

Untersuchung
der GAP-katalysierten
GTP-Hydrolysereaktion
von Ras und Rap

Inauguraldissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaftlichen Fachbereiche
der Justus-Liebig-Universität Gießen
im Fachgebiet Biologie

vorgelegt von

Dipl.-Biol.

Thilo Brinkmann

aus Unna

Gießen, 2000

Diese Arbeit entstand in der Zeit von Juni 1997 bis September 2000 unter der Leitung von Prof. Dr. Alfred Wittinghofer am Max-Planck-Institut für Molekulare Physiologie in Dortmund.

Erster Gutachter: Prof. Dr. Alfred Pingoud
Institut für Biochemie
des Fachbereiches Biologie, Chemie und Geowissenschaften

Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Gottfried Wagner
Institut für Allgemeine Botanik und Pflanzenphysiologie
des Fachbereiches Biologie, Chemie und Geowissenschaften

1	EINLEITUNG	1
1.1	ZELLTEILUNG, ZELLDIFFERENZIERUNG UND SIGNALTRANSDUKTION	1
1.2	KLEINE GTPASEN: SCHALTER DER ZELLULÄREN SIGNALVERARBEITUNG	1
1.3	DER GAP-KATALYSIERTE GTPASE-MECHANISMUS VON RAS ALS ZIELOBJEKT FÜR DIE ENTWICKLUNG VON ANTI-TUMOR-WIRKSTOFFEN	2
1.3.1	RAS ALS MOLEKULARER SCHALTER	3
1.3.2	DER MAP-KINASE-WEG	4
1.3.3	VERNETZTE SIGNALTRANSDUKTION	5
1.3.4	DER GTP-HYDROLYSEMECHANISMUS VON RAS	8
1.3.5	DER GTP-HYDROLYSEMECHANISMUS ALS GRUNDLAGE FÜR ANTI-RAS-MEDIKAMENTE	12
1.3.6	WEITERE ANSÄTZE FÜR ANTI-RAS-MEDIKAMENTE	12
1.4	DER GAP-KATALYSIERTE GTPASE-MECHANISMUS VON RAP: EIN PARADIGMA AUF DEM PRÜFSTAND	13
1.4.1	DIE RAP-PROTEINE - EINE EINFÜHRUNG	13
1.4.2	AUSTAUSCHFAKTOREN VON RAP	14
1.4.3	RAPGAP-PROTEINE	16
1.4.4	WELCHE FUNKTIONEN ÜBERNIMMT RAP IN DER ZELLE?	20
2	ZIELE DER ARBEIT	26
3	MATERIALIEN UND METHODEN	27
3.1	MATERIALIEN	27
3.1.1	CHEMIKALIEN	27
3.1.2	STANDARDPUFFER	27
3.1.3	VERWENDETE BAKTERIENSTÄMME	27
3.1.4	PLASMIDE	28
3.1.5	MEDIEN UND ANTIBIOTIKA	28
3.1.6	OLIGONUKLEOTIDE	29
3.1.7	ENZYME UND PROTEINE	30
3.1.8	ANTIKÖRPER	30
3.1.9	STANDARDS	30
3.1.10	SÄULENMATERIALIEN	30
3.1.11	KITS	31
3.1.12	FLUORESCENZLABEL	31
3.1.13	GERÄTE	31
3.1.14	COMPUTER UND SOFTWARE	32
3.2	METHODEN	32
3.2.1	MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN	32
3.2.2	PROTEINCHEMISCHE METHODEN	36
3.2.3	BIOPHYSIKALISCHE METHODEN	49

4	ERGEBNISSE	55
4.1	ENTWICKLUNG UND TEST EINES VERFAHRENS ZUR DETEKTION EINES NONAPEPTIDS MIT GTPASE-AKTIVIERENDER FUNKTION	55
4.1.1	UNTERSUCHUNG ORGANISCH-CHEMISCHER VERBINDUNGEN AUF GTPASE STIMULIERENDE AKTIVITÄT	60
4.2	CHARAKTERISIERUNG EINES KATALYTISCH AKTIVEN FRAGMENTS VON RAP1GAP	62
4.2.1	REINIGUNG EINES LÖSLICHEN RAP1GAP-FRAGMENTS IN PRÄPARATIVEM MAßSTAB	62
4.2.2	SEKUNDÄRSTRUKTURVORHERSAGE VON RAP1GAPV	64
4.2.3	CD-SPEKTROSKOPISCHE UNTERSUCHUNG VON RAP1GAPV	66
4.2.4	MASSENSPEKTROMETRISCHE UNTERSUCHUNG VON RAP1GAPV	68
4.2.5	THERMISCHE STABILITÄT VON VERKÜRZTEM RAP1GAP	69
4.2.6	KALORIMETRISCHE BESTIMMUNG DER AFFINITÄT VON RAP1GAPV ZU RAP1A*GppNHP	70
4.2.7	GELFILTRATIONSANALYSE VON RAP1GAPV	72
4.2.8	OBERFLÄCHENPLASMONRESONANZMESSUNG DER INTERAKTION VON GST-RAP1GAPV UND RAP1B*GppNHP	72
4.2.9	BESTIMMUNG DER KATALYTISCHEN AKTIVITÄT VON GST-RAP1GAPV IM VERGLEICH ZU RAP1GAPV	74
4.2.10	VERGLEICH DER GST-RAP1GAPV KATALYSIERTEN GTP-HYDROLYSEREAKTION VON RAP1A UND RAP1B	76
4.3	MUTATIONSGESTÜTZTE ANALYSE VON RAP1GAPV ZUR AUFKLÄRUNG DES KATALYTISCHEN MECHANISMUS DER RAP1GAP KATALYSIERTEN GTP-HYDROLYSE VON RAP1A/B	77
4.3.1	SEQUENZVERGLEICH BEKANNTER RAPGAP	77
4.3.2	MUTATIONSANALYSE KRITISCHER ARGININSEITENKETTEN IN RAP1GAP	78
4.3.3	MICHAELIS-MENTEN-KINETIK DER REAKTION VON RAP1A*GTP MIT DEN GST-RAP1GAPV VARIANTEN R284A UND R388A	80
4.3.4	KINETISCHE UNTERSUCHUNG DER GST-RAP1GAPV VARIANTEN K285A, K368A, Q280A, Q281A UND Q298A	81
4.3.5	CIRCULARDICHROISMUS-SPEKTRUM VON RAP1GAPV K285A	83
4.3.6	MICHAELIS-MENTEN-KINETIK DER REAKTION VON RAP1A*GTP MIT DER GST-RAP1GAPV VARIANTEN K285A	84
4.4	EINFLUSS DER AMINOSÄUREPOSITION 32 AUF DIE GAP-KATALYSIERTE GTP-HYDROLYSEREAKTION VON RAP1A	85
4.5	DIE GAP-KATALYSIERTE GTPASE-REAKTION DER RAP1A-VARIANTE G12V	86
4.6	RALGDS-RBD INHIBIERT DIE GST-RAP1GAP KATALYSIERTE GTPASE-REAKTION VON RAP1A	88
4.7	HERSTELLUNG VON FLUORESZENZMARKIERTEN RAP1-VARIANTEN	89
4.7.1	SPEKTREN DER IAEDANS-MARKIERTEN RAP1B-VARIANTEN	91
5	DISKUSSION	93
5.1	TEST VON PEPTIDBIBLIOTHEKEN AUF RASGAP-AKTIVITÄT	93
5.2	INTERAKTION VON RAP1 UND RAP1GAP	96
5.2.1	DAS KATALYTISCHE FRAGMENT VON RAP1GAP LÄSST SICH ALS GST-FUSIONSPROTEIN AUS <i>E. COLI</i> REINIGEN	97
5.2.2	RAP1GAP BESCHLEUNIGT DIE RAP1GTPASE 10 ⁵ FACH	99
5.2.3	RAP1GAP BESITZT KEINEN ARGININFINGER	100
5.2.4	WEITERE INDIZIEN FÜR EINEN ALTERNATIVEN GTPASE-MECHANISMUS	101
5.3	AUSBLICK	105

6	ZUSAMMENFASSUNG	107
<hr/>		
7	LITERATUR	109
<hr/>		
8	ANHANG	126
8.1	ABKÜRZUNGEN	126
8.2	DANKSAGUNG	128
8.3	VERÖFFENTLICHUNGEN ZUM THEMA DIESER ARBEIT	129
8.4	EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG	130

1 Einleitung

1.1 Zellteilung, Zelldifferenzierung und Signaltransduktion

Alles Leben entspringt einer Zelle. Sowohl aus phylogenetischer als auch aus ontogenetischer Perspektive hat dieser Satz Virchows seine Berechtigung. Im Laufe der Evolution erhöhten Zellen ihre Überlebenswahrscheinlichkeit durch selbstorganisierten Zusammenschluß. Analog zu den Prozessen, die in den Millionen Jahren der Evolution abliefen, wiederholt sich in der Ontogenese das komplizierte Zusammenspiel von Zellen, die sich hinsichtlich ihres Wachstums und ihrer Funktion selbst organisieren müssen.

Um ihre späteren Aufgaben im Organismus erfüllen zu können, müssen sich Zellen aus totipotenten Anfangsstadien zu Zellen mit definierter Funktion differenzieren. Voraussetzung für die Bildung komplexer selbstorganisierter Organismen ist eine funktionierende, vielseitige inter- und intrazelluläre Kommunikation. Hierzu gehören als wesentliche Elemente die Freisetzung von spezifischen Signalen (Botenstoffen), die Rezeption dieser Signale mittels geeigneter Proteine an der Zelloberfläche, die Weiterleitung in die Zelle, die Weiterleitung in der Zelle, die Integration verschiedener Signale und schließlich die Auslösung einer zellulären Antwort. Letztere besteht häufig in der differentiellen Expression von Genen, über die unter anderem Zellteilung oder Zelldifferenzierung eingeleitet werden. Der Begriff der Signaltransduktion umschreibt die Prozesse, die sich zwischen der Rezeption des Signals und der Reaktion der Zelle darauf abspielen. Verläuft einer dieser Prozesse nicht hinreichend reguliert, können Fehlfunktionen der Zelle, strukturelle Mißbildungen oder sogar unkontrolliert wuchernde Gewebe als Folgen auftreten. Auch im ausdifferenzierten Organismus kann es immer noch zu unregulierten Teilungsprozessen kommen, im Laufe derer die betroffenen Zellen ihre Differenziertheit verlieren können: Es entsteht ein Tumor.

Eine wichtige Rolle im Signaltransduktionsgeschehen übernehmen kleine GTPasen. Sie fungieren unter anderem als Schalter, die die Weiterleitung des Signals über eine komplexe Aktivierungskaskade aus Proteinkinasen einleiten oder beenden.

1.2 Kleine GTPasen: Schalter der zellulären Signalverarbeitung

Gemeinsam ist den kleinen GTPasen die Fähigkeit, GTP zu binden und zu hydrolysieren. Haben sie GTP gebunden, so befinden sie sich in ihrer aktiven Konformation. Mit der Hydro-

lyse des gebundenen GTP zu GDP geht ein Konformationswechsel des Proteins einher, der es in einen inaktiven Zustand überführt. Die kleinen GTPasen zeichnen sich durch ihr im Vergleich zu anderen GTP-hydrolysierenden Proteinen geringes Molekulargewicht von 20 bis 25 kDa aus. Sie alle verfügen über eine GTP-bindende Domäne, die zu der unter 1.3.4.1 vorgestellten der kleinen GTPase Ras homolog ist. Daher werden die kleinen GTPasen auch als Proteine der Ras-Superfamilie bezeichnet. Derzeit sind neun Familien von kleinen GTPasen bekannt, die jeweils nach ihrem prominentesten Mitglied benannt sind.

Die **Ras**-Proteine (*Rat sarcoma*) beeinflussen Apoptose, Proliferation und Differenzierung eukaryotischer Zellen (Vojtek & Der, 1998). Die Aufgaben der **Rho**-Proteine (*Ras homology*) liegen in der Reorganisation des Zytoskeletts, aber auch in der Kontrolle von Zellwachstum und Genexpression (Mackay & Hall, 1998; Sander & Collard, 1999). Auf den vesikulären Transport nehmen die **Rab**-Proteine (*Ras-like proteins from rat brain*) Einfluss (Schimmöller *et al*, 1998; Somsel & Wandinger-Ness, 2000). Von **Arf**-Proteinen (*ADP ribosylation factors*) wird die Bildung von Vesikeln und ihr Transport vom Endoplasmatischen Retikulum zum Golgi-Apparat (und umgekehrt) gesteuert (Jackson & Casanova, 2000; Moss & Vaughan, 1998). An der Regulation des Kerntransports sind die **Ran**-Proteine (*Ras-related nuclear proteins*) beteiligt (Moore, 1998). Die **Rad**-Proteine (*Ras-associated with diabetes*) wurden zuerst in den Muskelzellen von Diabeteskranken entdeckt. Ihre Funktion ist noch unbekannt (Bilan *et al*, 1998). Zur **Rheb**-Familie (*Ras homolog enriched in brain*) gehört derzeit nur das namensgebende Protein, bei dem es sich um einen Ras-Antagonisten handelt (Yee & Worley, 1997). Die Calmodulin-bindenden **Rit**-Proteine (*Ras-like expressed in many tissues*) sind wahrscheinlich an der Ca²⁺-vermittelten Signaltransduktion beteiligt (Lee *et al*, 1996; Shao *et al*, 1999; Wes *et al*, 1996). Weitgehend ungeklärt ist auch die Funktion der nur entfernt mit Ras verwandten **Rag**-Proteine (*Ras related GTP-binding proteins*) (Hirose *et al*, 1998; Schürmann *et al*, 1995).

Im Zentrum der vorliegenden Untersuchung stehen die Proteine Ras und Rap, die beide zur Ras-Familie gehören und im folgenden näher dargestellt werden.

1.3 Der GAP-katalysierte GTPase-Mechanismus von Ras als Zielobjekt für die Entwicklung von Anti-Tumor-Wirkstoffen

Ras ist das am häufigsten beim Menschen zum Onkogen mutierte Proto-Onkogen. Es liegt in zirka 20% aller menschlichen Tumoren mutiert vor (Grunicke, 1995). Das Expressionspro-

dukt des mutierten *Ras*-Gens ist maßgeblich an der unkontrollierten Proliferation der Zellen beteiligt. Ras¹ stellt daher ein lohnendes Zielobjekt für die Arzneimittelforschung dar (Wittinghofer & Waldmann, 2000).

1.3.1 Ras als molekularer Schalter

Ras dient als molekularer Schalter in Signaltransduktionsprozessen. Als kleine GTPasen erfüllen Ras-Proteine ihre Schalterfunktion durch die Bindung und Hydrolyse von Guaninukleotiden. Hat Ras GTP gebunden, so ist es aktiv und damit in der Lage mit Effektoren zu interagieren, die an der Spitze von Signaltransduktionskaskaden stehen. Bei Effektoren handelt es sich um Proteine, die an die Effektorbindungsregion von Ras (AS 32 bis 40) binden können (Marshall, 1993; McCormick & Wittinghofer, 1996). Mit der Hydrolyse von GTP zu GDP geht Ras in seinen inaktiven Zustand über, die Signalweiterleitung wird beendet.

Da sowohl die Hydrolyse von GTP, als auch der Austausch des an Ras gebundenen GDP gegen GTP durch Ras allein sehr langsam geschehen, werden diese von weiteren Proteinen beschleunigt, den Guaninnukleotid-Austauschfaktoren (GEF: *Guanine nucleotide Exchange Factors*) und den GTPase Aktivierenden Proteinen (GAP) (Abbildung 1-1). Die GEF beschleunigen die Austauschreaktion von GDP gegen GTP, indem sie die Nukleotidbindung destabilisieren und die Dissoziationsgeschwindigkeit erhöhen (Boriack-Sjodin *et al*, 1998). Da innerhalb der Zelle die GTP-Konzentration zirka zehnmal höher ist als die von GDP, ermöglicht die Erhöhung der Dissoziationsgeschwindigkeit die Bindung von GTP.

Die Ras inaktivierende GTP-Hydrolysereaktion wird durch GAP-Proteine stark beschleunigt und ist von großer Wichtigkeit, da bei einer Fehlfunktion des exakten Zusammenspiels von Ras und seinen GAP die Signalweiterleitung durch die intrinsische GTPase-Reaktion von Ras nur sehr langsam gestoppt wird. Die Bedeutung dieser Reaktion wird durch die Tatsache unterstrichen, dass alle Punktmutationen, aufgrund derer Ras zum Onkogen wird, die Fähigkeit von Ras zur intrinsischen und zur GAP-katalysierten GTP-Hydrolyse beeinträchtigen (1.3.4). Als Folge davon verharren die mutierten Ras-Proteine deutlich länger in der aktiven

¹ Es gibt drei menschliche *Ras* Gene, *H-*, *N-* und *K-Ras*, letzteres wird in zwei alternative Varianten gespleißt, *K-Ras4A* und *K-Ras4B*, die sich allein in den letzten, im fünften Exon codierten, 25 Aminosäuren unterscheiden. Da sie sich hinsichtlich ihrer in dieser Arbeit besprochenen biochemischen Eigenschaften nicht unterscheiden, wird im Text von Ras gesprochen. Alle Experimente wurden mit carboxyterminal verkürztem H-Ras durchgeführt (AS 1-166).

GTP-Konformation, was zu einer permanenten Signalweiterleitung von Ras-vermittelten Wachstumssignalen führt.

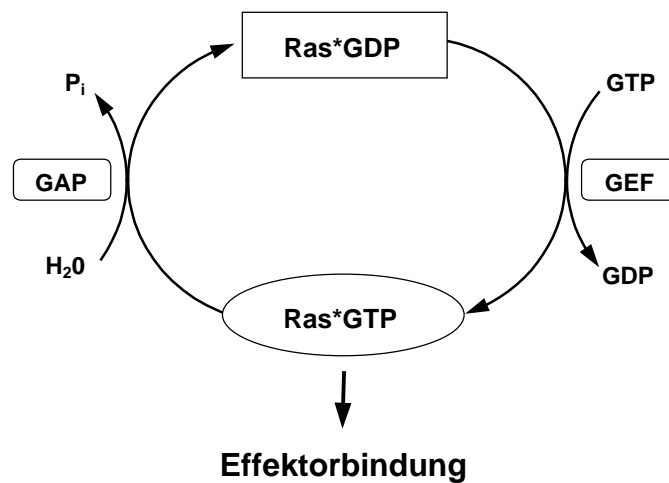


Abbildung 1-1 Der Ras-Zyklus

Ras als molekularer Schalter. Durch Guaninnukleotid-Austauschfaktoren (GEF: *guanine nucleotide exchange factors*) erfolgt die Aktivierung von Ras durch Bindung von GTP. Ras*GTP bindet an Effektorproteine. Die Inaktivierung von Ras wird durch GTPase aktivierende Proteine (GAP: *GTPase activating protein*) vermittelt, welche die Hydrolyse von GTP zu GDP und freiem Phosphat katalysieren.

1.3.2 Der MAP-Kinase-Weg

Als klassisches Beispiel für die Signaltransduktion über Ras kann der MAP-Kinase-Weg gelten (Bos, 1997; Campbell *et al*, 1998; Abbildung 1-2). Die Signalweiterleitung beginnt mit der Rezeption eines Signals, zum Beispiel in Form der Bindung der Wachstumsfaktoren EGF (*Epidermal Growth Factor*) oder PDGF (*Platelet Derived Growth Factor*), an die extrazelluläre Domäne ihrer Transmembranrezeptoren. Nach der Bindung ihres Liganden dimerisieren die Rezeptoren. Dabei kommen auch deren zyttoplasmatische Domänen miteinander in Kontakt. Diese enthalten Tyrosin-spezifische Proteinkinasedomänen (RTK = *Receptor Tyrosine Kinase*), die sich gegenseitig sowohl in der Kinasedomäne als auch in anderen Regionen an Tyrosinseitenketten transphosphorylieren. Durch die Phosphorylierung wird der Rezeptor aktiviert und es werden Bindungsstellen für Proteine mit SH2-Domänen (*Src Homology 2*)² geschaffen. SH2-Domänen sind Proteinmodule, die phosphorylierte Tyrosinseitenketten in sequenzspezifischen Kontexten erkennen. Ein Beispiel für ein solches Protein ist Grb2

² Bei *src* handelt es sich um ein Proto-Onkogen, das aus einem Sarkom, engl. *sarcom*, isoliert wurde.

(*Growth factor receptor binding 2*), welches wiederum im Komplex mit dem Ras Guaninnukleotid-Austauschfaktor SOS (nach dem *Drosophila* Gen *son-of-sevenless*) vorliegt. Die Translokation von SOS zur Plasmamembran führt dort zu einer lokal höheren Konzentration des Austauschfaktors, was in Konsequenz die Aktivierung des über einen Farnesylanker in der Membran verankerten Ras begünstigt.

Das von SOS in die aktive GTP-Form gebrachte Ras interagiert mit nachgelagerten (sogenannten *downstream*) Effektoren wie der Ser/Thr-spezifischen Proteinkinase Raf (Hagemann & Rapp, 1999), die selbst als ein Onkogen identifiziert wurde (***Rapid Fibrosarcoma***). Raf wird durch die Interaktion mit Ras an die Plasmamembran gebracht und aktiviert. Auf welche Weise die Translokation von Raf mit seiner Aktivierung zusammenhängt, ist allerdings noch Gegenstand intensiver Untersuchungen. Diskutiert wird sowohl eine allosterische Regulation, aber auch die Beteiligung weiterer Kinasen und der 14-3-3 Proteine (Aitken, 1996; Cacace *et al*, 1999; Marshall, 1993; Morrison & Cutler, 1997; Yaffe *et al*, 1997).

Ist Raf einmal aktiviert, aktiviert es seinerseits durch Phosphorylierung die Proteinkinase MEK (**MAPKK/Erk-Kinase**), die wiederum die Proteinkinase Erk (***Extracellular-signal-regulated-kinase***) aktiviert³. Aktivierte Erk kann in den Nukleus importiert werden und phosphoryliert dort Transkriptionsfaktoren der TCF/Ets-Familie (***Ternary Complex Factor, E26 transformation specific***). Damit wird die Expression verschiedener Gene – unter anderem die der *immediate early gene transcription* – eingeleitet. Die Spezifität der Wechselwirkungen dieser Reihe von Kinasen wird vermutlich durch sogenannte Kinase-Module gewährleistet, in denen die Kinasen durch Gerüst-, Anker- und Adapter-Moleküle in enger räumlicher Nachbarschaft fixiert werden (Block & Wittinghofer, 1995; Pawson & Scott, 1997).

1.3.3 Vernetzte Signaltransduktion

Der eben beschriebene lineare Signaltransduktionsweg stellt nach heutigem Wissen nur einen kleinen Ausschnitt aus einem stark verzweigten Netz von Interaktionen dar. Durch eine große Zahl von Untersuchungen der letzten Jahre wurde deutlich, dass Ras als molekularer Schalter in mehreren Signaltransduktionskaskaden dient. Die über Ras aktivierten Signalwege können

³ Diese Kinasen werden auch MAP-Kinase (**Mitogen Activated Kinase**), MAP-Kinase-Kinase und MAP-Kinase-Kinase-Kinase (MAPK, MAPKK, MAPKKK) genannt.

je nach Typ und Zustand der Zelle zu so verschiedenen Reaktionen wie Zellproliferation, Zellwachstum, und Apoptose führen (Vojtek & Der, 1998).

So kann zum Beispiel die Proteinkinase Erk im Zytosol mit einer Reihe weiterer Zielmoleküle interagieren (Waskiewicz *et al*, 1997). Aber auch Ras zeigt sich vielseitig hinsichtlich seiner Effektoren (Abbildung 1-2). So führt die Interaktion mit dem MEKK1⁴-Weg ebenfalls zu einer Aktivierung von Genen. Die Kinase MEKK phosphoryliert SEK, die SAPK⁵/JNK-Kinase, die die JNK (**J**un-**N**-terminal-**K**inase) aktiviert. JNK aktiviert wiederum den Transkriptionsfaktor c-Jun (Minden *et al*, 1994).

Die katalytische Untereinheit p110 der Phosphatidyl-inositol-3-Kinase (PI-3K) ist ein weiterer Effektor von Ras (Hawkins *et al*, 1995). Die Aktivierung von PI-3K beeinflusst über die Interaktion mit der kleinen GTPase Rac die Bildung von Membranausstülpungen, das sogenannte *membrane-ruffling* (Rodriguez-Viciano *et al*, 1997). Auch wurde beobachtet, dass durch Ras aktivierte PI-3K über die Aktivierung der Proteinkinase B (PKB) eine durch die Ras-Raf-Interaktion induzierte Apoptose inhibiert (Kauffmann-Zeh *et al*, 1997).

Über die Interaktion mit Austauschfaktoren für Ral beeinflusst Ras auch den Aktivierungszustand dieser kleinen GTPase. Die bekannten Austauschfaktoren für Ral - RalGDS (Albright *et al*, 1993), Rlf (Wolthuis *et al*, 1996), Rgl (Kikuchi *et al*, 1994) und Rgr (Peterson *et al*, 1996)⁶ - besitzen alle eine an Ras bindende Domäne (RBD), so dass sie Bindeglieder der Signaltransduktion zwischen Ras und Ral darstellen (Wolthuis & Bos, 1999). Die genaue Funktion der beiden homologen Formen von Ral, RalA und RalB, ist jedoch noch sehr wenig erforscht, obwohl bereits Effektoren von Ral beschrieben wurden. Zu ihnen zählen Phospholipase D 1 (Jiang *et al*, 1995) und RalBP1 (oder RLIP⁷). Letzteres wurde als als GAP für Cdc42 und Rac identifiziert (Cantor *et al*, 1995; Jullien-Flores *et al*, 1995), so dass ein komplexes Gefüge aus einander aktivierenden und deaktivierenden kleinen GTPasen entsteht (Feig *et al*, 1996). Darüberhinaus gibt es Hinweise auf eine Ral-abhängige Aktivierung der Tyrosinkinase c-Src (Goi *et al*, 2000).

⁴ MEKK = **MEK-Kinase**1, = **MAP/Erk-Kinase-Kinase**1

⁵ SAPK = *Stress Activated Protein Kinases*

⁶ RalGDS = *Ral Guanine nucleotide Dissociation Stimulator*, Rlf = *RalGDS like factor*, Rgl = *RalGDS-like*, Rgr = *RalGDS-related*

⁷ Ral-BP1 = *Ral binding protein 1*; RLIP = *Ral interacting protein*

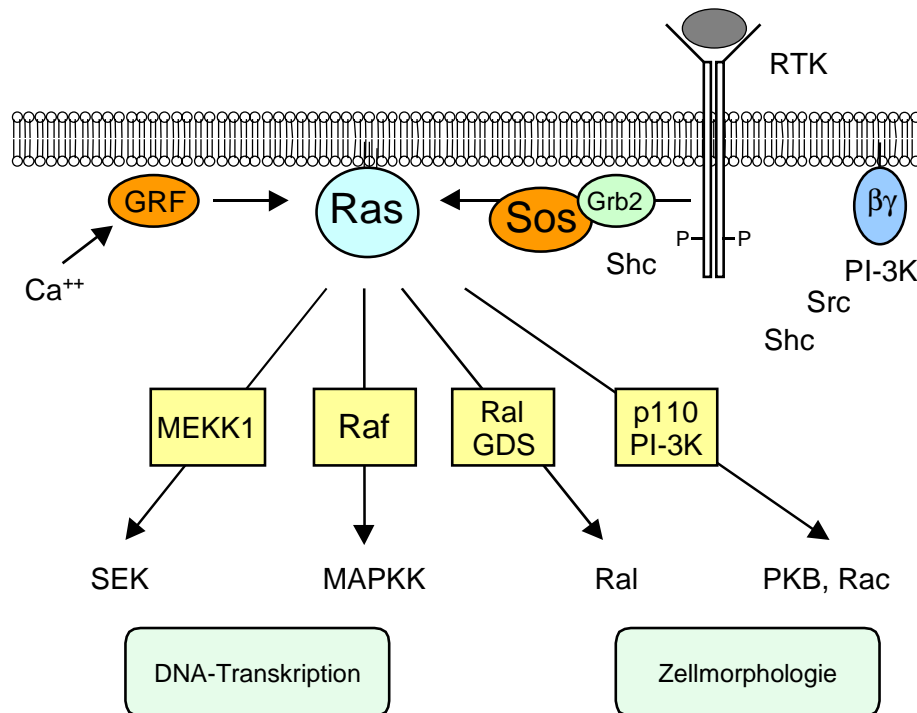


Abbildung 1-2 Signaltransduktion über Ras

Funktionen von Ras bei der Signaltransduktion. Gezeigt werden die Aktivierung von Ras über die Bindung eines Signalmoleküls an eine Rezeptortyrosinkinase (RTK), das Adapterprotein Grb2 und den Austauschfaktor Sos, sowie die Aktivierung über einen durch Calcium aktivierten Austauschfaktor (GRF = *Guaninnucleotide Releasing Factor*). Das Signal wird dann über eines der Effektorproteine MEKK1, Raf, RalGDS und PI-3K (Erläuterung im Text) weitergeleitet und führt letztlich zu gezielter DNA-Synthese oder Änderungen in der Zellmorphologie. Weitere Effektoren sind im Text beschrieben; nach (Bos, 1997).

Doch auch Ras verfügt noch über weitere Effektoren (Vojtek & Der, 1998), für die hier beispielhaft die folgenden erwähnt seien: p190^{GAP} (ein GTPase aktivierendes Protein für Ras, das neben der GAP-Domäne auch Protein-Protein-Interaktionsdomänen enthält (McGlade *et al.*, 1993), AF6/Canoe⁸ (Linnemann *et al.*, 1999; Vojtek & Der, 1998), Rin1⁹ (Han & Colicelli, 1995; Vojtek & Der, 1998), Nore1 (Vavvas *et al.*, 1998) und PKC ζ (Diaz-Meco *et al.*, 1994).

Doch nicht nur *downstream*, das heißt über seine Effektoren, ist Ras an einer Vielzahl von Signalwegen beteiligt. Auch auf Seiten des Signaleingangs, der Rezeptoren (*upstream*) integriert Ras sehr verschiedene Signale. So kann es über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren und zytoplasmatische Tyrosinkinasen wie Src aktiviert werden (van Biesen *et al.*, 1995), aber auch

⁸ AF6 = ALL-1 fusion protein 6

⁹ Rin = Ras interaction interference

von Austauschfaktoren, die über eine Calmodulin-bindende Domäne verfügen wie GRF1/CDC25^{Mm} (Farnsworth *et al*, 1995) und GRF2 (Fam *et al*, 1997)¹⁰.

1.3.4 Der GTP-Hydrolysemechanismus von Ras

Der wichtigste Schritt zum Verständnis des GAP-katalysierten GTP-Hydrolysemechanismus von Ras war die Aufklärung der Ko-Kristallstruktur beider Proteine in Verbindung mit biochemischen Mutationsanalysen, die die aus der Struktur getroffenen Vorhersagen bestätigten (Ahmadian *et al*, 1997; Scheffzek *et al*, 1997). Zuvor waren bereits der Mechanismus der intrinsischen GTPase-Aktivität von Ras, sowie Strukturen von Ras und dem RasGAP p120^{GAP} bekannt (Pai *et al*, 1990; Scheffzek *et al*, 1996; Schweins *et al*, 1995). Im folgenden werden die wesentliche Strukturmerkmale der GTP-Bindung und Hydrolyse vorgestellt.

1.3.4.1 Die Architektur der GTP-Bindung

Die GTP-Bindungsmotive von Ras können als exemplarisch für die ganze Ras-Superfamilie gelten (Kjeldgaard *et al*, 1996; Vetter & Wittinghofer, 1999; Wittinghofer & Waldmann, 2000). An der Bindung von GTP sind sechs Sequenzmotive beteiligt: G1, G2, G3 und PM1, PM2, PM3 (Abbildung 1–3). G steht dabei für die Bindung der Guaninbase, PM für Phosphat- und Magnesiumbindung (das Magnesiumion ist sowohl für die Bindung als auch für die Hydrolyse von GTP ein wichtiger Kofaktor).

Im PM1-Motiv (GxxxxGKS/T) befindet sich eine konservierte Lysinseitenkette, die das β - und das γ -Phosphat kontaktiert. Auch die Amidgruppen der Peptidbindungen dieses Motivs weisen in Richtung der negativ geladenen Phosphate und schaffen so eine polare Bindungstasche. Die konservierten Aminosäuren Serin oder Threonin sind an der Koordinierung des Magnesiumions beteiligt. Wird die Aminosäure an dieser Position gegen Alanin oder Asparagin ausgetauscht, so erhält man zumeist Proteine mit stark reduzierter Nukleotidaffinität, was eine verstärkte Bindung an GEF zur Folge haben kann. Dies wiederum kann zur Konstruktion sogenannter dominant-negativer Proteinvarianten¹¹ ausgenutzt werden (Cool *et al*, 1999; Feig, 1999).

¹⁰ GRF = **G**uanin nucleotide **R**eleasing **F**actor

¹¹ Der Ausdruck dominant-negativ bezieht sich in diesem Zusammenhang auf die Eigenschaft, die Signalweiterleitung über die kleine GTPase durch dauerhafte Bindung des Austauschfaktors zu verhindern.

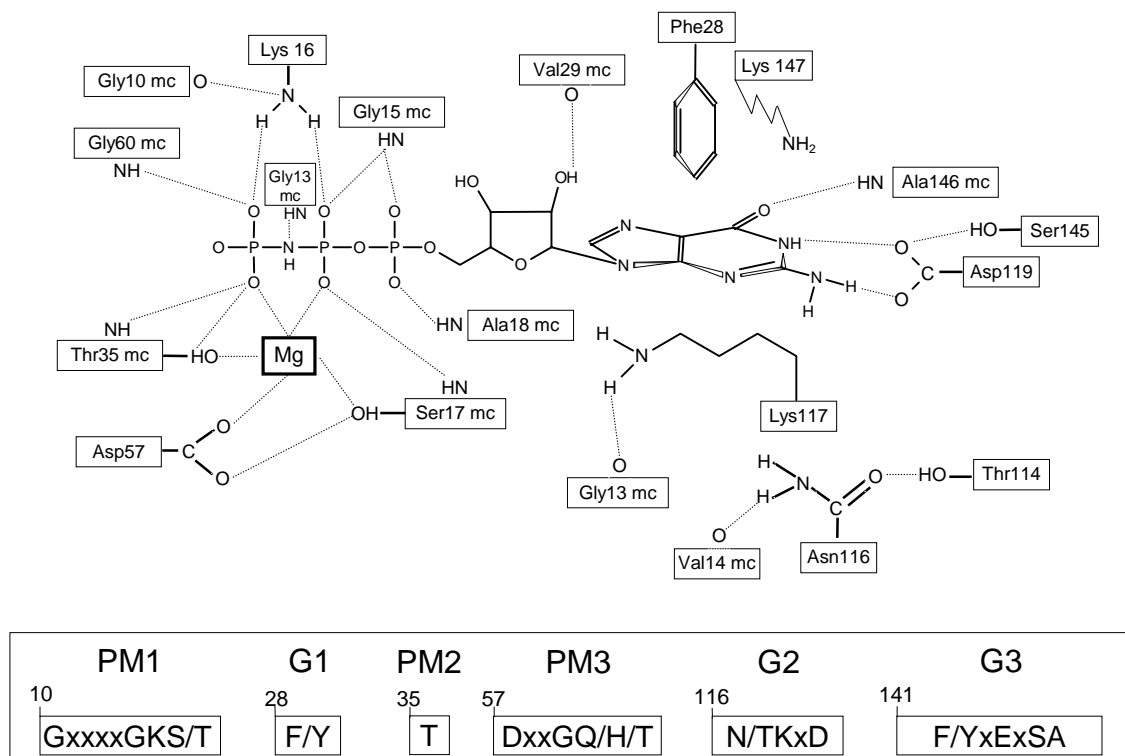


Abbildung 1-3 Die Motive der G-Domäne

Die Bindung des Guaninnukleotids (hier: GppNHp) und des Magnesiumions wird durch Kontakte mit den Aminosäureseitenketten und durch Hauptkettenkontakte (mc) vermittelt (oben). Guaninnukleotidbindende Proteine sind durch die konservierten Motive der G-Domäne (unten) charakterisiert. PM: Koordination von Phosphatgruppen und Magnesiumion, G: Koordination der Guaninbase. Die Aminosäuren sind im Ein-Buchstaben-Code angegeben (x = beliebige Aminosäure), die Numerierung bezieht sich auf die Aminosäuresequenz von Ras. Nach Zerial & Huber (1995).

Das γ -Phosphat wird durch die Amidbindungen eines Threonins – Motiv PM2 (T) – und des konservierten Glycinrestes aus Motiv PM3 (DxxGQ/H/T) kontaktiert. Das in allen GTPasen der Ras-Superfamilie konservierte Threonin ist mit seiner Hydroxyl-Gruppe ebenfalls an der Komplexierung des Magnesiumions beteiligt. Die Auflösung der Bindungen zum γ -Phosphat durch die Hydrolyse des GTP ermöglicht die für die Schalterfunktion so wichtige Konformationsänderung in den sogenannten *switch*-Regionen von Ras. Dabei ist die Wechselwirkung des Threonins für die Fixierung der *switch* I-Region, die des Glycins für die der *switch* II-Region verantwortlich.

Elektrostatische Wechselwirkungen zwischen dem senkrecht zur Guaninbase stehenden Phenylring aus Motiv G1 (F/Y) tragen zur Bindung der Base bei. Lysin und Asparagin aus Motiv G2 (NKxD) kontaktieren die Ribose des Guaninnukleotids. Die Lysinseitenkette schafft darüberhinaus noch hydrophobe Kontakte zur Base. Entscheidend für die Spezifität der Nukle-

otidbindung ist das konservierte Aspartat des Motivs G2, da es über zwei Wasserstoffbrücken mit dem Guanin wechselwirkt. Bei einem Austausch dieser Aminosäure zu Asparagin ändert sich die Nukleotidpräferenz des Proteins von Guanin zu Xanthin (Hwang & Miller, 1987; Schmidt *et al*, 1996).

Für die Diskriminierung gegen Adeninnukleotide ist das Amidproton des konservierten Alanins aus dem G3-Motiv (F/YxExSA) verantwortlich, da es eine Wasserstoffbrücke mit O⁶ der Guaninbase eingeht (Rensland *et al*, 1995).

1.3.4.2 Die GTPase Funktion von Ras

Die intrinsische Hydrolysereaktion läuft bei Ras sehr langsam ab ($0,028 \text{ min}^{-1}$ bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$; Gideon *et al*, 1992; John *et al*, 1990). Nach Daten von (Feuerstein *et al*, 1987) läuft diese Reaktion unter Inversion der Konfiguration des γ -Phosphats ab. Dies läßt sich durch einen sogenannten *in-line*-Angriff eines Wassermoleküls erklären. Die Aktivierung des Wassers erfolgt durch das γ -Phosphat selbst, da gezeigt wurde, dass die Phosphatgruppe als allgemeine Base fungiert und das vorgelagerte Wassermolekül deprotoniert (Schweins *et al*, 1995). Dem in der Nähe befindlichen Glutamin (Gln61), in dem zuvor die allgemeine Base gesehen wurde, kommt nach diesem Modell lediglich die akzessorische Funktion der Stabilisierung des intermediär gebildeten Hydroxid-Ions zu.

Über den Mechanismus der GAP-katalysierten GTP-Hydrolyse wurde lange Zeit spekuliert. Drei Modelle wurden diskutiert, die die Funktion von RasGAP entweder in einer Unterstützung der GTPase-aktiven Konformation von Ras sahen, eine aktive Beteiligung von GAP an der Hydrolysereaktion selbst annahmen, oder aber GAP eine Rolle bei der Freisetzung des abgespaltenen Phosphats zusprachen (Wittinghofer *et al*, 1997). Anhand der Struktur des Ras-RasGAP-Komplexes und der biochemischen Charakterisierung des Einflusses einzelner Aminosäuren konnte gezeigt werden, dass der Beitrag des GAP zur Hydrolyse von GTP in einer aktiven Teilnahme an der Hydrolysereaktion besteht (Ahmadian *et al*, 1997; Scheffzek *et al*, 1997). Abbildung 1-4 zeigt stilisiert die Verhältnisse im aktiven Zentrum von Ras im Übergangszustand der Hydrolyse. Der Übergangszustand wird in diesem Fall durch Aluminiumtrifluorid simuliert, das eine pentagonale Bipyramide bildet, in der das Fluorid die dreieckige Grundfläche und die zwei Sauerstoffatome die Spitzen der Pyramide darstellen. GAP stabilisiert diese Mimikry des Übergangszustandes der Phosphoryltransfer-Reaktion von

Ras (Mittal *et al*, 1996). Auch für andere Protein-Nukleotid-Komplexe sind derartige Aluminiumfluorid-Analoga beschrieben worden (Rittinger *et al*, 1997b; Wittinghofer, 1997). Der entscheidende Beitrag des GAP ist ein Arginin (in RasGAP: Arg 789), das den Übergangszustand stabilisiert und hierdurch die Reaktion 10^5 fach stimuliert. NMR-Untersuchungen haben gezeigt, dass das γ -Phosphat nur im Übergangszustand vom sogenannten Arginin-Finger kontaktiert wird (Geyer *et al*, 1996).

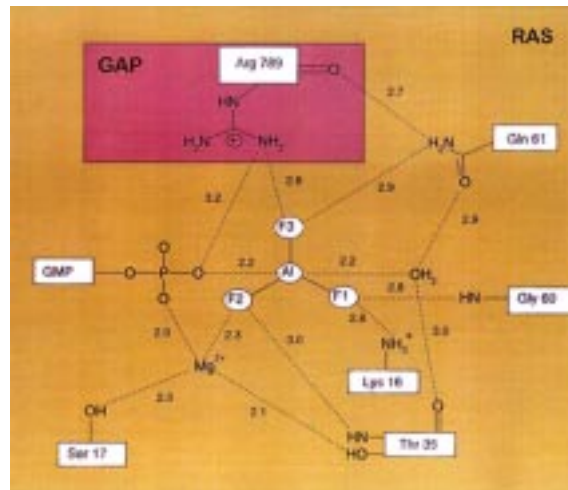


Abbildung 1-4 Funktion des Argininfingers

Der Beitrag des Argininfingers von GAP zur Stabilisierung des Übergangszustandes der GTP-Hydrolysereaktion, der hier durch GDP-Aluminiumtrifluorid nachgebildet wurde. Kleine Ziffern geben die Abstände zwischen den jeweiligen Atomen in Ångström an (weitere Erläuterungen im Text; Abbildung aus Scheffzek *et al*, 1997).

Wichtig an diesen Erkenntnissen ist nicht allein der Einblick, der in den GTP-Hydrolysemechanismus gewährt wird, sondern auch die Erklärung, die mit Hilfe dieser Erkenntnisse für die Onkogenizität von Ras gegeben werden kann. Die am häufigsten vorkommenden onkogenen Mutationen im *Ras*-Gen betreffen die Codons für die Aminosäuren Glycin 12/13, die im PM1-Motiv liegen, und Glutamin 61, das zum PM3-Motiv gehört. Fehlt die Glutaminsseitenkette, so erfolgt keine Stabilisierung des für den nukleophilen Angriff auf das γ -Phosphat verantwortlichen Hydroxyl-Ions, ist das Glycin durch eine andere Aminosäure ersetzt, so wird dem Argininfinger der Zutritt zum aktiven Zentrum von Ras sterisch verwehrt (Scheffzek *et al*, 1997). Als Folge daraus bleibt Ras länger im aktiven GTP-gebundenen Zustand und kann somit länger proliferative Signale weiterleiten.

1.3.5 Der GTP-Hydrolysemechanismus als Grundlage für Anti-Ras-Medikamente

Ziel der Entwicklung von Anti-Ras-Medikamenten auf der Grundlage des Wissens über den GTP-Hydrolysemechanismus ist die Beschleunigung der Hydrolysereaktion bei onkogenem Ras, um das konstitutiv aktive Protein zu inaktivieren. Hierzu ist es nicht erforderlich, die Hydrolyserate von onkogenem Ras auf die Geschwindigkeit der GAP-katalysierten Reaktion zu beschleunigen. Eine Beschleunigung auf etwa den zweifachen Wert der intrinsischen Hydrolysegeschwindigkeit würde ausreichen, um eine onkogene Transformation der Zelle zu unterbinden, da die nicht-onkogene Variante Ras G12P auch lediglich über eine zweifach aktivierte intrinsische GTPase verfügt (Ahmadian *et al*, 1999).

Die Suche nach einem entsprechenden GTPase-beschleunigenden Wirkstoff orientiert sich zunächst an der Struktur des Argininfingers von RasGAP. Die in dieser Arbeit verfolgte Suchstrategie besteht im Durchmustern (*screening*) großer Peptid-Bibliotheken, die in Analogie zum Argininfinger entworfen wurden (3.2.2.13 und 4.1). Weitere Ansätze könnten im *screening* von Naturstoff- oder organisch-chemischen Substanz-Bibliotheken bestehen.

Unterstützt wird die Idee, nach einer solchen Substanz zu suchen, durch die Befunde von Ahmadian *et al*, (1999). Hier wird ein spezielles Analogon von GTP vorgestellt (DABP-GTP), das eine deutlich beschleunigte Hydrolyserate aufweist, wenn es an RasG12V, eine onkogene Variante von Ras mit reduzierter intrinsischer GTPase, gebunden ist.

Zwar bietet das Analogon selbst keine direkte Möglichkeit, eine Leitsubstanz abzuleiten, da die hohe GTP-Konzentration in der Zelle die Wirkung eines GTP-Derivats zu sehr behindern würde. Jedoch liefert die mechanistische und röntgenkristallographische Untersuchung von RasG12V im Komplex mit DABP-GTP wertvolle Hinweise für die Entwicklung einer die GTPase-Reaktion von Ras beschleunigenden Leitsubstanz.

1.3.6 Weitere Ansätze für Anti-Ras-Medikamente

Weitere Ansätze für Krebs-Medikamente, deren Wirkung auf der Inhibierung von onkogenem Ras beruht – und die zum Teil bereits in klinischen Studien getestet werden – bestehen in der Inhibierung der Farnesyltransferasereaktion, um eine Lokalisierung von Ras in der Membran – und damit auch die Signalweiterleitung – zu verhindern, der Entwicklung von Hemmstoffen der Nukleotidaustauschreaktion für die Behandlung von Defekten, die auf einer Störung im Signalweg oberhalb von Ras auftreten, und der Produktion von Inhibitoren der Interaktion von Ras mit Effektoren (Wittinghofer & Waldmann, 2000).

1.4 Der GAP-katalysierte GTPase-Mechanismus von Rap: Ein Paradigma auf dem Prüfstand

Eines der Themen der vorliegenden Arbeit wird die Untersuchung des GAP-katalysierten GTPase-Mechanismus von Rap1 sein. Dieses Thema hängt mit dem vorhergehenden eng zusammen, da Ras und Rap nicht nur zu über 50% homolog sind, beider Proteine Kristallstrukturen bekannt sind (Nassar *et al.*, 1995; Pai *et al.*, 1989; Scheffzek *et al.*, 1997) sondern die große Ähnlichkeit der beiden Proteine auch einen ähnlichen Mechanismus für die Katalyse der GTPase-Reaktion vermuten läßt. Letzteres erscheint besonders wahrscheinlich, da die Arginin-Finger Hypothese nicht nur für Ras, sondern auch bei anderen GTPasen (G α , Rho und Rab) bestätigt wurde (Albert *et al.*, 1999; Coleman *et al.*, 1994; Markby *et al.*, 1993; Rittinger *et al.*, 1997a; Rittinger *et al.*, 1997b; Sondek *et al.*, 1994). Möglicherweise handelt es sich bei der Arginin-unterstützten GTP-Hydrolyse um ein für alle G-Proteine und kleine GTPasen verallgemeinerbares Prinzip.

1.4.1 Die Rap-Proteine - eine Einführung

Innerhalb der kleinen GTPasen der Ras-Familie sind die Rap-Proteine den Namensgebern strukturell am ähnlichsten. Derzeit sind zwei Rap-Proteine bekannt, die jeweils in zwei Isoformen vorliegen: Rap1A und B sowie Rap2A und B. Die jeweiligen Isoformen weisen Sequenzidentitäten von über 90% auf. Die beiden Rap-Untergruppen 1 und 2 besitzen Aminosäureidentitäten von 60%. Im Vergleich mit Ras-Proteinen ergibt sich eine AS-Identität von 52%, die namensgebend für die Rap-Proteine ist: Rap = *Ras proximate*. Erstmals beschrieben wurden Rap-Proteine von Pizon *et al.* (1988) und Kitayama *et al.* (1989). Pizon *et al.* bedienten sich dabei cDNA-Bibliotheken, die mit einer cDNA-Sonde des Ras-homologen Gens *Dras3* aus *Drosophila melanogaster* durchsucht wurden¹². Kitayama charakterisierte Rap als Suppressor von Transformationen aufgrund seiner Eigenschaft, den morphologischen Phänotyp von K-Ras-transformierten Fibroblasten zu revertieren. Daher rührt auch die anfangs parallel verwendete Bezeichnung Krev (= *K-Ras revertant*). Eine dritte Gruppe entdeckte Rap1 bei dem Versuch, Ras-Proteine aus Rinderhirnen aufzureinigen, und nannte es

¹² Das *Dras3*-Gen weist von den drei Ras-Homologen in *Drosophila* die geringste Ähnlichkeit mit Ras auf.

zunächst smg p21¹³ (Kawata *et al*, 1988). Später wurden die Isoformen Rap1B und Rap2B entdeckt (Farrell *et al*, 1990; Ohmstede *et al*, 1990; Pizon *et al*, 1988).

