

Konformationelle Dynamik des Ras-Proteins und ihre Bedeutung für die Effektor-Wechselwirkung

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften
(*Dr. rer. nat.*) der Naturwissenschaftlichen Fakultät III
-Biologie und Vorklinische Medizin-
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Michael Spörner
aus Bopfingen

Regensburg
Juli 2002

Promotionsgesuch eingereicht am: 08.07.2002

Die Arbeit wurde angeleitet von: Prof. Dr. Dr. Hans Robert Kalbitzer

Prüfungsausschuss: Prof. Dr. Reinhard Wirth (Vorsitzender)
Prof. Dr. Dr. Hans Robert Kalbitzer (1. Gutachter)
Prof. Dr. Alfred Wittinghofer (2. Gutachter)
Prof. Dr. Wolfgang Oertel (3. Prüfer)

1	Einleitung	1
1.1	Guaninnukleotid-bindende Proteine	1
1.2	Die Superfamilie der Ras-verwandten Proteine	1
1.3	Ras-Proteine	2
1.3.1	Strukturelle Organisation von Ras-Proteinen	2
1.3.2	Regulationszyklus von Ras	5
1.3.3	Ras und seine Funktion in der Signaltransduktion	7
1.4	Ras-Effektoren	10
1.5	Assoziation zwischen Ras und Effektoren	13
1.6	Ras(T35S): eine <i>partial loss-of-function</i> Mutante	13
1.7	Protein-Dynamik	15
1.8	³¹ P-NMR-Spektroskopie an Guaninnukleotid-bindenden Proteinen	16
1.9	EPR-Spektroskopie an Guaninnukleotid-bindenden Proteinen	18
1.10	Zielsetzung	20
2	Materialien und Geräte	21
2.1	Chemikalien	21
2.2	Häufig verwendete Puffer-Lösungen	21
2.3	Plasmide	21
2.4	Bakterienstämme	22
2.5	Nährmedien und Antibiotika	22
2.6	Enzyme	22
2.7	Standard	23
2.8	Verbrauchsmaterial und Zubehör	23
2.9	Säulenmaterialien	23
2.10	Geräte	23
2.11	Auswertung- und Darstellungssoftware	24
3	Methoden	25
3.1	Expression und Reinigung von Proteinen	25
3.1.1	Expression und Reinigung von Ras	25
3.1.2	Expression und Reinigung von Ran	26
3.1.3	Expression und Reinigung von Raf-RBD	27
3.1.4	Expression und Reinigung von RalGDS-RBD	27
3.1.5	Expression und Reinigung von NF1-333	28
3.2	Proteinbiochemische Methoden	28
3.2.1	Bestimmung der Proteinkonzentration	28
3.2.1.1	Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford	28
3.2.1.2	Bestimmung der Protein-/Nukleotidkonzentration mittels HPLC	28
3.2.2	Bestimmung von Hydrolyseraten mittels HPLC	29
3.2.3	Denaturierende SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	29
3.2.3.1	SDS-PAGE nach Laemmli	29
3.2.3.2	SDS-PAGE nach Schagger und v. Jagow	30
3.2.4	Nukleotidreinigung	30

3.2.5	Metallion- und Nukleotidaustausch	31
3.2.5.1	Austausch des Mg^{2+} zu Mn^{2+}	31
3.2.5.2	Nukleotidaustausch zu GTP	31
3.2.5.3	Nukleotidaustausch zu mGDP/mGTP	31
3.2.5.4	Nukleotidaustausch zu GppNHp, GppCH ₂ p, GTP γ S oder mGppNHp	32
3.2.6	Kristallisation von Ras-Proteinen	32
3.2.6.1	Kristallisation von Ras(wt)•GppNHp	32
3.2.6.2	Kristallisation von Ras(T35S)•GppNHp	32
3.3	Biophysikalische Messmethoden	33
3.3.1	Kernspinresonanz-Spektroskopie	33
3.3.1.1	Probenbereitung und Messung	33
3.3.1.2	Bestimmung der Parameter von Resonanzlinien	33
3.3.1.3	Simulation der Austauschraten	34
3.3.2	Elektronenspinresonanz-Spektroskopie	35
3.3.2.1	Probenbereitung und Messung	35
3.3.2.2	Simulation und Auswertung	36
3.3.3	<i>Stopped Flow</i> -Messungen der Interaktion zwischen Ras und Effektoren	37
3.3.3.1	Probenbereitung und Messung	37
3.3.3.2	Kinetik der Interaktion zwischen Ras-Varianten und Effektor-RBD	37
3.3.4	Fluoreszenzspektroskopie	38
3.3.5	Isotherme Titrationskalorimetrie (ITC)	39
3.3.6	<i>Differential Scanning</i> -Kalorimetrie (DSC)	40
4	Ergebnisse	41
4.1	Untersuchung verschiedener Ras•GDP-Komplexe	41
4.1.1	Die Ligandensphäre des Mn^{2+} -Ions im Ras•GDP-Komplex	41
4.1.2	³¹ P-NMR-Untersuchungen an Ras• Mg^{2+} •GDP	43
4.1.3	Analyse der Ras•GDP-EPR-Spektren unter Annahme einer inhomogenen Ligandensphäre des gebundenen Metallions	46
4.2.	Untersuchungen an verschiedenen Ras•GppNHp-Komplexen	48
4.2.1	³¹ P-NMR Untersuchungen an Ras(wt)•GppNHp	48
4.2.2	³¹ P-NMR-Spektroskopie an Thr35-Mutanten im Komplex mit GppNHp	49
4.2.3	Spin-Gitter-Relaxation der Phosphate im Ras-Nukleotid-Komplex	51
4.2.4	Kristallstruktur von Ras(T35S)•GppNHp	52
4.2.5	MAS- ³¹ P-NMR-Spektroskopie an Ras-Kristallpulver	53
4.2.6	DSC-Untersuchungen an Ras•GppNHp	55
4.2.7	Bestimmung der Mg^{2+} -Affinität zum Ras-Nukleotidkomplex	55
4.2.8	³¹ P-NMR-Untersuchungen zur Komplexbildung zwischen Ras(wt) und Effektorproteinen	57
4.2.9	Komplexbildung zwischen Thr35-Mutanten von Ras und Effektorproteinen	59
4.2.10	Auswirkung unterschiedlicher Fluorophore auf die Dynamik von Ras	61
4.2.11	<i>Stopped Flow</i> -Untersuchungen zur Assoziation zwischen Ras und Effektorproteinen	62

4.2.12	Affinitäten zwischen Ras(T35S) und verschiedener Effektor-RBDs	65
4.2.13	³¹ P-NMR-Spektroskopie an verschiedenen Schalter I-Mutanten von Ras im Komplex mit GppNHp	66
4.3	Untersuchung weiterer GTP-Analoga im Komplex mit Ras	69
4.3.1	³¹ P-NMR-Spektroskopie an Ras•GppCH ₂ p	69
4.3.1.1	Konformationelle Gleichgewichte von Ras•GppCH ₂ p	69
4.3.1.2	³¹ P-NMR-Untersuchungen zur Komplexbildung zwischen Ras•GppCH ₂ p und Effektorproteinen	72
4.3.2	³¹ P-NMR-Spektroskopie an Ras•GTP γ S	73
4.3.2.1	³¹ P-NMR-Untersuchungen zur Komplexbildung zwischen Ras•GTP γ S und Effektorproteinen	73
4.3.2.2	Konformationelle Gleichgewichte von Ras(T35S)•GTP γ S	75
4.3.3	Einfluss des gebundenen Nukleotids auf die Effektorbindung	78
4.4	³¹ P-NMR-Spektroskopie an Ras•GTP	80
4.5	Hochfeld-EPR an Ras-Triphosphat-Komplexen	82
4.6	Ras•GDP•BeF ₃ ⁻ zur Darstellung des Triphosphat-Komplexes	83
4.7	Hydrolyseeigenschaften von Ras(T35S)	85
4.8	Hydrolyse von GTP γ S	86
5	Diskussion	87
5.1	Mn ²⁺ -EPR-Spektroskopie an Guaninnukleotid-bindenden Proteinen	88
5.2	Untersuchung von Ras•GDP-Komplexen in Lösung	89
5.3	Untersuchungen zur Dynamik der konformationellen Gleichgewichte in Ras•GppNHp-Komplexen	93
5.4	Einfluss der Thr35-Mutationen auf die Bindung des Mg ²⁺ -Ions und des Nukleotids	95
5.5	Ras(T35S): eine <i>partial loss-of-function</i> Mutante	97
5.6	³¹ P-NMR-Untersuchungen der Komplexbildung zwischen Ras•GppNHp und Effektoren	98
5.6.1	Komplexbildung zwischen Ras•GppNHp und Effektoren	98
5.6.2	Komplexbildung zwischen Thr35-Mutanten von Ras und Effektoren	99
5.6.3	Komplexbildung weiterer Schalter I-Mutanten mit Raf-RBD	100
5.7	Assoziation von Effektor-RBD an Ras•mGppNHp	101
5.8	Einfluss unterschiedlicher Triphosphate auf die konformationellen Gleichgewichte von Ras	104
5.9	Einfluss verschiedener GTP-Analoga auf die Effektorbindung von Ras	108
5.10	Hydrolyseeigenschaften von Ras(T35S)	109
5.11	Hydrolyse von GTP γ S	110
6	Zusammenfassung	112
7	Literaturverzeichnis	114
8	Abkürzungsverzeichnis	123

1 Einleitung

1.1 Guaninnukleotid-bindende Proteine

Die Existenz höherer Organismen, aber bereits auch die, einfach organisierter Einzeller, erfordert Wege der Informationsübertragung. Im Laufe der Evolution haben sich Mechanismen entwickelt, die Zellen befähigen, mit ihrer Umwelt in Kontakt zu treten, aber auch intrazelluläre Prozesse zu steuern. Hierzu sind Rezeptoren notwendig die Signale spezifisch erkennen und weiterleiten können. An diesen Signalwegen sind häufig Guaninnukleotid-bindende Proteine beteiligt, die als regulierbare, molekulare Schalter funktionieren. Die Guaninnukleotid-bindenden Proteine werden in fünf Superfamilien unterteilt: die α -Untereinheiten heterotrimerer G-Proteine, die Translationsfaktoren der Proteinbiosynthese (IF-2, EF-Tu, EF-G, RF-3), die Superfamilie der Ras-verwandten Proteine, das Signalerkennungspartikel und dessen Rezeptor (SRP, SRP-R) und die großen Guaninnukleotid-bindenden Proteine (Dynamin, GBP, Mx). In dieser Arbeit wurde ein Mitglied der Superfamilie der Ras-verwandten Proteine untersucht, die auch Ras-homologe kleine GTPasen genannt werden.

1.2 Die Superfamilie der Ras-verwandten Proteine

Die inzwischen über 100 beschriebenen Proteine der Ras-Superfamilie werden in neun Subfamilien unterteilt. Ihr Molekulargewicht beträgt zwischen 20 und 25 kDa. Ihnen gemeinsam ist die Fähigkeit GTP zu binden und es durch eine Hydrolysereaktion in GDP und freierwerdendes Phosphat zu spalten. Die Bindung des Guaninnukleotids findet in einer Nukleotid-Bindedomäne statt, die nicht nur innerhalb der Ras-Superfamilie, sondern bei nahezu allen Guaninnukleotid-bindenden Proteinen homolog ist. Im GTP-gebundenen Zustand befinden sich diese Proteine im aktiven Zustand (Schalterstellung: „ein“) und können Effektorproteine mit hoher Affinität binden. Die Hydrolyse des gebundenen GTP zu GDP und die Freisetzung des γ -Phosphats führen zu einer Konformationsänderung der Proteine. In der GDP-gebundenen Form, die die Schalterstellung „aus“ darstellt, weisen sie dann nur noch sehr geringe Affinitäten zu ihren Effektorproteinen auf, so dass sie die Effektoren unter physiologischen Bedingungen nicht mehr binden.

Hinsichtlich ihrer Funktion sind die Mitglieder der Ras-Superfamilie an sehr unterschiedlichen Regulationsvorgängen beteiligt. Zur Familie der Ras-Proteine (**Rat sarcoma**), nach der auch die Ras-Superfamilie benannt ist, gehören H-Ras, K-Ras, N-Ras, R-Ras, TC21, M-Ras, Rap 1, Rap 2, Ral A und B. Sie sind als molekulare Schalter essentiell an Proliferation, Apoptose und Differenzierung eukaryotischer Zellen beteiligt (Vojtek & Der, 1998). Die Ran-Proteine (**Ras-related nuclear proteins**) sind die einzigen Vertreter ihrer Familie und spielen eine regulatorische Rolle beim Transport durch die Kernporenkomplexe (Moore, 1998), während die Proteine der Rho-Familie (**Ras homology**) an der Reorganisation des Zytoskeletts beteiligt sind. Sie regulieren aber auch Endo- und Exozytose und wirken bei der Kontrolle von Zellwachstum und Genexpression mit (Mackay & Hall, 1998; Garrett *et al.*, 2000). Arf-Proteine (**ADP ribosylation factors**) steuern die Bildung von Vesikeln und deren Transport zwischen endoplasmatischem Retikulum und Golgi-Apparat (Jackson & Casanova, 2000; Moss & Vaughan, 1998). Die Funktion der Rab-Proteine liegt im gerichteten Vesikelverkehr und der Exozytose (Guo *et al.*, 2000). Die Rad-Proteine (**Ras-associated with diabetes**) wurden zuerst in den Muskelzellen von Diabeteskranken entdeckt. Ihre Funktion ist aber bisher noch weitgehend 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 Ca^{2+} -vermittelten Signaltransduktion beteiligt (Lee *et al.*, 1996; Shao *et al.*, 1999; Wes *et al.*, 1996). Rag-Proteine (**Ras related GTP-binding proteins**) sind in den RCC1-Ran-Signalweg involviert, welcher den Transport durch die Kernporen-Komplexe vermittelt (Hirose *et al.*, 1998; Sekiguchi *et al.*, 2001).

1.3 Ras-Proteine

1.3.1 Strukturelle Organisation von Ras-Proteinen

Die Konformation des „ein-“ und „ausgeschalteten“ Zustands des molekularen Schalters Ras, sowie dessen Fähigkeit zur Interaktion mit verschiedenen Effektoren und Regulatoren, wird durch die Di- bzw. Triphosphat-Form des gebundenen Guaninnukleotids bestimmt und stabilisiert. Sowohl GTP als auch GDP binden an Ras(wt) mit Gleichgewichtsdissoziationskonstanten in der Größenordnung von 10 pM (John *et al.*, 1990; Schmidt *et al.*, 1996). Dabei hängt die Affinität in hohem

Maße von der Mg^{2+} -Konzentration ab (John *et al.*, 1988). Alle Proteine der Ras-Superfamilie aber auch die $G\alpha$ -Untereinheiten der heterotrimeren G-Proteine und die Elongationsfaktoren der Proteinbiosynthese weisen konservierte Bereiche in ihrer Aminosäuresequenz auf, die im Folgenden am Beispiel der Ras-Proteine näher beschrieben werden sollen. In den bisher gelösten Strukturen von Guaninnukleotid-bindenden Proteinen findet man ein für diese Proteine charakteristisches Faltungsmuster, die G-Domänen-Faltung (Wittinghofer & Pai, 1991). In Abb.1.1 ist die Struktur von Ras in der GppNHp-gebundenen Form dargestellt.

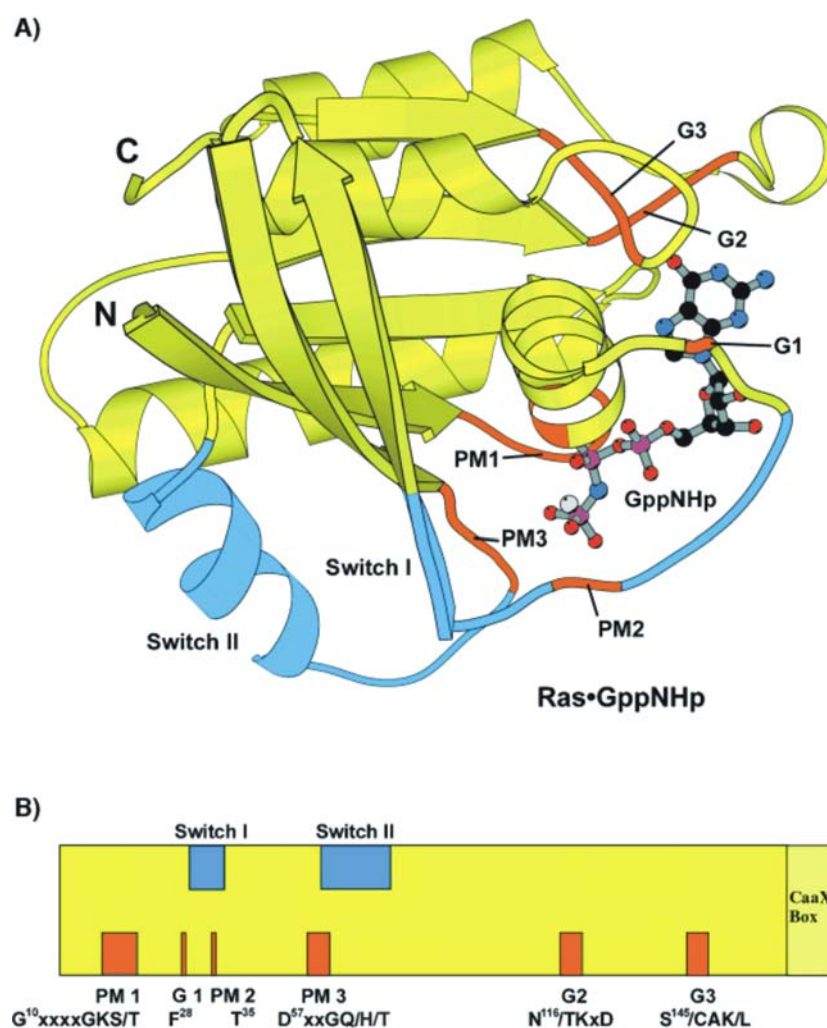


Abb. 1.1: Struktur und konservierte Regionen von Ras. (A) Bändermodell der Tertiärstruktur von Ras (AS 1-166) in der GppNHp gebundenen Form. Konservierte Bereiche der G-Domäne (orange) und die beiden Schalterregionen (switch I und switch II, blau) sind hervorgehoben. (B) Schematische Darstellung der Primärstruktur von Ras. Hier wurde dieselbe Farbkodierung wie in (A) verwendet. (Entnommen aus Wittinghofer & Waldmann, 2000)

Die G-Domäne besteht aus einem α/β Faltungsmotiv mit einem sechssträngigen, gemischten β -Faltblatt und fünf α -Helices. Die Strukturänderungen zwischen dem aktiven, GTP-gebundenen und dem inaktiven, GDP-gebundenen Zustand finden bei Ras in erster Linie in der L2- β 2- und der β 3/ α 2-Region statt (Abb. 1.1), die deswegen als Schalter I und Schalter II (*switch* I und *switch* II) benannt wurden (Milburn *et al.*, 1990).

An der Nukleotidbindung sind sechs konservierte Sequenzmotive beteiligt (Abb. 1.1; 1.2). Die völlig konservierte Lysin-Seitenkette innerhalb des PM1-Motivs (GxxxxGKS/T), das auch P-Schleife oder Walker-Motiv bezeichnet wird (Walker *et al.*, 1982; Saraste *et al.*, 1990) lagert sich eng an das β -Phosphat und bildet zusammen mit den Hauptketten-Amidgruppen der Aminosäuren 13-16 dieser Schleife eine positiv polarisierte Umgebung für die negativen Ladungen der Phosphatgruppen des Nukleotids. Lys16 und Gly15 können so über ihre Hauptketten-Amidgruppen Wasserstoffbrücken zum γ - und β -Phosphat bzw. α - und β -Phosphat ausbilden. Ebenfalls konserviert ist das benachbarte Ser17 (oder Threonin) in der P-Schleife, welches über die Hydroxylgruppe der Seitenkette zum einen an der Bindung des Mg^{2+} -Ions beteiligt ist und zum anderen über seine Amidgruppe eine Wasserstoffbrücke zum β -Phosphat ausbildet. Das PM2-Motiv besteht aus einem völlig konservierten Threonin (Thr35 bei Ras). Die Hydroxylgruppe der Seitenkette findet man in der Kristallstruktur der Triphosphat-gebundenen Form von Ras als Bindungspartner des Mg^{2+} -Ions, während die Hauptketten-Amidgruppe eine Wasserstoffbrücke zu einem Sauerstoff des γ -Phosphats ausbildet. Dieses Threonin wird als Schlüsselaminosäure der Konformationsänderung nach der Hydrolyse-reaktion diskutiert (Wittinghofer & Pai, 1991). Im PM3-Motiv (DxxGQ/H/T) ist die Seitenkette des Aspartats über ein Wassermolekül mit dem Mg^{2+} -Ion verbunden. Der benachbarte Glycin-Rest bildet eine Wasserstoffbrücke zum γ -Phosphat und wird neben Thr35 hauptsächlich für den Konformationswechsel zwischen der aktiven und inaktiven Form verantwortlich gemacht (Vetter & Wittinghofer 2001). Weiterhin ist ein Glutamin-Rest enthalten, der im Fall von Ras eine entscheidende Rolle bei der GTP-Hydrolyse spielt.

Neben den Phosphatgruppen wird aber auch das Nukleosid mehrfach durch Wechselwirkungen zum Protein stabilisiert. Dazu tragen hydrophobe Wechselwirkungen zwischen einem senkrecht zur Base stehenden Phenylalanin-Rest des G1-Motivs und einem parallel zur Base orientierten Lysin-Rest in G2 bei. Zusätzlich stabilisieren mehrere Aminosäuren des G2-Motivs durch weitere ionische Interaktionen und Wasserstoffbrücken zur Base und Ribose die Bindetasche für den

Nukleosidanteil des Guaninnukleotids. In Abb. 1.2 sind das GTP-Analogon GppNHp und eine Auswahl der Kontakte zum Ras-Protein im Ras-Nukleotidkomplex der Kristallstruktur (Pai *et al.*, 1990) dargestellt.

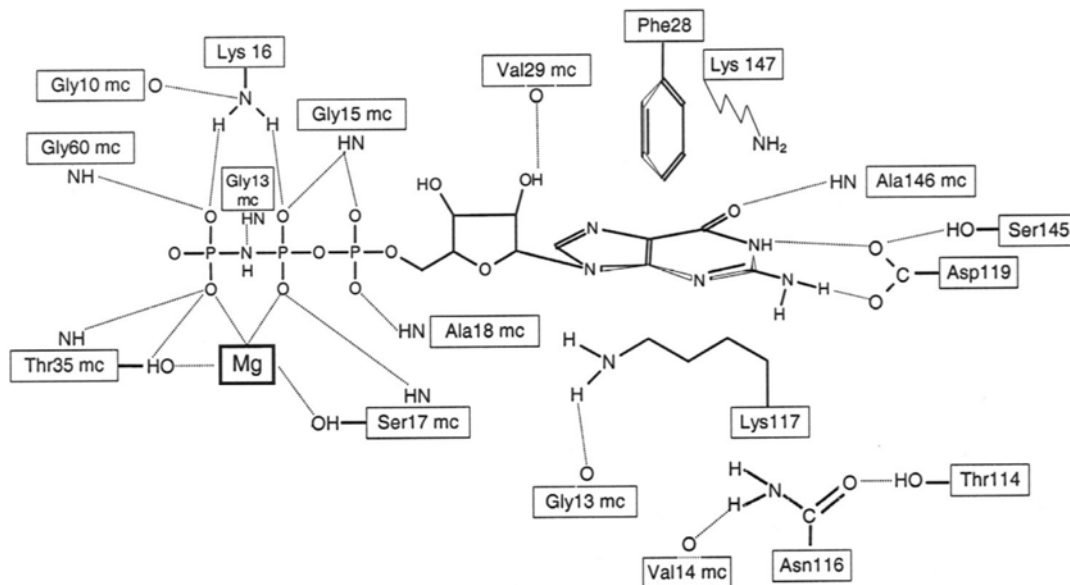


Abb. 1.2: Wechselwirkungen zwischen Ras und dem gebundenen GTP-Analogon GppNHp. Das Nukleotid und seine Kontakte zu ausgewählten konservierten Aminosäuren von Ras(wt) sind dargestellt, wie man sie in den Röntgenkristallstrukturen findet (mc= Peptidhauptkette).

1.3.2 Regulationszyklus von Ras

Anhand der kleinen GTPase Ras soll im Folgenden der Regulationszyklus des molekularen Schalters exemplarisch für alle Ras-verwandten Proteine dargestellt werden. Die biologische Aktivität dieser Proteine wird durch die Tri- bzw. Di-Phosphatform des gebundenen Guaninnukleotids und die damit verbundenen Konformationen bestimmt. So wechselt das Ras-Protein zwischen einem GDP-gebundenen, „ausgeschalteten“ und einem GTP-gebundenen, „angeschalteten“ Zustand. An die Konformation des GTP-gebundenen Zustands können Effektoren über ihre Ras-Bindedomänen (RBDs) mit hoher Affinität binden. Sie werden dadurch aktiviert und leiten das Signal durch Aktivierung anderer Guaninnukleotid-bindende Proteine oder Kinasen weiter. Sowohl die Dissoziation des gebundenen GDP, die notwendig für den Austausch zu GTP ist, als auch die intrinsische Hydrolyserate des gebundenen GTP der kleinen GTPase Ras sind sehr langsam. Beide Reaktionen werden jedoch durch Regulatoren, den Nukleotid-Austauschfaktoren (GEF: *guanine nucleotide exchange factor*) bzw. den GTPase aktivie-

renden Proteinen (GAP) um mehrere Größenordnungen beschleunigt. In Abb. 1.3 ist der Aktivierungs-/Inaktivierungszyklus von Ras schematisch dargestellt.

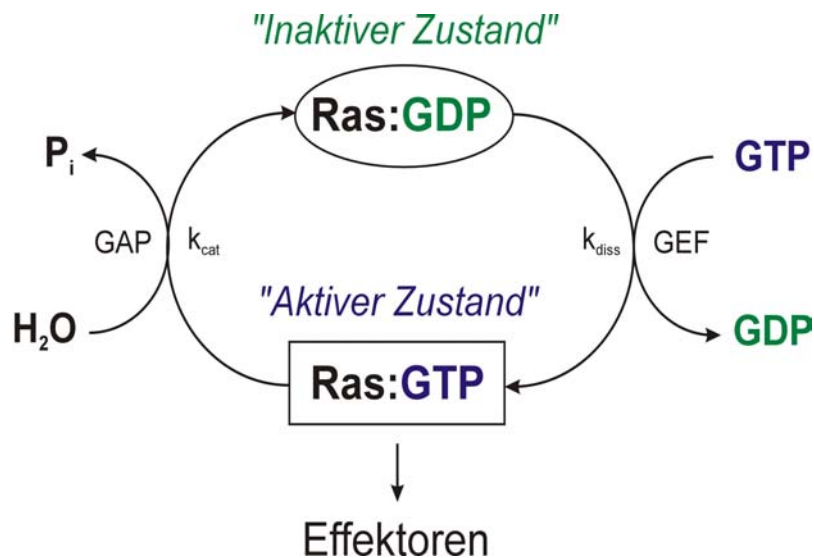


Abb. 1.3: Aktivierungs-/Inaktivierungszyklus kleiner GTPasen am Beispiel Ras. Die Aktivierung des Ras-Proteins erfolgt über den Nukleotidaustausch des gebundenen GDP zu GTP. Der Austausch des Nukleotids wird durch Guaninnukleotid-Austauschfaktoren (GEF: *guanine nucleotide exchange factor*) um mehrere Größenordnungen beschleunigt. Die Bindung des GTP überführt Ras in eine Konformation, an die Effektorproteine mit hoher Affinität binden können. Die Inaktivierung des Ras-Proteins erfolgt durch Hydrolyse des GTP zu GDP und die Freisetzung des Phosphats. Dieser Vorgang wird durch GTPase aktivierende Proteine (GAP: *GTPase activating protein*) um den Faktor 10^5 beschleunigt.

Neben der Eigenschaft von Ras in der aktiven Form mit verschiedenen Effektorproteinen zu interagieren und diese zu aktivieren, ist es für ein Schaltermolekül von essentieller Bedeutung, sich selbst wieder zu inaktivieren, oder zumindest durch das Einwirken von Regulatoren wieder in den ausgeschalteten Zustand überführt werden zu können. Die intrinsische Hydrolyserate von Ras beträgt $0,028 \text{ min}^{-1}$ bei 37°C (Bourne *et al.*, 1990). Sie kann aber durch GTPase aktivierende Proteine (GAP), wie z. B. NF1-333 um den Faktor 10^5 beschleunigt werden (Ahmadian *et al.*, 1997a).

Der Hydrolysemechanismus von Ras, sowie die Beschleunigung der Hydrolyserate durch GAPs ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Während der intrinsischen Hydrolyse kommt es zu einer Inversion der γ -Phosphat-Konfiguration. Dies kann mit einem *in-line* Angriff eines Wassermoleküls auf die γ -Phosphat-Gruppe erklärt

werden (Feuerstein *et al.*, 1987). Als Base wird das γ -Phosphat selbst diskutiert, welches das Wassermolekül durch Deprotonierung aktiviert (Schweins *et al.*, 1995). Gln61, dessen Mutation zu onkogenen Varianten des Ras-Proteins führen kann, stabilisiert dabei das intermediär gebildete Hydroxid-Ion. Welcher Schritt der Hydrolysereaktion nun durch die Bindung von GAP beschleunigt wird, war Gegenstand reger Diskussion. Grundsätzlich sind drei Schritte denkbar die Überführung von Ras in eine GTPase-aktivere Konformation, die aktive Beteiligung an der Hydrolysereaktion selbst und die Freisetzung des abgespaltenen Phosphats (Wittinghofer *et al.*, 1997). Biochemische Untersuchungen an Ras- und RasGAP-Mutanten in Kombination mit der Aufklärung der Kristallstruktur des Komplexes zwischen GAP-334 und Ras•GDP•AlF₃ (Ahmadian *et al.*, 1997b; Scheffzek *et al.*, 1997) brachten die Lösung. Ein Arginin ist essenziell für diese Reaktion. Im Komplex bindet GAP über diese Arginin-Seitenkette (Arg789) ein Sauerstoff des γ -Phosphats, sowie den Brückensauerstoff zwischen β - und γ -Phosphat. Es wird angenommen, dass dadurch negative Ladungen neutralisiert werden, die durch eine assoziative Phosphoryltransfer-Reaktion entstehen und dass dadurch der Übergangszustand stabilisiert wird. Des weiteren bindet Arg789 mit seiner Hauptketten-Carboxylgruppe an Gln61, das wiederum gemeinsam mit Thr35 das nukleophil angreifende Wassermolekül stabilisiert. GAP ist somit aktiv an der Spaltungsreaktion beteiligt. Bei den Proteinen der Rho-Familie und RhoGAP deuten biochemische und strukturelle Befunde auf einen gleichartigen Hydrolysemechanismus hin (Rittinger *et al.* 1997a,b; Ahmadian *et al.*, 1997; Nassar *et al.*, 1998). Dagegen muss für die GAP-beschleunigte Hydrolyse der GTPasen Rap und Ran ein andersartiger Mechanismus angenommen werden (Brinkmann *et al.*, 2002; Seewald *et al.*, 2002).

1.3.3 Ras und seine Funktion in der Signaltransduktion

Ras (*rat sarcoma*) wurde zuerst in Viren entdeckt, die in Nagetieren Tumoren vom Sarkom-Typ induzierten. An der transformierenden Eigenschaft dieser Viren waren die Ras-Gene maßgeblich beteiligt. Wie sich später herausstellte, zeigen die viralen Ras-Proteine Mutationen an den Aminosäurepositionen 12 und 59. Beim Menschen findet man drei Ras-Gene. Sie kodieren die Proteine H-(Harvey)-Ras und K-(Kirsten)-Ras, die nach Entdeckern der Viren benannt wurden und N-Ras, welches aus einer Neuroblastoma-Zelllinie isoliert wurde. Durch alternatives Spleißen entstehen zwei Varianten des K-Ras (K-Ras 4A und 4B), die sich jedoch ausschließlich an ihrem C-Terminus unterscheiden, welcher vom Exon 4 kodiert

wird. Eine besondere medizinische Bedeutung kommt den Ras-Proteinen zu, da sie in etwa 30 % aller diagnostizierten menschlichen Tumoren und in nahezu allen Tumoren der Bauchspeicheldrüse spezifische Punktmutationen an den Aminosäurepositionen 12, 13 und 61 aufweisen. Eine genauere Untersuchung dieser Ras-Mutanten ergab, dass diese Aminosäuren eine wichtige Rolle bei der intrinsischen und durch GAP beschleunigten Hydrolyse spielen. Mutationen in diesen Positionen können zu einer drastischen Herabsetzung der GTPase-Aktivität und damit zur dauerhaften Aktivierung des Schaltermoleküls führen (Barbacid, 1987; Lowy & Willumsen, 1993).

Zur Erfüllung ihrer Aufgaben müssen die Ras-Proteine an die Plasmamembran gebunden in der Zelle vorliegen. Hierzu werden sie posttranslational durch Koppung von Isoprengruppen an den C-Terminus und Carboxymethylierungen modifiziert. Während H- und N-Ras zusätzlich palmitoyliert werden, besitzt K-Ras 4B am C-Terminus eine polybasische Region, die mit den negativ geladenen Phospholipiden der Membran wechselwirken kann und als Anker dient.

Ras-Proteine regulieren eine Vielzahl von Signaltransduktionswegen, die zu Zellproliferation, Differenzierung oder Apoptose führen. Fehlfunktionen, die zu einer dauerhaften Aktivierung des Ras-Proteins führen, bewirken die Transformation von Zellen, d. h. die Zellen werden zu potentiellen Tumorzellen, die sowohl durch eine erhöhte Proliferationsrate als auch durch morphologische Veränderungen gekennzeichnet sind. Einer dieser Signaltransduktionswege, der zur Transformation von Zellen beiträgt und inzwischen gut untersucht ist, ist die Aktivierung der MAPK-Kaskade (*mitogen activated protein kinase*). Dieser Signalweg führt zur Aktivierung von Transkriptionsfaktoren, die die Proliferation der Zelle einleiten (Abb. 1.4). Die Bindung von Wachstumsfaktoren (EGF: *epidermal growth factor* oder PDGF: *platelet derived growth factor*) an die extrazelluläre Domäne der transmembran in der Plasmamembran lokalisierten Rezeptortyrosinkinasen (RTK) leitet die Signalkette ein. Diese Bindung führt zur Dimerisierung der RTKs. Im zytoplasmatischen Teil des Rezeptors erfolgt nun die Transphosphorylierung von Tyrosinseitenketten sowohl in der Kinasedomäne selbst, als auch in anderen Regionen des Dimers. Dadurch werden Bindestellen für Proteine geschaffen, die eine SH2-Domäne (*Src homology 2*) besitzen und der Rezeptor wird aktiviert. Grb2 (*growth factor receptor binding 2*) kommt die Funktion eines Adapterproteins zu. Es besitzt zum einen eine SH2-Domäne, mit der es spezifisch an den aktivierten Rezeptor binden kann und zum anderen liegt es im Komplex mit Sos (nach dem *Drosophila*-Gen *son-of-sevenless*) vor, welches ein Guaninnukleotid-Austauschfaktor (GEF) für Ras ist. Die Translokation des GEFs in die unmittelbare

Nähe des in der Plasmamembran verankerten Ras-Proteins begünstigt die Interaktion beider Proteine. Dabei wird Ras durch die Erhöhung der Dissoziationsrate des gebundenen GDP und die Assoziation des im Überschuss in der Umgebung vorliegenden GTP in den aktiven Zustand überführt. An die aktive Konformation von Ras kann nun die Raf-Kinase (***R*apid *f*ibrosarcoma**) mit hoher Affinität binden. Die Raf-Kinase wird dabei an der Membran lokalisiert und durch einen noch nicht vollständig geklärten Mechanismus aktiviert. Die aktivierte Raf-Kinase kann so die Kinase MEK (***M*APK/*E*RK-kinases**) phosphorylieren und aktivieren. In dieser linearen Kaskade wird ERK (***e*xtracellular signal regulated kinase**) von MEK wiederum durch Phosphorylierung aktiviert. Neben der Aktivierung weiterer Kinasen im Zytoplasma kann ERK die Kernmembran durchqueren und im Kern Transkriptionsfaktoren aktivieren, um so regulatorisch die Proliferation der Zelle einzuleiten.

