., Kushnir S., Brunsveld L., Waldmann H., Goody R.S., Alexandrov K. (2003). Structure of Rab GDP-dissociation inhibitor in complex with prenylated YPT1 GTPase. *Science* **302**, 646-650.
- Rittinger K., Walker P.A., Eccleston J.F., Nurmahomed K., Owen D., Laue E., Gamblin S.J., Smerdon S.J. (1997). Crystal structure of a small G protein in complex with the GTPase-activating protein rhoGAP. *Nature* **388**, 693-697.
- Rittinger K., Walker P.A., Eccleston J.F., Smerdon S.J., Gamblin S.J. (1997). Structure at 1.65 Å of RhoA and its GTPase-activating protein in complex with a transition-state analogue. *Nature* **389**, 758-762.
- Rodriguez-Escudero I., Roelants F.M., Thorner J., Nombela C., Molina M., Cid V.J. (2005). Reconstitution of the mammalian PI3K/PTEN/Akt pathway in Yeast. *Biochem. J.* **390**, 613-623.
- Rocks O., Peyker A., Kahms M., Verveer P.J., Koerner C., Lumbierres M., Kuhlmann J., Waldmann H., Wittinghofer A., Bastiaens P.I. (2005). An acylation cycle regulates localization and activity of palmitoylated Ras isoforms. *Science* **307**, 1746-1752.
- Russell S.E., Hall P.A. (2011). Septin genomics: a road less travelled. *Biol. Chem.* **392**, 763-767.
- Sandrock K., Bartsch I., Bläser S., Busse A., Busse E., Zieger B. (2011). Characterization of human septin interactions. *Biol. Chem.*, **392**, 751-761.
- Scheffzek K., Ahmadian M.R., Kabsch W., Wiesmüller L., Lautwein A., Schmitz F., Wittinghofer A. (1997). The Ras-RasGAP complex: structural basis for GTPase activation and its loss in oncogenic Ras mutants. *Science* **277**, 333-338.
- Schmidt K., Nichols B.J. (2004). A Barrier to Lateral Diffusion in the Cleavage Furrow of dividing Mammalian Cells. *Curr. Biol.* **14**, 1002-1006.
- Schulewitz M.J., Inouye C.J., Thorner J. (1999). Hsl7 Localizes to a Septin Ring and Serves as an Adapter in a Regulatory Pathway That Relieves Tyrosine Phosphorylation of Cdc28 Protein Kinase in *Saccharomyces cerevisia*. *Mol. Cell. Biol.* **19**, 7123-7137.
- Schwefel D., Fröhlich C., Eichhorst J., Wiesner B., Behlke J., Aravind L., Daumke O. (2010). Structural basis of oligomerization in septin-like GTPase of immunity-associated protein 2 (GIMAP2). *PNAS* **107**, 20299-304.
- Scrima A., Wittinghofer A. (2006). Dimerisation-dependent GTPase reaction of MnmE: how potassium acts as GTPase-activating element. *EMBO J.* **25**, 2940-2951.
- Sellin M.E., Sandblad L., Stenmark S., Gullberg M. (2011). Deciphering the rules governing assembly order of mammalian septin complexes. *Mol. Biol. Cell*, **22**, 3152-3164.
- Seewald M.J., Körner C., Wittinghofer A., Vetter I.R. (2002). RanGAP mediates GTP hydrolysis without an arginine finger. *Nature* **415**, 662-666.