Die Isoformen von Rap1 werden ubiquitär exprimiert, kommen aber insbesondere in Neutrophilen, Thrombozyten und Hirnzellen vor. Im Gegensatz zu Ras, das an der Innenseite der Plasmamembran verankert ist, kommen die Rap-Proteine je nach Zelltyp an verschiedenen intrazellulären Membransystemen vor. So wird Rap1 im mittleren Golgi-Apparat, an frühen und späten endozytotischen Vesikeln oder Lysosomen von Fibroblasten gefunden (Beranger *et al*, 1991; Pizon *et al*, 1994; Wienecke *et al*, 1997). In Neutrophilen findet es sich in der Plasmamembran und in spezifischen Granula, die nach Stimulation mit der Plasmamembran fusionieren (Maridonneau-Parini & de Gunzburg, 1992; Quinn *et al*, 1992). In Thrombozyten ist Rap an der Plasmamembran und in α -Granula lokalisiert (Berger *et al*, 1994). Mit der zu Ras unterschiedlichen Lokalisation läßt sich möglicherweise begründen, dass beide Proteine trotz identischer Effektorbinderegion (AS 32 bis 40) und vermutlich gleicher Effektoren an unterschiedlichen Signaltransduktionswegen teilhaben.

Eine Möglichkeit, die Lokalisation von Rap1 zu regulieren, könnte in der Phosphorylierung durch die Proteinkinase A bestehen, die eine Serinseitenkette in direkter Nachbarschaft zum Membrananker von Rap1 phosphoryliert (Altschuler & Lapetina, 1993; Siess *et al*, 1990). Phosphoryliertes Rap konnte im Cytosol von Blutzellen nachgewiesen werden (Torti *et al*, 1994). Der Membrananker von Rap besteht im Gegensatz zu Ras, das farnesyliert (und im Falle von N- und H-Ras zusätzlich palmitoyliert) wird, aus einem Geranylgeranylrest und einer Polylysinssequenz.

In den folgenden Abschnitten werden die Guaninnukleotidaustauschfaktoren (GEF) und GTPase aktivierenden Proteine (GAP) für Rap vorgestellt (Zwartkruis & Bos, 1999; Abbildung 1-5)

1.4.2 Austauschfaktoren von Rap

Als erster GEF für Rap wurde C3G (= *Crk SH3-binding GEF*) beschrieben (Gotoh *et al*, 1995). Über seine Prolin-reiche Domäne interagiert er mit den SH3-Domänen von Proteinen aus der Klasse der Crk-Adapterproteine Crk I, Crk II und Crk I (Gotoh *et al*, 1995; Kiyokawa *et al*, 1997). Deren SH2-Domänen binden an verschiedene aktivierte Rezeptortyrosinkinasen

¹³ smg p21 = small molecular weight GTP-binding protein of 21 kDa

und an Adapterproteine, die Phosphotyrosine enthalten (Kiyokawa *et al*, 1997). Durch die Bindung an diese Proteine erhöht sich die Austauschaktivität von C3G (Ichiba *et al*, 1999).

CalDAG-GEF ist ein weiterer Austauschfaktor für Rap, dessen Name schon andeutet, dass es sich um ein von Calcium/Calmodulin und Diacylglycerol (DAG) stimulierbares Protein handelt (Kawasaki *et al*, 1998b). Das in Basalganglien in besonders hoher Konzentration vorkommende Protein weist Strukturhomologien zu RasGRF (Ras *Guaninenucleotide Releasing Factor*) auf, wirkt aber spezifisch an Rap. Zwar ist anzunehmen, dass es sich bei CalDAG-GEF um das Protein handelt, das generell für die Vermittlung der über Phospholipase C eintreffenden Signale verantwortlich ist, jedoch ist aufgrund seiner hohen Gewebsspezifität zu vermuten, dass es weitere Isoformen des Proteins gibt (Zwartkruis & Bos, 1999).

Die Entdeckung von Epac könnte eine neue Interpretation einiger früherer Experimente zur Wirkung von cAMP auf Zellen erforderlich machen. Bei Epac handelt es sich um einen Austauschfaktor für Rap, der direkt durch cAMP aktiviert wird (Epac = *Exchange protein activated by cAMP*; de Rooij *et al*, 1998). Er verfügt neben seiner katalytischen Domäne über eine cAMP-bindende Region, deren Sequenz homolog zu der der Proteinkinase A (PKA) ist, dem bislang bekannten Effektor für cAMP. Die Expression des *Epac*-Gens zeigt keine Gewebsspezifität, das eng verwandte Epac-2 (auch cAMP-GEF) wird hingegen hauptsächlich im Gehirn exprimiert (Kawasaki *et al*, 1998a). De Rooij *et al* (1998) konnten zeigen, dass eine Epac-Variante ohne cAMP-Bindedomäne konstitutiv aktiv ist, die cAMP-Bindedomäne somit inhibitorische Wirkung hat, die durch die Bindung an cAMP aufgehoben wird.

Als letzter Austauschfaktor für Rap wurde PDZ-GEF identifiziert (de Rooij *et al*, 1999). Bei PDZ-Domänen (PDZ = *Postsynaptic density/Disc large/ZO1*) handelt es sich um Protein-Protein-Interaktions-Domänen, die insbesondere mit den carboxyterminalen Teilen von Membranproteinen wechselwirken. Obwohl PDZ-GEF über eine Domäne verfügt, die der autoinhibitorischen cAMP-bindenden Domäne von Epac ähnelt, wurde gezeigt, dass sie wahrscheinlich nicht mit cAMP interagiert. Der Aktivierungsmechanismus von PDZ-GEF ist noch nicht bekannt.

Durch biochemische Analysen konnten Aminosäuren identifiziert werden, die für die hohe Selektivität, mit der die Austauschfaktoren entweder mit Ras oder mit Rap interagieren, verantwortlich sind. Bei einem Vergleich der Austauschfaktoren Cdc25 für Ras und C3G für

Rap wurden die Aminosäuren 40, 61 und 70 von Ras/Rap als spezifitätsbestimmend ermittelt (van den Berghe *et al*, 1999).

Für die Einschätzung der Bedeutung von Rap im Signaltransduktionsgeschehen ist es wichtig festzuhalten, dass Rap über seine Austauschfaktoren direkt an *second messenger* gekoppelt ist. Die Aktivierung von Rap ist somit zu den frühen Ereignissen bei der Signaltransduktion in der Zelle zu zählen, wie im Falle von Thrombozyten, Fibroblasten und Lymphozyten auch gezeigt werden konnte (Franke *et al*, 1997; Posern *et al*, 1998; Reedquist & Bos, 1998; Zwartkruis *et al*, 1998).

1.4.3 RapGAP-Proteine

Die RapGAP-Proteine stellen eine Gruppe heterogener Proteine dar, die nicht zu den GAP von Ras und Rho homolog sind (Rubinfeld *et al*, 1992). Das erste RapGAP-Protein wurde von Kikuchi *et al* (1989) aus Rinderhirn isoliert und biochemisch als GAP charakterisiert, das spezifisch die GTP-Hydrolysereaktion von Rap (Kikuchi *et al*.: smg21) und nicht die von Ras oder Rho beschleunigt. Biochemisch und genetisch sind bislang folgende humane RapGAP identifiziert worden: Rap1GAP (Rubinfeld *et al*, 1991) und dessen *Splice*-Isoform Rap1GAP-II (Mochizuki *et al*, 1999), Tuberin (Wienecke *et al*, 1995), Spa-1 (Kurachi *et al*, 1997), GAP^{IP4BP} (Cullen *et al*, 1995) und E6TP1 (Gao *et al*, 1999).

Aus anderen Stämmen des Tierreichs sind als RapGAP beschrieben worden: *Drosophila* RapGAP1 (Chen *et al*, 1997) und Bud2 aus *Saccharomyces cerevisiae* (Bender, 1993; Holden *et al*, 1991; Park *et al*, 1993). Von *Mus musculus* und *Caenorhabditis elegans* sind die Sequenzen von Spa1-homologen Proteinen publiziert (Gotoh *et al*, 1995; The C.elegans Sequencing Consortium, 1998).

Nach Studien von Rubinfeld *et al*, (1992), die unterschiedliche Konstrukte von Rap1GAP mit carboxy- und aminoterminalen Deletionen hergestellt haben, umfaßt die katalytische Domäne von Rap1GAP maximal die Aminosäuren 75 bis 416. Mit Ausnahme Tuberin und der partiell zu RasGAP homologen GAP^{IP4BP} und Bud2 verfügen die bislang bekannten RapGAP über eine Domäne von zirka 320 AS, die zu der von Rubinfeld *et al* (1992) beschriebenen homolog ist, und die als RapGAP-Domäne bezeichnet werden kann. Sie macht bei E6TP1 nur 19% des gesamten Proteins aus. Tuberin verfügt nur über eine kürzere homologe Region, die nur 8% des Proteins ausmacht (Tabelle 1-1).

GAP	Spezies	Zugangsnummer	homologe AS	Länge (AS)
Rap1GAP	<i>H. sapiens</i>	1350590	13 - 326	615
Rap1GAP-II	<i>H. sapiens</i>	5816654	13 - 326	646
SPA-1	<i>H. sapiens</i>	2389009	216 - 542	1042
RapGAP1	<i>D. melanogaster</i>	2655096	230 - 540	850
T27F2.2	<i>C. elegans</i>	7508599	185 - 506	924
CELF47F6	<i>C. elegans</i>	4966315	33 - 343	535
E6TP1 α	<i>H. sapiens</i>	4151328	489 - 819	1783
Tuberin	<i>H. sapiens</i>	450352	1499 - 1650	1784
GAP ^{IP4BP}	<i>H. sapiens</i>	2653402	0	834
Bud2	<i>S. cerevisiae</i>	480378	0	1104

Tabelle 1-1 RapGAP-Proteine im Überblick

Übersicht über die GAP-Proteine für Rap. Angegeben sind Bezeichnung, Organismus, die Identifikationsnummer der *ProteinDataBank*, die Nummern der Aminosäuren der homologen Sequenzen, sowie die Größen der Proteine (nach Gao *et al.*, 1999).

Erste biochemische Daten über RapGAP wurden von (Rubinfeld *et al.*, 1991) mit aus Insektenzellen gereinigtem Rap1GAP gewonnen. Sie zeigten eine für Rap1*GTP spezifische katalytische Aktivität, die für Rap2 deutlich reduziert ist, für andere kleine GTPasen einschließlich Ras nicht existiert. Eine Bindung von Rap1GAP an Ras, wie sie im umgekehrten Falle für Rap und RasGAP von (Frech *et al.*, 1990) beschrieben wurde, konnte jedoch nicht festgestellt werden. Für GAP^{IP4BP} wurde allerdings sowohl RasGAP- als auch RapGAP-Aktivität festgestellt (Cullen *et al.*, 1995).

Aus ontogenetischer Perspektive ist die Tatsache interessant, dass Rap1GAP in fötalem Gewebe und undifferenzierten Zellen ubiquitär verbreitet ist, mit zunehmendem Alter des Organismus sich seine Anwesenheit jedoch auf Gehirn, Nieren und Pankreas beschränkt (Kurachi *et al.*, 1997; Rubinfeld *et al.*, 1991).

In adultem Gewebe kommen Tuberin und GAP^{IP4BP} ubiquitär vor. GAP^{IP4BP} befindet sich an der Plasmamembran (Lockyer *et al.*, 1997; Lockyer *et al.*, 1999). Tuberin befindet sich in erhöhten Konzentrationen in kleinen Blutgefäßen sowie Neuronen (Wienecke *et al.*, 1997).

Spa-1 wird zwar ebenfalls in den meisten Geweben gefunden, befindet sich aber in besonders hoher Konzentration im hämatopoetischen System und konnte im Gehirn nicht nachgewiesen werden. Intrazellulär befindet sich Spa-1 zumeist in perinukleären Membranen, an denen auch

Rap1 und Rap2 lokalisiert sind (Tsukamoto *et al*, 1999; Wienecke *et al*, 1996). Auch die Assoziation mit dem Zytoskelett wurde für Spa1 beschrieben. Möglicherweise interagiert es mit diesem durch seine PDZ-Domäne, der ein Leucin-Zipper-Motiv folgt (Tsukamoto *et al*, 1999).

Bei E6TP1 (**E6 Targeted Protein 1**) handelt es sich um ein Protein, das aufgrund seiner Eigenschaft, an das onkogene E6-Protein von Hochrisiko-Papillomaviren zu binden, identifiziert wurde. Es wird ubiquitär in verschiedenen Spleißvarianten exprimiert und besitzt eine RapGAP-homologe Domäne. RapGAP-Aktivität wurde jedoch noch nicht nachgewiesen (Gao *et al*, 1999).

Neuere Untersuchungen weisen auf eine Verbindung von RapGAP-Proteinen zu $G\alpha$ -Proteinen hin. *Two-Hybrid*-Analyse in Hefezellen und Koimmunopräzipitationsstudien von Mochizuki *et al* (1999) belegen eine Wechselwirkung von Rap1GAP-II mit der GTP-Form von $G\alpha_i$, die jedoch nicht in einer Beschleunigung der GTPase von $G\alpha_i$ resultiert. Durch diese Interaktion wird vielmehr Rap1GAP-II aktiviert, das daraufhin Rap1 inaktiviert. Doch auch Rap1GAP interagiert mit G-Protein-Untereinheiten. Jordan *et al* (1999) beschreiben die Bindung von Rap1GAP an nicht aktiviertes $G\alpha_o$, was indirekt zu einer Aktivierung von Rap führen kann, da das GTPase-stimulierende Protein nun nicht mehr für eine Interaktion zur Verfügung steht. Meng *et al* (1999) berichten von einer Interaktion zwischen Rap1GAP und $G\alpha_z$. Diese Wechselwirkung blockiert den Zugang von RGS (*Regulators of G-Protein Signaling*) zur $G\alpha$ -Untereinheit, was eine Verlängerung des GTP-gebundenen Zustands von $G\alpha$ zur Folge hat. Gleichzeitig verhindert das gebundene Rap1GAP aber auch die Inhibition der Adenylatzyklase durch aktiviertes $G\alpha_z$. Eine direkte Beeinflussung der GAP-Aktivität von Rap1GAP durch $G\alpha_z$ konnte nicht gezeigt werden, wohl aber Indizien für die Bildung eines trimeren Komplexes aus $G\alpha_z$, Rap1GAP und Rap1. Vermutlich befindet sich die für die Interaktion mit $G\alpha$ -Untereinheiten verantwortliche Domäne im aminoterminalen Bereich von Rap1GAP. Mochizuki *et al* (1999) zeigten, dass die Aminosäuren 26 bis 31 des aminoterminalen Teils, um den Rap1GAP-II im Vergleich zu Rap1GAP verlängert ist, für die Bindung an $G\alpha_i$ nötig sind.

Über den Zweck der Phosphorylierung von Rap1GAP ist bislang wenig bekannt. Die Existenz von Phosphorylierungsstellen wurde erstmals von Rubinfeld *et al* (1992) gezeigt. Janoueix-Lerosey *et al* (1994) wiesen die zellzyklus-abhängige Phosphorylierung von Rap1GAP nach,

konnten aber ebenso wie Rubinfeld *et al* (1992) keinen Einfluss auf die GAP-Aktivität *in vitro* feststellen. Möglicherweise wird die intrazelluläre Lokalisation von Rap1GAP über die Phosphorylierung reguliert.

Der Mechanismus der durch RapGAP stimulierten GTP-Hydrolyse von Rap ist noch unbekannt. Ein wichtiges Indiz für einen zur Interaktion von Ras mit RasGAP unterschiedlichen Mechanismus stellt die Aminosäureseitenkette Threonin 61 von Rap dar, die an die Stelle der bei den anderen GTPasen hochkonservierten Glutaminseitenkette tritt (1.3.4, 1.4). Dieser Unterschied ist für die im Vergleich zu Ras zehnfach langsamere intrinsische GTPase Reaktion von Rap verantwortlich. Im Falle eines Austausches des Threonins gegen Glutamin ist auch RasGAP imstande, die GTP-Hydrolyse-Reaktion von Rap leicht zu beschleunigen (Frech *et al*, 1990). Doch auch Rap1GAP kann die Hydrolysereaktion von RapT61Q noch beschleunigen (Maruta *et al*, 1991). Vermutlich sind die Aminosäuren 61 und 65 von Ras beziehungsweise Rap verantwortlich für die Spezifität der Interaktion zwischen Rap und RapGAP (Maruta *et al*, 1991). Der RapGAP stimulierte GTP-Hydrolysemechanismus von Rap beruht möglicherweise ebenfalls auf der Beteiligung eines katalytischen Arginins, dem jedoch zur Kompensation der fehlenden Glutaminseitenkette 61 von Rap weitere Aminosäureseitenketten zur Seite stehen.

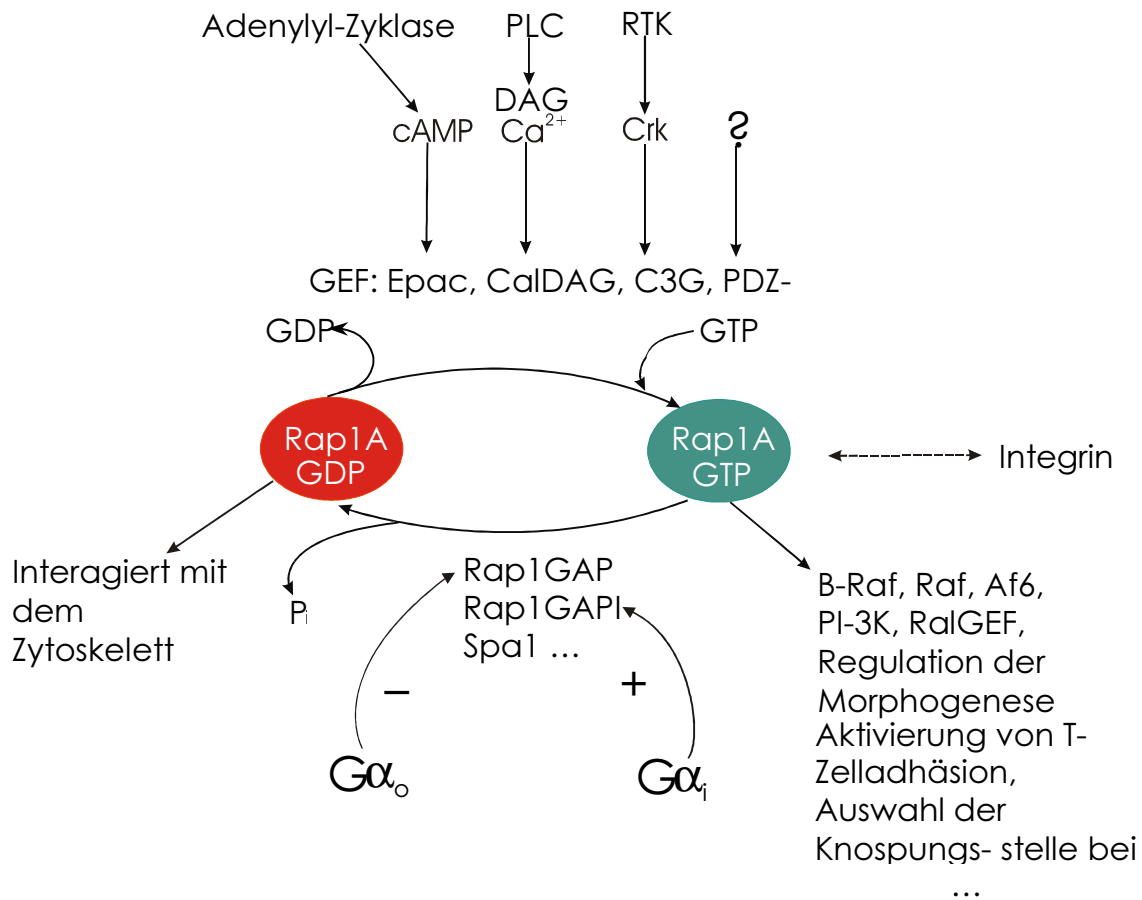


Abbildung 1-5 Signaltransduktion über Rap1A

Überblick über die Rolle von Rap im zellulären Signaltransduktionsgeschehen. Rap1A kann zwischen einem GTP-gebundenen, aktiven Zustand (grün) und einem GDP-gebundenen, inaktiven Zustand (rot) wechseln. Der Wechsel vom inaktiven in den aktiven Zustand wird von GEF beschleunigt. Verschiedene GEF stellen die Verbindung zu unterschiedlichen zellulären Signalwegen her: Epac wird von cAMP aktiviert, CalDAG von DAG und Ca^{2+} , C3G über das Adapterprotein Crk, Aktivatoren für PDZ-GEF sind noch unbekannt. Rap1A interagiert mit Integrin-Signalwegen, wenn auch auf noch nicht eindeutig geklärte Weise. B-Raf, Raf, AF6, PI-3K, RalGEF und Krit sind mögliche Effektoren von Rap1A. Über sie (und möglicherweise weitere) ist Rap1A an der Regulation der Morphogenese, der Aktivierung von T-Zellen, der Regulation der Zelladhäsion, der Auswahl der Knospungsstelle bei Hefen und weiteren zellulären Ereignissen beteiligt. Der Wechsel vom aktiven in den inaktiven Zustand von Rap erfolgt über die Hydrolyse des gebundenen GTP. Diese Reaktion wird von GAP beschleunigt. Einige der GAP sind ebenfalls mit weiteren Signalwegen verknüpft. So wirken die $G\alpha$ -Untereinheiten von heterotrimeren G-Proteinen aktivierend (+) oder inhibierend (-) bestimmte RapGAP-Formen. Rap1A im GDP-Zustand zeigt Wechselwirkungen mit dem Zytoskelett (Erläuterungen der Abkürzungen im Text und im Abkürzungsverzeichnis).

1.4.4 Welche Funktionen übernimmt Rap in der Zelle?

Ursprünglich wurde Rap, wie bereits erwähnt, eine Antagonistenrolle zu Ras zugesprochen (Cook *et al*, 1993; Kitayama *et al*, 1989). Kitayama *et al* (1989) entdeckten Rap1 aufgrund

seiner Eigenschaft, den morphologischen Phänotyp von K-Ras transformierten Zellen zu revertieren. Cook *et al.* (1993) zeigten, dass die Rap-Variante G12V in der Lage ist, eine LPA (*LysoPhosphatidic Acid* = Lysophosphatidsäure)-induzierte, Ras-abhängige Aktivierung der Proteinkinase Erk zu inhibieren. Die Daten von Boussiotis *et al.* (1997) und Sakoda *et al.* (1992) deuten ebenfalls auf eine Ras-antagonistische Wirkung hin, die jedoch nicht notwendigerweise auf der Bindung gleicher Effektoren beruhen muss. Boussiotis *et al.* (1997) konnten in humanen T-Zellen die durch aktiviertes Ras initiierte Transkription des IL-2 Gens durch aktiviertes Rap verhindern. Sakoda *et al.* (1992) zeigten, dass durch Rap1 die Ras aktivierte Transkription von c-Fos gehemmt wurde. Biochemische Hinweise auf eine direkte Interaktion des Rap- mit dem Ras-Signalweg liefern Hata *et al.* (1990) und Frech *et al.* (1990), die durch Zugabe von Rap1A*GTP eine Inhibierung der RasGAP katalysierten GTP-Hydrolysereaktion von Ras herbeiführen konnten¹⁴.

Doch nicht in allen Fällen wurde ein negativer Effekt auf durch Ras aktivierte Prozesse beobachtet. Sato *et al.* (1994) konnten eine Revertierung des von Ras induzierten Phänotyps nicht für alle untersuchten humanen Tumorzelllinien nachweisen. Die Untersuchungen von Posern *et al.* (1998) und Zwartkruis *et al.* (1998) belegen, dass Rap auch von Signalen aktiviert wird, die Raf1 und Erk aktivieren. Wäre Rap ein reiner Antagonist von Ras, sollten diese Signale inhibierend auf Rap wirken. Ebenso konnten sie zeigen, dass die Aktivierung von Ras in Zellen, die durch Vorbehandlung mit TPA (Tetradecanoyl-Phorbol-Acetat) über einen erhöhten Rap*GTP-Gehalt verfügten, nicht beeinträchtigt war.

Auch aus der *Drosophila*-Genetik kommen Hinweise auf weitere Funktionen von Rap. So ordneten Hariharan *et al.* (1991) den *Drosophila*-Phänotyp *roughened*, bei dem dem Ommatidium des Insektenauges stets die Photorezeptorzelle 7 fehlt, einer *gain-of-function* Mutation im Rap1-Gen zu. Li *et al.* (1997) wiesen nach, dass diese Mutation keine Wechselwirkungen mit dem Ras-Signalweg nach sich zieht. In umgekehrter Weise wurde von Asha *et al.* (1999) gezeigt, dass bei Rap1 Null-Mutanten von *Drosophila* keine Anzeichen erhöhter Ras-Aktivierung festzustellen waren. Darüberhinaus zeigten Asha *et al.* (1999), dass die Phosphorylierung von Rap keinen Einfluss auf seine Aktivität hat und Rap eine wichtige regulatorische Rolle bei der Morphogenese und Zellwanderung spielt.

¹⁴ Eine Wiederholung der Experimente von Frech *et al.* (1990) konnte diese Ergebnisse jedoch nicht bestätigen (Horn, 1996. Dissertation.)

Möglicherweise sind die Ras-antagonistischen Wirkungen von Rap auf die Überexpression von Rap und einer damit verbundenen Fehllokalisation des Proteins zurückzuführen. Da Rap über die gleiche Effektorbindungsregion wie Ras verfügt, könnte bei fehlender kompartimenteller Trennung und vergleichsweise hoher Rap-Konzentration der Signalweg von Ras durch die Bindung der Effektoren an Rap-Proteine beeinträchtigt werden, da so effektiv weniger Effektoren für die Interaktion mit Ras zur Verfügung stehen.

Zu den direkt beobachtbaren zellulären Effekten, die Rap zuzuschreiben sind, gehört die Abflachung von Zellen nach der Mikroinjektion von Rap. Diese Beobachtung spricht für eine Beteiligung von Rap an der Kontrolle der Zellmorphologie oder der Zelladhäsion (Kitayama *et al.*, 1989). Bestätigt wurde die letztere der Möglichkeiten durch Tsukamoto *et al.* (1999), die durch Injektion des RapGAP Sp1 die durch G-CSF (*Granulocyte Colony-Stimulating Factor*) induzierte Zelladhäsion inhibieren konnten. Durch die Zugabe von Rap1GAP konnte eine Inhibierung der durch IgE hervorgerufenen Zellstreuung in RBL-Zellen bewirkt werden (Zwartkuis & Bos, 1999). Beide Befunde könnten bedeuten, dass Rap die Aktivität von Zelladhäsionsmolekülen wie zum Beispiel Integrinen kontrolliert.

Einen Hinweis auf eine Interaktion von Integrinen mit Rap liefert die Beobachtung einer schnellen Aktivierung von Rap in Thrombozyten, nachdem diese durch Integrin-vermittelte Signale zu Zelladhäsion und Aggregation angeregt wurden (Franke *et al.*, 2000). Reedquist *et al.* (2000) vermuten, dass Rap die Adhäsion von T-Zellen über die Integrine $\beta 1$ und $\beta 2$ vermittelt. Interessanterweise wird Ras die Fähigkeit zur Blockade der Integrinaktivierung zugesprochen (Hughes *et al.*, 1997). Zwartkuis & Bos (1999) weisen jedoch darauf hin, dass dies nicht notwendigerweise auf eine direkte antagonistische Wirkung der beiden GTPasen hindeuten muß, da zum Beispiel auch die Integrin-aktivierte kleine GTPase R-Ras mit der Ras-Signalkaskade interagiert, jedoch erst *downstream* von Erk (Sethi *et al.*, 1999).

Möglicherweise lassen sich mit einer Signalübermittlung von Rap zu Integrinen auch Effekte erklären, die von Hariharan *et al.* (1991) und Asha *et al.* (1999) an *Drosophila*-Embryonen beobachtet wurden. *Loss-of-function* Mutationen im *Rap*-Gen sind im Larvalstadium lethal, was auf eine wichtige Rolle des *Rap*-Gens bei der Koordination der Entwicklung von Zellen und Geweben schließen läßt. Embryonen, denen das maternal vererbte Rap fehlt, entwickeln sich abnormal und zeigen unter anderem Defekte beim Schließen der Ventralfurche und der Kopfeinstülpung. In diesen Embryos sind die Wanderungsbewegungen der Polzellen und der

mesodermalen Zellen gestört – ein Effekt, der sehr gut auf einer Störung integrinvermittelter Signalkaskaden beruhen könnte.

1.4.4.1 Effektoren von Rap

Diskutiert wird ebenfalls, ob Rap über die gleichen oder ähnliche Effektoren wie Ras lediglich andere Effekte verursacht. Ein Kandidat einer solchen Interaktion ist B-Raf (eine Isoform der Raf-Kinase), die durch die Interaktion mit Rap aktiviert werden soll. Doch ist diese Verbindung noch immer umstritten (Ohtsuka *et al*, 1996; Vossler *et al*, 1997; Zwartkruis *et al*, 1998). B-Raf wird mit der verlängerten Aktivierung von Erk nach Stimulierung von PC12-Zellen mit NGF in Verbindung gebracht (York *et al*, 1998). Nach diesem Modell wird über Ras eine transiente Aktivierung des MAP-Signalwegs induziert, wohingegen Rap für eine anhaltende Aktivierung verantwortlich ist.

Weitere mögliche Effektoren stellen die Kinase Raf-1 sowie die Austauschfaktoren für Ral RalGDS, Rgl und Rlf dar, deren Interaktion mit Rap *in vitro* und *in vivo* gezeigt werden konnte (Geyer *et al*, 1997; Herrmann *et al*, 1996; Kishida *et al*, 1997; Nassar *et al*, 1995; Nassar *et al*, 1996; Spaargaren & Bischoff, 1994; Wolthuis *et al*, 1996). In Kotransfektionsexperimenten konnte Rlf (Zwartkruis *et al*, 1998), aber nicht RalGDS (Urano *et al*, 1996) Ral-Aktivierung durch aktiviertes Rap vermitteln. Experimente mit Fibroblasten konnten ebenfalls keinen Zusammenhang zwischen Rap und Ral-Aktivierung belegen. Die Aktivierung von Rap mit TPA und cAMP führte hier nicht zu einer Aktivierung von Ral (Zwartkruis *et al*, 1998). In Thrombozyten hingegen wurde eine Rap-abhängige Aktivierung von Ral beobachtet (Wolthuis *et al*, 1998).

Die Interaktion von Rap mit seinen Effektoren wurde strukturell und biochemisch charakterisiert (Geyer *et al*, 1997; Herrmann *et al*, 1996; Nassar *et al*, 1995; Nassar *et al*, 1996). So wurde beispielsweise nachgewiesen, dass die Affinitäten von Ras und Rap bezüglich der Ras-bindenden Domäne von Raf (Raf-RBD) und der entsprechenden Domäne von Ral-GEF (RGF-RBD) entgegengesetzt sind. Ras bindet Raf-RBD mit hoher und RGF-RBD mit niedriger Affinität, während Rap umgekehrte Präferenzen aufweist (Herrmann *et al*, 1996). Verantwortlich für diese Differenzen ist nach Nassar *et al* (1996) die Aminosäureposition 31, die in Rap von einer Lysin- und bei Ras von einer Glutaminsäureseitenkette besetzt wird. Trotz der niedrigen Affinität wurde in Zell-Experimenten Ral-GEF als Effektor-Molekül von Ras identifiziert (Matsubara *et al*, 1999; Wolthuis *et al*, 1998). Dies ist

möglicherweise auf die unterschiedliche intrazelluläre Lokalisation von Ras und Rap zurückzuführen.

1.4.4.2 *Rap und Zellzyklus*

Auch bei der Regulation des Zellzyklus spielt Rap wahrscheinlich eine Rolle. Nach Mikroinjektion von Rap1 in Swiss 3T3-Zellen konnte erhöhte DNA-Synthese nachgewiesen werden (Yoshida *et al*, 1992). Mit Rap1 stabil transfizierte Swiss 3T3 Zellen wurden sogar tumorigen und bildeten nicht-invasive Tumoren in Nacktmäusen (Altschuler & Ribeiro-Neto, 1998). Nicht bekannt ist bislang, ob bei diesem Effekt die Interaktion mit Ras-Effektoren eine Rolle spielt.

Möglicherweise beruht auch die Tuberöse Sklerose auf einer unzureichenden Regulation des aktiven Zustands von Rap, da bei dieser Krankheit das Tuberin-Gen von Mutationen betroffen ist (Wienecke *et al*, 1995). Die RapGAP-Aktivität des Tuberin-Proteins konnte allerdings nicht zweifelsfrei nachgewiesen werden (Dr. Eva Hostinova, persönliche Mitteilung).

Durch cAMP ausgelöste Zellproliferation könnte ebenfalls – zumindest partiell – über Rap vermittelt werden. Das Wachstum von Swiss 3T3 Zellen kann durch cAMP, insbesondere in Kombination mit Insulin stimuliert werden. Da die Überexpression von Rap1 in diesen Zellen den Bedarf an cAMP zur Einleitung der Proliferation senkt, liegt es nahe, eine Beteiligung von Epac, dem cAMP-regulierten Austauschfaktor von Rap, zu vermuten (Zwartkruis & Bos, 1999). Bestätigung findet diese These in der von Dremier *et al* (2000) an primären Thyrozyten gemachten Beobachtung, dass die Aktivierung der Proteinkinase A (PKA), allein nicht ausreicht, um den von cAMP ausgelösten zellproliferativen Effekt zu erzielen.

Auf eine zellzyklusabhängige Regulation von Rap deutet auch die Phosphorylierung von Rap1GAP hin, die zwar nicht die Aktivität, möglicherweise aber die Lokalisierung des Proteins beeinflusst (Janoueix-Lerosey *et al*, 1994).

In *S. cerevisiae* ist das Rap-homologe Bud1/RSR1-Protein für die Vervollständigung der M-Phase in Abwesenheit des *Ras*-Gens notwendig (Morishita *et al*, 1995). Weitere Daten deuten auch auf eine Rolle von Rap bei der Knospung der Hefe hin, da in Bud1/RSR-Null-Mutanten keine vom Karyotyp determinierte Auswahl der Knospungsstellen zu beobachten ist (Chant & Herskowitz, 1991). An der Bestimmung der Knospungsstellen sind auch die GEF und GAP von Bud1 (Bud5 und Bud2) beteiligt. Dies deutet darauf hin, dass Rap auch in dieser Funktion zwischen GDP- und GTP-gebundenem Zustand wechseln muß, um seine Funktion ausüben zu

können (Bender, 1993; Park *et al.*, 1997), die in der Rekrutierung von Zellpolaritätsfaktoren zur Knospungsstelle liegen könnte (Chenevert *et al.*, 1992; Michelitch & Chant, 1996; Park *et al.*, 1997). Zu den Zellpolaritätsfaktoren gehören das zur Rho-Familie der kleinen GTPasen gehörende Protein Cdc42 und sein Austauschfaktor Cdc24 sowie Bem1, ein Protein mit SH3-Domäne, das im Gegensatz zu Cdc24 nur mit der GDP-Form von Bud1 assoziiert, aber auch von diesem zur Knospungsstelle gebracht wird (Park *et al.*, 1997). Offensichtlich sind die GDP- und die GTP-Form von Bud1 nötig, um die erforderliche Menge von Zellpolarisationsfaktoren an die prospektive Knospungsstelle zu befördern. Das klassische (tautologische) Ras-Effektorkonzept, wonach Effektoren diejenigen Proteine sind, die mit der GTP-Form kleiner GTPasen interagieren (und die GTP-Form aufgrund ihrer Interaktion mit Effektoren als die aktive bezeichnet wird), bedarf möglicherweise einer Ergänzung oder Modifikation, da ein eingehendes, zum Guaninnukleotidaustausch führendes Signal nicht nur einen neuen Signaltransduktionsweg anschalten, sondern auch einen anderen abschalten könnte.

Ras und Rap sind zueinander stark homologe kleine GTPasen mit unterschiedlichen Aufgaben in der Zelle. Im Vergleich zur umfangreichen Literatur zu Wirkungen von Ras, wurden erst wenige der Effekte, die Rap-Proteine in einer Zelle vermitteln, eindeutig beschrieben. Auch die Funktionsweise der GTPase-Aktivität von Rap ist bislang noch nicht Gegenstand eingehender Untersuchungen gewesen. Während die GAP-katalysierte GTP-Hydrolyse-Reaktion von Ras bereits bis ins Detail verstanden ist, so dass sie zum Gegenstand der Entwicklung von Leitsubstanzen für die Arzneimittelherstellung wird, bedarf die Funktionsweise von Rap1GAP noch der Aufklärung.

2 Ziele der Arbeit

Die Ziele dieser Arbeit bestanden in der Untersuchung der durch GTPase aktivierende Proteine (GAP) stimulierten GTP-Hydrolysereaktion von Ras und Rap1. Dabei standen jeweils unterschiedliche Aspekte der Reaktionen im Vordergrund. Im Falle der RasGAP katalysierten GTP-Hydrolyse von Ras wurde der Mechanismus bereits *en detail* beschrieben. Diese Reaktion hat eine große Bedeutung für die korrekte Übermittlung von Wachstumssignalen - und bei Disfunktion für die Tumorgenese. Trotz der detaillierten mechanistischen Kenntnisse über die GAP-katalysierte GTPase-Reaktion wurde bislang noch keine Möglichkeit gefunden, onkogenes Ras über eine Beschleunigung seiner GTPase-Funktion zu inaktivieren. Ziel des ersten Teils dieser Arbeit war es daher, eine die Ras-GTPase stimulierende Peptidsequenz zu identifizieren, die als Grundlage für die Entwicklung weiterer Peptide und Peptidanaloga dienen sollte, um so Leitstrukturen für die Entwicklung eines gegen die onkogene Disfunktion von Ras gerichteten Wirkstoffs zu generieren. Hierzu war es nötig, kombinatorische Bibliotheken mit an Festphase synthetisierten Nonapeptiden zu entwerfen und herzustellen. Diese sollten im weiteren in einem zu entwickelnden manuellen Testsystem, das die parallele Prüfung mehrerer Peptidbibliotheken ermöglicht, auf RasGAP-Aktivität gegenüber onkogenem Ras getestet werden.

Die Frage, ob die Beschleunigung der GTPase-Reaktion von Rap durch RapGAP einem ähnlichen Mechanismus folgt, wie die RasGAP-stimulierte GTP-Hydrolysereaktion von Ras, stand im Zentrum des zweiten Teils der Arbeit. Als konkrete Arbeitshypothese diente die Frage, ob Rap1GAP in Analogie zu RasGAP und RhoGAP ebenfalls eine Argininseitenkette zur Stabilisierung des Übergangszustandes der GTP-Hydrolysereaktion beisteuert. Zur Klärung dieser Fragen war zunächst eine Reinigungsmethode für ein in *E. coli* hergestelltes katalytisch aktives Fragment von Rap1GAP zu etablieren, um im Anschluß daran, den Einfluss konservierter Aminosäuren dieses Fragmentes auf dessen katalytische Eigenschaften in einer Kombination von Mutagenesestudien und biochemischen Analysen zu untersuchen.

3 Materialien und Methoden

3.1 Materialien

Die Erwähnung von Produktnamen in dieser Arbeit sagt nichts über deren eventuellen marken- oder namensrechtlichen Schutz aus. Auf die besondere Kennzeichnung geschützter Bezeichnungen wurde verzichtet.

3.1.1 Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien wurden im Reinheitsgrad *pro analysi* von den Firmen Aldrich (Steinheim), Boehringer Mannheim, Merck (Darmstadt), LKB (Gräfelfing), Pharmacia (Freiburg), Riedel de Haen (Seelze), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) und Sigma (München) bezogen.

3.1.2 Standardpuffer

5 x SDS-Probenpuffer	150 mM Tris/HCl pH 6,8; 2% (w/v) SDS; 20% (w/v) Glycerol; 0,01% (w/v) Bromphenolblau; 10 mM DTE
6 x DNA-Probenpuffer	0,25% (w/v) Bromphenolblau; 0,25% (w/v) Xylencyanol; 30% (v/v) Glycerol
Färbelösung für SDS-Gele	0,1% (w/v) Coomassie Brilliant Blue G250; 0,1% (w/v) Coomassie Brilliant Blue R250; 40% (v/v) MeOH; 10% (v/v) Essigsäure
Entfärbelösung für SDS-Gele	20% (v/v) Essigsäure; 10% (v/v) Ethanol
PBS	10,2 mM Na ₂ HPO ₄ ; 1,8 mM KH ₂ PO ₄ ; 137 mM NaCl; 2,7 mM KCl, pH 7,4
SDS-Laufpuffer	25 mM Tris/HCl; 200 mM Glycin; 0,1% (w/v) SDS
TAE-Puffer	40 mM Tris; 40 mM Essigsäure; 1 mM EDTA, pH 8,0
TE-Puffer	10 mM Tris/HCl pH 8,0; 1 mM EDTA

3.1.3 Verwendete Bakterienstämme

<i>E. coli</i> CK600K	supE, hsdM ⁺ , hsdR ⁻ , kan ^R ; Hoffmann-Berling, Heidelberg.
<i>E. coli</i> TG1	K12, (lac-pro) supE, thi, hsd5 [F ⁺ traD36 proA ⁺ B ⁺ lacI ^q ZΔM15].

E. coli BL21 F⁻, *opmT*, *hsds* (*r_B*⁻, *m_B*⁻), *gal* (38, 39)

3.1.4 Plasmide

pGroESL, Kan ^r	Goloubinoff <i>et al</i> (1989)
pGEX-4T-1	Pharmacia, Freiburg
pGEX-4T-1Rap1Gapfl	Patricia Stege, MPI-Dortmund
pGEX-4T-1Rap1Gapv	Patricia Stege, MPI-Dortmund
ptacRap1AΔC	Dorothee Vogt, MPI-Dortmund
ptacRap1BΔC	Dorothee Vogt, MPI-Dortmund
ptacH-Ras	Dorothee Vogt, MPI-Dortmund

3.1.5 Medien und Antibiotika

Standard I - Fertigmedium	Merck
Luria-Bertani (LB)-Medium: 10 g Bacto-Trypton, 10 g NaCl, 5 g Hefeextrakt ad 1 l	
Terrific-Broth (TB)-Medium: 12 g Bacto-Trypton, 24 g Bacto-Hefeextrakt, 4 ml Glycerol, 100 ml 0,17 M KH ₂ PO ₄ 0,72 M K ₂ HPO ₄ ad 1 l	
Ampicillin	GERBU Biotechnik GmbH, Gaiberg
Stammlösung 100 g/l in H ₂ O, Endkonzentration 100 mg/l	
Kanamycin	GERBU Biotechnik GmbH, Gaiberg
Stammlösung 25 g/l in H ₂ O, Endkonzentration 25 mg/l	
Chloramphenicol	GERBU Biotechnik GmbH, Gaiberg
Stammlösung 25 g/l in EtOH, Endkonzentration 25 mg/l	

Konzentration der Antibiotika in Agarplatten

Ampicillin: 100 mg/l

Kanamycin: 50 g/l

Chloramphenicol: 25 g/l

3.1.6 Oligonukleotide

3.1.6.1 Oligonukleotide für die Klonierung

RapGAPfl start BamHI 5'-CGCGGATCCATGATTGAGAAGATG-3'	RapGAPv start 33 BamHI 5'-CGCGGATCCGTGCACGAGGTCTTGGGG-3'
RapGAPfl stop 663 NotI 5'-ATAAGAATGCGGCCGCTACTAACAGCCCA GCTGGG-3'	RapGAPv start 210 BamHI 5'-CGCGGATCCCTCTTCAGCACCAATGAGG-3'
RapGAPv start 75 BamHI 5'-CGCGGATCCCCACAACCAAGGTG-3'	RapGAPv stop 410 NotI 5'-ATAAGAATGCGGCCGCTACTAGCCCATCA TGGACTGG-3'
RapGAPv stop 415 NotI 5'-ATAAGAATGCGGCCGCTACTACTCGTCGC CGCCA-3'	RapGAPv stop 420 NotI 5'-ATAAGAATGCGGCCGCTACTAATTCTCCA TCTTGTCTC-3'
RapGAPv start 43 BamHI 5'-CGCGGATCCTTCCCCCTCATCCTGCTG-3'	

3.1.6.2 Mutageneseoligonukleotide

3.1.6.2.1 Oligonukleotide für die Zwei-Schritt-Mutagenese

RapGAPv R390K antisense 3'-CAGGAGGGCGGCCTTCGTCCGCTCC-5'	RapGAPv R284A antisense 3'-GATGTGCCGCTTAGCCTGCAACTGCTGG-5'
RapGAPv R388K antisense 3'-GGCGGCCCGCGTCTTCTCCTCCAGTT-5'	RapGAPv R240A antisense 3'-GTCCAGGCCTCTGCGAACCCCTTAAAG-5'
RapGAPv R286K antisense 3'-GTTCCCGATGTGCTTCTTCCGCTGC-5'	RapGAPv Q280A sense 5'-GGGGACGCCGCGCAGTTGCAGCGG-3'
RapGAPv R284K antisense 3'-GATGTGCCGCTTCTTCTGCAACTGC-5'	RapGAPv Q281A sense 5'-GGGGACGCCAGGCGTTGCAGCGG-3'
RapGAPv R240K antisense 3'-GTCCAGGCCTCTTGAACCCCTTAAAG-5'	RapGAPv Q298A sense 5'-GCTGTGGTCTTCGCGGATGAAAACACT-3'
RapGAPv R390A sense 5'-GAGGAGCGGACGGCTGCCGCCCTCCTG-3'	RapGAPv K285A sense 5'-TTGCAGCGGGCGCGGCACASTCGGG-3'
RapGAPv R388A sense 5'-AAACTGGAGGAGGCTACGCGGGCCGCC-3'	RapGAPv K368A antisense 3'-AGCATTGATCAGCGCTGTTCAGCAAAAA-5'
RapGAPv R286A antisense 3'-GTTCCCGATGTGAGCCTTCCGCTGCAAC-5'	

3.1.6.2.2 Oligonukleotide für die Mutagenese nach der Quick-Change Methode

Rap1B A86C sense 5'-GCATTAGTTTATTCCATCACATGTCAGTCC ACATTTAACGATTTA-3'	Rap1B Y40C sense 5'-CGATCCTACGATAGAAGATTCTTGTAGAAA GCAAGTTG-3'
Rap1B A86C antisense 3'-CGTAATCAAATAAGGTAGTGTACAGTCAG GTGTAATTGCTAAATG-5'	Rap1B Y40C antisense 3'-GCTAGGATGCTATCTTCTAAGAACATCTTT CGTTCAAC-5'
Rap1B N91C sense 5'-CACAGCACAGTCCACATTTTGC GATTTACA AGACCTGAGAG-3'	Rap1B L70C sense 5'-GCAATTTACAGCAATGAGGGATTGCTACAT GAAAATGGACAAGG-3'
Rap1B N91C antisense 3'-GTGTCGTGTCAGGTGTAACGCTAAATGT TCTGGACTCTC-5'	Rap1B L70C antisense 3'-CGTTAAATGTCGTTACTCCCTAACGATGTA CTTTTACCTGTTCC-5'

3.1.7 Enzyme und Proteine

Alkalische Phosphatase	Boehringer Mannheim
BSA	Fluka, Neu-Ulm
Chymotrypsin	Boehringer Mannheim
DNaseI	Boehringer Mannheim
Lysozym	Sigma, Deisenhofen
Phosphodiesterase	Boehringer Mannheim
Pfu-DNA-Polymerase	Stratagene, Heidelberg
Restriktionsenzyme	New England Biolabs, Schwalbach
T4-DNA-Ligase	New England Biolabs, Schwalbach
Thrombin	Serva, Heidelberg
Trypsin	Boehringer, Mannheim

3.1.8 Antikörper

Rap1A IgG <i>rabbit polyclonal antibody</i>	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA
RapGAP IgG <i>rabbit polyclonal antibody</i>	s. o.
Anti-Rabbit IgG <i>horseradish peroxidase</i>	s. o.