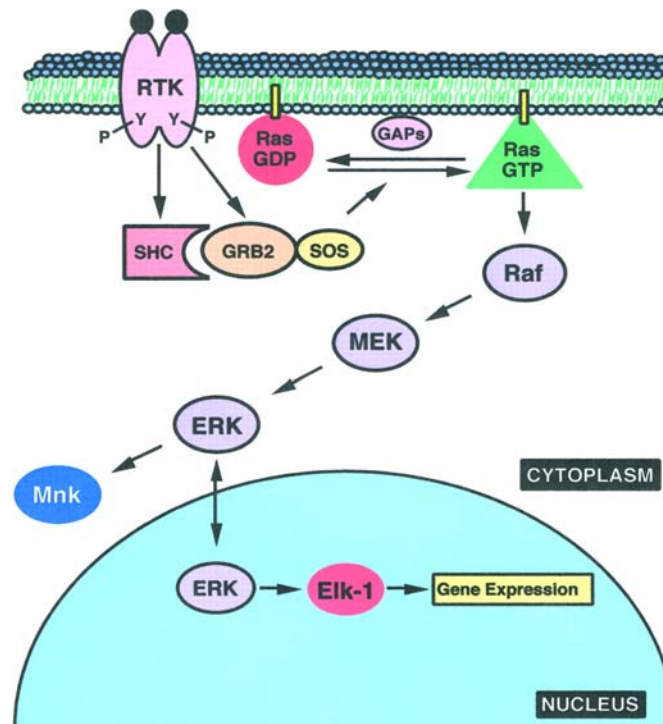


Abb. 1.4: Ras-abhängige Aktivierung der Map-Kinase-Kaskade. Die kleine GTPase Ras liegt membrangebunden in der Zelle vor. Sie ist als molekularer Schalter an einer linearen Signalkette beteiligt, die Wachstumssignale von der an der Zelloberfläche gebundenen aktivierten Rezeptor-Tyrosin-Kinase zum Zellkern leitet. Der Aktivierungs-/Inaktivierungszyklus wird durch den Nukleotidaustausch von GDP zu GTP bzw. die Hydrolyse des gebundenen GTP erreicht. Beide Reaktionen werden durch Regulatoren (GEFs und GAPs) um etwa fünf Größenordnungen beschleunigt. Die nachgeschaltete Signalweiterleitung erfolgt über eine Kaskade von Threonin/Serin-Kinasen (Entnommen aus Vojtek & Der, 1998; weitere Erklärungen siehe Text).

Durch die GAP-beschleunigte Hydrolyse des Ras-gebundenen GTP zu GDP wird Ras wieder in die inaktive Konformation überführt. Durch Phosphorylierung von Sos und die damit verbundene Dissoziation vom Adapterprotein Grb2 wird eine erneute, nicht Rezeptor-induzierte Aktivierung verhindert.

Es wurde inzwischen gezeigt, dass Ras nicht nur durch Rezeptor-Tyrosinkinasen sondern auch auf andere Weise aktiviert werden kann, wie durch zytoplasmatische Tyrosinkinasen oder G-Protein-gekoppelte Rezeptoren. Ras ist ebenfalls in der Lage im aktiven Zustand mit unterschiedlichen nachgeschalteten Effektorproteinen zu interagieren und somit verschiedenartige Zellantworten zu bewirken. Verschiedene Ras-ähnliche GTPasen wie Rap und R-Ras können darüber hinaus auf GTP-abhängige Weise zum Teil die gleichen Effektoren binden wie Ras selbst. Daraus ergibt sich ein sehr komplexes Netzwerk verschiedener, miteinander verknüpfter Schalt- und Regulationsmechanismen, die bisher nur ansatzweise aufgeklärt sind. Abb. 1.5 zeigt Auswahl derzeit untersuchter Signalwege.

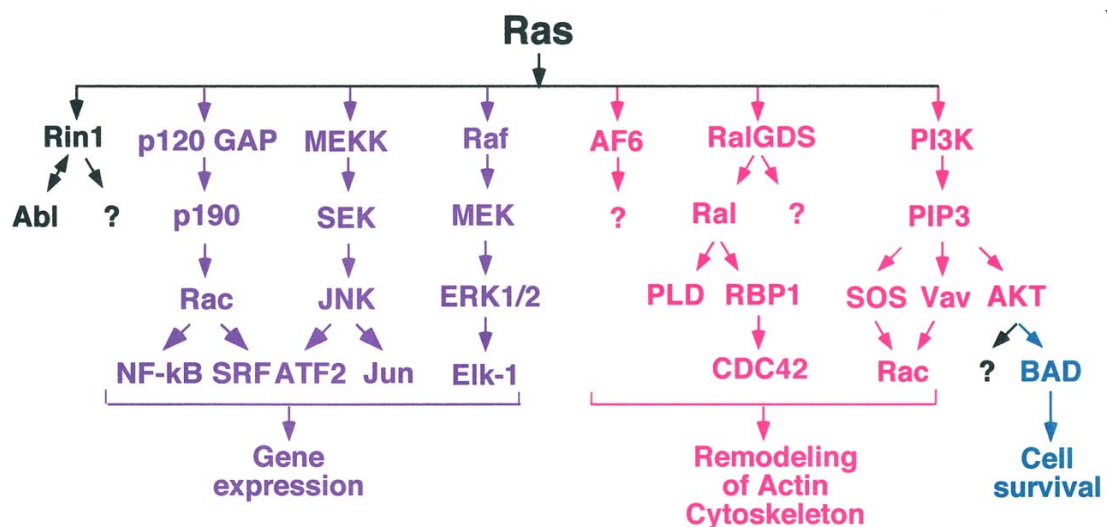


Abb. 1.5: Durch Ras induzierte Signalwege. Innerhalb seiner Aufgabe als Schaltermolekül aktiviert Ras eine Vielzahl verschiedener Effektormoleküle, über die Signalwege mit unterschiedlicher Endfunktion eingeleitet werden. (Entnommen aus Vojtek & Der, 1998)

1.4 Ras-Effektoren

Mit der GTP-gebundenen Form von Ras können verschiedene Effektorproteine interagieren. Dabei werden diese selbst, oder an sie gebundene Proteine aktiviert. Es gibt mehrere Kriterien, über die ein Protein als Effektor eines Guaninnukleotid-bindenden Proteins definiert werden kann. So sollte das Effektorprotein eine deutlich höhere Affinität zur GTP-gebundenen Konformation der GTPase aufweisen

als zur GDP-gebundenen Form. Durch diese Bindung sollte der Effektor direkt oder zumindest indirekt aktiviert werden, bzw. weitere an den Effektor gebundene Proteine beeinflusst werden. Durch Deletion funktioneller Gruppen des Effektors sollte es zu einem teilweisen Verlust der durch Ras vermittelten Funktion kommen (Toque *et al.*, 1997). Nachfolgend sollen einige Effektorproteine von Ras näher beschrieben werden, die im Laufe der Arbeit in Experimenten eingesetzt wurden.

Raf-Kinase:

Für die Raf1-Kinase (***rapid fibrosarcoma***), die wie Ras transformierendes Potential besitzt, wurde als erstes die direkte Interaktion mit Ras nachgewiesen. Weitere Untersuchungen mit konstitutiv-aktiven und dominant-negativen Ras-Varianten, sowie auch unterschiedlichen Raf-Varianten bestätigten auch den funktionellen Zusammenhang dieser Interaktion. Sie leitet die Signaltransduktionskaskade einer Reihe von Threonin/Serin-Kinasen (MEK: **MAPK/ Erk-Kinase** von ***mitogen-activated protein kinase*** und ***extracellular-signal-regulated kinase***) ein. Das Ziel dieser Kaskade ist die Phosphorylierung und somit die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren (TCF/ Ets: ***ternary complex factor/ E26 transformation specific***), die die Proliferation der Zelle einleiten (Campbell *et al.*, 1998). Es sind drei 70-80 kDa große Isoformen von Raf bekannt (Raf 1, A-Raf und B-Raf). Im regulatorischen N-Terminus befindet sich die 80 Aminosäuren umfassende Ras-Bindedomäne der Kinase. Sie stellt eine stabile, unabhängig-faltende Domäne dar, die notwendig und ausreichend für die GTP-abhängige Wechselwirkung mit Ras ist (Herrmann *et al.*, 1995). Die Röntgenstruktur von der Ras-Bindedomäne von Raf1 im Komplex mit dem Ras-verwandten Rap1A-Protein wurde von Nassar *et al.* (1995) gelöst.

RalGDS:

Ein weiterer Effektor von Ras ist RalGDS (***Ral guanine nucleotide dissociation stimulator***). RalGDS wurde zuerst als Nukleotid-Austauschfaktor der kleinen GTPase Ral beschrieben (Albright *et al.*, 1993). Seitdem sind neben RalGDS noch weitere verwandte RalGEFs beschrieben worden: Rgl (***RalGDS-like***), Rlf (***RalGDS-like factor***) und Rgr (***RalGDS-related***). Für RalGDS, Rgl und Rlf konnte ebenfalls eine Ras-bindende Domäne gezeigt werden. RalGDS und seine Isoformen sind 600-800 Aminosäuren groß. Eine 100 Aminosäuren umfassende Domäne am C-Terminus ist notwendig und ausreichend, um auf GTP-abhängige Weise an Ras zu binden, die RalGDS-RBD (Herrmann *et al.*, 1996). Die Struktur des Komplexes zwischen RalGDS-RBD und Ras wurde ebenfalls gelöst (Huang *et al.* (1997) und Vetter *et al.*, 1999).

Byr2:

Byr2 wird als Effektor für das Ras1-Protein der Spaltheefe *Schizosaccharomyces pombe* diskutiert. Eine Überexpression von Byr2 (**bypass of Ras**) in Ras1-defizienten Hefezellen ermöglicht den Zellen ein normales Wachstumsverhalten, so dass es Ras1 parallel oder nachgeschaltet sein sollte. Byr2 ist in einen MAP-Kinase-Signaltransduktionsweg involviert, der ausgelöst durch Pheromone die Konjugation haploider und die Sporulation diploider Hefezellen einleitet. Die Röntgenstruktur der Ras-Bindedomäne von Byr2 im Komplex mit Ras wurde von Scheffzek *et al.* (2001) gelöst.

Nore1:

Nore1 (**novel Ras effector**) wurde in Zwei-Hybrid-Untersuchungen als potenzieller Effektor von Ras entdeckt (Vavvas *et al.*, 1997). Es interagiert *in vitro* mit Ras(wt) bevorzugt in der GTP-gebundenen Form, bindet jedoch nicht an Ras-Mutanten, die Mutationen in den Schalterregionen tragen. Auch in *in vivo*-Untersuchungen konnte die durch Rezeptoraktivierung induzierte Interaktion zwischen Nore1 und Ras gezeigt werden, so dass Nore1 als wahrscheinlicher physiologischer Effektor von Ras anzusehen ist. In einer neueren Arbeit wird der Nore1/MST1-Komplex als Effektor von Ras postuliert, welcher Apoptose in Zellen einleitet, die onkogenes K-Ras(G12V) exprimieren (Khokhlatchev *et al.*, 2002).

Weitere Effektoren:

Ursprünglich als Fusionsprotein von All-1 (**acute lymphoblastic leukemia 1**) beschrieben, wurde für AF6 (**All-1 fusion protein 6**) ebenfalls die Bindung an verschiedene Mitglieder der Ras-Familie gezeigt. Bisherige Untersuchungen lassen vermuten, dass AF6 keine enzymatische Funktion besitzt. Es weist jedoch mehrere Bindungsmotive zur Protein-Protein-Erkennung auf. Deshalb wird angenommen, dass AF6 als ein Adapterprotein wirken könnte, welches gleichzeitig mehrere Proteine binden und sie so an einem Wirkort vereinigen kann.

Von der Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI(3)K) sind bisher 4 Isoformen bekannt. PI(3)K wird *in vivo* durch die Interaktion mit Ras aktiviert. Neben Ras werden auch andere kleine GTPasen wie Rap und TC21 von PI(3)K gebunden. Jedoch scheint hier keine Aktivierung stattzufinden. Die Struktur des Ras•PI(3)K-Komplexes wurde von Pacold *et al.* (2000) gelöst. Weitere Effektoren von Ras, die innerhalb dieser Arbeit nicht weiter betrachtet werden sollen, sind MEKK1 (**MEK-kinase 1**), Rin1, PKC ζ und p120^{GAP}.

Alle bisher gelösten Strukturen der Ras-Bindedomänen von Effektorproteinen weisen eine Ubiquitin-ähnliche Faltung auf, obwohl sie sich in ihrer Aminosäuresequenz deutlich unterscheiden. Die RBDs von Raf, RalGDS und Byr2 interagieren über ein Inter-Protein- β -Faltblatt mit dem Schalter I des Ras-Proteins. Im PI(3)K-Ras-Komplex finden dagegen Wechselwirkungen mit beiden Schalterbereichen von Ras statt. Die Interaktionen zwischen Ras und den Effektoren finden meist über die geladenen Seitenketten dieser Schalterregionen von Ras statt. Die Aminosäuren, die an diesen Wechselwirkungen im Komplex beteiligt sind variieren jedoch in den verschiedenen Ras-Effektor-Komplexen und bieten somit die Grundlage der Effektorspezifität.

1.5 Assoziation zwischen Ras und Effektoren

Die Assoziation verschiedener Effektor-RBDs an Ras(wt)•GppNHp folgt einer Sättigungskinetik (Sydor *et al.*, 1998; Linnemann *et al.*, 1999, 2002; Gronwald *et al.*, 2001). Diese lässt sich durch einen zwei Schritte umfassenden Bindungsmechanismus erklären. Zunächst findet eine schwache, einleitende Interaktion zwischen Ras und dem Effektorprotein statt. Dieser folgt ein langsamer Isomerisierungsschritt, der schließlich zum hochaffinen Komplex führt (Sydor *et al.*, 1998). Die Geschwindigkeitskonstante für diesen Isomerisierungsschritt liegt bei etwa 300 s^{-1} . Inwieweit sich dieses Verhalten auch auf die Assoziation von Effektoren an andere Ras-Triphosphatkomplexe übertragen lässt ist noch ungeklärt.

1.6 Ras(T35S): eine *partial loss-of-function* Mutante

Die Schalter I-Region der Ras-verwandten Proteine enthält ein völlig konserviertes Threonin (Thr35 bei Ras). In der Röntgenkristallstruktur der angeschalteten Konformation von Ras findet man die Hydroxylgruppe des Threonin zum Mg^{2+} -Ion koordiniert während seine Hauptketten-Amidgruppe eine Wasserstoffbrücke zu einem Sauerstoff des γ -Phosphats ausbildet (Abb. 1.6, li.). Dagegen ist in der konservierten P-Schleife, die ebenfalls in die Bindung der Phosphate des Nukleotids und des Metallions eingebunden ist, das Ser17 (gemäß Ras-Nomenklatur) bei mehreren Ras-verwandten Proteinen durch ein Threonin ersetzt. In der Kristallstruktur von Ras(wt)•GDP liegt die Seitenkette des Thr35 deutlich vom Metallion entfernt (Abb. 1.6, re.).

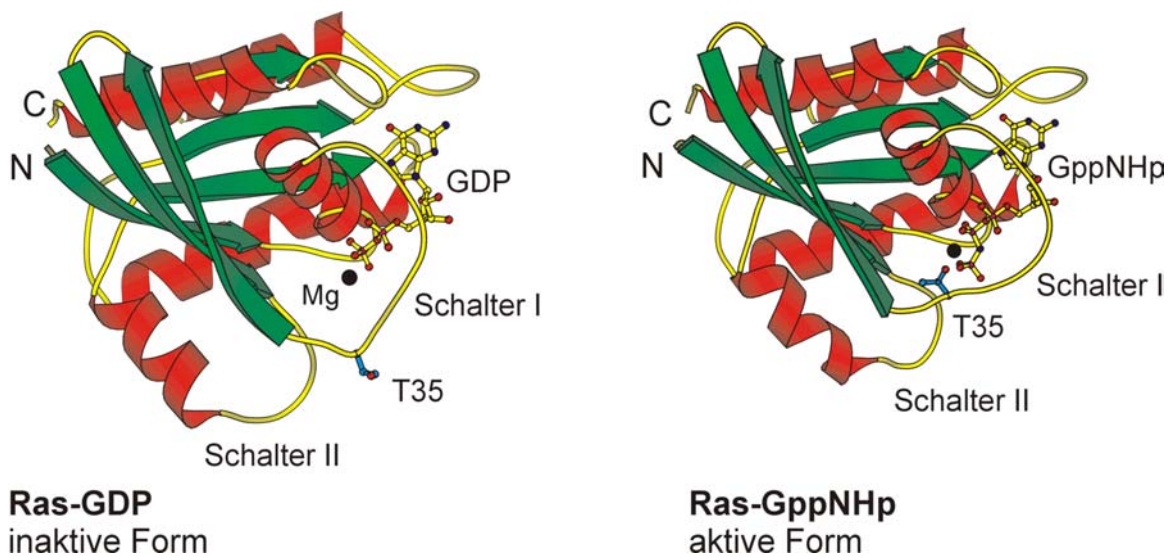


Abb. 1.6: Röntgen-Kristallstrukturen der inaktiven und aktiven Konformation von Ras(wt). Die Kristallstrukturen von Ras(wt)•GDP (li., pdb 4q21) und Ras(wt)•GppNHp (re., pdb 5p21) sind dargestellt. Die Schalterregionen, das Nukleotid sowie das Mg²⁺-Ion sind gekennzeichnet. Weiterhin ist die Seitenkette des innerhalb der Familie der Ras-verwandten Proteine völlig konservierten Thr35 blau hervorgehoben. In der aktiven Konformation ist Thr35 über seine Hydroxylgruppe an das Mg²⁺-Ion gebunden und seine Hauptketten-Amidgruppe bildet eine Wasserstoff-Brücke zu einem Sauerstoff des γ -Phosphats aus.

Wird dieses Threonin durch Serin ersetzt, erhält man eine sogenannte *partial loss-of-function* Mutante. Diese Proteine tragen Mutationen in der Effektorschleife, die die Wechselwirkung mit einer Untergruppe von Effektoren verhindern, während die Bindung von anderen Effektoren nicht beeinträchtigt wird. Damit weisen sie einen teilweisen Verlust ihrer Funktion auf, da bestimmte Signalwege selektiv unterbrochen werden. In *pull down-assays* und Zwei-Hybrid-Untersuchungen in Hefen konnte gezeigt werden, dass bei der Mutante Ras(T35S) die Interaktion mit dem Effektorprotein RalGDS nicht mehr stattfindet, während der Signalweg über die Raf-Kinase weiterhin induziert wird. Weitere *partial loss-of-function* Mutanten sind Ras(E37G), die den Signalweg über die Raf-kinase nicht mehr induziert oder Ras(Y40C), das zwar mit PI(3)K wechselwirken kann, aber nicht mit der Raf-Kinase und RalGDS. Mit diesen Mutanten hat man ein Werkzeug, mit dem man einzelne Signalwege weitgehend unabhängig voneinander analysieren kann. Deshalb wurde Ras(T35S) bereits in zahlreichen Untersuchungen eingesetzt, um die Beteiligung von RalGDS in verschiedenen Ras-Signalwegen zu überprüfen (Akasaka *et al.*, 1996; Rodriguez-Viciano *et al.*, 1996, 1997; Khosravi-Far *et al.*, 1996; White *et al.*, 1996; Joneson *et al.*, 1996a,b; Wolthuis *et al.*, 1996; Kinoshita *et al.*, 1997; Xue *et al.*, 2000; Tanaka *et al.*, 2002). Die entsprechende Mutation wurde

auch in andere Ras-verwandte Proteine eingeführt, um gleichartige Untersuchungen durchzuführen (Bae *et al.*, 1998).

Auf Grund dieser Beobachtungen stellt sich die Frage, warum die Mutation dieses Threonin-Rests, der weder im Komplex zwischen Raps und Raf-RBD, noch im Ras•RalGDS-RBD-Komplex direkt in die Bindung involviert ist, einen solchen Effekt zeigen kann. Aus struktureller Sicht sollte die Serin-Seitenkette, ebenso wie das Threonin, die beiden Bindungen zum Metallion bzw. zum γ -Phosphat ausbilden können. Die Vermutung lag nahe, dass es sich hierbei weniger um einen sterisch-strukturellen als vielmehr um einen dynamischen Effekt handelt.

1.7 Protein-Dynamik

Es ist bekannt, dass man sich die meisten Proteine nicht starr sondern vielmehr als „atmende“ Moleküle vorstellen muss. Es müssen innerhalb der Molekülstruktur Bewegungen möglich sein, um z. B. an andere Proteine spezifisch binden zu können oder als Enzym gewisse „Arbeiten“ durchführen zu können. Dies ist besonders wichtig für Proteinmoleküle wie Ras, die als molekulare Schalter in der Lage sind, abhängig vom gebundenen Nukleotid zwischen zwei unterschiedlichen Konformationen zu wechseln. Weiterhin müssen sie mit einer Vielzahl verschiedener Effektoren wie der Raf-Kinase, RalGDS oder PI(3)K und Regulatoren, wie z. B. GTPase-aktivierenden Proteinen oder Guaninnukleotid-Austauschfaktoren, spezifisch wechselwirken, um ihre Aufgaben kontrolliert und korrekt ausüben zu können. Zur Darstellung und Untersuchung von Moleküldynamik an Proteinen werden verschiedene Methoden verwendet, die diese molekularen Bewegungsvorgänge direkt, oder zumindest indirekt aufzeigen können. Hierzu eignen sich z. B. Methoden der magnetischen Resonanzspektroskopie, wie die Elektronen- bzw. die Kernspinresonanz-Spektroskopie (EPR bzw. NMR) (Hubbell *et al.*, 2000; Ishima & Torchia, 2000), weiterhin Infrarot- und Ramanspektroskopie, sowie optische Rotationsdispersion (ORD) und Circular dichroismus (CD). Kryoelektronenmikroskopie, Rasterkraftmikroskopie und Fluoreszenzresonanzenergietransfer (FRET) (Selvin, 2000) bzw. Fluoreszenzpolarisationsanisotropie sind weitere moderne Methoden. Die Wahl der Methode hängt davon ab in welchem Zeitfenster die zu untersuchende Dynamik stattfindet (Tab. 1.1). Die NMR-Spektroskopie bietet die Möglichkeit mit Zeitkonstanten von 10^{-4} - 10^{10} s⁻¹ einen sehr großen Bereich abzudecken. Die Anwendung mancher Methoden wird dadurch begrenzt, dass bestimmte Voraussetzungen bzw. Modifikationen an dem zu unter-

suchenden Molekül nötig sind, wie z. B. das Vorhandensein eines paramagnetischen Zentrums oder der Einsatz von Spinsonden in EPR-Untersuchungen bzw. fluoreszente Gruppen für fluoreszenzspektroskopische Methoden. Dabei ist es häufig schwierig abzuschätzen inwieweit diese Modifikationen zu Änderungen in den strukturellen und dynamischen Eigenschaften des Moleküls führen.

Tab. 1.1: Dynamische Eigenschaften von Proteinstrukturen (verändert nach Evans, 1995).

Bewegungsvorgang	Zeitskala (s^{-1})	Untersuchungsmethoden
Öffnung der Sekundärstruktur	$10^{-4} - 10^4$	1H - 2H Austausch, Hochdruck-NMR
Aromatische und aliphatische Seitenkettenrotation	$1 - 10^{10}$	NMR-Relaxationszeitmessung, Hochdruck-NMR und Fluoreszenztechniken
Bewegung einzelner Segmente der Proteinhauptkette	$10^6 - 10^{10}$	NMR-Relaxationszeitmessung, Hochdruck-NMR und Fluoreszenztechniken
Brownsche Molekularbewegung des Proteinmoleküls in Lösung	$10^6 - 10^{10}$	NMR-Relaxationszeitmessung, und Fluoreszenztechniken

1.8 ^{31}P -NMR-Spektroskopie an Guaninnukleotid-bindenden Proteinen

Das stabile Isotop ^{31}P mit einem Kernspin $I=1/2$ kommt zu 100 % in der Natur vor. Die ^{31}P -NMR-Spektroskopie eignet sich gut zur Untersuchung Guaninnukleotid-bindender Proteine, da die Phosphate des gebundenen Guaninnukleotids eine natürliche Sonde direkt im aktiven Zentrum dieser Proteine darstellen. Die relativ geringe Empfindlichkeit ($< 7\%$ im Vergleich zu 1H) und die vergleichsweise langen Relaxationszeiten erfordern Probenvolumen von einigen 100 μl mit millimolarer Konzentration. Man erhält jedoch meist einfach zuzuordnende Spektren, die durch die große Dispersion in der chemischen Verschiebung wenig Überlagerungen der verschiedenen Phosphor-Resonanzlinien aufweisen. Die einzelnen Resonanzlinien werden durch ihre chemische Verschiebung, die Linienbreite, die Linienform und ihr Integral charakterisiert. Dabei sind die Integrale unter geeigneten Messbedingungen proportional zur Konzentration der Kerne die das jeweilige Signal liefern. Mittels ^{31}P -NMR-Spektroskopie können in einfachen Spektren Änderungen

der chemischen Umgebung der Phosphate dargestellt werden, wie sie z. B. durch die Bindung des Nukleotids an das Protein oder durch Konformationsänderungen im Protein-Nukleotid-Komplex hervorgerufen werden. Bereits vor über 20 Jahren wurden ^{31}P -NMR-Messungen am Elongationsfaktor EF-Tu der thermophilen Archaea *Thermus thermophilus* bei 50 °C im GDP sowie im GTP-gebundenen Zustand durchgeführt (Nakano *et al.*, 1980). Etwas später wurden auch ^{31}P -NMR-Messungen an der aktiven und inaktiven Form, sowie auch an Mutanten des Ras-Proteins durchgeführt (Rösch *et al.*, 1986; Campbell-Burk, 1989; John *et al.*, 1989, 1993; Franken *et al.*, 1993). Um ein besseres Signal-zu-Rausch-Verhältnis zu erhalten, wurden die Messungen meist bei Raumtemperatur oder höheren Temperaturen durchgeführt. Grundsätzlich gibt es drei verschiedene Arten dynamische Prozesse von Molekülen über NMR-Spektroskopie nachzuweisen: *real time*-Methoden, die Darstellung eines chemischen Austauschs und die Bestimmung der Korrelationszeitabhängigkeit von Relaxationsprozessen. Geyer *et al.* (1996) konnten so in ^{31}P -NMR-Untersuchungen für Ras(wt)•GppNHp zeigen, dass es in zwei Konformationen (Zustand 1 und 2) vorliegen muss, die sich im gegenseitigen chemischen Austausch befinden. Die Austauschraten sind -bezogen auf die NMR-Zeitskala- bei Temperaturen um 278 K mit $k_1 = 60$ Hz langsam und werden somit durch zwei getrennte Resonanzlinien repräsentiert. Bei höheren Temperaturen mit $k_1 = 3200$ Hz bei 303 K wird der Austausch schnell, so dass nur noch eine Resonanzlinie detektiert werden kann, deren chemische Verschiebung im gewichteten Mittel der Ausgangslinien liegt. Es scheint hier, dass das Verhältnis der Populationen zueinander von der Temperatur weitgehend unabhängig ist. Es konnte gezeigt werden, dass die Interaktion der Ras-Bindedomäne der Raf-Kinase den Zustand 2 stabilisiert. Dieses Verhalten wurde auch für die Komplexe zwischen Ras und den RBDs von RafGDS (Geyer *et al.*, 1997) und AF6 (Linnemann *et al.*, 1999) gezeigt.

Geyer *et al.* (1996) machten auf der Grundlage verschiedener Kristallstrukturen für die Differenz der chemischen Verschiebung der Resonanzlinien, die zwischen den beiden Zuständen liegt in erster Linie die Seitenkette des Tyr32 verantwortlich. Dieser aromatische Ring befindet sich im Ras-Raf-RBD-Komplex (Nassar *et al.*, 1995) in unmittelbarer Nähe zum β -Phosphat, dessen Resonanzlinie in der NMR-Untersuchung mit 0,72 ppm am deutlichsten aufgespalten ist. Außerdem führte der Austausch des Tyr32 durch ein Arginin gemäß ^{31}P -NMR-spektroskopischen Untersuchungen zu einer Verschiebung des Gleichgewichts zum Zustand 1. Der Austausch anderer Aminosäuren in der Schalter I-Region führte jedoch zu ähnlichen Ergebnissen.

Auch an der Ras-verwandten GTPase Ran, die an der Regulation des Transports durch die Kernporenkomplexe beteiligt ist, wurden ^{31}P -NMR-Untersuchungen durchgeführt. Dabei konnte gezeigt werden, dass auch diese GTPase in der aktiven Form in unterschiedlichen Konformationen vorliegt. (Geyer *et al.*, 1999)

1.9 EPR-Spektroskopie an Guaninnukleotid-bindenden Proteinen

Für EPR-spektroskopische Untersuchungen sind ungepaarte Elektronen in einem Molekül als detektierbare Sonde erforderlich. In Guaninnukleotid-bindenden Proteinen liegt unter physiologischen Bedingungen kein solches paramagnetisches Zentrum vor. Meist ist jedoch der Austausch des im aktiven Zentrum gebundenen Mg^{2+} -Ion zu einem Mn^{2+} -Ion möglich, ohne die strukturellen und physiologischen Eigenschaften des Proteins stark zu verändern (Schweins *et al.*, 1997). Auf diese Weise sind bereits zahlreiche EPR-Experimente an Guaninnukleotid-bindenden Proteinen, wie dem Elongationsfaktor EF-Tu (z. B. Kalbitzer *et al.*, 1984) aber auch an Ras, durchgeführt worden (z. B. Feuerstein *et al.*, 1987b, Smithers *et al.*, 1990, Halkides *et al.*, 1994; Farrar *et al.*, 1997). Wird das H_2^{16}O in der Probe durch H_2^{17}O ersetzt, kommt es durch die Superhyperfein-Kopplung zwischen Mn^{2+} ($S=5/2$, $I=5/2$) und den ^{17}O -Kernen ($I=5/2$) der gebundenen Wassermoleküle zu einer Verbreiterung der Mn^{2+} -Hyperfeinlinien. Durch Linienformanalyse kann dann die Anzahl der zum Mn^{2+} -Ion koordinierten Wassermoleküle bestimmt werden und damit auch die Anzahl der Bindungen zum Protein und Nukleotid (Kalbitzer *et al.*, 1984). Bisherige Untersuchungen, die an verschiedenen Ras-Varianten durchgeführt wurden ergaben für die GDP-gebundene, inaktive Form vier gebundene Wassermoleküle sowohl in Lösung (Smithers *et al.*, 1990) als auch im gefrorenen Zustand (Bellew *et al.*, 1996). Dadurch, dass sich die Untersuchungen sowohl in den Messbedingungen als auch in der Wahl der Ras-Varianten unterscheiden, sind diese Ergebnisse jedoch meist nicht direkt miteinander vergleichbar. Durch die Markierung spezieller Aminosäurereste mit ^{17}O , ^{15}N oder ^{13}C konnten z. B. direkte Liganden des Metallions identifiziert werden, indem über die erhaltenen Kopplungen die Abstände abgeschätzt werden konnten. Auf diese Weise konnte gezeigt werden, dass die Bindung zwischen der Hydroxyl-Gruppe des Thr35 und dem Metallion im Ras(wt)•GppNHp-Komplex in gefrorener Lösung im Gegensatz zu den Befunden aus der Kristallstruktur eher schwach oder indirekt sein sollte, da der Abstand zum Metallion deutlich höher als im Kristall scheint (Bellew *et al.*,

1996, Halkides *et al.*, 1994, 1996). In analoger Weise wurden auch die Aminosäuren Ser17 und Asp57 untersucht, die ebenfalls aus struktureller Sicht als Bindungspartner zum Metallion in Frage kommen. Hierbei wurde die Hydroxylgruppe des Ser17 sowohl im inaktiven, GDP-gebundenen als auch im aktiven Komplex mit dem GTP-Analogon GppNHp als Ligand des Metallions identifiziert. Asp57, das in allen Ras-verwandten Proteinen konserviert ist (Bourne *et al.*, 1991), scheint dagegen auch in Lösung nur indirekt über ein Wassermolekül gebunden zu sein (Halkides *et al.*, 1994). Weiterhin können auch Spin-Sonden an spezifische Stellen (Cystein) im Protein kovalent gebunden werden. Sie ermöglichen sowohl die Untersuchung dynamischer Vorgänge, als auch die Bestimmung von Abständen zwischen zwei gebundenen Sonden (Hubbell *et al.*, 2000; Kensh *et al.*, 2000; Wegener *et al.*, 2000).

1.10 Zielsetzung

Um die Funktion und Wirkweise eines Proteins zu verstehen ist es nötig, Kenntnisse über seine Dynamik und Bindungseigenschaften zu erlangen. Die Ras-verwandten Proteine, die als molekulare Schalter in zahlreichen Signalketten, Bewegungs- und Transportvorgängen involviert sind, müssen in der Lage sein zumindest zwei eindeutige Konformationen einzunehmen, zwischen denen sie schnell und ohne großen Energieaufwand auf äußere Signale hin wechseln können. Da diese Schaltermoleküle, wie z. B. Ras mit unterschiedlichen Effektorproteinen interagieren können, müssen darüber hinaus weitere dynamische Fähigkeiten des Proteins vorhanden sein.

Ziel dieser Arbeit ist es, zu untersuchen, ob und wie sich die dynamischen Eigenschaften von Ras auf die für die Signaltransduktion und somit auch für den Organismus essenziellen Funktionen, wie die GTP-Hydrolyse und die Bindung von Effektorproteinen auswirken. Die Untersuchung von Mutationen in der Schalter I-Region kann hier Einblicke geben. Weiterhin ist auch der Einfluss unterschiedlicher Nukleotidanaloga auf die dynamischen Eigenschaften von Ras von Interesse, wie sie zur Darstellung des aktiven Zustands in Bindungsstudien bzw. in der Kristallisation häufig notwendig und weitverbreitet sind. Für Untersuchungen der Proteine unter weitgehend physiologischen Bedingungen in Lösung eignen sich die Methoden der magnetischen Resonanzspektroskopie. Durch ^{31}P -NMR-Spektroskopie (*nuclear magnetic resonance*) können Konformationsunterschiede detektiert werden, die die chemische Umgebung der Phosphatgruppen des Nukleotids verändern, welches direkt im aktiven Zentrum dieses Proteins gebunden ist. Durch den Austausch des ebenfalls in diesem Bereich gebundenen Mg^{2+} -Ion durch ein Mn^{2+} -Ion erhält man ein paramagnetisches Zentrum, das EPR-spektroskopische (*electron paramagnetic resonance*) Untersuchungen der Ligandensphäre des Metallions ermöglicht. Um zu prüfen, inwieweit die so erhaltenen Erkenntnisse mit den katalytischen und den Bindungseigenschaften der Ras-Effektor-Komplexe korrelieren, werden auf Fluoreszenz bzw. Kalorimetrie basierende Methoden, wie *stopped flow* und Isotherme Titrationskalorimetrie (ITC) angewandt.

2 Materialien und Geräte

2.1 Chemikalien

Die Grundausrüstung an Chemikalien wurde von den Firmen Fluka (Neu-Ulm), Merck (Darmstadt), Roche (Mannheim), Serva (Heidelberg), Roth (Karlsruhe), Pharma-Waldhof (Düsseldorf) und Sigma (Deisenhofen) im Reinheitsgrad *pro analysi* bezogen.

Die fluoreszierenden mant-Nukleotidderivate wurden in der Abteilung I des Max-Planck-Instituts für molekulare Physiologie nach der Methode von Hiratsuka (1983) hergestellt.

2.2 Häufig verwendete Puffer-Lösungen

Messpuffer A:	40 mM HEPES/NaOH pH 7,4; 2 mM DTE
Messpuffer B:	40 mM HEPES/NaOH pH 7,4; 10 mM MgCl ₂ ; 2 mM DTE
Messpuffer C:	40 mM HEPES/NaOH pH 7,4; 150 mM NaCl; 10 mM MgCl ₂ ; 2 mM DTE
PBS 10 x conc.:	14,42 g/l Na ₂ HPO ₄ ; 2,4 g/l KH ₂ PO ₄ ; 80 g/l NaCl; 2 g/l KCl; pH 7,4

2.3 Plasmide

Zur Expression der verschiedenen verkürzten (AS 1-166) und nicht verkürzten (AS 1-189) humanen H-Ras-Varianten wurden ptac-Vektoren verwendet (D. Kühnmann, Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie, Dortmund). Die Expression der Ras-Bindedomänen cRaf-RBD (AS 51-131), RaIGDS-RBD (AS 11-97), Byr2-RBD (AS 65-180) und Nore1-RBD (AS 198-358) sowie die katalytische Domäne NF1-333 (AS 1198-1531) wurde mittels pGEX-4T-Vektoren (S. Wohlgemuth, P. Stege, Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie, Dortmund) durchgeführt. Zur Expression von Ran wurden pet3D-Vektoren verwendet (C. Körner, Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie, Dortmund).

2.4 Bakterienstämme

Escherichia coli CK600K supE, hsdM⁺, hsdR⁻, kan^R; Hoffmann-Berling, Heidelberg

Escherichia coli BL21(DE3) F⁻, opmT, hsdS (r_B⁻, m_B⁻), gal (38, 39); Stratagene, Heidelberg

2.5 Nährmedien und Antibiotika

Luria-Bertani (LB)-Medium:

10 g/l Bacto-Trypton; 5 g/l Hefeextrakt; 10 g/l NaCl; 0,5 mM NaOH

Standard I -Fertigmedium: (Merck)

15 g/l Pepton; 3 g/l Hefeextrakt; 6 g/l NaCl; 1 g/l D(+)-Glucose; Spuren von Thymin und Thiamin

Minimalmedium:

7,5 g Na₂HPO₄•2H₂O; 3 g KH₂PO₄; 0,5 g NaCl; 0,25 g MgSO₄•7H₂O; 0,014 g CaCl₂•2H₂O ad 1 l (autoklavieren)

anschließend zugeben: 1 g NH₄Cl + 10 g Glucose +10 ml Spurenelemente

Spurenelemente:

9 ml 10fach SL4; 10 ml SL6; 81 ml H₂O → steril filtrieren

10fach SL4:

500 mg EDTA; 200 mg Fe(II)SO₄•7H₂O; ad 90 ml H₂O (frisch ansetzen)

SL6:

100 mg ZnSO₄•7H₂O; 30 mg MnCl₂; 300 mg H₃BO₃; 200 mg CoCl₂•6 H₂O

10 mg CuCl₂•2 H₂O; 20 mg NiCl₂•6H₂O; 30 mg Na₂MoO₄•2H₂O; ad 1 l H₂O

Alle eingesetzten Antibiotika wurden von GERBU Biotechnik GmbH (Gaiberg) bezogen.

