

Transiente Strukturelle Eigenschaften des Rho-GDP-Dissoziationsinhibitors

Sara Medina Gomez, Ilaria Visco, Felipe Merino, Peter Bieling,* und Rasmus Linser*

Abstract: Rho-GTPasen, räumliche Hauptregulatoren einer Vielzahl zellulärer Prozesse, werden durch Komplexbildung mit Guaninnukleotid-Dissoziationsinhibitoren (RhoGDIs) reguliert. Man nimmt bisher an, dass diese einen unstrukturierten N-Terminus aufweisen, der den Nukleotidaustausch ihres Klienten bei der Bindung/Faltung hemmt. Mithilfe von NMR-Analysen, Molekulardynamiksimulationen und biochemischen Tests konnten wir stattdessen relevante strukturelle Eigenschaften des Terminus nachweisen, die sowohl in Anwesenheit als auch in Abwesenheit des Klienten transient existieren, allerdings kontextspezifisch variiert werden. Diese Beobachtungen revidieren das seit Langem bestehende Bild zum Mechanismus der Membranextraktion der GTPasen. Der komplexe und hochselektive Extraktionsprozess der RhoGTPasen wird nicht durch das gleichzeitige Falten und Binden eines sterisch blockierenden Peptides, sondern durch ein dynamisches Ensemble mit vordefinierten transienten strukturellen Eigenschaften orchestriert, die durch die spezifische Umgebung entlang des mehrstufigen Prozesses noch moduliert werden können.

Einleitung

Kleine GTPasen der Ras-Superfamilie sind wichtige membranassoziierte Signalmoleküle, die unterschiedliche Aktivitätszustände annehmen können, die von der regulierten Hydrolyse und dem Austausch ihres zugehörigen Guaninnukleotids abhängen. Insbesondere die Mitglieder der Rho-Familie der kleinen GTPasen sind für die lokale Modulation der Zytoskelettdynamik bei der intrazellulären Organisation, der Zellpolarität, der Morphogenese, der Motilität und anderen wichtigen zellulären Prozessen verantwortlich.^[1] Rho-Guaninnukleotiddissoziationsinhibitoren regulieren RhoGTPasen negativ, indem sie sie aus Membranen herauslösen^[2] und dabei die membranankernde C-terminale Iso-prenggruppe umschließen^[3] und die Interaktionen mit Regulatoren der GTPase-Aktivitätszustände wie Nukleotidaustauschfaktoren (GEFs) oder GTPase-aktivierenden Proteinen (GAPs, siehe Abb. 1A und B) unterdrücken.^[3–4] Auf diese Weise halten RhoGDIs einen großen Pool löslicher, inaktiver RhoGTPasen aufrecht. Der hoch konservierte N-Terminus von RhoGDI (Abb. 1C) ist für die Membranextraktion erforderlich,^[2] ist aber auch für die Hemmung des Nukleotidaustauschs und der Hydrolyse verantwortlich, indem es die Schaltregionen seiner GTPase-Klienten sterisch blockiert und sie somit in einem inaktiven Zustand hält.^[3a,4–5] Er trägt zudem maßgeblich zur Bindungsenergie des RhoGDI:RhoGTPase-Komplexes bei, da seine vollständige Trunkierung die Affinität für GTPasen um mehr als das 100-fache verringert.^[4] Seine funktionelle Bedeutung steht im Einklang mit dem hohen Grad an Sequenzerhaltung zwischen verschiedenen RhoGDI-Orthologen und -Isoformen (Abb. 1C). Der N-Terminus des Apo-Proteins hat selbst eine geringe Bindungsaffinität und wurde bisher als intrinsisch ungeordnete Proteinregion ohne definierte strukturelle Merkmale angesehen.^[3b,4,6] Insbesondere wurden keine signifikanten NOEs beobachtet, und die N-terminalen Resonanzen häufen sich in der zentralen Region der NMR-HSQC-Spektren. Abb. 1D zeigt die Prädiktion der Ordnung/Unordnung auf der Grundlage der in silico Analyse mit dem ODiNPred-Server.^[7]

Im Gegensatz dazu wird derzeit angenommen, dass der N-Terminus des GDI bei der Komplexbildung mit GTPasen in eine strukturierte Konformation faltet und nun sowohl an die GTPase als auch an Teile seines eigenen gefalteten Proteinkerns stabil gebunden ist,^[3a,5] siehe entsprechende Kristallstruktur in Abb. 1B. Insbesondere enthält die gefaltete Konformation ein Helix-Loop-Helix-Motiv, das die Schalter I- und II-Regionen der RhoGTPase kontaktiert, und eine teilweise helikale Struktur für den N-Terminus,

[*] Dr. S. Medina Gomez, Prof. Dr. R. Linser
Fakultät für Chemie und Chemische Biologie
Technische Universität Dortmund
Otto-Hahn-Str. 4a, 44227 Dortmund, Deutschland
E-mail: rasmus.linser@tu-dortmund.de

Dr. I. Visco, Dr. P. Bieling
Abteilung Systemische Zellbiologie
Max Planck-Institut für molekulare Physiologie
Otto-Hahn-Str. 11, 44227 Dortmund, Deutschland
E-mail: peter.bieling@mpi-dortmund.mpg.de

Dr. F. Merino
Abteilungen für Proteinevolution
Max Planck-Institut für Biologie
Max-Planck-Ring 5, 72076 Tübingen, Deutschland

© 2024 Die Autoren. Angewandte Chemie veröffentlicht von Wiley-VCH GmbH. Dieser Open Access Beitrag steht unter den Bedingungen der Creative Commons Attribution Non-Commercial NoDerivs License, die eine Nutzung und Verbreitung in allen Medien gestattet, sofern der ursprüngliche Beitrag ordnungsgemäß zitiert und nicht für kommerzielle Zwecke genutzt wird und keine Änderungen und Anpassungen vorgenommen werden.

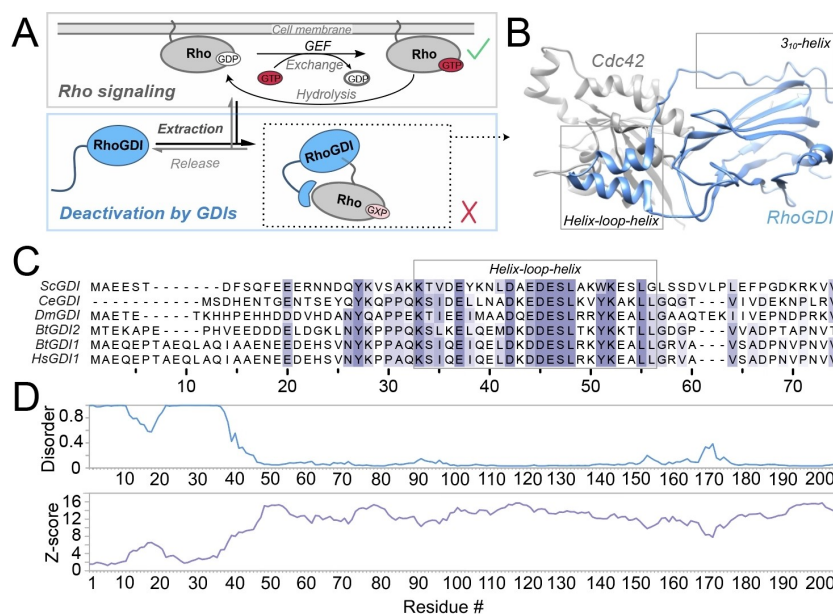


Abbildung 1. RhoGDI-Funktion und bioinformatische Analyse. **A)** RhoGDI deaktiviert RhoGTPasen (Rho) durch ihre Membranextraktion, woraufhin ein hochaffiner Komplex gebildet wird. „GXP“ bedeutet, dass sowohl aktives (GTP-gebundenes) als auch inaktives (GDP-gebundenes) Rho extrahiert wird.^[2] **B)** Kristallstruktur von RhoGDI im Komplex mit der GTPase Cdc42 (PDB 1DOA), die die spezifischen tertiären und sekundären Struktureigenschaften aufzeigt, die der zuvor flexible N-Terminus (graue Kästen) nun angenommen hat. **C)** Sequenzalignment der N-terminalen Region verschiedener RhoGDI-Orthologe und -Isoformen (vgl. auch Abb. S1). Sc: *Saccharomyces cerevisiae*, Ce: *Caenorhabditis elegans*, Dm: *Drosophila melanogaster*, Bt: *Bos taurus*, Hs: *Homo sapiens*. Die Farbe stellt den BLOSUM62-Score dar. L56 und Val74 markieren das Ende des Helix-Loop-Helix-Motivs bzw. den Beginn der C-terminalen, Ig-ähnlichen Domäne. **D)** Prädiktion von Unordnung (blau) und Z-Score (violett) bzgl. der Sekundärstruktur aus reiner in silico Analyse mittels ODIPred,^[7] wobei in Übereinstimmung mit der ursprünglichen Literatur^[3b,4,6] ein überwiegend ungeordneter Charakter der N-terminalen Reste vorhergesagt wird.

einschließlich einer 3₁₀-Helix für die Reste 9 bis 16, die sich gegen die Immunoglobulin (Ig)-ähnliche Domäne zurückfaltet, die die Reste zur Geranylgeranyl-Bindungstasche beiträgt.^[3a] Es wird angenommen, dass diese Umwandlung der Sekundärstruktur des N-Terminus von Unordnung zu Ordnung ein wesentlicher Bestandteil des diffizilen Mechanismus zur Extraktion von RhoGTPasen aus der Membran ist. Auf der Grundlage der bestehenden Struktur^[3a,5] und biochemischen Daten wurde ein zweistufiger Mechanismus vorgeschlagen, bei dem sich der unstrukturierte N-Terminus des GDI zunächst auf die membrangebundene GTPase faltet.^[8] Eine anschließende Isomerisierung führt dann zum Austausch des Prenylanteils zwischen der Membran und der Ig-ähnlichen Domäne von RhoGDI.