3.1.9 Standards**3.1.9.1 DNA-Standards**

λ -DNA, BSTII geschnitten	New England Biolabs, Schwalbach
-----------------------------------	---------------------------------

3.1.9.2 Proteinstandards

SDS6	Sigma, Deisenhofen
SDS7	Sigma, Deisenhofen

3.1.10 Säulenmaterialien

C-18 Ultrasphere Säule	Beckman, Unterschleißheim
DEAE-Sepharose	Pharmacia, Freiburg
Glutathion-Sepharose 4B	Pharmacia, Freiburg
Hi-Load 16/60 Säule und 26/60	Pharmacia, Freiburg

Q-Sepharose	Pharmacia, Freiburg
Resource S, 1 ml	Pharmacia, Freiburg
Resource Q, 1 ml	Pharmacia, Freiburg
Sephadex G-25 M in PD-5 und PD-10 Säulen	Pharmacia, Freiburg
Superdex 75 prep grade	Pharmacia, Freiburg
Superdex 200 prep grade	Pharmacia, Freiburg

3.1.11 Kits

QIAprep <i>Plasmid-Miniprep-Kit</i>	QIAGEN, Hilden
QIAquick <i>Gel-Extraction-Ki</i>	QIAGEN, Hilden
QIAquick <i>PCR-Purification-Kit</i>	QIAGEN, Hilden

3.1.12 Fluoreszenzlabel

1,5-IAEDANS	Mobitec, Göttingen
-------------	--------------------

3.1.13 Geräte

Amicon Druckfiltrationseinheiten	Waters/Millipore, Eschborn
Blotting-Apparatur	BioRad, Hercules, USA
FluoroMax II Spektrofluorimeter	SPEX Instruments: NJ, USA
FPLC Protein Purification System 650E	Waters/Millipore, Eschborn
Fraktionssammler FC 204	Abimed, Langenfeld
Gelelektrophoreseapparatur	BioRad, Hercules, USA
HPLC System Gold 166	Beckman, Unterschleißheim
Miniplus 3 Pumpe	Abimed, Langenfeld
<i>Microfluidizer Processor M-110S</i>	Microfluidics, Weinheim
Molecular Imager, <i>Storage Phosphor Imaging System GS-525</i>	BioRad, Hercules, USA
Oberflächenplasmonresonanz, Biacore 1000	BIACore, Uppsala, Schweden
PTC-200, Thermal-Cycler	MJ Research, Watertown, USA
Stopped-Flow-Gerät SX.18 MV	Applied Photophysics, Leatherhead, UK
Szintillationszähler LS 6500	Beckman, Unterschleißheim
UV-Detektor LKB Uvicord SII	Pharmacia, Freiburg

UV Detektor Waters 486,

System Controller 600 E Waters/Millipore

Uvikon 933-Doppelstrahl-Spektrophotometer Kontron, Neufahrn

3.1.14 Computer und Software

Apple PowerMac, Hewlett Packard 486, Transtac Pentium III

Die im Rahmen dieser Arbeit gewonnen Daten wurden mit folgenden Programmen verarbeitet:

Wisconsin Sequence Analysis Package	Genetics Computer Group, Madison, USA
Excel für Windows	Microsoft Corp.
GraFit	Erithracus Software, Staines, UK
<i>Molecular Analyst</i>	Biorad, Hercules, USA
<i>Origin for DSC 4.1</i>	MicroCal., USA

Die vorliegende Arbeit wurde mit Word 7.0 (Microsoft Corp.) unter Zuhilfenahme der Programme Photoshop (Adobe), CorelPhotoPaint und CorelDraw (beide Corel) erstellt.

3.2 Methoden

3.2.1 Molekularbiologische Methoden

3.2.1.1 Isolierung von Plasmid-DNA und DNA-Fragmenten

Plasmid-DNA wurde nach alkalischer Lyse der Zellen durch Ionenaustausch-Chromatografie nach der Methode und mit den Materialien der Firma Qiagen (QIAprep) gereinigt. Die DNA wurde in TE Puffer eluiert und bei -20° C aufbewahrt. Die Konzentration der DNA wurde photometrisch bei 260 nm bestimmt. Die Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen erfolgte mit dem QIAquick-Gel-Extraction-Kit entsprechend den Herstellerangaben.

3.2.1.2 Restriktionsspaltung von DNA

Die enzymatische Hydrolyse von DNA wurde mit Enzymen von NEB (Schwalbach/Taunus) durchgeführt und folgte den Herstellerangaben. Dabei wurde üblicherweise in 20 µl

Gesamtvolumen 1 µg DNA mit 5 U des jeweiligen Enzyms eine Stunde lang bei 37° C inkubiert.

3.2.1.3 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung von DNA-Fragmenten wurde die horizontale Agarosegelelektrophorese eingesetzt. Dabei kamen Gele mit einem Agarosegehalt von 1% zum Einsatz. Als Puffer zum Lösen der Agarose – wie auch als Laufpuffer – wurde TAE-Puffer verwendet. Nachdem die Agarose abgekühlt, jedoch noch nicht erhärtet war, wurde Ethidiumbromid zur späteren Detektion der DNA zugesetzt. Die mit Probenpuffer versetzten DNA-Proben wurden in die Taschen des mit Laufpuffer überschichteten Gels gegeben und bei einer Spannung von 8 V/cm aufgetrennt. Zur Detektion der mit Ethidiumbromid komplexierten DNA wurde ein UV-Transilluminator der Wellenlänge 212 nm eingesetzt.

3.2.1.4 Herstellung kompetenter Bakterienzellen

Die Vorbereitung von *E. coli*-Zellen zur Aufnahme von Plasmiden erfolgte nach (Chung *et al*, 1989). Hierzu wurden 100 ml LB-Medium aus einer ÜN-Vorkultur (37° C) angeimpft und bei 37° C geschüttelt. Die Kultur wurde nach Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,3 bis 0,4 für 10 min auf Eis gestellt und anschließend bei 4000 x g zentrifugiert. Das Zentrifugat wurde in 10 ml eiskaltem TSS-LB-Medium (85% (v/v) TSS; pH 6,5, 50 mM MgCl₂; 10% (v/v) PEG 8000; 5% (v/v) DMSO; steril filtriert) resuspendiert. Die schockgefrorenen Aliquots wurden bei -80° C gelagert.

3.2.1.5 Ligation von DNA-Fragmenten

Die zu ligierenden Fragmente wurden zunächst über eine Agarose-Gelelektrophorese und anschließende Ionentausch-Chromatografie (QIAquick-Gel-Extraction-Kit; Qiagen, Hilden) gereinigt. Ligiert wurde mit T4-DNA Ligase (NEB, Schwalbach/Taunus). Dabei wurden in einem 10 µl Ansatz zirka 0,2 µg Vektor-DNA mit 1 µg Fragment-DNA von 0,5 U Ligase bei 16° C ÜN verknüpft. Zur Vermeidung einer Rezyklisierung des linearisierten Plasmids wurde dieses vor der Ligation mit 1 U alkalischer Phosphatase aus Krabben (USB, Ohio, USA) bei 37° C 1 h inkubiert. Anschließend wurde die Phosphatase durch fünfzehnminütiges Erwärmen auf 65° C inaktiviert.

3.2.1.6 Transformation von *E. coli*

Die auf Eis aufgetauten kompetenten Bakterien (100 µl) wurden mit zirka 1 bis 5 ng gereinigter Plasmid-DNA oder einem Ligationsansatz vermischt und für weitere 30 Minuten auf Eis inkubiert. Einem Hitzeschock (42° C, 90 s) folgten nochmals 10 Minuten auf Eis. Nach der Zugabe von 900 µl LB-Medium wurde der Ansatz unter Schütteln eine halbe Stunde bei 37° C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen in der Tischzentrifuge bei 5000 rpm zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Zellen in 200 µl LB-Medium resuspendiert. Von dieser Suspension wurden unterschiedlich bemessene Fraktionen (25 und 175 µl) auf Agarplatten ausplattiert, die mit einem geeigneten Antibiotikum versehen waren, um die Selektion auf plasmidtragende Klone zu ermöglichen. Zur dauerhaften Aufbewahrung von Bakterienklonen wurden Glycerolkulturen angelegt. Dazu wurden 500 µl einer ÜN-Kultur mit 500 µl Glycerol vermischt und bei -80° C gelagert.

Mutagenisierte pGEX-Vektoren wurden zunächst in TG1-Bakterienzellen transformiert, da diese eine wesentlich höhere Transformationseffizienz aufweisen als die für die Expression empfohlenen BL21-Zellen. Von Klonen, deren Plasmide die gewünschte Sequenz aufwiesen, wurden 3 ml ÜN-Kulturen angesetzt, aus denen die Plasmid-DNA gereinigt wurde, um dann in BL-21 Zellen transformiert zu werden.

3.2.1.7 Gerichtete Mutagenese

Um Gene mit Punktmutationen zu erzeugen wurden zwei Methoden angewandt:

3.2.1.7.1 2 Schritt-Mutagenese

Die Mutagenese nach (Picard *et al*, 1994) erlaubt die Verwendung der drei benötigten Primer (5'-/3'-Ende und Mutageneseprimer) in einem PCR Reaktionsansatz, ohne dass es nötig ist, ein Zwischenprodukt aufzureinigen, wie es bei der Methode nach (Ito *et al*, 1991) der Fall ist. Lediglich die Variation der Primerkonzentration wird in der neueren Methode dazu verwendet, die PCR-Reaktion in Richtung des gewünschten Produktes zu lenken. Das Temperaturprofil der Mutagenese-PCR entspricht dem der Sequenzier-PCR (3.2.1.8). In den ersten zehn Zyklen der PCR wird mit einem der beiden Endprimer und dem Mutageneseprimer ein sogenannter Megaprimer erzeugt (zirka 3,6 fmol Template, 10 pmol Mutageneseprimer, 10 pmol Endprimer). Für die folgenden 10 Zyklen werden 50 pmol des zweiten Endprimers zugegeben. Vor den abschließenden 10 Zyklen werden 50 pmol des er-

sten Endprimers zugegeben. Die Produkte werden über Agarose-Gelelektrophorese und Gel-extraktion gereinigt (3.2.1.3).

3.2.1.7.2 Gerichtete Mutagenese nach der *Quick-Change* Methode

Der Vorteil dieses Systems liegt in der Möglichkeit, Basenaustausche in einer einzigen PCR zu erhalten und als Produkt ohne Ligationsschritt ein transformierbares Plasmid zur Verfügung zu haben. Zur Anwendung kam diese Methode in Form des "*Quick-Change Site-directed Mutagenesis-Kit*" der Firma Stratagene (Braman *et al*, 1996). Grundlegend für diese Methode sind das Restriktionsenzym DpnI mit seiner Eigenschaft, methylierte DNA zu schneiden, und die DNA-Polymerase Pfu, die es aufgrund ihrer hohen Prozessivität ermöglicht, ein Plasmid bis zu einer Größe von 10 kb zu amplifizieren. Als Matrize wird ein nicht linearisiertes Plasmid verwendet, welches das zu mutierende Gen trägt. Mit Hilfe zweier komplementärer Oligonukleotide, die beide die gewünschte Mutation tragen, wird nun eine PCR durchgeführt. Als Produkte entstehen hierbei unmethylierte Plasmide, die die Mutation tragen, hemimethylierte Plasmide, die noch einen Strang der Matrizen-DNA enthalten, sowie zu einem geringen Prozentsatz die vollmethylierten Ursprungsplasmide selbst. Auf die PCR folgt ein Restriktionsansatz mit der Restriktionsendonuklease DpnI, die spezifisch methylierte und hemimethylierte DNA schneidet. Mit diesem Schritt erhält man eine direkt zur Transformation einsetzbare Lösung mutierter Plasmide. Die Ansätze folgten alle der Anleitung des Herstellers.

3.2.1.8 Sequenzierung von DNA

Die Sequenzierung von DNA erfolgte mittels fluoreszierend markierter Didesoxynukleotide nach der Kettenabbruchmethode (Sanger *et al*, 1977). Für die PCR-Reaktionen (Volumen 20 µl) wurden je 4 µl des DyeDeoxyTerminator-Mix (Perkin-Elmer, Überlingen), 1 µg Plasmid-DNA und 3,2 pmol der spezifischen Primer eingesetzt. Das PCR-Programm sieht 28 Zyklen des folgenden Programms vor:

96°C	Denaturierung	30 s
48°C	Hybridisierung	20 s
60°C	Elongation	240 s

Die Fällung der DNA erfolgte durch Zugabe von 2 µl 3 M Natriumacetat (pH 5.0) und 50 µl eiskaltem EtOH abs.. Nach 30 minütiger Zentrifugation in der Tischzentrifuge bei 14000 rpm wurde der Überstand verworfen, das Pellet in 70% Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet an der Luft getrocknet. Die Analyse der DNA-Fragmente mittels Polyacrylamidgelelektrophorese sowie die Auswertung des Bandenmusters erfolgte durch die *Zentrale Einheit Synthese und Sequenzierung* des MPI für molekulare Physiologie Dortmund mit Hilfe eines Perkin-Elmer ABI-Sequencers 373A (Überlingen).

3.2.2 Proteinchemische Methoden

3.2.2.1 Analytische Expression rekombinierter Plasmide

Zur Abschätzung geeigneter Expressionsbedingungen und zur Kontrolle des Anteils an löslichem rekombinanten Protein wurden Proteinpräparationen in kleinem Maßstab durchgeführt. Hierzu wurden 20 ml Expressionskulturen mit 200 µl aus 3 ml ÜN-Kulturen angeimpft und bis zum Induktionszeitpunkt bei 37 °C und 180 rpm inkubiert. Variiert wurden der Induktionszeitpunkt, die Konzentration des Induktors (0,05 bis 1 mM IPTG), Temperatur (28 bis 37° C) und Schüttelgeschwindigkeit (50 bis 200 rpm) nach Induktion. Zwei, vier, acht und 16 h (ÜN) später wurden je zwei 1 ml Proben entnommen, um zum einen nach Zentrifugation der Zellen eine SDS-PAGE (3.2.2.5) zur Kontrolle des Gesamtexpressionsmusters durchzuführen und zum anderen, um einen analytischen Zellaufschluß (3.2.2.2) durchzuführen, welcher der Bestimmung des Anteils an löslichem Protein mittels SDS-PAGE diene.

3.2.2.2 Analytischer Aufschluss von Bakterienzellen

Der analytische Aufschluß von Bakterienzellen erfolgte im Gegensatz zum präparativen rein enzymatisch. Hierzu wurden 1 ml Proben der induzierten Zellen 5 min in der Tischzentrifuge bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in 150 µl Aufschlußpuffer (PBS) resuspendiert. Vor der folgenden Inkubationszeit von 10 min bei RT wurden 2 µl PMSF (20 g/l) und 5 µl Lysozym (60 g/l) zugesetzt. Die Reaktionsgefäße wurden einmal pro Minute invertiert. Im Anschluss wurden 3 µl Natriumdesoxycholat (80 g/l) sowie 4 µl DNase (10 g/l; 1 M MgCl₂) zugesetzt. Während der folgenden Inkubationszeit von 20 Minuten wurde das Reaktionsgefäß ebenfalls in zirka 1 minütigen Abständen invertiert. Nach einer zwanzigminütigen Zentrifugation der Proben bei maximaler Umdrehungszahl in

der Tischzentrifuge bei 4° C wurde der Überstand (zirka 160 µl) abgenommen, mit 40 µl 5 x SDS-Probenpuffer versetzt und für 15 Minuten auf 96° C erhitzt. Hiervon wurden 15 µl mittels SDS-PAGE (3.2.2.5) analysiert, um lösliche Proteine nachzuweisen. Zum Vergleich mit den im Präzipitat befindlichen Proteinen wurde das Pellet in 200 µl 1 x SDS-Probenpuffer resuspendiert und ebenfalls einer SDS-PAGE unterzogen.

3.2.2.3 *Präparativer Aufschluss von Bakterienzellen*

Der präparative Aufschluss von Bakterienzellen im Maßstab von 100 bis 500 ml resuspendierter Bakterienkulturen wurde mit Hilfe eines *Microfluidizers* durchgeführt. Dieses Gerät nützt Pressluftdruck von bis zu 1564 bar, um die Suspension durch einen patentierten Keramik-Interaktionsraum zu drücken, in dem durch Scherkräfte und eine massive Erhöhung der Fließgeschwindigkeit die Zellen schonend aufgebrochen werden. Die Zellen müssen hierzu sehr sorgfältig resuspendiert werden, um die Apparatur nicht zu verstopfen (1 h auf Eis gerührt).

3.2.2.4 *Herstellung rekombinanter Proteine*

3.2.2.4.1 Expression von H-Ras und H-Ras-Mutanten

Die Expression von rekombinanten *Ras*-Genen und die Reinigung der Proteine wurde wie von (Tucker *et al*, 1986) beschrieben ausgeführt. 10 l Standard I Medium (Ampicillin: 100 mg/l; Kanamycin: 30 mg/l) wurden mit einer 100 ml ÜN-Vorkultur von CK600K-Zellen, die einen ptac-Vector mit dem *Ras*-Gen enthalten, beimpft und im Schüttler bei 37° C und 180 rpm bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 inkubiert. Dann erfolgte die Induktion mit 50 µM IPTG. Zur ÜN-Expression wurde die Inkubationstemperatur auf 30° C gesenkt. Nach Beendigung der Inkubation wurden die Zellen zentrifugiert, in Aufschlußpuffer (20 mM Tris/HCl pH 7,4; 2 mM DTE) resuspendiert, erneut zentrifugiert und zur Verbesserung des Aufschlusses langsam bei -20° C eingefroren. Der Aufschluß erfolgte im gleichen Puffer unter Zusatz von PMSF (100 µM Endkonzentration) mittels eines *Microfluidizers*. Auf die Zentrifugation des Aufschlusses folgte eine DEAE-Anionenauschromatographie (600 ml Säulenvolumen) mit dem Überstand. Die an die Säule gebundenen Proteine wurden mit Hilfe eines linearen Gradienten von 0 bis 400 mM NaCl eluiert. Mittels SDS-PAGE wurden die H-Ras enthaltenden Fraktionen identifiziert und anschließend vereinigt. Durch sukzessive Zugabe von Ammoniumsulfat

wurden die Proteine aus den vereinigten Fraktionen gefällt. Hierzu wurde der Proteinlösung in halbstündigen Abständen unter Rühren bei 4° C Ammoniumsulfat bis zur Endkonzentration von 3 M zugegeben. Das Präzipitat wurde bei 75000 x g zentrifugiert (30 min, 4° C) und konnte nun bei 4° C aufbewahrt oder sofort weiterverarbeitet werden. Der zweite Reinigungsschritt bestand in einer Gelfiltration über eine Superdex75-(26/60)-Säule. Zuvor wurde das Ammoniumsulfatpräzipitat in Gelfiltrationspuffer (30 mM Tris/HCl pH 7,4; 200 mM NaCl, 5 mM MgCl₂; 1 mM DTE; 10 µM GDP) gelöst und anschließend bei 100 000 x g und 4° C zentrifugiert. Aliquots der Protein enthaltenden Fraktionen nach der Gelfiltration wurden ebenfalls einer SDS-PAGE unterzogen. Fraktionen mit hinreichender H-Ras-Konzentration wurden vereinigt. Aus ihnen wurde das Protein erneut mit Ammoniumsulfat gefällt, um anschließend zur gewünschten Konzentration in Puffer aufgenommen werden zu können. Die aliquotierten Proteinlösungen wurden schockgefroren und bei - 80° C aufbewahrt.

3.2.2.4.2 Herstellung von *Rap* und *Rap*-Varianten

Der Reinigung von Rap-Proteinen wurde das Protokoll von (Herrmann *et al*, 1996) zugrunde gelegt. Wie dort beschrieben erfolgte die Expression in CK600K Zellen, die den p Δ C-Rap1A Δ C-Vektor oder eine mutierte Variante und den pGroESL-Vektor enthielten. Allerdings wurde bei den neu hergestellten Varianten von Rap auf den Zusatz des pGroESL-Plasmids verzichtet. Die Expressionsbedingungen entsprechen denen bei H-Ras, ebenso die Aufschlußmethode. Die Reinigung unterschied sich in jedoch in zwei wesentlichen Punkten: a) anstelle einer DEAE- wurde eine Q-Sepharose-Anionenaustauschersäule verwendet; b) da Rap-Proteine bei der Fällung mit Ammoniumsulfat irreversibel denaturieren, wurde das Volumen der vereinigten Fraktionen nach beiden Reinigungsschritten in einer Amicon-Druckfiltrationskammer auf das jeweils gewünschte Maß reduziert.

3.2.2.4.3 Expression von *RapGAP* und *RapGAP*-Mutanten

RapGAP und RapGAP-Varianten wurden als GST-Fusionsproteine gereinigt. Die Expression der pGEX-Plasmide wurde in B121-Zellen durchgeführt, die vom Anbieter des pGEX-Systems (Pharmacia, Freiburg) für diese Zwecke empfohlen werden. Zwischen 2 und 20 l TB-Kulturmedium wurden mit einer ÜN-Vorkultur im Verhältnis 1:100 angeimpft und bei 37° C und 180 rpm inkubiert. Die Expression wurde bei einer OD₆₀₀ von 0,2 mit 50 µM IPTG induziert und ÜN bei 18° C fortgeführt. Anschließend wurden die Zellen zentrifugiert und in

ATP (1 mM), Mg^{2+} (5 mM) und DTE (3 mM) haltigem PBS-Puffer resuspendiert. Vor dem Aufschluß mit dem *Microfluidizer* wurde zur Inhibierung von Serinproteasen PMSF (100 μ M Endkonzentration) zugesetzt. Nach einer einstündigen Zentrifugation des Aufschlusses bei 100 000 x g wurde der Überstand auf eine mit ATP (100 μ M), Mg^{2+} (2 mM) und DTE (3 mM)-haltigem PBS-Puffer äquilibrierte Glutathion-Sepharose 4 B Säule (20 ml Säulenvolumen) aufgetragen. Anschließend wurde die Säule mit 3 Säulenvolumina PBS + 3 mM DTE gewaschen. Nun wurde das Protein entweder mit PBS + 3 mM DTE + 20 mM Glutathion (pH 7,4) von der Säule eluiert oder aber auf der Säule belassen und einem Thrombinverdau unterzogen. Hierzu wurden 50 bis 160 U Thrombin in 1 ml Puffer verdünnt und auf die Säule aufgetragen. Anschließend wurde die Säule kurzgeschlossen und mit geringer Flußrate (0,5 bis 1 ml/min) im Kreislauf bei 4° C ÜN durchflossen. Das im Kreislauf befindliche Protein wurde dann in 10 Fraktionen gesammelt, mittels SDS-PAGE (3.2.2.5) auf Reinheit überprüft und mit Vivaspin-Konzentratoren auf die gewünschte Konzentration gebracht. Mit dem direkt eluierten Fusionsprotein wurde ebenso verfahren. Vor dem Schockgefrieren in flüssigem Stickstoff wurde der Proteinlösung 1/10 Volumen 96%igen Glycerols zur Stabilisierung zugesetzt. Die Proteine wurden bei - 80° C aufbewahrt.

3.2.2.5 SDS-PAGE: Denaturierende SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Zur Auftrennung von Proteingemischen und zur Kontrolle der Reinheit von Proteinpräparationen wurde die diskontinuierliche Gelelektrophorese in Polyacrylamidgelen nach Laemmli benutzt (Laemmli, 1970). Die Polyacrylamidkonzentration betrug im Trenngel 15% und im Sammelgel 4%, wobei die Konzentration an Acrylamid zu der von Bisacrylamid im Verhältnis von 30% zu 0,8% stand. Die Dauer der Gelläufe betrug zirka 50 min bei konstanter Stromstärke von 36 mA, die Größe der Gele zirka 9 x 6 x 0,1 cm. Die oberen 2,5 Zentimeter wurden dabei vom Sammelgel eingenommen. Vor dem Auftrag wurden die Proben mit Lämmli-Puffer (3.1.2) versetzt und für mindestens 10 min bei 96° C inkubiert. Nach dem Lauf wurde das Gel mindestens 10 min bei leichter Bewegung in Färbelösung für SDS-Gele (3.1.2) gefärbt und anschließend in Entfärbelösung (3.1.2) bis zur deutlichen Sichtbarkeit der Banden entfärbt. Sowohl Färbe- als auch Entfärbvorgang können durch Erwärmung erheblich beschleunigt werden.

3.2.2.6 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Der Proteingehalt von Lösungen wurde nach (Bradford, 1976) bestimmt. Die Messungen beruhen auf der Verschiebung des Absorptionsmaximums des Farbstoffs Coomassie Brilliant Blue von 456 nm auf 595 nm nach Bindung von Protein in saurer Lösung. Pro Messung wurden 1 bis 15 µl der zu untersuchenden Lösung in 1 ml Coomassie Protein Assay Plus Reagenz (Pierce, Illinois, USA) gegeben. Nach gründlichem Durchmischen wurde die Extinktion bei 595 nm gegen pures Reagenz gemessen. Als Standard diente Rinderserumalbumin (Pierce, Illinois, USA).

3.2.2.7 Konzentrierung von Proteinen durch Ultrafiltration

Um gewünschte hohe Proteinkonzentrationen zu erzielen, wurden Proteinlösungen in Viva-spin-Röhrchen (Vivascience, Lincoln, England) unterschiedlicher Volumina durch Zentrifugation konzentriert. Für sehr große Volumina (> 100 ml) kamen Druckdialysekammern von Amicon (Amicon, Witten) zum Einsatz, in denen die Lösung mit Stickstoff bei 0,3 MPa durch die Ultrafiltrationsmembran gepreßt wird. In beiden Fällen kamen Membranen beziehungsweise membranbestückte Röhrchen mit einer Ausschlußgröße von 10 kDa zum Einsatz.

3.2.2.8 Nukleotidaustausch an kleinen GTPasen

3.2.2.8.1 Darstellung von Ras*GTP

Die Beladung von Ras und Rap-Proteinen (Rax) mit Nukleotiden erfolgte nach der EDTA-Methode (Feuerstein *et al.*, 1987; Tucker *et al.*, 1986). Magnesium stabilisiert die Bindung von Nukleotiden an Ras und verwandte Proteine. Die Komplexierung der Magnesium-Ionen durch EDTA erhöht daher die Nukleotiddissoziationsrate drastisch. Da Ras und Rap-Proteine nach der Reinigung meist im GDP-gebundenen Zustand vorliegen, im Rahmen dieser Arbeit jedoch die Hydrolyse von GTP zu GDP untersucht wurde, war es notwendig, die zu untersuchenden Proteine mit GTP zu beladen. Durch Zugabe von EDTA (12 mM) in Gegenwart eines Überschusses an GTP (10 bis 100fach) wurde die Austauschreaktion gestartet. Es wurde ein 30 mM Tris/HCl (pH 7,5)-Puffer mit 3 mM DTE verwendet. Nach einstündiger Inkubation bei RT wurde die Austauschreaktion durch Zugabe von MgCl₂ im Überschuß zur EDTA-Konzentration gestoppt. Die Darstellung von Ras*GTP-Proteinen fand in einer einstündigen Reaktion bei RT statt. Rap*GTP-Proteine wurden ÜN bei 4° in EDTA haltigem Puffer inku-

biert. Nach Beendigung der Reaktion schlossen sich zwei Gelfiltrationen über PD10 Säulen (NAP5-Säulen bei kleineren Mengen) an, um das überschüssige Nukleotid zu entfernen. Abschließend wurde die Proteinkonzentration nach der Bradford-Methode, die Nukleotid-Konzentration mittels HPLC bestimmt. Das Verhältnis der Konzentrationen von Nukleotid und Protein gibt Aufschluß über die Qualität des eingesetzten Proteins, da die Nukleotidbindung ein intaktes Protein voraussetzt. Daher wurde für die Berechnung der Proteinkonzentration als Grundlage weiterer Versuche nur die dreifach bestimmte Nukleotidkonzentration verwendet. Bei der Beladung von Rax mit $\gamma^{32}\text{P}$ -GTP wurde zur Vermeidung größerer radioaktiver Abfallmengen zuerst Rax*GTP nach obiger Methode dargestellt. Unmittelbar vor dem radioaktiven Experiment wurde das Rax*GTP mit einem Unterschub an $\gamma^{32}\text{P}$ -GTP (800 Ci/mmol, ICN) und 12 mM EDTA eine halbe Stunde auf Eis inkubiert. Gestoppt wurde die Reaktion wie oben durch Zugabe von MgCl_2 im Überschub zu EDTA. Auf eine weitere Gelfiltration konnte verzichtet werden, da die Konzentration des radioaktiven Nukleotids stets um mindestens eine Größenordnung geringer war als die ursprüngliche GTP-Konzentration.

3.2.2.9 HPLC-Analysen zur Bestimmung von Nukleotidkonzentrationen

HPLC-Analysen wurden zur relativen und absoluten Bestimmung des Nukleotidgehalts von Lösungen eingesetzt. Das Trennprinzip der *reversed-phase* HPLC beruht auf der Wechselwirkung einer polaren, mobilen Phase mit einer unpolaren, stationären Phase, der ODS Hypersil C18 Matrix der Trennsäule. Eventuell in der Probe befindliche Proteine wurden über eine Nucleosil-100-C18 Vorsäule (Bischoff, Leonberg) abgetrennt. Im verwendeten Laufpuffer liegen Proteine denaturiert vor (100 mM Kaliumphosphat; 10 mM Tetrabutylammoniumbromid (TBA); 7,5 % (v/v) Acetonitril). Die Phosphatgruppen der Nukleotide bilden mit den TBA-Ionen Ionenpaare, die ihnen hydrophobe Eigenschaften verleihen. Die hierdurch verlängerten Retentionszeiten erlauben eine Auftrennung von Guanosin und seinen Mono-, Di- und Triphosphaten. Zur Trennung von mant-Nukleotiden wurde ein Puffer mit 25% (v/v) Acetonitril eingesetzt, um die Bindung dieser hydrophoberen Nucleotidspezies an das Säulenmaterial zu schwächen. Die Detektion der Nukleotide erfolgte bei 252 nm im UV-Absorptionsdetektor der Beckman-HPLC-Anlage.

Zur Kalibrierung der HPLC-Messungen wurden Lösungen der Nukleotide verwendet, deren Nukleotidkonzentration zuvor photometrisch bestimmt worden war. Der für die Berechnung

eingesetzte molare Absorptionskoeffizient betrug für unmodifizierte Guaninnukleotide $\epsilon_{252} = 13700 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$, für mant-Nukleotide $\epsilon_{252} = 22600 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$.

3.2.2.10 Aktivkohletest zur Detektion freigesetzten Phosphats

Zur Quantifizierung der GTP-Hydrolysereaktionen kleiner GTPasen wurde der Aktivkohletest eingesetzt. Mit Hilfe dieses Tests kann freigesetztes Phosphat quantitativ nachgewiesen werden. Guaninnukleotide und Proteine werden von Aktivkohle gebunden, freies Phosphat hingegen nicht, da die Kohle in Phosphorsäure aufgeschwemmt wurde. Die Phosphorsäure trägt darüber hinaus zur effektiven sofortigen Denaturierung des Proteins bei, wodurch eine exakte Zeitwertnahme möglich wird. Hierzu werden aus dem Reaktionsansatz, der mit $\gamma^{32}\text{P}$ -GTP beladenes Protein enthält, Aliquots (hier: 5 μl) entnommen und in kalte Aktivkohlesuspension (5 g/0,1 l, 20 mM Phosphorsäure; hier: 395 μl) gegeben. Nach kräftigem Durchmischen werden die Aliquots bei 14.000 rpm in der Tischzentrifuge zentrifugiert und aus dem Überstand Aliquots (hier: 200 μl) entnommen. Diese können direkt (Cherenkov-Strahlung) oder nach Zugabe eines Szintillationscocktails (3 ml; Beckman, Unterschleißheim) im Szintillationszähler (3.2.3.7.1) gemessen werden. Bei der Messung von Hydrolysekinetiken wurde stets Leer- und Totalwert bestimmt und auf die zuvor per HPLC bestimmte Proteinkonzentration bezogen.

3.2.2.11 Nitrocellulose-Filterbindungstest

Eine Alternative zum Aktivkohletest stellt der Nitrocellulose-Filterbindungstest dar (Miller & Weissbach, 1974). Anstelle des freigesetzten Phosphats wird hierbei jedoch die Menge des noch nicht hydrolysierten, an Protein gebundenen $\gamma^{32}\text{P}$ -GTP bestimmt. Mit 20 % MeOH versetztem Waschpuffer (30 mM Tris/HCl pH 7,4; 3 mM DTE, 2 mM MgCl_2) vorinkubierte (30 min) Nitrocellulosefilter (0,2 μm Porengröße) werden auf die Fritten einer Absauganlage (Hölzel, Dorfen) gelegt, vorsichtig angesaugt und erneut mit Waschpuffer überschichtet (1 ml). Aliquots aus dem Reaktionsansatz werden nun auf den Filter gegeben und, nachdem sie kurz mit dem überschichtenden Puffer vermischt wurden, vorsichtig abgesaugt. Die Überschichtung durch Puffer führt zu einer homogenen Verteilung der Proteinlösung auf der Filteroberfläche, was zu einer quantitativen Bindung des Proteins und des von ihm gebundenen Nukleotids führt. Beim Durchsaugen der Lösung, wie auch bei den sich anschließenden Waschschritten (3 x 3 ml), mit denen Reste freien Phosphats und nicht gebundenen GTPs

entfernt werden, sollte darauf geachtet werden, dass stets nur ein minimaler Unterdruck für die Dauer des Durchsaugens angelegt wird. Das am Protein auf dem Filter verbliebene $\gamma^{32}\text{P}$ -GTP wird in 3 ml *Ready-Protein Szintillations-Cocktail* (Beckman, Unterschleißheim) im Szintillationszähler (3.2.3.7.1) oder im *Phospho-Imager* (3.2.3.7.2) gemessen.

3.2.2.12 Synthese von Peptid-Arrays auf Cellulose-Membranen

Umfangreiche Bibliotheken zur systematischen Suche nach Ras-GTPase-aktivierenden Peptidliganden wurden als zweidimensionale Raster (*arrays*) von synthetischen Peptiden sowohl mit definierten als auch zufällig belegten Sequenzpositionen im Labor der Arbeitsgruppe „Molekulare Erkennung“ von Dr. Ronald Frank an der GBF in Braunschweig hergestellt. Diese *arrays* wurden mittels einer automatisierten Peptidsynthese auf Cellulosemembranen nach der sogenannten SPOT-Synthese durchgeführt (Frank & Overwin, 1996). Dabei finden die Kopplungsreaktionen der Aminosäurebausteine zum Aufbau der Peptidketten in kleinen Lösungsmittelflecken auf reinem Cellulose-Chromatografiepapier statt. Dies hat den Vorteil, dass auf kleiner Fläche in direkter Nachbarschaft unterschiedliche Peptide durch paralleles Auftüpfeln der entsprechenden Reaktionslösungen synthetisiert, und alle nicht individuellen Schritte (Waschen etc.) bequem in einer Wanne durchgeführt werden können.

Vor Beginn der eigentlichen Synthese werden Hydroxylgruppen der Cellulose flächendeckend mit Anker-Molekülen substituiert, die die Ausgangspunkte für die weitere Peptidsynthese darstellen. Im Falle der fixierten Peptide kommt ein ω -Amino-PEG zum Einsatz. Dessen etwa 20 Glycol-Einheiten sorgen für eine größere Distanz zwischen Peptid und Cellulosematrix und dadurch für mehr Flexibilität sowie bessere Zugänglichkeit für biologische Makromoleküle, als dies bei direkt an die Matrix gekoppelten Peptiden der Fall wäre. Die Beladung mit Aminogruppen beträgt etwa 400 nmol/cm². Um bei leicht basischem pH ablösbare Peptide zu erhalten, ist β -Alanin als Linker mit der Matrix verestert. Die Beladung mit Aminogruppen des β -Alanins beträgt ebenfalls etwa 400 nmol/cm².

Die Peptidsynthese wird dann nach der Fmoc/tBu-Methode (9-Fluorenylmethyloxycarbonyl/tert-Butyl) durchgeführt (Fields & Noble, 1990). Die α -Aminofunktionen der Aminosäurebausteine und damit der wachsenden Peptidketten sind durch die Fmoc-Schutzgruppe vor unerwünschten Kreuzreaktionen geschützt, während die vorhandenen reaktiven Aminosäureseitenketten durch Schutzgruppen vom *tert*-Butyl-Typ geschützt sind.

Die Abspaltung von Fmoc-Schutzgruppen erfolgt über einen basenkatalysierten Eliminierungsmechanismus unter Einsatz von Piperidin in DMF, wohingegen die *tert*-Butyl-Schutzgruppen durch Behandlung mit Trifluoressigsäure abgespalten werden.

Nachdem die gesamte Papieroberfläche mit Anker-Molekülen substituiert ist¹⁵, werden im nächsten Schritt die Bereiche der parallel zu synthetisierenden Peptide - die sogenannten *spots* - voneinander abgegrenzt. Dies geschieht mit Hilfe eines umgebauten Pipettierautomaten, dem ABIMED SPOT-Synthesizers. Er generiert zum Beispiel 425 *spots* auf einem 8 x 12 cm Cellulosefilter. Nach Entfernen der α -Amino-Schutzgruppen durch Piperidinbehandlung (20% in DMF) werden hierzu 0,1 μ l große Tropfen einer 0,2 M Lösung von Fmoc- β Alaninhydroxybenzotriazolester in N-Methylpyrrolidinon (NMP) im Abstand von 4 mm auf die Matrix pipettiert. Die leicht verlaufenden Tropfen definieren die Größe der Flecken (*spots*) (zirka 3 mm Durchmesser). Nach Ende der Reaktion werden die verbliebenen Aminofunktionen der Anker zwischen den *spots* mit Essigsäureanhydrid (2% (w/v) in DMF) acetyliert, um sicherzustellen, dass die Peptidsynthese nur an den *spots* ablaufen kann. Diese sogenannte *Capping*-Reaktion findet ÜN bei RT statt und wird auch jeweils nach den einzelnen Aminosäurekopplungen während der Peptidsynthese für jeweils 10 min wiederholt. Die Fmoc-Schutzgruppen auf den nun gebildeten β Ala- β Ala *spots* werden mittels 20% Piperidin in DMF abgespalten und die entstandenen freien Aminogruppen der *spots* durch Behandlung des Filters mit Bromphenolblau BPB (1% (w/v) in DMF) angefärbt.

Bei den jetzt folgenden Aminosäurekopplungsschritten kann nun ein größeres Volumen (0,15 μ l) einer 0,2 M Lösung der jeweiligen Aminosäure oder des Aminosäuregemisches eingesetzt werden, um sicherzustellen, dass der *spot* auch vollständig bedeckt ist. Die geschützten Aminosäurebausteine werden vor der Synthese mit Hydroxybenzotriazol (HOBt) (4,7 mg/100 μ l) in NMP gelöst. Unmittelbar vor dem Start der Reaktion wird als Aktivator Diisopropylcarbodiimid (DICD) (4 μ l/100 μ l) zugesetzt, welcher die Aminosäuren in die aktivierten HOBt-Ester überführt. Nach Beendigung der Kopplungsreaktion, deren Verlauf über eine Abnahme der Blaufärbung (Verbrauch freier Aminogruppen) verfolgt werden kann, folgen mehrere Waschschritte zunächst in *Capping*-Lösung und dann in DMF. Die Abspaltung der terminalen Fmoc-Gruppen mit Piperidin/DMF und das Anfärben der terminalen

¹⁵ Dies entspricht zirka einer Konzentration von 0,2 bis 0,4 μ mol Anker pro cm^2 .

Aminogruppen mit Bromphenolblau-Lösung vervollständigen den Reaktionscyclus für eine Aminosäureaddition.

Dieser Cyclus wird so oft durchlaufen, bis alle Peptide ihre endgültige Länge erreicht haben. Es folgt als letzter Schritt die Abspaltung der Schutzgruppen der Seitenketten. Dies geschieht durch zwei einstündige Inkubationen bei RT in 50% Dichlormethan, 3% TIBS, 50% TFA, 2% H₂O.

3.2.2.12.1 Zyklisierte Peptide

Um Peptide zu erhalten, die hinsichtlich der Freiheitsgrade ihrer Konformationen eingeschränkt sind, wurden die Peptid-Bibliotheken parallel auch in zyklisiert löslicher und zyklisiert gebundener Form synthetisiert. Die Herstellung zyklisierter Peptide unterscheidet sich lediglich im Anfangs- und im Endschrift von der oben beschriebenen Prozedur. Als erste Aminosäure, die an den Anker gekoppelt wird, kommt Fmoc-Lys(MMt)-OH anstelle von Fmoc-βAlanin zum Einsatz. Im letzten Schritt der Synthese wird die MMt-Schutzgruppe mild sauer abgespalten. Damit kann die nun freie Aminogruppe des Lysins mit der terminalen Carboxylgruppe des Peptids über eine Succinatbrücke verknüpft werden und somit den Ringschluß vollziehen.

3.2.2.13 Test von Peptidbibliotheken auf Ras-GAP Aktivität

Zum Test auf Ras-GAP-Aktivität wurden zunächst die einzelnen Bibliotheken auseinandergeschnitten und auf Mikrotiterplatten verteilt. Um unspezifische Anlagerung von Proteinen sowohl an die Cellulosematrix als auch an die Wände der Mikrotiterplatten zu verhindern, schloss sich eine einstündige Inkubation mit BSA (1 g auf 100 ml H₂O) bei RT an.

Der nun folgende Test ist im Prinzip ein Filterbindungstest. Zu bestimmten Zeitwerten werden dem Reaktionsansatz, der neben den Peptiden mit γ -³²P GTP beladenes Ras in Tris/HCl pH 7,6; 3 mM DTE und 2 mM MgCl₂ enthält, Aliquots entnommen und durch Nitrocellulosemembranen filtriert. Die auf der Membran verbliebene Menge an Radioaktivität zeigt an, wieviel GTP noch nicht hydrolysiert wurde. Aus praktischen Gründen läßt sich der Test jedoch nicht wie unter 3.2.2.11 beschrieben durchführen, da für jede der 420 Bibliotheken (jeweils cyclisiert und linear) eine einzelne Versuchsreihe durchzuführen wäre. Deshalb bot sich die Filtration mittels einer 96-well Dot-Blot-Apparatur (BioRad, Hercules, USA) an. Die Nitrocellulosefilter mit 96 parallelen Zeitwerten wurden mit dem *Phospho-Imager* (3.2.3.7.2)

ausgewertet. Als interner Standard wurde eine Reihe der Mikrotiterplatten nicht mit Peptiden versehen, sondern mit gleich großen Stücken desselben Papiers. Den internen Kontrollen wurde zum Teil vor der Zugabe des Ras*GTP γ ³²P, wodurch die Reaktionen jeweils gestartet wurden, in abnehmenden Konzentrationen das RasGAP-Protein NF1 zugesetzt. Das Phospho-Imager Autoradiogramm (Abbildung 4-3) zeigt den Aufbau einer Testplatte, sowie die gewonnenen Primärdaten. Diese wurden mit Hilfe des Programms *Molecular Imager* (BioRad, Hercules, USA) ausgewertet. Dabei wurden Bereiche gleicher Größe pro *spot* ausgewählt, um die sogenannten *volume counts*, das heißt die in einem bestimmten Areal gemessenen Zerfälle, zu bestimmen. Eine Abnahme der *volume counts* im Vergleich mit den Leerwerten ohne Ras-GAP und ohne Peptide, zeigt eine GTPase Beschleunigung an.

Der Ablauf eines Experiments im Detail: Mit nicht-radioaktivem GTP beladenes Ras wurde wie beschrieben mit γ -³²P GTP ausgetauscht. Die Ras*GTP Konzentrationen betragen hierbei zwischen 100 und 150 μ M. Pro Mikrotiterplatte wurden 5 ml radioaktiv markiertes Ras-GTP benötigt. Die einzelnen Vertiefungen (*wells*) der Mikrotiterplatte, die alle entweder Peptidbibliotheken oder leere Papierstücke enthielten, werden nun mit einer Zwölfkanalpipette je mit 50 μ l Puffer befüllt (30 mM Tris/HCl pH 7,6; 2 mM MgCl₂; 0,1 g/l BSA; 2 mM DTE). Die Kontrollansätze enthielten NF1 in Konzentrationen von 1 μ M bis 1 fM. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 50 μ l des frischen Austausches gestartet. Die Platten wurden während der Reaktion leicht geschüttelt. Bei Verwendung von wt-Ras wurden zu den Zeitpunkten t = 0, 10, 30 und 60 min 20 μ l Aliquots entnommen und in die Öffnungen der Dot-Blot-Apparatur, die pro Öffnung 80 μ l Puffer enthielt, pipettiert¹⁶. Diese Maßnahme diente der gleichmäßigen Beladung der in der Apparatur befindlichen Membran. Diese Membran (Nitrocellulose 0,2 μ M Porengröße, Schleicher und Schuell) wurde vor dem Einspannen in die Apparatur eine halbe Stunde in Puffer unter Zugabe von 20% (v/v) Methanol geschwenkt. Die zwischen zwei Whatmanpapieren oberflächlich getrocknete Membran wurde dann luftblasenfrei auf die dichtende Gummimatte der Dot-Blot-Apparatur gelegt. Unter leichtem anliegendem Vakuum, das durch eine Wasserstrahlpumpe erzeugt wurde, wurde die Apparatur nun zusammengeschraubt. Durch die einzelnen *wells* wurden dreimal je 100 μ l Puffer gesaugt, um die Membran in den *wells* vollständig zu rehydrieren. Abschließend wurden die

¹⁶ Für den Test mit der onkogenen Ras-Variante G12V wurden die Inkubationszeiten verlängert und die Zeitwerte zu den Zeitpunkten 0, 3, 6, 12 h genommen.

oben erwähnten 80 µl Puffer in die *wells* der nun belüfteten Apparatur gefüllt. Nachdem alle parallelen Zeitwerte eingefüllt waren (die Zeitwertnahme sollte in den gleichen zeitlichen Abständen zwischen den einzelnen Reihen erfolgen wie der Start der Reaktion), wurde das Vakuum vorsichtig wieder angelegt und nach vollständigem Durchsaugen aller Proben sofort wieder entfernt. Dreimaliges Waschen mit je 150 µl kaltem Puffer schloss sich an. Unter leichtem Vakuum wurde die Membran entnommen und auf vorbereiteten Whatmanpapieren unter einer Wärmelampe getrocknet. Nach vollständiger Trocknung wurden die Filter auf dem Expositionstablett des *Phospho-Imagers* befestigt, wie beschrieben (3.2.3.7.2) exponiert und anschließend mit der *Molecular Analyst Software* ausgewertet.

In diesem Test durch verstärkte Hydrolyseaktivität auffallende Bibliotheken wurden einem weiteren Test unterzogen. Dazu wurde die entsprechende, parallel synthetisierte Peptidbibliothek mit ablösbaren Peptiden getestet. Hierzu wurden die Peptide ÜN bei RT in 50 µl leicht basischem Puffer (50 mM Tris/HCl pH 8,0, 1 g/l BSA, 3 mM DTE) abgelöst. Von dieser Lösung wurden drei verschiedene Mengen (5, 15, 30 µl) in einen Ansatz mit Ras*GTP (100 µl Endvolumen, 100 µM Endkonzentration) gegeben. Zu den gleichen Zeitwerten wie bei den Paralleltests aus der Mikrotiterplatte werden Aliquots (15 µl) entnommen und einem herkömmlichen Nitrocellulosebindungstest unterzogen (3.2.2.11).

3.2.2.14 Western Blot

Die Übertragung von Proteinen aus Gelen auf Membranen nennt man Western-Blot. Das membrangebundene Protein kann einem Antikörpertest oder auch einer Sequenzierung unterzogen werden. Die Übertragung findet in einer Elektroblo-Kammer von BioRad (Mini-Protean 2) in Transferpuffer (25 mM Tris, 192 mM Glycin, 10% MeOH) bei konstanter Stromstärke (350 mA) in zirka 70 min bei 4° C statt. Zuvor wurde die Membran (PVDF oder Nitrocellulose) in Methanol geschwenkt, auf das Gel luftblasenfrei aufgelegt, und mit diesem zwischen zwei mit Transfer-Puffer durchtränkte Whatman-Papiere gelegt. Dieses "*Sandwich*" wurde nun zwischen zwei Schwamm-Matten gelegt und so in die Elektroblo-Kammer eingespannt, dass sich die Membran auf Seiten der Anode befand, da die negativ maskierten Proteine dorthin wandern. Nach Abschluß des Blot-Vorgangs konnte die Membran zur Sichtbarmachung der Proteine mit Ponceau S (Sigma, Deisenhofen) angefärbt werden.

3.2.2.15 Proteinnachweis mit Antikörpern

Auf Membranen transferierte Proteine sind für Antikörper leicht zugänglich und lassen sich daher - sofern ein spezifischer Antikörper existiert - leicht identifizieren. Hierzu wurde die Membran zunächst in 10 ml Milchpulverlösung für zirka 60 min geschwenkt (5 g Milchpulver pro Liter 1 x PBS). Dies dient der Sättigung der Membran mit Protein und verhindert somit eine unspezifische Anlagerung des Antikörpers an die Membran. Nach dreimaligem Waschen der Membran mit PBS-Puffer bei RT wurde der erste Antikörper zugesetzt (in dieser Arbeit: Rap1A/Krev1 oder RapGAP *polyclonal rabbit IgG*, jew. auf 2 µg/ml verdünnt in 5 ml PBS). Mit diesem wurde die Membran zirka 30 min bei RT bei leichter Bewegung inkubiert. Drei Waschschrte mit PBS schlossen sich an, um nicht gebundenen Antikörper zu entfernen. Nun wurde der zweite - mit Peroxidase konjugierte Antikörper zugesetzt, der spezifisch an den ersten bindet (*polyclonal anti-rabbit IgG*, ebenfalls auf 2 µg/ml verdünnt) und die Inkubation analog zur ersten durchgeführt. Nach den Waschschrten wurden die gebundenen Antikörper mit Hilfe der Peroxidase-Reaktion nachgewiesen. Hierzu wurde die Membran mit Chlornaphtol in PBS überschichtet. Zugabe von H₂O₂ startet die Reaktion, bei der das Chlornaphtol reduziert wird, und die Stellen, an denen sich das nachzuweisende Protein befindet, lila anfärbt.