2.6 Enzyme

Alkalische Phosphatase Boehringer/Roche, Mannheim

DNase I Boehringer/Roche, Mannheim

Lysozym Sigma, Deisenhofen

Thrombin Serva, Heidelberg

2.7 Standard

Proteinstandard

SDS7 (66/45/36/29/24/20,1/14,2 kDa) Sigma, Deisenhofen

2.8 Verbrauchsmaterial und Zubehör

Bradfordreagenz	Biorad, München; Pierce, Illinois, USA
Klebeband (klar)	Hampton research, CA, USA
Linbro-Platten	Hampton research, CA, USA
3 well spot plates	Hampton research, CA, USA
Microcon Ultrafiltrationseinheiten	Millipore, Hamburg
NMR-Probenröhrchen 8 mm	Shigemi Co. LTD, Tokyo, Japan
Quarzglasküvetten	Perkin Elmer, Massachusetts, USA
Vivaspin Ultrafiltrationseinheiten	Vivascience, USA; Millipore, Hamburg

2.9 Säulenmaterialien

Nucleosil 100 C-18 Vorfilter	Bischoff Chromatography, Leonberg
ODS Hypersil C18	Beckmann Coulter, Fullerton, USA
DEAE-Sepharose	Amersham Pharmacia, Freiburg
Glutathion-Sepharose 4B	Amersham Pharmacia, Freiburg
Q-Sepharose	Amersham Pharmacia, Freiburg
Sephadex G25 in PD10	Amersham Pharmacia, Freiburg
Sephadex G75	Amersham Pharmacia, Freiburg
Superdex 75 prep grade	Amersham Pharmacia, Freiburg
Fractogel	Amersham Pharmacia, Freiburg
Chelex Resin 100	Biorad, München

2.10 Geräte

EPR-Spektrometer E580	Bruker, Karlsruhe
Fluoreszenzspektrometer	Perkin Elmer, Massachusetts, USA
FluoroMax II Spektrofluorimeter	SPEX Instruments S. A., Inc., NJ, USA
FPLC-Anlage, GradiFrac-System	Amersham Pharmacia, Freiburg
Gelelektrophoresekammern	Amersham Pharmacia, Freiburg
HPLC-Anlage, System Gold 166	Beckmann, Unterschleißheim

MCS ITC Titrationskalorimeter	MicroCal, Massachusetts, USA
Milliporeanlage	Millipore, Hamburg
NMR-Spektrometer DMX-500	Bruker, Karlsruhe
Stopped-Flow-Apparatur SX18MV	Applied Photophysics, Leatherhead, UK
Ultraschallgerät Sonifier 250/450	Branson, Schwäbisch Gmünd
UV/Vis-Spektrometer Uvikon 933	Kontron, Neufahrn
VP-DSC Mikrokalorimeter	MicroCal, Massachusetts, USA

2.11 Auswertungs- und Darstellungssoftware

CorelDraw 9	Corel Corporation, Ottawa, Kanada
GraFit 3.0	Erithracus Software, Staines, UK
Origin 6.0	Microcal Software Inc., Massachusetts, USA
X-Win NMR	Bruker, Karlsruhe
X-Win Plot	Bruker, Karlsruhe
Matlab 5.3	MathWorks Inc., Massachusetts, USA
Weblabviewer lite	Accelrys Inc., San Diego, USA

3 Methoden

3.1 Expression und Reinigung von Proteinen

3.1.1 Expression und Reinigung von Ras

Die Überexpression von humanem H-Ras wurde basierend auf der Methode nach Tucker *et al.*, (1986) mit Hilfe von ptac-Vektoren im *E. coli* Stamm CK600K durchgeführt. 10 Liter Standard I-Medium mit 100 mg/l Ampicillin und 25 mg/l Kanamycin wurden mit 100 ml einer Übernacht-Kultur beimpft. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C und einer Schüttlergeschwindigkeit von 180 rpm. Bei einer OD₆₀₀ von 0,8 wurde mit 1 mM IPTG die Proteinexpression induziert. Nach 18-stündiger Inkubation wurde die Kultur zentrifugiert und der Bakterienniederschlag im 3fachen Volumen Aufschlusspuffer (32 mM Tris/HCl pH 7,6/ 5 mM EDTA/ 2 mM DTE/ 1 mM PMSF) resuspendiert, eingefroren und bei -20 °C gelagert.

Der Zellaufschluss wurde durch Zugabe von Lysozym (1 mg/ml Zellsuspension) zur aufgetauten Bakteriensuspension eingeleitet. Nach 30-minütiger Inkubation bei 4 °C wurden 4 ml einer 6%igen Natrium-Deoxycholat-Lösung auf 100 ml Zellsuspension zugegeben. Nach weiteren 30 min wurden 10 mM MgCl₂ und 20 mg DNase1 auf 100 ml Zellsuspension zugegeben und der Ansatz nochmals 30 min bei 5 °C inkubiert.

Durch 60-minütige Zentrifugation bei 18000 g wurden die Zellfragmente sedimentiert und der klare Überstand auf eine mit C/2-Puffer (32 mM Tris/HCl pH 7,6/ 10 mM MgCl₂/ 1 mM DTE) äquilibrierte DEAE-Säule (500 ml Säulenvolumen) aufgetragen. Nach dem Waschen mit 1,5 Säulenvolumen C/2-Puffer wurde ein linearer Salzgradient (0-300 mM NaCl in C/2-Puffer) über ein Volumen von 4 Litern gefahren. Die Fraktionen wurden durch SDS-PAGE (3.2.3.1) analysiert und die Ras-Protein enthaltenden Fraktionen vereinigt. Durch portionsweise Zugabe von (NH₄)₂SO₄ bis zu einer Endkonzentration von 2,4 M bei 4 °C, wurde das Protein gefällt und durch Zentrifugation bei 18000 g für 30 min sedimentiert. Der Niederschlag wurde in wenigen ml Puffer D (64 mM Tris/HCl pH 7,6/ 400 mM NaCl /10 mM MgCl₂/ 2 mM DTE/ 0,1 mM GDP) resuspendiert und über eine mit demselben Puffer äquilibrierte Sephadex G75-Säule durch Gelfiltration weiter gereinigt. Durch SDS-PAGE wurden die Fraktionen mit reinem H-Ras identifiziert. Diese Fraktionen wurden vereinigt und durch Ultrafiltration bis zu einer Proteinkon-

zentration von 20-50 mg/ml eingengt. Die Konzentration der Proteinlösung wurde wie in 3.2.1.1-2 beschrieben bestimmt, die Lösung aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei -80 °C gelagert.

3.1.2 Expression und Reinigung von Ran

Die Expression von Ran-Proteinen wurde mit Hilfe von pet3D-Vektoren im *E. coli* Stamm BL21(DE3) durchgeführt. Da sich die Bakterien aus der Glycerin-Kultur in flüssigem Medium nur sehr langsam vermehren, wurden zunächst acht LB-Platten mit 150 mg/l Ampicillin mit der Glycerin-Kultur beimpft. Nach Inkubation über Nacht bei 37 °C wurden die Kolonien in etwas Medium suspendiert und in 10 l Standard I-Medium mit 150 mg/l Ampicillin überführt. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6, bei deren Erreichen mit 0,3 mM IPTG die Proteinexpression induziert wurde. Die weitere Inkubation erfolgte über Nacht bei 30 °C. Anschließend wurden die Kulturen zentrifugiert. Der Bakterienniederschlag wurde mit 20 mM KH₂PO₄/K₂HPO₄ pH 6,4 gewaschen, nochmals zentrifugiert und der Niederschlag bei -20 °C tiefgefroren.

Etwa 20 g Bakterienniederschlag wurden im dreifachen Volumen Puffer A (20 mM KH₂PO₄/K₂HPO₄ pH 6,4/ 5 mM MgCl₂/ 5 mM DTE/ 10 µM GDP) aufgenommen und 1 mM PMSF zugegeben. Der Aufschluss erfolgte mittels Ultraschall auf Eis. Nach einstündiger Zentrifugation bei 50000 g wurde der klare Überstand auf eine mit Puffer A äquilibrierte Fractogel-Säule (100 ml Säulenvolumen) aufgetragen. Nach dem Waschen mit vier Säulenvolumen wurde ein linearer KCl-Gradient von 0-1 M in Puffer A gefahren. Die Fraktionen wurden über SDS-PAGE (3.2.3.1) geprüft und die Fraktionen die Ran enthielten vereinigt. Das Protein wurde durch portionsweise Zugabe von Ammoniumsulfat bis zu einer Endkonzentration von 3,9 M gefällt und 30 min bei 17000 g zentrifugiert. Das Präzipitat wurde in Puffer A ohne GDP aufgenommen und über einen weiteren Gelfiltrationsschritt (Sephadex G75) im gleichen Puffer gereinigt. Fraktionen, die reines Ran enthielten, wurden über SDS-PAGE identifiziert, vereinigt und in Viva-spin-Konzentratoren bis zu einer Proteinkonzentration von 15-25 mg/ml eingengt. Diese Fraktionen wurden vereinigt und durch Ultrafiltration bis zu einer Proteinkonzentration von 20-50 mg/ml eingengt. Die Konzentration der Proteinlösung wurde wie in 3.2.1.1-2 beschrieben bestimmt, die Lösung aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei -80 °C gelagert.

3.1.3 Expression und Reinigung von Raf-RBD

Raf-RBD (51-131) wurde mittels eines pGex-2T-Vektors als GST-Fusionsprotein im *E. coli*-Stamm BL21(DE3) exprimiert. Hierzu wurden 10 l Standard I Medium mit 100 mg/l Ampicillin mit 100 ml einer Übernachtskultur beimpft und unter Schütteln (180 rpm) bei 37 °C inkubiert. Bei einer OD₆₀₀ von 0,6 wurde mit 0,3 mM IPTG die Proteinexpression induziert und die Kultur über Nacht bei 30 °C inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien zentrifugiert und der Niederschlag bei -20 °C tiefgefroren.

Nach dem Auftauen wurde der Bakterienniederschlag im zweifachen Volumen Aufschlusspuffer (50 mM Tris/HCl pH 7,5/ 150 mM NaCl/ 5 mM EDTA/ 5 mM DTE/ 1 mM PMSF/ 0,5 % Deoxycholat) resuspendiert und die Bakterien durch Ultraschall-Behandlung aufgeschlossen. Zellfragmente wurden durch 30-minütige Zentrifugation bei 25000 g sedimentiert und der klare Überstand auf eine in 50 mM Tris/HCl pH 7,5/ 150 mM NaCl/ 5 mM DTE äquilibrierte GSH-Säule gegeben, um das Fusionsprotein über die Glutathion-S-Transferase an die Glutathion-präsentierende Sepharose zu binden. Nach dem Spülen mit 3-5 Säulenvolumen des gleichen Puffers wurde Thrombin auf die Säule aufgetragen, um die Raf-RBD von der Glutathion-S-Transferase zu trennen. Hierfür wurden etwa 1 U Thrombin für 2 mg Fusionsprotein eingesetzt und die Spaltreaktion bei 4 °C über Nacht unter langsamer Zirkulation (0,3 ml/min) durchgeführt. Das Eluat wurde durch Ultrafiltration eingeeengt, über einen Gelfiltrationsschritt (Sephadex, G-75) weiter gereinigt und dabei in den gewünschten Puffer überführt (Messpuffer C). Das Salz diente dabei zur Stabilisierung des Proteins. Mittels SDS-PAGE nach Schagger (3.2.3.2) wurden die Fraktionen mit reiner Raf-RBD identifiziert, vereinigt und nochmals durch Ultrafiltration auf 50-70 mg/ml konzentriert. Die Proteinkonzentration wurde mit Coomassie Blau Reagenz (3.2.1.1) bestimmt, die Proteinlösung aliquotiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80 °C.

3.1.4 Expression und Reinigung von RalGDS-RBD

RalGDS-RBD (11-97) wurde mittels eines pGex-2T-Vektors als GST-Fusionsprotein in *E. coli* BL21(DE3) exprimiert. Hierzu wurden 10 l Minimal-Medium mit 100 mg/l Ampicillin durch 100 ml einer Übernachtskultur beimpft und unter Schütteln (180 rpm) bei 37 °C inkubiert. Bei einer OD₆₀₀ von 0,6 wurde mit 0,3 mM IPTG die Proteinexpression induziert und über Nacht bei 30 °C inkubiert. Anschließend wurde die Kultur zentrifugiert und der Bakterienniederschlag bei -20 °C tiefgefroren. Die weitere Aufreinigung erfolgte wie in Abschnitt 3.1.3 beschrieben.

3.1.5 Expression und Reinigung von NF1-333

NF1-333 wurde analog zur Raf-RBD (3.1.3) mittels eines pGex-2T-Vektors als GST-Fusionsprotein in *E. coli* BL21(DE3) exprimiert und gereinigt. Zur Darstellung des Proteins wurden 15%ige Acrylamid-Gele nach Laemmli (3.2.3.1) verwendet. Die Konzentration wurde mit Coomassie Brilliantblau Reagenz (3.2.1.1) bestimmt.

3.2 Proteinbiochemische Methoden

3.2.1 Bestimmung der Proteinkonzentration

3.2.1.1 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Der Gesamt-Proteingehalt in Lösungen wurde durch die Methode nach Bradford (1976) bestimmt. Sie beruht auf der Verschiebung des Absorptionsmaximums des Farbstoffs Coomassie Brilliantblau von 456 nm nach 595 nm durch die Bindung an Proteine in saurer Lösung. Zur Messung wurden 2-5 μ l der Proteinlösung oder einer Verdünnung dieser Lösung in 1 ml Coomassie Protein Assay Plus Reagenz (Pierce, Illinois, USA) gegeben und die Absorption bei $\lambda = 595$ nm gegen reines Reagenz gemessen. Die Eichung wurde mit Rinderserumalbumin durchgeführt.

3.2.1.2 Bestimmung der Protein-/Nukleotidkonzentration mittels HPLC

Zur Bestimmung der Nukleotidbeladung und Nukleotidkonzentration in Proteinproben wurden die Nukleotide mit Hilfe von Hochdruckflüssigkeitschromatographie (Beckmann, System Gold 166) und einer ODS-Hypersil C18 Umkehrphasensäule aufgetrennt. Bei Guaninnukleotid-bindenden Proteinen wird bei einer 1:1 Protein/Nukleotid-Stöchiometrie durch die Bestimmung der Nukleotidkonzentration ebenfalls die Konzentration des aktiven Proteins ermittelt, wenn zuvor das ungebundene Nukleotid vollständig abgetrennt wurde. Die Absorption des Nukleotids wurde bei $\lambda = 254$ nm bestimmt. Als Laufpuffer dienten 100 mM K_2HPO_4/KH_2PO_4 pH 6,4/ 10 mM Tetrabutylammoniumbromid mit 7,5 % Acetonitril bei der Auftrennung von Guaninnukleotiden und 25 % Acetonitril zur Auftrennung der hydrophoberen mant-Guaninnukleotide. Für quantitative Messungen wurde das HPLC-System mit einer Reihe von GDP-Lösungen geeicht, deren genaue Konzentrationen durch Messung der Absorption bei $\lambda = 254$ und dem Extinktionskoeffizienten $\epsilon_{254}(\text{GDP}) = 13700 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ bestimmt wurden. Bei der Konzentrationsbestimmung von mant-Guaninnukleotiden wurde mit einem Extinktionskoeffizienten $\epsilon_{254}(\text{mGXP}) = 22600 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ gerechnet.

3.2.2 Bestimmung von Hydrolyseraten mittels HPLC

Intrinsische Hydrolyseraten verschiedener Ras-Varianten wurden mittels C18-*reversed phase*-HPLC bestimmt, wie in 3.2.1.2 beschrieben. Dazu wurden 100 μM Ras•GTP-Lösungen in Ansätzen von 30 μl bei der gewünschten Temperatur inkubiert und die einzelnen Ansätze zu den verschiedenen Inkubationszeiten zunächst in flüssigem Stickstoff eingefroren, da bei schnellen Kinetiken für einzelnen Messungen mehr Zeit benötigt wird, als man zwischen zwei Messpunkten zur Verfügung hätte. Nach raschem Auftauen wurde über HPLC nicht die effektive GTP-Konzentration, sondern der Anteil des GTP an der Gesamtnukleotid-Konzentration der Probe bestimmt. Dadurch konnten eventuelle Fehler, die durch kleine Abweichungen in der aufgetragenen Proteinmenge entstehen könnten, eliminiert werden. Die einzelnen Messwerte (% GTP) wurden über der Inkubationsdauer aufgetragen und diesen experimentellen Werten einfach-exponentielle Funktionen angepasst.

Messungen der durch GAP aktivierten Hydrolysen von Ras sind mit dieser Methode nur begrenzt möglich, da sie sehr schnell verlaufen. Um eine zumindest qualitative, vergleichende Aussage zwischen Ras(wt) und Mutanten treffen zu können wurden unter gleichen Bedingungen Messungen durchgeführt bei der gleiche Konzentrationen von Ras und GAP eingesetzt wurden. Dabei wurde GAP gegenüber Ras im deutlichen molarem Überschuss zugegeben, so dass die Hydrolyserate nur etwa um einen Faktor von 5 beschleunigt wurde. Auf diese Weise konnten mit dieser Messmethode noch gut auswertbare Ergebnisse erzielt werden.

3.2.3 Denaturierende SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

3.2.3.1 SDS-PAGE nach Laemmli

Zur Auftrennung von Proteingemischen und zur Überprüfung der Reinheit von Proteinpräparationen wurde die denaturierende, diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese nach Laemmli (1970) angewandt. Dabei betrug die Acrylamidkonzentration im Trenngel 15 % und im Sammelgel 4 %. Der Laufpuffer setzte sich aus 25 mM Tris-Base/ 200 mM Glycin/ 0,1 % (w/v) SDS zusammen. Die Proteinproben wurden mit 1/5 Volumen 5x SDS-Probenpuffer (150 mM Tris/HCl pH 6,8; 2 % (w/v) SDS; 20 % (v/v) Glycerin; 0,01 % (w/v) Bromphenolblau; 10 mM DTE) vermischt und vor dem Auftragen auf das Gel durch Hitze denaturiert (5 min

bei 95 °C). Die Gele (6 x 9 cm) wurden bei einer konstanten Stromstärke von 36 mA pro Gel über eine Dauer von 50-60 min gefahren. Anschließend wurden die Gele in der Färbelösung (0,1 % Coomassie Brilliantblau G250; 0,1 % Coomassie Brilliantblau R250; 40 % (v/v) Methanol; 10 % (v/v) Essigsäure) etwa 30 min gefärbt und in der Entfärbelösung (20 % (v/v) Essigsäure; 10 % (v/v) Ethanol) bis zum deutlichen Sichtbarwerden der Proteinbanden entfärbt. Als Größenstandard wurde der Proteinstandard SDS7 (Sigma, Deisenhofen) verwendet.

3.2.3.2 SDS-PAGE nach Schagger und v. Jagow

Proteine mit einem Molekulargewicht von 10 kDa oder kleiner wurden mittels SDS-PAGE nach Schagger & v. Jagow, (1987) aufgetrennt. Im Trenngel betrug die Acrylamid-Konzentration 16,5 % und 4,1 % im Sammelgel. Der Anodenpuffer setzte sich aus 200 mM Tris/HCl pH 8,9 und der Kathodenpuffer aus 100 mM Tris, 100 mM Tricin, 0,1 % (w/v) SDS zusammen (der pH beträgt etwa 8,25 und wurde nicht eingestellt). Die Gele (6 x 9 cm) wurden bei konstanter Spannung von 100 V über eine Dauer von etwa 80 min gefahren. Das Färben und Entfärben wurde analog zu 3.2.3.1 durchgeführt.

3.2.4 Nukleotidreinigung

Da käufliches GTP meist nur eine Reinheit von 80-90 % aufweist wurde es für die Beladung von Nukleotid-freiem Protein nochmals von anderen Nukleotiden abgetrennt. Hierzu wurde bei einer Temperatur von 5 °C 1 g in Puffer gelöstes Nukleotidgemisch auf eine mit 0,1 M Triethylamin-Puffer (pH 7,4; eingestellt durch CO₂-Begasung) äquilibrierte Q-Sepharose Säule (16/60) gegeben. Nach zwei Säulenvolumen mit 0,1 M Triethylamin-Puffer wurde über 6 Säulenvolumen ein Gradient von 0,1 M bis 1 M Triethylamin gefahren. Die Fraktionen, die gemäß dem Elutionsprofil Nukleotid enthielten, wurden über C18-reversed phase-HPLC-Auftrennung (3.2.1.2) auf ihren Anteil an GTP geprüft und die Fraktionen die reines GTP enthielten vereinigt. Die GTP-Lösung wurde anschließend in einem Rotationsverdampfer bei einer Wasserbadtemperatur von 37 °C eingengt, das Nukleotid mehrmals in Methanol gelöst und wiederum eingengt, um das Triethylamin vollständig zu entfernen. Das GTP wurde anschließend in 100 mM Tris/HCl pH 7,6 aufgenommen und die Konzentration photometrisch bestimmt. Hierzu wurde ein Extinktionskoeffizient $\epsilon_{252}(\text{GTP}) = 13700 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ verwendet.

3.2.5 Metallion- und Nukleotidaustausch

3.2.5.1 Austausch des Mg^{2+} zu Mn^{2+}

Zur Untersuchung der Ligandenumgebung des im aktiven Zentrum von Ras gebundenen Mg^{2+} wurde für EPR-Messungen das Mg^{2+} durch das paramagnetische Mn^{2+} ersetzt. Für diese Austauschreaktion wurde das Protein in 50 mM Tris/HCl pH 7,5/ 2 mM DTE ohne Mg^{2+} umgepuffert. Die Proteinkonzentration betrug etwa 200 μM und das Protein befand sich im Komplex mit dem gewünschten Nukleotid. Durch Zugabe von 200-300 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ wurde die Dissoziationsrate des Nukleotids erhöht, so dass durch einen 200fachen Überschuss von Mn^{2+} über der Mg^{2+} -Konzentration die Komplexbildung zwischen Ras, Mn^{2+} und dem jeweiligen Nukleotid ermöglicht wurde. Die Austauschreaktion wurde bei 5 °C über Nacht durchgeführt. Freies Mg^{2+} bzw. Mn^{2+} wurde gründlich durch Gelfiltration (Sephadex G75 10/30 oder 3x PD10 (Sephadex G25, Pharmacia) entfernt. Die verwendeten Puffer wurden mit Chelex Resin 100 behandelt, um freie zweiwertig-positiv geladene Ionen zu entfernen.

3.2.5.2 Nukleotidaustausch zu GTP

Der Austausch von Ras•GDP zu Ras•GTP wurde im Beisein von 200-300 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ bzw. 10 mM EDTA durchgeführt, um die Dissoziationsrate des Nukleotids zu erhöhen. Durch einen 50-100fachen Überschuss an GTP und eine Inkubationszeit von 3 h auf Eis, konnten so Ras-Proteine mit einer GTP-Beladung von bis zu 85 % erhalten werden. Für NMR-Messungen wurde der Austausch mit bereits GTP-beladenem Ras (ca. 85 % Ras•GTP) und gereinigtem GTP (ca. 98 % GTP) wiederholt. Nach dem Abtrennen des freien Nukleotids durch Gelfiltration wurde auf diese Weise Ras mit GTP-Beladungen von 93 % bis 96 % erhalten.

3.2.5.3 Nukleotidaustausch zu mGDP/mGTP

Da die Herstellung von mant-Nukleotiden aufwendig und teuer ist, konnte hier nicht mit dem Einsatz eines großen Nukleotidüberschusses gearbeitet werden. Die Beladung mit mGDP und mGTP wurde deshalb über den Weg der Nukleotidbefreiung des Ras-Proteins erreicht. Hierzu wurde eine 200 μM Ras•GDP-Lösung mit 300 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ und 10 mM EDTA versetzt, um die Dissoziation des gebundenen Nukleotids zu erhöhen. 1 mM Guanosin wurde zugegeben, um das Protein zu stabilisieren. Durch Zugabe von alkalischer Phosphatase (2 U/mg Protein) wurde das GDP bei 4 °C über Nacht zu GMP und Guanosin abgebaut, die beide nur eine geringe Affinität zum Ras-Protein aufweisen. Anschließend wurden die

alkalische Phosphatase, die ungebundenen Nukleotide und Salze durch Gelfiltration abgetrennt und das Protein anschließend sofort mit 10 mM MgCl_2 und einem 2fachen Überschuss des gewünschten Nukleotids versetzt. Das überschüssige mant-Nukleotid wurde durch eine weitere Gelfiltration abgetrennt.

3.2.5.4 Nukleotidaustausch zu GppNHp, GppCH₂p, GTP γ S oder mGppNHp

Der Austausch von GDP zu stabilen GTP-Analoga wurde mittels dem Einsatz alkalischer Phosphatase durchgeführt. Zu 100-200 μM Ras•GDP in 50 mM Tris/HCl pH 7,6/ 2 mM DTE wurden 200 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ und eine Spur ZnCl gegeben. Es wurde ein 2facher Überschuss des gewünschten GTP-Analogen und alkalische Phosphatase (2 U/mg Protein) zugegeben. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 4 °C. Anschließend wurden alkalische Phosphatase, freies Nukleotid und Salze durch Gelfiltration (Sephadex, G75) abgetrennt und das Protein in den gewünschten Puffer überführt.

3.2.6 Kristallisation von Ras-Proteinen

Zur Kristallisation wurden C-Terminal verkürzte Ras-Proteine (AS 1-166) in Konzentrationen zwischen 1 und 1,5 mM in 50 mM Tris/HCl pH 7,5/ 10 mM MgCl_2 / 2 mM DTE eingesetzt.

3.2.6.1 Kristallisation von Ras(wt)•GppNHp

Für die MAS (*magic angle spinning*)-³¹P-Festkörper-NMR-Spektroskopie wurden größere Mengen von Kristallen (ca. 100-300 μm Kantenlänge) benötigt. Sie wurden im „sitting drop“ Verfahren in 3-spot-wells hergestellt. Dazu wurden 30 μl 100 mM Tris/HCl pH 7,6/ 52 % PEG 400/ 10 mM MgCl_2 / 5 mM DTE in der Kammer vorgelegt und 30 μl Proteinlösung zugegeben. Nach leichter Schleierbildung am Rand des Tropfens wurden die Kammern mit klarem Klebeband luftdicht verschlossen und die Platten bei 18 °C im Dunkeln inkubiert. Die Kristalle waren nach etwa 24-36 h herangewachsen.

3.2.6.2 Kristallisation von Ras(T35S)•GppNHp

Diese Ras-Mutante konnte nur im „hanging drop“ Verfahren mit Linbro-Platten und silikonisierten Deckgläschen kristallisiert werden. Die Reservoir-Lösung setzte sich aus 100 mM Tris/HCl pH 7,5/ 27 % PEG 1500/ 40 mM CaCl_2 zusammen.

Der Kristallisationsansatz bestand aus 5 μ l Proteinlösung/ 4 μ l Reservoirlösung/ 1 μ l 0,1 M Spermin/HCl. Die Inkubation erfolgte bei 18 °C über eine Dauer von 3-4 Tagen.

3.3 Biophysikalische Messmethoden

3.3.1 Kernspinresonanz-Spektroskopie

3.3.1.1 Probenbereitung und Messung

^{31}P -NMR-Spektren wurden an einem Bruker DMX-500 NMR-Spektrometer bei einer Phosphor-Resonanzfrequenz von 202 MHz durchgeführt. Die Protein- bzw. Nukleotid-Proben waren dabei in 40 mM HEPES/NaOH pH 7,4/ 10 mM MgCl_2 / 2 mM DTE/ 5 % D_2O / 0,1 mM DSS. Bei Titrationsmessungen mit Effektor-RBDs befanden sich zusätzlich 150 mM NaCl im Puffer. Die Referenzierung wurde indirekt über das DSS Signal durchgeführt, wie in Maurer & Kalbitzer (1996) beschrieben. Hierzu wurde vor jeder ^{31}P -NMR-Messung ein ^1H -Spektrum aufgenommen und ein Ξ -Wert von 0,4048073561 eingesetzt, der 85%iger externer Phosphorsäure in Glaskügelchen entspricht.

Die Messungen wurden in einem 10 mm Probenkopf in 8 mm Shigemi-Probenröhrchen durchgeführt. Die Volumina der Proben betrugen zwischen 0,7 und 1,2 ml bei Proteinkonzentrationen von 0,8-1,6 mM. Die Messungen wurden bei unterschiedlichen Temperaturen zwischen 278 K und 318 K durchgeführt. Die dabei eingestellte Temperatur wurde über die Linienaufspaltung $\Delta\delta$ von Methylen-Hydroxyl, einer externen Ethylenglycol-Probe, kontrolliert (Raiford *et al.*, 1979). Die reale Temperatur T_{real} wurde mit folgender Gleichung (Gl. 3.1) berechnet:

$$T_{\text{real}} = 465,77\text{K} - 100,06\text{K} \cdot \Delta\delta - 0,6276\text{K} \cdot \Delta\delta^2 \quad (\text{Gl. 3.1})$$

Bei der Messung von Proteinproben wurden die Protonen während der Datenaufnahme durch eine GARP Sequenz (Shaka *et al.*, 1985) mit einer B_1 -Feldstärke von 830 Hz entkoppelt. 60-70° Pulse wurden mit einer Wiederholungszeit von 4-7 s eingestrahlt. Die digitale Auflösung der Spektren war dabei immer besser als 0,4 Hz/Datenpunkt.

3.3.1.2 Bestimmung der Parameter von Resonanzlinien

Zur Bestimmung der Linienparameter der experimentellen Daten wurden die Spektren unter Verwendung des Programms „exnmr“ (G. Steiner, Regensburg) in

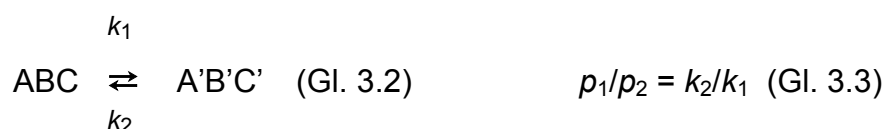
das *ascii*-Format umgewandelt. Im Programm Origin 6.0 (Microcal) wurden den experimentell erhaltenen Resonanzlinien Lorentzlinien angepasst und so die chemischen Verschiebungen, Linienbreiten und Integrale der einzelnen Resonanzlinien bestimmt. Bei höher aufgelösten Raumtemperaturmessungen von Ras•GDP, bei denen die Resonanzlinien deutlich die Aufspaltung durch die $^2J_{\alpha\beta}$ -Kopplung zeigen, wurden Paare von Lorentzlinien angepasst. Die Auswertung ist jedoch mit einem größeren Fehler verbunden, wenn sich zwei Resonanzlinien überlagern, oder wenn das Spektrum ein schlechtes Signal-zu-Rausch-Verhältnis aufweist.

3.3.1.3 Simulation der Austauschraten

Wenn ein Protein in Lösung in unterschiedlichen Konformationen vorliegt, so wird das Signal eines detektierten Kerns durch die unterschiedliche chemische Umgebung häufig in zwei oder mehrere Resonanzlinien aufgespalten. Befinden sich die Konformationen des Proteins in einem gegenseitigen dynamischen Gleichgewicht, so kann es auf Grund des chemischen Austauschs in Abhängigkeit der Austauschraten zur Linienverbreiterung und zu einer Überlagerung der einzelnen Linien kommen. Sind die Austauschraten langsam, relativ zur NMR-Zeitskala, so erhält man zwei getrennte Signale, wenn die jeweilige chemische Umgebung zu unterschiedlichen Werten der chemischen Verschiebung führt. Bei einem mittelschnellen Austausch werden die Linien stark verbreitert, so dass sie zum Teil nicht mehr detektiert werden können. Wird der Austausch schnell gegenüber dem NMR-Zeitfenster so erhält man eine resultierende Resonanzlinie, deren Wert der chemischen Verschiebung, abhängig von den Populationen der beiden Zustände, im gewichteten Mittel zwischen den Ausgangslinien zum Liegen kommt (Hausser & Kalbitzer, 1989; Evans, 1995). Dies macht die Spektren zum einen komplizierter, jedoch kann man durch diese Informationen Hinweise über das dynamische Verhalten des Proteins erhalten. In 1D- ^{31}P -NMR-Messungen, die bei unterschiedlichen Temperaturen von Ras-Proteinen aufgenommen wurden, konnten Geyer *et al.* (1996) ein solches konformationelles Gleichgewicht zwischen zwei Zuständen der Proteine zeigen. Dabei wurden die Phosphor-Kerne des gebundenen Guanin-nukleotids detektiert, die sich direkt im aktiven Zentrum des Proteins befinden. Mit einem auf dem Spindichtematrix-Formalismus basierendem Programm konnten diese Spektren analysiert werden. Innerhalb dieser Arbeit wurden in Zusammenarbeit mit G. Steiner (Regensburg) analoge Linienform-Analysen an Spektren anderer Ras-Nukleotidkomplexe durchgeführt, die jeweils bei unterschiedlichen Temperaturen aufgenommen wurden.

Eine genaue Beschreibung des Programms ist in Geyer (1995) und Geyer *et al.*, (1996) zu finden. Das Programm „linsim“ wurde von G. Steiner (Regensburg) erweitert und die Anwenderoberfläche verbessert.

Für den hier untersuchten Fall von Ras-Triphosphat-Nukleotidkomplexen, die in zwei unterschiedlichen Konformationen vorliegen, erhält man ein Drei-Spinsystem (α -, β - und γ -Phosphat), mit Phosphorkernen, die sich im dynamischen Gleichgewicht zwischen den beiden Zuständen 1 (ABC) und 2 (A'B'C') befinden (Gl. 3.2). Die Austauschraten k_1 und k_2 sind dabei umgekehrt proportional zu den Populationen (p) der beiden Zustände (Gl. 3.3):



Es wurde angenommen, dass sowohl die chemischen Verschiebungen der einzelnen Resonanzlinien, als auch das Verhältnis der jeweiligen Populationen der beiden Zustände annähernd unabhängig von der Messtemperatur sind. Diese beiden Parameter wurden aus den experimentellen Daten entnommen, die bei tiefer Temperatur aufgenommen wurden, da hier die Resonanzlinien am wenigsten durch chemischen Austausch verbreitert und somit am besten aufgelöst sind. Beide Parameter wurden dann bei der Analyse der experimentellen Daten, die bei höherer Temperatur gemessen wurden, konstant gehalten. Die J-Kopplungen sind ein weiterer erforderlicher Eingabeparameter des Programms. Sie wurden aus Spektren des Nukleotid-Mg²⁺-Komplexes entnommen, da die J-Kopplungen der Protein-gebundenen Nukleotide meistens nicht aufgelöst sind. Die so ermittelten Kopplungskonstanten sollten sich aber durch die Bindung zum Protein nicht wesentlich ändern.

3.3.2 Elektronenspinresonanz-Spektroskopie

3.3.2.1 Probenbereitung und Messung

Alle CW-EPR-Experimente wurden in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von T. Prisner (Frankfurt) durchgeführt. Wenn nicht anders angegeben wurden die Spektren an einem Bruker E580 EPR-Spektrometer aufgenommen, welches bei einer Mikrowellenfrequenz von 95 GHz arbeitet (K.-P. Dinse, Darmstadt). Zur Messung wurden etwa 10 μ l einer 0,9–1,1 mM Ras•Mn²⁺-Nukleotid-Lösung in Messpuffer A (40 mM HEPES/NaOH pH 7,4/ 2 mM DTE) in Quarzkapillaren mit einem

Innendurchmesser von 0,2-0,5 mm gefüllt. Zur Herstellung der ^{17}O -angereicherten Proben wurden die Proteinproben lyophilisiert und das Protein direkt vor der Messung in mit 46,3 % ^{17}O angereichertem Wasser gelöst. Die Spektren zweier Proteinproben in H_2^{16}O , von denen eine lyophilisiert und wieder in H_2^{16}O gelöst wurde, unterschieden sich nicht.