- Sheffield P.J., Oliver C.J., Kremer B.E., Sheng S., Shao Z., Macara I.G. (2003). Borg/Septin Interactions and the Assembly of Mammalian Septin Heterodimers, Trimers, and Filaments. *J. Biol. Chem.* **278**, 3483-3488.
- Sirajuddin M., Farkasovsky M., Hauer F., Kühlmann D., Macara I.G. Weyand M., Stark H., Wittinghofer A. (2007). Structural insight into filament formation by mammalian septins. *Nature*, **229**, 311-315.
- Sirajuddin M., Farkasovsky M., Zent E., Wittinghofer A. (2009). GTP-induced conformational changes in septins and implications for function. *PNAS* **106**, 16592-16597.
- Spoerner M., Nuehs A., Ganser P., Herrmann C., Wittinghofer A., Kalbitzer H.R. (2005). Conformational States of Ras Complexed with GTP Analogue GppNHp or GppCH2p: Implications for the Interaction with Effector Proteins. *Biochemistry* **44**, 2225-2236.
- Stewart M., Kent H.M., McCoy A.J. (1998). Structural Basis for Molecular Recognition between Nuclear Transport Factor 2 (NTF2) and the GDP-bound Form of the Ras-family GTPase Ran. *J. Mol. Biol.* **277**, 635-646.
- Sun Y.J., Forouhar F., Li H.M., Tu S.L., Yeh Y.H., Kao S., Shih H.L., Chou C.C., Chen C., Hsiao C.D. (2002). Crystal structure of pea Toc34, a novel GTPase of the chloroplast protein translocator. *Nat. Struct. Biol.* **9**, 95-100.
- Tada T., Simonetta A., Batteredon M., Kinoshita M., Edbauer D., Sheng M. (2007). Role of Septin Cytoskeleton in Spine Morphogenesis and Dendrite Development in Neurons. *Curr. Biol.* **17**, 1752-1758.
- Tanaka-Takiguchi Y., Kinoshita M., Takiguchi K. (2009). Septin-mediated Uniform Bracing of Phospholipid Membranes. *Curr. Biol.*, **19**, 140-145.
- The CCP4 suite: Programs for protein crystallography (1994). *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr* **50**, 760-763.
- Tooley, A.J., Gilden, J., Jacobelli, J., Beemiller, P., Trimble, W.S., Kinoshita, M., Krummel, M.F. (2009). Amoeboid T lymphocytes require the septin cytoskeleton for cortical integrity and persistent motility. *Nat. Cell. Biol.*, **11**, 17-26.
- Tucker, J., Sczakiel, G., Feuerstein, J., John, J., Goody, R.S., and Wittinghofer, A. (1986). Expression of p21 proteins in *Escherichia coli* and stereochemistry of the nucleotide-binding site. *EMBO J.* **5**, 1351-1358.
- Vagin, A. and Teplyakov, A. (1997). MOLREP: an automated program for molecular replacement. *J. Appl. Crystallogr.* **30**, 1022-1025.
- Versele M., Gullbrand B., Shulewitz M.J., Cid V.J., Bahmanyar S., Chem R.E., Barth P., Alber T., Thorner J. (2004). Protein-Protein Interactions Governing Septin Heteropentamer Assembly and Septin Filament Organization in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell* **15**, 4568-4583.
- Versele M., Thorner J. (2004). Septin collar formation in budding yeast requires GTP binding and direct phosphorylation by the PAK, Cla4. *J. Biol. Chem.* **164**, 701-715.
- Vetter I.R., Wittinghofer A. (2001). The guanine nucleotide-binding switch in three dimensions. *Science* **294**, 1299-1304.
- Vrabioiu A.M., Gerber S.A., Gygi S.P., Field C.M., Mitchison T.J. (2004). The majority of the *Saccharomyces cerevisiae* septin complexes do not exchange guanine nucleotides. *J. Biol. Chem.* **279**, 3111-3118.

- Vrabioiu A.M., Mitchison T.J. (2006). Structural insights into yeast septin organization from polarized fluorescence microscopy. *Nature* **443**, 466-469.
- Wittinghofer A., Vetter I.R. (2011). Structure-function relationships of the G domain, a canonical switch motif. *Annu. Rev. Biochem.* **80**, 943-971.
- Wennerberg K., Rossman K.L., Der C.J. (2005). The Ras superfamily at a glance. *J. Cell Sci.* **118**, 843–846.
- Xie Y., Vessey J.P., Konecna A., Dahm R., Macchi P., Kiebler M.A. (2007). The GTP-Binding Protein Septin 7 Is Critical for Dendrite Branching and Dendritic-Spine Morphology. *Curr. Biol.* **17**, 1746-1751.
- Ye M., Shima F., Muraoka S., Liao J., Okamoto H., Yamamoto M., Tamura A., Yagi N., Ueki T., Kataoka T. (2005). Crystal structure of M-Ras reveals a GTP-bound “off” state conformation of Ras family small GTPases. *J. Biol. Chem.* **280**, 267-275.
- Yu W., Ding X., Chen F., Liu M., Shen S., Gu X., Yu L. (2009). The phosphorylation of SEPT2 on Ser218 by casein kinase 2 is important to hepatoma carcinoma cell proliferation. *Mol Cell Biochem*, **325**, 61-67.