3.2.2.16 Sequenzierung von Proteinen

Zur direkten Analyse des Anfangs der Aminosäuresequenz eines Proteins wurde nach einer SDS-PAGE (3.2.2.5) mit dem fraglichen Protein ein Transfer auf eine PVDF-Membran mittels Western Blot (3.2.2.14) durchgeführt. Der Transferpuffer enthielt hierbei Tricin anstelle von Glycin, da letzteres die Detektion von Glycin als Bestandteil des Proteins behindern könnte. Die Membran wurde mit Ponceau S (Sigma, Deisenhofen) angefärbt und mit Wasser entfärbt. Die hierdurch sichtbar gewordenen Banden wurden ausgeschnitten und standen für die Sequenzierung zur Verfügung. Der automatische Edman-Abbau zur N-terminalen Sequenzierung von Proteinen wurde von der zentralen Einheit Synthese und Sequenzierung des Max-Planck-Institutes für molekulare Physiologie unter Verwendung eines ABI 473A *Proteinsequenzer* (Applied Biosystems Inc.) durchgeführt.

3.2.2.17 Markierung von Proteinen mit Fluorophoren

Um ein Fluoreszenzsignal für die Interaktion von Rap-Proteinen mit Effektoren und GAP-Proteinen zu erhalten, wurden die Proteine mit dem Haloalkylderivat 1,5-IAEDANS (5-(((2-Iodoacetyl)amino)ethyl)amino)naphthalen-1-sulfonsäure) markiert, das kovalent an die Sulfhydrylgruppe von Cysteinen bindet. Um eine spezifische Markierung zu erhalten, wurden durch gerichtete Mutagenese (3.2.1.7) Varianten von Rap1B erzeugt, die an den Positionen 86 oder 91 Cysteine tragen. Ihre weiteren für Lösungsmittel zugänglichen Cysteine wurden durch Serine ersetzt. Als Fluoreszenzmarkierung diente, ein Haloalkylderivat. Die Markierungsreaktion wurde ÜN bei 4°C und vollständiger Dunkelheit in entgastem Puffer (30 mM Tris/HCl pH 7,4; 2 mM MgCl₂, 3 mM Ascorbat), einer Proteinkonzentration von 100 µM und einem 20fachen Überschuß an 1,5-IAEDANS durchgeführt. Anschließend wurde das überschüssige Fluorophor durch Zugabe von 5 mM DTE oxidiert und über zwei mit 30 mM Tris, 5 mM DTE, 2 mM MgCl₂ äquilibrierte PD10-Säulen abgetrennt.

3.2.3 Biophysikalische Methoden

3.2.3.1 Isotherme Titrationsmikrokalorimetrie

Die isotherme Titrationskalorimetrie (ITC) dient der Bestimmung der bei der Assoziation zweier Moleküle freiwerdenden oder benötigten Energie. Mit dem isothermen Titrationsmikrokalorimeter (MicroCal, Northhampton, MA, USA) läßt sich die Änderung der Enthalpie ΔH bei der Interaktion von Proteinen bestimmen. Eine Meßzelle im Innern des Gerätes wird hierzu mit der Lösung eines Proteins befüllt, das zweite Protein wird durch einen Pipettierautomaten zutitriert. Nach jedem Titrationsschritt stellt die Regelungsautomatik des Kalorimeters die Temperaturdifferenz zwischen der Meßzelle und einer wassergefüllten Referenzzelle wieder auf Null. Gemessen wird die Leistung, die nötig ist, den Temperaturgradienten auszugleichen ($P = U \cdot I$ und $P = E/t$). Trägt man die Leistung gegen die Zeit auf, so gibt die Fläche unter dem Graphen die in diesem Zeitraum als Wärme abgegebene Energie wieder. Wird diese Wärme gegen das molare Verhältnis der beteiligten Proteine aufgetragen, erhält man eine Kurve, aus deren Krümmung die Affinitätskonstante K_A berechnet werden kann.

Für die Messungen wurden die Proteine (Rap1GAPv und Rap1A*GppNHp) zunächst gegen denselben Puffer dialysiert, um Mischungsenthalpien gering zu halten (30 mM Tris/HCl, pH 7,6; 3 mM DTE; 50 mM KCl; 2 mM MgCl₂). In der Meßzelle wurde eine 31,2 µM RapGAPv

Lösung vorgelegt, eine 346 μM Rap1A*GppNHp-Lösung zutitriert. Die Temperatur während der Messungen betrug 15° C. Ausgewertet wurden die Messungen mit dem Programm *Origin for ITC 3.1* von MicroCal.

3.2.3.2 *Differential Scanning Calorimetry*

Mit der *Differential Scanning Calorimetry* (DSC) lassen sich die thermischen Entfaltungen von Proteinen untersuchen. Hierzu wird das zu untersuchende Protein in eine heizbare Messzelle gefüllt. Parallel mit dieser wird eine Referenzzelle, die lediglich mit Puffer gefüllt ist, erwärmt. Aus der Differenz beider Heizleistungskurven (abzüglich einer Leermessung Puffer gegen Puffer) läßt sich die Wärmekapazität pro Mol errechnen, die dann gegen die Heiztemperatur aufgetragen wird. So erhält man eine Schmelzkurve des Proteins, die Aussagen über die Stabilität seiner Faltung zuläßt. Bei einer rein thermodynamisch kontrollierten Faltung sollte das Ergebnis reversibel sein, so dass sich nach Abkühlung bei einer weiteren Erwärmungsrunde der gleiche Kurvenverlauf zeigt. Die Auswertung der Messungen erfolgte mit dem Programm *Origin for DSC 4.1* von MicroCal.

Für die Messungen wurde 8,8 μM RapGAPv in 20 mM Glycin, 1 mM Mercaptoethanol, 100 mM NaCl bei pH 9,5 eingesetzt. Die Pufferbedingungen, unter denen das Protein die maximale thermische Stabilität zeigt, wurden in Vorversuchen ermittelt.

3.2.3.3 *Bestimmung von Bindungsparametern mittels Oberflächenplasmonresonanz*

Das BIAcore-System (BIAcore AB, Uppsala, Schweden) macht sich das physikalische Phänomen der Oberflächenplasmonresonanz zu Nutze, um Bindung von Liganden an Moleküle zu messen, die auf der Oberfläche eines Sensorchips immobilisiert wurden. Der Sensorchip stellt eine Wand der Flußzelle dar, durch die eine Lösung des Liganden geleitet wird. Er besteht aus einem Glasplättchen, das einseitig mit einem dünnen Goldfilm bedampft wurde, auf dem wiederum eine Matrix liegt, in der Moleküle immobilisiert werden können. Auf der der Flußzelle abgewandten Seite befindet sich ein Prisma, durch das polarisiertes Licht eines Lasers auf den Sensorchip kegelförmig eingestrahlt wird. Dieses wird zum Teil an der Grenzschicht zwischen Glasschicht und Goldfilm totalreflektiert. Ein Teil des Lichtes dringt jedoch als sogenannte evaneszente Welle in die Goldschicht ein. Dort interagiert es mit dem Elektronengas (Plasmon) der Goldschicht. Dieses Phänomen tritt allerdings nur unter bestimmten Lichteinfallswinkeln auf, die von der optischen Dichte des Mediums oberhalb der

Goldschicht, und damit von der Menge gebundener Moleküle, abhängig sind. Tritt Resonanz auf, so ergibt sich im reflektierten Licht ein Intensitätsminimum, das mit Hilfe eines *Diode-Array*-Detektors registriert wird. Abkürzend wird dieser Winkel auch SPR-Winkel genannt (*Surface Plasmon Resonance*). Das BIAcore-Gerät mißt diesen Winkel in *resonance units* (RU), wobei eine Winkeländerung von 360 Winkelsekunden 1000 RU und einer Massenänderung in der Matrix von 1 ng/mm² entspricht. Die Messungen dieser Arbeit fanden bei 20°C statt. Als Puffer diente der Biacore-Messpuffer (10 mM HEPES, 5 mM MgCl₂, 0,0005% (v/v) Igepal CA-630, pH 7,4). Der eingesetzte Messchip besaß eine Polysaccharidmatrix mit kovalent verknüpften anti-GST Antikörpern (Kuhlmann *et al.*, 1997; O'Shannessy, 1990).

3.2.3.4 *Circulardichroismus-Spektroskopie*

Sekundärstrukturen von Proteinen lassen sich aus dem Vergleich von UV-Circulardichroismusspektren mit Referenzspektren bekannter Sekundärstruktur prognostizieren. In der CD-Spektroskopie wird die Differenz der Absorptionskoeffizienten für links (ϵ_L) und rechts (ϵ_R) zirkular polarisiertes Licht in einem Wellenlängenbereich im allgemeinen von 190 bis 250 nm gemessen und als Elliptizität θ angegeben. In einem typischen CD-Spektrum wird die Elliptizität gegen die Wellenlänge aufgetragen. Die Ursache für die Elliptizität liegt in der Chiralität der untersuchten Strukturen, vor allem der Carbonylgruppen der Amidbindungen, die im angegebenen Wellenlängenbereich bei unsymmetrischer Substitution über zwei Absorptionsübergänge verfügen. In dieser Arbeit wurde die CD-Spektroskopie vor allem eingesetzt, um nachzuweisen, dass sich die Sekundärstruktur von Proteinvarianten durch die Substitution einzelner Aminosäuren gegenüber dem Originalprotein nicht verändert hat. Die CD-Spektren wurden mit dem JASCO 710 CD-Spektrometer aufgenommen. Der untersuchte Wellenlängenbereich umfasste 195 bis 240 nm (Fern-UV). Die *Scan*-Geschwindigkeit betrug 50 nm/min, die Bandbreite 1 nm, die Auflösung 0,2 nm, die Empfindlichkeit 50 mdeg, die Zeitkonstante 1s und die Schichtdicke der Quarzküvette 0,1 cm. Die Auswertung der Daten erfolgte mittels der JASCO-Programme *Standard Analysis* und *Secondary Structure Estimation*.

3.2.3.5 *Fluoreszenzdetektion*

Fallen durch Licht angeregte Elektronen in ihr energetisches Ausgangsniveau zurück, so können sie die Anregungsenergie in Form von Wärmestrahlung oder Licht wieder abgeben.

Bei der Emission von Licht wird zwischen Fluoreszenz und Phosphoreszenz unterschieden. Im Unterschied zur Phosphoreszenz ist die Fluoreszenz durch einen wesentlich schnelleren Übergang des Elektrons in den Grundzustand (10^{-9} bis 10^{-7} s) gekennzeichnet. Da bei diesem Vorgang nicht die gesamte Anregungsenergie in Form von Licht emittiert wird, ist das emittierte Licht im Vergleich zum anregenden Licht langwelliger (Rotverschiebung). Die Fluoreszenzintensität ist von der Umgebung des Fluorophors abhängig. Daher bietet die Fluoreszenzmessung eine gute Möglichkeit, die Interaktion zweier Moleküle zu beobachten, sofern zumindest einer der beiden Interaktionspartner ein detektierbares Fluoreszenzsignal emittiert und sich die Umgebung des Fluorophors durch die Interaktion verändert. Im Rahmen dieser Arbeit wurden sowohl fluoreszierende Nukleotidanaloga als auch mit Fluorophoren modifizierte Proteine zur Beobachtung von Protein-Protein-Wechselwirkungen eingesetzt. Die Messungen wurden in einem Fluoromax II Spectrofluorometer (SPEX Instruments SA, Grasbrunn) in $0,5 \times 1 \text{ cm}^2$ Küvetten bei 25°C durchgeführt, das einfache Fluoreszenzmessungen und Anisotropiemessungen ermöglicht.

Zur Detektion der Fluoreszenz IAEDANS-markierter Proteine wurden zunächst Exzitations- und Emissionsspektren aufgenommen, um die optimalen Anregungs- und Detektionswellenlängen für spätere Interaktionsstudien zu ermitteln. Bei der für ungebundenes IAEDANS optimalen Anregungswellenlänge von 360 nm wurde ein Emissionsspektrum im Bereich von 400 bis 600 nm aufgenommen. Die Spalte waren dabei 2 nm (Exzitation) und 4 nm (Emission) geöffnet. Im Anschluss wurde der Detektor auf die zuvor bestimmte Wellenlänge, bei der maximale Emission beobachtet werden konnte, eingestellt und die Exzitationswellenlänge in einem Bereich von 300 bis 400 nm variiert. Interaktionsmessungen wurden mit den so ermittelten Exzitations- und Emissionsbedingungen durchgeführt.

3.2.3.6 Massenspektrometrie

Das Molekulargewicht von Proteinen und deren Varianten wurde mittels Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometrie (ESI-MS) bestimmt. In der Massenspektrometrie wird durch geeignete Detektoren (hier: eine heliumgefüllte Ionenfalle) das Verhältnis der Massen- zur Ladungszahl (m/z) von Ionen bestimmt.

Das Ionisierungsprinzip der ESI-MS besteht in der Desolvatisierung gelöster Ionen. Hierzu wird eine möglichst salzfreie Proteinprobe in saurem, leicht flüchtigem Puffer verdünnt und in eine goldbeschichtete Mikroglasskapillare gegeben, die vor der Öffnung des Massenspektro-

eters plaziert wird. Die Kapillare dient als Anode, die Öffnung der Elektrosprayapparatur vor dem eigentlichen Massenspektrometer als Kathode. Diese Vorrichtung erzeugt winzige Tröpfchen, die bei schnell verdampfendem Lösungsmittel eine so hohe Ladungsdichte erreichen, dass sie zerplatzen (Coulomb-Explosionen). Letztlich lassen sich bei entsprechend geringer Konzentration an Makromolekülen und vollständiger Verdampfung des Lösungsmittels durch Erhitzung einzelne ionisierte Makromoleküle darstellen, die vom Hochvakuum im Spektrometer eingesogen werden. Dort werden sie von elektromagnetischen Linsen fokussiert und in die Ionenfalle geleitet, wo sie von Heliumgas abgebremst werden. Die abgebremsten Ionen werden dann mittels eines Quadrupolfeldes für kurze Zeit (einige Millisekunden) in der Falle akkumuliert. Dabei nehmen sie Resonanzenergie auf und werden aus der Falle zum Detektor geschleudert. Bei der Messung von Protein-Ionen detektiert man eine Serie von Ionensignalen, die sich bei gleicher Masse um meist eine Ladung unterscheiden. Mit Hilfe eines Dekonvolutionsalgorithmus wird hieraus ein Massenspektrum errechnet, bei dem die Ereignishäufigkeit gegen die Masse aufgetragen ist. Für die Molekulargewichtsbestimmungen in dieser Arbeit wurde das LCQ-Massenspektrometer der Firma Finnigan (Bremen) verwendet. Dabei kamen zwei Formen der Elektrospray-Ionisation zum Einsatz: zum einen die Nano-Elektrospray-Technik, bei der manuell jeweils eine goldbeschichtete Glaskapillare mit der Probe beschickt wurde, und die Mikro-Elektrospray-Technik, bei der die Proben kontinuierlich durch eine Stahlkapillare zum Massenanalysator geleitet werden. Für eine Messung reichen bei beiden Techniken 10 µl einer 10 µM salzfreien Proteinlösung in 50% (v/v) Methanol und 5% (v/v) Ameisensäure.

3.2.3.7 Detektion radioaktiver Strahlung

3.2.3.7.1 Szintillationszählung

Die Szintillationszählung stellt eine indirekte Methode zur quantitativen Bestimmung von β -Strahlern dar. Die radioaktive Strahlung regt hierbei zunächst Lösungsmittelmoleküle (Anisol, Xylol oder Toluol) an, die diese Anregungsenergie an Fluorophore weiterleiten. Um den maximalen Empfindlichkeitsbereich von Photomultipliern auszunutzen, wird eine Mischung von primären (2,5-Di-phenyloxazol = PPO, λ_{\max} = 380 nm) und sekundären Fluorophoren (1,4-Bis-(5-phenyloxazolyl)-benzol POPOP, λ_{\max} = 420 nm) verwandt. Die Messungen wurden in einem Beckman Szintillationszähler LS 6500 mit Ready-Protein-Liquid-Szintilla-

tionscocktail (Beckman, Unterschleißheim) durchgeführt. Letzterer verfügt über den Vorteil, dank eines Seifenzusatzes auch wäßrige Proben bis zu 20% seines Volumens emulgieren zu können, so dass eine langwierige vollständige Trocknung der zu messenden Filter unterbleiben konnte.

3.2.3.7.2 Phospho-Imaging

Eine bildgebende, semiquantitative Methode zur Detektion von Radioaktivität stellt das *Phospho-Imaging* dar, die als moderne Variante der klassischen Autoradiographie gelten kann. Ihre Vorteile sind eine größere Empfindlichkeit und ein größerer Spielraum, innerhalb dessen das Verhältnis von ausgesandter und detektierter Strahlung linear ist. Darüberhinaus entfällt die gesamte Photo-Nasschemie, da die zur Detektion eingesetzten Platten mit Hilfe eines Lasers ausgewertet und anschließend durch Bestrahlung reaktiviert werden können. Wie bei der Autoradiographie werden mit dem *Phospho-Imaging*-Verfahren Gele, Blots, DC-Chromatogramme oder Filter ausgewertet. Bei dem hier eingesetzten Gerät der Firma Biorad (*Molecular Imager GS-525*) werden die flachen Proben auf einer Schaumstoffplatte befestigt und gegen die lichtdicht in die Expositionsapparatur eingebrachte *Imaging*-Platte gedrückt. Die Platte besteht aus einer Strontiumsulfid-Matrix, die mit Cer und Samarium dotiert ist. Empfängt diese Platte ein emittiertes β -Teilchen oder ein chemilumineszentes Photon, so findet eine Redox-Reaktion zwischen Cer und Samarium statt, bei der das Samarium reduziert wird. Nach Beendigung der Exposition (im Durchschnitt wurde bei den Experimenten dieser Arbeit eine halbe Stunde exponiert) wird die *Imaging*-Platte wiederum in einem lichtdichten Behälter in ein Lesegerät überführt, in der ein pulsierender Infrarotlaser der Wellenlänge 910 nm die Platte zeilenweise bestrahlt. Dadurch wird die Redoxreaktion umgekehrt, die Elektronen fallen in den Grundzustand zurück und entsenden dabei Photonen der Wellenlänge 525 nm, die mit einem Photomultiplier gezählt werden. Nach Abschluß des Auslesens der Platte kann das Bild mit Bildbearbeitungssoftware (*Molecular Analyst*, BioRad, Hercules, USA) densitrometrisch ausgewertet werden. Die *Imaging*-Platte wird für einige Stunden mit Infrarot-Licht bestrahlt und somit vollständig reaktiviert.

4 Ergebnisse


4.1 Entwicklung und Test eines Verfahrens zur Detektion eines Nonapeptids mit GTPase-aktivierender Funktion

Die bedeutende Rolle, die onkogene Varianten von Ras bei der Entstehung von Tumoren einnehmen, machen Ras zu einem interessanten Objekt für die Entwicklung von Wirkstoffen (*drug design*), die sich direkt an der atomaren Struktur des Protein orientiert (1.3.5). Die genaue Kenntnis der molekularen Defekte – Mutationen in den Codons für AS 12 und 61 – und ihrer direkten Auswirkungen – Verhinderung einer Stabilisierung des Übergangszustandes der GTP-Hydrolyse durch RasGAP und die fehlende Stabilisierung des angreifenden Nukleophils (1.3.4) – eröffnet die Möglichkeit, einen Wirkstoff zu entwerfen, der diese Defekte von onkogenem Ras *in situ* behebt.

Da sich der Entwurf eines Wirkstoffs *de novo* aufgrund noch zu geringer Kenntnisse der Protein-Ligand-Wechselwirkungen schwierig gestaltet, ist es sinnvoll, zunächst mit der Durchmusterung (*screening*) von Substanzbibliotheken zu beginnen, um aus diesen eine Leitsubstanz für die weiteren Entwicklungsstufen des Wirkstoff herauszufiltern. Die Verwendung einer Bibliothek aus Peptiden bietet sich an, da so auf einfache Weise eine große Anzahl unterschiedlicher Verbindungen herzustellen ist. Kleine Peptide aus wenigen Aminosäuren (bis zu 20 AS) besitzen keine rigiden Strukturen, was die Ableitung der jeweils aktiven und/oder bindenden Konformation erschwert, und damit ihre Funktion als Leitstrukturen beeinträchtigt. Doch verfügen sie über die gleichen chemisch aktiven Seitenketten wie Proteine und können analog zu AS-Sequenzmotiven von Proteinen synthetisiert werden. Darüberhinaus bietet ihre Flexibilität den Vorteil, eine Bindung nach dem *induced-fit*-Prinzip zu ermöglichen.

Der Entwurf des Grundgerüsts der im Rahmen dieser Arbeit hergestellten Peptid-Bibliothek, wurde anhand der Kristallstruktur von RasGAP und Ras*GDP*AlF₃ durchgeführt (Scheffzek *et al*, 1997). Mit in die Überlegungen einbezogen wurde ein Vergleich der verfügbaren RasGAP-Sequenzen aus verschiedenen Organismen (Abbildung 4-1). Die Konsensussequenz der Argininfingerregion der verschiedenen GAP lautet TxFRGNSLA. Ein probeweise hergestelltes lösliches Peptid mit der AS-Konsensussequenz des Argininfingers zeigte keinen GTPase stimulierenden Effekt an Ras*GTP. Getestet wurden 0,1 bis 1 µM des Peptids, die

mit 1 μ M Ras*GTP bei 37°C über eine Dauer von 20 min inkubiert wurden. Der Verlauf der Hydrolysereaktion wurde über HPLC-Analyse (3.2.2.9) verfolgt. Im Vergleich zu einer Messung der intrinsischen GTPase-Reaktion von Ras unter den gleichen Bedingungen zeigte das Peptid keinen GTPase stimulierenden Effekt (Daten nicht gezeigt). Ein Argininfingerpeptid muss demnach über eine andere Aminosäurenkomposition verfügen als der Argininfinger eines GAP. Die Konsensussequenz wurde daher nicht vollständig für den Entwurf der Peptidbibliotheken übernommen.



hsNF1	TL FRGNSLA	794
hsp120^{GAP}	TL FRATTLA	1281
rnGAP1^m	AI FRGNSLA	401
mmGAP^{III}	TI FRGNSLT	376
ssGAP^{IP4BP}	TI FRGNSLA	374
ceGAP	LM FRGNTLA	193
dmGAP1	TI FRGNTLV	550
scIRA1	DIL RRNSCA	1601
scIRA2	DIL RRNSCA	1747
Consensus	TxFRGNSLA	
1. Peptid	TLFRGNSLA	
Library	XXnRGQnXX	
X = beliebige Aminosäure		
n = definierte Aminosäure		
⇒ 20 x 20 = 400 Sublibraries		

Abbildung 4-1 Vergleich von Argininfingersequenzen im Verhältnis zur Peptidbibliothek

Sequenzvergleich der Argininfinger-Region verschiedener Ras-GAP. Die stilisierte Hand deutet auf die katalytische Argininseitenkette (rot) der Proteine. Consensus = Konsensussequenz, 1. Peptid = erstes im Rahmen dieses Projektes synthetisiertes, zur Fingerregion von RasGAP homologes Peptid; Library = gemeinsame Sequenz der synthetischen Peptide (X = in jeder Unterbibliothek zufällig besetzte AS-Position; n = für jede Unterbibliothek jeweils definierte AS-Positionen); hs NF1 = Neurofibromatosis1-Protein aus *Homo sapiens*; hs p120^{GAP} = GAP p120 aus *H. sapiens*; rn GAP1^m = GAP1^m aus *Rattus norvegicus*; mmGAP = GAP aus *Mus musculus*; ssGAP^{IP4BP} = *Homo sapiens* GAP^{IP4BP}; ceGAP = GAP aus *Caenorhabditis elegans*; dm = *Drosophila melanogaster* GAP; scIRA1 und 2 = IRA1 und 2 aus *Saccharomyces cerevisiae*.

Für die allen synthetisierten Peptiden gemeinsamen Aminosäureseitenketten wurde aus der Argininfinger-Sequenz das zentrale Arginin als katalytisch wichtige Aminosäureseitenkette

und aus sterischen Gründen auch das flankierende Glycin übernommen. Das konservierte Asparagin wurde durch ein Glutamin substituiert, da dieses möglicherweise eine akzesorischen Funktion bei der Stabilisierung des angreifenden Hydroxyl-Ions ausüben kann (analog zu Glutamin 61 von Ras, siehe 1.3.4).

Die zentrale Aminosäure-Triade RGQ wurde in allen synthetisierten Unterbibliotheken beibehalten. Die die Triade direkt flankierenden Aminosäuren spezifizieren jeweils die einzelnen Unterbibliotheken. Beide Positionen wurden mit den zwanzig zur Verfügung stehenden Standardamino-säuren in allen Kombinationen besetzt, so dass 400 Unterbibliotheken mit jeweils fünf definierten Positionen und vier zufällig besetzten Positionen entstanden. Zu beiden Seiten der definierten Aminosäuren wurden je zwei Positionen durch Reaktionen mit einem Gemisch aller Aminosäuren besetzt, so dass an diesen Stellen eine zufällige Verteilung von AS-Seitenketten entstand (Abbildung 4-2).

<p>• • •</p> <p>XXERGQVXX</p> <p>XXERGQWXX</p> <p>XXERGQYXX</p> <p>XXERGQAXX</p> <p>XXERGQCXX</p> <p>XXERGQDXX</p> <p>XXERGQEXX</p> <p>XXERGQFXX</p> <p>XXERGQGXX</p> <p>XXERGQHXX</p> <p>XXERGQIXX</p>	<p>XXERGQKXX</p> <p>XXERGQLXX</p> <p>XXERGQMXX</p> <p>XXERGQNXX</p> <p>XXERGQPXX</p> <p>XXERGQQXX</p> <p>XXERGQRXX</p> <p>XXERGQSXX</p> <p>XXERGQTXX</p> <p>XXFRGQVXX</p> <p>XXFRGQWXX</p> <p>• • •</p>
---	---

Abbildung 4-2 Beispiele für Peptidbibliotheken

Ausschnitt aus dem Programm zur teilautomatisierten Herstellung der Peptidbibliotheken (X = beliebige Aminosäure, blau = für jeweils 20 Ansätze konstante Aminosäure, rot = in allen Ansätzen konstante Aminosäure, grün = Aminosäuren, die in Abständen von 20 Ansätzen wieder eingesetzt werden).

Jede Unterbibliothek hat folglich eine Komplexität von 160000 verschiedenen Peptiden. Die gesamte Bibliothek enthält damit 64 Millionen verschiedene Peptide. Die Herstellung der Bibliothek erfolgte durch SPOT-Synthese auf Cellulosematrix in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe „Molekulare Erkennung“ von Dr. Ronald Frank an der GBF in Braunschweig (Frank & Overwin, 1996; 3.2.2.12). Um sowohl flexible als auch konformationell eingeschränkte Peptide zu erhalten, wurden parallel Bibliotheken mit linearen und zyklisierten Peptiden hergestellt. In weiteren Parallelansätzen wurden sowohl die Bibliotheken mit

linearen als auch mit zyklisierten Peptiden mit ablösbaren Linkern hergestellt, um für Kontrolluntersuchungen mit Peptiden in Lösung verwendet zu werden.

Das Testverfahren zur Bestimmung der GTPase-Aktivität der Peptidbibliotheken beruht auf der klassischen Filterbindungsmethode (3.2.2.11). Bei dieser Methode werden dem Reaktionsansatz, der mit $\gamma^{32}\text{P}$ -GTP beladenes Ras enthält, zu bestimmten Zeiten Aliquots entnommen und durch Nitrocellulosefilter filtriert. Mit den Proteinen bleibt auf der Oberfläche dieser Filter das an diese gebundene GTP zurück und kann aufgrund seiner radioaktiven Markierung detektiert und quantifiziert werden. Erweitert wurde diese Methode hinsichtlich der Verwendung einer *Dot-Blot*-Apparatur, so dass parallel eine große Anzahl von Proben getestet werden konnte (3.2.2.13). Zur Etablierung des Systems wurden die Bibliotheken zunächst mit wtRas*GTP getestet. Da dessen GTPase-Funktion im Gegensatz zu onkogenem Ras durch GAP stimulierbar ist, konnte bei diesen Versuchen eine Kontrolle mit dem RasGAP NF1 in Konzentrationen von nM bis fM durchgeführt werden. Abbildung 4-3 zeigt die mit einem Phosphor-Imager gewonnenen Primärdaten nach einer zwölfminütigen Inkubation bei RT aus einem Test mit 70 der 400 linearen Peptidbibliotheken. Die Konzentration an Ras*GTP betrug 100 μM .

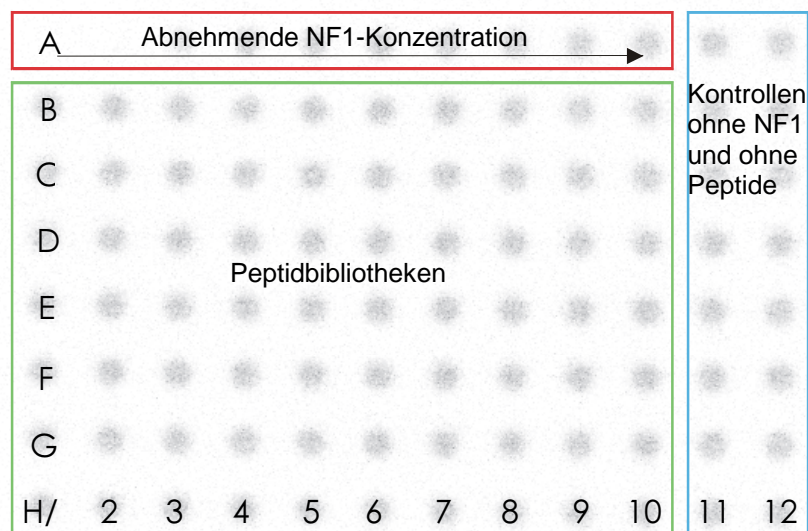


Abbildung 4-3 Phospho-Imager-Autoradiogramm

Phospho-Imager-Autoradiogramm eines Filters aus der *Dot-Blot*-Apparatur. Er zeigt die Rohdaten der Messung von Proben einer Mikrotiter-Platte mit 70 Peptidbibliotheken, 10 Kontrollansätzen mit dem GAP NF1, sowie mit 16 Kontrollen, die nur Ras*GTP enthielten. Die Stärke der Schwärzung korreliert mit der Menge des auf dem Filter verbliebenen $\gamma^{32}\text{P}$ -GTP. Buchstaben und Ziffern dienen der Zuordnung der einzelnen Flecken (weitere Erläuterungen im Text).

Dargestellt ist ein *Phospho-Imaging* Bild des Nitrocellulosefilters. Jeder Fleck repräsentiert die zum Zeitpunkt der Zeitwertnahme im Testansatz jeweils einer Peptidunterbibliothek verbliebene Menge Ras*GTP. Die doppelten Kontrollen ohne Peptide und ohne Zusatz eines GAP dienten sowohl der Überprüfung der Pipettiergenauigkeit, als auch der Normierung der jeweiligen Zeile hinsichtlich der intrinsischen GTPase Aktivität von Ras. Dies war notwendig, da die Zeitwertnahme aus der Mikrotiterplatte mit einer Zwölfkanalpipette (Eppendorf) zeilenweise erfolgte und bis zu einer Minute dauerte. Die Kontrollen mit unterschiedlichen Konzentrationen an GAP (NF1) dienten der Überprüfung der Sensitivität des Tests und dem Nachweis konstanter Versuchsbedingungen.

Auf die Kontrollansätze konnte beim Test der Peptidbibliotheken mit RasG12V*GTP verzichtet werden, da sich die GTPase dieser Variante von Ras nicht durch GAP stimulieren läßt. Darüberhinaus verfügt sie auch über eine reduzierte intrinsische Aktivität, so dass die Dauer der Zeitwertnahme vernachlässigbar wird. Daher lassen sich mit dieser Variante auch wesentlich längere Inkubationszeiten (bis zu 12 h) realisieren, ohne Gefahr zu laufen, eine geringe Stimulierung der GTPase-Aktivität aufgrund des vergleichsweise hohen Beitrags der intrinsischen GTPase nicht detektieren zu können.

Die Auswertung der Daten erfolgte mit dem Programm *Molecular Analyst* (BioRad). Beispielhaft zeigt Abbildung 4-4 das grafische Ergebnis einer solchen Auswertung für wt Ras. Auf der Ordinate sind die Spaltennummern der Mikrotiterplatte aufgetragen, auf der Abzisse die vom *Molecular Imager* detektierten *Volume counts* (das heißt durchschnittliche Zählereignisse im Zählareal), die Auskunft über die Menge noch vorhandenen Ras*GTP geben. Die farbigen Linien symbolisieren die Zeilen, die Symbole die jeweiligen Vertiefungen (*wells*) der Mikrotiterplatte.

Das dargestellte Beispiel zeigt deutlich den Ablauf der Kontrollreaktion mit NF1. In den mit Peptidbibliotheken bestückten *wells* ist jedoch keine signifikante Abnahme der Radioaktivität festzustellen. Auch nach 30 und 60 min war in keinem Fall eine Erhöhung der Hydrolyserate zu erkennen. Die Experimente wurden dreimal sowohl mit zyklisierten als auch linearen Peptiden jeweils mit wtRas*GTP und RasG12V*GTP durchgeführt (3.2.2.13). Die löslichen Pendanten einzelner Unterbibliotheken, bei denen aufgrund mindestens zweier Messungen eine die GTP-Hydrolyse stimulierende Aktivität vermutet wurde, wurden wie beschrieben (3.2.2.13) getestet. In keinem dieser Fälle ließ sich eine stimulierende Aktivität nachweisen.

Mikrotiterplatte Nr. 12, ID: 1704-3, ZW 12 min, 2h exp.

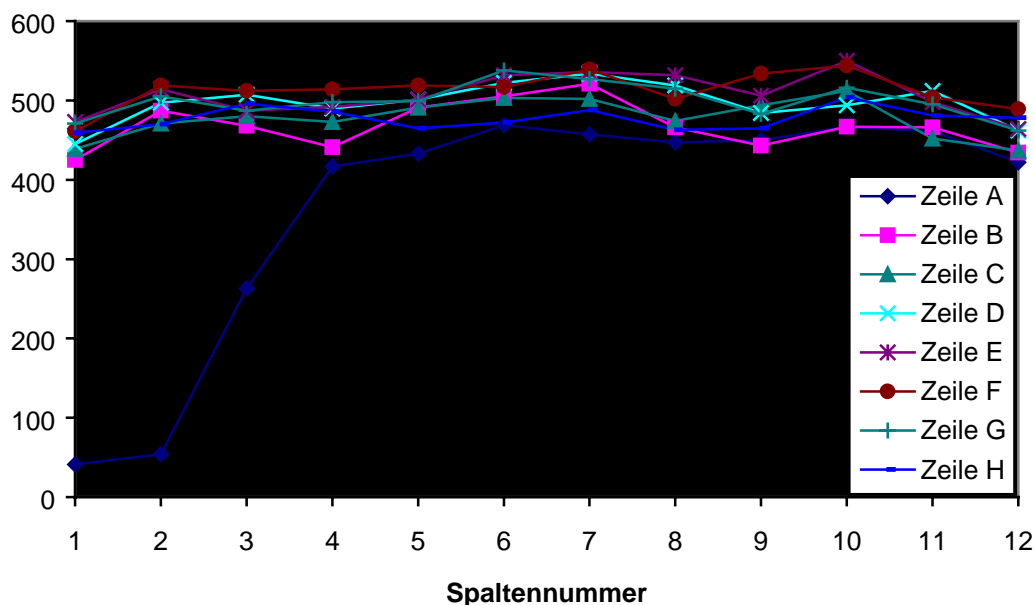


Abbildung 4-4 Auswertung eines Autoradiogramms

Diagramm der Auswertung der zum Zeitpunkt $t = 12$ min entnommenen Aliquots von 70 Peptidbibliotheken, die bei RT auf GAP-Aktivität untersucht wurden. Der Filter wurde 2 h auf der *Phospho-Imaging*-Platte exponiert. Die Ras*GTP-Konzentration betrug $100 \mu\text{M}$. Die Zuordnung der einzelnen Bibliotheken ergibt sich aus der jeweiligen Zeile (farbige Linien) und den Spaltennummern (Abbildung 4-3).

4.1.1 Untersuchung organisch-chemischer Verbindungen auf GTPase stimulierende Aktivität

Im Rahmen der Suche nach geeigneten, die GTPase von Ras aktivierenden Verbindungen, wurden die in Abbildung 4-5 gezeigten, von PD Dr. Markus Kalesse (Hannover) synthetisierten, guanidinylmodifizierten Pregnane getestet. In an der Medizinischen Hochschule Hannover durchgeführten Anti-Tumortest in Zellkulturen, zeigten diese Substanzen in einer Konzentration von $10 \mu\text{M}$ anti-proliferative Wirkung (M. Kalesse, persönliche Mitteilung). Ein möglicher Wirkmechanismus könnte die Aktivierung der GTPase-Funktion von Ras sein, falls ihre Amidinofunktionen analog zum Arginfinger wirkten.

Die GTP-Hydrolyse-Reaktion von $40 \mu\text{M}$ Ras* $\gamma^{32}\text{P}$ -GTP wurde in Gegenwart von je $10 \mu\text{M}$ der Komponenten MK 48a, MK35b und Goe1 in 30 mM Tris/HCl pH 7,4; 2 mM MgCl_2 und 3 mM DTE über einen Zeitraum von 40 min verfolgt. Aus $100 \mu\text{l}$ Ansätzen wurde zu den Zeitpunkten $t = 10, 20$ und 40 min je ein $20 \mu\text{l}$ Aliquot entnommen und durch Nitrocellu-

losefilter filtriert (3.2.2.11). Die Filter wurden sowohl mit dem *Phospho-Imager* (3.2.3.7.2) als auch mit dem Szintillationszähler (3.2.3.7.1) ausgewertet. Eine Beschleunigung der GTP-Hydrolysereaktion konnte in keinem Falle festgestellt werden.

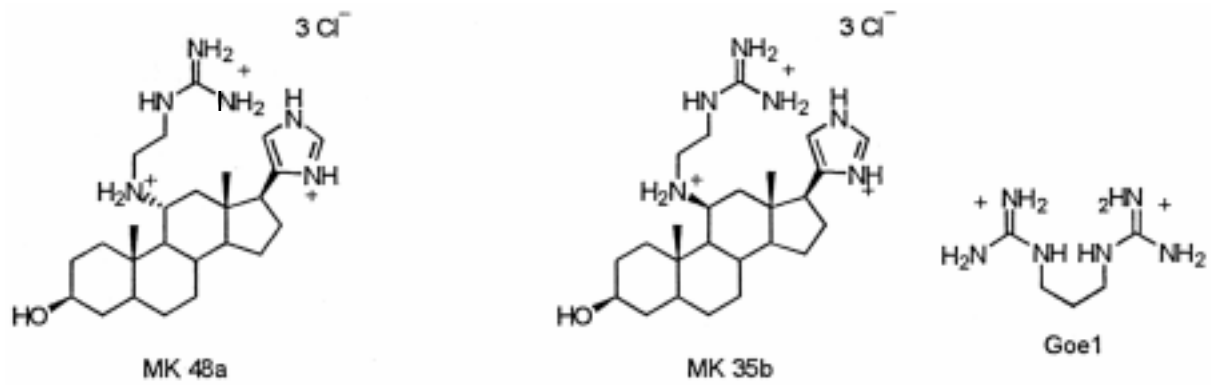


Abbildung 4-5 Anti-proliferative Substanzen

Die Verbindungen wurden in H₂O zu 1 mM Stammlösungen angesetzt und in einer Konzentration von 10 μM auf GTPase-stimulierende Effekte untersucht. Bei den Bezeichnungen MK48a, MK35b und Goe1 handelt es sich um die Nomenklatur von PD Dr. Kallese.

4.2 Charakterisierung eines katalytisch aktiven Fragments von Rap1GAP

4.2.1 Reinigung eines löslichen Rap1GAP-Fragments in präparativem Maßstab

Rap1GAP ist ein GTPase aktivierendes Protein für die kleine GTPase Rap1. Es wurde zuerst von Kikuchi *et al* (1989) beschrieben (1.4.3). Zum Zwecke der biochemischen Charakterisierung von Rap1GAP wurde eine Reinigungsmethode für ein bakteriell hergestelltes, katalytisch aktives Rap1GAP-Fragment etabliert. Bislang wurde lediglich ein Protokoll zur Reinigung des rekombinanten Proteins aus Insektenzellen beschrieben (Rubinfeld & Polakis, 1995).

Da die geringen Ausbeuten dieser Methode eine eingehende biochemische Analyse erschweren, wurden zunächst pGEX-4T-1-Konstrukte sowohl von *full-length*-Rap1GAP als auch von dem von Rubinfeld *et al* (1992) als katalytische Domäne beschriebenen Fragment der AS 75-415 hergestellt (pGEX-4T1Rap1GAPfl und pGEX-4T1Rap1GAPv). Die hierzu nötigen DNA-Fragmente wurden mittels PCR mit den für die Einklonierung vorgesehenen Schnittstellen für die Restriktionsenzyme BamHI und NotI versehen und nach Reinigung mit dem ebenfalls mit BamHI und NotI behandelten Vektor ligiert.

Da beide Konstrukte nur wenig lösliches Protein lieferten, wurden auch Plasmide hergestellt, die für die AS 210 bis 415, 210 bis 410, 210 bis 663, 43 bis 410 und 33 bis 420 von Rap1GAP kodieren. Expressionstests in BL21DE3-Zellen führten jedoch bei keinem der Konstrukte zu nennenswerten Mengen an löslichem Protein. Die Veränderung der Expressionstemperatur (25 bis 37° C) und der Menge des eingesetzten Induktors (0,05 bis 1 mM IPTG, zugegeben bei OD₆₀₀ = 0,8) zeigten ebenfalls keinen Einfluss auf die Menge des hergestellten löslichen Proteins.

Stets wurden die über Western-Blot (3.2.2.14) und Antikörpertest (3.2.2.15) identifizierten Rap1GAP(v oder fl)-Banden von weiteren Proteinbanden flankiert. Eine Proteinsequenzierung (3.2.2.16) ergab, dass es sich bei den dominanten Begleitbanden um GroEL Proteine handelt (Xu *et al*, 1997). Dies sind als Faltungshelfer agierende Proteine, sogenannte molekulare Chaperone, deren Anwesenheit während aller Reinigungsschritte auf eine nicht-triviale Faltung von Rap1GAP schließen läßt.

Die Chaperone ließen sich weder auf der Glutathion-Säule durch Waschen mit Hochsalzpuffern, noch durch einen weiteren Reinigungsschritt über Anionen- oder Kationenaustauschersäulen (Resource Q, 1 ml; Resource S, 1 ml; Pharmacia, Freiburg) und Elution mit Salzgradienten von 0 bis 500 mM KCl, von den RapGAP-Proteinen trennen. Da die Faltung von Proteinen durch das GroEL/GroES-System strikt an die Hydrolyse von ATP gekoppelt ist (Xu & Sigler, 1998) wurde auch versucht, die Proteine über eine mit ATP-haltigem Puffer äquilibrierte Gelfiltrationssäule (16/60 Superdex 75, Pharmacia, Freiburg) zu trennen (Puffer 30 mM Tris, pH 7,4; 2 mM MgCl₂; 3 mM DTE, 0,5 mM ATP). Aber auch von dieser Säule eluierten beide Proteine gemeinsam.

Die Anwesenheit großer Mengen an Chaperonen weist wie die Tatsache, dass sich der größere Anteil des produzierten GST-Rap1GAP-Fragmentes nach Zellaufschluss und Zentrifugation im Präzipitat befindet, auf eine geringe Stabilität und/oder Löslichkeit des Fragments hin. Sollte der geringe Anteil löslichen Proteins auf dessen inkorrekte Faltung zurückzuführen sein, so läßt sich dieser möglicherweise durch die gezielte Koexpression von GroEL und GroES steigern. Somit stünde eine größere Menge an Faltungshelfern zur Verfügung. Erfolgreich wurde diese Methode unter anderem von (Nassar *et al*, 1995) angewandt. Die Koexpression der Plasmide pGEX-4T1Rap1GAPv und dem von (Goloubinoff *et al*, 1989) beschriebenen pGroESL erbrachte jedoch keine Zunahme an GST-Rap1GAPv in der löslichen Proteinfraction.

Erst die Zugabe von ATP (1mM) und MgCl₂ direkt in den kaliumhaltigen Aufschlußpuffer (PBS, 3.1.2), ohne Zusatz von EDTA, erbrachte größere Mengen reinen Rap1GAP-Fragments, wobei auch die weiteren Schritte einschließlich des ersten Wasch-Schrittes auf der Glutathion-Sepharosesäule stets in ATP-haltigem Puffer durchgeführt wurden. So ließen sich aus 20 Liter Bakterienkultur in LB-Medium bis zu 20 mg GST-Fusionsprotein von über 90%iger Reinheit gewinnen (Abbildung 4-6).

Eine erhebliche Steigerung der Ausbeute ließ sich durch Verlagerung des Induktionszeitpunktes auf OD₆₀₀ = 0,2 bei einer Expressionstemperatur von nur 18° C erreichen. ÜN-Expression ließ die Dichte der Kultur auf OD₆₀₀ > 2 anwachsen. Bei Verwendung von TB-Medium (3.1.5) ließen sich so aus 2,5 l Bakterienkultur bis zu 50 mg GST-RapGAPv gewinnen. Diese Reinigungsstrategie ließ sich nicht auf *full-length* Rap1GAP übertragen, das sich weiterhin als mit Chaperonen vergesellschaftet und schwer löslich herausstellte.

Abbildung 4-6 zeigt die Stufen der Reinigung von GST-Rap1GAPv. Das Plasmid pGEX-Rap1GAPv ließ sich sehr gut überexprimieren, wie der Vergleich der Proteinzusammensetzung der uninduzierten mit den induzierten Zellen ergibt (Spalten A und B). Das hergestellte Protein (GST-Rap1GAPv) befindet sich nach Zellaufschluss und anschließender Zentrifugation jedoch nur zum Teil im Überstand (Spalte C). Die Reinheit des nach der Elution der Glutathion-Sepharosesäule gewonnenen Proteins liegt nach Abschätzung der Bandenstärke bereits bei über 90% (Spalte D). Eine Abspaltung des GST-tag mit Thrombin führte zum erwarteten Produkt mit einer Größe von 39 kDa (Spalte E). Die Übereinstimmung des Molekulargewichts des gereinigten Fragments mit dem aus der Sequenz vorhersagbaren wurde mittels ESI-Massenspektrometrie überprüft (3.2.3.6, 4.2.3).

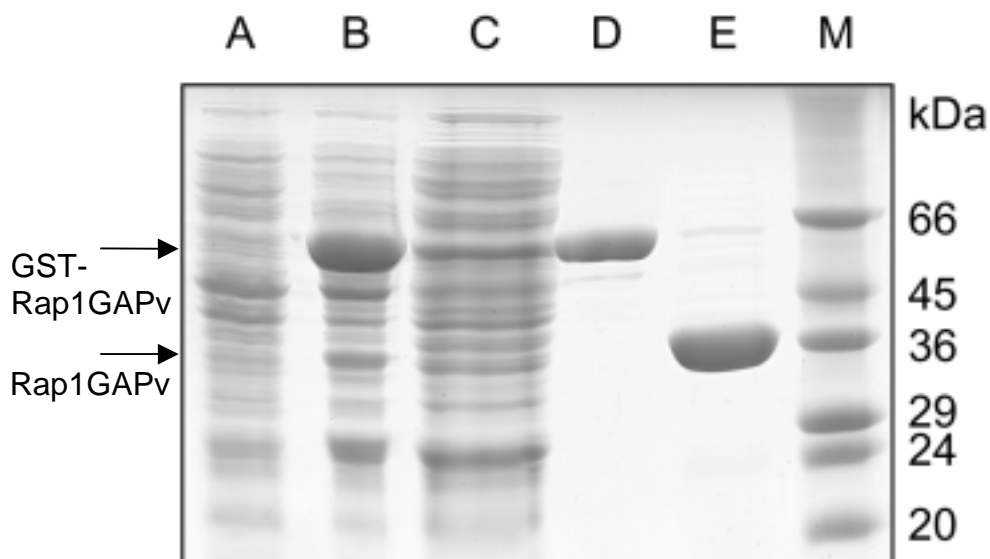


Abbildung 4-6 Reinigung von GST-Rap1GAPv aus *E. coli*

SDS-PAGE einer GST-Rap1GAPv-Reinigung: A nicht induziert (Totalzellextrakt), B induziert (Totalzellextrakt), C Überstand, D GST-Rap1GAPv, E Rap1GAPv, M Marker (SDS7). Die Pfeile geben die Laufhöhen von GST-Rap1GAPv (66 kDa) und Rap1GAPv (39 kDa) an.