3.3.2.2 Simulation und Auswertung

EPR-Untersuchungen an *high-spin* Mn^{2+} ($S=5/2$, $I=5/2$)-Protein-Komplexen wurden bereits mehrfach durchgeführt und publiziert (Reed & Markham, 1984). Da die in Kooperation mit T. Prisner (Frankfurt) durchgeführten Messungen an $\text{Ras}\cdot\text{Mn}^{2+}$ -Nukleotidkomplexen bei einem hohen magnetischen Feld (3,4 Tesla) aufgenommen wurden, ist eine Störungsrechnung der Mn^{2+} -Hyperfein- und Nullfeldaufspaltung bis zur 3. Ordnung völlig ausreichend, um die experimentellen Daten zu beschreiben. Die Kernspinquantenzahl des ^{17}O ist ebenfalls $I=5/2$. Die anisotropen Beiträge des g-Faktors und der Mn^{2+} -Hyperfeinkopplung können vernachlässigt werden. Die geringen anisotropen Beiträge der ^{17}O -Superhyperfeinkopplung wurden in der Auswertung der experimentellen Daten ebenfalls nicht berücksichtigt. Durch die Nullfeldverbreiterung werden von den 30 erlaubten Übergängen nur die sechs Mn^{2+} -Hyperfeinlinien des zentralen elektronischen Übergangs ($m_s = +1/2 \rightleftharpoons m_s = -1/2$) im CW-EPR-Spektrum aufgelöst.

Die Simulationen der EPR-Spektren wurden mit einem von T. Prisner (Frankfurt) in MATLAB geschriebenen Programm durchgeführt. Das Programm basiert auf einer störungstheoretischen, analytischen Berechnung des Spektrums, wie von Reed & Markham (1984) beschrieben. Es erlaubt sowohl die Optimierung der Parameter an experimentelle Daten durch einen Simplex Algorithmus, als auch die Erzeugung von simulierten Spektren anhand von manuell vorgegebenen Parametern. Das Programm berücksichtigt für den beobachteten zentralen elektronischen Übergang folgende Parameter: die isotrope Hyperfeinwechselwirkung des Mn^{2+} -Kernspins ($I=5/2$), die Nullfeldtensor-Parameter D und E des Mn^{2+} -Elektronenspins, die isotrope Hyperfein-Wechselwirkung zu den ^{17}O Kernen ($I=5/2$) der isotoopenmarkierten Wassermoleküle inklusive der statistischen Verteilung (46.3 % Isotoopenmarkierung), die homogene Restlinienbreite sowie eventuell weitere isotrope Hyperfein-Wechselwirkungen zu Kernspins der Proteinumgebung (^{31}P , ^{14}N). Einige dieser Parameter, wie die Mn^{2+} - ^{17}O oder die Mn^{2+} - ^{31}P -Superhyperfeinkopplung, konnten durch unabhängige Messungen und Literaturwerte auf ihre Konsistenz geprüft werden. Die Simulationen wurden für die Messungen in H_2^{17}O zunächst unter Annahme unterschiedlicher, ganzzahliger Werte von Wasser-Ligan

den durchgeführt. Auf Grund der Ergebnisse der ^{31}P -NMR-Spektroskopie wurde das Programm insofern erweitert, dass auch statistische Verteilungen zwischen zwei benachbarten Anzahlen von Wasserliganden als zusätzlicher freier Parameter in der Simulation zugelassen werden konnten.

3.3.3 *Stopped Flow*-Messungen der Interaktion zwischen Ras und Effektoren

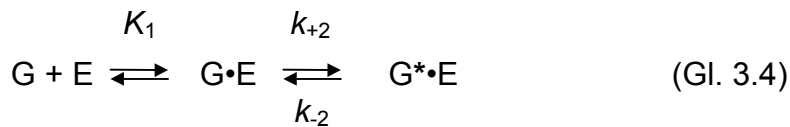
3.3.3.1 Probenbereitung und Messung

Schnelle Kinetiken, wie die Assoziation und Dissoziation zwischen Ras-Proteinen und Effektor-RBDs wurden mit einer *Stopped-Flow*-Apparatur SX18MV (Applied Photophysics, Leatherland, Großbritannien) durchgeführt. Dabei wurde die Fluoreszenz von mant-Nukleotiden (mGppNHp bzw. mGDP) in Abhängigkeit von ihrer chemischen Umgebung detektiert, welche durch Einstrahlung bei $\lambda = 360\text{ nm}$ angeregt wurde. Durch einen Kantenfilter wurde das Spektrum des Emissionslichts bei 408 nm zu kürzeren Wellenlängen hin abgeschnitten. Die Signale wurden elektronisch geglättet. Dabei war die jeweilige Zeitkonstante jedoch immer mindestens 10fach kleiner als die beobachtete Geschwindigkeitskonstante der Reaktion. Es wurde für diese Messungen der gleiche Puffer verwendet, der auch für die NMR-Experimente verwendet wurde (Messpuffer C: $40\text{ mM HEPES/NaOH pH } 7,4/ 10\text{ mM MgCl}_2/ 150\text{ mM NaCl/ } 2\text{ mM DTE}$; jedoch hier ohne Zugabe von D_2O und DSS). Die Temperatur während der Messungen betrug $10\text{ }^\circ\text{C}$. Die Anpassung von einfach-exponentiellen Funktionen an die experimentellen Daten erfolgte über die systemeigene Software.

3.3.3.2 Kinetik der Interaktion zwischen Ras-Varianten und Effektor-RBD

Zur Bestimmung der Assoziationsgeschwindigkeitskonstanten wurden $0,5\text{ }\mu\text{M}$ Ras•mGppNHp-Lösungen mit Raf-RBD-Lösungen aufsteigender Konzentration mittels der *stopped flow*-Apparatur gemischt und der zeitliche Verlauf des Fluoreszenzsignals detektiert. Da die Messungen immer unter den Bedingungen einer Reaktion pseudo-erster-Ordnung durchgeführt wurden, konnten den jeweiligen Fluoreszenzänderungen einfach-exponentielle Funktionen angeglichen und die beobachteten Geschwindigkeitskonstanten bestimmt werden. Die einzelnen Geschwindigkeitskonstanten wurden anschließend über der Konzentration der eingesetzten Effektor-RBD aufgetragen und im Fall eines linearen Verlaufs mit $k_{\text{obs}} = k_{\text{ass}} \cdot [\text{E}] + k_{\text{diss}}$ beschrieben bzw. mit Gleichung 3.5, wenn die Kinetik ein Sättigungsverhalten aufwies. Diese Gleichung geht von einem Zweischnitt-Modell

aus (Gl. 3.4), bei dem ein einleitender Schritt mit niedriger Affinität und hoher Dissoziationsrate einem zweiten vergleichsweise langsamen Umlagerungsschritt vorgeht (Johnson, 1991):



G: GTPase-Nukleotidkomplex

E: Effektor-RBD

$$k_{\text{obs}} = k_{-2} + \frac{k_2}{1 + K_1 / [E]} \quad (\text{Gl. 3.5})$$

Mit Gleichung 3.5 kann das Sättigungsverhalten beschrieben werden. Für $[E] \ll K_1$ kann k_{obs} durch Anpassung einer linearen Funktion bestimmt werden, aus deren y-Achsenabschnitt man die beobachtete k_{-2} erhält und deren Steigung $k_2/K_1 = k_{\text{ass}}$ entspricht. Bei $[E] \gg K_1$ tritt bei einem Wert von $k_{-2} + k_2$ Sättigung der Assoziationsgeschwindigkeit ein.

Die Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante k_{-2} kann aus dem oben aufgeführten Experiment nur abgeschätzt werden. Sie wurde deshalb in einem weiteren Experiment direkt bestimmt. Hierzu wurde eine Lösung von 0,5 μM Ras•mGppNHp + 10 μM Raf-RBD mit einer 100 μM Lösung von nicht fluoreszierendem Ras•GppNHp in der *stopped flow*-Apparatur gemischt. Durch den hohen Überschuss an nicht-fluoreszierendem Ras•GppNHp wird eine Reassoziationsreaktion der aus dem Komplex dissoziierten RBD an das Fluorophor-tragenden Ras•mGppNHp nahezu verhindert, so dass man eine quasi-irreversible Reaktion erhält. Der zeitliche Verlauf des Fluoreszenzsignals wurde detektiert und eine einfach-exponentielle Funktion angepasst, um k_{-2} zu ermitteln.

3.3.4 Fluoreszenzspektroskopie

Langsame Kinetiken in der Minuten- oder Stundenzeitskala wurden mittels Fluoreszenzspektroskopie an einem FluoroMax II Spektrofluorimeter aufgenommen. Bei Messungen mit mant-Nukleotiden wurde bei einer Wellenlänge von 366 nm angeregt und die Emission bei $\lambda = 450$ nm detektiert. Die Temperatur betrug 25 °C,

bei einer Integrationszeit von 1 s und Schlitzbreiten von 0,2 mm (ex.) und 2,0 mm (em.).

Zur Bestimmung der Mg^{2+} -Affinität zum Ras-Nukleotidkomplex wurde die Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante des mant-Nukleotids in Abhängigkeit von der freien Mg^{2+} -Konzentration gemessen. Dabei wurden kleine Mg^{2+} -Konzentrationen mittels eines Gleichgewichts zu EDTA eingestellt unter Annahme einer Mg^{2+} /EDTA Gleichgewichtsdissoziationskonstanten von 1,7 μM bei einem pH-Wert von 7,5 (Reinstein *et al.*, 1991). Zur Ermittlung der Dissoziationsraten wurden zu 800 μl HEPES/NaOH pH 7,4/ 150 mM NaCl/ (10 mM EDTA)/ 2 mM DTE/ 160 μM GppNHp bzw. GDP zunehmende Mengen $MgCl_2$ (Endkonzentration von 10 μM bis 10 mM) in Quarzküvetten gegeben. Der pH-Wert des Messansatzes betrug 7,5. Direkt vor Messbeginn wurde Ras•mGXP zu einer Konzentration von 0,5 μM zugegeben und während der Messung der zeitliche Verlauf des Fluoreszenzsignals verfolgt. Die Dissoziationsgeschwindigkeitskonstanten wurden bestimmt, indem der Fluoreszenzänderung unter Zuhilfenahme des Programms Origin 6.0 (Micro-Cal) einfach-exponentielle Funktionen angepasst wurden. Die so ermittelten Geschwindigkeitskonstanten wurden über dem Logarithmus der Mg^{2+} -Konzentration aufgetragen und eine hyperbolische Funktion angepasst, aus der sich der K_D ergibt (John *et al.*, 1993).

3.3.5 Isotherme Titrationskalorimetrie (ITC)

Die isotherme Titrationskalorimetrie wurde zur Bestimmung der Assoziationskonstanten zwischen verschiedenen Ras-Nukleotidkomplexen und der Ras-Bindedomäne der Raf-Kinase eingesetzt. Die Messungen wurden mit einem MicroCal MCS ITC Titrationskalorimeter durchgeführt. Hierbei wird die Enthalpieänderung ΔH bestimmt, die sich aus der Assoziation zweier Moleküle ergibt. Durch die Anpassung einer Bindungsisothermen an die Titrationsdaten können darüber hinaus die Affinitätskonstante K_A sowie die Stöchiometrie des gebildeten Komplexes bestimmt werden.

Zur Messung wurde eine 55,1 bzw. 73,4 μM Ras-Nukleotidkomplex-Lösung in der Messzelle vorgelegt und thermostatisiert. Zu dieser wurde dann schrittweise eine 0,6, 1,0 oder 1,5 mM Raf-RBD Lösung titriert. Die Messtemperatur betrug 25 °C. Alle Proteine waren in demselben Puffer (Messpuffer C: 40 mM HEPES/NaOH pH 7,4/ 150 mM NaCl/ 10 mM $MgCl_2$ / 2 mM DTE) gelöst. Die Konzentrationen der Ras-Proben wurden über die Konzentration des im Verhältnis 1:1 gebundenen Nukleotids mittels HPLC-Analyse bestimmt (3.2.1.2.), die Konzentration der Raf-

RBD über die Methode nach Bradford (3.2.1.1.). Die Auswertung wurde mit dem systemeigenen Programm Origin für ITC 3.1 (Microcal) unter Annahme eines 1:1 Bindungsmodells nach Wiseman *et al.* (1989) durchgeführt.

3.3.6 Differential Scanning-Kalorimetrie (DSC)

Die thermische Entfaltung verschiedener Protein-Nuklotidkomplexe wurde mit einem VP-DSC Mikrokalorimeter (Microcal, Massachusetts, USA) untersucht. Die Proteine wurden hierzu über PD10-Säulen (Pharmacia) in den Messpuffer umgepuffert (Messpuffer B: 40 mM HEPES/NaOH pH 7,4/ 10 mM MgCl₂/ 2 mM DTE). Die Proteinkonzentrationen betrugen zwischen 22 und 28 µM. Die Referenzzelle wurde mit dem gleichen Puffer ohne Protein befüllt. Die gemessenen Werte wurden mit dem Programm Microcal Origin 4.1 für DSC bezüglich der Konzentration normalisiert, die Referenzmessung (Puffer gegen Puffer) von der Schmelzkurve subtrahiert und die molare Wärmekapazität berechnet. Eine genaue Bestimmung der thermodynamischen Parameter ist jedoch nur möglich, wenn keine irreversiblen Prozesse wie die Präzipitation des Proteins auftreten. Deshalb konnten die in dieser Arbeit durchgeführten Messungen an Ras-Nukleotidkomplexen nur qualitativ ausgewertet werden.

4 Ergebnisse

4.1 Untersuchung verschiedener Ras•GDP-Komplexe

4.1.1 Die Ligandensphäre des Mn^{2+} -Ions im Ras•GDP-Komplex

Um den Schaltmechanismus molekularer Schaltermoleküle, wie z. B. der kleinen GTPase Ras zu verstehen und die hierzu erforderlichen dynamischen Eigenschaften des Proteins zu untersuchen, ist es notwendig, neben der aktiven, angeschalteten Konformation auch ein möglichst genaues Bild von der Konformation des ausgeschalteten Zustands zu haben. Der Schwerpunkt bisheriger Untersuchungen lag auf dem angeschalteten Zustand, da dieser zur Signalweiterleitung führt und onkogene Varianten des Proteins in diesem aktiven, angeschalteten Zustand verharren.

Durch den Austausch des im aktiven Zentrum gebundenen Mg^{2+} durch ein Mn^{2+} -Ion ($S=5/2$, $I=5/2$) erhält man ein paramagnetisches Zentrum, das es ermöglicht durch Elektronenspinresonanz-Spektroskopie (EPR) Aussagen über die direkte Ligandensphäre des Metallions zu treffen. Hohe Magnetfelder und Mikrowellenfrequenzen sind erforderlich, um schmale auswertbare Linien zu erhalten (Abb. 4.1).

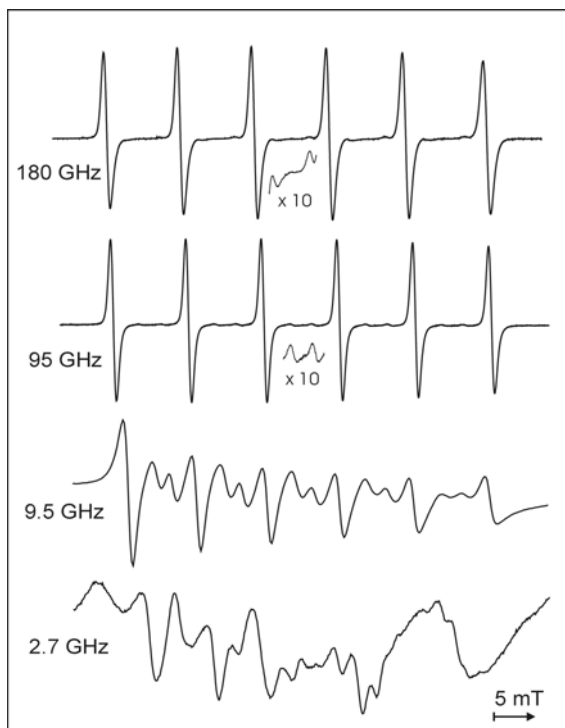


Abb. 4.1: Bei unterschiedlichen Feldern und Frequenzen aufgenommene EPR-Spektren von Ras(wt)• Mn^{2+} •GDP. Die EPR-Messungen wurden von Kooperationspartnern der Arbeitsgruppen von T. Prisner (Frankfurt) und K.-P. Dinse (Darmstadt) durchgeführt. Die EPR-Spektren wurden von 1 mM Ras(wt)• Mn^{2+} •GDP in Messpuffer A bei unterschiedlichen Magnetfeldern und den angegebenen Mikrowellenfrequenzen bei 297 K aufgenommen.

Die Hochfeld-EPR Untersuchungen wurden in Kooperation mit den Arbeitsgruppen von T. Prisner (Frankfurt) und K.-P. Dinse (Darmstadt) durchgeführt. Durch den Kernspin von $I=5/2$ wird das Mn^{2+} -EPR-Spektrum ungeordneter Proben von sechs Hyperfeinlinien dominiert. Während man im Q-Band bei der Frequenz von 35 GHz Linienbreiten von $0,81 \pm 0,01$ mT erhält (Feuerstein *et al.*, 1987b), verringern sich diese bei höherem Feld und höherer Frequenz im W-Band (95 GHz) auf $0,45 \pm 0,01$ mT. In Raumtemperatur-Messungen von $\text{Ras} \cdot \text{Mn}^{2+} \cdot \text{GDP}$ Proben werden die Linien nochmals aufgespalten, wenn das normale Wasser in der Probe durch ^{17}O angereichertes Wasser ersetzt wird. Diese Aufspaltung resultiert aus der Superhyperfeinkopplung des Mn^{2+} mit dem Kernspin des ^{17}O ($I=5/2$) der Wassermoleküle in der ersten Koordinationssphäre des gebundenen Metallions. Da das eingesetzte Wasser nur zu einem bestimmten Teil (46,3 %) mit ^{17}O angereichert war, erhielt man Linien, die nur teilweise, abhängig von der Anzahl der gebundenen H_2^{17}O -Moleküle, verbreitert sind. Aus dem Verhältnis zwischen dem verbreiterten und nicht-verbreiterten Anteil der Linie lässt sich die Anzahl der an das Mn^{2+} -Ion gebundenen H_2^{17}O -Moleküle bestimmen. Bei Messungen im gefrorenen Zustand konnte dagegen nur eine Linienverbreiterung festgestellt werden, deren Auswertung zunächst zu keinem eindeutigen Ergebnis führte.

Die Simulation der Spektren erlaubt die Bestimmung der Anzahl der Wasserliganden des Mn^{2+} und somit indirekt, wieviele Bindungen das Metallion zum Protein-Nukleotidkomplex ausbildet. Weitere freie Parameter für die Simulation waren die Nullfeldtensor-Parameter D und E, die ^{17}O -Superhyperfeinkopplungskonstante, der Mischwinkel (Absorption/Dispersion) und die homogene Linienbreite (Lorentzlinie) (Reed & Markham, 1984).

Zunächst wurden die bei Raumtemperatur aufgenommenen Spektren von Ras(wt), zwei Schalter I-Mutanten und der onkogenen Mutante G12V unter Annahme einer ganzzahligen Anzahl an Wasserliganden simuliert. Im Gegensatz zu den Ergebnissen aus der Kristallstruktur (Milburn *et al.*, 1990; Tong *et al.*, 1991) stellte sich bei den Lösungsspektren heraus, dass bei den Raumtemperatur-Spektren im Fall des Ras(wt) die Resonanzlinien am besten simuliert werden können, wenn drei H_2^{17}O -Bindestellen für das Mn^{2+} angenommen werden. Das gleiche Ergebnis erhält man auch für die (T35S)Mutante, die sich gegenüber dem Wildtyp ausschließlich durch das Fehlen der hydrophoben Methylgruppe unterscheidet. Bei einer weiteren Mutante wurde dieses konservierte Thr35 in Ras durch ein Alanin ersetzt. Sie verfügt also im Vergleich zum Ras(wt) weder über die Methylgruppe noch über die Hydroxylgruppe, die in der Kristallstruktur des aktiven, Tri-

phosphat-gebundenen Zustands von Ras zum Mg^{2+} koordiniert ist. Das EPR-Spektrum dieser Mutante kann am besten simuliert werden, wenn man vier Bindestellen für H_2O annimmt. Vier gebundene Wassermoleküle liefern auch das beste Resultat für den GDP-Komplex der onkogenen Mutante Ras(G12V) (Tab 4.1). In Abb. 4.2. sind jeweils die $m_I = +1/2$ Linie, die beste Simulation und die jeweiligen Residuen zwischen experimentellen Spektren und den Simulationen mit einer jeweils unterschiedlichen Anzahl angenommener Wasserliganden dargestellt (Rohrer *et al.*, 2001).

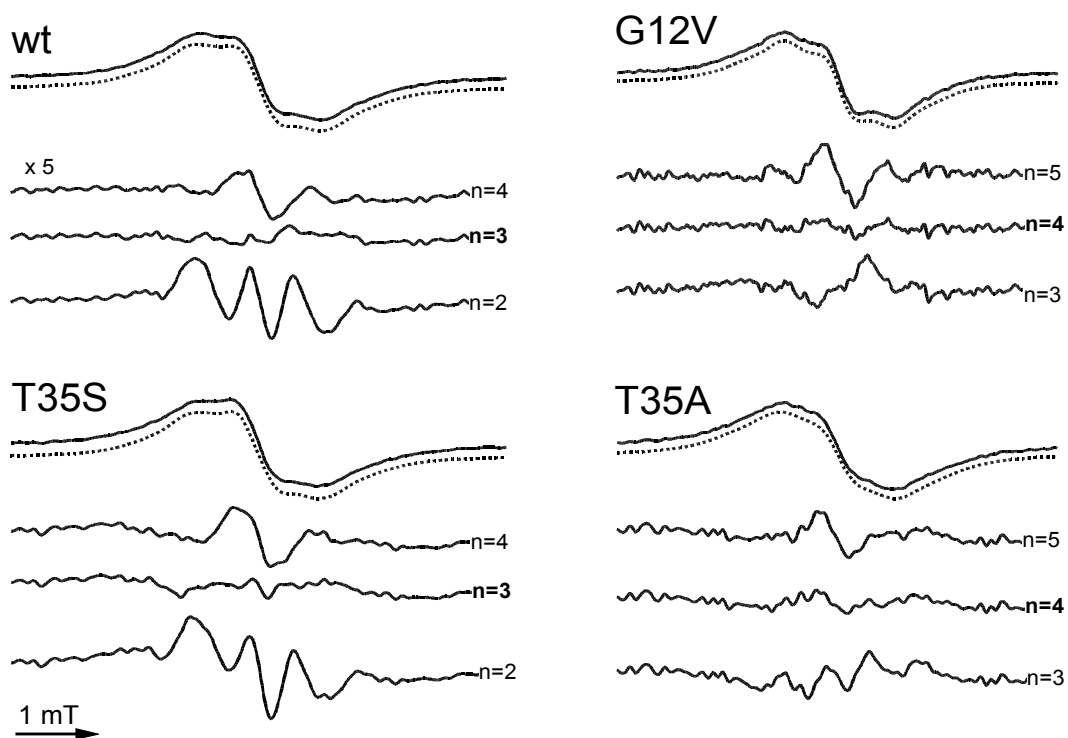


Abb. 4.2: Bestimmung der Anzahl der Wasserliganden des Mn^{2+} -Ions im $\text{Ras} \cdot \text{Mn}^{2+} \cdot \text{GDP}$ -Komplex in H_2^{17}O . Die experimentellen Daten wurden bei 297 K von 1 mM Proteinlösungen in Messpuffer A aufgenommen. Gezeigt sind jeweils die $m_I = +1/2$ Linie (durchgezogene Linie), die beste Simulation (gepunktete Linie) und die Residuen (x 5) zwischen den experimentellen Daten und den jeweiligen Simulationen unter Annahme einer unterschiedlichen Anzahl an Wasserliganden. Die jeweilige Mutation und die Anzahl der angenommenen Wasserliganden sind angegeben (Rohrer *et al.*, 2001).

4.1.2 ^{31}P -NMR-Untersuchungen an $\text{Ras} \cdot \text{Mg}^{2+} \cdot \text{GDP}$

Neben der Hochfeld-EPR stellt auch die ^{31}P -NMR-Spektroskopie eine geeignete und mehrfach genutzte Methode dar, um Untersuchungen am aktiven Zentrum von Guaninnukleotid-bindenden Proteinen in Lösung durchzuführen. Hier können

Unterschiede in der Umgebung der Phosphatgruppen, wie sie durch Konformationsänderungen hervorgerufen werden, dargestellt werden. Wie in den vorhergehenden EPR-Messungen wurden Ras(wt), die zwei Effektorschleifen-Mutanten Ras(T35S) und (T35A), sowie die onkogene Mutante Ras(G12V) im Komplex mit $\text{Mg}^{2+}\cdot\text{GDP}$ in Lösung bei unterschiedlichen Temperaturen untersucht. In den Messungen, die bei Raumtemperatur durchgeführt wurden, sind die Phosphatlinien des gebundenen Nukleotids schmal genug, um zum einen die $^2J_{\alpha\beta}$ -Kopplung zum jeweils anderen Phosphat deutlich zu erkennen, zum anderen kann bei den β -Phosphat-Linien je nach Ras-Variante die Überlagerung von mindestens zwei Linienpaaren beobachtet werden.

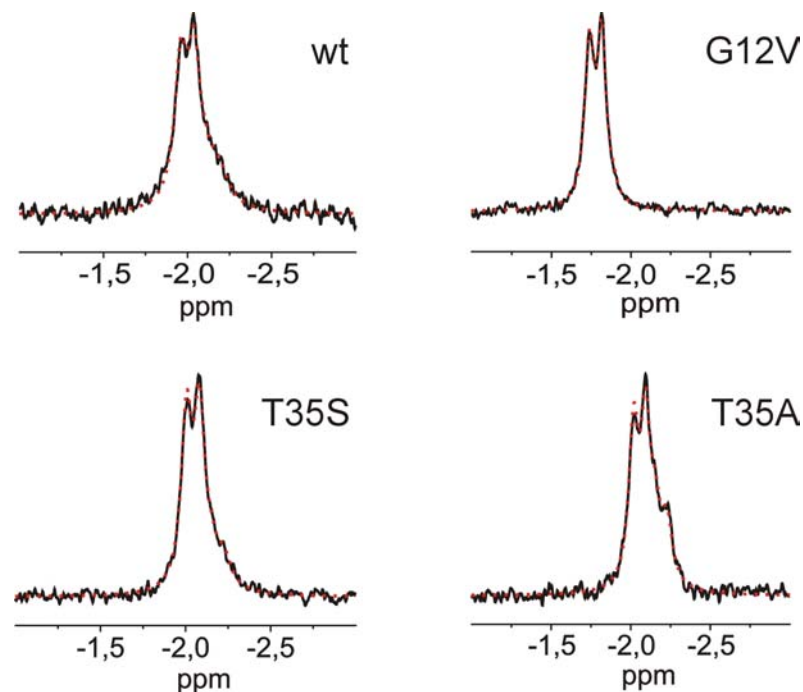


Abb. 4.3: ^{31}P -NMR-Spektren von Ras $\cdot\text{Mg}^{2+}\cdot\text{GDP}$. Dargestellt sind jeweils die experimentell bestimmte Resonanzlinie des β -Phosphats (schwarze, durchgezogene Linie) und die Simulation (rote, gepunktete Linie). Die Spektren wurden von 1 mM Proteinlösungen in Messpuffer B bei 298 K aufgenommen. Die Ras-Varianten sind den jeweiligen Spektren zugeordnet. Um ein besseres Signal-zu-Rausch-Verhältnis zu erhalten, sind die Daten exponentiell gefiltert. Dies führt zu einer zusätzlichen Linienverbreiterung von 2 Hz. Als gepunktete Linien sind die Umrisslinien der simulierten Spektren gezeigt, die durch Angleichen von zwei Paaren von Lorentzlinien an die experimentellen Daten erhalten wurden. Die dazugehörigen Parameter sind in Tab. 4.1 zusammengefasst.

In Abb. 4.3 sind die ^{31}P -NMR-Spektren der β -Phosphatlinien von Ras(wt), Ras(G12V) und zwei Thr35-Mutanten, überlagert mit der Umrisslinie der angeglichenen Lorentzfunktionen, dargestellt. In Tab. 4.1 sind die Werte der jeweiligen

chemischen Verschiebungen und der Gleichgewichtskonstanten zwischen den zwei angenommenen Zuständen zusammengestellt. Das ^{31}P -NMR-Spektrum von Ras(T35A)•Mg $^{2+}$ •GDP zeigt bei 298 K in der β -Resonanzlinie neben der Aufspaltung, die durch die $^2J_{\alpha\beta}$ -Kopplung zum α -Phosphat verursacht wird, deutlich das Vorhandensein einer zweiten Resonanzlinie, die um 0,14 ppm zu einer niedrigeren Frequenz verschoben ist. Für Ras(wt)•GDP und Ras(T35S)•GDP werden ebenfalls überlagerte Resonanzlinien für das β -Phosphat erhalten, jedoch sind hier die Populationen der zweiten Konformation deutlich weniger besetzt. Durch Anpassung von zwei Lorentzlinienpaaren (Berücksichtigung einer Aufspaltung durch die $^2J_{\alpha\beta}$ -Kopplung von 15,93 Hz) an die β -Phosphatlinien konnten die chemischen Verschiebungen und die Gleichgewichtskonstanten $K_{12}=[2]/[1]$ ermittelt werden. Für Ras(T35A) erhält man im Rahmen der Fehlergenauigkeit, die hier wahrscheinlich mit einem Fehler von etwa 10 % anzusetzen ist, eine Gleichgewichtskonstante zwischen den beiden Zuständen von $K_{12}= 0,49$. Ras(wt) und Ras(T35S) zeigen ebenfalls das Vorhandensein einer zweiten Konformation, wobei hier der zweite Zustand, der durch die zu niedrigerer Frequenz verschobene Linie repräsentiert wird, deutlich weniger besetzt ist. Ohne Berücksichtigung des Fehlers, der dadurch begründet ist, dass die Linien nicht deutlich voneinander getrennt sind, erhält man für Ras(wt) mit 0,31 bzw. 0,21 für die T35S-Mutante ähnliche Werte für die Gleichgewichtskonstanten zwischen den beiden Populationen. Die Untersuchung der onkogenen Mutante Ras(G12V) zeigte dagegen unter denselben Messbedingungen keine derartige Aufspaltung der β -Phosphatlinie. Unter Berücksichtigung des Rauschens kann man abschätzen, dass hier die Gleichgewichtskonstante kleiner 0,04 sein muss. Im Vergleich zum Wildtyp und den beiden Thr-Mutanten, die durch ähnliche Werte in den chemischen Verschiebungen charakterisiert werden, zeigt die onkogene G12V-Mutante in der chemischen Verschiebung der α - und besonders der β -Resonanzlinie deutlich abweichende Werte (Tab. 4.1). Dies deutet darauf hin, dass sich diese Mutante von den anderen Ras-Varianten durch eine andere chemische Umgebung der Phosphatgruppen unterscheidet. Diese Ergebnisse aus der NMR-Spektroskopie, die ebenso wie die EPR-Messungen Auskunft über Veränderungen im katalytischen Zentrum des Ras-Proteins geben, korrelieren deutlich miteinander. In beiden Fällen erhält man für Ras(wt) und die Serin-Mutante ähnliche Resultate, während die T35A-Mutante, sowie auch die G12V-Mutante sich deutlich vom Wildtyp-Spektrum unterscheiden.

Tab. 4.1: Zusammenfassung der Ergebnisse aus den ^{31}P -NMR- und EPR-Experimenten an Ras•GDP-Komplexen. Die aus der Simulation der EPR-Spektren erhaltene Anzahl (n) der an das Mn^{2+} gebundenen H_2O - Moleküle, sowie die Werte der chemischen Verschiebungen aus der ^{31}P -NMR-Spektroskopie und die Gleichgewichtskonstanten zwischen den beiden Zuständen $K_{12}=[2]/[1]$ sind angegeben. Die NMR-Messungen wurden an 1 mM Ras•GDP in Messpuffer B bei 298 K durchgeführt. Die Werte der chemischen Verschiebung und die Gleichgewichtskonstanten wurden durch Anpassung von Lorentzlinien-Paaren bestimmt. Durch die Überlagerung der Resonanzlinien müssen bei den chemischen Verschiebungen mit $\pm 0,3$ ppm und bei den Gleichgewichtskonstanten mit $\pm 0,05$ vergleichsweise große Fehler berücksichtigt werden.

Protein	H_2O	α -Phosphat	β -Phosphat		K_{12}
	n	δ/ppm	δ_1/ppm	δ_2/ppm	
Ras(wt)• Mn^{2+} •GDP	3	-10,68	-2,00	-2,15	0,31
Ras(T35S)• Mn^{2+} •GDP	3	-10,71	-2,04	-2,19	0,21
Ras(T35A)• Mn^{2+} •GDP	4	-10,70	-2,06	-2,19	0,49
Ras(G12V)• Mn^{2+} •GDP	4	-10,60	-1,78	--	<0,04

4.1.3 Analyse der Ras•GDP-EPR-Spektren unter Annahme einer inhomogenen Ligandensphäre des gebundenen Metallions

Auf Grund der Ergebnisse der ^{31}P -NMR-Untersuchungen an Ras• Mg^{2+} •GDP, die insbesondere für den Fall der T35A-Mutante das Vorhandensein von zwei Zuständen aufweisen, wurde das Simulationsprogramm zur Auswertung der H_2^{17}O -Spektren der EPR-Untersuchungen insofern erweitert, dass auch Mischungen zweier benachbarter Anzahlen an Wasserliganden zum Mn^{2+} -Ion zugelassen werden können. Abb. 4.4A zeigt eine Mn^{2+} -Hyperfein-Linie der experimentellen Daten von Ras(T35A)• Mn^{2+} •GDP in H_2^{17}O (durchgezogene Linie), die beste Simulation (gepunktete Linie) und die Residuen zwischen experimentellen und simulierten Daten für die Annahme von 3, 4 oder das Verhältnis zwischen 3 und 4 Wasserliganden. Das Verhältnis ging dabei als freier Parameter in die Simulation ein. Die Nullfeldtensor-Parameter D, E und die Mn^{2+} -Phosphat-Kopplung wurden aus der Simulation der gleichen Proteinprobe in H_2^{16}O entnommen und für alle drei Simulationen konstant gehalten. Damit sollte weitgehend verhindert werden, dass die Unterschiede, die man durch die Variation der Anzahl gebundener Wasserliganden erhält, durch andere Parameter kompensiert werden. Es wird

deutlich, dass die Simulation mit dem freien Parameter für die Anzahl an Wasserliganden gegenüber der mit 4 angenommenen Wasserliganden ein kleineres Residuum liefert. Als gemittelte Anzahl werden bei Ras(T35A) 3,8 gebundene Wassermoleküle erhalten. In Abb. 4.4B ist die Resonanzlinie des β -Phosphats aus dem ^{31}P -NMR-Spektrum der gleichen Mutante im Komplex mit $\text{Mg}^{2+}\cdot\text{GDP}$ gezeigt (durchgezogene Linie). Als gestrichelte Linien sind zwei Paare von Lorentzlinien (Berücksichtigung der $^2J_{\alpha\beta}$ -Kopplung) und die resultierende Umrisslinie dargestellt, die dem experimentellen Spektrum angepasst wurden. Hieraus erhält man zwei Konformationen, die in ihrer Population ein Verhältnis von etwa 2:1 ergeben. Dies ist zwar nicht identisch, aber doch sehr ähnlich zu dem Verhältnis von 4:1 das man aus der Simulation des EPR-Spektrums erhält. Analog erhält man bei der Auswertung der EPR-Spektren für Ras(wt) $\cdot\text{GDP}$ 3,03 bzw. 3,06 gebundene Wassermoleküle für die Serin-Mutante. Das entspricht tendenziell den Ergebnissen der ^{31}P -NMR-Experimente. Beide resonanzspektroskopischen Messmethoden zeigen für Ras in Lösung wahrscheinlich die gleichen Konformationsunterschiede an.

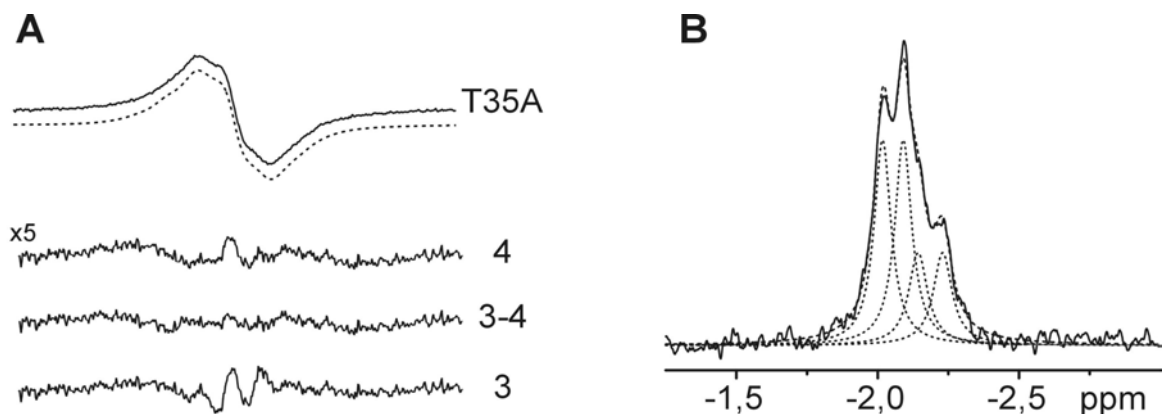


Abb. 4.4: HF-EPR und ^{31}P -NMR-Spektren von Ras(T35A)•GDP bei RT. (A) Experimentell bestimmte Mn^{2+} -Hyperfeinlinie von Ras(T35A)• Mn^{2+} •GDP (durchgezogene Linie) in H_2^{17}O (46,3 %) und die beste Simulation (unterbrochene Linie). Darunter sind die Residuen (x5) zwischen experimentellen Daten und den Simulationen dargestellt die unter Annahme einer unterschiedlichen Anzahl an Wasserliganden (3, 4 oder eine Mischung) berechnet wurden. (B) ^{31}P -NMR-Spektrum von Ras(T35A)• Mg^{2+} •GDP in H_2^{16}O . Gezeigt sind die β -Resonanzlinie (durchgezogene Linie), die Anpassung durch zwei Paare von Lorentzlinien und die daraus resultierende Umriss-Linie (unterbrochene Linien).