Aus der Sicht der ursprünglichen Literatur zur Struktur von RhoGDI war das extreme Ausmaß der Veränderung der strukturellen Eigenschaften des N-Terminus von RhoGDI, die mit der spezifischen Erkennung von membrangebundenen GTPasen in Einklang zu bringen sind, erstaunlich. Zudem schienen der ungeordnete Charakter in apo-GDI, seine geringe Bindungsaffinität zur GTPase in isolierter Form und die wohldefinierten strukturellen Eigenschaften in der Komplexstruktur, wo er sich an einer vom Nukleotid entfernten Stelle faltet, ohne die heutigen Konzepte zu intrinsisch ungeordneten Regionen (IDRs) als evolutionär abgestimmte Ensembles von Konformeren mit transienten aber hoch definierten Eigenschaften^[9] überraschend. Hier nutzen wir NMR-Spektroskopie und biochemi-

sche Assays, um das bestehende Bild der strukturellen Eigenschaften der N-terminalen Domäne von RhoGDI in der apo-Form und in der Bindung an seinen Klienten, die RhoGTPase Cdc42, zu überprüfen. Angesichts seiner weit verbreiteten Expression und höheren Affinität für seine GTPase-Klienten im Vergleich zu anderen RhoGDI-Isoformen^[3b,10] beschränken wir unsere Analyse auf RhoGDI1.

Ergebnisse und Diskussion

Unser Interesse an den strukturellen Eigenschaften des N-Terminus von RhoGDI1 ergab sich aus einer Analyse mit dem aktuellen Robetta-Modellierungsalgorithmus, einem auf Deep Learning basierenden Tool zur Vorhersage von Proteinstruktur.^[11] Obwohl solche Vorhersageergebnisse durch Daten von gebundenen Zuständen potenziell verzerrt sein können, weckte es unsere Neugier, dass die Robetta-Vorhersage für den N-Terminus des Apoproteins das Vorhandensein helikaler Elemente für die Reste 8 bis 16 und das Helix-Loop-Helix-Motiv (Abb. 2A) zeigte, die im aktuellen mechanistischen Modell nicht angenommen werden. (Abb. S2 vergleicht die Vorhersagen für das Protein in voller Länge mit denen für einen isolierten N-Terminus.) Um in silico zu testen, ob/wie (teilweise) gefaltete Zustände innerhalb des Konformationsensembles des N-terminalen Endes von RhoGDI tatsächlich möglich sind und wie dies mit den bisherigen Daten in Einklang gebracht werden

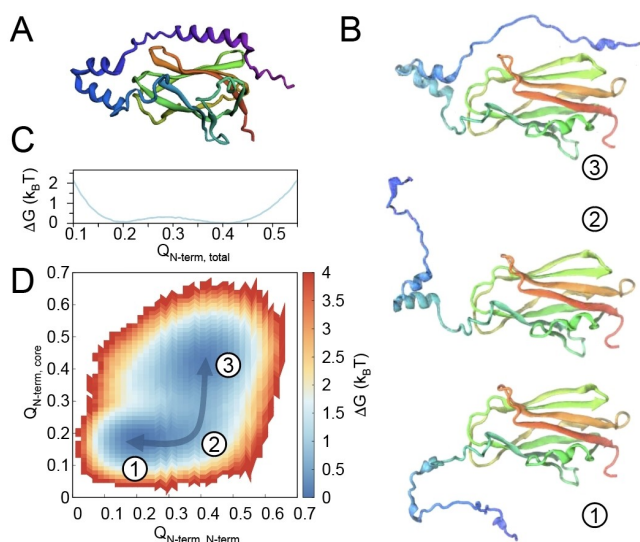


Abbildung 2. Strukturelle Eigenschaften aus evolutionären Analysen und MD-Simulationen. **A)** Robetta-Output, der starke N-terminale sekundärstrukturelle Eigenschaften anstelle des angenommenen ungeordneten Charakters vorhersagt. **B)** Repräsentative Schnappschüsse der von RhoGDI während der Simulationen eingenommenen Konformationen. (Farbe in A) und B) entsprechend der Primärsequenz). **C** und **D)** Profile der freien Faltungsenthalpie für den N-Terminus von RhoGDI bei seiner Faltungstemperatur: C) Freie Enthalpie als Funktion des Anteils aller nativen Kontakte, die durch den N-Terminus gebildet werden, d. h. Aminosäuren 1–65 ($Q_{\text{N-term, gesamt}}$), und D) 2D-Profil der freien Enthalpie bei Faltung des N-Terminus als Funktion des Anteils nativer Kontakte zwischen N-terminalen Resten (x-Achse, $Q_{\text{N-term, N-term}}$) und solcher zwischen N-terminalen Resten und dem übrigen Protein (y-Achse, $Q_{\text{N-term, Kern}}$). Der Pfeil zeigt den Pfad minimaler freier Enthalpie, der den vollständig gefalteten mit dem vollständig entfalteten N-Terminus verbindet.

könnte, haben wir uns zunächst Molekulardynamiksimulationen (MD) mit strukturbasierten Potenzialen zugewandt. Diese vereinfachten Simulationen werden dafür genutzt, den Faltungsprozess eines Proteins ohne die typischen Einschränkungen herkömmlicher MD-Läufe mit allen Atomen erfassen. Als Referenz für den nativen Zustand haben wir die Struktur von RhoGDI im Komplex mit Cdc42 (PDBID: 1DOA) verwendet.

Abb. 2B zeigt drei repräsentative Konformationen, die der N-Terminus von RhoGDI während der Simulationen durchläuft. In Übereinstimmung mit seiner losen Verbindung zum Rest des Proteins erkundet der N-Terminus ein großes Konformationsensemble, während die Kerndomäne des Proteins gefaltet bleibt. Gefaltete und ungefaltete Zustände sind durch eine sehr flache Barriere getrennt, die weit unter der thermischen Energie liegt (Abb. 2C). Interessanterweise beobachteten wir durchgängig eine Umwandlung zwischen vollständig entfalteten Konformationen und Zuständen, in denen N-terminale Sekundärstrukturelemente (insbesondere das Helix-Loop-Helix-Motiv und die N-terminale 3_{10} -Helix) spontan ohne Bindung an den Proteinkern gebildet werden. Das 2D-Profil der freien Faltungsenthalpie in Abhängigkeit von den intra-N-terminalen Kontakten und den Kontakten zwischen N-terminalen Resten und dem

Kern zeigt, dass die erwarteten Minima der freien Energie, die den vollständig ungeordneten und den vollständig gebundenen Zustand repräsentieren, zwar vorhanden sind (Zustände „1“ bzw. „3“ in Abb. 2B und D), aber ein flacher Pfad – der Pfad der minimalen freien Energie – sie durch einen Zwischenzustand mit teilweise gefaltetem, aber abgelöstem N-Terminus (Zustand „2“) verbindet.

Um die Tendenz zu einer präformierten N-terminalen Kontaktfläche für Interaktionen zwischen GDI und GTPase experimentell zu quantifizieren, haben wir uns der NMR-spektroskopischen Charakterisierung von restspezifischen strukturellen und dynamischen Eigenschaften zugewandt.^[12] Zu diesem Zweck wurden drei verschiedene Konstrukte von bovinem RhoGDI1 rekombinant exprimiert und nach Standardverfahren aufgereinigt. Insbesondere wurde RhoGDI1 in voller Länge (Reste 1 bis 204) in dreifach markierter Form (^2H , ^{13}C , ^{15}N) hergestellt, während zwei isolierte N-terminale Fragmente (Reste 1 bis 59 und Reste 1 bis 69) in zweifach, ^{13}C , ^{15}N -markierter Form exprimiert wurden. (Einzelheiten zur Expression und Reinigung finden sich in den Materialien und Methoden, SI.) Um eine ortsspezifische Charakterisierung der sekundären Strukturmerkmale zu ermöglichen, wurde eine umfassende Reihe von 3D-Lösungen NMR-Spektren der verschiedenen RhoGDI1-Konstrukte aufgenommen. (Da sich die N-terminalen Reste in einer stark überlappenden zentralen Region der H/N-Ebene drängen, was die Resonanzzuordnung der Reste des Proteinkerns bereits in früheren Studien beeinträchtigt hat,^[4] wendeten wir uns zunächst der Zuordnung dieser Reste in den isolierten N-terminalen Fragmenten zu. Auf diese Weise wurde eine vollständige Zuordnung der N-terminalen Reste, ihre sukzessive Übertragung auf die Vollängenproteine sowie eine umfassende Zuordnung der verbleibenden Reste im Vollängenkonstrukt möglich. (Abb. 3A und 4A zeigen die zugeordneten HSQC-Spektren für das gesamte RhoGDI1-Protein bzw. den (längeren) eigenständigen N-Terminus. Die chemischen Verschiebungen wurden in der BRMB unter der Zugriffsnummer 51835 hinterlegt.