4.2.2 Sekundärstrukturvorhersage von Rap1GAPv

Kenntnisse über die Sekundärstruktur von Rap1GAPv lassen möglicherweise Schlüsse auf die Ursachen der unzureichenden Stabilität des Fragments zu. Das Programm PHD (*Profile fed neural network systems from Heidelberg*) ist ein umfassendes Paket zur Analyse von Proteinprimärstrukturen hinsichtlich ihrer prospektiven Sekundärstruktur. Das Unterprogramm PHDsec (*Profile based neural network prediction of secondary structure*) liefert auf

der Basis von Sequenzvergleichen und Prozessierung der gewonnenen Daten durch zwei neuronale Netzwerke Sekundärstrukturvorhersagen mit einer Genauigkeit von zirka 72% (Rost, 1996). Das Ergebnis dieser Berechnungen für Rap1GAPv zeigt Abbildung 4-7. Die errechneten prozentualen Anteile der Sekundärstrukturen betragen für α -Helices 31,4%; für β -Faltblätter 25,2% und für *loops* 43,4%.

```

|80      |90      |100     |110     |120     |130
AS      PTTKVKLECNPTARIYRKHFLGKEHFNYISLDTALGHLVFSLSKYDVIDGQEHRLRLLLRK
PHD     FFF     HHHHHHHH FHHHH FFFFFFFF HHHHHHHHHH
Ver     *** ** ** *****
Lös     eeeeebeeb eeebbbe bbeebbebbbbeebbbbbeebbeebbeebbeebbeeb
Ver     * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

|140     |150     |160     |170     |180     |190
AS      CRTYHDVIPISCLTEFPNVVQMAKLVCEVDVNDRFYPVLYPKASRLIVTFDEHVISNNFK
PHD     FFFFF HHHHHHHHHHHHHFFF F FF FFFFFFFF
Ver     ***** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
Lös     b b ebbbbbbbeb ebbbebbbbeebbe bbbb eebbbebbbbeebbeebbe
Ver     * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

|200     |210     |220     |230     |240     |250
AS      FGVIYQKLGQTSEEELFSTNEESPAFVEFLEFLGQKVKLQDFKGRGGLDVTHTGQTGTES
PHD     FFFFF HHHHH HHHHHHHHHHHH FFFFF HHHH F
Ver     ***** ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
Lös     bbbbbbeebbeeb eeeeebebbbbebbbbeebbeebbeebbeebbeebbeeb
Ver     * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

|260     |270     |280     |290     |300     |310
AS      VYCNFRNKEIMFHVSTKLPYTEGDAQQLQRKRHIGNDIVAVVFQDENTPFVPMIASNFL
PHD     FF FFFFFFFF HHHHHHHHHH FFFFF HHHH F
Ver     * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
Lös     bbbbeebbbbbeeb eeeee bebe bbbbbbbbeebbeebbeebbeeb b b
Ver     * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

|320     |330     |340     |350     |360     |370
AS      HAYVVVQAEGGPDGPLYKVSVTARDDVPPFGPPLPDAVFRKGFQEFLLTKLINAQY
PHD     FFFFFFF FFFFFFFF HHHHHHHHHHHH HHH
Ver     ***** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
Lös     bbbbbbeebbeebbeebbeeb eebb ebeebbeebbeebbeebbeebbeeb
Ver     ***** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

|380     |390     |400     |410
AS      ACYKAEKFAKLEERTRAALLETLYEELHIHSQSMMLGGDE
PHD     HHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHH FFFF
Ver     ***** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
Lös     bbeebbeebbeeb b eebbeebbeebbeebbb bbeebbeeb
Ver     * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

```

Abbildung 4-7 Sekundärstrukturvorhersage für Rap1GAPv

Dargestellt sind die Sequenz von Rap1GAPv (AS, rot = in dieser Arbeit substituierte AS), die Sekundärstrukturvorhersage des Programms PHD (F = β -Faltblatt, H = α -Helix), Ver = Verlässlichkeit der jeweiligen Vorhersage (* = sehr verlässlich), Lös = Lösungsmittelzugänglichkeit (e = 36 bis 100%, b = 0 bis 9% Lösungsmittelzugänglichkeit). Die Darstellung beruht auf den PHD-Kurzresultaten.

Mit Hilfe des Algorithmus von PHDacc (*Profile based neural network prediction of solvent accessibility*) läßt sich die relative Zugänglichkeit der einzelnen Aminosäureseitenketten für Lösungsmittel errechnen. Die Ergebnisse werden in drei Klassen eingeteilt: b = 0 bis 9%, i = 9 bis 36%, e = 36 bis 100%. Rap1GAPv erweist sich nach diesen Berechnungen als Protein, das sowohl α -Helices als auch β -Faltblätter enthält. Die Berechnungen der Lösungsmittelzugänglichkeit für die Seitenketten von Rap1GAPv ergeben lediglich sehr gut (e) zugängliche

und schlecht (b) zugänglicher Aminosäureseitenketten. Aufgrund dieser Daten stuft das PHD-Unterprogramm GLOBE, das die Globularität von Proteinen abschätzt, Rap1GAPv als globuläres kompaktes Protein ein. Aus diesen Berechnungen lassen sich keine direkten Gründe für eine schlechte Löslichkeit des Proteins ableiten.

Die Vorhersagen des Programmes PHD stimmen mit der Bestimmung der Sekundärstrukturanteile mittels Circular dichroismus-Spektroskopie hinsichtlich der Anteile an strukturierten und unstrukturierten Sequenzanteilen gut überein (4.2.3). Die Abweichung beträgt in diesem Falle unter 2%. Die Angaben für α -helikale und β -Faltblattstrukturen variieren um 5,3 beziehungsweise 6,7%.

4.2.3 CD-Spektroskopische Untersuchung von Rap1GAPv

Zur Überprüfung der konformationellen Integrität von Rap1GAPv und einer Abschätzung der Sekundärstrukturanteile wurde das Circular dichroismus-Spektrometer J 710 der Firma JASCO eingesetzt.

GST-Rap1GAPv wurde vor der Untersuchung mit Thrombin proteolytisch (ÜN, 4° C) vom GST-tag getrennt. Nach zehnminütiger Inkubation mit Glutathion-Sepharose (50 μ l dreimal in PBS aufgeschwemmten Sepharose pro 100 μ l 100 μ M Proteinlösung) wurden die GST-Abschnitte durch Zentrifugation in der Tischzentrifuge abgetrennt. Die Reinheit des Proteins wurde mittels SDS-Page (3.2.2.5) überprüft. Da das Protein eine Reinheit von über 90 % aufwies, kann eine Überlagerung des Spektrums von Rap1GAPv durch die des GST-Abschnittes ausgeschlossen werden. Die 25 Spektren wurden mit einer 10 μ M Proteinlösung in H₂O unter den beschriebenen Bedingungen (3.2.3.4) aufgenommen (Abbildung 4-8). Aus dem Verlauf des Spektrums läßt sich ersehen, dass das Protein über definierte Strukturelemente verfügt.

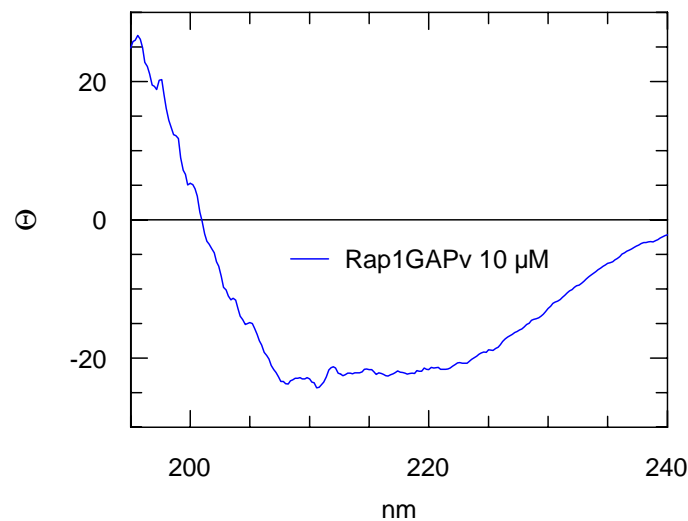


Abbildung 4-8 CD-Spektrum von Rap1GAPv

CD-Spektrum einer 10 μM Lösung des katalytischen Rap1GAP-Fragments. Technische Daten: Wellenlängenbereich 195 bis 240 nm, *Scan*-Geschwindigkeit 50 nm/min, Bandbreite 1 nm, Auflösung 0,2 nm, Empfindlichkeit 50 mdeg, Zeitkonstante 1s. Die Spektren wurden 25fach akkumuliert.

Die auf den CD-Spektren basierende Sekundärstrukturvorhersage durch das Programm *Secondary Structure Estimation* unter Verwendung der Referenz-Daten von Dr. Yang lieferte die in Tabelle 4-1 verzeichneten Werte. Diese bestätigen die mit dem Programm PHD angefertigte sequenzbasierte Sekundärstrukturvorhersage (4.2.2), nach der es sich bei Rap1GAPv um ein Protein handelt, das sowohl über α -helikale Strukturen als auch über β -Faltblatt-Anteile verfügt. Hinsichtlich der exakten Verteilung der Anteile der jeweiligen Strukturen zeigen die beiden Voraussagen unterschiedliche Schwerpunkte. Während aufgrund der CD-Daten ein höherer β -Faltblattanteil prognostiziert wird, liefert PHD leicht höhere Anteile an α -Helices. Dieser Unterschied befindet sich jedoch innerhalb des Fehlerbereichs beider Methoden.

Rap1GAPv	CD	PHD
Sekundärstruktur	Anteil in %	Anteil in %
α -Helix	26,1	31,4
Beta-Faltblatt	31,9	25,2
Turn + Random	42	43,4
Total	100	100

Tabelle 4-1 Sekundärstrukturanteile von Rap1GAPv und Rap1GAPv K285A

Abschätzung der Sekundärstrukturanteile durch das Programm *Secondary Structure Estimation* im Vergleich zur Sekundärstrukturvorhersage durch das Programm PHD.

4.2.4 Massenspektrometrische Untersuchung von Rap1GAPv

Zur Bestätigung der korrekten Größe der gereinigten Proteine, insbesondere bei Varianten mit Aminosäureaustauschen wurde das Molekulargewicht mittels Massenspektrometrie bestimmt. Abbildung 4-9 zeigt beispielhaft ein Massenspektrum von Rap1GAPv. Das getestete Fragment wurde als GST-Fusionsprotein gereinigt (4.2.1). Der GST-tag des noch an die Glutathion-Sepharose gebundenen Proteins wurde mit Thrombin ÜN abgespalten (3.2.2.4.3). Das konzentrierte Eluat wurde dann ohne weitere Reinigungsschritte nach Verdünnung in 50% (v/v) Methanol und 5% (v/v) Ameisensäure zur Messung im Nanoelektrospray-Massenspektrometer eingesetzt (3.2.3.6). Die Summation der Molekulargewichte aller Aminosäuren von Rap1GAPv ergibt 39053 Da. Die Molekulargewichtsbestimmung ergibt nach Dekonvolution der Daten 39051 Da. Die Abweichung von zwei Massen liegt innerhalb der Fehlergrenze des Massenspektrometers zum Zeitpunkt der Messung (zirka 3 Da; PD Dr. Heino Prinz, persönliche Mitteilung).

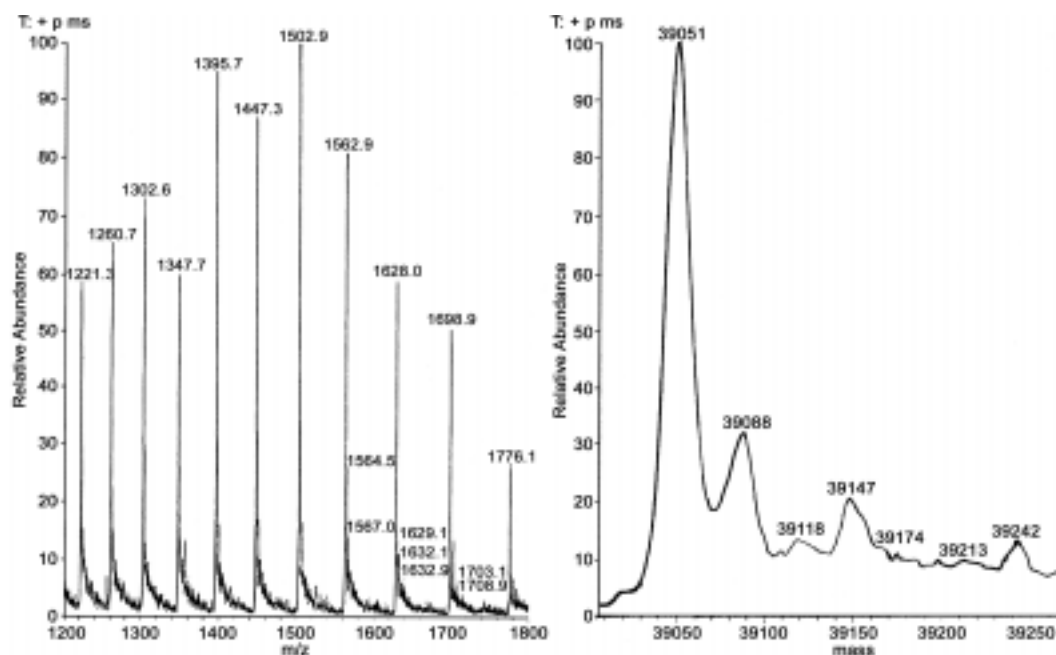


Abbildung 4-9 Massenspektrometrische Analyse von Rap1GAPv

Der linke Teil der Abbildung zeigt die relative Häufigkeit (*Relative Abundance*) der gemessenen Ereignisse aufgetragen gegen das Verhältnis von Masse zu Ladung. Der rechte Teil zeigt das dekonvolvierte Massenspektrum, in dem die relative Häufigkeit gegen die Masse aufgetragen ist.

4.2.5 Thermische Stabilität von verkürztem Rap1GAP

Eine Möglichkeit, die thermische Stabilität von Proteinen oder Proteinfragmenten zu bestimmen, bietet die *Differential Scanning Calorimetry* (DSC, 3.2.3.2). Wird in einem solchen Experiment eine reversible Entfaltung beobachtet, so läßt dies darauf schließen, dass es sich beim untersuchten Fragment um eine stabile Domäne handelt, deren Primärsequenz bereits alle Informationen zur Ausbildung der Tertiärstruktur enthält. In einem DSC-Experiment wird die Änderung der Wärmekapazität einer Proteinlösung bei konstantem Druck gemessen. Im Vergleich zu einer Pufferreferenz wird die erhöhte Energieaufnahme der Lösung bei der Entfaltung des Proteins bestimmt. Der Umschlagspunkt der Wärmekapazitätskurve wird als thermischer Übergang bezeichnet. Die Höhe der Temperatur, bei der ein solcher Übergang auftritt, korreliert mit der Stabilität des untersuchten Proteins.

In Vorversuchen wurden zunächst Pufferbedingungen bestimmt, unter denen Rap1GAPv hohe thermische Stabilität aufweist. Hierzu wurden Aliquots einer 10 μM Rap1GAPv Lösung in verschiedenen Puffern 20 min lang einer Temperatur von 90° C ausgesetzt. Da der pH-Wert von Tris-Puffern bei Temperaturänderungen stark schwankt, wurden im sauren Bereich Acetat- und für den alkalischen Bereich Glycin-Puffer eingesetzt, die jeweils 100 mM NaCl und 1 mM Mercaptoethanol enthielten. Es wurden Puffer der pH-Werte 4, 5, 6, 7, 8 und 9,5 getestet. Nur in folgendem Puffer waren nach Ablauf der Inkubation optisch keine Proteinaggregate zu erkennen: 20 mM Glycin, 100 mM NaCl, 1 mM Mercaptoethanol, pH 9,5. Abbildung 4-10 zeigt zwei aufeinanderfolgende Messungen desselben Ansatzes im Temperaturbereich von 3 bis 73°C mit einer 8,4 μM Lösung von Rap1GAPv im eben genannten Puffer. Der von der oberen Kurve stark abweichende Verlauf der unteren Kurve weist darauf hin, dass keine vollständige Rückfaltung stattgefunden hat, die Lösung also nicht korrekt gefaltete Proteinfragmente enthält. Ein möglicher thermischer Übergang ist bei zirka 45° C zu erkennen. Ein weiterer möglicher Übergang befindet sich bei zirka 32° C. Die niedrigen Temperaturen, bei denen diese Übergänge stattfinden, deuten auf eine geringe Stabilität von Rap1GAPv hin. Demnach ist die Faltung von Rap1GAPv wahrscheinlich nicht rein thermodynamisch gesteuert. Gestützt wird diese Annahme durch Beobachtung der Assoziation von Chaperonen an GST-Rap1GAP in *E. coli* (4.2.1).

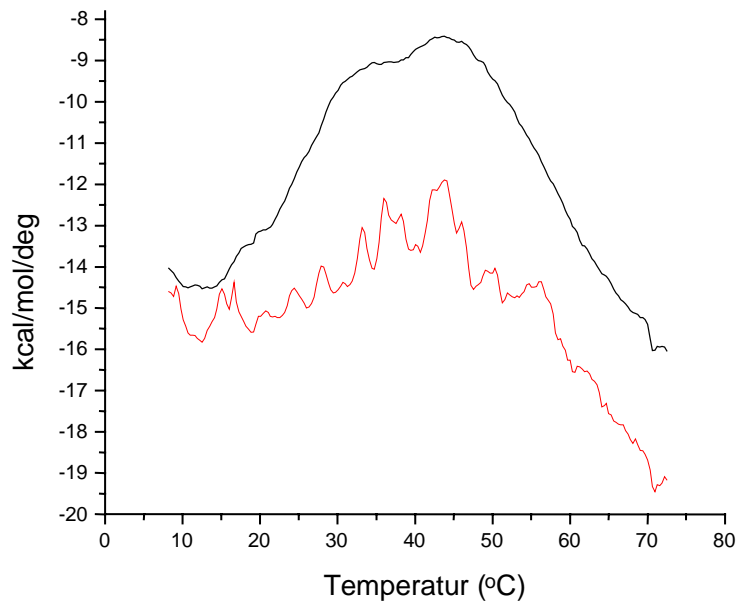


Abbildung 4-10 Thermische Entfaltung von Rap1GAPv

Verlauf zweier aufeinanderfolgender Messungen von Rap1GAPv im *differential scanning calorimeter*. Der Verlauf der ersten Schmelzkurve ist in schwarz dargestellt. Die rote Kurve zeigt die thermische Entfaltung derselben Proteinlösung nach Abkühlung auf 4°C.

4.2.6 Kalorimetrische Bestimmung der Affinität von Rap1GAPv zu Rap1A*GppNHp

Das Messprinzip der isothermen Titrationskalorimetrie (ITC) beruht auf der direkten Messung der Reaktionsenthalpien bei der Titration eines Liganden zu dem in der Messzelle vorgelegten Protein (3.2.3.1). Mit Hilfe dieser Methode lassen sich Aussagen über die Affinität zweier Moleküle zueinander, sowie die Stöchiometrie ihrer Interaktion machen. Mittels der ITC wurde in dieser Arbeit die Interaktion von Rap1GAPv zu Rap1A*GppNHp, einem nicht hydrolysierbaren GTP-Analogen untersucht.

Im in Abbildung 4-11 gezeigten Versuch wurde in der Messkammer eine Rap1GAPv-Lösung vorgelegt (31,2 μM). Titriert wurde mit einer 471 μM Rap1A*GppNHp Lösung. Als Puffer wurde 30 mM Tris/HCl, 3 mM DTE, 50 mM KCl, pH 7,4 verwendet, gegen den beide Proteine zuvor dialysiert wurden. Die Messung fand bei 25° C statt. Im oberen Teil der Abbildung ist die pro Titrationschritt gemessene Energieänderung gegen die Dauer des Experiments aufgetragen. Der untere Teil zeigt die pro Mol zutitrierten Rap1A*GppNHp gemessene Energie als Funktion des molaren Verhältnisses von Rap1GAPv und Rap1A*GppNHp.

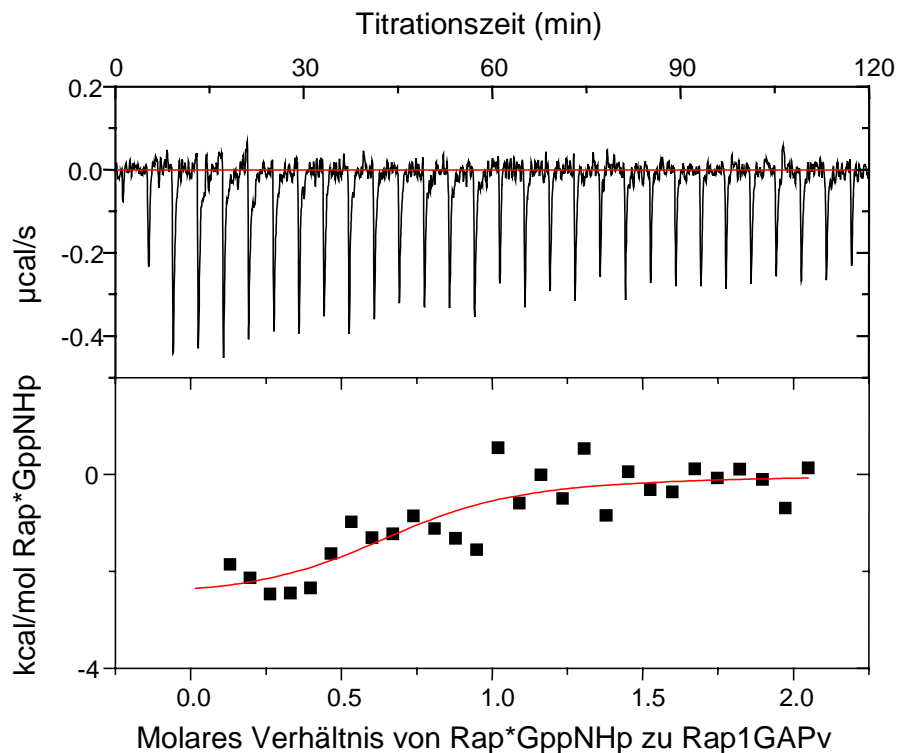


Abbildung 4-11 ITC-Titration von Rap1GAPv mit Rap*GppNHp

Die Messung wurde bei 25°C in 30 mM Tris/HCl, 3 mM DTE 50 mM KCl, pH 7,4 durchgeführt. Im oberen Teil des Diagramms ist der Heizstrom der Meßzelle im Verlauf der Titration dargestellt. Die untere Diagrammhälfte zeigt die gegen das molare Verhältnis von Rap*GppNHp zu Rap1GAPv aufgetragenen integrierten Peakflächen aus der oberen Diagrammhälfte.

Aufgrund der großen Streuung der Messwerte, die auf die nachträglich festgestellte sichtbare Präzipitation von Proteinen zurückzuführen ist, kann die Affinität beider Proteine zueinander nach Auswertung der Daten mit dem Programm *Origin* lediglich auf einen Bereich um $5\ \mu\text{M}$ eingegrenzt werden, da die Präzipitation der Proteine eine genauere Titration nicht ermöglicht. Weiterhin läßt sich mittels *Origin* eine 1:1 Stöchiometrie für die Interaktion von Rap1GAPv mit Rap1A im Rahmen der Messgenauigkeiten feststellen. Aufgrund der geringen Affinität der beiden Proteine zueinander wären für eine exakte Bestimmung der Affinitäten Proteinkonzentrationen von über $100\ \mu\text{M}$ erforderlich gewesen. Rap1GAPv zeigt jedoch bereits im gezeigten Versuch eine Tendenz zu aggregieren, so dass von weiteren Versuchen und damit einer exakten Bestimmung der Affinität von Rap1GAPv zu Rap*GppNHp Abstand genommen wurde. Möglicherweise wird Rap1GAPv durch die Interaktion mit Rap1A zusätzlich aufgrund konformationeller Umlagerungen destabilisiert.

4.2.7 Gelfiltrationsanalyse von Rap1GAPv

Zur Überprüfung einer möglichen konzentrationsabhängigen Oligomerisierung von Rap1-GAPv, die eventuell zur Präzipitationsneigung des Proteins beiträgt, wurden Gelfiltrationsläufe mit einer Kontron System 525 HPLC und einer Supelco Sigmachrom GFC1300 (13,25 ml) Gelfiltrationssäule bei 4° C durchgeführt. Die Anlage ist mit dem Kontron *Diode Array Detector* 440 ausgestattet.

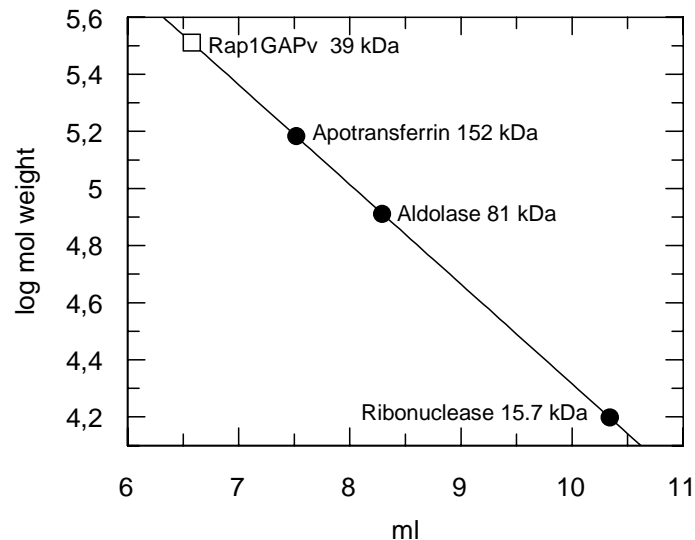


Abbildung 4-12 Analytische Gelfiltration von Rap1GAPv

Rap1GAPv (Quadrat) befindet sich im Ausschlussvolumen der GFC1300 Säule. Die Säule wurde mit den drei gezeigten Markerproteinen kalibriert. Puffer: 30 mM Tris/HCl pH 7,4; 3 mM DTE. T = 4° C, Flussrate 0,4 ml/min.

Nach der Kalibrierung der Säule durch drei Filtrationen mit Apotransferrin, Aldolase und Ribonuclease wurden Rap1GAP-Konzentrationen von 20 bis 100 μ M in PBS (3.1.2) + DTE und 30 mM Tris/HCl + DTE (beide Puffer pH 7,4) untersucht. Der vom Detektor der Anlage detektierbare Anteil von Rap1GAP befand sich stets im Ausschlussvolumen der Säule, was auf die Aggregation des Proteins schließen läßt (Abbildung 4-12).

4.2.8 Oberflächenplasmonresonanzmessung der Interaktion von GST-Rap1GAPv und Rap1B*GppNHp

Das Biacore™-System erlaubt die Untersuchung der Interaktion eines an eine Matrix gekoppelten Substrats mit einem Liganden, der im Durchfluß über die Matrix geleitet wird (3.2.3.3). Die Quantifizierung der Interaktion erfolgt über die Messung des Winkels, unter dem bei Einstrahlung von Licht in der Oberfläche des Chips, auf dem die Matrix verankert ist,

Plasmonresonanz auftritt. Die Plasmonresonanzsignale werden als *resonance units* (RU) angegeben, die linear mit der Masse an gebundenen Liganden korrelieren.

Im vorliegenden Experiment wurde die Affinität der Interaktion von GST-Rap1GAPv mit Rap1B*GppNHp untersucht. Über seinen GST-*tag* wurde Rap1GAPv an in der Dextran-Matrix des Sensorchips verankerten GST-Antikörper gekoppelt. Abbildung 4-13 zeigt den Verlauf der Messung im Vergleich zu drei Kontrollmessungen. Auf der Ordinate ist der zeitliche Verlauf des Experiments aufgetragen, die Abszisse zeigt die in *Resonance Units* gemessenen Plasmonresonanzsignale.

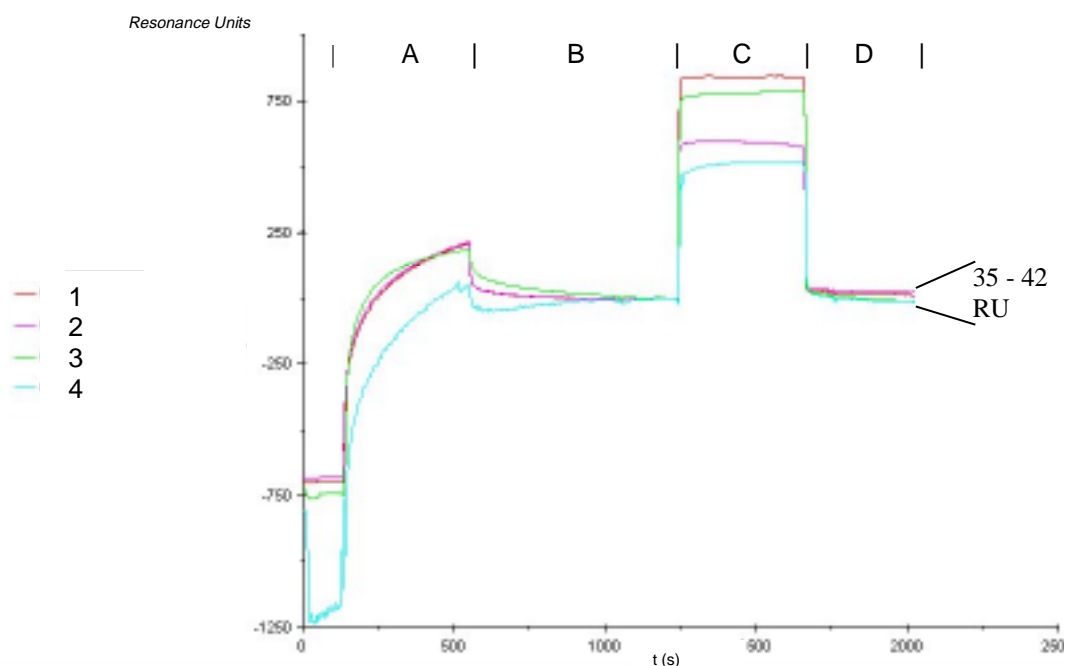


Abbildung 4-13 Oberflächenplasmonresonanzmessung der Interaktion von GST-Rap1GAPv mit Rap1B*GppNHp

Auf der y-Achse sind die Veränderungen der Plasmonresonanz in *Resonance Units* (RU) angegeben, auf der x-Achse ist die Zeit in Sekunden aufgetragen. 1: GST-Rap1GAPv + Rap1B*GppNHp; 2: GST-Rap1GAPv + Rap1B*GDP; 3: GST + Rap1B*GppNHp; 4: GST + Rap1B*GDP. A: Kopplungsschritt; B: Waschschrift; C: *Bulk*-Effekt; D: Waschschrift. Erläuterung der einzelnen Abschnitte der Experimente im Text.

Nach der Reinigung des Sensorschips mit 3 M Guanidiniumchlorid und 0,05% SDS (0 bis 100 s) begannen die Messungen jeweils mit der Kopplung von 35 μ l GST-Rap1GAPv oder GST als Kontrolle, jeweils in einer Konzentration von 0,2 g/l an den Sensorchip (100 bis 520 s). Die Flußrate betrug dabei 5 μ l/min. Nach einem Waschschrift (520 bis 1250 s) mit Biacore-Messpuffer (3.2.3.3) wurden 35 μ l einer 100 μ M Rap1B*GppNHp-Lösung (oder

einer 100 μM Rap1B*GDP als Kontrolle) über den Sensorchip geleitet (1250 bis 1670 s). Die große Signaländerung (*Bulk*-Effekt) beim Auftrag des Liganden ist auf dessen relativ hohe Konzentration von 100 μM zurückzuführen. Die sich beim finalen Waschschrift einstellende Basislinie sollte bei Bindung von Rap1B*GppNHp (Rap1B*GDP) an matrixgebundenes GST-Rap1GAPv gegenüber der Basislinie vor dem Auftrag zu höheren RU-Werten verschoben sein. Im Falle der Bindung von Rap1B*GppNHp ist ein Effekt von 35 RU erkennen. Auch die Kontrollmessung mit Rap1B*GDP ergab ein Signal ähnlicher Stärke (42 RU). Bei den Kontrollen mit GST zeigte sich kein Bindungseffekt von Rap1B, weder in der GppNHp- noch in der GDP-Form. Der Erwartungswert für 100%ige Bindung von Rap1B an GST-Rap1GAPv läge in einem Bereich um 216 RU, da die Signalstärke der Bindung von GST-Rap1GAPv mit einem Molekulargewicht von 66 kDa 750 RU beträgt. Das nahezu vollständige Abklingen des *Bulk*-Effekts zeigt an, dass keine unspezifische Bindung an den Sensorchip stattgefunden hat. Dennoch ist keine spezifische Bindung von Rap1GAPv an die GppNHp-Form von Rap1B im Vergleich zur GDP gebundenen Form zu erkennen. Möglicherweise bindet Rap1GAPv mit ähnlich schwacher Affinität an Rap1B*GDP und Rap1B*GTP. Eine weitergehende Untersuchung der Interaktion mit der BiacoreTM-Methode bietet sich jedoch aufgrund der für deutlichere Signale einzusetzenden hohen Proteinkonzentrationen nicht an.

4.2.9 Bestimmung der katalytischen Aktivität von GST-Rap1GAPv im Vergleich zu Rap1GAPv

Als Grundlage für die Identifizierung einer katalytisch aktiven Aminosäureseitenkette, ist es zunächst notwendig, die Reaktion von Rap1A*GTP mit Rap1GAPv zu charakterisieren. Da sich Rap1GAPv ohne GST-Anteil in Vorversuchen als instabiler als das GST-Fusionsprotein erwiesen hat (höherer Aktivitätsverlust nach Schockgefrier- und Auftauzyklen), wurde die Aktivität beider Proteine parallel untersucht.

Zur kinetischen Charakterisierung der katalytischen Rap1GAP-Fragmente wurden die Initialgeschwindigkeiten der GTP-Hydrolyse von 100 nM Rap1GAPv (mit und ohne GST-Anteil) mit Rap1A*GTP in Konzentrationen von 1 bis 800 μM im radioaktiven Aktivkohle-Test gemessen (3.2.2.10). Dazu wurden nach Start der Reaktion durch Zugabe von Rap1GAPv dem Reaktionsansatz fünf bis zehn Aliquots entnommen, jeweils bevor maximal 20% des Rap1A*GTP umgesetzt waren. Die initialen Reaktionsgeschwindigkeiten wurden aus der

Steigung der Regressionsgeraden, die mit dem Programm GraFit 3.0 an die Messpunkte angepasst wurde, ermittelt. Die Auswertung der in Relation zur Substratkonzentration aufgetragenen Reaktionsgeschwindigkeitsdaten erfolgte nach dem Modell von Michaelis und Menten ebenfalls unter Verwendung des Programmes GraFit (Abbildung 4-14). Dabei wird Rap1GAP als Enzym und Rap1*GTP als Substrat angesehen. Danach ergibt sich sowohl für das GST-Fusionsprotein, als auch für die mit Thrombin gespaltene Variante eine maximale Reaktionsgeschwindigkeit von $5,6 \text{ s}^{-1}$. Im Vergleich zur Geschwindigkeit der intrinsischen GTP-Hydrolysereaktion ($5,2 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$, bei 37° C (Schweins *et al*, 1997), $1,7 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ bei 30° C ; siehe 4.5) wird die Reaktion sowohl von Rap1GAPv als auch von GST-Rap1GAPv 100000 fach beschleunigt.

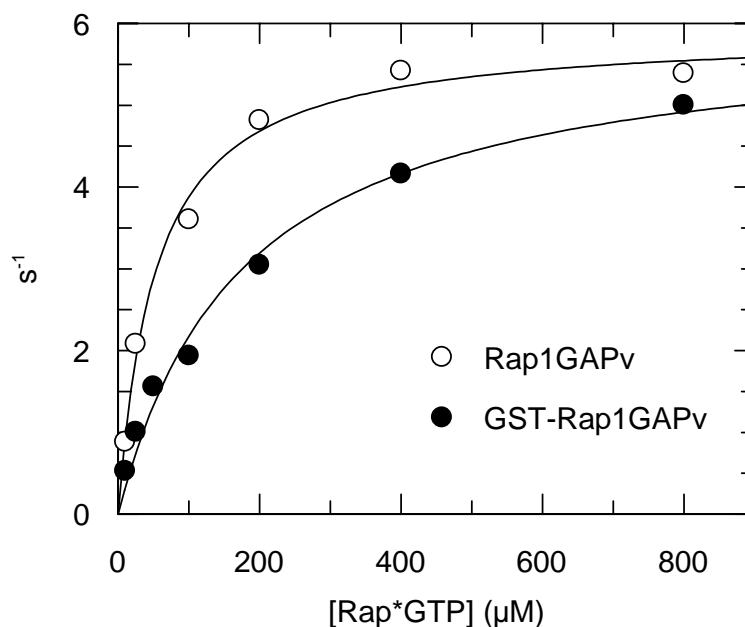


Abbildung 4-14 Vergleich der Michaelis-Menten-Kinetiken von Rap1A*GTP mit Rap1GAPv und GST-Rap1GAPv

Beide Reaktionen zeigen einen k_{cat} -Wert von $5,6 \text{ s}^{-1}$. Die ermittelten K_{M} -Werte lauten $52,3 \text{ μM}$ für Rap1GAPv und 170 μM für GST-Rap1GAPv. Die Bestimmungen der initialen Reaktionsgeschwindigkeiten wurden mit GST-Rap1GAPv und GST-Rap1GAPv in einer Konzentration von 100 nM in 30 mM Tris/HCl , 2 mM MgCl_2 , 3 mM DTE , $\text{pH } 7,4$ bei 25° C durchgeführt.

Unterschiedlich sind hingegen die K_{M} -Werte beider Proteine. Für Rap1GAPv ergibt sich ein K_{M} -Wert von $52,3 \text{ μM}$, für GST-Rap1GAP beträgt dieser Wert $175,2 \text{ μM}$. Dieses Resultat deutet auf eine geringere Affinität der GST-Form zum Substrat (unter der Annahme, dass die Hydrolysereaktion im Vergleich zur Bildung und zum Zerfall des Enzym-Substrat-Komplexes langsamer verläuft).

Da der GST-Anteil des Rap1GAPv-Fusionsproteins nach diesen Daten auf die maximale Geschwindigkeit der GAP-stimulierten GTP-Hydrolysereaktion keinen Einfluss hat, wurden die folgenden Analysen (4.3) zur Identifizierung einer katalytischen Aminosäureseitenkette von Rap1GAPv mit Varianten des GST-Fusionsproteins durchgeführt.

Dem erhöhten K_M -Wert der Interaktion von Rap1GAPv und Rap1A*GTP wurde durch die standardmäßige Verwendung einer Rap1A*GTP-Konzentration von 200 μM Rechnung getragen.

4.2.10 Vergleich der GST-Rap1GAPv katalysierten GTP-Hydrolysereaktion von Rap1A und Rap1B

Rap1A und Rap1B sind zu über 90% identisch (Pizon *et al.*, 1988). Im Bereich der Effektor-Region und des katalytischen Zentrums erreicht die Homologie sogar 100%. Daher ist davon auszugehen, dass sich die Interaktionen von Rap1A und Rap1B mit Rap1GAPv nicht wesentlich unterscheiden. Da für die Messungen in dieser Arbeit sowohl Rap1A als auch Rap1B Verwendung finden sollte, wurde die GST-Rap1GAPv katalysierte GTPase-Reaktion beider Proteine in dem für die Messungen der initialen Reaktionsgeschwindigkeiten relevanten Bereich von 0 bis 80 s mit dem Aktivkohletest (3.2.2.10) untersucht (Abbildung 4-15).

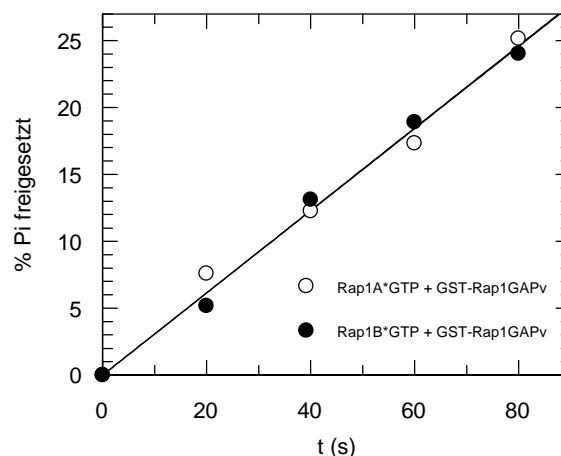


Abbildung 4-15 Vergleich der GAP-katalysierten GTPase-Reaktionen von Rap1A und Rap1B

Der Versuch wurde unter den folgenden Bedingungen durchgeführt: Rap1A/B*GTP = 200 μM , GST-Rap1GAPv = 100 nM, T = 25 °C, Puffer = 30 mM Tris/HCl, 2 mM MgCl₂, 3 mM DTE, pH 7,4. Die ermittelte Geschwindigkeit beträgt für beide Reaktionen 0,3 $\mu\text{M s}^{-1}$.

Beide Reaktionen verlaufen nahezu identisch und entsprechen damit den obengenannten Erwartungen. Hinsichtlich der Charakterisierung der GAP-stimulierten GTPase-Reaktion sind die Rap1-Isoformen A und B daher äquivalent zu betrachten.

4.3 Mutationsgestützte Analyse von Rap1GAPv zur Aufklärung des katalytischen Mechanismus der Rap1GAP katalysierten GTP-Hydrolyse von Rap1A/B

Im Zentrum dieser Untersuchung steht die Frage nach Aminosäureseitenketten von Rap1GAP, die relevant für dessen GTPase aktivierende Funktion sind. Heuristische Dienste bei der Auswahl möglicherweise katalytisch aktiver Aminosäureseitenketten leistete dabei die sogenannte Argininfinger-Hypothese (1.3.4). Diese wurde bei den kleinen GTPasen Ras und Rho durch biochemische und röntgenkristallographische Analysen bestätigt (Ahmadian *et al*, 1997; Rittinger *et al*, 1997b; Scheffzek *et al*, 1997). In beiden Fällen beschleunigen die jeweiligen GAP die intrinsische GTP-Hydrolysereaktion durch eine Argininseitenkette, die im aktiven Zentrum der kleinen GTPase den Übergangszustand der GTP-Hydrolyse stabilisiert. In Übertragung des Argininfingermodells wurden konservierte Argininpositionen in RapGAP-Proteinen ausgemacht, die möglicherweise katalyserelevant sein könnten.

4.3.1 Sequenzvergleich bekannter RapGAP

Der zur Identifizierung konservierter Argininseitenketten innerhalb des katalytisch aktiven Rap1GAP-Fragments durchgeführte Sequenzvergleich berücksichtigt nur Proteine, deren RapGAP-Aktivität erwiesen wurde, sowie deren Homologe aus anderen Organismen. Tuberin, E6TP1, GAP^{IP4BP} sowie Bud2 wurden daher (1.4.3) nicht in den Vergleich einbezogen. Die beiden letztgenannten Proteine wurden nicht berücksichtigt, da sie keine Sequenzhomologie mit Rap1GAP aufweisen (1.4.3) und darüber hinaus ihre RapGAP-Aktivität in Kontrollexperimenten nicht nachvollzogen werden konnte (Dr. Reza Mohammad Ahmadian, persönliche Mitteilung). Der Vergleich der Sequenzen (Abbildung 4-16) von humanem Rap1GAP, den RapGAP Sequenzen aus *Drosophila melanogaster* und *Caenorhabditis elegans*, sowie den Spa1-Sequenzen aus *Mus musculus* und *Homo sapiens* lieferte fünf konservierte Arginine in den Positionen 240, 284, 286, 388 und 390 (der Numerierung liegt die Sequenz von humanem Rap1GAP zugrunde).

	200		210		220		230																																		
Rap1GAP hs	Q	K	L	G	Q	T	S	E	E	E	L	F	S	T	N	E	S	P	A	F	V	E	F	L	E	F	L	G	Q	K	V	K	L	Q	D	F	K	G	F		
SPA1 hs	-	R	A	G	Q	G	S	E	E	E	M	Y	N	N	Q	E	A	G	P	A	F	M	Q	F	L	T	L	L	G	D	V	V	R	L	K	G	F	E	S	Y	
SPA1 mm	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Y	N	N	Q	E	A	G	A	A	F	M	Q	F	L	T	L	L	G	D	V	V	R	L	K	G	F	E	S	Y		
RapGAP1 dm	-	R	Y	G	Q	T	T	E	E	E	L	F	G	N	Q	Q	T	S	P	A	F	D	E	F	L	D	V	L	G	Q	R	I	R	L	K	D	H	K	G	Y	
RapGAP ce	-	K	G	G	Q	T	T	E	E	Q	L	F	G	N	P	H	G	S	P	A	F	D	E	F	L	S	M	I	G	D	S	V	Q	L	N	G	F	Q	K	Y	
	240		250		260		270																																		
Rap1GAP hs	R	G	G	L	D	V	T	H	G	Q	T	G	T	E	S	V	Y	C	N	F	R	N	K	E	I	M	F	H	V	S	T	K	L	P	Y	T	E	G	D	A	
SPA1 hs	R	A	Q	L	D	T	K	T	D	S	T	G	T	H	S	L	Y	T	T	Y	Q	D	H	E	I	M	F	H	V	S	T	M	L	P	Y	T	P	N	N	Q	
SPA1 mm	R	A	Q	L	D	T	K	T	D	S	T	G	T	H	S	L	Y	T	T	Y	Q	D	H	E	I	M	F	H	V	S	T	M	L	P	Y	T	P	N	N	Q	
RapGAP1 dm	R	G	G	L	D	I	Q	N	G	H	T	G	D	T	A	V	Y	E	V	F	K	E	R	E	I	M	F	H	V	S	T	L	L	P	H	T	E	G	D	P	
RapGAP ce	R	G	G	L	D	T	A	H	N	Q	T	G	H	Q	S	V	F	S	E	F	K	N	R	E	I	M	F	H	V	S	T	M	L	P	Y	T	I	G	D	A	
	280		290		300		310																																		
Rap1GAP hs	Q	Q	L	Q	R	K	R	H	I	G	N	D	I	V	A	V	V	F	Q	E	D	-	E	N	T	P	F	V	P	D	M	I	A	S	N	F	L	H	A	Y	V
SPA1 hs	Q	Q	L	L	R	K	R	H	I	G	N	D	I	V	T	I	V	F	Q	E	P	G	S	K	P	F	C	P	T	T	I	R	S	H	F	Q	H	V	F	L	
SPA1 mm	Q	Q	L	L	R	K	R	H	I	G	N	D	I	V	T	I	V	F	Q	E	P	G	S	K	P	F	C	P	T	T	I	R	S	H	F	Q	H	V	F	L	
RapGAP1 dm	Q	Q	L	Q	R	K	R	H	I	G	N	D	I	V	A	I	V	F	Q	E	-	T	N	T	P	F	S	P	D	M	I	A	S	H	F	L	H	A	F	I	
RapGAP ce	Q	Q	L	Q	R	K	R	H	I	G	N	D	I	V	A	I	I	F	Q	E	-	A	N	T	P	F	A	P	D	M	I	A	S	N	F	L	H	A	Y	V	
	320		330		340		350																																		
Rap1GAP hs	V	V	Q	A	E	G	G	G	P	D	G	P	L	Y	K	V	S	V	T	A	R	D	D	V	P	F	F	G	P	P	L	P	D	P	A	V	-	F	R	K	
SPA1 hs	V	V	R	A	H	T	P	C	T	P	H	T	T	Y	R	V	A	V	S	R	T	Q	D	T	P	A	F	G	P	A	L	P	A	G	G	G	P	F	A	A	
SPA1 mm	V	V	R	A	H	T	P	C	T	P	H	T	S	Y	R	V	A	V	S	R	T	Q	D	T	P	A	F	G	P	A	L	P	E	G	G	G	P	F	A	A	
RapGAP1 dm	V	V	Q	P	I	E	P	N	T	P	H	T	R	Y	K	V	S	V	T	A	R	D	D	V	P	F	F	G	P	T	L	P	N	P	A	V	-	F	R	K	
RapGAP ce	V	V	Q	P	I	D	A	L	T	D	R	V	R	Y	R	V	S	V	A	A	R	D	D	V	P	F	F	G	P	T	L	P	T	P	S	I	-	F	K	R	
	360		370		380		390																																		
Rap1GAP hs	G	P	E	F	Q	E	F	L	L	T	K	L	I	N	A	E	Y	A	C	Y	K	A	E	K	F	A	K	L	E	E	R	T	R	A	A	L	L	E	T	L	
SPA1 hs	N	A	D	F	R	A	F	L	L	A	K	A	L	N	G	E	Q	A	A	G	H	A	R	Q	F	H	A	M	A	T	R	T	R	Q	Q	Y	L	Q	D	L	
SPA1 mm	N	A	D	F	R	A	F	L	L	A	K	A	L	N	G	E	Q	A	A	G	H	A	R	Q	F	H	A	M	A	T	R	T	R	Q	Q	Y	L	Q	D	L	
RapGAP1 dm	G	Q	E	F	K	E	F	I	L	T	K	L	I	N	A	E	N	A	C	Y	K	A	E	K	F	A	K	L	E	Q	R	T	R	T	S	L	L	Q	N	L	
RapGAP ce	G	Q	D	F	R	N	F	L	L	T	K	L	I	N	A	E	N	A	A	Y	K	S	S	K	F	A	K	L	A	E	R	T	R	S	S	L	L	D	G	L	

Abbildung 4-16 Identifizierung potentieller katalytischer Reste in RapGAP

Sequenzvergleich der katalytisch aktiven Bereiche bekannter RapGAP-Proteine: Rap1GAP hs = RapGAP aus *Homo sapiens*, SPA1 hs = SPA1 aus *H. sapiens*, SPA1 mm = SPA1 aus *Mus musculus*, RapGAP1 dm = RapGAP1 aus *Drosophila melanogaster*, RapGAP ce = in Aminosäuren übersetzte cDNA-Sequenz aus *Caenorhabditis elegans*. Konservierte Aminosäuren sind schwarz umrandet, vollständig konservierte AS sind schwarz hinterlegt. Farblich hinterlegt sind totalkonservierte Arginine (rot), Lysinseitenketten (grün) und Glutamine (blau), als potentiell für Phosphoryltransferreaktionen wichtige Aminosäuren. Die Numerierung bezieht sich auf die Aminosäurepositionen von humanem Rap1GAP.