4.2 Untersuchungen an verschiedenen Ras•GppNHp-Komplexen

4.2.1 ³¹P-NMR Untersuchungen an Ras(wt)•GppNHp

Von Geyer *et al.* (1996) konnte mit Hilfe von ³¹P-NMR-Spektroskopie gezeigt werden, dass Ras(wt) im Komplex mit dem nicht oder nur sehr langsam durch Ras hydrolysierbaren GTP-Analogon GppNHp in zwei Konformationen existiert, die als Zustand 1 und Zustand 2 bezeichnet wurden. Dabei wurde die Konformation, die das zu niedrigerer Frequenz verschobene Signal liefert als Zustand 2 definiert. Die beiden Konformationen befinden sich im Austausch miteinander, mit Austauschraten, die bei Raumtemperatur in der Größenordnung von 1000 Hz liegen. Dieses Verhalten konnte für Ras(wt) unter den in dieser Arbeit verwendeten Präparations- und Messbedingungen reproduziert werden. So zeigt das ³¹P-NMR-Spektrum von Ras(wt)•GppNHp bei tiefen Temperaturen die asymmetrische α -Phosphatlinie, die aus der Überlagerung zweier Resonanzlinien resultiert und die deutlich aufgespaltene β -Resonanzlinie (Abb. 4.5). Bei der schrittweisen Erhöhung der Temperatur werden die Linien zunächst breiter, ohne dass sich das Verhältnis der beiden Populationen zueinander zu verändern scheint. Bei noch höheren Temperaturen verschmelzen beide Resonanzlinien schließlich zu einer Linie, deren chemische Verschiebung im gewichteten Mittel zwischen den Werten der beiden Ausgangslinien zum liegen kommt. Durch anschließendes Abkühlen der Probe wird die Resonanzlinie wiederum aufgespalten und man erhält ein Spektrum, das dem Ausgangsspektrum entspricht und somit auf einen reversiblen Prozess hindeutet. Das Protein ist über diesen Temperaturbereich korrekt gefaltet und stabil. Dieses Verhalten ist typisch für zwei Konformationen, die sich bei niedrigen Temperaturen in einem -bezogen auf die Zeitskala des NMR-Experiments- langsamen chemischen Austausch befinden, so dass man hier mindestens zwei Zustände aufgelöst findet, welche bei steigender Temperatur in einen schnellen chemischen Austausch übergehen, so dass nur noch die Mittelung zwischen den Zuständen detektiert und als schmale Resonanzlinie beobachtet werden kann.

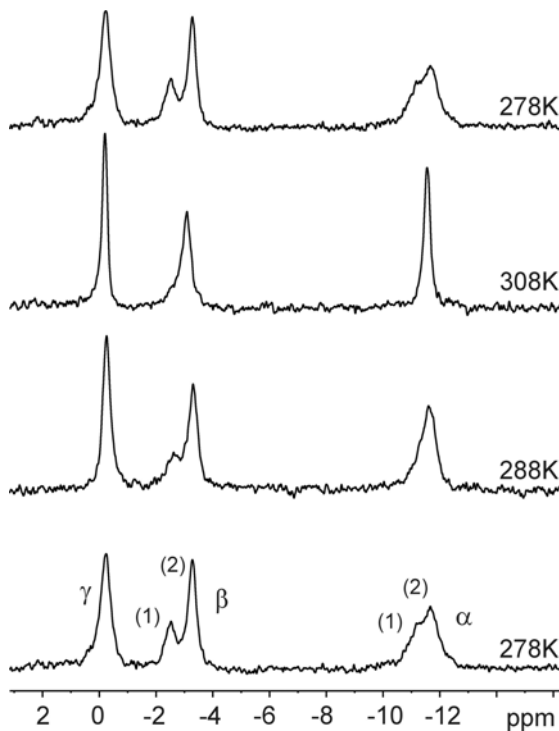


Abb. 4.5: ^{31}P -NMR-Spektren von Ras(wt) im Komplex mit Mg^{2+} -GppNHp bei unterschiedlichen Temperaturen. Eine 1 mM Lösung von Ras(wt)•GppNHp in Messpuffer B wurde bei unterschiedlichen Temperaturen gemessen. Die Spektren sind in der Reihenfolge der durchgeführten Messungen von unten nach oben angeordnet. Die Resonanzlinien sind dem α -, β - und γ -Phosphat zugeordnet. Die beiden Zustände sowie die jeweiligen Messtemperaturen sind angegeben. Die effektiven Temperaturen wurden über einen externen Standard kontrolliert, wie in 3.3.1.1 beschrieben. Die Spektren sind exponentiell gefiltert. Dies führt zu einer zusätzlichen Linienverbreiterung von 8 Hz.

4.2.2 ^{31}P -NMR-Spektroskopie an Thr35-Mutanten im Komplex mit GppNHp

Bei Ras(T35S) bzw. Ras(T35A) handelt es sich um zwei *partial loss-of-function*-Mutanten. Das sind Mutanten, die *in vivo* einen teilweisen Verlust ihrer Funktionen aufweisen und deswegen häufig für Untersuchungen einzelner Signalwege verwendet werden. So wird durch Ras(T35S) zwar noch der Signalweg über die Raf-Kinase angeschaltet, aber nicht mehr die Signalwege über RalGDS.

Wie in Abb. 4.6 zu sehen ist, zeigen die ^{31}P -NMR-Spektren beider Thr-Mutanten im GppNHp-gebundenen Komplex im Gegensatz zum Wildtyp nur jeweils eine Resonanzlinie für jedes Phosphat. Die jeweiligen Phosphatlinien dieser beiden Mutanten weisen gleiche chemische Verschiebungen auf. Im Vergleich zum Wildtyp-Spektrum stimmen diese chemischen Verschiebungen mit denen des Zustands 1 des Wildtyps überein (Tab. 4.2). Es wurden auch drei weitere Ras-Mutanten untersucht, bei denen die Aminosäuren der „Angelstellen“ der Schalter I-Region zu Glycinen ausgetauscht wurden. Für diese Mutanten, Ras(V29G), Ras(I36G) und die Doppelmutante (V29G/I36G) wird eine erhöhte Dynamik der Effektor-Schleife postuliert (Kuppens *et al.*, 1999). Sie zeigten für die β -Resonanzlinie im ^{31}P -NMR-Spektrum ebenfalls eine deutliche Verschiebung des Gleichgewichts zum Zustand

1 hin, was sich in einer asymmetrischen Resonanzlinie des β -Phosphats widerspiegelte. Im Fall der Doppelmutante erhält man -wie auch für die Threonin-Mutanten- nur eine schmale Resonanzlinie mit einer chemischen Verschiebung, die ebenfalls dem Zustand 1 des Wildtyps entspricht (Abb. 4.6). Dies deutet darauf hin, dass es sich im Fall des Zustands 1 weniger um eine stabile Konformation, als vielmehr um die resultierende Resonanzlinie handeln könnte, die man bei einem -relativ zur NMR-Zeitskala- schnellen Austausch einer sehr beweglichen Schalter I-Region erhalten würde.

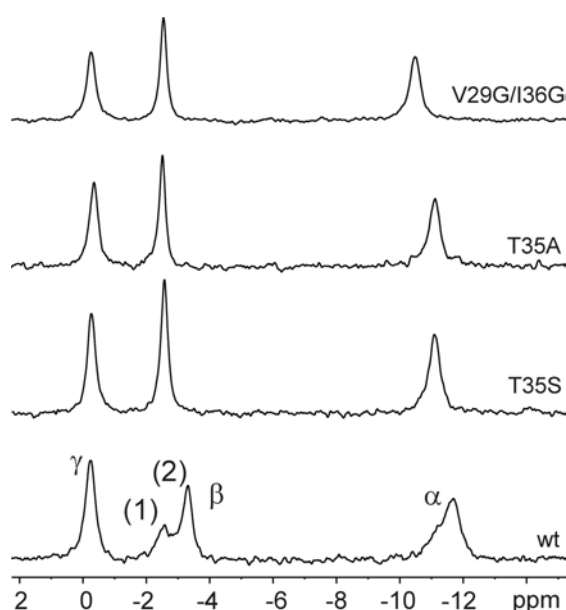


Abb. 4.6: ^{31}P -NMR-Spektren von Ras(wt) und verschiedenen Schalter I-Mutanten im Komplex mit Mg^{2+} •GppNHp. Die Spektren wurden von 1 mM Ras•GppNHp in Messpuffer B bei 278 K aufgenommen. Die Mutationen sind den jeweiligen Spektren zugeordnet. Die drei Mutanten zeigen nur je eine Resonanzlinie für das α -, β - bzw. γ -Phosphat mit Verschiebungswerten, die für den Zustand 1 von Ras(wt) charakteristisch sind. Die genauen Werte der chemischen Verschiebung sind in Tab. 4.2 zusammengefasst. Die Spektren sind exponentiell gefiltert. Dies führt zu einer zusätzlichen Linienverbreiterung von 15 Hz.

Tab. 4.2: ^{31}P -NMR-Untersuchungen an Ras(wt)•GppNHp und Schalter I-Mutanten. Die Werte der chemischen Verschiebung von Ras(wt) und der Schalter I-Mutanten in der GppNHp-gebundenen Form sind angegeben. Die Messungen wurden bei 278 K in Messpuffer B durchgeführt. Die Gleichgewichtskonstante K_{12} ist definiert als Quotient der beiden Populationen der Zustände 1 und 2 mit $K_{12}=[2]/[1]$. Für die Mutanten wurde für K_{12} unter Berücksichtigung des Signal-zu-Rausch Verhältnisses eine obere Grenze angegeben.

Ras•GppNHp	α -Phosphat		β -Phosphat		γ -Phosphat	K_{12}
	δ_1/ppm	δ_2/ppm	δ_1/ppm	δ_2/ppm	$\delta_{1,2}/\text{ppm}$	
Ras(wt)	-11,20	-11,70	-2,59	-3,32	-0,25	1,9
Ras(T35S)	-11,13		-2,57		-0,26	<0,05
Ras(T35A)	-11,10		-2,50		-0,34	<0,05
Ras(V29G/I36G)	-10,49		-2,54		-0,26	<0,05

4.2.3 Spin-Gitter-Relaxation der Phosphate im Ras-Nukleotid-Komplex

Für einen Kern in einer bestimmten chemischen Umgebung wird die Spin-Gitter-Relaxation -auch longitudinale Relaxation genannt- durch die Zeitkonstante T_1 charakterisiert und hängt von der Koordination des angeregten Kerns, der Temperatur, sowie weiteren Parametern wie dem pH und der Ionenstärke ab. In den folgenden Experimenten wurden die longitudinalen Relaxationszeiten der einzelnen Phosphate des Protein-gebundenen Nukleotids unter den in dieser Arbeit verwendeten Messbedingungen bestimmt. Ras(wt) und die Mutante Ras(T35A) wurden im GppNHp-gebundenen Zustand untersucht, um Hinweise auf eventuelle Unterschiede in der Koordination der Phosphatgruppen im Proteinkomplex zu erhalten. Dazu wurde die „*inversion recovery*“-Methode angewandt. Hier erfährt das zu untersuchende Spinsystem zunächst einen 180° -Puls, der die $+M_z$ Magnetisierung zunächst in die $-z$ -Richtung klappt. Anschließend wird das Spinsystem über unterschiedlich lange Zeitintervalle τ (hier $\tau = 3 \mu\text{s} \dots 20 \text{ s}$) sich selbst überlassen, in denen es die Möglichkeit hat sich dem Boltzmann-Gleichgewicht anzunähern. Nach einem weiteren 90° -Impuls kann man dann die Magnetisierung in Abhängigkeit der unterschiedlich langen Zeitintervalle $M_z(\tau)$ in eine transversale Magnetisierung umwandeln und erhält so ein NMR-Signal, das proportional zu $M_z(\tau)$ ist. Die auf diese Weise erhaltenen Signalintensitäten können über der Zeit τ aufgetragen werden und den Werten eine einfach-exponentielle Funktion angepasst werden. Der Nulldurchgang $M_z(\tau)=0$ entspricht dann $0,69 \cdot T_1$.

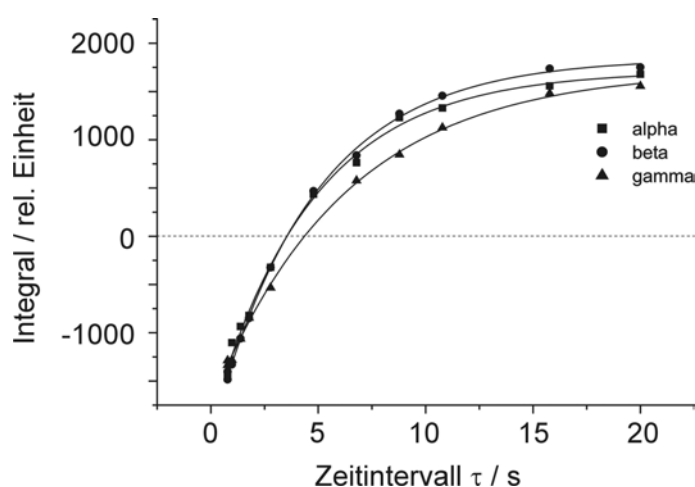


Abb. 4.7: T_1 -Relaxation der Phosphate im Ras(T35A)•GppNHp-Komplex. Die Messungen wurden bei 278 K in Messpuffer C durchgeführt. Die Integrale der Resonanzlinien wurden durch Angleichung von Lorentzlinien bestimmt, über dem jeweils eingesetzten Zeitintervall τ aufgetragen und eine einfach exponentielle Funktion angepasst. Die erhaltenen Werte sind in Tab. 4.3 zusammengefasst.

Abb. 4.7 zeigt, dass sich bei Ras(T35A) die einzelnen Phosphate etwas in ihren T_1 -Zeiten unterscheiden. So erhält man bei dieser Mutante für das α - und β -Phosphat T_1 -Zeiten von jeweils 5,1 s und 6,3 s für das γ -Phosphat.

Unter gleichen Mess-Bedingungen wurden für das Wildtyp-Protein ähnliche Relaxationszeiten erhalten. Ras(wt)•GppNHp befindet sich jedoch gemäß den ^{31}P -NMR-Spektren zu 60 – 70 % in einer anderen Konformation als die Mutante. Da die Zeitintervalle τ zwischen 180° und 90° -Impuls, mit bis zu 20 s deutlich länger sind, als die Austauschraten zwischen den beiden konformationellen Zuständen, die bei einer Messtemperatur von 278 K bei $k_1 = 130$ Hz liegen, sollte es nicht möglich sein Unterschiede zwischen den einzelnen Zuständen eines Phosphats zu erhalten. Deshalb wurden bei der Auswertung die Integrale der Resonanzlinien, die einem Phosphat zugeordnet wurden, addiert und über dem Zeitintervall τ aufgetragen. Die erhaltenen T_1 -Zeiten für das α - und β -Phosphat sind auch beim Wildtyp gleich und sind mit 5,6 s etwas länger als bei der Mutante, während die longitudinale Relaxationszeit des γ -Phosphats des Wildtyps mit 5,8 s etwas kürzer ist und nahe bei den Zeiten für die anderen beiden Phosphatgruppen liegt. Dies könnte durch die zusätzliche Bindung durch das Thr35 im höher besetzten Zustand bewirkt werden.

Tab. 4.3: T_1 -Relaxationszeiten von Ras(wt) und Ras(T35A). Die Messungen wurden an 1,5 mM Ras•GppNHp in Messpuffer C bei 278 K durchgeführt. Die Integrale der Phosphatlinien wurden durch Anpassen von Lorentzlinien bestimmt. Die jeweiligen Integrale wurden über dem Zeitintervall τ aufgetragen und einfach-exponentielle Funktionen angepasst. Es ist der Fehler der Anpassung der einfach-exponentiellen Funktion angegeben.

Ras-Protein	α -Phosphat T_1	β -Phosphat T_1	γ -Phosphat T_1
(wt)•GppNHp	$5,64 \pm 0,4$ s	$5,62 \pm 0,4$ s	$5,77 \pm 0,4$ s
(T35A)•GppNHp	$5,13 \pm 0,2$ s	$5,13 \pm 0,1$ s	$6,32 \pm 0,2$ s

4.2.4 Kristallstruktur von Ras(T35S)•GppNHp

In einer Zusammenarbeit wurde von I. R. Vetter (Dortmund) die Kristallstruktur von Ras(T35S)•GppNHp gelöst (Spoerner *et al.*, 2001). Abb. 4.8A zeigt eine Überlagerung der Strukturen von Ras(wt) (Pai *et al.*, 1990) und Ras(T35S) in der Mg^{2+} •GppNHp gebundenen Form. In der Struktur des ganzen Proteinmoleküls unterscheidet sich die Mutante kaum von der des Wildtyps. Jedoch sind in der Struktur der Mutante im Gegensatz zur Struktur von Ras(wt) beide Schalterbereiche Schalter I und Schalter II nicht sichtbar. Bei den Proteinen dieser Mutante liegen im Kristall beide Schalterbereiche ungeordnet vor. Sie weisen also entwe-

der eine hohe Dynamik auf oder liegen parallel in mehreren unterschiedlichen Konformationen vor. Dadurch werden in diesen Regionen des Proteins keine Elektronendichten erhalten. Abb. 4.8B zeigt den Bereich des Schalters I der (T35S)-Mutante, in die die Effektorschleife (Tyr32-Glu37) aus der Ras(wt)-Struktur (Pai *et al.*, 1990) modelliert wurde.

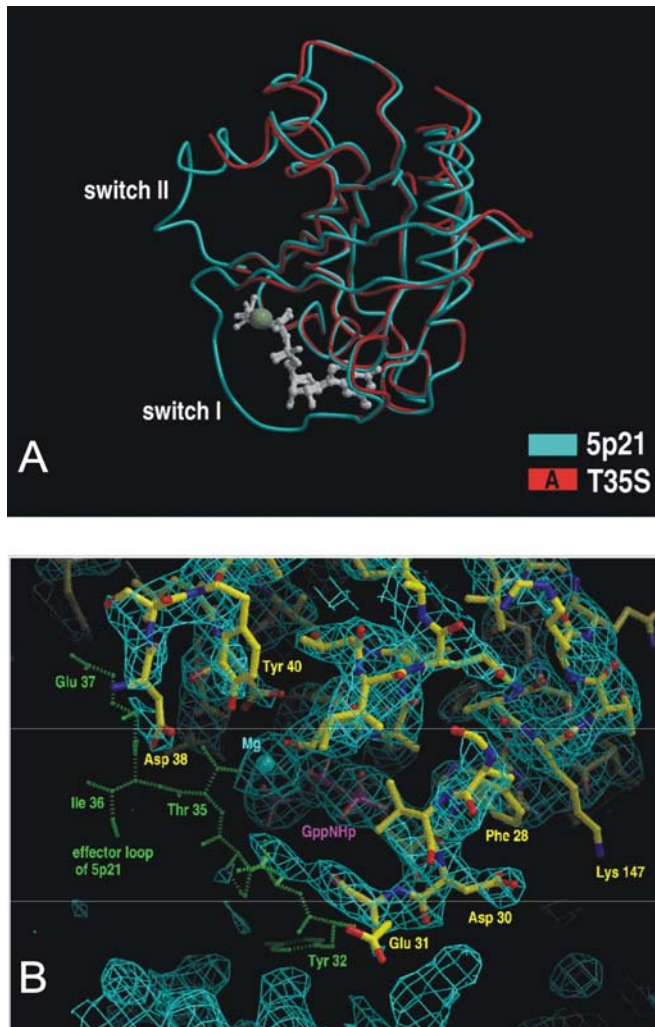


Abb. 4.8: Kristallstrukturanalyse von Ras(T35S). (A) Überlagerung der Kristallstrukturen von Ras(T35S) im Komplex mit Mg²⁺•GppNHp (Spoerner *et al.*, 2001, PDB 1qra, Molekül A; rot) und Ras(wt)•Mg²⁺•GppNHp (Pai *et al.*, 1990, PDB 5p21; blau). Die Schalter I und II-Regionen sind angegeben (switch I und switch II). Beide Regionen sind in der Struktur der Mutante nicht sichtbar. (B) Fokus auf die Schalter I-Region von Ras(T35S) zusammen mit der Effektorschleife (Tyr32-Glu37), wie man sie in der Struktur von Ras-Wildtyp (Pai *et al.*, 1990) findet.

4.2.5 MAS-³¹P-NMR-Spektroskopie an Ras-Kristallpulver

Um die Frage zu klären, ob Ras(wt)•GppNHp auch im Kristall in unterschiedlichen Konformationen vorliegt, wie man sie im ³¹P-NMR-Spektrum in Lösung findet, wurden in Kooperation mit E. Brunner (Regensburg) ³¹P-MAS-Festkörper-NMR-Untersuchungen (MAS: *magic angle spinning*; Andrew *et al.*, 1958) an Ras-Kristallpulvern durchgeführt. Für die Kristallherstellung wurde die verkürzte Form

von H-Ras (AS 1-166) verwendet. Es wurde gezeigt, dass der C-Terminus von Ras allein für die Lokalisierung in der Plasmamembran notwendig ist und die C-terminal verkürzte Variante (AS 1-166) für die biochemischen Eigenschaften des Proteins hinreichend ist (John *et al.*, 1989). Das in Lösung aufgenommene ^{31}P -NMR-Spektrum der verkürzten Form von Ras(wt) unterscheidet sich von dem des 189 Aminosäuren umfassenden Proteins nur innerhalb der Fehler, die bei der Anpassung der Resonanzlinien durch Lorentzlinien angegeben werden.

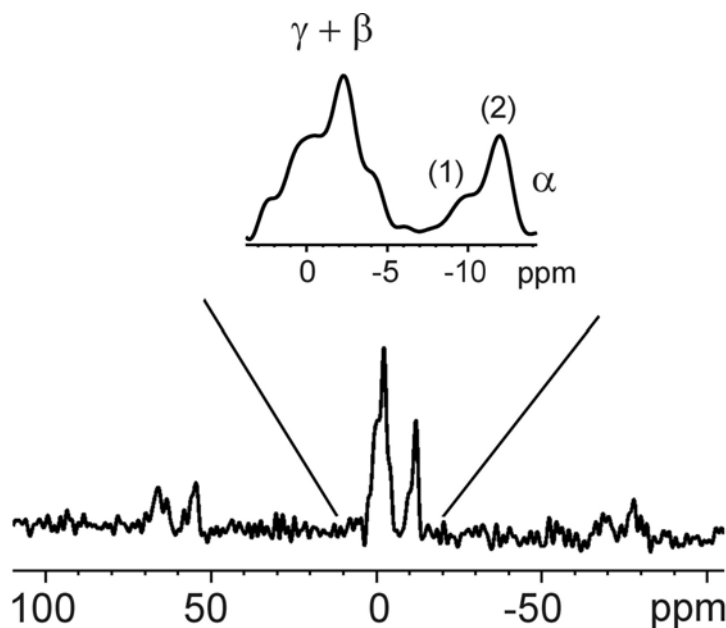


Abb. 4.9: ^{31}P -MAS-NMR-Spektrum von Ras(wt)•GppNHp-Kristallpulver. Die Messungen wurden an einem Bruker DRX-750 Spektrometer, welches bei einer ^{31}P -Resonanzfrequenz von 303,606 MHz arbeitet, in Kooperation mit E. Brunner bei 278 K aufgenommen. Es wurden 4096 Signale bei einer Probenrotationsfrequenz von 20,15 kHz akkumuliert. Dabei wurden Wiederholungszeiten von 30 s verwendet, um Sättigung zu vermeiden. Die Herstellung der Kristalle ist in 3.2.6 beschrieben. Das Spektrum zeigt, dass Ras(wt)•GppNHp (AS 1-166) auch im Kristall in mindestens zwei Zuständen vorliegt.

Aus den an Kristallpulvern durchgeführten ^{31}P -MAS-Experimenten wird deutlich dass Ras(wt)•GppNHp (Abb. 4.9) sowohl im Kristall, wie auch in Lösung, in mindestens zwei verschiedenen Konformationen vorliegen muss, da das jeweilige Signal eines Phosphats deutlich in zwei Resonanzlinien aufgespalten ist. Im Gegensatz zu den Messungen in Lösung, scheint hier auch die Resonanzlinie des γ -Phosphats aufgespalten zu sein. Die Resonanzlinien lassen sich unter der Annahme von zwei Zuständen mit einer Gleichgewichtskonstanten $K_{12}=[2]/[1]$ von 2 gut durch Lorentzlinien beschreiben und zeigen ein ähnliches Verhältnis, wie man es bei diesem Protein in Lösung findet.

Bei vorläufigen Untersuchungen an Kristallen der Ras(T35S)-Mutante in der GppNHp-gebundenen Form waren dagegen die Signale des β - und γ -Phosphats nicht sichtbar. Dies könnte durch eine starke Verbreiterung als Folge eines chemischen Austauschs verursacht werden und somit auf eine relativ zur NMR-Zeitskala mittelschnelle Dynamik im Bereich dieser Phosphatgruppen hindeuten. Das Signal des α -Phosphats ist bei einer ^{31}P -Resonanzfrequenz von 202 MHz, wie auch im Spektrum dieser Mutante in Lösung, nicht aufgespalten.

4.2.6 DSC-Untersuchungen an Ras•GppNHp

Ras(wt)•GppNHp und die beiden Thr35-Mutanten wurden mittels DSC (*differential scanning calorimetry*) auf ihre thermische Stabilität hin untersucht. Bei dieser Methode werden Proteinlösungen mit konstanter Rate erwärmt und die Änderungen der Wärmekapazität, die durch Veränderungen in der Struktur der Proteine bewirkt werden, z. B. durch das Lösen von Bindungen, aufgezeichnet. Bei höheren Temperaturen überlagern sich bei Nukleotid-bindenden Proteinen jedoch die Effekte, die durch das Aufschmelzen der Protein-Struktur entstehen mit den Wärmeänderungen, die durch die Präzipitation des Proteins verursacht werden. Durch die Dissoziation des Nukleotids werden die Proteine instabil und aggregieren. Deshalb war eine quantitative Auswertung dieses Experiments nicht möglich. Jedoch war die Tendenz deutlich zu erkennen, dass Ras(wt) im Vergleich zu den Thr-Mutanten erst bei höherer Temperatur beginnt sich zu entfalten und die Präzipitation ebenfalls erst bei einer etwas höheren Temperatur eintritt. Nur leichte Unterschiede fand man dagegen zwischen den beiden Ras-Mutanten T35S und T35A. Die Serin-Mutante schien etwas stabiler als die Alanin-Mutante zu sein. Unterschiede in der Stabilität zwischen dem Wildtyp-Protein und diesen beiden Mutanten liegen in der Koordination des Mg^{2+} -Ions bzw. des Nukleotids. Im Folgenden wurde deshalb die Affinität des Metallions und die Nukleotid-Dissoziation bei Ras(wt) und den beiden Mutanten genauer untersucht.

4.2.7 Bestimmung der Mg^{2+} -Affinität zum Ras-Nukleotidkomplex

In der Kristallstruktur findet man im aktiven Zustand die Hydroxylgruppe des konservierten Thr35 an das Mg^{2+} -gebunden. In Lösung scheint diese Bindung aber eher transient (Bellew *et al.*, 1996, Halkides *et al.*, 1996). Um Unterschiede bezüglich der Mg^{2+} -Bindung von Ras(wt), (T35S) und der Alanin-Mutante Ras(T35A)

zu untersuchen, wurde die Dissoziation von mant-GppNHp in Abhängigkeit der freien Magnesiumkonzentration bestimmt. In Abb. 4.10 sind die experimentellen Daten von Ras(wt)•GppNHp und die Anpassung einer hyperbolischen Funktion exemplarisch dargestellt.

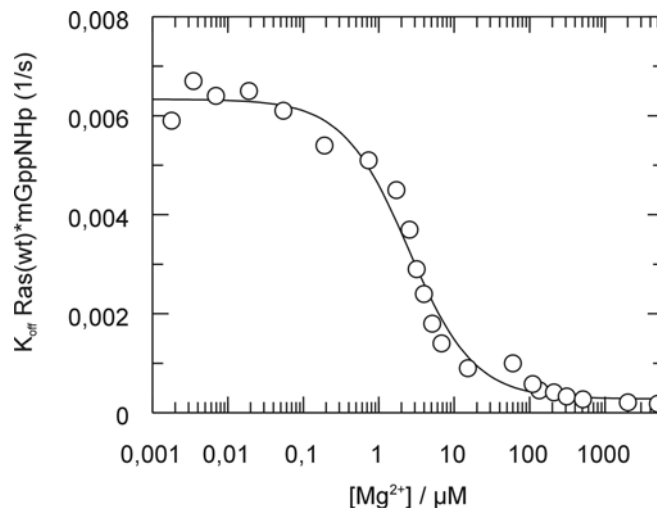


Abb. 4.10: Bestimmung der Mg²⁺-Affinität zu Ras(wt). Zu einer 0,5 μM Ras•mGppNHp-Lösung wurde bei 298 K ein 200facher Überschuss Ras•GppNHp gegeben. Die Konzentration des freien Mg²⁺ wurde mittels eines Gleichgewichts zum Komplexbildner EDTA (10 mM) und einem angenommenen K_D-Wert von 1,7 μM bei pH 7,5 (Reinstein *et al.*, 1991) eingestellt. Die ermittelten K_{diss}-Werte wurden über dem Logarithmus der Mg²⁺-Konzentration aufgetragen, eine hyperbolische Funktion angepasst und daraus der K_D bestimmt (John *et al.*, 1993).

Beide Thr35-Mutanten weisen 3-4fach niedrigere Affinitäten zum Mg²⁺-Ion auf als der Wildtyp. Für Ras(wt)•mGDP wird ebenfalls eine ähnliche Affinität zum Metallion erhalten (Tab. 4.4).

In der beobachteten Dissoziationsrate des mGppNHp von Ras bei Mg²⁺-Sättigung unterscheiden sich die Thr-Mutanten etwa um den Faktor 1,3. Für Ras(wt) findet man unter gleichen Bedingungen eine beobachtete Rate die etwa um den Faktor 2 bzw. 3,5 niedriger liegt als bei Ras(T35S) bzw. (T35A). Die Ergebnisse dieser Experimente sind in Tab. 4.4 zusammengefasst.

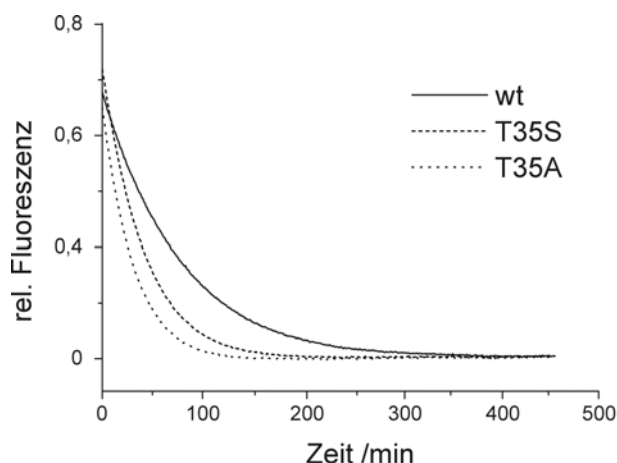


Abb. 4.11: Dissoziation von mGppNHp und Ras-Varianten unter Mg^{2+} -Sättigung. Zu $0,5 \mu M$ Ras•mGppNHp in Messpuffer C wurden $200 \mu M$ GppNHp gegeben. Die Messung wurde bei $298 K$ durchgeführt. Die beobachtete Dissoziationsrate zwischen Ras und mGppNHp wurde durch Anpassung einfach-exponentieller Funktionen an die Fluoreszenz-Änderung bestimmt.

Tab. 4.4: Affinität von Mg^{2+} zu verschiedenen Ras•GppNHp-Komplexen. Die Affinität des Mg^{2+} -Ions an die verschiedenen Ras-Nukleotidkomplexe wurde in $40 mM$ HEPES/NaOH pH 7,5/ $150 mM$ NaCl/ $2 mM$ DTE bei $298 K$ durch Ermittlung von k_{diss} des mant-Nukleotids in Abhängigkeit der freien Mg^{2+} -Konzentration bestimmt. Dabei wurden geringe Konzentrationen an freiem $MgCl_2$ als Gleichgewicht mit $10 mM$ EDTA und einem angenommenen K_D zwischen Mg^{2+} und EDTA von $1,7 \mu M$ bei pH 7,5 (Reinstein et al. 1991) eingestellt. Die zusätzlichen k_{diss} -Werte wurden unter Mg^{2+} -Sättigung ($10 mM$) bestimmt.

Ras•mGppNHp	wt	T35S	T35A	wt•mGDP
$K_D Mg^{2+} / \mu M$	2,5	7,2	10,4	4,0
$k_{diss} mGppNHp / 10^{-4}s^{-1}$	2,2	4,1	5,5	1,0

4.2.8 ^{31}P -NMR-Untersuchungen zur Komplexbildung zwischen Ras(wt) und Effektorproteinen

Durch Titration von Ras(wt)•GppNHp mit Ras-Bindedomänen (RBDs) verschiedener Effektorproteine, wie den RBDs der Raf-Kinase (Geyer *et al.*, 1996), des RalGDS (Geyer *et al.*, 1997) oder AF6 (Linnemann *et al.*, 1999) nimmt im ^{31}P -NMR-Spektrum mit zunehmender Konzentration der RBD die Resonanzlinie des Zustands 1 ab und verschwindet schließlich ganz, während die des Zustands 2 zunimmt. Dies bedeutet, dass der Zustand 2 durch die Bindung der Effektor-RBD stabilisiert wird. Dieses Verhalten konnte im Rahmen dieser Arbeit ebenfalls für die Effektor-RBDs von Byr2 (Tu *et al.*, 1997) und Nore1 (Vavvas *et al.*, 1998) (Abb. 4.12) gezeigt werden. In Tab. 4.5 sind die erhaltenen Werte der chemischen Verschiebungen für die Komplexe zwischen Ras(wt)•GppNHp und den verschiedenen Effektor-RBDs zusammengefasst, die unter gleichen Bedingungen gemes-

sen und ausgewertet wurden. In allen Fällen verschwindet die Linie des Zustands 1 zu Gunsten einer Resonanzlinie die nahe bei der des Zustands 2 liegt.

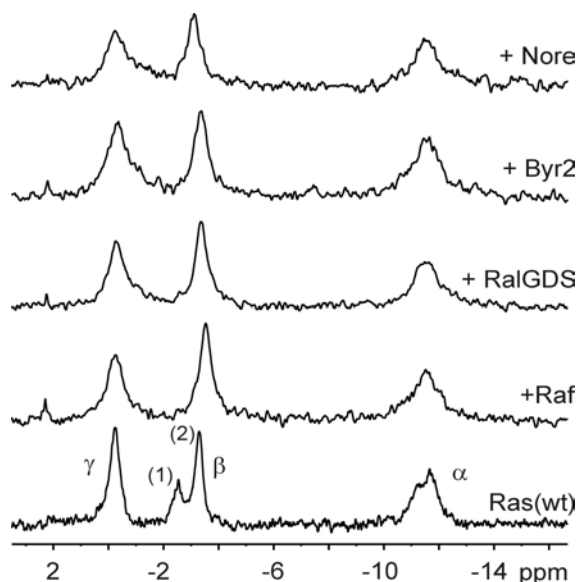


Abb. 4.12: ^{31}P -NMR-Spektren verschiedener Ras-Effektor-RBD-Komplexe. Zu einer 1,5 mM Ras(wt)•GppNHp-Lösung (unten) wurden 3-7 mM RBD-Lösungen verschiedener Effektoren bis zu einem 1,5fachen molaren Überschuss der jeweiligen RBD über Ras titriert. Die jeweiligen Effektor-RBDs sind den Spektren zugeordnet. Die Messungen wurden bei 278 K in Messpuffer C durchgeführt. Eine exponentielle Filterung der Spektren führt zu einer zusätzlichen Linienverbreiterung von 15 Hz.

Tab. 4.5: ^{31}P -NMR-Untersuchungen von Ras(wt)•GppNHp im Komplex mit verschiedenen Effektor-RBDs. Ras(wt)•GppNHp wurde bis zu einem 1,5fachen molaren Überschuss mit verschiedenen Effektor-RBDs titriert. Die Messungen wurden bei 278 K in Messpuffer C durchgeführt. Die Werte der chemischen Verschiebung wurden durch Angleichung von Lorentzlinien an die experimentellen Daten bestimmt.