Die Resonanzzuordnungen bildeten die Grundlage für die experimentelle Untersuchung von RhoGDI1-Strukturmerkmalen in Lösung in restaurierter Weise. Wir verwendeten zunächst den Algorithmus CheSPI (Chemical shift Secondary structure Population Inference,^[13] Abb. 3C) – entwickelt, um relative strukturelle Eigenschaften in geordneten und ungeordneten Systemen auf der Grundlage von nachbarschaftskorrigierten chemischen Verschiebungen zu quantifizieren – für eine Sekundärstrukturanalyse auf der Grundlage der erhaltenen chemischen Verschiebungen der $^1\text{H}^{\text{N}}$, ^{15}N , ^{13}CO , $^{13}\text{C}^{\alpha}$ und $^{13}\text{C}^{\beta}$ Kerne im Proteintrückgrat. (Die zugrunde liegenden individuellen, kernspezifischen sekundären chemischen Verschiebungen, berechnet nach Nielsen et al.,^[14] sind in Abb. 3D dargestellt; eine entsprechende Analyse mit Talos+^[15] und der aus der CheSPI-Analyse erhaltene Z-Score, der den Grad der Ordnung/Unordnung als Funktion des Restes angibt, sind in Abb. S3 bzw. S4 dargestellt.) Die erzielten Ergebnisse bestätigen das Vorhandensein einer ausgeprägten Sekundärstruktur innerhalb des N-Terminus der apo-Form des Vollängenproteins. Insbesondere die Reste 42 bis 55 zeigen ein stabiles helikales

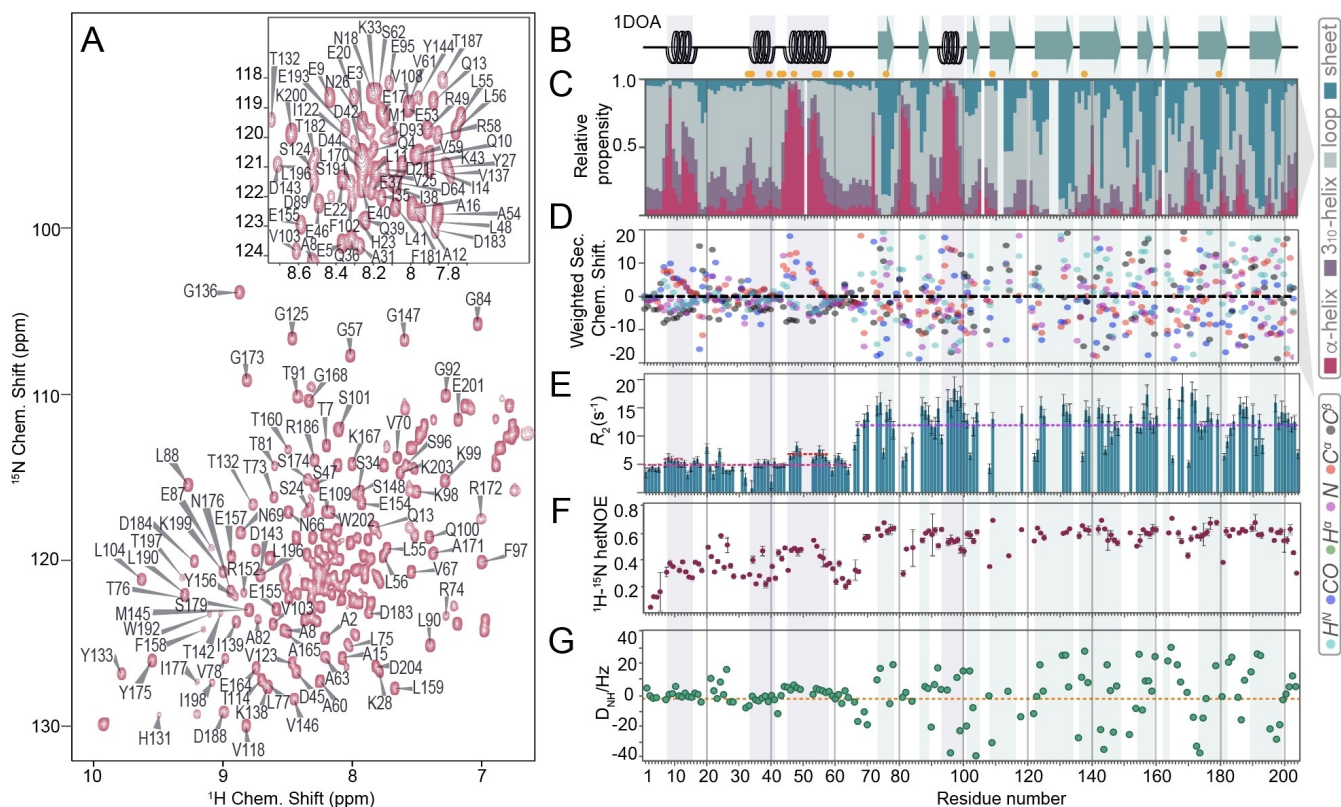


Abbildung 3. Experimentelle NMR-basierte Analyse der sekundärstrukturellen Eigenschaften von RhoGDI1 in voller Länge. **A)** Zugeordnetes HSQC des Volllängenproteins, aufgenommen bei 800 MHz ^1H -Larmor-Frequenz, wobei Teile des gedrängten zentralen Bereichs nur im vergrößerten Ausschnitt oben bezeichnet sind. **B)** Sekundärstruktur aus der Röntgenstruktur des RhoGDI1:Cdc42-Komplexes (PDB 1DOA). **C)** Auf chemischen Verschiebungen basierende relative sekundärstrukturelle Tendenzen (CheSPI) und **D)** nachbarschaftskorrigierte sekundärchemische Verschiebungen für ^1H , ^1N , $^1\text{C}^\alpha$, $^1\text{C}^\beta$ und ^1CO (gezeichnet in cyan, magenta, rot, schwarz, blau bzw. grün) von apo RhoGDI1. **E)** R_2 -Relaxation von apo GDI. **F)** $^{15}\text{N}\{^1\text{H}\}$ heteronuklearer NOE. **G)** Residuale dipolare Kopplungen, erhalten unter Verwendung von 15 mg/mL Pf1-Phagen, was zu einer quadrupolaren $^2\text{D}_2\text{O}$ -Aufspaltung von 15 Hz führt. Der Farbcode für die Sekundärstrukturanalyse in C) ist auf der rechten Seite dargestellt. Gelbe Punkte markieren Reste mit teilweiser Überlappung. Alle oben genannten Parameter deuten durchweg auf das Vorhandensein einer lokalen (temporären) Sekundärstruktur in einem Teil des N-Terminus hin.

Fragment, das genau der helikalen Struktur entspricht, die für den kristallinen RhoGDI:GTPase Komplex gefunden wurde.^[3a,5] Der zweite, kürzere helikale Abschnitt, der in der Röntgenstruktur im Bereich der Reste 32 bis 40 zu sehen ist, zeigt in der NMR ebenfalls eine helikale sekundärstrukturelle Neigung, allerdings mit einer viel schwächeren helikalen Tendenz (etwa 30 % insgesamt) und einem niedrigeren Z-Score als der erste Abschnitt. Ein drittes helikales Fragment wird experimentell für die Reste 8–15 (die 3_{10} -Region im kristallinen Komplex) gefunden, wiederum mit einer quantitativ geringeren Neigung (etwa 50 %) und einem moderaten Z-Score. Alle (transienten) helikalen Neigungen im Terminus stimmen mit den strukturellen Merkmalen von RhoGDI1 im Komplex überein (Abb. 3B). Abb. 3E zeigt die ortsspezifischen R_2 -Raten von apo-RhoGDI1. (Man beachte, dass im Gegensatz zu den gut aufgelösten 3D-Tripelresonanzspektren bei den H/N-basierten Analysen ein Teil der Peaks teilweise überlappt, wie durch gelbe Punkte in den Abbildungen 3–5 markiert.) Diese Raten (ca. 5 s^{-1} , im Gegensatz zu Raten von ca. 15 s^{-1} für die strukturierten Reste im Kern) bestätigen eine größere Gesamtflexibilität (eine kürzere effektive Korrelationszeit) des N-Terminus,

jedoch mit leichten, aber eindeutigen Erhöhungen ($7\text{--}8 \text{ s}^{-1}$) für die transiente Sekundärstruktur im äußersten N-Terminus (um Rest 8) und insbesondere für die stabilere Helix-Loop-Helix-Motivs (um Rest 50). Der signifikante Unterschied im Vergleich zu den R_2 -Raten, die generell für den Kern gefunden werden, zeigt, dass keines der Elemente im Terminus mit transientser Sekundärstruktur fest mit dem Kern assoziiert ist. Eine eindeutige Bestätigung für eine teilweise aufrechterhaltene Helizität im Kontext einer hohen Gesamtflexibilität ergibt sich auch aus den $^{15}\text{N}\{^1\text{H}\}$ heteronuklearen NOEs (Abb. 3F) und residuellen dipolaren Kopplungen (unter Verwendung von Pf1-Phagen), wobei leicht positive Werte in aufeinanderfolgenden Resten innerhalb intrinsisch ungeordneter Regionen typisch sind für eine helikale Tendenz^[16] (Abb. 3G, siehe Hintergrundinformationen für präparative Details).