Anhang

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1 Drei Haupt-Filamenttypen des Cytoskeletts	3
Abb. 1.2 Der nukleotid-abhängige Zyklus der kleinen GNBPs	7
Abb. 1.3 G-Domäne	8
Abb. 1.4 Der postulierte nukleotid-abhängige Zyklus von GADs	13
Abb. 1.5 Elektronenmikroskopische Aufnahme und Fluoreszenzbilder der Septine in <i>S. cerevisiae</i>	17
Abb. 1.6 Funktion der Septine in ausdifferenzierten humanen Zellen	20
Abb. 1.7 Elektronenmikroskopische Einzelpartikelanalyse der Septinkomplexe	22
Abb. 1.8 Struktur der G-Domäne der Septine	23
Abb. 1.9 Interaktionsoberflächen, zwischen den G-Domänen der Septine	24
Abb. 1.10 Die Struktur des humanen hexameren Komplexes	24
Abb. 1.11 Interaktionen zwischen humanen Septinen	25
Abb. 1.12 Größenverteilung der aus den Säugertierzellen isolierten Septinkomplexe	27
Abb. 1.13 Einfluss des Lipidmonolayer auf die Organisation der Septinfilamente	28
Abb. 1.14 Septinstrukturen in <i>S. cerevisiae</i> im Laufe der Zellteilung	29
Abb. 1.15 Sept2 im GppNHp-Zustand	35
Abb. 3.1 Verwendete Konstrukte	41
Abb. 3.2 Kristallisation der Proteine	51
Abb. 4.1 Auswahl neuer Konstrukte	55
Abb. 4.2 Reinigung von Sept7(29 - 297)	57
Abb. 4.3 Charakterisierung des Sept7(29 - 297)	58
Abb. 4.4 Initiale Kristalle von Sept7(29-297) beladen mit GDP	59
Abb. 4.5 Ramachandran-Diagramm und Verfeinerungsstatistik des finalen Modells	60
Abb. 4.6 Die Kristallpackung von Sept7(29 - 297)	61
Abb. 4.7 Wechselwirkungen am NC-Interface	62
Abb. 4.8 Vergleich der G-Interface von Sept2 und Sept7	63
Abb. 4.9 Struktur des G-Dimers von Sept7(29 - 297)	64
Abb. 4.10 Der <i>switch</i> II Bereich – ein Teil des G-Interface	65
Abb. 4.11 Vergleich der Strukturen von Sept2 und Sept7	65
Abb. 4.12 Unterschiede zwischen Sept2 und Sept7	66
Abb. 4.13 Analytische Gelfiltration von Sept7(S149F)	67
Abb. 4.14 Analyse der <i>switch</i> II Mutanten	68
Abb. 4.15 Einfluss der Nukleotidbeladung auf die Dimerisierung der <i>switch</i> II Mutanten	69
Abb. 4.16 <i>Stopped-Flow</i> Messung der Nukleotidbindung mittels Fluoreszenz	70
Abb. 4.17 <i>Stopped-Flow</i> Messung der Nukleotidbindung mittels FRET	71
Abb. 4.18 Einfluss der Proteinkonzentration	72
Abb. 4.19 Einfluss der Nukleotidkonzentration	73
Abb. 4.20 <i>Stopped-flow</i> Messung der Bindung zwischen mGppNHp und Sept7(E184A)	74
Abb. 4.21 Gleichgewichtstitration von mGppNHp bzw. mGDP mit Sept7(E184A)	75
Abb. 4.22 Gleichgewichtstitration von mGppNHp mit Sept7(D103A)	76
Abb. 4.23 Gleichgewichtstitration von mGDP mit Sept7(D103A)	77
Abb. 4.24 Direkte Messung der Nukleotid-Dissoziation	78
Abb. 4.25 GTP-Hydrolyse der verschiedenen Sept7-Konstrukte	79
Abb. 4.26 <i>Stopped-Flow</i> Messung der intrinsischen GTP-Hydrolyse von Sept7(D103A)	80
Abb. 4.27 <i>Stopped-Flow</i> Messung von mGTP mit Sept7(E184A)	81
Abb. 4.28 Funktion des Thr-71 bei der GTP-Hydrolyse in Sept7-Konstrukten	82
Abb. 4.29 Biotinmarkierung in einer gpTGase katalysierten Reaktion	84
Abb. 4.30 Die SPR-Messungen von Sept7(E184A)	85
Abb. 4.31 Die SPR-Messungen der Dissoziation von Sept7(E184A) im GDP gebundenen Zustand	87
Abb. 4.32 Die SPR-Messungen der Dissoziation von Sept7(D103A) im GDP gebundenen Zustand	88
Abb. 4.33 Die SPR-Messungen der Dissoziation von Sept7(D103A) im GppNHp gebundenen Zustand	89
Abb. 4.34 Die SPR-Messungen der Dissoziation von Sept7(E184A) im GppNHp gebundenen Zustand	90
Abb. 4.35 Die SPR-Messungen der Dissoziation von Sept7(wt)	91