4.3.2 Mutationsanalyse kritischer Argininseitenketten in Rap1GAP

Durch PCR-Mutagenese (3.2.1.7) wurden die Codons der unter 4.3.1 identifizierten Argininpositionen zu Codons für Lysin mutiert. Dieser konservative Austausch zeigt im Falle der Interaktion von Ras*GTP mit dem RasGAP NF1 bereits eine vergleichbar starke Reduktion der katalytischen Aktivität wie der Austausch zu Alanin (zirka 1800fache Reduktion, (Ahmadian *et al*, 1997)). Die Proteine wurden wie unter 3.2.2.4.3 beschrieben hergestellt und gereinigt. Im radioaktiven Aktivkohletest (3.2.2.10) wurde die Aktivität der jeweiligen Va-

riante bei 25° C in einem Ansatz bestimmt, der 100 nM der zu testenden Variante und 200 μ M Rap1A*GTP in 30 mM Tris/HCl pH7,5; 2 mM MgCl₂ sowie 3 mM DTE enthielt. Die Konzentration an Rap1A*GTP lag somit über dem zuvor für das wtGST-Rap1GAP-Fragment ermittelten K_M-Wert von 170 μ M. Pro Messung wurden mindestens 5 Zeitwerte entnommen. Zum Zeitpunkt der letzten Zeitwertnahme durfte der Umsatz der Reaktion maximal 20% betragen, um zu gewährleisten, dass sich die Reaktion noch in ihrer Initialphase befindet. Abbildung 4-17 zeigt die für die einzelnen Varianten ermittelten Werte im Vergleich zur wt-Kontrolle.

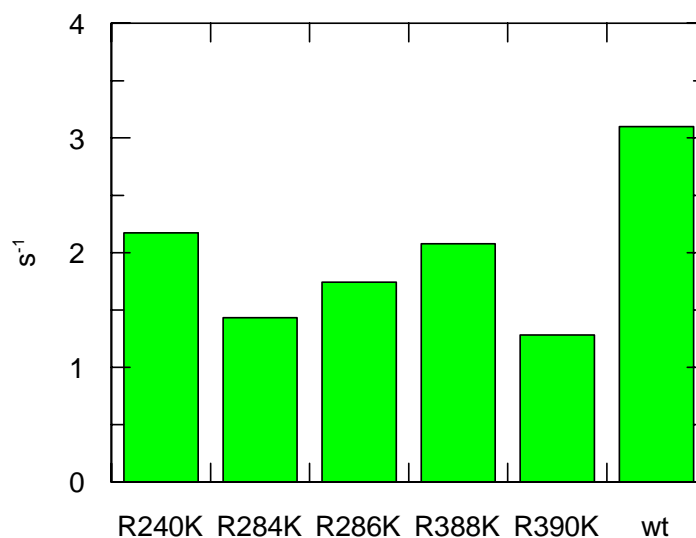


Abbildung 4-17 Aktivitätsvergleich der Lysin-Varianten von GST-Rap1GAPv

Geschwindigkeiten GTP-Hydrolysereaktion von Rap1A bei Stimulierung durch Rap1GAPv-Varianten mit Aminosäuresubstitutionen von Arginin nach Lysin an den angegebenen Positionen im Vergleich zum Wildtyp (wt). Konzentrationen: Rap1A*GTP = 200 μ M, GST-Rap1GAPv = 100 nM, T = 25°C.

Wie aus Abbildung 4-17 ersichtlich ist, zeigt die konservative Aminosäuresubstitution von Arginin durch Lysin an keiner der ausgewählten Positionen eine starke Reduktion der katalytischen Aktivität. Dies deutet möglicherweise auf einen alternativen Argininfingermechanismus hin, wie er für die Interaktion von rna1p mit Ran*GTP postuliert wurde (Hillig *et al*, 1999). Im Falle von rna1p zeigte erst ein Austausch des Arginins 74 zu Alanin dessen wichtige Rolle bei der GTP-Hydrolyse. Daher wurden auch in Rap1GAPv die konservierten Argininseitenketten durch Alaninseitenketten ersetzt und unter gleichen Bedingungen einem Aktivitätstest unterzogen (Abbildung 4-18).

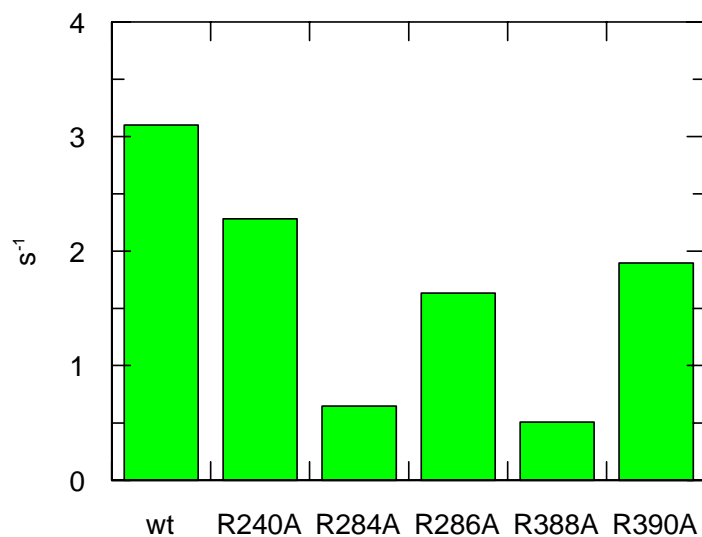


Abbildung 4-18 Aktivitätsvergleich GST-Rap1GAPv-Varianten mit Arginin-Alanin-Substitutionen

Geschwindigkeiten der GTP-Hydrolysereaktion von Rap1A bei Stimulierung durch Rap1GAPv-Varianten mit Aminosäuresubstitutionen von Arginin nach Alanin an den angegebenen Positionen im Vergleich zum Wildtyp (wt). Konzentrationen: Rap1A*GTP = 200 μ M, GST-Rap1GAPv = 100 nM.

Die Substitutionen der Arginine durch Alanin an den Aminosäurepositionen 284 und 388 bewirkten eine Verringerung der GAP-Aktivität auf zirka ein Fünftel der Aktivität des unveränderten Fragments. Um festzustellen, ob diese Reduktion auf eine direkte Beeinträchtigung der Katalyse zurückzuführen ist, was sich in einer Reduktion der maximalen Hydrolysegeschwindigkeit (k_{cat}) niederschlagen sollte, oder ob lediglich ein Bindungsdefekt, der sich in einer Verschiebung von K_M zeigen sollte, wurden beide Varianten in einer Michaelis-Menten-Kinetik untersucht.

4.3.3 Michaelis-Menten-Kinetik der Reaktion von Rap1A*GTP mit den GST-Rap1GAPv Varianten R284A und R388A

Zur Bestimmung der maximalen Geschwindigkeit der durch die GST-Rap1GAPv Varianten R284A und R388A katalysierten GTP-Hydrolysereaktion wurden die Initialgeschwindigkeiten dieser Reaktion bei verschiedenen Substratkonzentrationen (Rap1A*GTP: 1 bis 800 μ M) im Aktivkohletest (3.2.2.10) bestimmt und mit GraFit 3.0 als Michaelis-Menten-Kinetik ausgewertet. Parallel wurde das gleiche Experiment mit wt GST-Rap1GAPv als Kontrolle durchgeführt (Abbildung 4-19). Für die Reaktion von Rap1A*GTP mit GST-Rap1GAPv R284A wurde ein K_M -Wert von 860 μ M sowie ein k_{cat} -Wert von 3,8 s⁻¹ ermittelt. Im Vergleich zur Reaktion mit GST-Rap1GAPv ($K_M = 170 \mu\text{M}$, $k_{\text{cat}} = 5,6 \text{ s}^{-1}$, 4.2.9) wird die

Maximalgeschwindigkeit durch die R284A-Variante um weniger als die Hälfte reduziert, die Konzentration, bei der halbmaximale Sättigung der Reaktion auftritt, verfünffacht. Im Falle der GST-Rap1GAP-Variante R388A konnten unter den gegebenen Versuchsbedingungen keine Werte für k_{cat} und K_{M} ermittelt werden, da sich die Reaktion auch bei hohem Substratüberschuß nicht sättigen ließ. Beide Varianten weisen somit nicht die für eine Variante mit katalytischem Defekt erwartete Verminderung von k_{cat} auf. Die GTP-Hydrolysereaktion von Rap1 wird nach diesen Daten nicht über die Interaktion mit einem von GAP beigesteuerten Argininfinger beschleunigt.

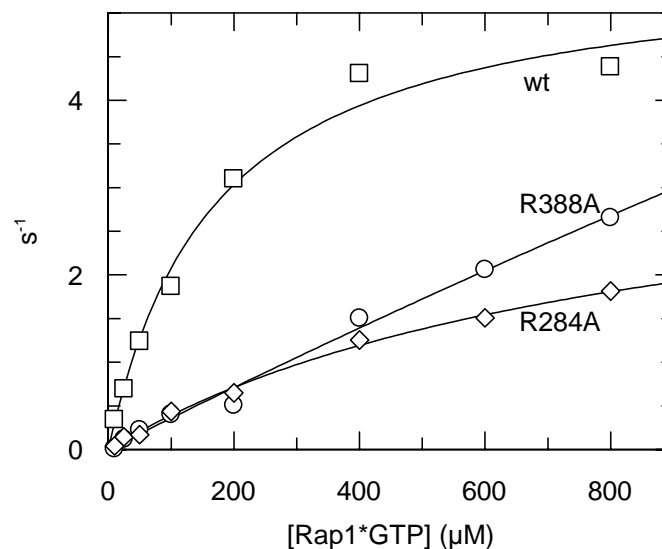


Abbildung 4-19 Michaelis-Menten-Kinetik der GAP-katalysierten GTPase von Rap1A mit den GST-Rap1GAPv Varianten R284A und R388A

Michaelis-Menten-Kinetik der durch GST-Rap1GAPv (wt) sowie dessen Varianten R284A und R388A stimulierten GTP-Hydrolysereaktion von Rap1A. Die Konzentration an Rap1GAP betrug 100 nM, $T = 25^{\circ}\text{C}$. Es wurden folgende Werte ermittelt: GST-Rap1GAPv R284A: $K_{\text{M}} = 860 \mu\text{M}$, $k_{\text{cat}} = 3,8 \text{ s}^{-1}$ (Kreise); GST-Rap1GAPv R388A: nicht sättigbar (Rauten); GST-Rap1GAPv (wt): $K_{\text{M}} = 170 \mu\text{M}$, $k_{\text{cat}} = 5,6 \text{ s}^{-1}$ (Quadrate).

4.3.4 Kinetische Untersuchung der GST-Rap1GAPv Varianten K285A, K368A, Q280A, Q281A und Q298A

Da die Substitution der konservierten Argininseitenketten des aktiven Fragments von Rap1GAP keinen Effekt erbrachte, der es erlauben würde, eine dieser Argininseitenketten als katalytisch relevanten Argininfinger einzustufen, wurden weitere konservierte Aminosäureseitenketten gesucht, die eine katalytische Funktion erfüllen können. Der in Abbildung 4-16 dargestellte Sequenzvergleich zeigt drei konservierte Glutamin- und zwei konservierte Lysin-

Seitenketten. Diese könnten aufgrund ihres polaren Charakters möglicherweise katalyse-relevant sein. Eine Glutaminseitenkette von Rap1GAP könnte eventuell das in Rap fehlende Glutamin 61 ersetzen, eine Lysinseitenkette übernimmt in Nitrogenase die Funktion eines Stabilisators des Übergangszustands (Schindelin *et al*, 1997). Analog zu den unter 4.3.2 beschriebenen Versuchen wurden mittels PCR-Mutagenese (3.2.1.7) Varianten von GST-Rap1GAPv hergestellt, in denen die konservierten Lysin-Seitenketten der Positionen 285 und 368 sowie die Glutamin-Seitenketten der Positionen 280, 281 und 298 zu Alanin ausgetauscht wurden.

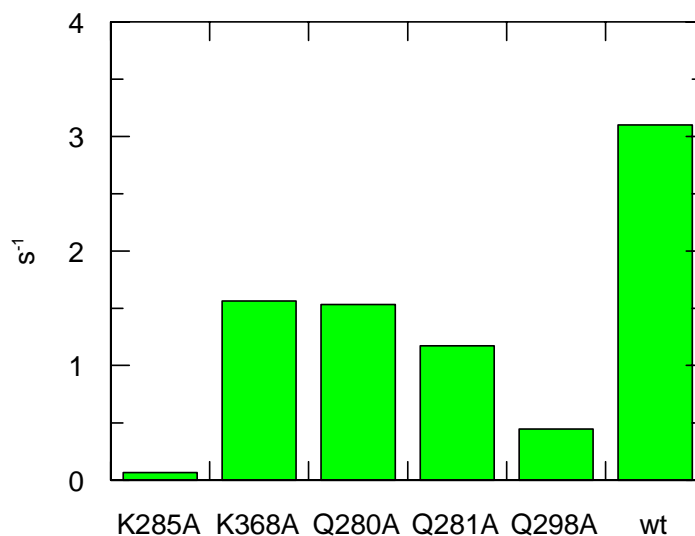


Abbildung 4-20 Aktivitätsvergleich GST-Rap1GAPv-Varianten mit Lysin zu Alanin und Glutamin zu Alanin Substitutionen

Initiale Geschwindigkeiten der GTP-Hydrolysereaktion von Rap1A bei Stimulierung durch Rap1GAPv-Varianten mit Aminosäuresubstitutionen von Lysin/Glutamin durch Alanin an den angegebenen Positionen im Vergleich zum Wildtyp (wt). Konzentrationen: Rap1A*GTP = 200 μ M, GST-Rap1GAPv = 100 nM, T = 25°C.

Ihre katalytische Aktivität wurde ebenfalls im Aktivkohletestverfahren unter den oben (4.3.2) beschriebenen Bedingungen bestimmt (Abbildung 4-20). Die Varianten Q298A und K285A weisen deutlich reduzierte Aktivitäten auf.

GST-Rap1GAPv Q298A ist bei der eingesetzten Rap1A*GTP-Konzentration von 200 μ M zirka sechsfach weniger aktiv als GST-Rap1GAPv wt. Im Falle der K285A Variante liegt eine über 80fache Reduktion der GTP-Hydrolysegeschwindigkeit vor.

4.3.5 Circular dichroismus-Spektrum von Rap1GAPv K285A

Um auszuschließen, dass die reduzierte Aktivität der Rap1GAPv Variante K285A auf eine durch die Aminosäuresubstitution gestörte Konformation zurückzuführen ist, wurde sie unter den gleichen Bedingungen wie Rap1GAPv (4.2.3) im CD-Spektrometer untersucht. Die Abspaltung des GST-tag erfolgte ebenfalls wie unter 4.2.3 beschrieben.

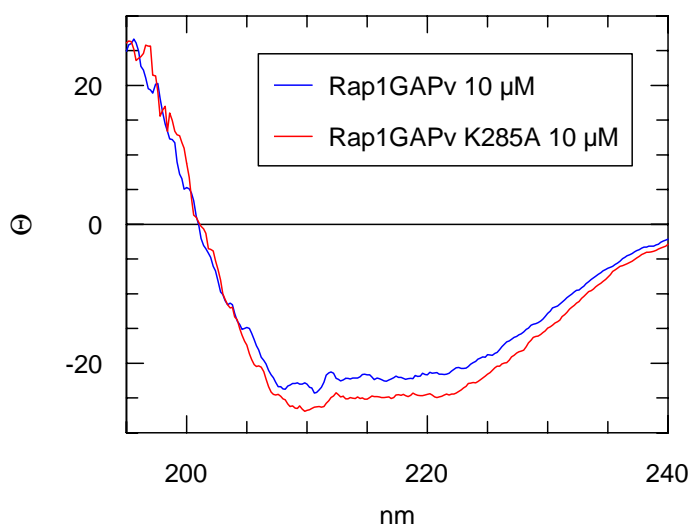


Abbildung 4-21 Vergleich der CD-Spektren von Rap1GAPv und Rap1GAPv K285A

Wellenlängenbereich 195 bis 240 nm, *Scan*-Geschwindigkeit 50 nm/min, Bandbreite 1 nm, Auflösung 0,2 nm, Empfindlichkeit 50 mdeg, Zeitkonstante 1s. Die Spektren wurden 25fach akkumuliert.

Beide Spektren zeigen einen sehr ähnlichen Verlauf, was darauf hindeutet, dass beide Proteine über eine ähnlich Sekundärstrukturzusammensetzung verfügen. Dies bestätigt auch die Sekundärstrukturvorhersage durch das Programm *Secondary Structure Estimation* (4.2.3), die in Tabelle 4-2 dargestellt sind.

	Rap1GAPv	Rap1GAPv K285A
Sekundärstruktur	Anteil in %	Anteil in %
α -Helix	26,1	27,0
Beta-Faltblatt	31,9	27,5
Turn	14,9	17,2
Random	27,1	28,3
Total	100	100

Tabelle 4-2 Vergleich der Sekundärstrukturvorhersagen für Rap1GAPv und Rap1GAPv K285A

Vergleich der Abschätzung der Sekundärstrukturanteile durch das Programm *Secondary Structure Estimation* für Rap1GAPv und Rap1GAPv K285A.

Die Werte der Tabelle zeigen, dass es sich auch bei Rap1GAPv K285A um ein aus α -Helices und β -Faltblättern zusammengesetztes Protein handelt. Die Anteile der berechneten Werte für β -Faltblätter unterscheiden sich zwar bei 4,4 %, dennoch kann aufgrund des weitgehend parallelen Verlaufs beider Spektren von einer weitgehenden strukturellen Homologie beider Proteine ausgegangen werden. Damit folgt für die Aminosäureseitenkette K285, dass sie entweder eine wichtige Rolle bei der Bindung von Rap1GAP an Rap1 spielt, oder aber direkt an der GTP-Hydrolysereaktion beteiligt ist.

4.3.6 Michaelis-Menten-Kinetik der Reaktion von Rap1A*GTP mit der GST-Rap1GAPv Varianten K285A

Um den Effekt der Variante K285A auf die GTP-Hydrolyse von Rap1B*GTP zu bestimmen, wurde zunächst in einem Vorversuch eine Konzentration von GST-Rap1GAPv K285A ermittelt, bei der sich ein im Aktivkohletest (3.2.2.10) messbarer Effekt zeigt. Gemessen wurde der Effekt dreier Konzentrationen von GST-Rap1GAP K285A (0,1; 1 und 10 μ M), die mit 200 μ M Rap1A*GTP inkubiert wurden (Abbildung 4-22).

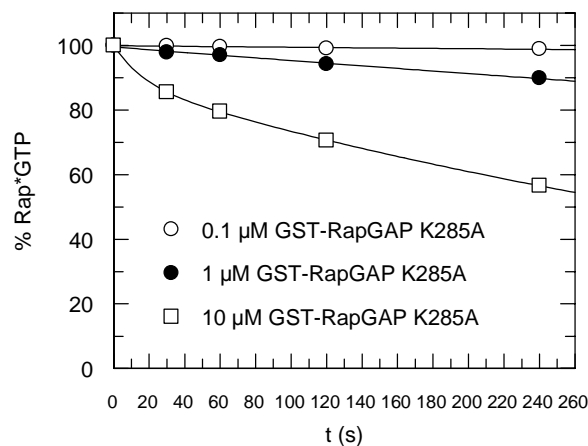


Abbildung 4-22 Einfluss unterschiedlicher Konzentrationen an GST-Rap1GAPv K285A auf die GTP-Hydrolysereaktion von Rap1B

Im Aktivkohletestverfahren wurde der Effekt von 0,1 μ M, 1 μ M und 10 μ M auf die GTPase-Reaktion von 200 μ M Rap1B*GTP bei 25°C getestet. Puffer: 30 mM Tris/HCl pH 7,4; 3 mM DTE, 2 mM MgCl₂.

Aufgrund dieser Daten wurde die folgende Michaelis-Menten-Kinetik mit einer Konzentration an GST-Rap1GAP K285A von 5 μ M durchgeführt.

Die Michaelis-Menten-Kinetik der von GST-Rap1GAP K285A katalysierten GTPase von Rap1B weist eine im Vergleich zur Reaktion mit GST-Rap1GAPv wt deutlich reduzierte Ge-

schwindigkeit auf. Eine Berechnung der kinetischen Konstanten nach Michaelis-Menten ist aufgrund der nicht erreichten Sättigung nicht möglich.

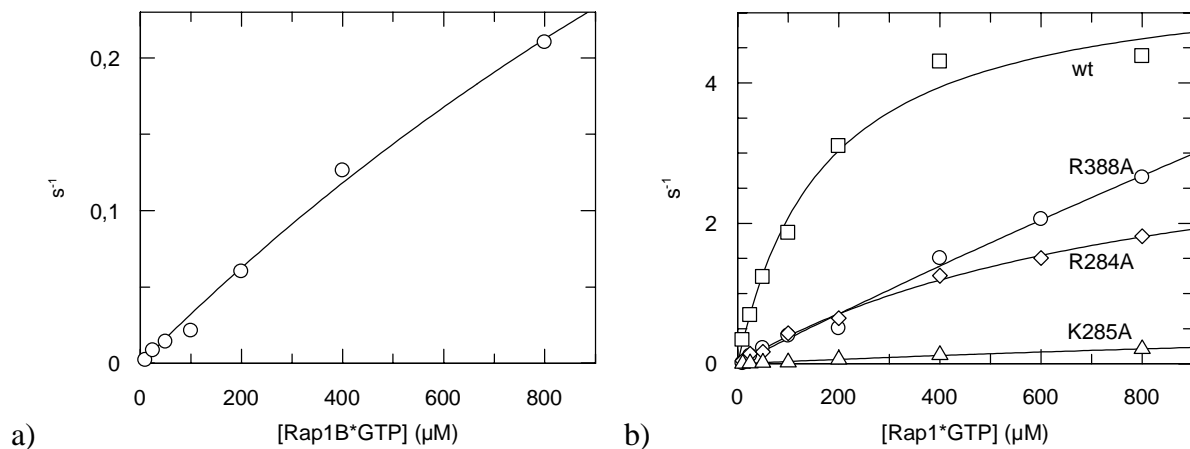


Abbildung 4-23 Michaelis-Menten-Kinetik der Reaktion von GST-Rap1GAP K285A mit Rap1B*GTP

a) zeigt die bei 7 verschiedenen Konzentrationen bestimmten, durch $5 \mu M$ GST-Rap1GAPv K285A katalysierten GTP-Hydrolysereaktion von Rap1B ($25^\circ C$, Puffer: $30 \text{ mM Tris/HCl pH } 7,4$; 3 mM DTE , 2 mM MgCl_2), b) stellt die Messung von a) im Kontext der unter 4.3.3 beschriebenen Messungen dar.

Auf eine genauere Bestimmung der kinetischen Parameter wurde aufgrund der einzusetzenden hohen Proteinkonzentrationen verzichtet. Beim Vergleich der bei der höchsten getesteten Konzentration ($800 \mu M$) ermittelten GTP-Hydrolyse-Geschwindigkeit der Variante K285A ($0,21 \text{ s}^{-1}$) mit der von Rap1GAPv wt ($4,3 \text{ s}^{-1}$) ergibt sich eine 20,8fache Verlangsamung. Lysin 285 ist daher guter Kandidat für eine katalytisch relevante Aminosäureseitenkette von Rap1GAP.

4.4 Einfluss der Aminosäureposition 32 auf die GAP-katalysierte GTP-Hydrolysereaktion von Rap1A

Der Austausch der Aminosäure Tyrosin 32 gegen Tryptophan in Ras behindert die RasGAP-katalysierte GTP-Hydrolysereaktion nicht und zeigt eine Änderung des Tryptophanfluoreszenzsignals, die mit der Hydrolyse des GTP korreliert (Ahmadian *et al*, 1999; Rensland *et al*, 1995; Yamasaki *et al*, 1994). Aufgrund dieser Beobachtung wurde eine analoge Aminosäuresubstitution in Rap1A vorgenommen, um die mit dem Aktivkohletest gewonnenen Daten mit einer alternativen Methode zu überprüfen. Qualitative Tests, bei denen $10 \mu M$ Rap1A Y32W nach Beladung mit GTP (3.2.2.8) bei RT für 5 min mit 100 nM Rap1GAPv inkubiert wurden, zeigten jedoch keine Beschleunigung der GTP-Hydrolysereaktion (Daten nicht gezeigt). Eine kinetische Untersuchung nach Michaelis-Menten mit der radioaktiven Aktivkohlemethode

(3.2.2.10) bestätigte diesen Befund (Abbildung 4-24). Möglicherweise ist eine sterische Behinderung der Interaktion von Rap1A mit Rap1GAP durch die Tryptophanseitenkette die Ursache für die fehlende GTPase-Beschleunigung.

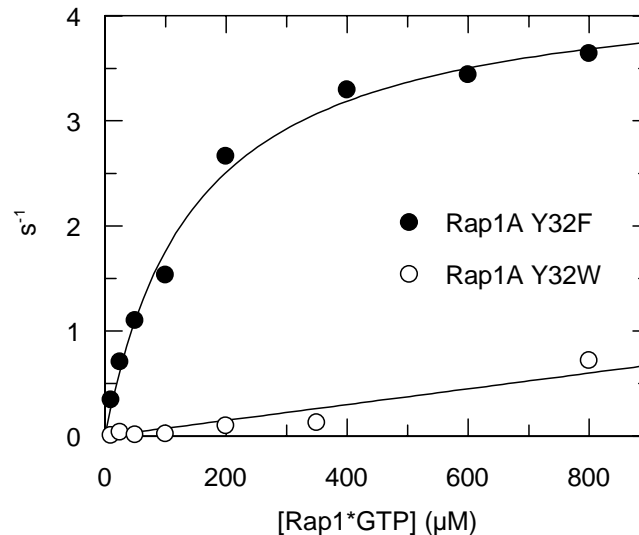


Abbildung 4-24 GST-Rap1GAPv katalysierte GTPase-Reaktion der Rap1A-Varianten Y32W und Y32F

Michaelis-Menten-Kinetik mit 100 nM GST-Rap1GAPv und steigenden Konzentrationen an Rap1A Y32W*GTP, beziehungsweise Rap1A Y32F. Da Rap1A Y32F über eine kaum vom wt zu unterscheidende GAP-stimulierbare GTPase-Funktion verfügt, ist ein katalytischer Einfluss der Hydroxylgruppe von Tyrosin 32 auszuschließen. Für Rap1A Y32F wurden folgende kinetische Parameter ermittelt: $k_{\text{cat}} = 4,4 \text{ s}^{-1}$, $K_M = 137 \text{ µM}$, $T = 25^\circ\text{C}$

Zur Untersuchung eines möglichen Einflusses der Hydroxylgruppe der Tyrosin 32-Seitenkette, wurde mittels PCR-Mutagenese (3.2.1.7) eine Rap1A-Variante mit einer Phenylalaninseitenkette an Position 32 hergestellt. Unter gleichen Bedingungen wie bei Rap1A und Rap1A Y32W wurde mit GST-Rap1GAP und Rap1A Y32F eine Michaelis-Menten-Kinetik aufgenommen. Abbildung 4-24 zeigt das Resultat dieser Messung. Eine Auswertung der Daten mit dem Programm GraFit 3.0 ergab für Rap1A Y32F ähnliche kinetische Parameter wie für Rap1A wt ($k_{\text{cat}} = 4,4 \text{ s}^{-1}$, $K_M = 137 \text{ µM}$; 4.2.9), so dass ein direkter Einfluss der Hydroxylgruppe von Tyrosin 32 auf die Rap1GAP katalysierte GTP-Hydrolysereaktion auszuschließen ist.

4.5 Die GAP-katalysierte GTPase-Reaktion der Rap1A-Variante G12V

Für die Charakterisierung der zellulären Aufgaben von Rap ist es nützlich, über eine Variante zu verfügen, die konstitutiv im aktiven Zustand verharrt, um herauszufinden, welche

Effektoren durch Rap aktiviert werden. Im Falle von Ras erfüllt die onkogene Variante G12V diesen Zweck. Da in dieser Arbeit bereits gezeigt wurde, dass die Rap1GAP-katalysierte GTP-Hydrolyse-Reaktion von Rap1 einem anderen Mechanismus folgt als die RasGAP katalysierte von GTP-Hydrolyse-Reaktion von Ras, stellt sich die Frage, ob der Aminosäureposition 12 in Rap eine mit Ras vergleichbare Rolle für diese Reaktion zukommt. Dazu wurden mit Hilfe des Aktivkohletests (3.2.2.10) kinetische Daten der intrinsischen und der von 100 nM GST-Rap1GAPv katalysierten GTP-Hydrolyse-Reaktion von Rap1A G12V*GTP (200 μ M) im Vergleich zu Rap1A*GTP (200 μ M) bei T = 30° C bestimmt.

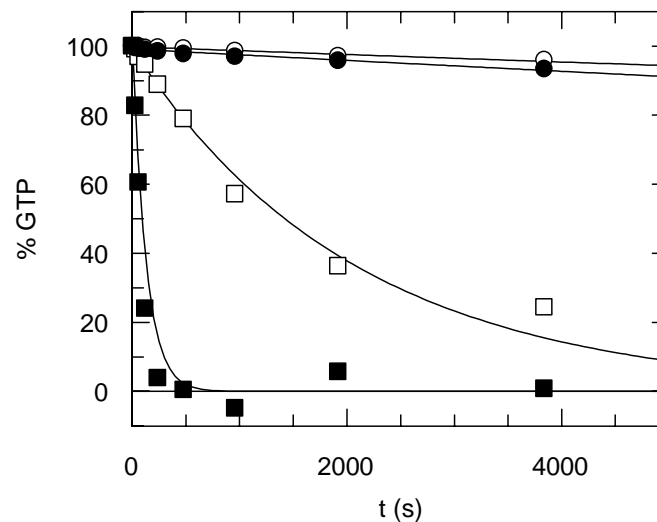


Abbildung 4-25 Intrinsische und GST-Rap1GAPv katalysierte GTPase-Reaktion von Rap1A G12V im Vergleich zu Rap1A wt

Die GTPase-Funktion der Rap1A Variante G12V ist durch GST-Rap1GAPv-stimulierbar. Geschlossene Symbole: Rap1A wt; offene Symbole: Rap1A G12V; Kreise: intrinsische GTPase; Quadrate: GST-Rap1GAP katalysierte GTPase-Reaktion; Konzentrationen: Rap1A*GTP = 200 μ M, GST-Rap1GAPv 100 nM, T = 30 °C. Geschwindigkeit der GAP-stimulierten GTPase: 78 μ M s⁻¹ (Rap1A wt); 9 μ M s⁻¹ (Rap1A G12V).

Die Geschwindigkeit der GAP-katalysierten Reaktion betrug in dieser Messung für Rap1A wt 78 μ M s⁻¹, für die G12V Variante 9 μ M s⁻¹. Die intrinsischen Hydrolysegeschwindigkeiten betragen 3,4 x 10⁻³ μ M s⁻¹ im Falle von Rap1A wt und 2,2 x 10⁻³ μ M s⁻¹ bei Rap1A G12V. Unter den gegebenen experimentellen Bedingungen ist die durch GST-Rap1GAPv aktivierte GTPase von Rap1A G12V zirka 8,6 fach langsamer als Rap1A wt. Dennoch kann nicht davon ausgegangen werden, dass es sich bei Rap1A G12V um eine konstitutiv aktive Variante handelt, wie es bei Ras G12V der Fall ist.

4.6 *RalGDS-RBD* inhibiert die *GST-Rap1GAP* katalysierte *GTPase-Reaktion* von *Rap1A*

Ral-GDS (*Ral-Guaninnucleotide Dissociation Stimulator*) ist ein Austauschfaktor für die kleine GTPase *Ral*, der über eine **Ras-bindende Domäne** (RBD) verfügt (Kikuchi *et al.*, 1994). Diese interagiert mit der Effektorschleife von *Ras* und *Rap* (Herrmann *et al.*, 1996). Die Bindung von *Ral-GDS* an *Rap* inhibiert die Stimulierung der GTP-Hydrolyse durch *Rap1GAP* (Herrmann *et al.*, 1996), da wahrscheinlich beide Proteine um dieselbe Bindungsstelle konkurrieren. Um zu überprüfen, ob dieser Effekt auch bei der Interaktion mit *Rap1GAPv* zu beobachten ist, wurden die Anfangsgeschwindigkeiten der *Rap1GAPv* stimulierten GTP-Hydrolysereaktion von *Rap1B* in Gegenwart verschiedener Konzentrationen von *Ral-GDS*¹⁷ gemessen (Abbildung 4-26).

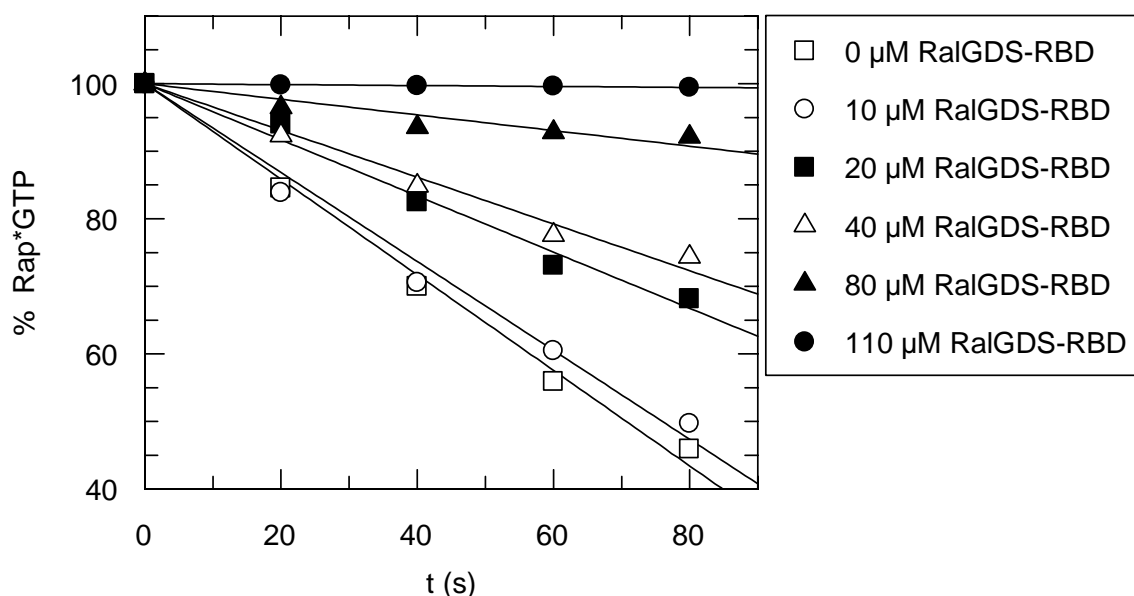


Abbildung 4-26 Inhibition der GAP-katalysierten GTP-Hydrolyse-Reaktion von *Rap1A*

Dargestellt ist die Reaktion von 60 μM *Rap*GTP* mit 100 nM *GST-Rap1GAP* bei 25°C in Gegenwart variierender Konzentrationen von *RalGDS-RBD*.

Auch diese Untersuchung wurde mittels des Aktivkohle-Verfahrens zur Bestimmung freigesetzten Phosphats durchgeführt (3.2.2.10). In Gegenwart von 110 μM *RalGDS-RBD* ließ sich die Reaktion von 60 μM *Rap1B*GTP* mit 100 nM *GST-Rap1GAPv* vollständig inhibieren.

¹⁷ *Ral-GDS RBD* wurde freundlicherweise von Michael Spörner zur Verfügung gestellt.

4.7 Herstellung von fluoreszenzmarkierten Rap1-Varianten

Die Fluoreszenzspektroskopie stellt eine empfindliche und hochauflösende Methode zur Untersuchung der Interaktionen von Proteinen dar (Pingoud & Urbanke, 1997). Fehlt ein natürlicher Fluorophor, wie zum Beispiel Tryptophan, oder liegt er an einer für die zu untersuchende Interaktion ungünstigen Stelle, so besteht die Möglichkeit, einen oder beide Interaktionspartner mit einem artifiziellen Fluorophor, zum Beispiel IAEDANS zu markieren (3.2.2.17). Für die Kopplung eines Fluorophors an ein Protein bieten sich die Sulfhydrylgruppen von Cysteinen an. Verfügt das Protein nicht über Cysteine, oder liegen diese an für Lösungsmittel unzugänglichen Stellen des Proteins, so können diese über eine gerichtete Mutagenese eingeführt werden. In Analogie zu der bei Ras bereits erfolgreich erprobten Fluoreszenzmarkierung an der Aminosäurepositionen Alanin 86, die ein mit dem Übergangszustand der GTP-Hydrolysereaktion korrelierbares Fluoreszenzsignal liefert (Astrid Krämer, persönliche Mitteilung) sollte eine analoge Markierung auch in Rap1 eingefügt werden. Aminosäureposition Asparagin 91 wurde ausgewählt, da sie der Kristallstruktur von Nassar *et al* (1995) eine gut zugängliche Aminosäureseitenkette in der Nähe der prospektiv mit Rap1GAP interagierenden Region darstellt. Da sich an diesen Positionen keine Cysteinseitenketten befinden, ist es zum einen notwendig, Rap1-Varianten mit Cysteinen an diesen Stellen zu erzeugen und zum anderen unerlässlich, die weiteren Cysteinseitenketten aus Rap1 zu entfernen, zumindest soweit sie für eine Markierungsreaktion zugänglich sind. Rap1B weist gegenüber Rap1A den Vorteil auf, lediglich über drei Cysteinseitenketten zu verfügen (im Gegensatz zu fünf bei Rap1A), was im Falle einer Zugänglichkeit für die Markierungsreaktion die Zahl der notwendigen Mutagenesen reduziert. Rap1B wurde daher zunächst – wie unter 3.2.2.17 beschrieben – einer Markierungsreaktion mit IAEDANS unterzogen. Der Test einer 600 nM Lösung des Proteins nach der Markierungsreaktion in einem Wellenlängenbereich von 400 bis 600 nm im Fluoreszenzspektrometer zeigte nur eine sehr schwache Fluoreszenz (maximale relative Fluoreszenz $0,6 \cdot 10^{-6}$ bei 480 nm bei Schlitzbreiten von 2 nm bei der Anregung und 4 nm bei der Detektion), die eventuell auch auf im Puffer verbliebene IAEDANS-Rückstände zurückzuführen sein könnte (Daten nicht gezeigt). Zur Klärung dieser Frage wurde ein Massenspektrum angefertigt (3.2.3.6), das Abbildung 4-27 zeigt.

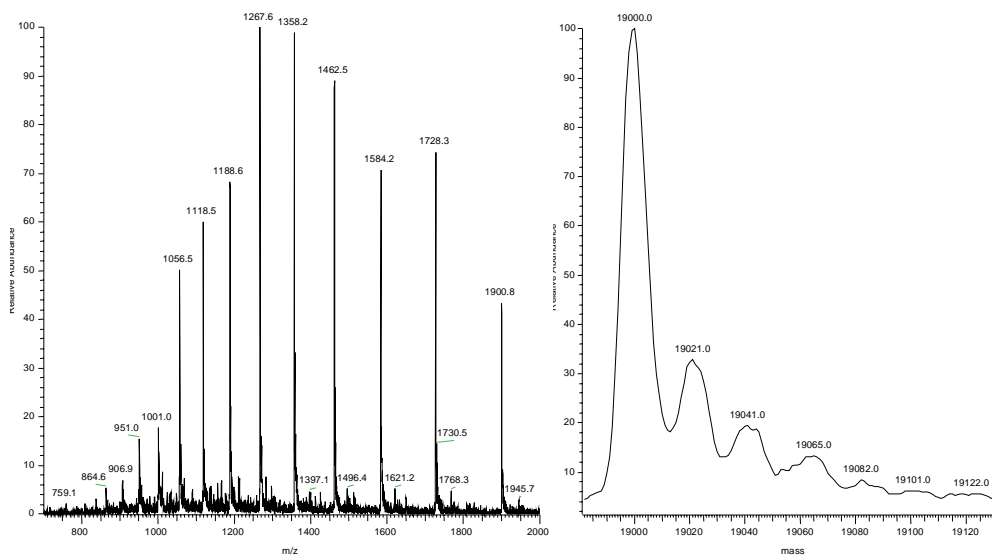


Abbildung 4-27 Massenspektrum von Rap1B nach IAEDANS-Markierungsreaktion

Links das Originalspektrum, rechts das dekonvolierte Massenspektrum der Messung von Rap1B. Die erwarteten Molekulargewichte betragen für unmarkiertes Rap1B 19000 Da für IAEDANS markiertes 19306 Da.

Die Masse von 19000 Da stimmt mit dem Erwartungswert für nichtmarkiertes Rap1B überein. Bei einer Masse von 19306 Da, die dem Erwartungswert für markiertes Rap1B entspricht, ist kein signifikantes Signal zu erkennen. Da Rap1B nach diesen Daten keine für die Markierung mit IAEDANS zugänglichen Cysteinseitenketten besitzt, wurde auf eine Substitution der in der Sequenz vorhandenen Cysteinseitenketten durch Serinseitenketten verzichtet. An den Positionen 86 und 91 wurden die gewünschten Cysteinseitenketten durch PCR-Mutagenese des ptacRap1B-Vektors nach der Quick-Change-Methode (3.2.1.7.2) eingeführt. Nach Expression der Plasmide wurden die Proteine gereinigt (3.2.2.4), einer Markierungsreaktion mit IAEDANS unterzogen und massenspektrometrisch (3.2.3.6) überprüft (Abbildung 4-28). Hierbei zeigte sich, dass die Markierungsreaktion in beiden Ansätzen erfolgreich verlaufen ist. Aufgrund des möglicherweise unterschiedlichen Verhaltens von markiertem und unmarkiertem Protein im elektrischen Feld des Massenspektrometers lassen sich allerdings über die genauen Verhältnisse von markiertem zu unmarkiertem Protein keine Aussagen machen.

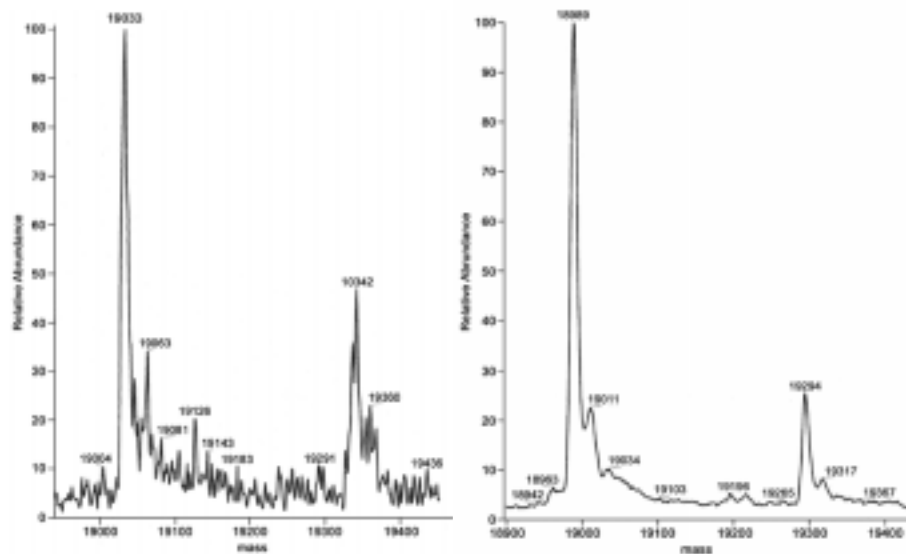


Abbildung 4-28 Massenspektren von Rap1B A86C und Rap1B N91C nach der Markierungsreaktion mit IAEDANS

Dargestellt sind die dekonvolierten Spektren der massenspektrometrischen Analyse der Rap1B-Varianten A86C und N91C nach der Markierungsreaktion mit IAEDANS. Die Massen der unmarkierten Proteine betragen 19033 Da (Rap1B A86C) und 18989 Da (Rap1B N91C), für die IAEDANS-markierten Proteine erhöhen sich diese Werte um 306 Da auf 19339 Da und 19295 Da. Die Abweichungen von maximal 3 Da liegen innerhalb der Fehlergrenze des Massenspektrometers.

4.7.1 Spektren der IAEDANS-markierten Rap1B-Varianten

Zur Charakterisierung der Fluoreszenzeigenschaften der beiden IAEDANS-markierten Rap1B-Varianten A86C und N91C wurden im FluoroMax II Spektrofluorimeter je ein Anregungsspektrum und ein Emissionsspektrum der Varianten bei einer Proteinkonzentration von 100 nM aufgenommen (3.2.3.5). Dabei konnte für beide Varianten maximale Emission bei 492 nm sowie maximale Exzitation bei 338 nm beobachtet werden (Abbildung 4-29).

Zur Charakterisierung der Interaktion der IAEDANS-markierten Rap1B-Varianten wurden Vorversuche mit GST-Rap1GAPv und beiden markierten Varianten durchgeführt. Hierzu wurde 100 nM Rap1B A86C*GppNHp (in 30 mM Tris/HCl pH 7,4; 5 mM MgCl₂ und 3 mM DTE) in einer Fluoreszenzküvette vorgelegt und GST-Rap1GAPv in Konzentrationen bis zu 10 µM hinzugegeben. Die Messungen wurden bei einer Anregungswellenlänge von 338 nm und einem Detektionsbereich von 440 bis 550 nm durchgeführt (Daten nicht gezeigt). Es wurde hierbei eine geringe Fluoreszenzniedrigung in Kombination mit einer leichten Verschiebung des Emissionsspektrums in kürzere Wellenlängenbereiche beobachtet. Dies

weist auf eine beginnende Präzipitation der Proteine hin, die bei weiterer Erhöhung der GST-Rap1GAP-Konzentration auch mit dem bloßen Auge wahrzunehmen war.

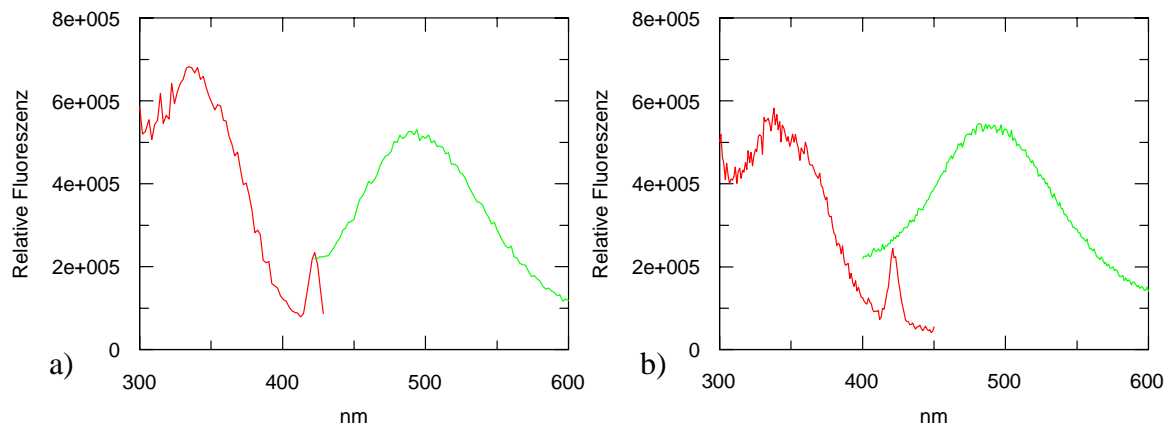


Abbildung 4-29 Exzitations- und Emissionsspektren der Rap1B-Varianten A86C und N91C

a) Rap1b A86C, b) Rap1b 91C. Rot: Exzitationspektren (Detektionswellenlänge: 490 nm), Grün: Emissionsspektren (Anregungswellenlänge: 338 nm). Maximale Emission beider Varianten bei 492 nm, maximale Exzitation bei 338 nm. Puffer: 50 mM Tris/HCl, 5 mM MgCl₂, 3 mM DTE. Spaltblenden: 2 nm (Anregung), 4 nm (Detektion).

Dies könnte zur Folge haben, dass auch mittels der IAEDANS-markierten Rap1B-Proteine Interaktionsmessung nur in eng begrenzten Konzentrationsbereichen durchzuführen sind.

5 Diskussion

5.1 Test von Peptidbibliotheken auf RasGAP-Aktivität

GTPase aktivierende Proteine sind wichtige Regulatoren kleiner GTPasen. Schwerwiegende Probleme bei der zellulären Signaltransduktion können die Folge sein, wenn diese Regulation aufgrund von Mutationen gestört ist. Mutationen im Gen der kleinen GTPase Ras, deren Folge eine Störung der Interaktion mit RasGAP ist, sind an der Entstehung von 20% aller menschlichen Tumore beteiligt. Die Entwicklung einer Verbindung, die in der Lage ist, die GTPase-Reaktion auch onkogener Varianten von Ras zu stimulieren, ist daher ein lohnendes Ziel (Wittinghofer & Waldmann, 2000).

Ausgehend von der strukturellen Kenntnis des Übergangszustandes der GAP-katalysierten GTPase Reaktion (Scheffzek *et al*, 1997) wurden in der vorliegenden Arbeit kombinatorische Bibliotheken aus Nonapeptiden entworfen und hergestellt. Die Sequenzen der einzelnen Peptide bestanden sowohl aus zufällig ausgewählten Aminosäuren als auch aus einem definierten Kern, der Aminosäuretriade RGQ. Die Bibliotheken wurden parallel nach der sogenannten SPOT-Synthese-Methode (Frank & Overwin, 1996) hergestellt. Diese Methode wurde bislang hauptsächlich zur Charakterisierung von Epitopen in Verbindung mit Antikörper-gekoppelten Nachweismethoden verwendet wurde (Beck-Sickinger & Weber, 1999; Niebuhr *et al*, 1997), bei denen lediglich Bindung von Proteinen nachgewiesen werden sollte. Um die Peptidbibliotheken auf RasGAP-Aktivität testen zu können, musste eigens ein Testverfahren hierfür etabliert werden (3.2.2.13). Die Identifikation eines Peptids mit RasGAP-Aktivität würde die Basis liefern für die auf strukturelle Analysen des Peptids gestützte Entwicklung von Medikamenten gegen Tumore mit Ras-Mutationen.