Um zu entschlüsseln, ob bzw. inwieweit es sich bei den für den N-Terminus gefundenen sekundärstrukturellen Tendenzen um vollständig intrinsische Eigenschaften handelt oder ob sie durch lokale Wechselwirkungen kontextspezifisch weiter geformt werden, wurde eine Analyse der sekundärstrukturellen Merkmale für zwei isolierte N-terminale

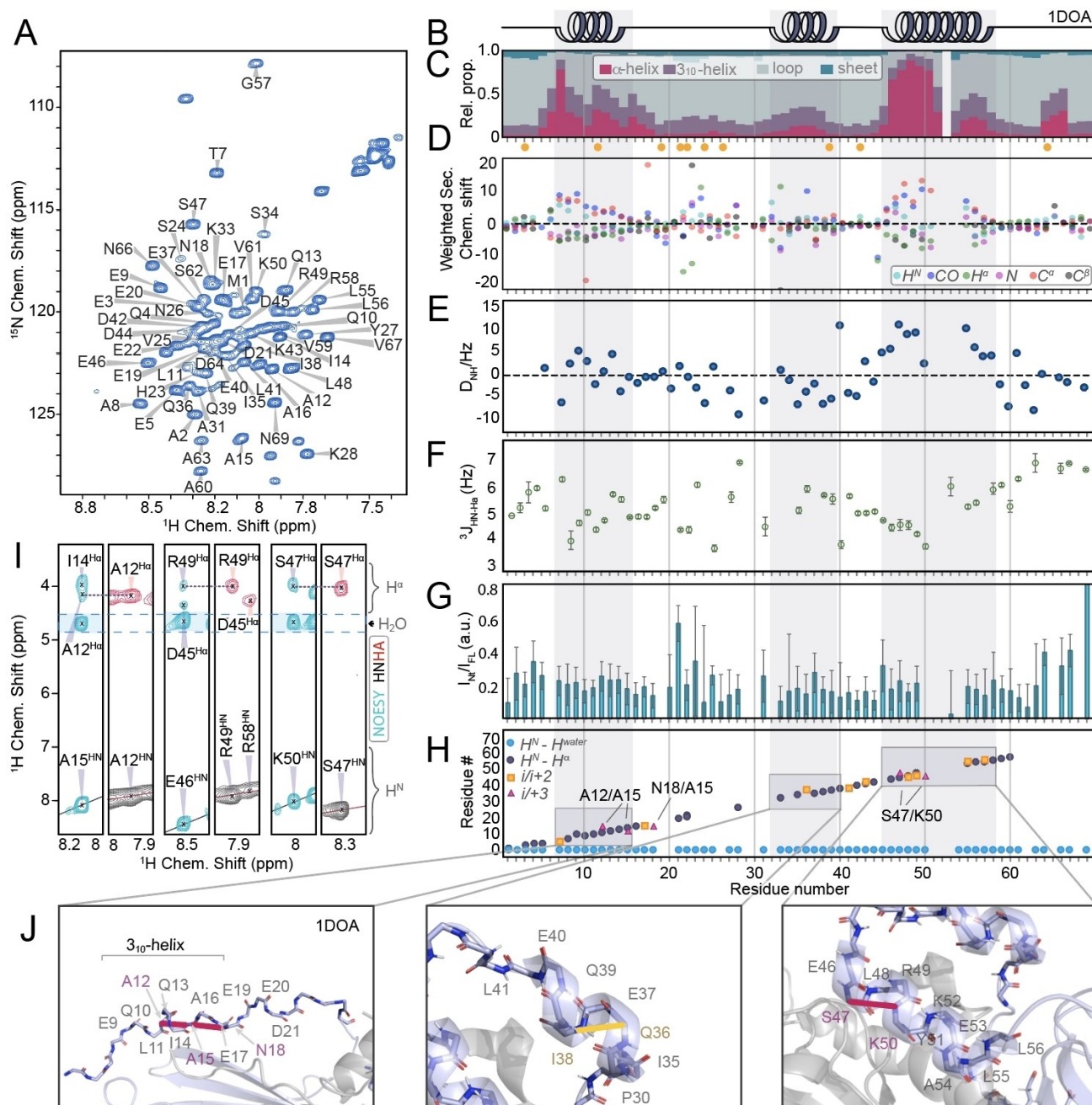


Abbildung 4. Charakterisierung des isolierten RhoGDI1-N-Terminus (hier: Konstrukt mit den Resten 1–69). **A)** Zugeordnetes ^1H – ^{15}N HSQC des isolierten N-Terminus. **B)** Sekundärstruktur der Röntgenstruktur (1DOA) des Komplexes. **C)** Analyse des Ausmaßes der Sekundärstruktur des isolierten N-Terminus von RhoGDI anhand chemischer Verschiebungen des Rückgrats.^[13] Der Farbcode ist auf der rechten Seite dargestellt. Gelbe Punkte markieren Reste mit teilweiser Überlappung in 2D- (aber nicht in 3D-) Experimenten. **D)** Sekundäre chemische Verschiebungen für H^{N} , N, C^{α} , C^{β} , CO und H^{α} (in den Farben cyan, magenta, rot, schwarz, blau bzw. grün gezeichnet). **E)** Residuale dipolare Kopplungen, unter Verwendung von 30 mg/ml Pf1-Phagen ermittelt und zu einer quadrupolaren $^2\text{D}_2\text{O}$ -Aufspaltung von ~25 Hz führend, wobei gleichbleibend hohe (positive) Werte in aufeinanderfolgenden Resten typisch für helikale Eigenschaften in IDPs sind.^[16] **F)** $^3J_{\text{HNH}^{\alpha}}$ Kopplungen als Funktion des Restes, wobei durchweg kleine Werte ($\leq 4,5$ Hz) für helikale Abschnitte typisch sind. **G)** Verhältnis der Peakintensität zwischen isoliertem N-Terminus und dem Volllängenprotein als Funktion des Restes. Vergleiche Abb. S10 und S11 für CSPs. **H)** Vorhandensein von Amid-NOE-Kreuzpeaks in einem 3D- ^{15}N -editierten NOESY-Experiment, die das Vorhandensein temporärer Sekundärstruktur durch Magnetisierungsübertrag von Amidprotonen auf nahe gelegene H^{α} Spins zeigen (Kontakte von i zu $i+2$ und i zu $i+3$ durch gelbe Quadrate bzw. magentafarbene Dreiecke dargestellt, Kontakte zu Wasser durch blaue Kreise auf der x-Achse). **I)** Exemplarische Strips aus einem 3D ^{15}N -editierten NOESY (cyan) mit wichtigen Kontakten, in Verbindung mit passenden Strips aus einem HNHA-Experiment (rot/schwarz). **J)** Darstellung einiger NOE-Kontakte, die temporäre Sekundärstruktur repräsentieren, im Zusammenhang mit der passenden Sekundärstruktur in kristallographischer Erfassung, wobei die magentafarbenen und gelben gestrichelten Linien die experimentell beobachteten i zu $i+3$ - (linkes und rechtes Feld) bzw. i zu $i+2$ -Kontakte (mittleres Feld) zwischen H^{N} und H^{α} kennzeichnen.

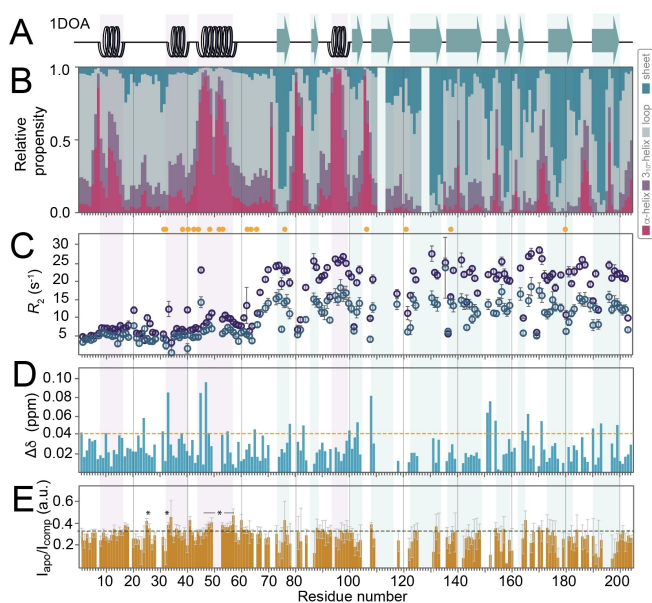


Abbildung 5. Struktur und Dynamik des N-Terminus von RhoGDI1 im GDI:Cdc42-Komplex. **A)** Sekundärstruktur des Komplexes wie in 1DOA gesehen. **B)** Sekundärstrukturelle Tendenzen des Komplexes, abgeleitet aus experimentellen chemischen Verschiebungen (CheSPI). **C)** R_2 -Raten des Komplexes (cyan), überlagert mit denen der apo-Form (dunkelblau). Vergleiche Abb. S12 für R_1 - und R_2/R_1 -Werte. **D)** Änderungen der chemischen Verschiebung bei Komplexbildung. Gelbe Punkte markieren eine teilweise Überlappung in den Pseudo-3D-Relaxationsdaten (nicht jedoch in den 3D-Tripelresonanzexperimenten). **E)** Verhältnis der Peak-Intensität zwischen dem Apoprotein und dem RhoGDI:Cdc42-Komplex als Funktion des Restes. Die gestrichelte Linie ist eingefügt, um Reste mit leicht erhöhten Verhältnissen erkennen zu lassen.