Abb. 4.36 Optimierte Kristalle von Sept7(29-297) beladen mit GppNHp	92
Abb. 4.37 Struktur von Sept7(29-297,S149F)·GppNHp	93
Abb. 4.38 Reinigung von Sept6(40-305)	95
Abb. 4.39 Reinigung von Sept9(297-565)	96
Abb. 4.40 Analytische Gelfiltration von Sept6 und Sept9	97
Abb. 4.41 Intrinsische GTP-Hydrolyse von Sept6 und Sept9	98
Abb. 4.42 Intrinsische GTP-Hydrolyse von Sept2-Konstrukten	99
Abb. 4.43 Pulldown-Experiment mit GST-Sept2(33-306) und Sept6(40-305)	100
Abb. 4.44 Koexpression von GST-Sept2(33-306) und Sept6(40-305)	100
Abb. 4.45 Charakterisierung des Komplexes aus Sept2(33-306) und Sept6(40-305)	101
Abb. 4.46 Intrinsische GTP-Hydrolyse des Sept2/Sept7-Komplexes	102
Abb. 4.47 Wechselwirkungen zwischen Sept7 und Sept9	103
Abb. 4.48 Koexpression von GST-Sept9(297-565) und Sept7(29-297)-His6	104
Abb. 4.49 Analytische Gelfiltration von Sept6 Δ cc/Sept7 Δ cc	105
Abb. 5.1 Aminosäurereste des G-Interface	107
Abb. 5.2 Reaktionen bei Nukleotidbindung	111
Abb. 5.3 Vergleich der Aminosäuresequenzen der Septine	113
Abb. 5.4 Rolle der GTPase-Aktivität für die Funktion der Septine	117
Abb. 5.5 Rolle des Nukleotids für Stabilität des G-Interface	118
Abb. 5.6 Der nukleotid-abhängige Zyklus der heterotrimeren G-Proteine sowie der GNBPs Rho und Rab	119
Abb. 5.7 Struktur von Rab mit RabGDI	120
Abb. 5.8 Struktur der heterotrimeren G-Proteine	121
Abb. 5.9 Konformation des <i>switch</i> II Bereiches im GppNHp-gebundenen Zustand	122
Abb. 5.10 Mögliche Septinkomplexe bei Bruchstellen über verschiedene G-Interface	124

Tabellenverzeichnis

Tab. 1.1 Klassifikation der Septine in Gruppen	18
Tab. 3.1 Verwendeten Oligonukleotide	40
Tab. 5.1 Charakterisierung der Wechselwirkungen zwischen Sept7 und Nukleotiden.	110
Tab. 5.2 Hydrolyserate in den <i>multi-turnover</i> -Experimenten.	112
Tab. 5.3 Gemessene Dissoziationsraten der Sept7-Dimere.	115

Abkürzungsverzeichnis

°C	Celsius
µL	Mikroliter
µM	mikromolar
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure(n)
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
c	c-Terminus
ca.	circa
Cam	Chloramphenicol
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTE	Dithioerythritol
GAP	<i>GTPase-activating protein</i> (GTPase aktivierendes Protein)
GDI	<i>guanine nucleotide-dissociation inhibitor</i> Guaninnukleotid-Dissoziationsinhibitor)
GDP	Guanosin-5'-diphosphat
GEF	<i>guanine nucleotide-exchange factor</i> (Guaninukleotid-Austauschfaktor)
GMP	Guanosin-5'-monophosphat
GppNHp	Guanosin-5'-(β,γ-imido)-triphosphat
GST	Glutathion-S-Transferase
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
HPLC	<i>high performace liquid chromatography</i>
IPTG	Isopropyl β-D-thiogalactosid
Kan	Kanamycin
kDa	Kilodalton
L	Liter
LB	Luria-Bertani
M	molar
mant	N-methylantraniloyl
mg	Milligramm
mGDP	2',3'-bis(O)-(N-methylantraniloyl)-guanosin 5'-diphosphat
mGppNHp	2',3'-bis(O)-(N-methylantraniloyl)-guanosin 5'-(β,γ-imido)-triphosphat
mGTP	2',3'-bis(O)-(N-methylantraniloyl)-guanosin 5'-triphosphat
min	Minute(n)
mL	Milliliter
MPI	Max-Planck-Institut
N	N-Terminus
Ni-NTA	<i>nickel-nitrilotriacetic acid</i> (Nitrilotriessigsäure)
nL	Nanoliter
OD ₆₀₀	optische Dichte bei 600 nm
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PDB	Protein Datenbank
P _i	anorganisches Phosphat
rpm	rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SDS	Natrumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Natrumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
TB	<i>terrific broth</i>
TBA	Tetramethylammonium
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
v/v	Verhältnis Volumen/Volumen
w/v	Verhältnis Masse/Volumen
wt	Wildtyp, wildtypisch