Ras(wt)•GppNHp	α -Phosphat δ/ppm	β -Phosphat δ/ppm	γ -Phosphat δ/ppm
+ Raf-RBD	-11,55	-3,50	-0,22
+ RalGDS-RBD	-11,55	-3,40	-0,37
+ Byr2-RBD	-11,54	-3,36	-0,37
+ Nore1-RBD	-11,56	-3,10	-0,32

Während die chemische Verschiebung der ^{31}P -Resonanzlinie des α -Phosphats von Ras(wt)•GppNHp im Komplex mit allen vier Effektor-RBDs sehr ähnlich ist, zeigen die Werte der β - und γ -Phosphatlinie größere Abweichungen. Im Komplex von Ras mit den RBDs von Byr2 und RalGDS findet man für alle drei Phosphate ähnliche Werte in den jeweiligen chemischen Verschiebungen, während die Komplexe mit Raf-RBD und Nore1-RBD sich deutlich voneinander unterscheiden.

4.2.9 Komplexbildung zwischen Thr35-Mutanten von Ras und Effektorproteinen

Auf Grund der Ergebnisse, die man bei Ras(wt) nach Komplexbildung mit verschiedenen Effektor-RBDs findet, stellt sich die Frage, wie sich die Thr35-Mutanten, die sich zumindest weitgehend im Zustand 1 befinden, im Komplex mit den Effektoren verhalten. Selbst bei niedrigen Affinitäten zwischen den Ras-Mutanten und den Effektorproteinen sollten bei den hohen Konzentrationen, wie sie in diesen NMR-Experimenten eingesetzt werden, beide Mutanten weitgehend im Komplex mit den Effektor-RBDs vorliegen. Abb. 4.13 zeigt ^{31}P -NMR-Spektren von Komplexen zwischen Ras(T35S) bzw. Ras(T35A) mit Raf-RBD bzw. RalGDS-RBD. Durch Titration von Ras(T35S)•GppNHp mit Raf-RBD verschwindet die β -Resonanzlinie, die dem Zustand 1 entspricht und eine Linie entsteht, deren chemische Verschiebung der des Zustands 2 des Wildtyps gleicht (Tab. 4.6). Bei einem Verhältnis zwischen Ras und der Raf-RBD von etwa 1:1 erhält man für die Serin-Mutante ein Spektrum, das dem des Wildtyps im Komplex mit Raf-RBD entspricht. Die Titration der Serin-Mutante mit RalGDS-RBD führt zu einem ähnlichen Ergebnis, jedoch ist hier eine deutlich höhere Konzentration der Effektor-RBD nötig, um das Ras-Protein vollständig in den Zustand 2 zu überführen. Da die eingesetzten Konzentrationen sowohl von Ras als auch der Effektor-RBD bekannt sind und das Verhältnis von nicht-gebundenem und gebundenem Ras aus den Integralen der -in diesem Fall- deutlich voneinander getrennten β -Resonanzlinien bestimmt werden kann, ist mit dieser Messmethode eine Abschätzung der Gleichgewichtsdissoziationskonstanten zwischen Ras(T35S) und RalGDS-RBD auf etwa 360 μM möglich.

Die Titration der Alanin-Mutante mit Raf-RBD führt nur zu einer Linienverbreiterung um etwa 30 %, die durch die Erhöhung des Molekulargewichts im Komplex und die damit verbundene Änderung der rotatorischen Korrelationszeit begründet ist. Die α - und die β -Resonanzlinie erfahren eine sehr geringe Änderung in der chemischen Verschiebung, jedoch nicht zu Verschiebungswerten, die denen des Zustands 2 beim Wildtyp entsprechen (Tab. 4.6). Für die Bindung zwischen Raf-RBD und Ras(T35A)•GppNHp wurde unter etwas anderen Messbedingungen ein K_D von 3,4 μM erhalten (Herrmann *et al.*, 1995). Das bedeutet, dass unter den eingesetzten Proteinkonzentrationen, in den hier durchgeführten NMR-Experimenten Ras(T35A) nahezu vollständig im Komplex mit Raf-RBD vorliegen sollte.

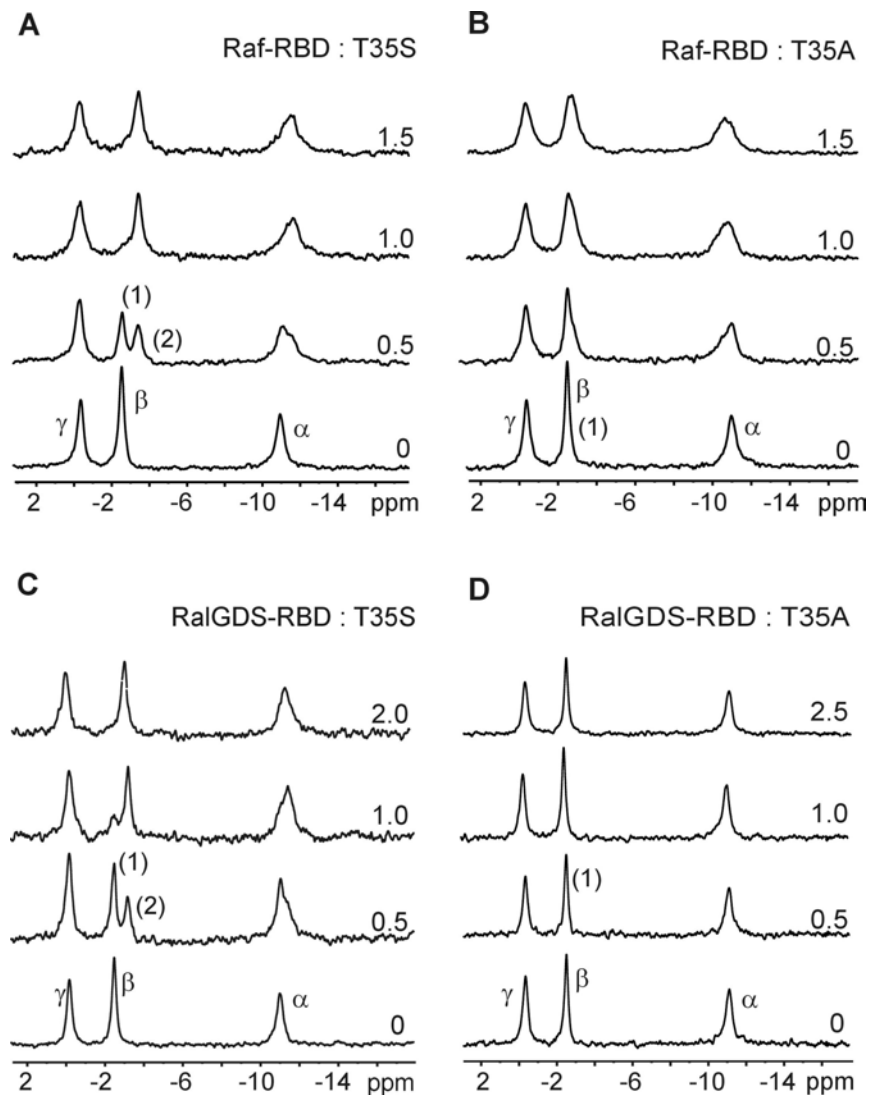


Abb. 4.13: Komplexbildung zwischen Ras(T35S) bzw. Ras(T35A)•GppNHp und Raf-RBD (A,B) bzw. RalGDS-RBD (C,D). Zu 1 mM Ras in Messpuffer C wurden 3-5 mM RBD-Lösungen titriert. Die Spektren wurden bei 278 K aufgenommen. Die molaren Verhältnisse zwischen den RBDs und Ras sind jeweils angegeben. Die Spektren sind exponentiell gefiltert. Das führt zu einer Linienverbreiterung von 15 Hz.

Die Titration mit RalGDS-RBD führte bei Ras(T35A)•GppNHp allenfalls zu einer leichten Linienverbreiterung. Wenn man davon ausgeht, dass die schmale γ -Resonanzlinie nicht durch chemischen Austausch verbreitert ist, sollte ihre Linienbreite proportional zum Molekulargewicht und linear mit dem Anteil des gebundenen Effektors zunehmen. So kann zumindest eine untere Grenze des K_D -Wertes zwischen Ras(T35A)•GppNHp und RalGDS-RBD auf etwa 10 mM abgeschätzt werden.

Tab. 4.6: ^{31}P -NMR-Untersuchungen an Ras(wt)•Mg $^{2+}$ •GppNHp und Thr35-Mutanten im Komplex mit Effektorproteinen. Die Werte der chemischen Verschiebung von Ras(wt) und Thr35-Mutanten gebunden an GppNHp und im Komplex mit Raf-RBD bzw. RalGDS-RBD sind angegeben. Die Messungen wurden bei 278 K in Messpuffer C durchgeführt. Die Werte der chemischen Verschiebung und die Gleichgewichtskonstante $K_{12}=[2]/[1]$ wurde durch Angleichen von Lorentzlinien and die experimentellen Daten bestimmt.

Protein-Komplex	α -Phosphat		β -Phosphat		γ -Phosphat	K_{12}
	δ_1/ppm	δ_2/ppm	δ_1/ppm	δ_2/ppm	$\delta_{1,2}/\text{ppm}$	
Ras(wt)•GppNHp	-11.20	-11.70	-2.59	-3.32	-0.25	1.9
+ Raf-RBD		-11.55		-3.50	-0.22	
+ RalGDS-RBD		-11.54		-3.40	-0.37	
Ras(T35S)•GppNHp	-11.13		-2.57		-0.26	<0.05
+ Raf-RBD		-11.60		-3.42	-0.27	
+ RalGDS-RBD		-11.54		-3.31	-0.29	
Ras(T35A)•GppNHp	-11.10		-2.50		-0.34	<0.05
+ Raf-RBD	-11.10		-2.49		-0.31	
+ RalGDS-RBD	-11.11		-2.49		-0.31	

4.2.10 Auswirkung unterschiedlicher Fluorophore auf die Dynamik von Ras

Für fluoreszenzspektroskopische Untersuchungen der Ras-Effektor-Interaktion werden zwei Fluorophore häufig verwendet: der Einsatz eines Tryptophanrestes, der in diesem Fall durch gezielte Mutagenese in die Effektorschleife eingefügt werden muss (siehe z. B. Sydor *et al.*, 1998) und modifizierte Nukleotide, wie die mant-Nukleotide (John *et al.*, 1990). Um zu überprüfen, ob die eingeführten Modifikationen am Protein bzw. Nukleotid Veränderungen in den dynamischen Eigenschaften bewirken, wurden ^{31}P -NMR-Spektren von Ras(Y32W)•GppNHp und Ras(wt)•mGppNHp aufgenommen und mit dem Ras(wt)•GppNHp-Spektrum verglichen. Wie man in Abb 4.14 sehen kann, zeigt die Y32W-Mutante im Gegensatz zum Wildtyp-Protein nur je eine Resonanzlinie für jedes Phosphat. Die β -Phosphatlinie weist eine chemische Verschiebung auf, die der des Zustands 1 des Ras(wt) entspricht. Dagegen erhält man für das Signal des α -Phosphats eine Verschiebung die auf den Zustand 2 hindeuten könnte. Es kann aus diesem Experiment nicht abgeschätzt werden, ob bei dieser Mutation das Gleichgewicht -wie

auch bei den Thr35-Mutanten- vollständig zum Zustand 1 hin verschoben ist, oder ob das Fehlen des aromatischen Rings der Tryptophan-Seitenkette, die zumindest teilweise für die Differenz der chemischen Verschiebungen der β -Phosphatlinien verantwortlich ist, zu keiner Aufspaltung des Signals führt. Das bedeutet, dass man mögliche Ergebnisse nicht direkt auf den Wildtyp von Ras übertragen kann. Dagegen scheint der Austausch des GTP-Analogons GppNHp zur Fluorophor-tragenden Form mant-GppNHp nur eine minimale Auswirkung auf die Dynamik (die Resonanzlinie des Zustands 1 ist leicht verbreitert) und die chemischen Verschiebungswerte zu haben. Die Gleichgewichtskonstante zwischen dem Zustand 1 und 2 wird nicht beeinflusst. Die jeweiligen Resonanzlinien scheinen leicht verbreitert, was durch etwas höhere Austauschraten zwischen den beiden Zuständen bewirkt werden könnte. Für die nachfolgenden Messungen wurde deshalb der Einsatz des mant-Nukleotids gewählt.

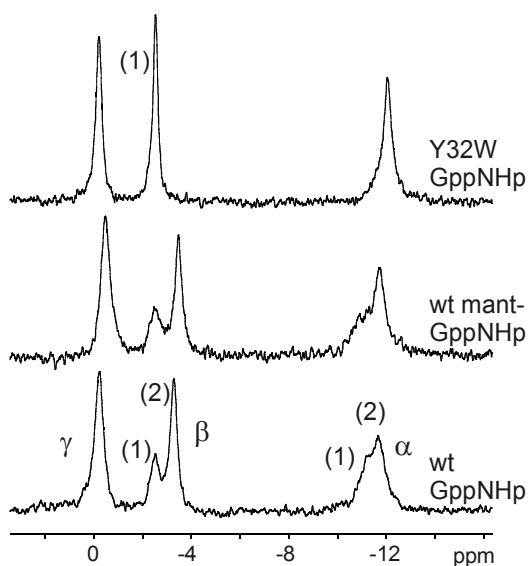


Abb. 4.14: ^{31}P -NMR-Spektren von Fluorophor-tragenden Ras•Nukleotid-Komplexen im Vergleich mit Ras(wt). Von Ras(wt) im Komplex mit GppNHp bzw. mant-GppNHp und die Mutante Ras(Y32W)•GppNHp wurden unter gleichen Bedingungen ^{31}P -NMR-Spektren bei 278 K in Messpuffer B aufgenommen. Die Spektren sind exponentiell gefiltert. Das führt zu einer zusätzlichen Linienverbreiterung von 15 Hz.

4.2.11 Stopped Flow-Untersuchungen zur Assoziation zwischen Ras und Effektorproteinen

Mit *stopped flow*-Experimenten wurde die Kinetik der Interaktion zwischen verschiedenen Effektoren und Ras•mant-Nukleotid-Komplexen bei 283 K untersucht. Zur Bestimmung der Assoziationsrate wurde eine 0,5 μM Ras-Lösung mit Lösungen steigender Konzentration an Effektor-RBD gemischt. Dabei war die Konzentration der Effektor-RBD mindestens im 10fachen Überschuss gegenüber der Ras-Konzentration. Die Ratenkonstanten wurden daher unter Annahme einer Reaktion

pseudo-erster-Ordnung durch Angleichung einfach-exponentieller Funktionen bestimmt. Die Dissoziationsratenkonstante zwischen der Effektor-RBD und Ras wurde direkt bestimmt, indem zum Ras•mGppNHp•RBD-Komplex ein 200facher Überschuss Ras•GppNHp gegeben wurde. Hier erfolgte die Bestimmung der Ratenkonstanten wiederum durch Anpassung einfach-exponentieller Funktionen.

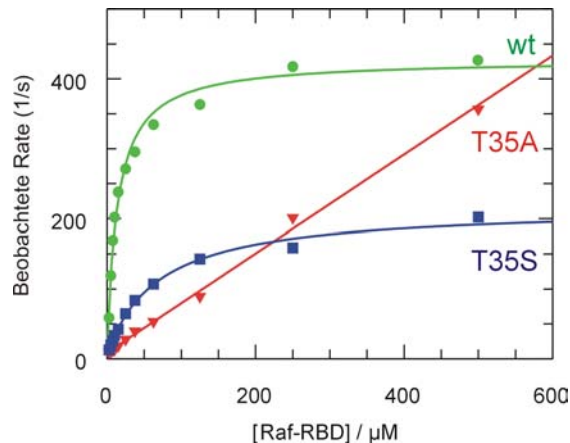
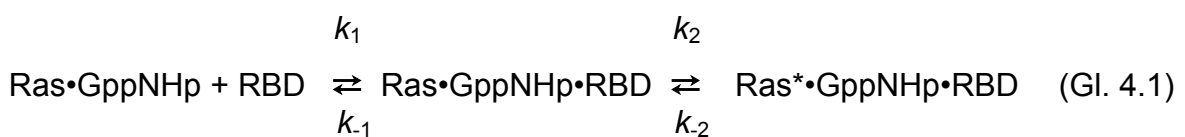


Abb. 4.15: Assoziationskinetiken zwischen Raf-RBD und verschiedenen Ras-Varianten im Komplex mit mGppNHp. Die Messungen wurden wie in 3.3.3 beschrieben bei 283 K in Messpuffer C mittels einer *stopped flow*-Apparatur durchgeführt. Die erhaltenen Werte wurden gemäß dem Modell in Gl. 4.1 wie in 3.3.3.2 beschrieben angeglichen. Die so erhaltenen Konstanten sind in Tab. 4.7 zusammengefasst.

Wie es bereits von Sydor *et al.*, (1998) für Ras(wt)•mGppNHp gezeigt wurde, erhält man für die Assoziation von Raf-RBD eine Sättigungskinetik, wenn die Assoziationsraten über die steigenden Konzentrationen der Raf-RBD aufgetragen werden (Abb. 4.15). Diese lässt sich durch einen mindestens zwei Stufen umfassenden Bindungsmechanismus erklären, bei dem zunächst ein schneller, wenig affiner, einleitender Bindungsschritt stattfindet, dem ein langsamer Isomerisierungsschritt folgt. Erst dieser führt zur hoch affinen Bindung:



Wird die Bindungsreaktion durch das Modell in Gleichung 4.1 (3.3.3.2) beschrieben, so erhält man bei Ras(wt) für den ersten Schritt eine Dissoziationskonstante K_1 von 12 μM und eine Geschwindigkeitskonstante k_2 von 415 s^{-1} für den Isomerisierungsschritt. Für die Serin-Mutante erhält man eine 5,9 mal höhere Gleichgewichtskonstante für den einleitenden Schritt, während die Ratenkonstante für den Isomerisierungsschritt etwa um den Faktor 2 auf 211 s^{-1} sinkt. Ebenfalls sinkt auch die Gesamtaffinität von 60 nM bei Wildtyp-Ras auf 2 μM für die Serin-Mutante. Während Ras(wt) und Ras(T35S) aber dennoch ähnliche Assoziationskinetiken zeigen, unterscheidet sich die T35A-Mutante deutlich von ihnen. Ras(T35A) zeigt im beobachteten Konzentrationsbereich eine lineare Assoziationskinetik mit einer

Gesamtaffinität zu Raf-RBD, die nochmals um den Faktor 3,5 unter der Affinität bei der Serin-Mutante liegt. Die erhaltenen Werte sind in Tab. 4.7 zusammengefasst.

Tab. 4.7: Kinetik der Interaktion zwischen Ras•mGppNHp und Raf-RBD. Die *stopped flow*-Messungen wurden bei 283 K in Messpuffer C wie in 3.3.3 beschrieben durchgeführt.

Raf-RBD+	$K_1 = k_{-1}/k_1$ (μM)	k_2 (s^{-1})	$k_{\text{on}} = k_2/K_1$ ($\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)	$k_{\text{off}} = k_{-2}$ (s^{-1})	$K_D = (K_1K_2)$ (μM)
Ras(wt)	13.9	421	30.0	1.7	0.06
Ras(T35S)	68.8	211	3.1	6.5	2.1
Ras(T35A)	--	--	0.7	5.1	7.2

Einen weiteren Hinweis dafür, dass die Art der Raf-RBD-Bindung zwischen Ras(wt) und Ras(T35S) auf der einen Seite und der Alanin-Mutante auf der anderen Seite unterschiedlich ist, findet man in der Änderung des Fluoreszenz-Signals von Ras•mGppNHp durch die Bindung dieser Effektor-RBD (Abb. 4.16).

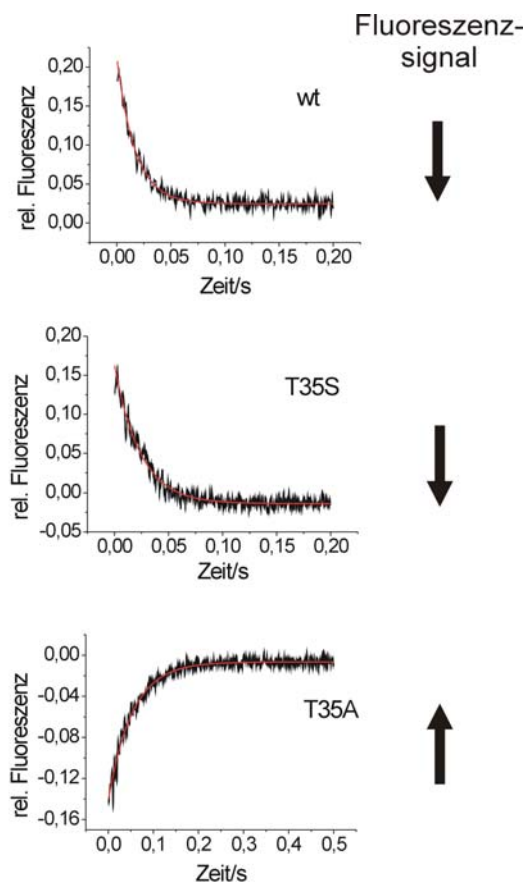


Abb. 4.16: Komplexbildung zwischen Raf-RBD und Ras•mGppNHp. Die Änderung des Fluoreszenzsignals von Ras•mGppNHp durch die Assoziation von Raf-RBD ist dargestellt. Die Messungen wurden bei 283 K in Messpuffer C durchgeführt. Die Ras-Varianten sind den Spektren zugeordnet. Die Änderung des Fluoreszenz-Signals ist durch einen Pfeil hervorgehoben.

Während bei Ras(wt) und Ras(T35S) das Fluoreszenzsignal durch die Komplexbildung mit der Raf-RBD zunimmt, nimmt sie bei Ras(T35A) ab (Abb. 4.16). Im

Bereich der mant-Gruppe muss somit im Fall der Alanin-Mutante eine andersartige Umgebung entstehen als beim Wildtyp und der Serin-Mutante. Die Zunahme der Fluoreszenzintensität wird häufig durch den Wechsel der fluoreszierenden Gruppe in eine hydrophobere Umgebung verursacht.

Bei analogen Experimenten mit den Thr35-Mutanten und RalGDS-RBD konnte keine Fluoreszenzänderung beobachtet werden, da die Affinitäten zu gering sind, um bei den eingesetzten Konzentrationen eine ausreichende Komplexbildung zu erhalten.

4.2.12 Affinitäten zwischen Ras(T35S) und verschiedener Effektor-RBDs

In Kooperation mit C. Herrmann (Dortmund) wurden die Bindungskonstanten zwischen Ras(wt) bzw. Ras(T35S)•mGppNHp und verschiedenen Effektor-RBDs durch die GDI-(Guaninnukleotid-Dissoziations-Inhibitor)-Methode (Herrmann *et al.*, 1995) bestimmt. Die Methode beruht auf der Inhibition der Nukleotid-Dissoziation durch die Effektorbindung. In Tab. 4.8 sind die Affinitäten zwischen unterschiedlichen Effektoren und Ras(wt) bzw. der Mutante Ras(T35S) gezeigt.

Tab. 4.8: Affinität zwischen Ras(wt) bzw. Ras(T35S) und unterschiedlichen Effektoren (Spoerner *et al.*, 2001). Die Gleichgewichtsdissoziationskonstanten K_D wurden mittels der GDI-Methode bei 37 °C bestimmt, wie in Herrmann *et al.* (1995, 1996) beschrieben.

H-Ras-Variante	Effektor	$K_D/\mu\text{M}$	relative Affinität K_D^{rel} (T35S/wt)
Ras(wt)•Mg ²⁺ •mGppNHp	Raf-RBD	0.02	
	RalGDS-RBD	1.0	
	AF6-RBD	3.0	
	Byr2-RBD	0.3	
Ras(T35S)•Mg ²⁺ •mGppNHp	Raf-RBD	1.2	60
	RalGDS-RBD	>100	>100
	AF6-RBD	>100	>33
	Byr2-RBD	3.7	12

Für alle vier aufgelisteten Effektorproteine ist die Affinität zur Mutante drastisch reduziert, obwohl Thr35 nicht direkt an der Effektorbindung beteiligt ist. Im Fall der

Raf-Kinase scheint die Affinität trotz der 60fachen Verringerung bei der Mutante mit 1,2 μM noch hoch genug zu sein, um eine Bindung unter physiologischen Konzentrationen zu ermöglichen und diesen Signalweg noch anschalten zu können.

4.2.13 ^{31}P -NMR-Spektroskopie an verschiedenen Schalter 1-Mutanten von Ras im Komplex mit GppNHp

Innerhalb dieser Arbeit wurden weitere Ras-Varianten untersucht, die Mutationen in der Effektorschleife tragen. Wie in Abb. 4.17 zu sehen ist, wird die Dynamik der Schalter I-Region durch die Mutation einzelner Aminosäuren in diesem Bereich empfindlich gestört.

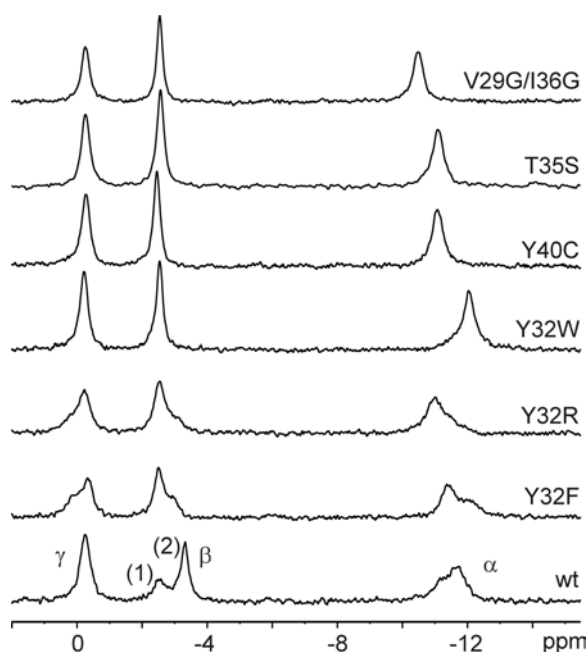


Abb. 4.17: ^{31}P -NMR-Spektren von Ras(wt) und verschiedenen Schalter 1-Mutanten im Komplex mit GppNHp. Die ^{31}P -NMR-Spektren wurden von 1-1,3 mM Ras-Lösungen in Messpuffer C bei 278 K aufgenommen. Die Spektren sind exponentiell gefiltert. Das führt zu einer zusätzlichen Linienverbreiterung von 15 Hz. Die Mutationen sind den jeweiligen Spektren zugeordnet.

Man findet in allen hier untersuchten Mutanten eine Verlagerung des Gleichgewichts zu Gunsten des Zustands 1. Während bei den unterschiedlichen Mutanten die chemische Verschiebung der α -Phosphatlinien um bis zu 1,5 ppm variiert (Tab. 4.9), erhält man sowohl für die γ -Phosphatlinien als auch für die Resonanzlinie des Zustands 1 des β -Phosphats in allen Mutanten sehr ähnliche Werte für die chemische Verschiebung. Die Mutation des Tyr32 zu Arginin bzw. Phenylalanin führt nur zu einer teilweisen Verlagerung des Gleichgewichts zum Zustand 1. Im Gegensatz zu den anderen Mutanten und dem Wildtyp-Protein sind hier auch die Resonanzlinien des γ -Phosphats aufgespalten. Die Glycin-Doppelmutante und die *partial loss-of-function*-Mutante Ras(Y40C) zeigen wie auch die beiden Thr35-Mutanten eine vollständige Verschiebung des Gleichgewichts zum Zustand 1.

Eine weitere Besonderheit stellt Ras(Y32W) dar. Hier erhält man für die α -Phosphatlinie eine chemische Verschiebung die der des Zustands 2 beim Wildtyp entspricht, während man für die β -Phosphatlinie eine chemische Verschiebung entsprechend dem Zustand 1 findet.

Tab. 4.9: ^{31}P -NMR-Untersuchungen an Ras(wt)-GppNHp und verschiedenen Schalter I-Mutanten. Die Werte der chemischen Verschiebung von Ras(wt) und den Schalter I-Mutanten in der GppNHp-gebundenen Form sind angegeben. Die Messungen wurden bei 278 K in Messpuffer C durchgeführt. Die Gleichgewichtskonstante K_{12} ist definiert als Quotient der beiden Populationen der Zustände 1 und 2 mit $K_{12}=[2]/[1]$. Für die Mutanten wurde für K_{12} unter Berücksichtigung des Signal-zu-Rausch Verhältnisses eine obere Grenze angegeben. Die chemischen Verschiebungen der γ -Phosphatlinien können nicht eindeutig zugeordnet werden. Die Zuordnung erfolgte hier in Anlehnung an die Verschiebung des β -Signals.

Ras•GppNHp	α -Phosphat		β -Phosphat		γ -Phosphat		K_{12}
	δ_1/ppm	δ_2/ppm	δ_1/ppm	δ_2/ppm	δ_1/ppm	δ_2/ppm	
Ras(wt)	-11,20	-11,70	-2,59	-3,32	-0,25		1,9
Ras(V29G)	-10,54		-2,59		-0,23		<0,1
Ras(V29G)/(I36G)	-10,49		-2,54		-0,26		<0,05
Ras(Y32F)	-11,41	-12,05	-2,50	-2,81	-0,34	0,07	1,4
Ras(Y32R)	-11,00	-11,36	-2,54	-2,97	-0,24	0,11	1,3
Ras(Y32W)	-12,02		-2,53		-0,21		<0,05
Ras(T35A)	-11,10		-2,50		-0,34		<0,05
Ras(T35S)	-11,13		-2,57		-0,26		<0,05
Ras(I36G)	-10,54		-2,60		-0,22		<0,1
Ras(Y40C)	-11,08		-2,46		-0,23		<0,05

Mehrere dieser Schalter 1-Mutanten wurden mit Raf-RBD titriert und ^{31}P -NMR-Spektren aufgenommen. In Tab. 4.10 sind die erhaltenen chemischen Verschiebungen der Ras•GppNHp•RBD-Komplexe zusammengefasst. Die Glycin-Doppelmutante und die *partial loss-of-function* Mutante Ras(Y40C) konnten bei den eingesetzten Konzentrationen nicht vollständig in den Komplex überführt werden. Für die Bindung zwischen Raf-RBD und den beiden Mutanten können K_D -Werte von etwa 1 mM abgeschätzt werden. Die beiden Tyr32-Mutanten zeigen im Komplex geringere Änderungen in der Verschiebung der β -Phosphatlinie. In diesen Fällen ist jedoch der Tyrosinrest mutiert, dem in erster Linie die Auswirkung auf die Differenz zwischen den beiden Zuständen in der chemischen Verschiebung zugeschrieben wird (Geyer *et al.*, 1996).

Tab. 4.10: Ras(wt)•GppNHp und verschiedene Schalter 1-Mutanten im Komplex mit Raf-RBD.

Zu den verschiedenen Ras-Varianten in der GppNHp-gebundenen Form wurde bis zu einem 1,5fachen molaren Überschuss Raf-RBD zugegeben. Die Messungen wurden bei 278 K in Messpuffer C durchgeführt. Die Werte der chemischen Verschiebung wurden durch Angleichung von Lorentzlinien an die experimentellen Daten bestimmt. Der Fehler der Anpassung liegt dabei immer unter 0,01 ppm.

Ras•GppNHp•RBD	α -Phosphat δ /ppm	β -Phosphat δ /ppm	γ -Phosphat δ /ppm
Ras(wt)	-11,55	-3,50	-0,22
Ras(V29G/I36G)	-10,65	-3,42	-0,08
Ras(Y32R)	-11,33	-3,23	0,15
Ras(Y32W)	-12,03	-2,80	-0,11
Ras(T35A)	-11,10	-2,49	-0,31
Ras(T35S)	-11,60	-3,42	-0,27
Ras(Y40C)	-11,60	-3,52	-0,21

4.3 Untersuchung weiterer GTP-Analoga im Komplex mit Ras

4.3.1 ^{31}P -NMR-Spektroskopie an Ras•GppCH₂p

4.3.1.1 Konformationelle Gleichgewichte von Ras•GppCH₂p

Abb. 4.18A zeigt ^{31}P -NMR-Spektren von Ras(wt) im Komplex mit dem nur langsam von Ras hydrolysierbarem GTP-Analogen GppCH₂p, die bei unterschiedlichen Temperaturen aufgenommen wurden.

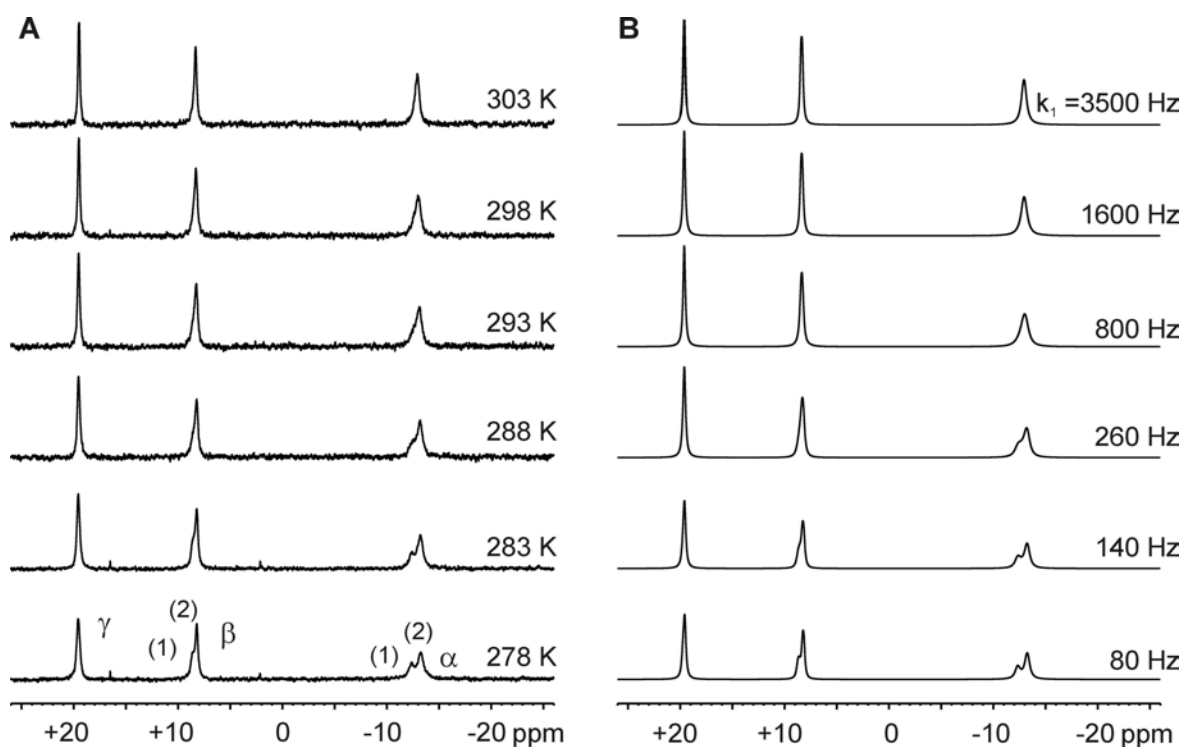


Abb. 4.18: ^{31}P -NMR-Spektren und Simulationen von Ras(wt)•GppCH₂p bei unterschiedlichen Temperaturen. **(A)** Experimentelle Spektren. Die Spektren wurden von 1,3 mM Ras(wt)•GppCH₂p in Messpuffer C bei unterschiedlichen Temperaturen aufgenommen. Die angegebenen effektiven Messtemperaturen wurden durch Bestimmung der Differenz der chemischen Verschiebung des Hydroxyl-methylen von Ethylenglycol in einer externen Probe bestimmt (Raiford *et al.*, 1979). Die experimentellen Daten sind exponentiell gefiltert. Das führt zu einer zusätzlichen Linienverbreiterung von 5 Hz. Die Anzahl der akkumulierten FIDs pro Spektrum beträgt 1600–5400. **(B)** Simulierte Spektren. Die Daten wurden wie in 3.3.1.3 beschrieben simuliert. Die erhaltenen Austauschraten k_1 sind angegeben.

Während man bei hohen Temperaturen für jedes Phosphat je eine schmale Resonanzlinie erhält, werden die α - und β -Phosphatlinie zunächst breiter, wenn man die Temperatur senkt und spalten bei noch tieferen Temperaturen deutlich auf. Dieses reversible Verhalten weist darauf hin, dass sich Ras(wt) im GppCH₂p-gebundenen Zustand, wie es bereits für den GppNHp gebundenem Zustand gezeigt wurde (Geyer *et al.*, 1996), in einem dynamischen Konformationsgleichgewicht befindet. Dieses befindet sich bei niedrigen Temperaturen (278 K) im langsamen und bei hohen Temperaturen (298 K) im schnellen Austausch relativ zur Zeitskala dieses NMR-Experiments. Bei Ras(wt)•GppCH₂p wurde der Zustand der zu niedrigerer Frequenz verschoben ist -analog zum GppNHp-gebundenen Komplex- als Zustand 2 definiert. Die chemischen Verschiebungen der beiden Zustände scheinen im Ras•GppCH₂p unabhängig von der Temperatur zu sein. Das Verhältnis der Populationen beider Zustände in der GppCH₂p gebundenen Form wurde aus dem Spektrum gewonnen das bei 278 K aufgenommen wurde, da hier die Populationen der beiden Zustände durch den langsamen Austausch am besten getrennt vorliegen. Man erhält eine Gleichgewichtskonstante $K_{12} = [k_2]/[k_1]$ von etwa 2 (Tab. 4.11). Dieses Verhältnis scheint über den ganzen Temperaturbereich konstant zu bleiben.