Konstrukte (Abb. 4) als (unphysiologische) Referenzfälle durchgeführt. (Der umgekehrte Fall, die Bewertung eines trunkierten RhoGDI-Kerns im Vergleich zur Vollversion, findet sich in Gosser et al.^[4]) Die CheSPI-Ergebnisse (Abb. 4C und S5) stimmen qualitativ immer noch mit den Tendenzen des Volllängenproteins überein. (Die zugrundeliegenden sekundärchemischen Verschiebungen für einzelne Kerntypen sind in Abb. 4D dargestellt, Vergleiche von CheSPI und TALOS sind in Abb. S5 und S6 zu sehen, und die Vorhersage der Unordnung aus reiner in silico Bewertung mittels ODINPred^[7,13] ist zum Vergleich in Abb. S7 dargestellt.) Wie im Volllängenprotein weist der helikale Abschnitt, der für die Reste 8–15 im längeren Konstrukt zu sehen ist, ähnlich niedrige Werte auf (etwas höher als im Volllängenprotein, aber mit einem Durchschnitt, der noch immer den Wert 0,5 nicht übersteigt), und transiente helikale Eigenschaften finden sich wieder um die Reste 32–40 und 45–55.

Das quantitative Ausmaß der helikalen Tendenz der letztgenannten Regionen (insbesondere der Reste 32–40 und 50–55) ist jedoch unterschiedlich, mit nur geringen Graden von Helizität im isolierten Terminus (etwa 30 bzw. 50 % im Vergleich zu etwa 60 bzw. 90 % im Protein voller Länge). Wie beim GDI in voller Länge wird die teilweise beibehaltene Helizität qualitativ durch residuale dipolare Kopplungen bestätigt, die mit 10–30 mg/mL Pf1-Phagen

ermittelt wurden (Abb. 4E). Darüber hinaus wurden $^3J^{\text{HNH}\alpha}$ Kopplungen (Abb. 4F und Abb. S8) und das Auftreten von typischen NOE-Mustern zwischen Amid- und H^α -Protonen (Abb. 4H–J) untersucht, die eindeutig die temporäre Bildung helikaler Struktur bestätigen, wo diese erwartet wird. Abb. S9 zeigt die Redfield-Relaxationsdaten R_1 , R_2 und $^{15}\text{N}\{^1\text{H}\}$ heteronukleare NOEs, die ebenfalls mit dem oben Beschriebenen übereinstimmen. Die oben erwähnten quantitativen Unterschiede zwischen dem isolierten N-Terminus und dem Volllängenprotein für einen Teil der helikalen Abschnitte der endgültigen Bindungsschnittstelle zur GTPase deuten darauf hin, dass (vorübergehende) intra- und intermolekulare Wechselwirkungen die strukturellen Tendenzen weiter modulieren, während die Nähe zum Kern bei der Vorstrukturierung der GDI-Oberfläche für die Initiierung der Komplexbildung hilft: Während die meisten C-terminalen Reste des N-Terminus durch Eigenschaften intrinsisch ungeordneter Proteine geprägt werden und nur wenig Tendenz zeigen, die endgültige Struktur zu bilden – was mit der zuvor beobachteten niedrigen Affinität des isolierten N-Terminus übereinstimmt, den Klienten zu binden^[4] – erhöhen die Wechselwirkungen zwischen N-Terminus und Kern des Proteins, wenn auch nicht fest verbunden, die Population temporärer sekundärer Strukturelemente weiter, so dass die Oberflächen für die GTPase-Bindung in größerem Umfang präformiert werden. Die Variabilität der Sekundärstruktur im Helix-Loop-Helix-Motiv, im Gegensatz zu konsistent ungeordneten Eigenschaften, manifestiert sich auch in den quantitativen Unterschieden in der residuellen Sekundärstruktur zwischen kürzerem und längerem N-terminalen Konstrukt (vgl. Abb. S5 vs. Abb. S6). Dieser Effekt wird durch die Unterschiede in den chemischen Verschiebungen (CSPs) zwischen den beiden isolierten N-terminalen Konstrukten im Vergleich zum GDI in voller Länge bestätigt (Abb. S10 und S11), was eine allgemeine Kontextabhängigkeit der strukturellen Eigenschaften in beiden Helices des Helix-Loop-Helix-Motivs bestätigt. Zur Ergänzung der CSPs, bei denen die Beträge der Sekundärstrukturmodulation mit den auf räumlicher Nähe basierenden Verschiebungsänderungen konvolviert werden, haben wir auch die Änderungen der Signalintensitäten im Vergleich zum Protein voller Länge untersucht (Abb. 4G). Hier deuten die erhöhten Werte darauf hin, dass die entsprechenden Reste im Volllängenprotein entweder stärker immobilisiert sind (wie erwartet und in Richtung des neuen C-Terminus beobachtet) oder eine Austauschverbreiterung erfahren (Reste 20–24), was wahrscheinlich auf transiente Kontakte zum Proteinkern zurückzuführen ist. Beide Tendenzen sind auch bei den CSPs im Vergleich zum Volllängenprotein zu beobachten (siehe Abb. S11). Paramagnetische Labels wären interessant, um die Wechselwirkungen innerhalb und zwischen den Domänen mit besserer Empfindlichkeit zu untersuchen. Abgesehen von den präparativen Herausforderungen für dieses System könnten diese jedoch auch chemische und sterische Veränderungen einführen, die bereits allein das empfindliche Gleichgewicht zwischen Ordnung und Unordnung stören könnten.

Als nächstes wurden die temporären strukturellen Eigenschaften, die wir im Apoprotein beobachteten, mit denen

von RhoGDI1 im Komplex mit seinem Bindungspartner GTPase Cdc42 verglichen (Abb. 5). Zu diesem Zweck wurde dreifach markiertes RhoGDI durch Zugabe von überschüssigem (isotopisch unmarkiertem) Cdc42, das in vitro homogen geranylgeranylisiert worden war, quantitativ in einen stöchiometrischen 1:1-Komplex inkorporiert. Angesichts der sub-nM-Affinität des Komplexes (siehe unten) konnte der heterodimere Komplex durch Größenausschlusschromatographie leicht von überschüssigem freiem Cdc42 getrennt werden, wodurch Detergenzien in den nachfolgenden Experimenten vermieden wurden. (Um die Komplexbildung zu überprüfen, wurden die GDI R_2 -Raten der beiden Proben verglichen (Abb. 5C). Die R_2 -Raten werden durch die Zeitskala des molekularen Taumelns moduliert (τ_c), und es wird eine allgemeine Zunahme erwartet, wenn das effektive Molekulargewicht und damit τ_c zunehmen. Diese Tendenz ist sowohl für die Reste des Kerns (von 11.9 ± 3.9 bis 19.6 ± 5.8) als auch für den N-Terminus (von 5.2 ± 2.0 bis 7.7 ± 3.1) deutlich zu beobachten, wenn man die R_2 -Raten beider Proben übereinanderlegt. Siehe auch Abb. S12 für R_2/R_1 -Verhältnisse sowie R_1 -Raten als Repräsentanten für effektive lokale Korrelationszeiten bzw. schnelle Bewegungen.

Obwohl die Röntgenstruktur des Komplexes (PDB 1DOA) zu einer definierten Struktur des N-Terminus konvergiert, zeigt die Elektronendichte selbst unter kryogenen Bedingungen im Kristall bereits eine gewisse Flexibilität (vgl. Abb. S13). C α B-Faktoren, deren Werte in der übrigen Struktur bis auf 34 sinken, weisen bis zum Rest 25 und zwischen 59 und 66 Werte von deutlich über 100 auf. Die NMR-Untersuchung bei Raumtemperatur zeigt nun ein sehr mobiles Verhalten des N-Terminus – auch im Komplex – und entspricht damit nahezu physiologischen Bedingungen in Lösung. Der Anstieg der R_2 -Raten von repräsentativen Resten im Inneren der Kernregion stimmt mit dem überein, was man für einen Komplex mit einem Molekulargewicht von 46,6 kDa bei 25 °C erwarten würde (siehe Abb. 5C). Zusätzlich zu dem systematischen Gesamtanstieg der R_2 -Raten der N-terminalen Reste (ab Rest 7) wird ein stärkerer Anstieg für die Abschnitte mit höherer relativer sekundärstruktureller Neigung beobachtet (bis weit über 10 s^{-1} für den Bereich um Rest 50). Das weitgehend erhaltene dynamische Verhalten widerspricht der bisher angenommenen stabilen Faltung auf die GTPase im gebundenen Zustand und zeugt vielmehr von solch Wechselwirkungen mit dem Klienten, die einen hohen Grad an konformationeller Freiheit im N-Terminus beibehalten. Das Bild einer eher lockeren Assoziation des N-Terminus und seiner präformierten Strukturelemente unterstützend sind nur geringe sekundärstrukturelle Änderungen bei der Komplexbildung ersichtlich (Abb. 5B, im Vergleich zu Abb. 3C). (Die einzelnen sekundär-chemischen Verschiebungswerte sind in Abb. S14 dargestellt). Abgesehen vom moderaten Anstieg der meisten N-terminalen R_2 -Raten werden bei der Komplexbildung schwache lokale Störungen der chemischen Verschiebung beobachtet (z.B. für die Reste K33, D45 und S47, Abb. 5D und S15), die mit den erwarteten N-terminalen Wechselwirkungen zwischen Cdc42 und RhoGDI1 übereinstimmen.^[3a]

In Übereinstimmung mit diesen Beobachtungen neigen diese Bereiche dazu, bei der Komplexbildung einen besonderen Anstieg der R_2 -Raten zu zeigen (Abb. 5C), was wahrscheinlich auf Beiträge durch chemischen Austausch im Zusammenhang mit diesen temporären Kontakten zurückzuführen ist. In Abb. 5E sind auch die Intensitätsverhältnisse zwischen der apo-Form und dem Komplex dargestellt. Sternchen kennzeichnen Reste mit leicht erhöhten Verhältnissen, welche mit Regionen übereinstimmen, in denen temporäre Kontakte Sekundärstruktur- und Flexibilitätseigenschaften beeinflussen könnten. (Beachten Sie, dass die Intensitätsverhältnisse kritisch zu bewerten sind, da ihre Werte von mehreren, miteinander verknüpften Aspekten abhängen). Zusammengenommen deuten diese Beobachtungen auf eine lockere, plastische Interaktion des N-Terminus des GDI mit dem Bindungspartner und dem Rest des Komplexes hin, mit einer verbleibenden Flexibilität der meisten N-terminalen Reste, schwachen spezifischen Kontakten und einem Aufrechterhalt der intrinsischen Sekundärstrukturverteilung in Präsenz von Assoziations-/Dissoziationsdynamik auf der mittleren Zeitskala. Eine weitere Charakterisierung der transienten intermolekularen Kontakte zwischen dem GDI-N-Terminus und Cdc42 wäre auch von der Klientenseite her interessant. Dies ist derzeit jedoch durch die geringe Kompatibilität der erforderlichen Geranylierung von Cdc42 sowohl mit Isotopenmarkierung/Resonanzzuordnung als auch mit paramagnetischer Spinmarkierung eingeschränkt.