Bei der Durchführung der unter 4.1 beschriebenen Experimente konnte kein Peptid mit RasGAP-Aktivität identifiziert werden. Die Ursachen hierfür können vielfältig sein, die Diskussion soll jedoch auf zwei Ursachen und mögliche Ansätze zu ihrer Überwindung fokussiert werden.

Zum einen ist möglicherweise die Affinität der Peptide zu Ras*GTP zu gering, um mit den bei der SPOT-Synthese (3.2.2.12) zu erzielenden Peptid-Konzentrationen einen meßbaren Effekt zu erhalten. Es wurde bewußt auf die Selektion hochaffin an Ras bindender Peptide verzichtet, wie sie beispielsweise über einen *phage-display*-Ansatz (Kay *et al*, 1996) hätte

erreicht werden können. Eine starke Bindung der Peptide war verzichtbar, da vorerst lediglich eine Steigerung der intrinsischen Hydrolyserate von wt Ras um den Faktor 2 angestrebt wurde. Denn die Ras-Variante G12P, die über eine zweifach beschleunigte intrinsische GTPase-Reaktion verfügt, stellt die einzige nicht tumorinduzierend wirkende Ras-Variante mit einer Aminosäuresubstitution an Position 12 dar (Ahmadian *et al*, 1999). Eine zweifache Beschleunigung der GTP-Hydrolyse bedarf keiner Bindung des GTPase-aktivierenden Wirkstoffes in der Stärke der Interaktion von Ras mit NF1 voraus ($K_D = 0,13 \mu\text{M}$, Ahmadian *et al*, 1997).

Innerhalb einer Unterbibliothek sind in 100 μl Ansatzvolumen 150 μM Peptide enthalten. Diese stimmen allerdings nur in ihrer Kernsequenz aus 5 Aminosäuren überein. Unter Berücksichtigung der zufälligen Randsequenzen liegt die minimale Konzentration für Peptide einer Sequenz bei 1 bis 5 nM. Die lokale Konzentration der Peptide ist jedoch wesentlich höher anzusetzen, da sie zweidimensional verteilt sind. Die zweidimensionale Verteilung der Peptide kann jedoch auch von Nachteil sein, da sie möglicherweise so nicht ins aktive Zentrum von Ras vordringen können. Ob diese Konzentrationen zu gering sind, oder ob die synthetisierten Peptide nicht über die Eigenschaften von GAP verfügen, läßt sich aufgrund der durchgeführten Experimente nicht ermitteln.

Die Konzentration einzelner Sequenzen läßt sich bei vorgegebener Synthesekapazität nur auf Kosten der Komplexität der Bibliothek erhöhen. Eine rationale Strategie bestünde zum Beispiel in der computergestützten Generierung von Zufallssequenzen um einen festgelegten Kern, von denen dann ebenfalls computergestützt eine bestimmte Anzahl für die Synthese ausgewählt wird, so dass pro Synthesefleck nur eine oder wenige verschiedene Sequenzen hergestellt werden. Möglicherweise wäre dies ein geeigneterer Ansatz, um über eine Peptid-Bibliothek zu einem Leitpeptid und über dieses zu einer Leitstruktur für eine GTPase stimulierende Substanz zu gelangen.

Ein weiterer möglicher Weg zu einer solchen Leitstruktur besteht in der Synthese organisch-chemischer Substanzbibliotheken. Ein Nachteil von Peptiden ist ihre geringe Rigidität. Cyclisierung der Peptide reduziert zwar die Anzahl der Freiheitsgrade, dennoch ist die Struktur-unbestimmtheit von Peptiden um Größenordnungen größer als die von stabilen Ringsystemen. Eine geringere Anzahl von Freiheitsgraden reduziert zwar die Möglichkeiten einer Interaktion nach dem *induced-fit* Prinzip, bietet aber Vorteile hinsichtlich der Bestimmung der wirksamen

Struktur. Erste Ansätze für die Grundstrukturen einer solchen Bibliothek können aus den Untersuchungen von (Ahmadian *et al*, 1999) erwachsen, der eine starke Beschleunigung der intrinsischen Hydrolyse eines an onkogenes Ras gebundenen GTP-Analogons (DABP-GTP) beobachtete. Eine Aufklärung des Mechanismus der DABP-GTP beschleunigten Hydrolyse könnte wertvolle Hinweise auf die Bedingungen geben, die eine mögliche Leitsubstanz erfüllen muss (1.3.5).

Eine alternative Strategie zur Identifizierung eines Proteins mit GAP-Aktivität gegenüber onkogenem Ras besteht in der Zufallsmutagenese der DNA-Abschitte, die der Arginin-Fingerregion des GAP-Gens entsprechen. Mit Vektoren, die diese mutierte DNA enthalten, können Hefezellen transfiziert werden, die aufgrund einer (bei humanem Ras onkogenen) Mutation im *Ras2*-Gen konditional letale Eigenschaften aufweisen. Diese Hefen überstehen einen Hitzeschock nur, wenn das Produkt des mutierten GAP-Gens, die Fähigkeit besitzt, das konstitutiv aktive Ras zu inaktivieren (Ruggieri *et al*, 1994). Aus der Struktur eines solchen GAP lassen sich wertvolle Informationen für die Entwicklung von Leitstrukturen für die Wirkstoffsynthese gewinnen.

Die Suche nach einem Wirkstoff, der direkt am defekten GTPase-Mechanismus von onkogenem Ras ansetzt, bleibt eine lohnende Herausforderung, da eine derartige Substanz im Hinblick auf große Spezifität entworfen werden kann, und so eine sehr gezielte Behandlung von Ras-bedingten Tumoren ermöglicht, die voraussichtlich nur geringe Nebenwirkungen hervorrufen wird.

5.2 Interaktion von Rap1 und Rap1GAP

Argininseitenketten spielen eine wichtige Rolle bei der enzymatischen Phosphorylübertragung. So besitzen zum Beispiel Nukleosidmonophosphatkinasen wie die Adenylat-Kinase oder die Uridylat-Kinase eine Reihe von katalytisch wichtigen Arginin-Seitenketten (Vetter & Wittinghofer, 1999). Auch bei den regulatorischen G-Proteinen und den kleinen GTPasen spielen Argininseitenketten wichtige katalytische Rollen.

Die Bestätigung der Arginin-Fingerhypothese für die Interaktion von Ras und RasGAP sowie Rho und RhoGAP (Ahmadian *et al*, 1997; Rittinger *et al*, 1997b; Scheffzek *et al*, 1997) legen die Annahme nahe, dass es sich bei der Arginin-unterstützten GTP-Hydrolyse um ein bei nahezu allen GTPasen verwirklichtes Prinzip handelt. Weiter gestützt wird diese Hypothese durch die Tatsache, dass der für die Katalyse der GTP-Hydrolyse von Ras durch RasGAP *in trans* beigesteuerte Argininfinger auch bei G-Proteinen zu finden ist. Die α -Untereinheiten heterotrimerer G-Proteine verfügen zwar auch über eine Ras-ähnliche G-Domäne, doch ist diese um eine weitere α -Helix erweitert, die eine Argininseitenkette zum aktiven Zentrum des Proteins beisteuert (Coleman *et al*, 1994; Scheffzek *et al*, 1998; Sondek *et al*, 1994). Auch für die GTP-Hydrolysereaktion der kleinen GTPase Ran ist ein katalytisch wichtiges Arginin identifiziert worden (Hillig *et al*, 1999). Weitere Beispiele sind der Elongationsfaktor G (Mohr *et al*, 2000) und die kleine GTPase YPT/Rab (Albert *et al*, 1999), deren GAP ebenfalls über einen Argininfinger verfügt. Die Tatsache, dass sich im Zuge der Strukturaufklärung von ARF und ARFGAP (Goldberg, 1999) kein Argininfinger zeigen lies, ist möglicherweise auch darauf zurückzuführen, dass für die volle GTPase-Aktivität von Arf auch die Bindung an den Effektor von ARF, den Coatomer-Komplex notwendig ist. Letzterer steuert möglicherweise den Argininfinger bei (J. Goldberg, persönliche Mitteilung).

Für die Untersuchung der Interaktion von Rap und RapGAP ergab sich aus diesem Wissen als Arbeitshypothese die Annahme, dass auch Rap1GAP über eine katalytisch aktive Argininseitenkette verfügt. Zur Überprüfung dieser Hypothese wurde ein Protokoll zur Expression und Reinigung eines katalytisch aktiven Fragments von Rap1GAP als GST-Fusionsprotein etabliert.

5.2.1 Das katalytische Fragment von Rap1GAP lässt sich als GST-Fusionsprotein aus *E. coli* reinigen

Rap1GAP wurde zuerst von Polakis *et al* (1991) gereinigt und beschrieben. Rubinfeld *et al* (1992) beschrieben das *Rap1GAP*-Gen und zeigten, dass die AS 75 bis 416 notwendig für die Katalyse der GTPase-Funktion von Rap1 sind. Dieses Fragment wies darüberhinaus auch eine größere Stabilität als das vollständige Rap1GAP-Protein auf, welches stets ein heterogenes Bandenmuster in der SDS-PAGE lieferte, was zum Teil auf unterschiedliche Phosphorylierung und zum Teil auf proteolytischen Abbau zurückzuführen sein kann (Rubinfeld & Polakis, 1995). Das Rap1GAP-Fragment 75-416 verfügt nicht mehr über die c-terminal gelegenen Phosphorylierungsstellen. Die Reinigung der ersten rekombinanten Rap1GAP-Fragmente erfolgte aus dem Baculovirus-SF9 Insektenzellsystem (Polakis *et al*, 1991). In dieser Arbeit wurde erstmals ein Protokoll zur Expression eines pGEX-Vektors mit dem katalytisch aktiven Rap1GAP-Fragment von AS 75 bis 416 (Rap1GAPv) vorgestellt (4.2.1). Im Gegensatz zur Expression in SF9-Zellen erwies sich das unter Standardbedingungen in *E. coli* exprimierte Rap1GAPv als nur zu einem geringen Teil löslich. Darüberhinaus wurden die Banden von GST-Rap1GAP in der SDS-PAGE stets von einer Bande begleitet, die sich nach partieller Sequenzierung als GroEL identifizieren ließ. In dem in dieser Arbeit vorgestellten Protokoll wird der Anteil des löslichen und nicht von GroEL begleiteten Rap1GAPv durch die Expression bei 18° C und die Reinigung in Puffer, der ATP und MgCl₂ enthält, erhöht. ATP und MgCl₂ dienen als Kofaktoren bei der Proteinfaltung durch GroEL und dienen somit der Erhöhung des löslichen Anteils an Rap1GAPv. Die fehlende Inaktivierung von Metalloproteasen durch die Verwendung des MgCl₂-haltigem Puffer wurde durch rasches Arbeiten bei niedrigen Temperaturen kompensiert. Obwohl durch Anwendung des in dieser Arbeit entwickelten Protokolls der Anteil an löslichem Protein deutlich erhöht werden konnte, verbleiben noch immer bis zu zirka 40% des produzierten GST-Rap1GAPv nach der Lyse der Zellen im Zentrifugationsrückstand. Dies deutet bereits auf eine nicht optimale Stabilität des Proteins hin, die sich auch in weiteren Experimenten zumindest für Konzentrationen über 10 µM bestätigte. Bei Konzentrationen unter 1 µM konnte weder eine Tendenz zur Aggregation noch ein messbarer Aktivitätsverlust binnen 1 h bei RT beobachtet werden. Damit sind die zur Bestimmung der kinetischen Eigenschaften des Proteins durchgeführten Versuche, die sich auf die Messung der initialen Geschwindigkeiten der GAP-stimulierten GTPase beziehen, nicht von der reduzierten Stabilität des Proteins eingeschränkt. Der Versuch einer

Charakterisierung der Faltungstabilität über die Messung der Wärmekapazität des Proteins mittels *Differential Scanning Calorimetry* zeigte, dass die thermische Entfaltung von Rap1GAPv nur partiell reversibel ist. Damit bestätigt sich die bereits aufgrund der beobachteten starken Expression von Chaperonen zu machende Vermutung, dass es sich bei der Faltung von Rap1GAP um einen vergleichsweise komplizierten Prozess handelt, der der Unterstützung durch Faltungshelfer unbedingt bedarf. Die beobachteten möglichen thermischen Übergänge liegen darüberhinaus bei relativ niedrigen Temperaturen und deuten so auf eine geringe Stabilität des Proteins hin. In Gelfiltrationsexperimenten befand sich Rap1GAPv bei Konzentrationen über 10 μM in der aufgetragenen Lösung im Ausschlussvolumen, was auf eine Tendenz zur Aggregation schließen lässt (4.2.7). Eine eingeschränkte Stabilität bei höheren Konzentrationen zeigte sich ebenfalls beim Versuch, die Enthalpie der Interaktion von Rap1A*GppNHp (ein nicht hydrolysierbares GTP-Analogon) mit Hilfe der Isothermen Titrationskalorimetrie zu bestimmen. Möglicherweise ist die hier beobachtete Präzipitation von Proteinen zusätzlich durch interaktionsbedingte konformationelle Umlagerungen bedingt. Mit diesen Einschränkungen versehen konnte durch diese Messungen eine Abschätzung der Dissoziationskonstante K_D auf einen Wert von über 5 μM vorgenommen werden. Diese Beobachtung deckt sich mit der durch Rubinfeld *et al* (1991) in einem Konkurrenzexperiment vorgenommenen Abschätzung der halbmaximalen Inhibition der Rap1GAP-stimulierten GTP-Hydrolysereaktion von Rap1A*GTP durch Zugabe von Rap1A*GppNHp auf zirka 30 bis 35 μM . Dies entspräche einer zirka 250fach schlechteren Affinität als bei der Interaktion von Ras*GTP und dem RasGAP NF1 ($K_D = 0,13 \mu\text{M}$; (Ahmadian *et al*, 1997).

Niedrige Affinitäten sind allerdings für GAP nicht ungewöhnlich, so beträgt die Affinität von Ras zu p120GAP lediglich 4,8 μM (Gideon *et al*, 1992). Für die Reaktion der aktiven Fragmente von Gyp1p und Gyp7P (GAP für Ypt/Rab GTPasen) mit Ypt7*GTP wurden K_M -Werte von 143 und 43 μM bestimmt. Hierbei bleibt jedoch zu berücksichtigen, dass Gyp1p die intrinsische GTP-Hydrolysereaktion verschiedener Rab-Proteine lediglich 2 bis 182fach beschleunigt (Albert *et al*, 1999).

Aufgrund der schwachen Interaktion von Rap1GAPv mit Rap*GppNHp lieferte auch der Versuch, die Affinität beider Proteine zueinander mittels der Biacore-Methode zu bestimmen, kein definitives Ergebnis (4.2.8). Die bei einer Konzentration von 100 μM Rap1B*GppNHp

beziehungsweise Rap1B*GDP gemessenen Plasmonresonanzsignale zeigen lediglich eine geringe Affinität beider Proteine zueinander, ohne eine Präferenz für den GppNHp-Zustand aufzuweisen. Möglicherweise substituiert GppNHp GTP im Falle der Interaktion von Rap1B mit Rap1GAP nur unvollkommen. Sollte dies nicht der Fall sein, so kann die Beobachtung eines ähnlich starken Bindungssignals für die GDP und die GppNHp-Form von Rap1B als Bestätigung der Experimente von Rubinfeld *et al.*, (1991) gewertet werden, die in einem Konkurrenzexperiment eine ähnliche Affinität zu beiden Zustandsformen festgestellt haben. Ein solches Verhalten könnte dafür sprechen, dass die bisherige Definition, die den GTP-gebundenen Zustand der Ras-ähnlichen Proteine als aktiven Zustand beschrieb, zumindest für Rap1 modifizierungsbedürftig ist. Möglicherweise ist die Interaktion von RapGAP mit der GDP-Form von Rap1 für die Lokalisierung von Rap mitverantwortlich. So wurde zum Beispiel für das RapGAP Spa1 eine Assoziation mit dem Zytoskelett beschrieben (Tsukamoto *et al.*, 1999).

5.2.2 Rap1GAP beschleunigt die Rap1GTPase 10⁵fach

Für eine niedrige Affinität von Rap1GAP und Rap1 sprechen auch die bei der kinetischen Charakterisierung der durch Rap1GAPv und GST-Rap1GAPv stimulierten GTP-Hydrolyse-reaktion von Rap1A ermittelten K_M -Werte von 52,3 μM für Rap1GAPv und von 175,2 μM für GST-Rap1GAP (4.2.9). Da Rubinfeld *et al.* (1991) bei der oben erwähnten Abschätzung der Affinität auf 30 bis 35 μM nicht mit einer verkürzten Form von Rap1GAP arbeiteten, ist möglicherweise davon auszugehen, dass das katalytische Fragment nicht über alle Aminosäureseitenketten verfügt, die Interaktionen mit Rap eingehen. Die weitere Reduktion der Affinität im Falle des GST-Fusionsproteins wirkt sich jedoch nicht auf die maximale Reaktionsgeschwindigkeit der GTP-Hydrolyse-reaktion aus, was dafür spricht, dass der GST-tag keinen Einfluss auf die eigentliche Hydrolyse-reaktion ausübt. Die maximale Reaktionsgeschwindigkeit der von Rap1GAPv beschleunigten Rap1GTPase-Reaktion wurde durch Anpassen der Michaelis-Menten-Gleichung an die in 4.2.9 gezeigten Daten mit $5,6 \text{ s}^{-1}$ bestimmt. Die intrinsische GTPase Reaktion von Rap1 ($5,2 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$, bei 37° C; Schweins *et al.*, (1997), $1,7 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ bei 30° C; in dieser Arbeit 4.5) wird somit 10⁵fach beschleunigt. Damit beschleunigt Rap1GAP die im Vergleich zu Ras ($0,00047 \text{ s}^{-1}$ bei 37°C Ahmadian *et al.*, 1997) zehnfach langsamere intrinsische GTP-Hydrolyse-reaktion von Rap1 auf eine vergleichbare

Geschwindigkeit, wie sie für die NF1 beschleunigte GTPase von Ras beschrieben wurde ($5,4 \text{ s}^{-1}$ bei 25° C ; Ahmadian *et al*, 1997).

5.2.3 Rap1GAP besitzt keinen Argininfinger

Um zu überprüfen, ob der entscheidende katalytische Beitrag von Rap1GAP ebenfalls in der Bereitstellung einer Argininseitenkette besteht, wurde zunächst ein Sequenzvergleich zwischen bekannten RapGAP-Proteinen und übersetzten cDNA-Sequenzen, die eine hohe Homologie zur Rap1GAP-DNA-Sequenz aufwiesen, durchgeführt. Fünf konservierte Argininseitenketten konnten innerhalb des von Rubinfeld *et al* (1992) beschriebenen katalytischen Fragments gezeigt werden (4.3.1). Diese Argininseitenketten wurden durch Lysin- und Alaninseitenketten substituiert, um anschließend hinsichtlich ihrer katalytischen Eigenschaften getestet zu werden (4.3.2, 4.3.3). Die Untersuchungen konnten die Argininfingerhypothese für Rap1GAP nicht bestätigen. Keine der Rap1GAPv-Varianten zeigte eine im Vergleich zum wt mehr als dreifach reduzierte Beschleunigung der GTP-Hydrolyse-Reaktion von Rap1*GTP.

Da die Aufgabe der Argininseitenketten beim Vorgang der GTP-Hydrolyse bei den eingangs genannten Proteinen in der Stabilisierung negativer Ladungen besteht, wurde nach weiteren konservierten Aminosäureseitenketten gesucht, die aufgrund ihrer Polarität und/oder Ladung über ein ähnliches Potential, negative Ladungen zu kompensieren verfügen. Nach Substitution und biochemisch-kinetischer Charakterisierung der konservierten Glutamin- und Lysinseitenketten wurde bei Substitution des Lysins285 durch Alanin eine 20,8fache Reduktion der GTP-Hydrolysegeschwindigkeit bei einer Rap1B*GTP-Konzentration von $800 \mu\text{M}$ festgestellt. Damit ist Lysin 285 unter den untersuchten Aminosäuren der wahrscheinlichste Kandidat für eine dem Argininfinger in RasGAP vergleichbare Funktion. Hierbei ist zu berücksichtigen, dass die Substitution des katalytischen Arginins (R1276) von NF1 eine 1800fache Reduktion der maximalen GTP-Hydrolyse-Geschwindigkeit bewirkt (Ahmadian *et al*, 1997). Möglicherweise sind die Funktionen des Lysins 285 von Rap1GAP und der Argininseitenketten der RasGAPs nicht direkt vergleichbar. Allerdings wurden auch bei der Substitution des vermutlichen Argininfingers von rna1p, einem GAP für die kleine GTPase Ran, nur geringe Reduktionen der GTP-Hydrolysegeschwindigkeit gemessen. Eine Substitution des Arginins durch Lysin erbrachte hier keine signifikante Reduktion von k_{cat} . Erst die Substitution des Arginins durch Alanin schlug sich in einer 100fachen Reduktion von k_{cat}

nieder (Hillig *et al.*, 1999). Diese Beobachtung unterstützt die Annahme, dass es sich bei Lysin 285 von Rap1GAP um eine katalyserelevante Seitenkette handeln könnte. Auch die Substitution des konservierten Arginins 282 von RhoGAP durch Alanin schlug sich lediglich in einer 237fachen Reduktion von k_{cat} nieder (Graham *et al.*, 1999). Um sicher auszuschliessen, dass die Substitution von Lysin 285 nicht zu einem großen Teil auf einem Verlust an Bindung zurückzuführen ist, ist es unerlässlich, die Bindung von Rap1GAP an Rap1*GTP/GppNHp/GDP*AlF₃ mit einem unabhängigen Testverfahren zu überprüfen. Hierzu würde sich beispielsweise eine Fluoreszenz-Anisotropiemessung mit fluoreszenzmarkierten Nukleotiden oder mit fluoreszenzmarkierten Proteinen, wie sie in 4.7 vorgestellt werden, eignen.

5.2.4 Weitere Indizien für einen alternativen GTPase-Mechanismus

Für die Existenz eines alternativen GTPase-Mechanismus der Rap1GAP katalysierten GTP-Hydrolyse durch Rap1 spricht neben dem Fehlen eines Argininfingers vor allem die Tatsache, dass die Position des in allen kleinen GTPasen konservierten Glutamins im aktiven Zentrum (Ras/Rap Position 61) in Rap durch ein Threonin besetzt ist. Für die GTPase-Reaktion von Ras konnte gezeigt werden, dass diesem Glutamin eine wichtige Funktion bei der Stabilisierung des intermediär gebildeten Hydroxyl-Ions zukommt, welches das γ -Phosphat nukleophil angreift (Schweins *et al.*, 1995). Mutationen im Codon für Glutamin 61 gehören nach denen im Codon für Glycin 12 zu den onkogenen Mutationen in Ras, was die Relevanz dieser Seitenkette weiter unterstreicht.

Das Fehlen dieser Glutaminseitenkette könnte bereits ein Hinweis auf eine andere oder weitergehende Funktionen von RapGAP im Vergleich zur RasGAP sein. Die Threoninseitenkette an Position 61 ist für die zirka 10fach langsamere intrinsische GTP-Hydrolyse-Aktivität von Rap im Vergleich zu Ras verantwortlich. Wird sie durch eine Glutaminseitenkette ersetzt, erreicht die intrinsische GTPase-Reaktion von Rap1 etwa die Geschwindigkeit von Ras (Frech *et al.*, 1990). Dies könnte bedeuten, dass eventuell mehrere Aminosäureseitenketten von Rap1GAP ins aktive Zentrum von Rap gebracht werden müssen, um den Übergangszustand der GTP-Hydrolysereaktion gewährleisten zu können. Kandidaten für diese funktionellen Seitenketten stellen die Aminosäuren Arginin 284 und Lysin 285 von Rap1GAP dar. Die Rap1GAP-Variante, deren Arginin 284 gegen eine Alaninseitenkette ausgetauscht wurde, zeigt die schwächste GTPase-Stimulierung unter den Varianten mit substituierten

Argininen (4.3.2). Die Variante Rap1GAPv K285A zeigt von allen untersuchten Varianten die geringste Beschleunigung der GTPase-Funktion von Rap1 (4.3.6).

5.2.4.1 Die Bedeutung von Tyrosin 32

Die Aminosäuresubstitution Y32W liefert bei Ras eine Variante, deren GAP-stimulierte GTP-Hydrolyse durch Messung der Tryptophanfluoreszenz beobachtbar ist, ohne sie wesentlich zu beeinflussen (Rensland *et al.*, 1995; Yamasaki *et al.*, 1994). Die Kristallstruktur des Komplexes aus Ras und RasGAP (Scheffzek *et al.*, 1997) zeigt, dass das Tyrosin 32 bei der GAP-katalysierten Hydrolyse des GTP aufgrund einer Konformationsänderung der *Switch1*-Region nicht mehr ins katalytische Zentrum weist, in dem nun Arginin 789 von RasGAP den Übergangszustand der Reaktion stabilisiert (Abbildung 5-1 a). Dieser Effekt beruht auf der großen Beweglichkeit der Tyrosinseitenkette, wie sie von mehreren Autoren sowohl in NMR-Studien als auch in kristallographischen Untersuchungen beobachtet wurde (Geyer *et al.*, 1996; Kraulis *et al.*, 1994; Milburn *et al.*, 1990; Pai *et al.*, 1990; Schlichting *et al.*, 1990).

Die Hydroxylgruppe von Tyrosin 32 befindet sich sowohl bei Ras als auch bei Rap1A (Nassar *et al.*, 1995; Nassar *et al.*, 1996) und Rap2A (Cherfils *et al.*, 1997; Menetrey & Cherfils, 1999) in Wasserstoffbrückendistanz zum γ -Phosphat des GTP (Abbildung 5-1 b). Interessanterweise nimmt Tyrosin 32 in der Rap2A-Struktur eine ähnliche Position zum γ -Phosphat ein wie das katalytisch wichtige Arginin 174 aus Transducin- α (Noel *et al.*, 1993; Sondek *et al.*, 1994). Umgekehrt ist die Situation in der Kristallstruktur von Rap1A mit Raf-RBD. Hier weicht die Position von Tyrosin 32 von allen Aminosäuren im Vergleich mit ihrer Position in Ras am stärksten ab. Zusammen mit Prolin 34 schirmt es in dieser Struktur den Zugang zur Phosphatbindenden Region ab, und liefert so möglicherweise die Erklärung für die Tatsache, dass Raf-RBD die Dissoziation von an Ras oder Rap gebundenen Nukleotiden behindert (Nassar *et al.*, 1995). Eine solche Nähe des Tyrosins zum aktiven Zentrum wurde auch in der Röntgenstruktur des Komplexes von Cdc42 (einem Verwandten der kleinen GTPase Rho) mit der Cdc42GAP-Variante R305A beobachtet. In dieser Struktur ist das Tyrosin 32 von Cdc42 in der Lage, die Abwesenheit der katalytischen Argininseitenkette 305 von Cdc42GAP bei der Stabilisierung des durch AlF_3 simulierten Übergangszustandes zu kompensieren. Dabei wird es ebenfalls durch die Prolinseitenkette 42 stabilisiert (Nassar *et al.*, 1998).

Die Beobachtung, dass Rap1A Y32W im Gegensatz zu Ras Y32W über eine nicht GAP-stimulierbare GTPase-Funktion verfügt (4.3.6), spricht für eine unterschiedliche Bedeutung

dieser Aminosäure in Ras und Rap bei der GAP-katalysierten GTP-Hydrolyse. Möglicherweise spielt Tyrosin 32 in Rap1 eine aktive Rolle bei der GTP-Hydrolyse. Die zur Überprüfung dieser These durchgeführte Substitution des Tyrosins durch Phenylalanin ergab jedoch – wie im Falle von Ras – eine Rap1-Variante, deren GTPase-Funktion ohne Einschränkung durch Rap1GAP stimulierbar ist (4.3.6). Es ist daher wahrscheinlich, dass die Tryptophanseitenkette an Position 32 aus sterischen Gründen die Interaktion der katalyse-relevanten Aminosäureseitenketten von Rap1GAP mit dem aktiven Zentrum von Rap1 verhindert. Eine Substitution durch eine kleinere Aminosäureseitenkette könnte diese Frage weiter klären. Klarheit könnte ebenfalls eine Kristallstruktur des Komplexes von Rap1 und Rap1GAP schaffen. Aufgrund der Präzipitationsneigung der in dieser Arbeit untersuchten Fragmente lieferten diese jedoch kein geeignetes Ausgangsmaterial für kristallographische Untersuchungen (Klaus Scheffzek, persönliche Mitteilung).

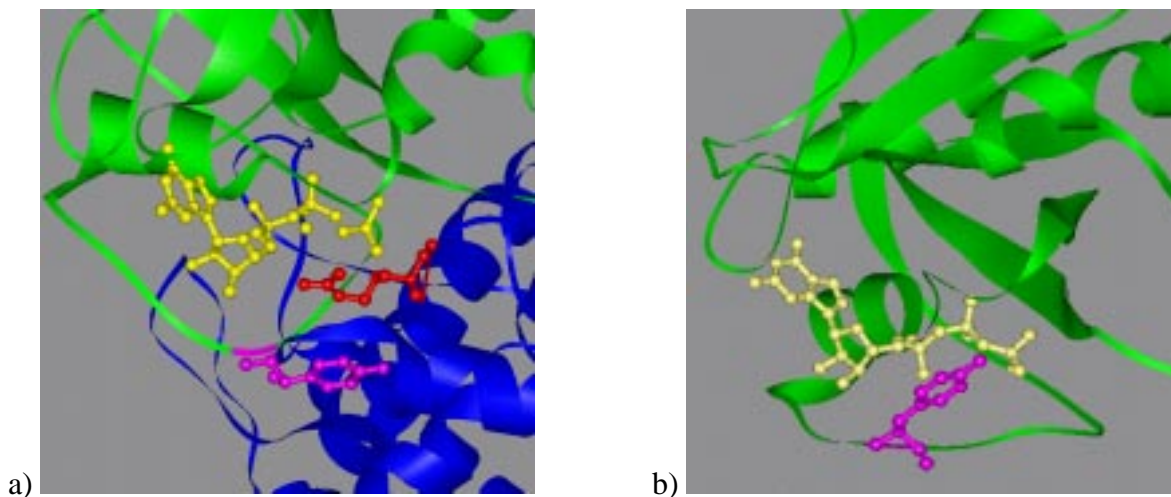


Abbildung 5-1 Vergleich der Tyrosinseitenketten an Position 32 in Ras*GDP*MgF₃*RasGAP und in Rap1A*GTP*RafRBD

a) Blick in das aktive Zentrum der Kokristallstruktur (Scheffzek *et al*, 1997) von Ras (Grün) und RasGAP (blau) mit GDP*AlF₃ (gelb). Abgebildet sind die Hauptketten beider Proteine in *Ribbon*-Darstellung, sowie als *Ball-and-Stick*-Strukturen die farblich hervorgehobenen Seitenketten Arg 789 von RapGAP (rot), sowie Tyr 32 von Ras (lila). b) Rap1A-Struktur (Nassar *et al*, 1995) mit GTP (gelb) und Tyr 32 (lila). Deutlich ist die unterschiedliche Position des Tyrosin 32 in Relation zum γ -Phosphat (AlF₃) zu erkennen.

Eine sterische Behinderung der Interaktion von Rap1 und Rap1GAP durch Substitution der Tyrosinseitenkette 32 impliziert, dass Rap1GAPv an die Effektorbinderegion (AS 32 bis 40) bindet (Wittinghofer & Nassar, 1996). Für aus Baculoviren gereinigtes Rap1GAP wurde dies

über die Inhibition der GAP-katalysierten GTPase-Reaktion von Rap1A durch steigende Konzentrationen an RalGDS-RBD, der Ras-bindenden Domäne von RalGDS, gezeigt (Herrmann *et al.*, 1996). In dieser Arbeit konnte ein GTPase-inhibierender Effekt von RalGDS-RBD auch für die Interaktion von GST-Rap1GAPv mit Rap1A*GTP nachgewiesen werden (4.6). Somit ist davon auszugehen, dass GST-Rap1GAP ebenfalls an die Effektorregion von Rap1 bindet. Dieser Vorgang wird möglicherweise durch die voluminöse Tryptophanseitenkette an Position 32 behindert. Möglicherweise besteht der Beitrag von Rap1GAP zur Stimulation der GTP-Hydrolysereaktion auch zu einem großen Teil in der Stabilisierung der *switch*-Regionen von Rap1 und weniger in der Bereitstellung katalytischer Aminosäureseitenketten. Ein ähnlicher Effekt wird für die Interaktion von Cdc42 mit Cdc42GAP diskutiert (Nassar *et al.*, 1998). Auch der Effekt der GAP für heterotrimere G-Proteine beruht lediglich auf der Stabilisierung der *switch*-Regionen (Tesmer *et al.*, 1997).

5.2.4.2 Rap1B G12V - Eine konstitutiv aktive Variante von Rap1B?

Einen weiteren Hinweis auf einen alternativen Mechanismus der GAP-katalysierten GTP-Hydrolyse-Reaktion von Rap1 liefert die Beobachtung, dass die GTPase-Funktion der Variante Rap1B G12V durch Rap1GAP stimulierbar ist (4.5). Dies steht im Gegensatz zur analogen Aminosäuresubstitution bei Ras, die den Zugang zum aktiven Zentrum von Ras für den Argininfinger blockiert, und damit zu einer dominant aktiven, onkogenen Variante führt, die nicht mehr durch GAP stimulierbar ist (Scheffzek *et al.*, 1997). Rap1B G12V kann somit nicht als dominant aktive Variante betrachtet werden, die sich für Zellversuche zur Identifizierung von Rap-spezifischen Signaltransduktionswegen eignet, da ihre GAP stimulierbare GTPase-Funktion deutlich langsamer ist als bei Wildtyp Rap1. Um zu gewährleisten, dass diese Rap-Variante in einem Experiment als dominant aktiv angesehen werden kann, sollte zumindest vor einem solchen Experiment festgestellt werden, ob und welche RapGAP in den untersuchten Zellen vorhanden sind. Separat müsste gezeigt werden, dass die vorhandenen RapGAP keinen stimulierenden Einfluss auf die GTP-Hydrolyse der eingesetzten Rap-Variante haben. Dies wurde zum Beispiel beim Nachweis der Antagonistenrolle, die Rap G12V zur Aktivierung von Erk durch Ras einnehmen soll, unterlassen (Cook *et al.*, 1993).

Abgesehen von der Bedeutung die die GAP-Stimulierbarkeit von RapG12V für die Aufklärung von Signaltransduktionswegen haben kann, hat die Aufklärung des zugrundeliegenden alternativen Mechanismus große Bedeutung auch für das Ziel des ersten Teils dieser

Arbeit, die Entwicklung eines Wirkstoffs zur Stimulierung der defekten GTPase-Funktion von onkogenem Ras. Da sich dieses durch Mutationen in den Codons für jene Aminosäuren auszeichnet, die bei der Interaktion von Rap1 und Rap1GAP eine weniger wichtige Rolle übernehmen: Glycin 12 und Glutamin 61, das in Rap durch ein Threonin ersetzt ist.

Zur Etablierung eines Mechanismus, der eventuell auf der Insertion mehrerer Aminosäureseitenketten von Rap1GAP ins aktive Zentrum beruht, bedarf es jedoch noch eingehender Untersuchungen.

5.3 Ausblick

Die Entwicklung eines Wirkstoffs, der onkogenes Ras durch die Beschleunigung seiner GTPase-Funktion inaktiviert, bleibt ein vielversprechendes Ziel. Zukünftige Strategien, eine solche Struktur zu finden, werden neben dem computergestützten Design neuer Substanzen anhand kristallografischer Daten auch weiterhin das Durchmustern von Substanzbibliotheken verwenden müssen, um eine geeignete Struktur zu finden. Weitere hilfreiche Informationen kann der in der Diskussion vorgestellte Ansatz liefern, mit einem speziellen Hefeselektionssystem ein GAP zu finden, das onkogenes Ras inaktivieren kann.

Hinsichtlich der Charakterisierung des alternativen GTPase-Mechanismus von Rap1 bieten sich weitere Mutagenesestudien an. So könnte beispielsweise nach einer Substitution des Tyrosins 32 durch eine Alaninseitenkette gezeigt werden, ob Tyrosin 32 eine Rolle bei der Bindung von Rap1GAP an Rap1*GTP zukommt. Über die Substitution der katalyserelevanten Lysinseitenkette 285 von Rap1GAP durch eine Argininseitenkette sollte sich klären lassen, ob die Aufgabe des Lysins der des Arginins von RasGAP ähnelt. Um den Einfluss dieser und anderer Aminosäureseitenketten auf die Affinität der Interaktion von Rap1 und Rap1GAP zu bestimmen, müssen weitere Untersuchungen durchgeführt werden. Hierfür bieten sich fluoreszenzmarkierte Varianten von Rap1, wie sie in dieser Arbeit erstmals vorgestellt wurden, an. Zur exakten Klärung des Mechanismus der GAP-katalysierten GTP-Hydrolysereaktion könnte eine Kristallstruktur beitragen, für die es aber unabdingbar ist, ein stabileres Fragment von Rap1GAP in Händen zu haben. Auch ein Vergleich der in dieser Arbeit gezeigten Daten mit solchen, die mit *full-length* Rap1GAP gewonnen wurden, bietet sich an. Um dieses in reiner Form zu gewinnen, sollte nach den Erfahrungen dieser Arbeit jedoch auf ein Baculovirus-Expressionssystem zurückgegriffen werden. Weiterhin ist es

sinnvoll, nach einer Rap1-Variante zu suchen, deren GTPase nicht durch Rap1GAP (oder ein anderes GAP) zu stimulieren ist. Diese würde ein geeignetes Werkzeug zur Untersuchung von Rap1-Signalwegen darstellen.

Die weitere Aufklärung des alternativen GAP-stimulierten GTP-Hydrolysemechanismus von Rap1 wird wichtige Informationen liefern, die für die Entwicklung eines die GTPase-Funktion von onkogenem Ras beschleunigenden Wirkstoffs große Bedeutung haben, da die Aminosäurepositionen 12 und 61 in Ras und Rap offensichtlich unterschiedliche Aufgaben wahrnehmen.

6 Zusammenfassung

Ein Ziel dieser Arbeit bestand in der Entwicklung einer Leitsubstanz für die Herstellung eines Anti-Tumorpräparates, das an der defekten GTPase-Funktion von onkogenem Ras ansetzen sollte. Für die Entwicklung eines derartigen Wirkstoffes durch *drug design* spricht aufgrund der Tatsache, dass in 30% aller menschlichen Tumore onkogene Ras-Mutationen gefunden werden, die Singularität des Angriffspunktes. Um einen Ausgangspunkt für molekulares *drug design* zu erhalten, wurden Peptidbibliotheken entworfen, synthetisiert und auf RasGAP-Aktivität untersucht.

Unter Zuhilfenahme der Röntgenkristallstruktur des Komplexes von Ras mit seinem GTPase-aktivierenden Protein im Übergangszustand der GTP-Hydrolysereaktion und eines Vergleiches der bekannten RasGAP-Sequenzen, wurden eine Kernsequenz identifiziert, die als Grundlage für den Entwurf der kombinatorischen Peptidbibliotheken diente. Alle Peptide besitzen die gemeinsame Kernsequenz (RGQ), die von definiert und zufällig variierten Aminosäuren flankiert wird. Jede Bibliothek besitzt eine Komplexität von 160000 verschiedenen Peptiden. Zusammen enthalten alle Bibliotheken somit 64 Millionen verschiedene Peptide. Die Bibliotheken wurden in Kooperation mit der Arbeitsgruppe Molekulare Erkennung von Dr. Ronald Frank aus an Festphasen gekoppelten Peptiden nach der sogenannten SPOT-Synthese-Methode hergestellt. Zum Nachweis von GAP-Aktivität wurden die einzelnen Peptidbibliotheken parallel in Mikrotiterplatten mit onkogenem und wt Ras, das zuvor mit radioaktiv markiertem GTP beladen wurde, inkubiert. Zur Quantifizierung der Aktivität wurde ein eigens für das Mikrotiterplattenformat adaptierter und modifizierter Filterbindungstest durchgeführt. Es wurden neben linearen auch zyklisierte Peptidbibliotheken getestet. In den durchgeführten Tests konnte kein Peptid mit GAP-Aktivität identifiziert werden.

Der zweite Teil dieser Arbeit galt der Untersuchung des GTPase-aktivierenden Proteins Rap1GAP für das Ras-homologe Protein Rap1. Besonders berücksichtigt wurde dabei die Frage, ob sich Rap1GAP wie die GAP für Ras, Rho und Ran ebenfalls eines sogenannten Argininfingers bedient, um die intrinsische GTP-Hydrolysereaktion der jeweiligen kleinen GTPase zu beschleunigen. Hierzu wurde zunächst ein Protokoll für die Herstellung eines katalytischen Fragments als GST-Fusionsprotein in *E. coli* und die anschließende Reinigung

etabliert. Die maximale Geschwindigkeit der von Rap1GAPv katalysierten GTPase-Reaktion von Rap1A wurde nach Michaelis-Menten mit $5,6 \text{ s}^{-1}$ bestimmt, der K_M -Wert wurde mit $52,3 \mu\text{M}$ bestimmt. Aufgrund der eingeschränkten Stabilität des Fragments konnte die Affinität von Rap1GAPv zu Rap1 nicht exakt bestimmt werden.

Nach Herstellung von Rap1GAPv-Varianten, in denen je eine konservierte Argininseitenkette durch eine Lysin- oder Alaninseitenkette substituiert wurde, konnte durch kinetische Untersuchung der katalytischen Eigenschaften gezeigt werden, dass keine der Argininseitenketten einen Einfluss auf die GTP-Hydrolysereaktion aufweist, der dem des Argininfingers von RasGAP vergleichbar ist. Durch weitere kinetische Untersuchungen mit Rap1GAP-Varianten, in denen konservierte polare Aminosäureseitenketten von Rap1GAP durch Alaninseitenketten ersetzt wurden, konnte Lysin 285 als katalytisch relevante Seitenkette identifiziert werden. Damit verwendet Rap1GAP möglicherweise einen Lysin-Finger zur Katalyse der GTPase-Reaktion von Rap1.

In weiteren Mutagenesestudien wurden die Aminosäureseitenketten Glycin 12 und Tyrosin 32 von Rap1A durch Valin respektive Tryptophan ersetzt. Im Gegensatz zu den analogen Substitutionen bei Ras zeigte sich die GTPase-Reaktion der G12V-Variante als GAP-stimulierbar, wohingegen die Y32W-Variante ebenfalls von der Situation bei Ras abweichend nicht durch GAP zu stimulieren ist. Eine direkte Beteiligung der Hydroxylgruppe des Tyrosins konnte durch die Untersuchung einer Variante mit der Substitution Y32F ausgeschlossen werden. Zusammen mit der Tatsache, dass im Gegensatz zu allen anderen GTPasen bei Rap das streng konservierte Glutamin des Motivs PM3 durch ein Threonin ersetzt ist, resultiert aus den Untersuchungen dieser Arbeit die Annahme eines alternativen GTP-Hydrolysemechanismus für die Rap1GAP-katalysierte GTP-Hydrolyse von Rap.

7 Literatur

- Ahmadian, M.R., Stege, P., Scheffzek, K. & Wittinghofer, A. (1997) Confirmation of the Arginine-finger Hypothesis for the GAP-Stimulated GTP-Hydrolysis Reaction of Ras. *Nature Structural Biology*, **4**, 686-689.
- Ahmadian, M.R., Zor, T., Vogt, D., Kabsch, W., Selinger, Z., Wittinghofer, A. & Scheffzek, K. (1999) Guanosine triphosphatase stimulation of oncogenic Ras mutants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **96**, 7065-7070.
- Aitken, A. (1996) 14-3-3 and its possible role in co-ordinating multiple signaling pathways. *Trends in Cell Biology*, **6**, 341-347.
- Albert, S., Will, E. & Gallwitz, D. (1999) Identification of the catalytic domains and their functionally critical arginine residues of two yeast GTPase-activating proteins specific for Ypt/Rab transport GTPases. *EMBO Journal*, **18**, 5216-5225.
- Albright, C.F., Giddings, B.W., Liu, J., Vito, M. & Weinberg, R.A. (1993) Characterization of a guanine nucleotide dissociation stimulator for a Ras-related GTPase. *EMBO Journal*, **12**, 339-347.
- Altschuler, D.L. & Lapetina, E.G. (1993) Mutational analysis of the cAMP-dependent protein kinase-mediated phosphorylation site of Rap1b. *Journal of Biological Chemistry*, **268**, 7527-7531.
- Altschuler, D.L. & Ribeiro-Neto, F. (1998) Mitogenic and oncogenic properties of the small G protein Rap1b. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **95**, 7475-7479.
- Asha, H., de Ruyter, N.D., Wang, M.G. & Hariharan, I.K. (1999) The Rap1 GTPase functions as a regulator of morphogenesis in vivo. *EMBO Journal*, **18**, 605-615.
- Beck-Sickinger, A. & Weber, P. (1999) *Kombinatorische Methoden in Chemie und Biologie.*, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin.
- Bender, A. (1993) Genetic evidence for the roles of the bud-site-selection genes BUD5 and BUD2 in control of the Rsr1p (Bud1p) GTPase in yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **90**, 9926-9929.
- Beranger, F., Goud, B., Tavitian, A. & de Gunzburg, J. (1991) Association of the Ras-antagonistic Rap1/Krev-1 proteins with the Golgi complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **88**, 1606-1610.
- Berger, G., Quarck, R., Tenza, D., Levy-Toledano, S., de Gunzburg, J. & Cramer, E.M. (1994) Ultrastructural localization of the small GTP-binding protein Rap1 in human platelets and megakaryocytes. *British Journal of Haematology*, **88**, 372-382.

- Bilan, P.J., Moyers, J.S. & Kahn, C.R. (1998) The Ras-related protein Rad associates with the cytoskeleton in a non-lipid-dependent manner. *Experimental Cell Research*, **242**, 391-400.
- Block, C. & Wittinghofer, A. (1995) Switching to Rac and Rho. *Structure*, **3**, 1281-1284.
- Boriack-Sjodin, P.A., Margarit, S.M., Barsagi, D. & Kuriyan, J. (1998) The Structural Basis of the Activation of Ras by Sos. *Nature*, **394**, 337-343.
- Bos, J.L. (1997) Ras-like GTPases. *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer*, **1333**, M 19-M 31.
- Boussiotis, V.A., Freeman, G.J., Berezovskaya, A., Barber, D.L. & Nadler, L.M. (1997) Maintenance of human T cell anergy: blocking of IL-2 gene transcription by activated Rap1. *Science*, **278**, 124-128.
- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, **72**, 248-254.
- Braman, J., Papworth, C. & Greener, A. (1996) Site-directed mutagenesis using double-stranded plasmid DNA templates. *Methods in Molecular Biology*, **57**, 31-44.
- Cacace, A.M., Michaud, N.R., Therrien, M., Mathes, K., Copeland, T., Rubin, G.M. & Morrison, D.K. (1999) Identification of constitutive and Ras-inducible phosphorylation sites of KSR: Implications for 14-3-3 binding, mitogen-activated protein kinase binding, and KSR overexpression. *Molecular and Cellular Biology*, **19**, 229-240.
- Campbell, S.L., KhosraviFar, R., Rossman, K.L., Clark, G.J. & Der, C.J. (1998) Increasing complexity of Ras signaling. *Oncogene*, **17**, 1395-1413.
- Cantor, S.B., Urano, T. & Feig, L.A. (1995) Identification and characterization of Ral-binding protein 1, a potential downstream target of Ral GTPases. *Molecular & Cellular Biology*, **15**, 4578-4584.
- Chant, J. & Herskowitz, I. (1991) Genetic control of bud site selection in yeast by a set of gene products that constitute a morphogenetic pathway. *Cell*, **65**, 1203-1212.
- Chen, F., Barkett, M., Ram, K.T., Quintanilla, A. & Hariharan, I.K. (1997) Biological characterization of Drosophila Rapgap1, a GTPase activating protein for Rap1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **94**, 12485-12490.
- Chenevert, J., Corrado, K., Bender, A., Pringle, J. & Herskowitz (1992) A yeast gene (BEM1) necessary for cell polarization whose product contains two SH3 domains. *Nature*, **356**, 77-79.