Mittels Linienformanalysen der temperaturabhängigen Daten können sowohl die Austauschratenkonstanten, als auch die freie Aktivierungsenergie als Funktion der Temperatur ermittelt werden. In Zusammenarbeit mit G. Steiner (Regensburg) wurden diese Linienformanalysen unter Verwendung eines auf dem Dichtematrixformalismus (Nageswara *et al.*, 1989) basierenden Programms berechnet, wie es in Geyer *et al.* (1996) beschrieben ist. Die freie Aktivierungsenthalpie, die Aktivierungsenthalpie, sowie die Aktivierungsentropie wurden durch Angleichen der Temperaturabhängigkeit der Austauschraten durch die Eyring-Gleichung ermittelt. Die hier erhaltenen Daten konnten anschließend mit den Daten für den Ras(wt)•GppNHp Komplex (Geyer *et al.*, 1996) verglichen werden.

Neben den Werten der chemischen Verschiebung und dem Besetzungsverhältnis benötigt man für die Linienformanalyse noch die J-Kopplungen der einzelnen Phosphate des Nukleotids. Im Protein-gebundenen Zustand sind die Linien selbst bei hoher Temperatur zu breit, als dass diese Feinstrukturkomponenten aufgelöst werden könnten. Deshalb wurden Protonen-entkoppelte Spektren von freiem GppCH₂p gemessen und daraus die Kopplungskonstanten bestimmt, die mit $^2J_{\alpha\beta} = 26,1$ Hz und $^2J_{\beta\gamma} = 8,9$ Hz eine gute Näherung für das gebundene Nukleotid darstellen sollten. Die Phosphorkopplungen $^2J_{H\beta}$ und $^2J_{H\gamma}$ zu den Protonen der CH₂-

Gruppe betragen 14,7 Hz bzw. 25,2 Hz. Da die Protonen jedoch während der Datenaufnahme entkoppelt wurden, konnten sie bei der Simulation der Spektren vernachlässigt werden.

Durch iteratives Vorgehen konnten die weiteren Parameter bestimmt werden. Obwohl die Resonanzlinie des γ -Phosphats keine deutliche Aufspaltung zeigt, wurden bei der Simulation der Spektren, die bei unterschiedlicher Temperatur aufgenommen wurden, bessere Ergebnisse erhalten, wenn man auch hier zwei Linien mit einer Differenz in der chemischen Verschiebung von 0,2 ppm ($\delta_1 = 19,77$ ppm, $\delta_2 = 19,55$ ppm) annahm. Für die natürliche Linienbreiten, also die Linienbreiten ohne den Einfluss des chemischen Austauschs, die durch die transversale Spinrelaxation bedingt werden, ergaben sich folgende T_2 -Relaxationsraten, die für die beiden Zustände des jeweiligen Phosphats ähnlich sind:

$$\begin{array}{lll} 1/T_2(\alpha_1): 85 \text{ Hz} & 1/T_2(\beta_1): 40 \text{ Hz} & 1/T_2(\gamma_1): 45 \text{ Hz} \\ 1/T_2(\alpha_2): 90 \text{ Hz} & 1/T_2(\beta_2): 35 \text{ Hz} & 1/T_2(\gamma_2): 45 \text{ Hz} \end{array}$$

Als ein weiterer freier Parameter wurde die Austauschrate k_1 durch iteratives Vorgehen bestimmt. Durch deren Anpassung sollen die einzelnen, bei unterschiedlicher Temperatur erhaltenen, experimentellen Daten möglichst gut durch die Simulationen beschrieben werden. Da das Besetzungsverhältnis K_1 zwischen den beiden Zuständen mit $K_1 = k_1/k_2$ bekannt ist, kann die Rate der Rückreaktion aus k_1 berechnet werden. Das Besetzungsverhältnis, das auf Grund des Boltzmannfaktors von der Temperatur abhängig ist, wurde für die jeweilige Temperatur korrigiert.

Tab. 4.11: Zusammenfassung der ermittelten Werte, die aus der Simulation der ^{31}P -NMR-Spektren von Ras(wt)•GppCH₂p erhalten wurden. Erläuterungen siehe Text.

T /K	k_1 /Hz	k_2 /Hz	$K_1 = k_1/k_2$	ΔG^\ddagger /kJ mol ⁻¹
278	80	39	2,04	57,8
283	140	69	2,01	57,6
288	260	131	1,99	57,2
293	800	407	1,97	55,5
298	1600	823	1,94	54,7
303	3500	1820	1,92	53,7

Die nichtlineare Anpassung der erhaltenen Parameter durch die Eyring-Gleichung liefert die energetischen und entropischen Beiträge beim Zustandswechsel.

Wie in Tab. 4.11 gezeigt, erhält man für Ras(wt) in der GppCH₂p gebundenen Form hinsichtlich der Austauschraten und der freien Aktivierungsenthalpie ähnliche Werte wie für den GppNHp-Komplex (Geyer *et al.*, 1996).

4.3.1.2 ³¹P-NMR-Untersuchungen zur Komplexbildung zwischen Ras•GppCH₂p und Effektorproteinen

Nach Titration von Ras(wt)•GppCH₂p mit Effektor-RBDs, wie die Ras-Bindedomäne der Raf-Kinase bzw. des RaIGDS wird, ähnlich wie im Komplex mit Ras(wt)•GppNHp, ein Zustand stabilisiert. Dieser weicht jedoch in der chemischen Verschiebung etwas stärker von der des Zustands 2 ab als im GppNHp-Komplex (Abb. 4.19A). Die erhaltenen chemischen Verschiebungswerte sind in Tab. 4.12 zusammengefasst.

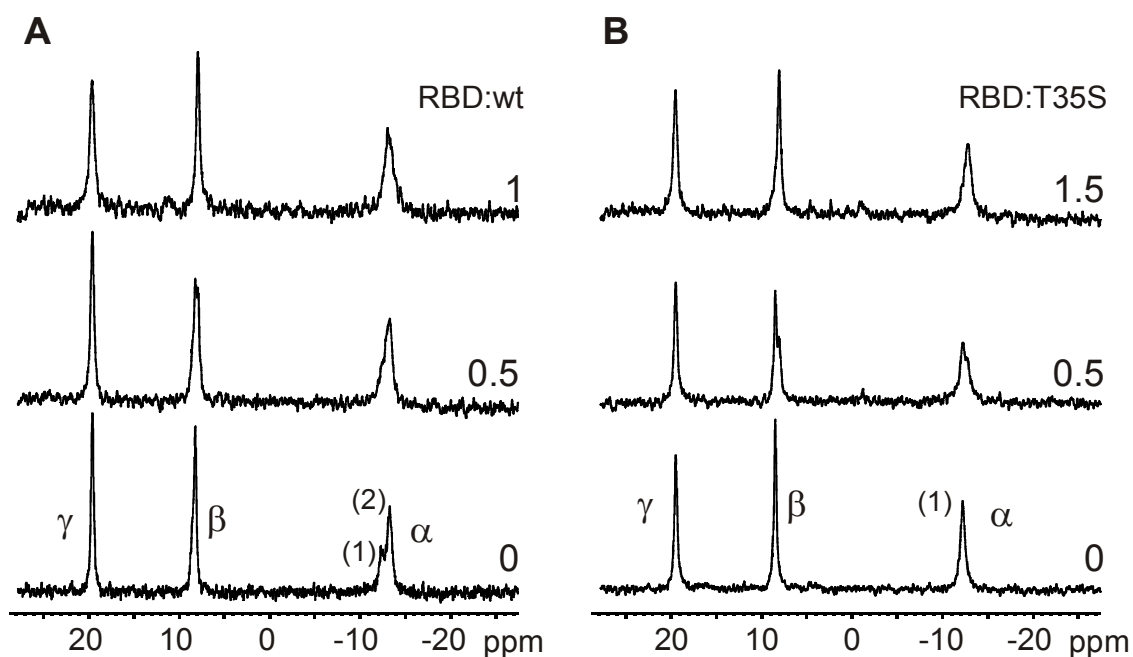


Abb. 4.19: Komplexbildung zwischen Raf-RBD und Ras•GppCH₂p. ³¹P-NMR-Spektren von 1 mM Lösungen von Ras(wt) (A) und Ras(T35S)•GppCH₂p (B). Die Ras-Lösungen wurden mit einer hoch konzentrierten Raf-RBD-Lösung (7,2 mM) titriert. Das Verhältnis RBD:Ras ist angegeben. Die ³¹P-NMR-Spektren wurden bei 278 K aufgenommen. Eine exponentielle Filterung der Daten führt zu einer zusätzlichen Linienverbreiterung von 15 Hz.

Wie es in dieser Arbeit bereits für Ras(T35S) im GppNHp-gebundenen Zustand gezeigt wurde, so findet man im Komplex dieser Mutante mit GppCH₂p bei tiefer Temperatur ebenfalls wieder nur je eine Resonanzlinie für jedes Phosphat. Die chemischen Verschiebungen der Resonanzlinien des Komplexes sind nicht identisch, aber ähnlich zu den Werten, die man für die Linien erhält, die den Zustand 1 im Spektrum des Ras(wt)•GppCH₂p repräsentieren, der weniger besetzt und zu höherer Frequenz verschoben ist. Nach Bindung der Raf-RBD bzw. der RalGDS-RBD wird wiederum ein Zustand stabilisiert der durch Resonanzlinien mit chemischen Verschiebungen repräsentiert wird, die denen des Wildtyp-RBD-Komplexes ähnlich sind (Abb. 4.19B; Tab. 4.12).

Tab. 4.12: ³¹P-NMR-Messungen von Ras(wt)•GppCH₂p und Thr35-Mutanten im Komplex mit verschiedenen Effektor-RBDs. Die Messungen wurden bei 278 K durchgeführt. Zu 1,3 mM Ras in Messpuffer C wurde eine 7,2 mM Raf-RBD-Lösung bzw. 5,3 mM RalGDS-RBD-Lösung titriert. Die Werte der chemischen Verschiebung und die Gleichgewichtskonstante $K_{12} = [2]/[1]$ wurden durch Angleichung von Lorentzlinien an die experimentellen Daten und Integration der Linien bestimmt.

Protein-Komplex	α -Phosphat		β -Phosphat		γ -Phosphat	K_{12}
	δ_1 /ppm	δ_2 /ppm	δ_1 /ppm	δ_2 /ppm	$\delta_{1,2}$ /ppm	
Ras(wt)•Mg ²⁺ •GppCH ₂ p	-12,37	-13,26	8,59	8,20	19,54	2,0
+Raf-RBD		-13,07		7,90	19,60	
+RalGDS-RBD		-12,87		8,06	19,69	
Ras(T35S)•Mg ²⁺ •GppCH ₂ p	-12,37		8,38		19,48	<0,05
+Raf-RBD		-12,97		7,83	19,50	
+RalGDS-RBD		-12,87		8,05	19,50	

4.3.2 ³¹P-NMR-Spektroskopie an Ras•GTP_γS

4.3.2.1 ³¹P-NMR-Untersuchungen zur Komplexbildung zwischen Ras•GTP_γS und Effektorproteinen

Im Komplex mit GTP_γS zeigt das ³¹P-NMR-Spektrum von Ras(wt) im Gegensatz zu den Komplexen mit den beiden anderen GTP-Analoga, bei hoher, wie auch tiefer Temperatur nur je eine Resonanzlinie für jedes Phosphat. Das kann bedeuten, dass Ras(wt)•GTP_γS nur in einer Konformation vorliegt, oder dass man selbst bei der niedrigen Temperatur von 278 K nur die resultierende Linie eines schnellen chemischen Austauschs erhält. Durch die Bindung eines Effektors, wie der Raf-RBD erfährt die Resonanzlinie zwar die erwartete Linienverbreiterung, jedoch

keine signifikante Änderung der chemischen Verschiebung (Abb. 4.20A, Tab. 4.13). Dies legt nahe, dass sich Ras(wt)•GTP γ S bereits im freien, also nicht Effektor-gebundenen Zustand zumindest nahezu komplett in einer Konformation befindet, die der des Effektor-gebundenen Zustands entspricht. Einen weiteren Hinweis ergibt die Mutante Ras(T35S), welche im Komplex mit GppNHp bzw. GppCH₂p nur im Zustand 1, also dem Zustand vorliegt, welcher nicht vom gebundenen Effektor stabilisiert wird. Abb. 4.20B zeigt ³¹P-Resonanz-Spektren der Titration von Ras(T35S)•GTP γ S mit Raf-RBD. Im Gegensatz zum Wildtyp zeigt die Mutante im ungebundenen Zustand eine deutliche Aufspaltung des β - und γ -Signals, mit einer Gleichgewichtskonstanten $K_{11'} = [k_{1'}]/[k_1]$ von 0,5. Dabei weist die Resonanzlinie des Zustands 1 noch eine kleine Population auf, deren Resonanzlinie etwas zu niedrigerer Frequenz verschoben ist und der des Wildtyp-Proteins nahe ist. Nach Komplexbildung mit Raf-RBD entsteht eine Resonanzlinie mit einem ähnlichen Verschiebungswert, wie dem des höher populierte Zustands im nicht-komplexierten Protein, während die beiden Linien des freien Proteins an Fläche verlieren und bei Sättigung im Rahmen des Rauschen völlig verschwinden.

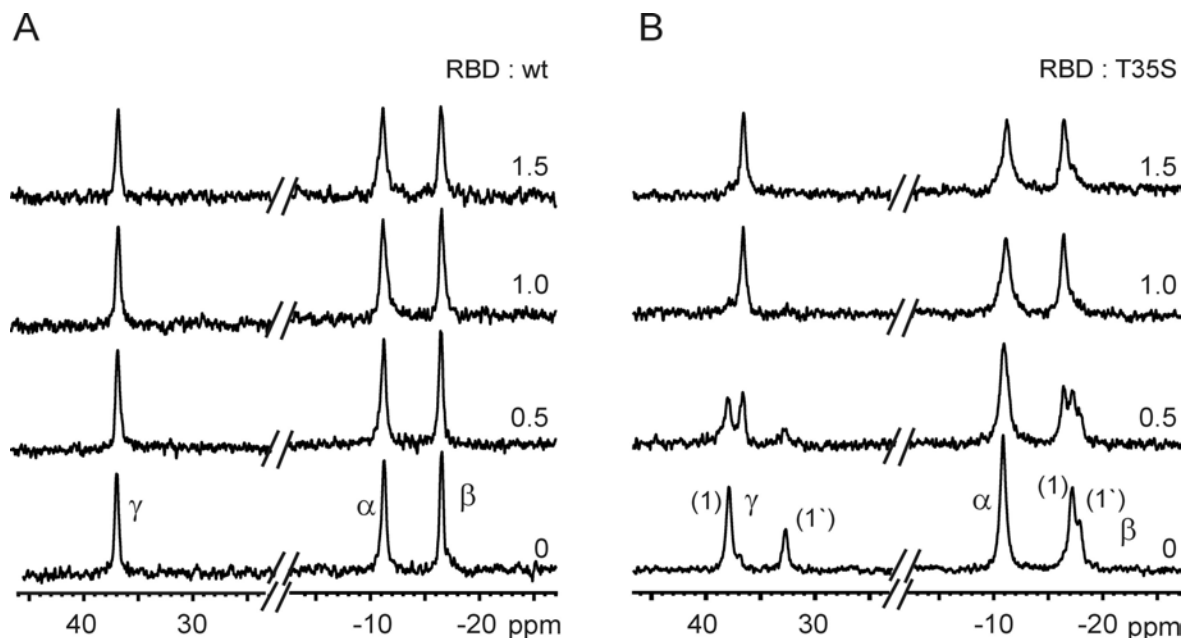


Abb. 4.20: ³¹P-NMR-Spektren von der Komplex-Bildung zwischen Ras•GTP γ S und Raf-RBD. 1,2 mM Ras(wt) (A) bzw. Ras(T35S)•GTP γ S (B) in Messpuffer C wurden mit hochkonzentrierter Raf-RBD (5,3 mM) titriert. Das jeweilige Verhältnis RBD:Ras ist angegeben. Die Messungen wurden bei 278 K durchgeführt. Die Spektren sind exponentiell gefiltert. Dies führt zu einer Linienverbreiterung von 10 Hz.

Tab. 4.13: ^{31}P -NMR-Messungen von Ras(wt)•GTP γ S und Thr35-Mutanten im Komplex mit Effektoren. Die Messungen wurden bei 278 K durchgeführt. Zu 1,1-1,3 mM Ras-Lösungen im Messpuffer C wurde eine 7,2 mM Raf-RBD-Lösung titriert. Die Werte der chemischen Verschiebung und die Gleichgewichtskonstante $K_{12} = [2]/[1]$ wurden durch Angleichung von Lorentzlinien an die experimentellen Daten und Integration bestimmt.

Protein-Komplex	α -Phosphat	β -Phosphat		γ -Phosphat		K_{12}
	$\delta_{1,1'}$ /ppm	δ_1 /ppm	$\delta_{1'}$ /ppm	δ_1 /ppm	$\delta_{1'}$ /ppm	
Ras(wt)•Mg ²⁺ •GTP γ S	-11,30	-16,67		37,01		<0,1
+Raf-RBD	-11,19	-16,55		36,85		
Ras(T35S)•Mg ²⁺ •GTP γ S	-10,70	-17,22	-17,96	37,85	32,75	0,5
+Raf-RBD	-11,22	-16,52		-36,54		
Ras(T35A)•Mg ²⁺ •GTP γ S	-10,80	-17,19	-17,92	37,91	32,77	0,5
+Raf-RBD	-10,50	-17,36	-17,89	37,90	32,49	

Die Mutante Ras(T35A) stellte in den bisherigen Untersuchungen dieser Arbeit eine Art Negativkontrolle dar, da sie auch nach Effektorbindung weiterhin Resonanzlinien aufweist, deren chemische Verschiebungswerte denen des freien Zustands entsprechen. Deshalb wurden unter gleichen Messbedingungen auch ^{31}P -NMR-Spektren von Ras(T35A)•GTP γ S im freien und Raf-RBD-gebundenem Zustand aufgenommen. Im freien Zustand gleicht das Spektrum dem der Serin-Mutante, jedoch kann man hier im Gegensatz zum Spektrum der Serin-Mutante die kleine dritte Population nicht erkennen. Nach Zugabe der Effektor-RBD kommt es zwar zur Linienverbreiterung und zu leichten Verschiebungen der $\alpha_{11'}$, β_1 und $\gamma_{1'}$ -Phosphatlinie, jedoch bleiben beide Zustände erhalten und die Verschiebungen zeigen deutlich andere Werte als die des Wildtyp-Komplexes (Tab. 4.13). Es scheint als ob die Bindung des Effektors an Ras(T35A) keinen Einfluss auf die Orientierung und Koordination des Nukleotids hat. Das ist in sofern naheliegend, als dass bei dieser Mutante die Hydroxylgruppe fehlt, die eine Interaktion zum Metallion und somit die weitere Interaktion zwischen Hauptketten-Amid und dem γ -Phosphat erst ermöglicht.

4.3.2.2 Konformationelle Gleichgewichte von Ras(T35S)•GTP γ S

In Abb. 4.21A sind ^{31}P -NMR-Spektren von Ras(T35S)•GTP γ S dargestellt, die bei unterschiedlichen Temperaturen aufgenommen wurden. Während die Resonanzlinie des β -Phosphats wie zu erwarten mit steigender Temperatur schmaler wird,

verbreitern sich die beiden Resonanzlinien des α -Phosphats zunächst, ohne dass sich das Verhältnis der Populationen zu ändern scheint und verschmelzen bei hohen Temperaturen wiederum zu einer schmalen Linie im gewichteten Mittel der beiden Ausgangslinien. Die Resonanzlinien des γ -Phosphats zeigen im gemessenen Temperaturbereich nur eine starke Verbreiterung der einzelnen Linien. Selbst bei der hohen Temperatur von 303 K erscheint die γ -Phosphatlinie noch stark durch chemischen Austausch verbreitert.

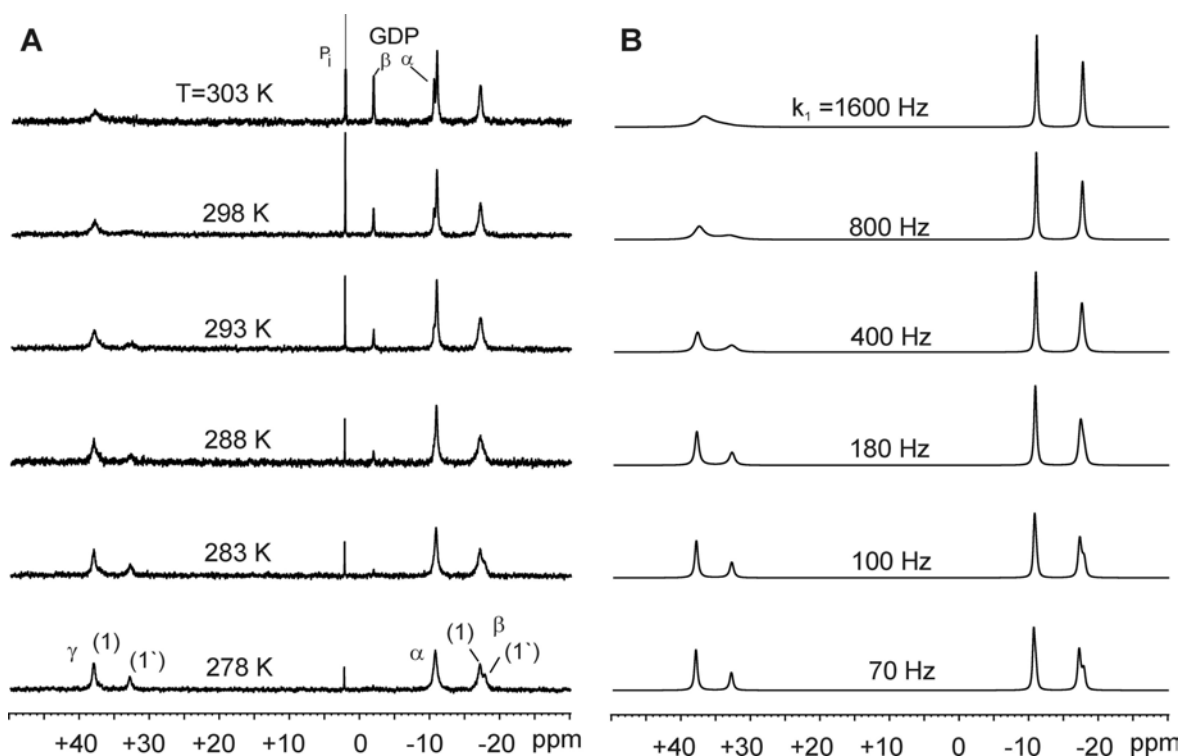


Abb. 4.21: ^{31}P -NMR-Spektren und Simulationen von Ras(T35S)•GTP γ S bei unterschiedlichen Temperaturen. **(A)** Experimentelle Spektren von 1,6 mM Ras(T35S)•GTP γ S in Messpuffer C. Die angegebenen effektiven Messtemperaturen wurden durch Messung der Differenz der chemischen Verschiebung des Hydroxyl-methylen von Ethylenglycol bestimmt (3.3.1.1). Die experimentellen Daten sind exponentiell gefiltert, was zu einer zusätzlichen Linienverbreiterung von 5 Hz führt. Die Anzahl der akkumulierten FIDs pro Spektrum beträgt 1600–3600. **(B)** Simulierte Spektren. Die Daten wurden wie in 3.3.1.3 beschrieben simuliert. Die berechneten Austauschraten k_1 sind angegeben.

In Abb. 4.21(B) sind die Simulationen der Spektren einer Temperaturreihe von Ras(T35S)•GTP γ S dargestellt, die in Zusammenarbeit mit G. Steiner (Regensburg) erhalten wurden. Bei der Linienformanalyse der Spektren dieser Temperaturreihe erhält man ähnliche Austauschraten wie bei Ras(wt)•GppNHp bzw. GppCH $_2$ p (Tab. 4.14). Dies verwundert nicht, da es sich hier wohl um einen

Austausch handelt, der auf der Orientierung und Koordination des an das γ -Phosphat gebundenen Schwefelatoms handelt. In Abb. 4.22 sind die Eyring-Auftragungen der Ergebnisse der drei Temperaturreihen dargestellt.

Bei diesem Experiment wird deutlich, dass es sich bei $\text{GTP}_{\gamma}\text{S}$, besonders bei höheren Temperaturen, um ein weniger stabiles GTP-Analogon handelt. Darüberhinaus fällt auf, dass aus der Hydrolyse von $\text{GTP}_{\gamma}\text{S}$ nicht Thiophosphat sondern freies Phosphat und H_2S freigesetzt werden. Weiterführende Untersuchungen hierzu werden in 4.6 beschrieben.

Tab. 4.14: Zusammenfassung der ermittelten Werte aus der Simulation der ^{31}P -NMR-Spektren von $\text{Ras}(\text{T35S})\cdot\text{GTP}_{\gamma}\text{S}$. Erläuterungen siehe Text.

T /K	k_1 /Hz	$k_{1'}$ /Hz	$K_1=k_{1'}/k_1$	ΔG^\ddagger /kJ mol $^{-1}$
276	50	99	0,51	58,5
278	70	138	0,51	58,1
283	100	194	0,51	58,4
288	180	346	0,52	58,1
293	400	759	0,53	57,2
298	800	1502	0,53	56,5
303	1600	2974	0,54	55,7

Die bei der Simulation der experimentellen Daten von $\text{Ras}(\text{T35S})\cdot\text{GTP}_{\gamma}\text{S}$ erhaltenen natürlichen Linienbreiten sind:

$$\begin{array}{lll}
 1/T_2(\alpha_1): 55 \text{ Hz} & 1/T_2(\beta_1): 70 \text{ Hz} & 1/T_2(\gamma_1): 65 \text{ Hz} \\
 1/T_2(\alpha_{1'}): 55 \text{ Hz} & 1/T_2(\beta_{1'}): 55 \text{ Hz} & 1/T_2(\gamma_{1'}): 60 \text{ Hz}
 \end{array}$$

Für die Enthalpie ΔH^\ddagger wurde hier 100 ± 3 kJ/mol und die Entropie $\Delta S^\ddagger = 146 \pm 8$ J/mol·K erhalten. Beide Werte sind ähnlich zu denen die für die $\text{Ras}(\text{wt})$ -Komplexe mit den beiden anderen GTP-Analoga gefunden wurden.

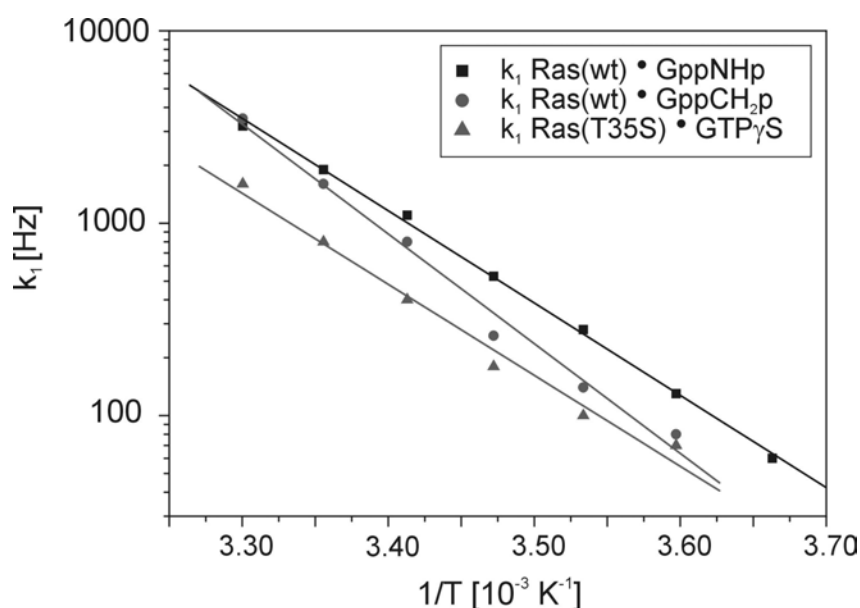


Abb. 4.22: Eyring-Auftragung der Austauschraten über der reziproken, absoluten Temperatur von Ras(wt) im Komplex mit Mg^{2+} •GppNHp bzw. Mg^{2+} •GppCH₂p und Ras(T35S)• Mg^{2+} •GTP γ S. Die Austauschraten k_1 wurden aus den NMR-Daten gewonnen und durch die Eyring Gleichung angepasst mit der Aktivierungsenthalpie ΔH^\ddagger und Aktivierungsentropie ΔS^\ddagger als freie Parameter. Die erhaltenen Werte sind in Tab. 4.15 zusammengefasst.

Tab. 4.15: Aktivierungsenthalpie ΔH^\ddagger und Aktivierungsentropie ΔS^\ddagger der verschiedenen konformationellen Übergänge bei Ras. ΔH^\ddagger und ΔS^\ddagger wurden aus der Auftragung (Abb. 4.22) über die Eyring-Gleichung erhalten.

Ras•Nukleotid-Komplex	ΔH^\ddagger (kJ/mol)	ΔS^\ddagger (J/mol·K)
Ras(wt)•GppNHp ¹	89 ± 2	102 ± 20
Ras(wt)•GppCH ₂ p	113 ± 4	194 ± 11
Ras(T35S)•GTP γ S	100 ± 3	146 ± 8

¹ aus Geyer et al. (1996)

4.3.3 Einfluss des gebundenen Nukleotids auf die Effektorbindung

Um einen möglichen Effekt des gebundenen Nukleotids auf die Affinität der Ras-Effektorbindung zu prüfen, wurden ITC-Messungen durchgeführt. Mit dieser kalorimetrischen Methode können die Bindungskonstanten zwischen Ras und Effektor-RBDs bestimmt werden, ohne dass Fluorophore wie mant-Nukleotide oder Mutationen des Ras-Proteins, wie z. B. Ras(Y32W), welche ebenfalls einen Einfluss auf die Effektorbindung haben könnten, erforderlich sind. In Abb. 4.23 ist die Titration von Ras(wt)•GppCH₂p mit Raf-RBD exemplarisch dargestellt. Die erhaltenen Ergebnisse sind in Tab. 4.16 zusammengefasst.

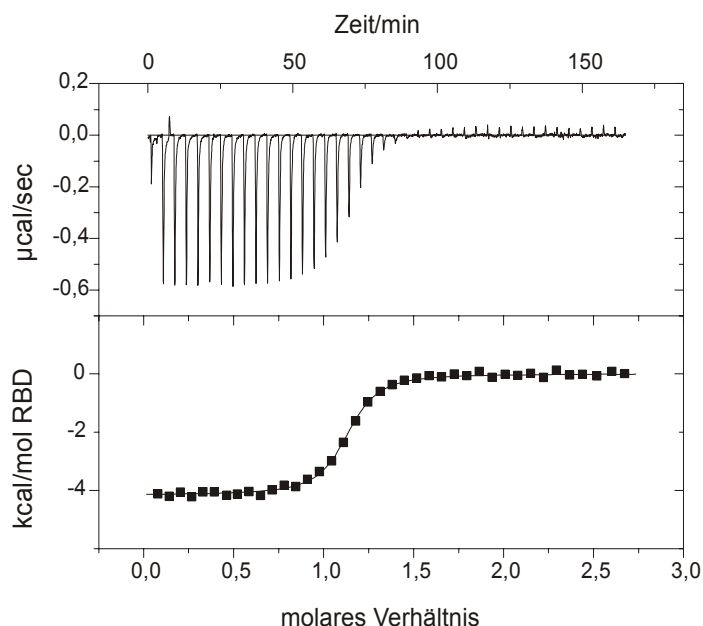


Abb. 4.23: ITC-Titration von Ras mit Raf-RBD. Die Messungen wurden bei 298 K durchgeführt. Zu einer 55 bzw. 73 μM Ras-Lösung wurde eine 0,6, 1,0 bzw. 1,5 mM Raf-RBD-Lösung titriert. Exemplarisch ist die Titration von Ras(wt)•GppCH₂p mit Raf-RBD dargestellt. Die obere Diagrammhälfte zeigt den Heizstrom der Messzelle im Verlauf der Titration. Der untere Teil des Diagramms zeigt die Auftragung der integrierten *Peak*flächen des oberen Graphen über dem molaren Verhältnis zwischen der Raf-RBD-Lösung und dem in der Messzelle vorgelegten Ras-Protein. Die Anpassung der experimentellen Daten erfolgte unter Annahme eines 1:1 Komplexes nach Wiseman *et al.* (1989). Hieraus lassen sich die Assoziationskonstante K_A und die Enthalpieänderung ΔH° der Komplexbildung direkt bestimmen.

Tab. 16: Assoziation zwischen Raf-RBD und unterschiedlichen Ras-Nukleotidkomplexen. 55 oder 73 μM Ras-Lösungen wurden in der Messzelle vorgelegt und mit einer 0,6, 1,0 bzw. 1,5 mM Raf-RBD-Lösung bei 298 K titriert. Die Daten wurden mittels Origin für ITC 2.9 unter Annahme der Komplexbildung im Verhältnis 1:1 nach Wiseman *et al.* (1989) analysiert. Die Fehlerangaben berücksichtigen die Standardabweichungen der Anpassung und die Differenz mehrerer durchgeführter Titrationsen.

Raf-RBD +	K_A [μM^{-1}]	ΔG^0 [kJ·mol ⁻¹]	ΔH^0 [kJ·mol ⁻¹]	$T\Delta S^0$ [kJ·mol ⁻¹]
Ras(wt)•Mg ²⁺ •GppNHp	2,50 ± 0,4	-36,5 ± 0,6	-13,4 ± 1,5	23,1 ± 2,1
Ras(wt)•Mg ²⁺ •GppCH ₂ p	2,50 ± 0,4	-36,5 ± 0,6	-18,4 ± 2,0	18,1 ± 2,6
Ras(wt)•Mg ²⁺ •GTP _γ S	2,44 ± 0,6	-36,4 ± 0,9	-7,5 ± 1,5	28,9 ± 2,4
Ras(T35S)•Mg ²⁺ •GppNHp	0,12 ± 0,04	-29,0 ± 0,06	-9,7 ± 1,0	19,3 ± 1,1
Ras(T35S)•Mg ²⁺ •GppCH ₂ p	0,09 ± 0,04	-28,2 ± 0,06	-15,3 ± 1,5	12,9 ± 1,6
Ras(T35S)•Mg ²⁺ •GTP _γ S	0,18 ± 0,04	-30,0 ± 0,06	-13,6 ± 1,5	16,4 ± 1,6

Um signifikante ΔH° -Unterschiede zu erhalten, sind für die Messungen Temperaturen von über 293 K erforderlich. Bei 298 K wurden für die unterschiedlichen Ras(wt)-Nukleotid-Komplexe keine deutlichen Unterschiede in der Affinität zur Raf-RBD festgestellt. Die ermittelten K_A -Werte liegen alle bei etwa $2,5 \mu\text{M}^{-1}$. Für die T35S-Mutante liegen die auf gleiche Weise ermittelten K_A -Werte alle etwa um eine Größenordnung niedriger. Bei den Messungen der Thr-Mutante sind die Unterschiede ebenfalls nicht sehr deutlich, jedoch kann man hier in soweit eine Tendenz feststellen, dass die Affinität zwischen Raf-RBD und Ras(T35S)•GTP γ S am höchsten ist. Im GppNHp-Komplex liegt die Assoziationskonstante um den Faktor 1,5 und im GppCH $_2$ p-Komplex um den Faktor 2 niedriger als im GTP γ S-gebundenen Zustand der Mutante.

Während die Änderungen der freien Energie bei der Bindung von Raf-RBD an die verschiedenen Ras-Nukleotidkomplexe ähnlich sind, gemäß der geringen Änderungen in der Affinität, kann man deutliche Unterschiede in den Beiträgen der Enthalpie und Entropie erkennen, die sich gegenseitig kompensieren (Tab. 4.16).

4.4 ^{31}P -NMR-Spektroskopie an Ras•GTP

Neben der Untersuchung von GTP-Analoga, die eine weitverbreitete Anwendung sowohl in der Strukturbestimmung, als auch in Bindungsstudien finden, ist es von besonderem Interesse, auch das Verhalten des physiologisch relevanten Ras•GTP-Komplexes genauer zu betrachten. Die ^{31}P -NMR-spektroskopischen Untersuchungen zeigen, dass sich Ras(wt) im GTP-gebundenen Zustand wie im Komplex mit GTP γ S verhält. Es zeigt für jedes Phosphat jeweils nur eine definierte Resonanzlinie, auch wenn kein Effektorprotein gebunden ist (Abb. 4.24A u.). Alle drei Resonanzlinien erfahren durch die Effektor-Bindung keine deutliche Änderung der chemischen Verschiebungen, die auf eine Änderung der Struktur oder der Dynamik des Ras-Proteins hindeuten würden (Abb. 4.24B u.).

Die T35A-Mutante zeigt ebenfalls nur drei Resonanzlinien, die sich in ihren chemischen Verschiebungen deutlich von denen des Wildtyps unterscheiden. Wie auch im Fall der GppNHp-gebundenen Form, kommt es hier zu keinen deutlichen Änderungen der chemischen Verschiebung nach Bindung von Raf-RBD bzw. RalGDS-RBD, sondern wiederum nur zu Linienverbreiterungen bei der Bindung von Raf-RBD (Tab. 4.17).