Schließlich wollten wir die Bedeutung einer internen strukturellen Stabilität des N-Terminus von GDI für eine bessere Bindung an die GTPase biochemisch bewerten. Auf der Grundlage der oben genannten MD-Simulationen und NMR-Daten suchten wir nach einem Rest, der möglichst nicht Teil des Bindungsinterfaces selbst ist – und daher die Bindungsaffinität möglichst wenig durch direkte intermolekulare Wechselwirkungen mit Cdc42 beeinflusst – sondern v.a. die strukturelle Stabilität des temporären Helix-Loop-Helix-Strukturelements innerhalb des GDI-N-Terminus beeinflussen würde. (Eine damit einhergehende nachteilige Auswirkung nicht nur auf die Tertiär- sondern auch auf die freien Energien der Sekundärstrukturenbildung, die für die Mutanten im Folgenden nicht experimentell aufgeklärt wird, ist wahrscheinlich und kein Nachteil). Um den am besten geeigneten Rest zu identifizieren, führten wir einen Alanin-Scan des Interfaces mit dem Robetta-Server durch^[17] (siehe Abb. S16). Abb. 6A zeigt die Einbettung des Rests L56 in die Helix-Helix-Wechselwirkungen über den hydrophoben Kontakt mit I35. Wir wählten abnehmend konservative Mutationen von Leu56 zu Val, Ala oder Gly und untersuchten die kinetische Stabilität des Komplexes mit einem Förster-Resonanz-Energie-Transfer (FRET)-basierten Dissoziationsassay. Das FRET-Signal eines zweifach markierten Komplexes (80 nM) mit einem intermolekularen FRET-Paar (ein Alexa647-Akzeptor auf RhoGDI1 bzw. ein Cy3-Donor auf Cdc42) nimmt hier beim Mischen mit überschüssigem (5 μM) unmarkiertem GDI ab, so dass die Dissoziation des Komplexes in Abhängigkeit von der Zeit zu beobachten ist. Tatsächlich beobachteten wir einen starken und konsistenten Anstieg der Dissoziationskonstante des Kom-

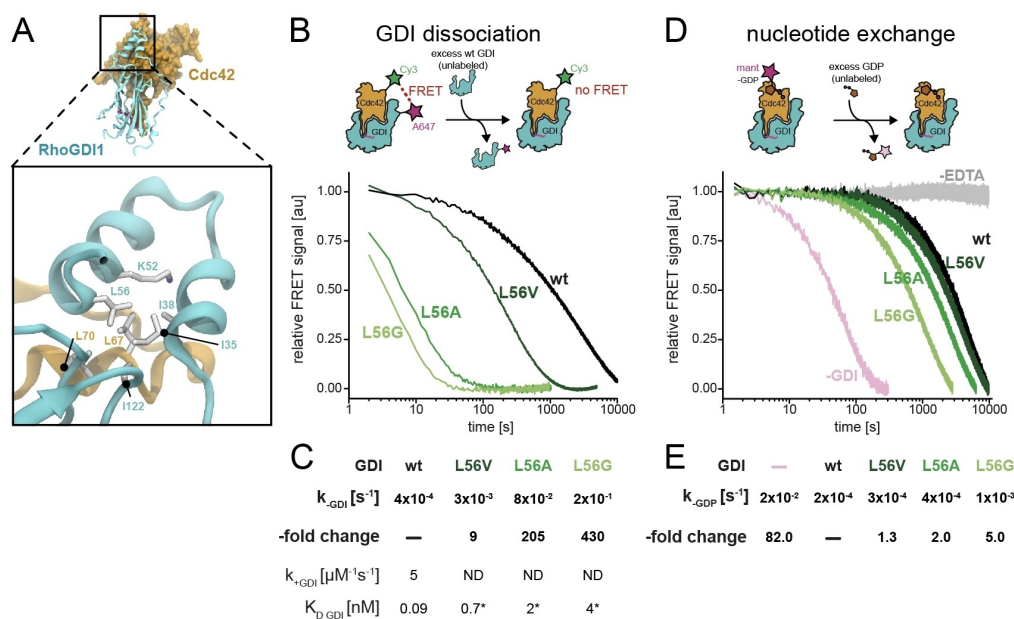


Abbildung 6. Analyse der Modulation der Komplexstabilität durch Destabilisierung der intramolekularen Wechselwirkungen im N-Terminus von RhoGDI mittels FRET. **A)** Umgebung von L56 innerhalb der Gesamtstruktur (oben) und lokal innerhalb des C-terminalen Endes des Helix-Loop-Helix-Motivs (unten). **B)** Oben: Schema des FRET-basierten Dissoziationsexperiments. Ein 1 : 1-Komplex zwischen Cy3-markiertem, prenyliertem Cdc42 und Alexa647-markiertem RhoGDI1 (wt oder Mutante) wird mit überschüssigem wt RhoGDI1 gemischt. Die Dissoziation des Komplexes wird im Laufe der Zeit durch den Verlust des FRET-Signals zwischen den beiden Fluorophoren verfolgt. Unten: Abnahme des FRET-Signals als Funktion der Zeit für wt RhoGDI (schwarz) und die Mutanten L56V, L56A und L56G (dunkel- bis hellgrün) wie angegeben. **C)** Übersicht zu Raten der Dissoziation (k_{GDI}) von GDI (entweder wt oder Mutanten, wie angegeben) von prenyliertem Cdc42, die aus monoexponentiellen Fits an die in B gezeigten Daten erhalten wurden, und zur relativen Ratenerhöhung im Vergleich zu wt-GDI. Die entsprechende Assoziationsrate ($k_{+ \text{GDI}}$) wurde für Wildtyp-GDI gemessen (siehe Abb. S17), und es wird angenommen, dass sie für die GDI-Varianten gleich oder langsamer ist. Die Gleichgewichtsdissoziationskonstanten ($K_{\text{D GDI}}$) wurden aus der Rate der gemessenen Dissoziationskonstanten und der gemessenen oder angenommenen Assoziationskonstante berechnet. **D)** Oben: Schema des auf Fluoreszenzintensität basierenden Nukleotidaustauschexperiments. Prenyliertes Cdc42, beladen mit Mant-GDP, wurde mit überschüssigem (5 μM) RhoGDI1 (wt oder Mutante) gemischt, um eine kontinuierliche RhoGDI-Bindung während des Experiments sicherzustellen. Die Nukleotiddissoziation wurde durch die Zugabe von überschüssigem unmarkiertem GDP (100 μM) eingeleitet und im Laufe der Zeit durch den Verlust der Fluoreszenzintensität aufgrund der Lösungsmittelexposition des Mant-GDP bei der Bindung von Cdc42 im Komplex mit RhoGDI verfolgt. Unten: Abnahme der Mant-Fluoreszenz als Funktion der Zeit für freies prenyliertes Cdc42 (rosa) oder im Komplex mit RhoGDI (entweder Wildtyp (schwarz) oder Mutanten L56V, L56A und L56G (dunkel- bis hellgrün)) wie angegeben. **E)** Übersicht der Nukleotidaustauschraten (k_{GDP}) von Mant-GDP aus prenyliertem Cdc42, entweder frei oder im Komplex mit RhoGDI (entweder wt oder Mutanten, wie angegeben), erhalten aus monoexponentiellen Fits der in D gezeigten Daten.

plexes bei Störung der interhelikalen Wechselwirkung mit abnehmender Seitenkettenlänge (Abb. 6B,C). Diese Messungen, zusammen mit der Assoziationsgeschwindigkeitskonstante, die wir unabhängig für Wildtyp-GDI bestimmt haben ($k_{+ \text{GDI}} = 5 \text{ s}^{-1} \mu\text{M}^{-1}$, Abb. S17), ermöglichten es uns, die Änderungen der Komplexaffinität abzuschätzen (Abb. 6C). Wir nehmen an, dass die GDI-Mutationen die hohe Assoziationsgeschwindigkeitskonstante für die Komplexbildung nicht wesentlich beeinflussen können, da diese (für Moleküle in diesem Molekulargewichtsbereich) nahe der Diffusionsgrenze liegt und daher nicht viel schneller werden kann. Daher haben wir wie zuvor beobachtet,^[18] dass Wildtyp-GDI seine GTPase-Klienten mit extrem hoher Affinität ($K_{\text{D}} = 90 \text{ pM}$) bindet (Abb. 6C). Mutationen von L56 führen zu einem fortschreitenden Verlust der Affinität bis zum mehr als 400-fachen. Doch selbst die am schwächsten bindende GDI-Variante (L56G) besitzt noch eine hohe Affinität ($K_{\text{D}} = 4 \text{ nM}$) für prenyliertes Cdc42.