Aminosäure	3-Buchstabencode	1-Buchstabencode
Alanin	Ala	A
Arginin	Arg	R
Asparagin	Asn	N
Aspartat	Asp	D
Cyctein	Cys	C
Glutamin	Glu	Q
Glutamat	Gln	E
Glycin	Gly	G
Histidin	His	H
Isoleucin	Iso	I
Leucin	Leu	L
Lysin	Lys	K
Methionin	Met	M
Phenylalanin	Phe	F
Prolin	Pro	P
Serin	Ser	S
Threonin	Thr	T
Tryptophan	Trp	W
Tyrosin	Tyr	Y
Valin	Val	V

Danksagung

An erste Stelle möchte ich mich herzlich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Alfred Wittinghofer für die gute Betreuung, die stetige Unterstützung, die scharfsinnigen Diskussionen und die offenherzige Kritik bedanken.

Prof. Dr. Ronald Winter möchte ich für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens herzlich danken.

Mein Dank richtet sich an alle aktuellen und ehemaligen Mitarbeiter aus dem Arbeitskreise Wittinghofers, Dr. Marian Farkasovsky, Dr. Rafael Gasper, Bernd Gilsbach, Dr. Katja Gotthardt, Dr. Lothar Gremer, Dr. Yiu Fung Ho, Dr. Shehab Ismail, Carolin Koerner, Dr. Arjan Kortholt, Alexandra Kravchenkov, Doro Kühlmann, Dr. Simon Meyer, Dr. Mandy Miertzschke, Dr. Kim Remans, Dr. Antje Schäfer, Rita Schebaum, Dr. Benjamin Schumacher, Dr. Minhajuddin Sirajuddin, Dr. Begona Sot, Patricia Stege, Susanne Terheyden, Dr. Katharina Uhlenbrock, Dr. Denise Wätzlich für eine nette, kollegiale Arbeitsatmosphäre und fruchtbare Diskussionen in unseren Seminaren.

Bei Dr. Mandy Miertzschke möchte ich mich besonders für das Korrekturlesen dieser Arbeit bedanken. Dr. Rafael Gasper und Dr. Shehab Ismail danke ich für die kompetente Einführung in die Welt der Kristallstrukturaufklärung.

Ein großer Dank geht zudem an die ganze X-Ray-Gemeinschaft des Instituts und insbesondere an Dr. Ingrid Vetter für die hervorragende Infrastruktur und die große Hilfsbereitschaft.

Bei Frau Simone Möbitz aus dem Arbeitskreis von Prof. Dr. Ronald Winter möchte ich mich für die intensive Betreuung und die geduldige und freundliche Hilfestellung bei der Durchführung der SPR-Messungen herzlich bedanken.

Die tiefste Dankbarkeit empfinde ich gegenüber meiner Mutter und meinen Brüdern, die in alle Lebenssituationen mir stets beigestanden haben. Ohne ihre Unterstützung wären mein Studium und die Doktorarbeit in dieser Form nicht möglich.

Der größte Dank gilt aber meiner Freundin Nadine, die in den ganzen Jahren während meines Studiums und meiner Doktorarbeit eine treue Begleiterin und Partnerin gewesen ist. Ohne ihre Hilfe wären die zahlreichen wissenschaftlichen Rückschläge auf diesem Wege deutlich schwerer zu verkraften gewesen. Aus diesem Grund möchte ich diese Arbeit ihr widmen.

Lebenslauf

Eldar Zent

Euskirchen Str. 14
45143 Essen

geboren am 13.01.1982 in Orsk (Russland)

Familienstand: ledig

Staatsangehörigkeit: deutsch

Ausbildung

09/1988 - 06/1998 Allgemeinbildende Schule in Orsk, Russland

Einreise nach Deutschland: 13.06.1998

09/1998 – 06/2002 Dietrich - Bonhoeffer - Gymnasium in Hilden
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

08/2002 - 05/2003 Zivildienst in St. Marien Hospital in Köln

10/2003 – 09/2008 Chemie Studium an der Philipps - Universität Marburg
Abschluss: Diplom Chemiker

10/2008 – 07/2012 Promotion am Max-Planck-Institut für molekulare
Physiologie mit dem Ziel der Promotion an der
Technischen Universität Dortmund

Dortmund, 11. Juni 2012

Erklärung

Ich versichere hiermit, dass ich meine Dissertation "Struktur-Funktions-Beziehungen der humanen Septine" selbständig und ohne unerlaubte Hilfe und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe.

Dortmund, 11. Juni 2012

Eldar Zent