- Cherfils, J., Menetrey, J., Lebras, G., Janoueix-Lerosey, I., de Gunzburg, J., Garel, J.R. & Auzat, I. (1997) Crystal Structure of the Small G Protein Rap2A in Complex with its Substrate GTP, with GDP and with GTP-gamma-S. *EMBO Journal*, **16**, 5582-5591.
- Chung, C.T., Niemela, S.L. & Miller, R.H. (1989) One-step preparation of competent *Escherichia coli*: transformation and storage of bacterial cells in the same solution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **86**, 2172-2175.
- Coleman, D.E., Berghuis, A.M., Lee, E., Linder, M.E., Gilman, A.G. & Sprang, S.R. (1994) Structures of active conformations of Gi alpha 1 and the mechanism of GTP hydrolysis. *Science*, **265**, 1405-1412.
- Cook, S.J., Rubinfeld, B., Albert, I. & McCormick, F. (1993) RapV12 antagonizes Ras-dependent activation of ERK1 and ERK2 by LPA and EGF in Rat-1 fibroblasts. *EMBO Journal*, **12**, 3475-3485.
- Cool, R.H., Schmidt, G., Lenzen, C.U., Prinz, H., Vogt, D. & Wittinghofer, A. (1999) The Ras mutant D119N is both dominant negative and activated. *Molecular and Cellular Biology*, **19**, 6297-6305.
- Cullen, P.J., Hsuan, J.J., Truong, O., Letcher, A.J., Jackson, T.R., Dawson, A.P. & Irvine, R.F. (1995) Identification of a specific Ins(1,3,4,5)P4-binding protein as a member of the GAP1 family. *Nature*, **376**, 527-530.
- de Rooij, J., Boenink, N.M., van Triest, M., Cool, R.H., Wittinghofer, A. & Bos, J.L. (1999) PDZ-GEF1, a guanine nucleotide exchange factor specific for Rap1 and Rap2. *Journal of Biological Chemistry*, **274**, 38125-38130.
- de Rooij, J., Zwartkruis, F.J.T., Verheijen, M.H.G., Cool, R.H., Nijman, S.M.B., Wittinghofer, A. & Bos, J.L. (1998) Epac is a Rap1 guanine-nucleotide-exchange factor directly activated by cyclic AMP. *Nature*, **396**, 474-477.
- Diaz-Meco, M.T., Lozano, J., Municio, M.M., Berra, E., Frutos, S., Sanz, L. & Moscat, J. (1994) Evidence for the in vitro and in vivo interaction of Ras with protein kinase C zeta. *Journal of Biological Chemistry*, **269**, 31706-31710.
- Dremier, S., Vandeput, F., Zwartkruis, F.J., Bos, J.L., Dumont, J.E. & Maenhaut, C. (2000) Activation of the small G protein Rap1 in dog thyroid cells by both cAMP-dependent and -independent pathways. *Biochemical & Biophysical Research Communications*, **267**, 7-11.
- Fam, N.P., Fan, W.T., Wang, Z., Zhang, L.J., Chen, H. & Moran, M.F. (1997) Cloning and characterization of Ras-GRF2, a novel guanine nucleotide exchange factor for Ras. *Molecular and Cellular Biology*, **17**, 1396-1406.

- Farnsworth, C.L., Freshney, N.W., Rosen, L.B., Ghosh, A., Greenberg, ME & Feig, L.A. (1995) Calcium activation of Ras mediated by neuronal exchange factor Ras-GRF. *Nature*, **376**, 524-527.
- Farrell, F.X., Ohmstede, C.A., Reep, B.R. & Lapetina, E.G. (1990) cDNA sequence of a new ras-related gene (rap2b) isolated from human platelets with sequence homology to rap2. *Nucleic Acids Research*, **18**, 4281
- Feig, L.A. (1999) Tools of the trade: use of dominant-inhibitory mutants of Ras-family GTPases. *Nature Cell Biology*, **1**, E25-E27
- Feig, L.A., Urano, T. & Cantor, S. (1996) Evidence for a Ras/Ral signaling cascade. *Trends in Biochemical Sciences*, **21**, 438-441.
- Feuerstein, J., Goody, R.S. & Wittinghofer, A. (1987) Preparation and characterization of nucleotide-free and metal ion-free p21 "apoprotein". *Journal of Biological Chemistry*, **262**, 8455-8458.
- Feuerstein, J., Kalbitzer, H.R., John, J., Goody, R.S. & Wittinghofer, A. (1987) Characterisation of the metal-ion-GDP complex at the active sites of transforming and nontransforming p21 proteins by observation of the ^{17}O -Mn superhyperfine coupling and by kinetic methods. *European Journal of Biochemistry*, **162**, 49-55.
- Fields, G.B. & Noble, R.L. (1990) Solid phase peptide synthesis utilizing 9-fluorenylmethoxycarbonyl amino acids. *International Journal of Peptide & Protein Research*, **35**, 161-214.
- Frank, R. & Overwin, H. (1996) SPOT synthesis. Epitope analysis with arrays of synthetic peptides prepared on cellulose membranes. *Methods in Molecular Biology*, **66**, 149-169.
- Franke, B., Akkerman, J.W. & Bos, J.L. (1997) Rapid Ca^{2+} -mediated activation of Rap1 in human platelets. *EMBO Journal*, **16**, 252-259.
- Franke, B., van Triest, M., de Bruijn, K.M., van Willigen, G., Nieuwenhuis, H.K., Negrier, C., Akkerman, J.W. & Bos, J.L. (2000) Sequential regulation of the small GTPase Rap1 in human platelets. *Molecular and Cellular Biology*, **20**, 779-785.
- Frech, M., John, J., Pizon, V., Chardin, P., Tavitian, A., Clark, R., McCormick, F. & Wittinghofer, A. (1990) Inhibition of GTPase activating protein stimulation of Ras-p21 GTPase by the Krev-1 gene product. *Science*, **249**, 169-171.
- Gao, Q.S., Srinivasan, S., Boyer, S.N., Wazer, D.E. & Band, V. (1999) The E6 oncoproteins of high-risk papillomaviruses bind to a novel putative GAP protein, E6TP1, and target it for degradation. *Molecular and Cellular Biology*, **19**, 733-744.

- Geyer, M., Herrmann, C., Wohlgemuth, S., Wittinghofer, A. & Kalbitzer, H.R. (1997) Structure of the Ras-binding domain of RalGEF and implications for Ras binding and signaling. *Nature Structural Biology*, **4**, 694-699.
- Geyer, M., Schweins, T., Herrmann, C., Prisner, T., Wittinghofer, A. & Kalbitzer, H.R. (1996) Conformational Transitions in p21(Ras) and in its Complexes with the Effector Protein Raf-RBD and the GTPase Activating Protein GAP. *Biochemistry*, **35**, 10308-10320.
- Gideon, P., John, J., Frech, M., Lautwein, A., Clark, R., Scheffler, J.E. & Wittinghofer, A. (1992) Mutational and kinetic analyses of the GTPase-activating protein (GAP)-p21 interaction: the C-terminal domain of GAP is not sufficient for full activity. *Molecular and Cellular Biology*, **12**, 2050-2056.
- Goi, T., Shipitsin, M., Lu, Z., Foster, D.A., Klinz, S.G. & Feig, L.A. (2000) An EGF receptor/Ral-GTPase signaling cascade regulates c-Src activity and substrate specificity. *EMBO Journal*, **19**, 623-630.
- Goldberg, J. (1999) Structural and functional analysis of the ARF1-ARFGAP complex reveals a role for coatomer in GTP hydrolysis. *Cell*, **96**, 893-902.
- Goloubinoff, P., Gatenby, A.A. & Lorimer, G.H. (1989) GroE heat-shock proteins promote assembly of foreign prokaryotic ribulose biphosphate carboxylase oligomers in *Escherichia coli*. *Nature*, **337**, 44-47.
- Gotoh, T., Hattori, S., Nakamura, S., Kitayama, H., Noda, M., Takai, Y., Kaibuchi, K., Matsui, H., Hatase, O. & Takahashi, H. (1995) Identification of Rap1 as a target for the Crk SH3 domain-binding guanine nucleotide-releasing factor C3G. *Molecular and Cellular Biology*, **15**, 6746-6753.
- Graham, D.L., Eccleston, J.F. & Lowe, P.N. (1999) The conserved arginine in rho-GTPase-activating protein is essential for efficient catalysis but not for complex formation with Rho.GDP and aluminum fluoride. *Biochemistry*, **38**, 985-991.
- Grunicke, H.H. (1995) *Signal Transduction Mechanisms in Cancer*, Springer, Heidelberg.
- Hagemann, C. & Rapp, U.R. (1999) Isotype-specific functions of Raf kinases. *Experimental Cell Research*, **253**, 34-46.
- Han, L. & Colicelli, J. (1995) A human protein selected for interference with Ras function interacts directly with Ras and competes with Raf1. *Molecular & Cellular Biology*, **15**, 1318-1323.
- Hariharan, I.K., Carthew, R.W. & Rubin, G.M. (1991) The *Drosophila* roughened mutation: activation of a Rap homolog disrupts eye development and interferes with cell determination. *Cell*, **67**, 717-722.
- Hata, Y., Kikuchi, A., Sasaki, T., Schaber, M.D., Gibbs, J.B. & Takai, Y. (1990) Inhibition of the Ras p21 GTPase-activating protein-stimulated GTPase activity of c-Ha-Ras p21 by

- smg p21 having the same putative effector domain as Ras p21s. *Journal of Biological Chemistry*, **265**, 7104-7107.
- Hawkins, P.T., Eguinoa, A., Qiu, R.G., Stokoe, D., Cooke, F.T., Walters, R., Wennstrom, S., Claesson-Welsh, L., Evans, T. & Symons, M. (1995) PDGF stimulates an increase in GTP-Rac via activation of phosphoinositide 3-kinase. *Current Biology*, **5**, 393-403.
- Herrmann, C., Horn, G., Spaargaren, M. & Wittinghofer, A. (1996) Differential interaction of the Ras family GTP-binding proteins H-Ras, Rap1A, and R-Ras with the putative effector molecules Raf kinase and Ral-guanine nucleotide exchange factor. *Journal of Biological Chemistry*, **271**, 6794-6800.
- Hillig, R.C., Renault, L., Vetter, I.R., Drell, T., Wittinghofer, A. & Becker, J. (1999) The crystal structure of ralp: A new fold for a GTPase-activating protein. *Molecular Cell*, **3**, 781-791.
- Hirose, E., Nakashima, N., Sekiguchi, T. & Nishimoto, T. (1998) RagA is a functional homologue of *S. cerevisiae* Gtr1p involved in the Ran/Gsp1-GTPase pathway. *Journal of Cell Science*, **111**, 11-21.
- Holden, J.L., Nur, E.K.M., Fabri, L., Nice, E., Hammacher, A. & Maruta, H. (1991) Rsr1 and Rap1 GTPases are activated by the same GTPase-activating protein and require threonine 65 for their activation. *Journal of Biological Chemistry*, **266**, 16992-16995.
- Hughes, P.E., Renshaw, M.W., Pfaff, M., Forsyth, J., Keivens, V.M., Schwartz, M.A. & Ginsberg, M.H. (1997) Suppression of integrin activation: a novel function of a Ras/Raf-initiated MAP kinase pathway. *Cell*, **88**, 521-530.
- Hwang, Y.W. & Miller, D.L. (1987) A mutation that alters the nucleotide specificity of elongation factor Tu, a GTP regulatory protein. *Journal of Biological Chemistry*, **262**, 13081-13085.
- Ichiba, T., Hashimoto, Y., Nakaya, M., Kuraishi, Y., Tanaka, S., Kurata, T., Mochizuki, N. & Matsuda, M. (1999) Activation of C3G guanine nucleotide exchange factor for Rap1 by phosphorylation of tyrosine 504. *Journal of Biological Chemistry*, **274**, 14376-14381.
- Ito, W., Ishiguro, H. & Kurosawa, Y. (1991) A general method for introducing a series of mutations into cloned DNA using the polymerase chain reaction. *Gene*, **102**, 67-70.
- Jackson, C.L. & Casanova, J.E. (2000) Turning on ARF: the Sec7 family of guanine-nucleotide-exchange factors. *Trends in Cell Biology*, **10**, 60-67.
- Janoueix-Lerosey, I., Fontenay, M., Tobelem, G., Tavitian, A., Polakis, P. & de Gunzburg, J. (1994) Phosphorylation of Rap1GAP during the cell cycle. *Biochemical & Biophysical Research Communications*, **202**, 967-975.

- Jiang, H., Luo, J.Q., Urano, T., Frankel, P., Lu, Z., Foster, D.A. & Feig, L.A. (1995) Involvement of Ral GTPase in v-Src-induced phospholipase D activation. *Nature*, **378**, 409-412.
- John, J., Sohmen, R., Feuerstein, J., Linke, R., Wittinghofer, A. & Goody, R.S. (1990) Kinetics of interaction of nucleotides with nucleotide-free H-ras p21. *Biochemistry*, **29**, 6058-6065.
- Jordan, J.D., Carey, K.D., Stork, P.J.S. & Iyengar, R. (1999) Modulation of Rap activity by direct interaction of G alpha(o) with Rap1 GTPase-activating protein. *Journal of Biological Chemistry*, **274**, 21507-21510.
- Jullien-Flores, V., Dorseuil, O., Romero, F., Letourneur, F., Saragosti, S., Berger, R., Tavitian, A., Gacon, G. & Camonis, J.H. (1995) Bridging Ral GTPase to Rho pathways. RLIP76, a Ral effector with CDC42/Rac GTPase-activating protein activity. *Journal of Biological Chemistry*, **270**, 22473-22477.
- Kauffmann-Zeh, A., Rodriguez-Viciana, P., Ulrich, E., Gilbert, C., Coffey, P., Downward, J. & Evan, G. (1997) Suppression of c-Myc-induced apoptosis by Ras signalling through PI(3)K and PKB. *Nature*, **385**, 544-548.
- Kawasaki, H., Springgett, G.M., Mochizuki, N., Toki, S., Nakaya, M., Matsuda, M., Housman, D.E. & Graybiel, A.M. (1998a) A family of cAMP-binding proteins that directly activate Rap1. *Science*, **282**, 2275-2279.
- Kawasaki, H., Springgett, G.M., Toki, S., Canales, J.J., Harlan, P., Blumenstiel, J.P., Chen, E.J., Bany, I.A., Mochizuki, N., Ashbacher, A., Matsuda, M. & Housman, D.E. (1998b) A Rap guanine-nucleotide exchange factor enriched highly in the basal ganglia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **95**, 13278-13283.
- Kawata, M., Matsui, Y., Kondo, J., Hishida, T., Teranishi, Y. & Takai, Y. (1988) A novel small molecular weight GTP-binding protein with the same putative effector domain as the Ras proteins in bovine brain membranes. Purification, determination of primary structure, and characterization. *Journal of Biological Chemistry*, **263**, 18965-18971.
- Kay, B.K., Winter, J. & McCaffery, J.M. (1996) *Phage Display of Peptides and Proteins*, Academic Press,
- Kikuchi, A., Demo, S.D., Ye, Z.H., Chen, Y.W. & Williams, L.T. (1994) RalGDS family members interact with the effector loop of ras p21. *Molecular & Cellular Biology*, **14**, 7483-7491.
- Kikuchi, A., Sasaki, T., Araki, S., Hata, Y. & Takai, Y. (1989) Purification and characterization from bovine brain cytosol of two GTPase-activating proteins specific for smg p21, a GTP-binding protein having the same effector domain as c-ras p21s. *Journal of Biological Chemistry*, **264**, 9133-9136.

- Kishida, S., Koyama, S., Matsubara, K., Kishida, M., Matsuura, Y. & Kikuchi, A. (1997) Colocalization of Ras and Ral on the membrane is required for Ras-dependent Ral activation through Ral GDP dissociation stimulator. *Oncogene*, **15**, 2899-2907.
- Kitayama, H., Sugimoto, Y., Matsuzaki, T., Ikawa, Y. & Noda, M. (1989) A ras-related gene with transformation suppressor activity. *Cell*, **56**, 77-84.
- Kiyokawa, E., Mochizuki, N., Kurata, T. & Matsuda, M. (1997) Role of Crk oncogene product in physiologic signaling. *Critical Reviews in Oncogenesis*, **8**, 329-342.
- Kjeldgaard, M., Nyborg, J. & Clark, B.F. (1996) The GTP binding motif: variations on a theme. *FASEB Journal*, **10**, 1347-1368.
- Kraulis, P.J., Domaille, P.J., Campbell-Burk, S.L., Van Aken, T. & Laue, E.D. (1994) Solution structure and dynamics of ras p21.GDP determined by heteronuclear three- and four-dimensional NMR spectroscopy. *Biochemistry*, **33**, 3515-3531.
- Kuhlmann, J., Macara, I. & Wittinghofer, A. (1997) Dynamic and equilibrium studies on the interaction of Ran with its effector, RanBP1. *Biochemistry*, **36**, 12027-12035.
- Kurachi, H., Wada, Y., Tsukamoto, N., Maeda, M., Kubota, H., Hattori, M., Iwai, K. & Minato, N. (1997) Human SPA-1 gene product selectively expressed in lymphoid tissues is a specific GTPase-activating protein for Rap1 and Rap2. Segregate expression profiles from a rap1GAP gene product. *Journal of Biological Chemistry*, **272**, 28081-28088.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.
- Lee, C.H.J., Della, N.G., Chew, C.E. & Zack, D.J. (1996) Rin, a neuron-specific and calmodulin-binding small G-protein, and Rit define a novel subfamily of Ras proteins. *Journal of Neuroscience*, **16**, 6784-6794.
- Li, Q., Hariharan, I.K., Chen, F., Huang, Y. & Fischer, J.A. (1997) Genetic interactions with Rap1 and Ras1 reveal a second function for the fat facets deubiquitinating enzyme in *Drosophila* eye development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **94**, 12515-12520.
- Linnemann, T., Geyer, M., Jaitner, B.K., Block, C., Kalbitzer, H.R., Wittinghofer, A. & Herrmann, C. (1999) Thermodynamic and kinetic characterization of the interaction between the Ras binding domain of AF6 and members of the Ras subfamily. *Journal of Biological Chemistry*, **274**, 13556-13562.
- Lockyer, P.J., Bottomley, J.R., Reynolds, J.S., McNulty, T.J., Venkateswarlu, K., Potter, B.V., Dempsey, C.E. & Cullen, P.J. (1997) Distinct subcellular localisations of the putative inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate receptors GAP1IP4BP and GAP1m result from the GAP1IP4BP PH domain directing plasma membrane targeting. *Current Biology*, **7**, 1007-1010.

- Lockyer, P.J., Vanlingen, S., Reynolds, J.S., McNulty, T.J., Irvine, R.F., Parys, J.B. & Cullen, P.J. (1999) Tissue-specific expression and endogenous subcellular distribution of the inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate-binding proteins GAP1(IP4BP) and GAP1(m). *Biochemical & Biophysical Research Communications*, **255**, 421-426.
- Mackay, D.J. & Hall, A. (1998) Rho GTPases. *Journal of Biological Chemistry*, **273**, 20685-20688.
- Maridonneau-Parini, I. & de Gunzburg, J. (1992) Association of Rap1 and Rap2 proteins with the specific granules of human neutrophils. Translocation to the plasma membrane during cell activation. *Journal of Biological Chemistry*, **267**, 6396-6402.
- Markby, D.W., Onrust, R. & Bourne, H.R. (1993) Separate GTP binding and GTPase activating domains of a G alpha subunit. *Science*, **262**, 1895-1901.
- Marshall, M.S. (1993) The effector interactions of p21ras. *Trends in Biochemical Sciences*, **18**, 250-254.
- Maruta, H., Holden, J., Sizeland, A. & D'Abaco, G. (1991) The residues of Ras and Rap proteins that determine their GAP specificities. *Journal of Biological Chemistry*, **266**, 11661-11668.
- Matsubara, K., Kishida, S., Matsuura, Y., Kitayama, H., Noda, M. & Kikuchi, A. (1999) Plasma membrane recruitment of RalGDS is critical for Ras-dependent Ral activation. *Oncogene*, **18**, 1303-1312.
- McCormick, F. & Wittinghofer, A. (1996) Interactions between Ras proteins and their effectors. *Current Opinion in Biotechnology*, **7**, 449-456.
- McGlade, J., Brunkhorst, B., Anderson, D., Mbamalu, G., Settleman, J., Dedhar, S., Rozakis-Adcock, M., Chen, L.B. & Pawson, T. (1993) The N-terminal region of GAP regulates cytoskeletal structure and cell adhesion. *EMBO Journal*, **12**, 3073-3081.
- Menetrey, J. & Cherfils, J. (1999) Structure of the small G protein Rap2 in a non-catalytic complex with GTP. *Proteins-Structure Function and Genetics*, **37**, 465-473.
- Meng, J.W., Glick, J.L., Polakis, P. & Casey, P.J. (1999) Functional interaction between G alpha(z) and Rap1GAP suggests a novel form of cellular cross-talk. *Journal of Biological Chemistry*, **274**, 36663-36669.
- Michelitch, M. & Chant, J. (1996) A mechanism of Bud1p GTPase action suggested by mutational analysis and immunolocalization. *Current Biology*, **6**, 446-454.
- Milburn, M.V., Tong, L., deVos, A.M., Brunger, A., Yamaizumi, Z., Nishimura, S. & Kim, S.H. (1990) Molecular switch for signal transduction: structural differences between active and inactive forms of protooncogenic Ras proteins. *Science*, **247**, 939-945.
- Miller, D.L. & Weissbach, H. (1974) Elongation factor Tu and the aminoacyl-tRNA-EFTu-GTP complex. *Methods in Enzymology*, **30**, 219-232.

- Minden, A., Lin, A., McMahon, M., Lange-Carter, C., Derijard, B., Davis, R.J., Johnson, G.L. & Karin, M. (1994) Differential activation of ERK and JNK mitogen-activated protein kinases by Raf-1 and MEKK. *Science*, **266**, 1719-1723.
- Mittal, R., Ahmadian, M.R., Goody, R.S. & Wittinghofer, A. (1996) Formation of a transition-state analog of the Ras GTPase reaction by Ras-GDP, tetrafluoroaluminate, and GTPase-activating proteins. *Science*, **273**, 115-117.
- Mochizuki, N., Ohba, Y., Kiyokawa, E., Kurata, T., Murakami, T., Ozaki, T., Kitabatake, A., Nagashima, K. & Matsuda, M. (1999) Activation of the ERK/MAPK pathway by an isoform of Rap1GAP associated with G alpha(i). *Nature*, **400**, 891-894.
- Mohr, D., Wintermeyer, W. & Rodnina, M.V. (2000) Arginines 29 and 59 of elongation factor G are important for GTP hydrolysis or translocation on the ribosome. *EMBO Journal*, **19**, 3458-3464.
- Moore, M.S. (1998) Ran and nuclear transport. *Journal of Biological Chemistry*, **273**, 22857-22860.
- Morishita, T., Mitsuzawa, H., Nakafuku, M., Nakamura, S., Hattori, S. & Anraku, Y. (1995) Requirement of *Saccharomyces cerevisiae* Ras for completion of mitosis. *Science*, **270**, 1213-1215.
- Morrison, D.K. & Cutler, R.E. (1997) The complexity of Raf-1 regulation. *Current Opinion in Cell Biology*, **9**, 174-179.
- Moss, J. & Vaughan, M. (1998) Molecules in the ARF orbit. *Journal of Biological Chemistry*, **273**, 21431-21434.
- Nassar, N., Hoffman, G.R., Manor, D., Clardy, J.C. & Cerione, R.A. (1998) Structures of Cdc42 bound to the active and catalytically compromised forms of Cdc42GAP. *Nature Structural Biology*, **5**, 1047-1052.
- Nassar, N., Horn, G., Herrmann, C., Block, C., Janknecht, R. & Wittinghofer, A. (1996) Ras/Rap effector specificity determined by charge reversal. *Nature Structural Biology*, **3**, 723-729.
- Nassar, N., Horn, G., Herrmann, C., Scherer, A., McCormick, F. & Wittinghofer, A. (1995) The 2.2 Å crystal structure of the Ras-binding domain of the serine/threonine kinase c-Raf1 in complex with Rap1A and a GTP analogue. *Nature*, **375**, 554-560.
- Niebuhr, K., Ebel, F., Frank, R., Reinhard, M., Domann, E., Carl, U.D., Walter, U., Gertler, F.B., Wehland, J. & Chakraborty, T. (1997) A novel proline-rich motif present in ActA of *Listeria monocytogenes* and cytoskeletal proteins is the ligand for the EVH1 domain, a protein module present in the Ena/VASP family. *EMBO Journal*, **16**, 5433-5444.

- Noel, J.P., Hamm, H.E. & Sigler, P.B. (1993) The 2.2 Å crystal structure of transducin- α complexed with GTP gamma S. *Nature*, **366**, 654-663.
- O'Shannessy, D.J. (1990) Antibodies biotinylated via sugar moieties. *Methods in Enzymology*, **184**, 162-166.
- Ohmstede, C.A., Farrell, F.X., Reep, B.R., Clemetson, K.J., Lapetina & EG (1990) Rap2B: a Ras-related GTP-binding protein from platelets. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **87**, 6527-6531.
- Ohtsuka, T., Shimizu, K., Yamamori, B., Kuroda, S. & Takai, Y. (1996) Activation of brain B-Raf protein kinase by Rap1B small GTP-binding protein. *Journal of Biological Chemistry*, **271**, 1258-1261.
- 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.
- Pai, E.F., Krengel, U., Petsko, G.A., Goody, R.S., Kabsch, W. & Wittinghofer, A. (1990) Refined crystal structure of the triphosphate conformation of H-Ras p21 at 1.35 Å resolution: implications for the mechanism of GTP hydrolysis. *EMBO Journal*, **9**, 2351-2359.
- Park, H.O., Bi, E., Pringle, J.R. & Herskowitz, I. (1997) Two active states of the Ras-related Bud1/Rsr1 protein bind to different effectors to determine yeast cell polarity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **94**, 4463-4468.
- Park, H.O., Chant, J. & Herskowitz, I. (1993) BUD2 encodes a GTPase-activating protein for Bud1/Rsr1 necessary for proper bud-site selection in yeast. *Nature*, **365**, 269-274.
- Pawson, T. & Scott, J.D. (1997) Signaling Through Scaffold, Anchoring, and Adaptor Proteins. *Science*, **278**, 2075-2080.
- Peterson, S.N., Trabalzini, L., Brtva, T.R., Fischer, T., Altschuler, D.L., Martelli, P., Lapetina, E.G., Der, C.J. & White, G.C.2. (1996) Identification of a novel RalGDS-related protein as a candidate effector for Ras and Rap1. *Journal of Biological Chemistry*, **271**, 29903-29908.
- Picard, V., Ersdal-Badju, E., Lu, A. & Bock, S.C. (1994) A rapid and efficient one-tube PCR-based mutagenesis technique using Pfu DNA polymerase. *Nucleic Acids Research*, **22**, 2587-2591.
- Pingoud, A. & Urbanke, C. (1997) *Arbeitsmethoden der Biochemie.*, Walter de Gruyter, Berlin, New York.
- Pizon, V., Desjardins, M., Bucci, C., Parton, R.G. & Zerial, M. (1994) Association of Rap1a and Rap1b proteins with late endocytic/phagocytic compartments and Rap2a with the Golgi complex. *Journal of Cell Science*, **107**, 1661-1670.

- Pizon, V., Lerosey, I., Chardin, P. & Tavitian, A. (1988) Nucleotide sequence of a human cDNA encoding a Ras-related protein (Rap1B). *Nucleic Acids Research*, **16**, 7719
- Polakis, P.G., Rubinfeld, B., Evans, T. & McCormick, F. (1991) Purification of a plasma membrane-associated GTPase-activating protein specific for rap1/Krev-1 from HL60 cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **88**, 239-243.
- Posern, G., Weber, C.K., Rapp, U.R. & Feller, S.M. (1998) Activity of Rap1 is regulated by bombesin, cell adhesion, and cell density in NIH3T3 fibroblasts. *Journal of Biological Chemistry*, **273**, 24297-24300.
- Quinn, M.T., Mullen, M.L., Jesaitis, A.J. & Linner, J.G. (1992) Subcellular distribution of the Rap1A protein in human neutrophils: colocalization and cotranslocation with cytochrome b559. *Blood*, **79**, 1563-1573.
- Reedquist, K.A. & Bos, J.L. (1998) Costimulation through cd28 suppresses t-cell receptor-dependent activation of the Ras-like small gtpase Rap1 in human t- lymphocytes. *Journal of Biological Chemistry*, **273**, 4944-4949.
- Reedquist, K.A., Ross, E., Koop, E.A., Wolthuis, R.M.F., Zwartkruis, F.J.T., van Kooyk, Salmon, M., Buckley, C.D. & Bos, J.L. (2000) The small GTPase, Rap1, mediates CD31-induced integrin adhesion. *Journal of Cell Biology*, **148**, 1151-1158.
- Rensland, H., John, J., Linke, R., Simon, I., Schlichting, I., Wittinghofer, A. & Goody, R.S. (1995) Substrate and product structural requirements for binding of nucleotides to H-ras p21: the mechanism of discrimination between guanosine and adenosine nucleotides. *Biochemistry*, **34**, 593-599.
- Rittinger, K., Walker, P.A., Eccleston, J.F., Nurmahomed, K., Owen, Laue, E., Gamblin, S.J. & Smerdon, S.J. (1997a) 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. (1997b) Structure at 1.65 Å of RhoA and its GTPase-activating protein in complex with a transition-state analogue. *Nature*, **389**, 758-762.
- Rodriguez-Viciano, P., Warne, P.H., Khwaja, A., Marte, B.M., Pappin, D., Das, P., Waterfield, M.D., Ridley, A. & Downward, J. (1997) Role of phosphoinositide 3-OH kinase in cell transformation and control of the actin cytoskeleton by Ras. *Cell*, **89**, 457-467.
- Rost, B. (1996) PHD: predicting one-dimensional protein structure by profile-based neural networks. *Methods in Enzymology*, **266**, 525-539.
- Rubinfeld, B., Crosier, W.J., Albert, I., Conroy, L., Clark, R., McCormick, F. & Polakis, P. (1992) Localization of the Rap1GAP catalytic domain and sites of phosphorylation by mutational analysis. *Molecular and Cellular Biology*, **12**, 4634-4642.

- Rubinfeld, B., Munemitsu, S., Clark, R., Conroy, L., Watt, K., Crosier, W.J., McCormick, F. & Polakis, P. (1991) Molecular cloning of a GTPase activating protein specific for the Krev-1 protein p21Rap1. *Cell*, **65**, 1033-1042.
- Rubinfeld, B. & Polakis, P. (1995) Purification of baculovirus-produced Rap1 GTPase-activating protein. *Methods in Enzymology*, **255**, 31-38.
- Ruggieri, R., Macdonald, S.G., Callow, M. & McCormick, F. (1994) Raf-1 interferes with Ras and Rap1A effector functions in yeast. *Molecular Biology of the Cell*, **5**, 173-181.
- Sakoda, T., Kaibuchi, K., Kishi, K., Kishida, S., Doi, K., Hoshino, M., Hattori, S. & Takai, Y. (1992) smg/rap1/Krev-1 p21s inhibit the signal pathway to the c-fos promoter/enhancer from c-Ki-ras p21 but not from c-raf-1 kinase in NIH3T3 cells. *Oncogene*, **7**, 1705-1711.
- Sander, E.E. & Collard, J.G. (1999) Rho-like GTPases: their role in epithelial cell-cell adhesion and invasion. *European Journal of Cancer*, **35**, 1905-1911.
- Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A.R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **74**, 5463-5467.
- Sato, K.Y., Polakis, P.G., Haubruck, H., Fasching, C.L., McCormick, F. & Stanbridge, E.J. (1994) Analysis of the tumor suppressor activity of the K-rev-1 gene in human tumor cell lines. *Cancer Research*, **54**, 552-559.
- Schürmann, A., Brauers, A., Massmann, S., Becker, W. & Joost, H.G. (1995) Cloning of a novel family of mammalian GTP-binding proteins (RagA, RagBs, RagB1) with remote similarity to the Ras-related GTPases. *Journal of Biological Chemistry*, **270**, 28982-28988.
- Scheffzek, K., Ahmadian, M.R., Kabsch, W., Wiesmuller, L., Lautwein, A., Schmitz, F. & Wittinghofer, A. (1997) The Ras-RasGAP complex: structural basis for GTPase activation and its loss in oncogenic Ras mutants. *Science*, **277**, 333-338.
- Scheffzek, K., Ahmadian, M.R. & Wittinghofer, A. (1998) GTPase-activating proteins: helping hands to complement an active site. *Trends in Biochemical Sciences*, **23**, 257-262.
- Scheffzek, K., Lautwein, A., Kabsch, W., Ahmadian, M.R. & Wittinghofer, A. (1996) Crystal structure of the GTPase-activating domain of human p120GAP and implications for the interaction with Ras. *Nature*, **384**, 591-596.
- Schimmöller, F., Simon, I. & Pfeffer, S.R. (1998) Rab GTPases, directors of vesicle docking. *Journal of Biological Chemistry*, **273**, 22161-22164.

- Schindelin, H., Kisker, C., Schlessman, J.L., Howard, J.B., Rees & DC (1997) Structure of ADP x AIF4(-)-stabilized nitrogenase complex and its implications for signal transduction. *Nature*, **387**, 370-376.
- Schlichting, I., Almo, S.C., Rapp, G., Wilson, K., Petratos, K., Lentfer, A., Wittinghofer, A., Kabsch, W., Pai, E.F. & Petsko, G.A. (1990) Time-resolved X-ray crystallographic study of the conformational change in Ha-Ras p21 protein on GTP hydrolysis. *Nature*, **345**, 309-315.
- Schmidt, G., Lenzen, C., Simon, I., Deuter, R., Cool, R.H., Goody, R.S. & Wittinghofer, A. (1996) Biochemical and Biological Consequences of Changing the Specificity of p21(Ras) from Guanosin to Xanthosine Nucleotides. *Oncogene*, **12**, 87-96.
- Schweins, T., Geyer, M., Scheffzek, K., Warshel, A., Kalbitzer, H.R. & Wittinghofer, A. (1995) Substrate-assisted catalysis as a mechanism for GTP hydrolysis of p21Ras and other GTP-binding proteins. *Nature Structural Biology*, **2**, 36-44.
- Schweins, T., Scheffzek, K., Assheuer, R. & Wittinghofer, A. (1997) The Role of the Metal Ion in the p21(Ras) Catalysed GTP-Hydrolysis - Mn^{2+} versus Mg^{2+} . *Journal of Molecular Biology*, **266**, 847-856.
- Sethi, T., Ginsberg, M.H., Downward, J. & Hughes, P.E. (1999) The small GTP-binding protein R-Ras can influence integrin activation by antagonizing a Ras/Raf-initiated integrin suppression pathway. *Molecular Biology of the Cell*, **10**, 1799-1809.
- Shao, H.P., Kadono-Okuda, K., Finlin, B.S. & Andres, D.A. (1999) Biochemical characterization of the Ras-related GTPases Rit and Rin. *Archives of Biochemistry & Biophysics*, **371**, 207-219.
- Siess, W., Winegar, D.A. & Lapetina, E.G. (1990) Rap1-B is phosphorylated by protein kinase A in intact human platelets. *Biochemical & Biophysical Research Communications*, **170**, 944-950.
- Somsel, R.J. & Wandinger-Ness, A. (2000) Rab GTPases coordinate endocytosis. *Journal of Cell Science*, **113 Pt 2**, 183-192.
- Sondek, J., Lambright, D.G., Noel, J.P., Hamm, H.E. & Sigler, P.B. (1994) GTPase mechanism of Gproteins from the 1.7-A crystal structure of transducin alpha-GDP-AIF-4. *Nature*, **372**, 276-279.
- Spaargaren, M. & Bischoff, J.R. (1994) Identification of the guanine nucleotide dissociation stimulator for Ral as a putative effector molecule of R-Ras, H-Ras, K-Ras, and Rap. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **91**, 12609-12613.
- Tesmer, J.J., Berman, D.M., Gilman, A.G. & Sprang, S.R. (1997) Structure of RGS4 bound to AIF4--activated G(i alpha1): stabilization of the transition state for GTP hydrolysis. *Cell*, **89**, 251-261.

- The C.elegans Sequencing Consortium (1998) Genome sequence of the nematode *C. elegans*: a platform for investigating biology. *Science*, **282**, 2012-2018.
- Torti, M., Ramaschi, G., Sinigaglia, F., Lapetina, E.G. & Balduini, C. (1994) Glycoprotein IIb-IIIa and the translocation of Rap2B to the platelet cytoskeleton. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **91**, 4239-4243.
- Tsukamoto, N., Hattori, M., Yang, H.L., Bos, J.L. & Minato, N. (1999) Rap1 GTPase-activating protein SPA-1 negatively regulates cell adhesion. *Journal of Biological Chemistry*, **274**, 18463-18469.
- Tucker, J., Sczakiel, G., Feuerstein, J., John, J., Goody, R.S. & Wittinghofer, A. (1986) Expression of p21 proteins in *Escherichia coli* and stereochemistry of the nucleotide-binding site. *EMBO Journal*, **5**, 1351-1358.
- Urano, T., Emkey, R. & Feig, L.A. (1996) Ral-GTPases mediate a distinct downstream signaling pathway from Ras that facilitates cellular transformation. *EMBO Journal*, **15**, 810-816.
- van Biesen, T., Hawes, B.E., Luttrell, D.K., Krueger, K.M., Touhara, K., Porfiri, E., Sakaue, M., Luttrell, L.M. & Lefkowitz, R.J. (1995) Receptor-tyrosine-kinase- and G beta gamma-mediated MAP kinase activation by a common signalling pathway. *Nature*, **376**, 781-784.
- van den Berghe, N., Cool, R.H. & Wittinghofer, A. (1999) Discriminatory residues in Ras and Rap for guanine nucleotide exchange factor recognition. *Journal of Biological Chemistry*, **274**, 11078-11085.
- Vavvas, D., Li, X., Avruch, J. & Zhang, X.F. (1998) Identification of Nore1 as a potential Ras effector. *Journal of Biological Chemistry*, **273**, 5439-5442.
- Vetter, I.R. & Wittinghofer, A. (1999) Nucleoside triphosphate-binding proteins: different scaffolds to achieve phosphoryl transfer. *Quarterly Reviews of Biophysics*, **32**, 1-56.
- Vojtek, A.B. & Der, C.J. (1998) Increasing complexity of the Ras signaling pathway. *Journal of Biological Chemistry*, **273**, 19925-19928.
- Vossler, M.R., Yao, H., York, R.D., Pan, M.G., Rim, C.S. & Stork, P.J.S. (1997) cAMP activates MAP kinase and Elk-1 through a B-Raf- and Rap1- dependent pathway. *Cell*, **89**, 73-82.
- Waskiewicz, A.J., Flynn, A., Proud, C.G. & Cooper, J.A. (1997) Mitogen-activated protein kinases activate the serine/threonine kinases Mnk1 and Mnk2. *EMBO Journal*, **16**, 1909-1920.
- Wes, P.D., Yu, M. & Montell, C. (1996) RIC, a calmodulin-binding Ras-like GTPase. *EMBO Journal*, **15**, 5839-5848.

- Wienecke, R., Konig, A. & DeClue, J.E. (1995) Identification of tuberin, the tuberous sclerosis-2 product. Tuberin possesses specific Rap1GAP activity. *Journal of Biological Chemistry*, **270**, 16409-16414.
- Wienecke, R., Maize, J.C., Reed, J.A., de Gunzburg, J., Yeung, R.S. & DeClue, J.E. (1997) Expression of the TSC2 Product Tuberin and Its Target Rap1 in Normal Human Tissues. *American Journal of Pathology*, **150**, 43-50.
- Wienecke, R., Maize, J.C., Jr., Shoarinejad, F., Vass, W.C., Reed, J., Bonifacino, J.S., Resau, J.H., de Gunzburg, J., Yeung, R.S. & DeClue, J.E. (1996) Co-localization of the TSC2 product tuberin with its target Rap1 in the Golgi apparatus. *Oncogene*, **13**, 913-923.
- Wittinghofer, A. (1997) Signaling mechanistics: aluminum fluoride for molecule of the year. *Current Biology*, **7**, R682-5.
- Wittinghofer, A. & Nassar, N. (1996) How Ras-related proteins talk to their effectors. *Trends in Biochemical Sciences*, **21**, 488-491.
- Wittinghofer, A., Scheffzek, K. & Ahmadian, M.R. (1997) The interaction of Ras with GTPase-activating proteins. *FEBS Letters*, **410**, 63-67.
- Wittinghofer, A. & Waldmann, H. (2000) Ras, a Molecular Switch Involved in Tumor Formation. *Angewandte Chemie*,
- Wolthuis, R.M., Bauer, B., van't Veer, L.J., de Vries-Smits, A.M., Cool, R.H., Spaargaren, M., Wittinghofer, A., Burgering, B.M. & Bos, J.L. (1996) RalGDS-like factor (Rlf) is a novel Ras and Rap 1A-associating protein. *Oncogene*, **13**, 353-362.
- Wolthuis, R.M. & Bos, J.L. (1999) Ras caught in another affair: the exchange factors for Ral. *Current Opinion in Genetics & Development*, **9**, 112-117.
- Wolthuis, R.M., Franke, B., van Triest, M., Bauer, B., Cool, R.H., Camonis, J.H., Akkerman, J.W. & Bos, J.L. (1998) Activation of the small GTPase Ral in platelets. *Molecular and Cellular Biochemistry*, **18**, 2486-2491.
- Wolthuis, R.M., Zwartkuis, F., Moen, T.C. & Bos, J.L. (1998) Ras-dependent activation of the small GTPase Ral. *Current Biology*, **8**, 471-474.
- Xu, Z., Horwich, A.L. & Sigler, P.B. (1997) The crystal structure of the asymmetric GroEL-GroES-(ADP)₇ chaperonin complex. *Nature*, **388**, 741-750.
- Xu, Z. & Sigler, P.B. (1998) GroEL/GroES: structure and function of a two-stroke folding machine. *Journal of Structural Biology*, **124**, 129-141.
- Yaffe, M.B., Rittinger, K., Volinia, S., Caron, P.R., Aitken, A., Leffers, H., Gambin, S.J., Smerdon, S.J. & Cantley, L.C. (1997) The structural basis for 14-3-3:phosphopeptide binding specificity. *Cell*, **91**, 961-971.

- Yamasaki, K., Shirouzu, M., Muto, Y., Fujita-Yoshigaki, J., Koide, H., Ito, Y., Kawai, G., Hattori, S., Yokoyama, S., Nishimura, S. & Miyazawa, T. (1994) Site-directed mutagenesis, fluorescence, and two-dimensional NMR studies on microenvironments of effector region aromatic residues of human c-Ha-Ras protein. *Biochemistry*, **33**, 65-73.
- Yee, W.M. & Worley, P.F. (1997) Rheb interacts with Raf-1 kinase and may function to integrate growth factor- and protein kinase A-dependent signals. *Molecular & Cellular Biology*, **17**, 921-933.
- York, R.D., Yao, H., Dillon, T., Ellig, C.L., Eckert, S.P., McCleskey, E.W. & Stork, P.J.S. (1998) Rap1 mediates sustained MAP kinase activation induced by nerve growth factor. *Nature*, **392**, 622-626.
- Yoshida, Y., Kawata, M., Miura, Y., Musha, T., Sasaki, T., Kikuchi, A. & Takai, Y. (1992) Microinjection of smg/Rap1/Krev-1 p21 into Swiss 3T3 cells induces DNA synthesis and morphological changes. *Molecular & Cellular Biology*, **12**, 3407-3414.
- Zerial, M. & Huber, L.A. (1995) *Guidebook to the Small GTPases*, Oxford University Press, Oxford, New York, Tokyo.
- Zwartkruis, F.J., Wolthuis, R.M., Nabben, N.M., Franke, B. & Bos, J.L. (1998) Extracellular signal-regulated activation of Rap1 fails to interfere in Ras effector signalling. *EMBO Journal*, **17**, 5905-5912.
- Zwartkruis, F.J.T. & Bos, J.L. (1999) Ras and Rap1: Two highly related small GTPases with distinct function. *Experimental Cell Research*, **253**, 157-165.

8 Anhang

8.1 Abkürzungen

AF6	<i>ALL-1 fusion-protein 6</i>
AS	Aminosäure(n)
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BMP	Bromphenolblau
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i>
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
DABP	Diaminobenzophenon
DEAE	Diethylaminoethyl
DICD	Diisopropylcarbodiimid
DMF	N,N-Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>DesoxyriboNucleic Acid</i> (Desoxyribonukleinsäure)
DSC	<i>Differential Scanning Calorimetry</i>
DTE	1,4-Dithioerythritol
DTNB	5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoesäure)
E	Energie
Ets	<i>E26 transformation specific</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EGF	<i>Epidermal Growth Factor</i>
Epac	<i>Exchange protein activated by cAMP</i>
EtOH	Ethanol
Fmoc	9-Fluorenylmethyloxycarbonyl
g	Erdbeschleunigung
GAP	GTPase aktivierendes Protein
G-CSF	<i>Granulocyte Colony-Stimulating Factor</i>
GDP	Guanosin-5'-diphosphat
GEF	<i>GuanineNucleotide Exchange Factor</i> (Guaninnukleotid-Austauschfaktor)
GMP	Guanosin-5'-monophosphat
GST	Glutathion-S-Transferase
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
HOBt	Hydroxybenzotriazol
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
I	Strom
IAEDANS	5-(((2-Iodoacetyl)amino)ethyl)amino)naphtalen-1-sulfonsäure
IPTG	Isopropyl- β -D-1-thiogalaktosid
ITC	<i>Isothermal Titration Calorimetry</i>
kDa	Kilodalton
LPA	<i>LysoPhosphatidic Acid</i> (Lysophosphatidsäure)
mant	N-Methylantraniloyl
MeOH	Methanol

mGDP	N-Methylantraniloyl-guanosin-5'-Diphosphat
mGppNHp	N-Methylantraniloyl-guanosin-5'-(β , γ -imido)triphosphat
min	Minute(n)
MMt	4-Methoxytriphenylmethyl-
NGF	<i>Nerve Growth Factor</i>
NMP	N-Methylpyrrolidinon
OD ₆₀₀	optische Dichte bei 600 nm
P	Leistung
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Polymerasekettenreaktion)
PDGF	<i>Platelet Derived Growth Factor</i>
PDZ	<i>Postsynaptic density/Disc large/ZO1</i>
PEG	Polyethylenglycol
PHD	<i>Profile fed neural network systems from Heidelberg</i>
PKA	Proteinkinase A
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
POPOP	1,4-Bis-(5-phenyloxazolyl)-benzol
PPO	2,5-Di-phenyloxazol
PVDF	Polyvinylidendifluorid
Rax	Ras oder Rap
Ral	<i>Ras like protein</i>
RalGDS	<i>Ral guanine dissociation stimulator</i>
RBD	Ras-Bindedomäne
Rgl	<i>RalGDS-like</i>
RGS	<i>Regulators of G-Protein-Signaling</i>
Rin	<i>Ras-interaction-interference</i>
Rlf	<i>RalGDS-like factor</i>
rpm	revolutions per minute (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
RU	<i>Resonance Units</i>
SDS-PAGE	<i>Sodium</i> (Natrium)- <i>dodecyl-sulfate</i> Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SPR	<i>Surface Plasmon Resonance</i>
t	Zeit
TBA	Tetrabutylammoniumbromid
TCF	<i>Ternary Complex Factor</i>
tBu	tertiär Butyl
TFA	Trifluoressigsäure
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin
TIBS	Triisobutylsilan
TPA	Tetradecanoyl-Phorbol-Acetat
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
TSS	<i>Transformation and Storage Solution</i>
U	<i>unit</i> (enzymatische Aktivität [$\mu\text{M min}^{-1}$]); elektrische Spannung
ÜN	über Nacht
UV	Ultraviolett

8.2 Danksagung

Mein Dank gilt allen, die mit der Entstehung dieser Arbeit in mittelbarem Zusammenhang stehen, insbesondere:

Prof. Dr. Alfred Wittinghofer für seine ständige Diskussionsbereitschaft, die intensive Betreuung und Unterstützung dieses und anderer Projekte sowie die zeitweilige Überlassung von Dauerkarten für die Spiele einer lokalen Fußballmannschaft;

Prof. Dr. Alfred Pingoud für die freundliche und unkomplizierte Übernahme der Betreuung dieser Arbeit an der Justus-Liebig-Universität Giessen und dafür, mich mit der Welt der GTPasen bekannt gemacht zu haben;

Prof. Dr. Gottfried Wagner für die ebenfalls freundliche und unkomplizierte Übernahme des Korreferates;

Dr. Ronald Frank für die temporäre Aufnahme in seine sympathische Arbeitsgruppe und seine kombinatorischen Fähigkeiten;

Dr. Reza Ahmadian für die Überlassung von Rap1GAP und reichlich Erfahrung;

Doro Kühlmann und Patricia Stege für ihre wunderbar mutagene Art, Ordnung im Labor, Süßigkeiten in der Schublade, Rat und Tat...;

Astrid Krämer für ihre stete Hilfsbereitschaft, viele Lacher im Labor und die häufige Überlassung von Laborbankecken, Taschenrechnern etc.;

Robert Gail, Michael Spörner und Oliver Rocks für geistigen und sportlichen Ansporn;

Holger (Holcher) Rehmann für interessante Erlebnisse und viele Anekdoten;

Martin Würtele für seine Kritikfähigkeit;

Gerrit Praefcke für ich weiss nicht was alles;

allen Kollegen (ohne Ausnahme!) der Abteilung I, für ihre Kollegialität und Hilfsbereitschaft;

meinen Eltern, für ihre Unterstützung nicht nur während der Promotion;

und Marion, die mich ausserhalb des Labors ertragen hat.

8.3 Veröffentlichungen zum Thema dieser Arbeit

Thilo Brinkmann, Mohammad Reza Ahmadian, Patricia Stege und Alfred Wittinghofer: Stimulation of Rap1-GTPase by Rap1GAP Follows an Alternative Mechanism. (in Vorbereitung).

8.4 Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, daß ich die vorliegende Arbeit mit dem Titel "Untersuchung der GAP-katalysierten GTP-Hydrolysereaktion von Ras und Rap" selbständig verfaßt und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel und Quellen verwendet habe. Ich habe diese Arbeit weder in Gießen noch an anderer Stelle bereits als Diplomarbeit oder Dissertation eingereicht.

Dortmund, 07.09.2000