Eine bekannte Funktion des N-Terminus des GDI ist die Hemmung des Nukleotidaustauschs und der Hydrolyse in

der gebundenen GTPase.^[3a,4–5] Daher fragten wir uns, wie die intrinsische N-terminale Dynamik und ihre Verstärkung durch die destabilisierenden Mutationen in GDI die Kinetik des GTPase-Nukleotidaustauschs beeinflussen. Zu diesem Zweck bestimmten wir die EDTA-induzierte Nukleotiddissoziation unter Verwendung des fluoreszenzmarkierten GDP-Analogs Mant-GDP, das an prenyliertes Cdc42 gebunden ist, in Gegenwart von überschüssigem unmarkiertem GDP in Lösung (Abb. 6D). Wir führten diese Experimente in Anwesenheit oder Abwesenheit von sättigenden (5 μM) Konzentrationen von RhoGDI (entweder Wildtyp oder Mutanten) durch, um während des Experiments den vollständig GDI-gebundenen oder GDI-freien Zustand zu erzeugen. Wir beobachteten, dass die Bindung von Wildtyp-GDI den Nukleotidaustausch in Cdc42 wie erwartet stark (83-fach) hemmt (Abb. 6D). Die geringe verbleibende Rate des Nukleotidaustauschs (Abb. 6D, $k_{\text{GDP}} = 2 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$) ist jedoch ähnlich langsam wie die GDI-Dissoziation ($k_{\text{GDI}} = 4 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$), was zeigt, dass diese Prozesse für Wildtyp-GDI auf einer ähnlichen Zeitskala ablaufen. Dies bedeutet, dass

die ausgeprägte N-terminale Dynamik, die wir für GDI innerhalb des Komplexes beobachten, um Größenordnungen schneller ist. (Der N-Terminus hat eine kürzere Korrelationszeit als der Proteinkern, eine Eigenschaft auf der ns-Zeitskala). Die vorgeschlagene sterische Blockade des Nukleotidaustauschs durch den N-Terminus, ein inhärent langsamer Prozess ($k_{\text{GDP}} = 2 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$ sogar in Abwesenheit von GDI), könnte daher ausschließlich als eine Ensemble-Eigenschaft erklärt werden, bei der der Zugang zur Bindungsstelle teilweise durch das Vorhandensein mehrerer (variabler) Konformationen in der Nähe der Bindungsstelle und nicht durch die Schaffung einer festen sterischen Blockade reduziert wird. Wir fanden heraus, dass die Destabilisierung der N-terminalen Struktur durch Mutationen von L56 zu einer (bis zu 5-fachen) Beschleunigung der Nukleotiddissoziation in Kongruenz zum Ausmaß der Störung führte (Abb. 6D/E), was mit der verringerten Lebensdauer des GTPase:GDI-Komplexes übereinstimmt. Während etwaige „blockierende“ Eigenschaften des Ensembles durch die Mutation weiter moduliert werden können, deutet die Übereinstimmung der Raten zwischen diesen Prozessen darauf hin, dass der Nukleotidaustausch während der gesamten Lebensdauer des Protein:Protein-Komplexes (moduliert durch die Interaktion mit dem Terminus) aufgehoben ist. (Die Diskrepanz zwischen der stärkeren Beschleunigung der Dissoziation des Proteinkomplexes mit Raten von bis zu $2 \times 10^{-1} \text{ s}^{-1}$ und einer geringeren Beschleunigung des Nukleotidaustauschs von bis zu $1 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ ergibt sich aus der Tatsache, dass die maximale Beschleunigung des Nukleotidaustauschs durch die Mutation mit der Austauschrate im freien Cdc42 von maximal $2 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$ begrenzt ist). Anstelle einer klassischen (d.h. statischen) sterischen Blockierung, für die ausreichend langlebige direkte Wechselwirkungen zwischen dem N-Terminus des GDI und der Nukleotidbindungsstelle ausgeschlossen werden können, könnte der bekannte Effekt, dass der Nukleotidaustausch durch den GDI effektiv verlangsamt wird, entweder auf stark abstoßende Effekte des *dynamischen Ensembles* zurückzuführen sein. Man könnte jedoch auch vermuten, dass die Kongruenz der Lebenszeiten auf andere, übergreifende Merkmale der Komplexbildung zurückzuführen ist, z.B. auf eine Modulation der internen GTPase-Dynamik im Komplex mit GDI (z.B. Reduktion des „Atems“ des Proteins, welches für den Austausch im Fall der freien GTPase wichtige Voraussetzung sein könnte), solange der Komplex besteht – oder sogar auf eine Kombination von verschiedenen Mechanismen.

Das Verhalten, das bei der Beurteilung der strukturellen Eigenschaften des N-Terminus von RhoGDI durch NMR-Spektroskopie beobachtet wurde, weicht von der langjährigen Annahme eines Übergangs von Unordnung zu Ordnung bei der Komplexbildung mit seinem GTPase-Klienten ab. Stattdessen enthält der N-Terminus von RhoGDI in voller Länge in seinem apo-Zustand den größten Teil der Architektur, die in der Röntgenstruktur des Komplexes im Rahmen wohldefinierter Strukturelemente stabil angenommen wird. Umgekehrt bleibt ein hohes Maß an Flexibilität in den N-terminalen Resten auch nach der Komplexbildung erhalten. Dies ist der Fall, obwohl die erwarteten Änderungen von chemischen Verschiebungen und eine allgemeine Erhö-

hung der R_2 -Raten die Bildung des heterodimeren Komplexes eindeutig bestätigen. Auch wenn zum jetzigen Zeitpunkt unklar ist, wofür diese besonderen strukturellen Eigenschaften im zellulären Kontext benötigt werden, wird deutlich, dass das vorherrschende Modell der RhoGDIs und der Interaktion mit ihren Klienten angepasst werden muss, was gut zum sich mehr und mehr abzeichnenden allgemeinen Bild von Proteinen als dynamische konformationelle Ensembles mit heterogen definierten strukturellen Eigenschaften passt. Insbesondere bei intrinsisch ungeordneten Regionen wird davon ausgegangen, dass die ortsspezifische, transiente Sekundärstruktur wichtige Auswirkungen auf die Bindungseigenschaften, die Affinität und die Selektivität gegenüber Bindungspartnern hat.^[19] Zusätzlich zur Faltung/Bindung^[21] als eher *graduellen* Veränderungen innerhalb unterschiedlich verschobener Gleichgewichte ermöglichen die heterogenen Landschaften der freien Energie dynamischer Ensembles auch eine Feinabstimmung der strukturellen Eigenschaften in Abhängigkeit von externen Ereignissen, die die nachgeschalteten Signalkaskaden empfindlich beeinflussen können. Während mechanistische Daten im biologischen Kontext in dieser Studie nicht verfolgt wurden, kann spekuliert werden, dass das Vorhandensein von transienten und extern modulierbaren strukturellen Eigenschaften im N-Terminus von RhoGDI eine komplexere mechanistische Rolle spielt als der zuvor angenommene, binäre Übergang von Unordnung zu Ordnung, der für die sterische Hemmung des Nukleotidaustauschs erforderlich ist. Die Gesamtflexibilität trotz abstimmbarer lokaler Präformation könnte *mechanistisch* günstig für die Membranextraktion von GTPasen durch RhoGDI sein – wahrscheinlich ein mehrstufiger und reversibler Prozess^[8] – was in der Tat weder mit einem hochaffinen, aber völlig starren, noch mit einem völlig unstrukturierten und daher niedrigaffinen N-Terminus vereinbar zu sein scheint. Die Kontextabhängigkeit der strukturellen Tendenzen des N-terminalen Bindungsinterfaces, das in Anwesenheit (GDI in voller Länge) oder in Abwesenheit von Wechselwirkungen mit Oberflächen des Kerns (isolierte N-Termini) und bei unterschiedlichen Längen der terminalen Konstrukte beobachtet wurde, deutet außerdem auf einen gewissen Grad an *Modulation* ihrer Faltungsenergielandschaft durch vorübergehende intra- oder inter-Domänen- und intermolekulare Wechselwirkungen hin, die leicht an eine kooperative Faltung benachbarter Domänen erinnert^[22] oder Modulation von Potenzialhyperflächen durch „Crowding Agents“ und andere Oberflächenwechselwirkungen in einer zellulären Umgebung.^[23] Man könnte spekulieren, dass die beobachteten Eigenschaften die schnelle und selektive Bindung des Klienten beim ersten Kontakt verbessern könnten, während die Kompatibilität mit anderen Schritten des Prozesses erhalten bleibt. Insgesamt stehen die fein abgestimmten transienten strukturellen und dynamischen Eigenschaften, die für die N-terminale Sequenz beobachtet werden, im Einklang mit ihrem hohen Grad an Sequenzerhaltung, die angesichts der Tatsache, dass vermutlich nur ein kleiner Teil der Reste direkt mit dem Klienten interagiert, bemerkenswert ist.

Die Daten sprechen für eine ausgewogene Koexistenz von Struktur und Unordnung, die in einem kontextspezifi-

schen Gleichgewicht dynamisch variieren, und bringen die verschiedenen Erkenntnisse über RhoGDIs und ihre GTPase-Interaktionen aus früheren Arbeiten effektiv in Einklang. Der Fall RhoGDI fügt sich ein in das wachsende Spektrum zellulärer Kontexte, welche von einer solchen Koexistenz abhängen, die in einer Reihe verschiedener Bereiche der Strukturbiochemie von Bedeutung ist^[12b,24] und sowohl der Natur als auch künstlichen Eingriffen besondere Möglichkeiten bietet, Affinität und Selektivität zu optimieren.

Schlussfolgerung

Hier haben wir NMR-Spektroskopie in Lösung eingesetzt, um die inhärenten strukturellen Eigenschaften des N-Terminus des Rho-Guaninnukleotiddissoziationsinhibitors in Abwesenheit und in Anwesenheit seines GTPase-Klienten zu ergründen. Im Gegensatz zum bisher angenommenen binären Übergang von Unordnung zu Ordnung bei der Komplexbildung zeigen die Daten bereits in apo-Form eine kontextspezifische Tendenz des Interfaces zur teilweisen Präformierung jener strukturellen Merkmale, die später bei der Bindung des RhoGDI an seine GTPase beobachtet werden. Umgekehrt bleibt der Gesamtflexibilitätsgrad dieser Domäne auch nach der Komplexierung hoch. Zusammen mit FRET-basierten Dissoziationsassays deuten die Daten auf eine fein abgestimmte Koexistenz von Ordnung und Unordnung für den N-Terminus hin, der ein wohltemperiertes Ensemble von temporär angenommenen Konformationen bildet. Auch wenn die tatsächlichen zellulären Implikationen dieser Eigenschaften jenseits der durch die NMR-Experimente erreichbaren Einsichten liegen, deckt das beobachtete modulierbare dynamische Zusammenspiel verbleibende Lücken im derzeitigen Verständnis bzgl. des selektiven Erkennens und Bindens von Klienten durch GDIs auf.

Danksagung

Gefördert durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG, Einzelgrants 27112786, 325871075 an R.L. und 399893760 an P.B. und das Emmy Noether-Programm an R.L.). Gefördert durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG) im Rahmen der Exzellenzstrategie des Bundes und der Länder – EXC 2033-390677874 – RESOLV, und EXC-114 – 24286268 – CiPS-M. Finanziert/mitfinanziert von der Europäischen Union (ERC, 101082494 bypassNMR). Die geäußerten Ansichten und Meinungen sind jedoch ausschließlich die des Autors/der Autoren und spiegeln nicht unbedingt die der Europäischen Union oder des Europäischen Forschungsrats wider. Weder die Europäische Union noch die Bewilligungsbehörde können für sie verantwortlich gemacht werden. Open Access Veröffentlichung ermöglicht und organisiert durch Projekt DEAL.

Interessenkonflikt

Die Autoren erklären, dass keine Interessenkonflikte vorliegen.

Erklärung zur Datenverfügbarkeit

The data that support the findings of this study are openly available in BMRB at <https://bmr.io/>, reference number 51835.

Stichwörter: RhoGTPasen · NMR-Spektroskopie · Proteindynamik · Proteinkomplexe · Konformationelle Unordnung

- [1] a) A. L. Bishop, A. Hall, *Biochem. J.* **2000**, 348 Pt 2, 241–255; b) A. B. Jaffe, A. Hall, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **2005**, 21, 247–269.
- [2] A. E. Golding, I. Visco, P. Bieling, W. M. Bement, *eLife* **2019**, 8, e50471.
- [3] a) G. R. Hoffman, N. Nassar, R. A. Cerione, *Cell* **2000**, 100, 345–356; b) R. Garcia-Mata, E. Boulter, K. Burrage, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2011**, 12, 493–504.
- [4] Y. Q. Gosser, T. K. Nomanbhoy, B. Aghazadeh, D. Manor, C. Combs, R. A. Cerione, M. K. Rosen, *Nature* **1997**, 387, 814–819.
- [5] a) S. Grizot, J. Fauré, F. Fieschi, P. V. Vignais, M. C. Dagher, E. Pebay-Peyroula, *Biochemistry* **2001**, 40, 10007–10013; b) K. Scheffzek, I. Stephan, O. N. Jensen, D. Illenberger, P. Gierschik, *Nat. Struct. Biol.* **2000**, 7, 122–126.
- [6] N. H. Keep, M. Barnes, I. Barsukov, R. Badii, L. Y. Lian, A. W. Segal, P. C. Moody, G. C. Roberts, *Structure* **1997**, 5, 623–633.
- [7] R. Dass, F. A. A. Mulder, J. T. Nielsen, *Sci. Rep.* **2020**, 10, 14780.
- [8] T. K. Nomanbhoy, R. Cerione, *J. Biol. Chem.* **1996**, 271, 10004–10009.
- [9] a) A. Chowdhury, D. Nettels, B. Schuler, *Annu. Rev. Biophys.* **2023**, 52, 433–462; b) B. Fu, M. Vendruscolo, *Adv. Exp. Med. Biol.* **2015**, 870, 35–48.
- [10] J. V. Platko, D. A. Leonard, C. N. Adra, R. J. Shaw, R. A. Cerione, B. Lim, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1995**, 92, 2974–2978.
- [11] D. E. Kim, D. Chivian, D. Baker, *Nucleic Acids Res.* **2004**, 32, W526–531.
- [12] a) H. J. Dyson, P. E. Wright, *J. Biomol. NMR* **2019**, 73, 651–659; b) A. Abyzov, M. Blackledge, M. Zweckstetter, *Chem. Rev.* **2022**, 122, 6719–6748; c) M. R. Jensen, M. Zweckstetter, J.-r. Huang, M. Blackledge, *Chem. Rev.* **2014**, 114, 6632–6660; d) S. Milles, D. Mercadante, I. V. Aramburu, M. R. Jensen, N. Banterle, C. Koehler, S. Tyagi, J. Clarke, S. L. Shammass, M. Blackledge, F. Gräter, E. A. Lemke, *Cell* **2015**, 163, 734–745; e) K. Tamiola, B. Acar, F. A. Mulder, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, 132, 18000–18003; f) C. Camilloni, A. De Simone, W. F. Vranken, M. Vendruscolo, *Biochemistry* **2012**, 51, 2224–2231.
- [13] J. T. Nielsen, F. A. A. Mulder, *J. Biomol. NMR* **2021**, 75, 273–291.
- [14] J. T. Nielsen, F. A. Mulder, *Front. Mol. Biosci.* **2016**, 3, 4.
- [15] Y. Shen, F. Delaglio, G. Cornilescu, A. Bax, *J. Biomol. NMR* **2009**, 44, 213–223.
- [16] M. R. Jensen, M. Blackledge, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130, 11266–11267.
- [17] T. Kortemme, D. E. Kim, D. Baker, *Sci. STKE* **2004**, 2004, pl2.

- [18] Z. Tnimov, Z. Guo, Y. Gambin, U. T. Nguyen, Y. W. Wu, D. Abankwa, A. Stigter, B. M. Collins, H. Waldmann, R. S. Goody, K. Alexandrov, *J. Biol. Chem.* **2012**, 287, 26549–26562.
- [19] a) D. Neri, M. Billeter, G. Wider, K. Wüthrich, *Science* **1992**, 257, 1559–1563; b) B. Schuler, H. Hofmann, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2013**, 23, 36–47; c) E. Akoury, M. D. Mukrasch, J. Biernat, K. Tepper, V. Ozenne, E. Mandelkow, M. Blackledge, M. Zweckstetter, *Protein Sci.* **2016**, 25, 1010–1020; d) P. Sormanni, D. Piovesan, G. T. Heller, M. Bonomi, P. Kukic, C. Camilloni, M. Fuxreiter, Z. Dosztanyi, R. V. Pappu, M. M. Babu, S. Longhi, P. Tompa, A. K. Dunker, V. N. Uversky, S. C. E. Tosatto, M. Vendruscolo, *Nat. Chem. Biol.* **2017**, 13, 339–342.
- [20] a) B. A. Shoemaker, J. J. Portman, P. G. Wolynes, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, 97, 8868–8873; b) C. D. Mackereth, T. Madl, S. Bonnal, B. Simon, K. Zanier, A. Gasch, V. Rybin, J. Valcárcel, M. Sattler, *Nature* **2011**, 475, 408–411.
- [21] K. Sugase, H. J. Dyson, P. E. Wright, *Nature* **2007**, 447, 1021–1025.
- [22] L. Laursen, S. Gianni, P. Jemth, *J. Mol. Biol.* **2021**, 433, 167148.
- [23] W. B. Monteith, R. D. Cohen, A. E. Smith, E. Guzman-Cisneros, G. J. Pielak, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2015**, 112, 1739–1742.
- [24] a) S. Gianni, J. Dogan, P. Jemth, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2016**, 36, 18–24; b) M. Gruebele, G. J. Pielak, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2021**, 70, 1–7; c) H. Singh, C. K. Das, B. Buchmuller, L. V. Schäfer, D. Summerer, R. Linser, *Nucleic Acids Res.* **2023**, 51, 6495–6506.

Manuskript erhalten: 26. Februar 2024

Akzeptierte Fassung online: 9. Juni 2024

Endgültige Fassung online: 24. Juli 2024