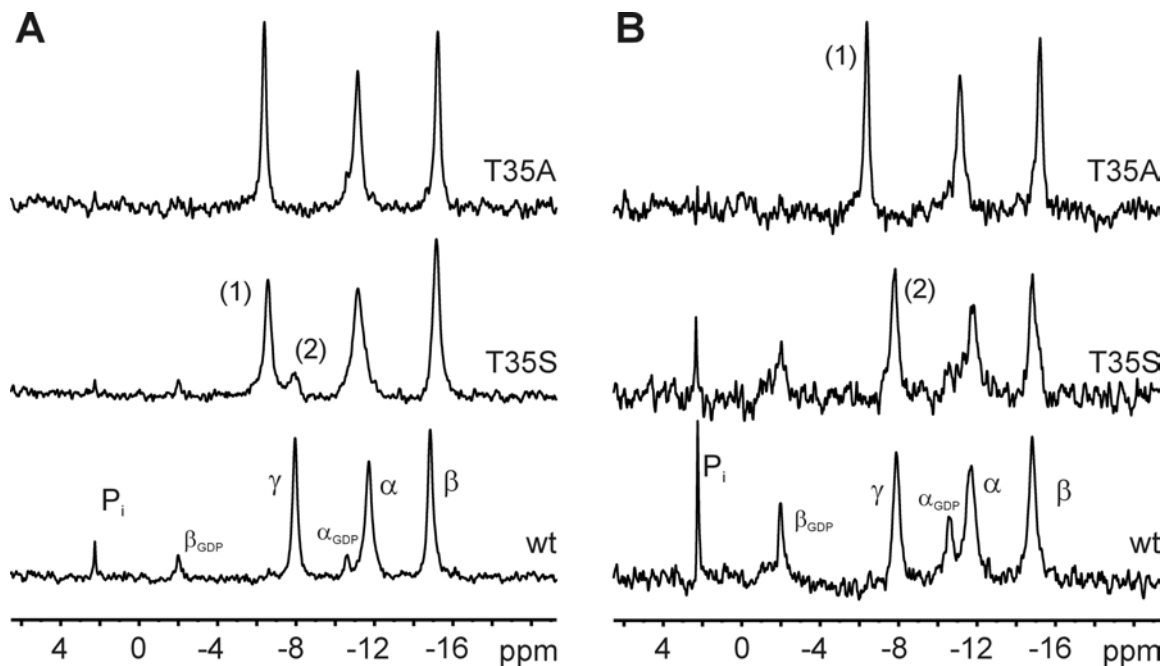


Abb. 4.24: ^{31}P -NMR-Spektren von Ras(wt) und T35-Mutanten in der GTP-gebundenen Form. (A) 1 mM Lösungen von Ras(wt), (T35S) und (T35A) gebunden an GTP im Standardpuffer. (B) Komplex zwischen RalGDS-RBD und Ras•GTP. Die Ras-Varianten sind angegeben. Zu 1 mM Ras•GTP wurden hochkonzentrierte RBD-Lösungen (5-7 mM) bis zu einem Verhältnis RBD:Ras von 1,5:1 bei (wt) bzw. (T35S)Ras und 2:1 bei Ras(T35A) titriert. Die Spektren wurden bei 278 K aufgenommen und exponentiell gefiltert. Das führt zu einer zusätzlichen Linienbreite von 15 Hz.

Anders verhält sich die T35S-Mutante, die auch in diesem Fall eine Mittelstellung einnimmt. Im freien, also nicht-Effektor-gebundenen Zustand, zeigt das Spektrum eine Aufspaltung der Resonanzlinien, die zum einen chemische Verschiebungswerte der Alanin-Mutante aufweisen, jedoch zu 26 % auch Linien mit Verschiebungswerten zeigt, die denen des Wildtyps gleichen. Dies wird besonders im Fall des γ -Signals deutlich sichtbar. Nach Effektorbindung wird das Gleichgewicht völlig zu den Werten verschoben, die denen des Wildtyp-Effektor-Komplexes entsprechen. Es scheint also, dass sich die Serin-Mutante im physiologisch relevanten GTP-gebundenen Komplex bereits ohne gebundenes Effektorprotein zu einem deutlichen Anteil in der Wildtyp-ähnlichen Konformation befindet.

Tab. 4.17: ^{31}P -NMR-Messungen von Ras(wt)•GTP und Thr35-Mutanten im Komplex mit Effektoren. Zu 0,9-1,3 mM Ras in Messpuffer C wurden hochkonzentrierte RBD-Lösungen zutitriert. Die Messungen wurden bei 278 K durchgeführt. Die Werte der chemischen Verschiebung und die Gleichgewichtskonstante $K_{12} = [2]/[1]$ wurden durch Angleichung von Lorentzlinien an die experimentellen Daten bestimmt.

Protein-Komplex	α -Phosphat		β -Phosphat		γ -Phosphat		K_{12}
	δ_1/ppm	δ_2/ppm	δ_1/ppm	δ_2/ppm	δ_1/ppm	δ_2/ppm	
Ras(wt)•Mg ²⁺ •GTP		-11,71		-14,85		-7,95	>0,8
+Raf-RBD		-11,58		-14,81		-8,08	
+RalGDS-RBD		-11,68		-14,86		-7,91	
Ras(T35S)•Mg ²⁺ •GTP	-11,21		-15,18		-6,60	-7,92	0,4
+Raf-RBD		-11,59		-14,78		-8,00	
+RalGDS-RBD		-11,81		-14,85		-7,81	
Ras(T35A)•Mg ²⁺ •GTP	-11,14		-15,23		-6,39		<0,1
+Raf-RBD	-10,67		-15,31		-6,37		
+RalGDS-RBD	-11,16		-15,24		-6,37		

4.5 Hochfeld-EPR an Ras-Triphosphat-Komplexen

Parallel zu den ^{31}P -NMR-Untersuchungen an Ras-Triphosphat-Komplexen wurden in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von T. Prisner (Frankfurt) EPR-Untersuchungen an Ras im Komplex mit Mn²⁺•GppNHp und Mn²⁺•GTP γ S durchgeführt. Im Gegensatz zu den Spektren der Ras•GDP-Komplexe sind in denen der Triphosphat-Komplexe die Mn²⁺-Hyperfeinlinien bereits in H₂¹⁶O deutlich breiter (Abb. 4.25). Außerdem ist in den Messungen, die in H₂¹⁷O durchgeführt wurden, im Gegensatz zu denen der Ras•GDP-Komplexe die nur teilweise Verbreiterung der Mn²⁺-Linien nicht aufgelöst, was die Simulation eindeutiger und signifikanter machen würde.

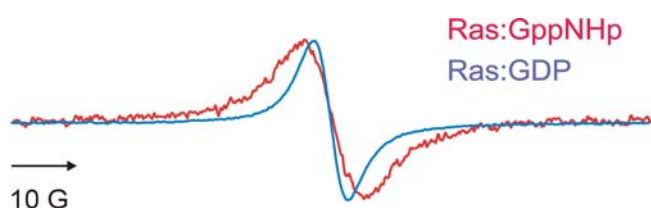


Abb. 4.25: HF-EPR am Ras-Di- und Tri-Phosphatkomplex. 1 mM Ras(wt) im Mn²⁺•GDP bzw. Mn²⁺•GppNHp-Komplex in Messpuffer A (H₂¹⁶O) wurden bei 295 K an einem EPR-Spektrometer (95 GHz) vermessen. Gezeigt ist jeweils die $m_I = -1/2$ Linie.

Es wurden Simulationen der experimentellen Spektren von Ras-Proben in H_2^{17}O durchgeführt, wobei unterschiedliche ganzzahlige Anzahlen von Wasserliganden des Mn^{2+} -Ions als Parameter eingesetzt wurden. Dabei fiel auf, dass die Residuen zwischen den Simulationen und der experimentellen Spektren, unabhängig von der Anzahl der angenommenen Wasserliganden, ähnlich klein waren. Andere freie Parameter, wie die ^{17}O -Kopplungskonstante glichen durch Anpassung diese Effekte aus. Für eine genaue Auswertung müssen bei diesen Spektren weitere Parameter durch direkte Messung, wie z. B. durch ENDOR-Experimente, bestimmt werden und als konstante Werte in der Simulation eingesetzt werden. Man kann jedoch bereits an den Simulationen mit freien Parametern deutlich erkennen, dass es Unterschiede in der Mn^{2+} -Koordination zwischen Ras(wt) im Komplex mit GppNHp und $\text{GTP}\gamma\text{S}$ geben muss (Abb. 4.26). Während man die genaue Anzahl der Wassermoleküle, die an das Mn^{2+} -Ion im jeweiligen Komplex binden, hier nicht abschätzen kann, erkennt man bei diesen vorläufigen Simulationen, dass die Anzahl der Wasserliganden bei Ras(wt)• $\text{GTP}\gamma\text{S}$ niedriger ist, als bei Ras, wenn es im Komplex mit GppNHp vorliegt.

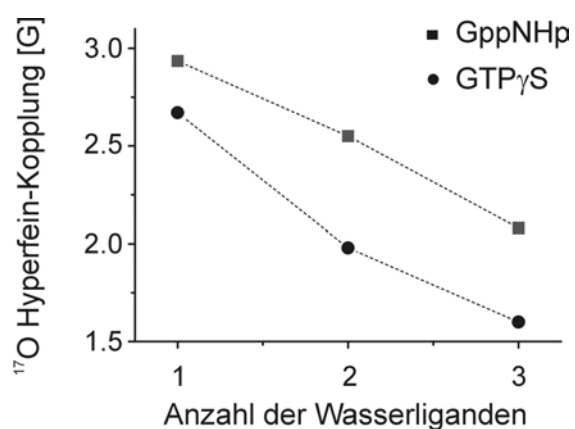


Abb. 4.26: Mittels Simulation berechnete ^{17}O -Hyperfeinkopplungskonstanten bei unterschiedlicher Anzahl von Wasserliganden. Die experimentellen Daten von 1 mM Ras(wt)•GppNHp bzw. Ras(wt)• $\text{GTP}\gamma\text{S}$ in 40 mM HEPES/NaOH pH 7,4/ 2 mM DTE/ 46,3 % H_2^{17}O wurden simuliert, wie in 3.3.2.2 beschrieben. Dabei konnten alle Parameter frei variieren.

4.6 Ras•GDP• BeF_3^- zur Darstellung des Triphosphat-Komplexes

Berylliumfluorid ist neben Aluminiumfluorid ein weiteres Phosphat-Analogon, welches in Untersuchungen von Nukleotidbindenden-Proteinen verwendet wird, um den Triphosphat-gebundenen Zustand des Proteins in Proteinkomplexen dar-

zustellen. Dabei befinden sich die Nukleotid-bindenden Proteine in der GDP-gebundenen Form und BeF_3^- initiiert die γ -Phosphatgruppe.

Im nachfolgenden ^{31}P -NMR-Experiment wurde zu einer $\text{Ras}(\text{wt})\cdot\text{GDP}$ -Lösung zunächst NaF_2 im 10fachen Überschuss zugegeben. Dies hatte keinerlei Auswirkung auf die Phosphor-Resonanzlinien. Erst bei der Titration dieser Probe mit BeCl_2 begannen beide Signale abhängig von der zugegebenen BeCl_2 -Konzentration in Resonanzlinien mit deutlich anderen chemischen Verschiebungen überzugehen. Die Affinität scheint jedoch im millimolaren Bereich zu liegen, da auch durch einen zweifachen Überschuss an BeCl_2 nur etwa 50 % des Ras-Proteins in den Komplex überführt werden konnte. Bei Zugabe von Raf-RBD verschwinden die Resonanzlinien des freien $\text{Ras}\cdot\text{GDP}$ und das Gleichgewicht liegt vollständig auf der Seite des $\text{Ras}\cdot\text{GDP}\cdot\text{BeF}_3^-\cdot\text{RBD}$ -Komplexes. Durch die Bindung der RBD werden die Phosphatlinien des $\text{Ras}\cdot\text{GDP}\cdot\text{BeF}_3^-$ -Komplexes verbreitert. Die Werte der chemischen Verschiebung ändern sich jedoch nur im Rahmen der Fehlergenauigkeit. Sie sind in Tab. 4.18 zusammengefasst.

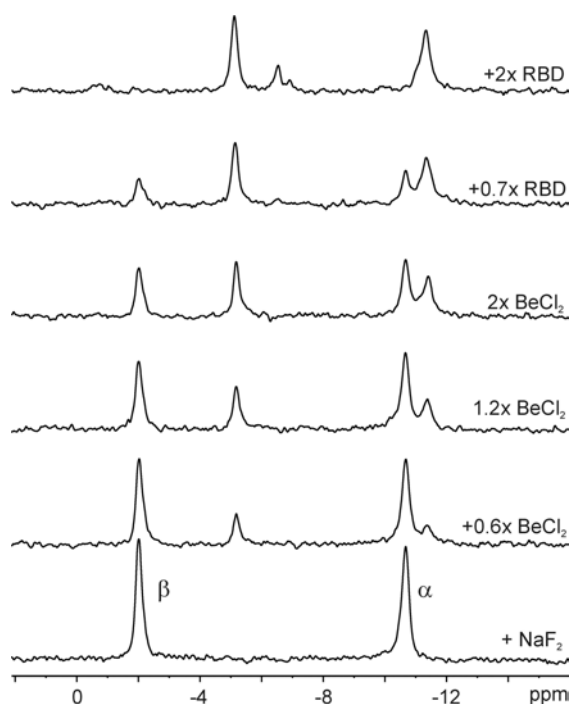


Abb. 4.27: Komplexbildung zwischen $\text{Ras}\cdot\text{GDP}\cdot\text{BeF}_3^-$ und Raf-RBD. Zu 1 mM $\text{Ras}(\text{wt})\cdot\text{GDP}$ in Messpuffer B wurden 10 mM NaF_2 gegeben (unten), anschließend wurde bis zu einer Konzentration in der Probe von 0,6, 1,2, bzw. 2 mM BeCl_2 titriert. In die gleiche Probe wurden in einer weiteren Titration 0,7 und 2 mM Raf-RBD zugegeben. Die ^{31}P -NMR-Spektren wurden bei 298 K aufgenommen. Es sind die Verhältnisse der zugegebenen Substanzen relativ zur Ras-Konzentration angegeben. Die Linien sind exponentiell gefiltert. Das führt zu einer zusätzlichen Linienbreite von 15 Hz.

Tab. 4.18: ^{31}P -NMR-Daten der Komplexbildung zwischen Ras(wt)•GDP, BeF_3^- und Raf-RBD. Zu 1 mM Ras(wt)•GDP in Messpuffer B wurden 10 mM NaF_2 gegeben und mit BeCl_2 bis zu einem 2fachen Überschuss titriert. In die gleiche Probe wurde in einer weiteren Titration Raf-RBD ebenfalls bis zu einem 2fachen Überschuss zugegeben. Die Messung wurde bei 298 K durchgeführt. Von der β -Phosphatlinie wurde nur die chemische Verschiebung des höher besetzten Zustands angegeben. Das Besetzungsverhältnis der beiden Populationen veränderte sich während der Titration nicht.

Protein	α -Phosphat δ/ppm	β -Phosphat δ_1/ppm
Ras(wt)• Mg^{2+} •GDP	-10,67	-2,02
+ NaF_2	-10,67	-2,02
+ BeF_3^-	-11,40	-5,19
+Raf-RBD	-11,32	-5,12

4.7 Hydrolyseeigenschaften von Ras(T35S)

Es wurde bereits gezeigt, dass Ras(T35A) bei 310 K eine etwa 4-5fach langsamere intrinsische Hydrolyserate als der Wildtyp aufweist (John *et al.*, 1993). Um zu überprüfen, ob die Mutation des Thr35 zu Alanin bzw. Serin neben dem Einfluss auf die Effektorbindung auch Auswirkungen auf die intrinsische und/oder GAP-katalysierte Hydrolyse zeigt, wurden die Hydrolyseraten von Ras(wt), Ras(T35S) und Ras(T35A) unter gleichen Bedingungen bestimmt. Zunächst wurde die intrinsische Hydrolyserate bei 310 K mittels HPLC ermittelt. Die Hydrolyse von freiem GTP wurde unter gleichen Bedingungen mitverfolgt, konnte aber im Messungszeitraum vernachlässigt werden. Die beobachteten Hydrolyseraten bei Ras(wt) von $0,0290 \text{ min}^{-1}$ und bei Ras(T35A) von $0,0064 \text{ min}^{-1}$, stimmen mit den bereits veröffentlichten Daten überein (John *et al.*, 1993). Die auf gleiche Weise bestimmte Rate für Ras(T35S) liegt mit $0,0106 \text{ min}^{-1}$ etwa um den Faktor 3 niedriger als die des Wildtyps, ist aber 1,7 mal höher als die der Alanin Mutante (Abb. 4.28).

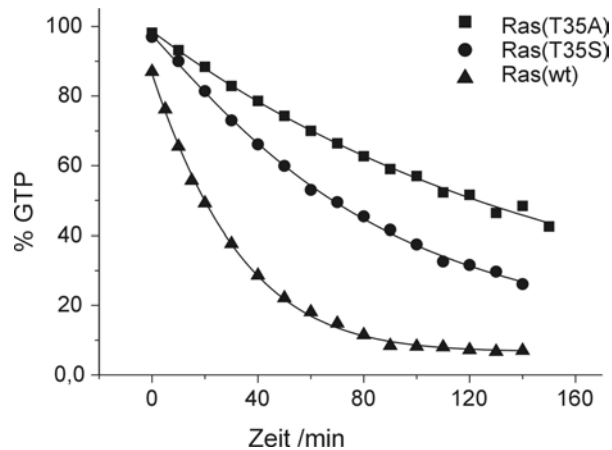


Abb. 4.28: GTP-Hydrolyse von Ras(wt) und zwei Thr35-Mutanten. Von Ras(wt), (T35S) und (T35A) wurden die intrinsischen Hydrolyseraten bei 310 K mittels C18 *reversed phase*-HPLC verfolgt. Aufgetragen ist der Anteil GTP des an Ras gebundenen Nukleotids über der Inkubationsdauer. Den Kinetiken wurden einfach-exponentielle Funktionen angepasst und die Ratenkonstanten bestimmt.

Um einen qualitativen Vergleich zur GAP-Induzierbarkeit der Ras-Mutanten zu erhalten, wurde zu den verschiedenen Ras-Lösungen gleicher Konzentration (100 μM) dieselbe Menge einer NF1-333-Lösung zugegeben. Dabei lag NF1-333 gegenüber Ras etwa im 400fachen molaren Überschuss vor. Die Kinetik wurde über die Zeit bei 298 K mittels HPLC-Analyse verfolgt. Während sich die GTPase-Aktivität von Ras(T35A) durch NF1-333 nicht beschleunigen lässt, zeigte Ras(T35S) unter gleichen Bedingungen eine höhere Hydrolyserate als der Wildtyp. Weiterhin fällt auf, dass die Kinetik der Hydrolyse, die sich aus dem intrinsischen und dem GAP-induzierten Anteil zusammensetzt, unter diesen Messbedingungen bei Ras(wt) einer linearen Beziehung folgt, während sie sich im Fall der Ras(T35S)-Mutante durch eine einfach-exponentielle Funktion beschreiben lässt.

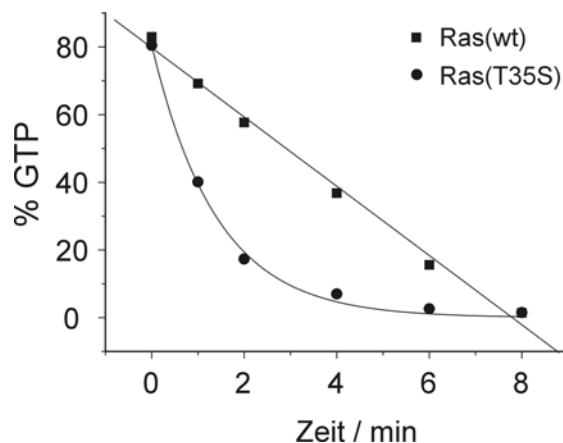


Abb. 4.29: GAP-beschleunigte GTP-Hydrolyse von Ras. 100 μM Ras•GTP in Messpuffer C wurden mit einem gegenüber Ras 400fachen molaren Überschuss NF1-333 versetzt und bei 298 K der prozentuale Anteil des GTP am Gesamtnukleotid über HPLC mitverfolgt.

4.8 Hydrolyse von $\text{GTP}_{\gamma}\text{S}$

Bei ^{31}P -NMR-Messungen an Ras• $\text{GTP}_{\gamma}\text{S}$ -Komplexen über längere Zeit oder bei höherer Temperatur fiel auf, dass bei der langsam stattfindenden Hydrolyse des $\text{GTP}_{\gamma}\text{S}$, nicht gebundenes GDP und freies Thiophosphat resultierten, sondern

dass anstelle von Thiophosphat freies Phosphat und H_2S entstanden. Für diese Reaktion sind zwei Schritte notwendig: die Abspaltung des Schwefel-Atoms von der Phosphatgruppe und die Hydrolyse des γ -Phosphats, bzw. des γ -Thiophosphats vom Nukleotid. Dabei ist die Reihenfolge der beiden Reaktionen unklar.

Die schmale Resonanzlinie des freien Phosphats kann bereits nach Akkumulation weniger FIDs in relativ kurzer Messzeit detektiert werden, so dass langsam ablaufende Kinetiken mittels ^{31}P -NMR-Spektroskopie verfolgt und untereinander verglichen werden können. In diesen Experimenten wurden je 400 FIDs über eine Messzeit von etwa 1 h akkumuliert.

Es konnte gezeigt werden, dass Thiophosphat in Messpuffer B bei einer Temperatur von 293 K stabil ist, jedoch durch die Anwesenheit von Ras(wt) in der GDP oder GppNHp- gebundenen Form in H_2S und Phosphat gespalten wird. Daraufhin wurde untersucht, inwieweit verschiedene Nukleotide, Proteine und Ras-Mutanten in der Lage sind diese Reaktion zu katalysieren. Hierzu wurden 5 mM Thiophosphat in Messpuffer B vorgelegt und jeweils zu einer Endkonzentration von 100 μM verschiedene Nukleotide, Ras-Proteine aber auch nicht-Nukleotid-bindende Proteine, zugegeben und die Entstehung freien Phosphats über ^{31}P -NMR-Spektroskopie verfolgt. Von den nicht-Nukleotid-bindenden Proteinen wurden entsprechend der Ras-Konzentration 2 mg/ml eingesetzt.

In Tab. 4.19 sind die getesteten Proteine und Nukleotide mit den jeweils bestimmten Effekten zusammengefasst. Da diese Methode eher qualitative Ergebnisse liefert, wurde eine grobe Einteilung gemäß ihrer Hydrolyseaktivität in drei Gruppen getroffen.

Tab 4.19: Hydrolyse von Thiophosphat: Aktivität verschiedener Nukleotide, Proteine und Protein-Nukleotid-Komplexe. Zu 5 mM Thiophosphat in Messpuffer B wurden verschiedene Nukleotide, Proteine und Protein-Nukleotid-Komplexe zu einer Endkonzentration von 100 μM zugegeben. Bei Aprotinin, BSA und Raf-RBD betrug die Konzentration entsprechend zu 100 μM Ras etwa 2 mg/ml. Diese langsamen Kinetiken wurde bei 293 K mitverfolgt. Dabei wurde mittels ^{31}P -NMR-Spektroskopie die Konzentration des freien Phosphats in Abhängigkeit von der Zeit bestimmt. Den so erhaltenen Messpunkten wurden einfach-exponentielle Funktionen angepasst und die jeweilige Ratenkonstante bestimmt.

Thiophosphat-Hydrolyse	hoch ($> 1 \cdot 10^{-3} \text{ min}^{-1}$)	gering ($< 1 \cdot 10^{-4} \text{ min}^{-1}$)	keine ($< 1 \cdot 10^{-5} \text{ min}^{-1}$)
Protein / Nukleotid	Ras(wt)•GDP Ras(wt)•GppNHp Ras(wt)•GppNHp•Raf	Ran(wt)•GDP Ras(wt)•GDP + EDTA Ras(T35S)•GppNHp Ras(T35S)•GppNHp•RBD Raf-RBD	ohne Zusatz GDP / GppNHp Ras(T35A)•GppNHp Ras(V29G/I36G)•GppNHp Aprotinin / BSA

5 Diskussion

5.1 Mn^{2+} -EPR-Spektroskopie an Guaninnukleotid-bindenden Proteinen

Um Proteine EPR-spektroskopischen Untersuchungen zugänglich zu machen, benötigt man ein paramagnetisches Zentrum, wie man es z. B. bei Enzymen der mitochondrialen Atmungskette findet, die Übergangsmetalle als Cofaktoren gebunden haben. Dies ist bei Guaninnukleotid-bindenden Proteinen unter physiologischen Bedingungen nicht der Fall. Hier bietet es sich jedoch an, das im aktiven Zentrum gebundene Mg^{2+} -Ion durch ein Mn^{2+} -Ion zu ersetzen, wie es bereits an Ras-Proteinen und anderen Guaninnukleotid-bindenden Proteinen, wie z. B. einem Faktor der Proteinbiosynthese EF-Tu von *Bacillus Thermophilus* (Kalbitzer *et al.*, 1984) durchgeführt wurde. Wie von Schweins *et al.* (1996) gezeigt, hat der Austausch des im Ras-Nukleotidkomplex gebundenen Mg^{2+} -Ions durch ein Mn^{2+} -Ion nur geringe Auswirkungen auf die Struktur des $\text{Ras(G12P)} \cdot \text{GppCH}_2\text{p}$ -Komplexes. In den physiologischen Eigenschaften wurde für diesen Komplex jedoch eine etwa 4fach erhöhte intrinsische und 8fach erhöhte GAP-beschleunigte Hydrolyse über der des Mg^{2+} -gebundenen Ras gefunden (Schweins *et al.*, 1997). Ähnliche Effekte auf die intrinsische Hydrolyse wurden auch bei den Ras-verwandten Proteinen Rap und Ran gefunden. Dieser Effekt wird der Erhöhung des pK_a -Wertes des γ -Phosphats zugeschrieben, welches an das Metallion gebunden ist. Dabei wird dem γ -Phosphat selbst die Rolle als Base innerhalb der Reaktion des nukleophilen Angriffs eines Wassermoleküls zugeschrieben (Schweins *et al.*, 1997).

Für die hier durchgeführten strukturellen Untersuchungen, sollten die Ergebnisse, die man durch die EPR-Messungen erhält, gut mit denen aus der NMR-Spektroskopie vergleichbar sein. Im Unterschied zu den NMR-Untersuchungen kann den EPR-Proben kein Überschuss des Metallions zugegeben werden, dennoch sollte die Affinität zwischen Mn^{2+} und dem Ras-Nukleotidkomplex groß genug sein, um bei millimolarer Konzentration nahezu vollständig als Protein $\cdot\text{Mn}^{2+}$ -Nukleotidkomplex vorzuliegen. Charakteristische Linien im EPR-Spektrum, die auf freies Mn^{2+} oder freien Mn^{2+} -Nukleotidkomplex in den Proben hindeuten würden, wurden nicht erhalten.

5.2 Untersuchung von Ras•GDP-Komplexen in Lösung

Die innerhalb dieser Arbeit durchgeführten Hochfeld-EPR- sowie auch die ^{31}P -NMR-Untersuchungen haben gezeigt, dass verschiedene Varianten des Ras-Proteins, wie es bereits bei der GppNHp-gebundenen Form von Geyer *et al.* (1996) gefunden wurde, auch in der GDP-gebundenen Form in mindestens zwei unterschiedlichen Konformationen vorliegen. In dieser Arbeit wurden Ras(wt), zwei Thr35-Mutanten und die onkogene Mutante Ras(G12V) in der GDP-gebundenen Form untersucht. NMR-Spektren von Messungen bei unterschiedlichen Temperaturen zeigen, dass Ras(G12V) nur in einer Konformation vorzukommen scheint, während Ras(wt) und die beiden Thr35-Mutanten mindestens zwei überlagerte Resonanzlinien des β -Phosphats aufweisen.

Im Fall der Alanin-Mutante ist das Signal des β -Phosphats deutlich in zwei Linien aufgespalten. Hier konnte im Gegensatz zu den ^{31}P -NMR-Untersuchungen an Ras(wt)•GppNHp jedoch kein Übergang eines -relativ zur NMR-Zeitskala- langsamen in einen schnellen chemischen Austausch zwischen den beiden Zuständen gezeigt werden, wenn die Temperatur erhöht wurde. Durch die Erhöhung der Messtemperatur auf bis zu 313 K wurden die Linien nicht weiter verbreitert, was einen allenfalls langsamen Austausch vermuten lässt. Wenn man annimmt, dass die Linienbreite ausschließlich durch die Austauschverbreiterung bestimmt ist, kann für den Austausch eine Ratenkonstante bei Ras(T35A) mit $k_1 = 40 \text{ s}^{-1}$ abgeschätzt werden. Die wirkliche Ratenkonstante sollte aber deutlich kleiner sein, da die Linienbreiten von gebundenen Nukleotiden in der ^{31}P -NMR-Spektroskopie ziemlich groß sind. Wenn man die sehr schmale β -Phosphatlinie von Ras(G12V)•GDP betrachtet und sie als Abschätzung für eine nicht Austausch-verbreiterte Linienbreite heranzieht, erhält man für die T35A-Mutante bei Raumtemperatur eine Austauschrate von etwa 3 s^{-1} . Bei dieser langsamen Rate wird die leicht zunehmende Austauschverbreiterung bei Temperaturerhöhung, durch die Änderung der rotatorischen Korrelationszeit kompensiert.

Bei Ras(wt) und den beiden Thr35-Mutanten tritt der zweite Zustand, der durch die zu niedrigerer Frequenz verschobene Resonanzlinie des β -Phosphats charakterisiert ist, in einem unterschiedlichen Besetzungsverhältnis der beiden Populationen auf. Während für die Alanin-Mutante eine Gleichgewichtskonstante K_{12} von etwa 0,5 erhalten wurde, lagen diese Werte bei Ras(wt) und der Serin-Mutante etwa bei 0,2- 0,3. Für die onkogene Mutante Ras(G12V) konnte unter Berücksichtigung des Rauschens mit $<0,05$ nur eine obere Grenze angegeben werden. Die Auswertung der Spektren ist jedoch mit einem großen Fehler behaftet, da die

chemischen Verschiebungswerte, sowie auch die Linienbreiten besonders des zweiten Zustands durch die Überlagerung der beiden Linien nur schwer abzuschätzen sind. Gleiche Werte für die chemische Verschiebung müssen nicht zwangsläufig die gleiche chemische Umgebung darstellen. Beim Vergleich von Mutanten, bei denen die Mutation in unmittelbarer Nähe zu den Phosphatgruppen liegt, ist es ebenfalls schwierig abzuschätzen, inwieweit die Änderung des Signals direkt der mutierten Aminosäure oder einer durch die Mutation veränderten Konformation in der Nähe des detektierten Phosphats zuzuschreiben ist.

Für die GDP-gebundene Form von Cdc42 wurden kürzlich von Zhao *et al.* (2002) auf Grund der Ergebnisse aus Fluoreszenz-, EPR- und NMR-Untersuchungen ebenfalls zwei unterschiedliche Nukleotid-Bindungszustände des GDP postuliert. Hier wurden in ^{31}P -NMR-Experimenten zwei Paare von Resonanzlinien für gebundenes GDP gefunden. Die Signale eines dieser Paare zeigen sehr ähnliche Werte der chemischen Verschiebung, wie die Resonanzlinien des freien $\text{Mg}^{2+}\cdot\text{GDP}$ -Komplexes. Der weniger besetzte Zustand scheint empfindlicher auf die Zugabe von Harnstoff zu reagieren und somit weniger stabil zu sein als der andere Zustand.

Die in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von T. Prisner (Frankfurt) durchgeführten EPR-Untersuchungen an Ras(wt), (T35S), (T35A) und (G12V) im Komplex mit $\text{Mn}^{2+}\cdot\text{GDP}$ ließen auf Unterschiede in der Koordination des Metallions schließen. Zunächst wurden die bei Raumtemperatur aufgenommenen Spektren unter der Annahme einer unterschiedlichen ganzzahligen Anzahl an Wasserliganden des Metallions simuliert. Die besten Simulationen wurden erhalten, wenn für Ras(wt) und die T35S-Mutante drei Wasserliganden des Metallions angenommen wurden, während bei Ras(T35A) und der onkogenen Mutante G12V vier gebundene Wassermoleküle die besten Resultate lieferten. Das Fehlen der Hydroxylgruppe des Thr35 führt somit zu einem weiteren Wasserliganden des Metallions. Gemäß der Kristallstruktur, sollte Thr35 jedoch keinen direkten Kontakt zum Metallion ausbilden.

Auf Grund der Ergebnisse aus der ^{31}P -NMR wurden die Simulationen der EPR-Spektren wiederholt, wobei nun auch die Mischung zwischen drei und vier Wasserliganden des Metallions als freier Parameter in der Simulation zugelassen wurde. Dabei korrelieren die Verhältnisse der abgeschätzten Gleichgewichtskonstanten aus den NMR-Experimenten mit den Verhältnissen der gebundenen Anzahl an Wassermolekülen. Während Ras(T35A) mit einer durchschnittlichen Wasserligandenzahl von 3,8 vorliegt, erhält man in der ^{31}P -NMR-Spektroskopie das Vorhandensein der zweiten Konformation, die hier mit $K_{12} = 0,49$ im Vergleich zu

den anderen hier untersuchten Ras-Varianten am höchsten besetzt war. Dagegen zeigt das Metallion im Ras(wt) und (T35S)•GDP-Komplex mit 3,03 und 3,06 eine nahezu einheitliche Koordination zu 3 Wassermolekülen. Hier findet man die Populationen des zweiten Zustands mit 0,3 und 0,2 ebenfalls deutlich weniger besetzt. Es wurde versucht, die Anzahl der freien Parameter für diese Simulation zu begrenzen, indem die Parameter des Nullfeldtensors D und E, sowie die Superhyperfein-Kopplung zum β -Phosphat aus den H_2^{16}O -Simulationen übernommen und als feste Parameter eingesetzt wurden. Eine weitere Verbesserung könnte man erreichen, indem die Superhyperfein-Kopplungskonstante zwischen Mn^{2+} und H_2^{17}O unter gleichen Bedingung in ENDOR-Experimenten festgelegt würde.

Sowohl Mg^{2+} als auch Mn^{2+} können sechs Bindungen eingehen. Das bedeutet, dass drei bzw. zwei Bindestellen durch Interaktionen mit dem Protein oder Nukleotid besetzt sein sollten. Bei Betrachtung der Daten aus der Röntgenkristallographie findet man als einen Liganden einen Sauerstoff des β -Phosphats (Milburn *et al.*, 1990; Schlichting *et al.*, 1990; Tong *et al.*, 1991) (Abb. 5.1).

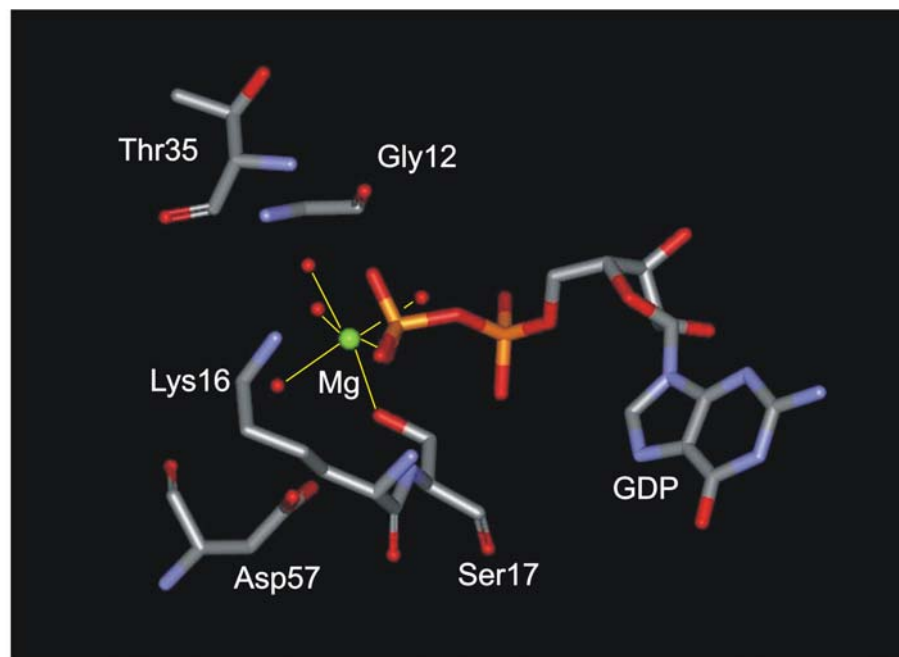


Abb. 5.1: Mg^{2+} -Bindung in der Kristallstruktur des Ras(wt)-GDP-Komplexes. Das Nukleotid und ausgewählte Aminosäuren in der Umgebung des Mg^{2+} -Ions sind dargestellt. Neben vier Wassermolekülen werden gemäß der Kristallstruktur (Tong *et al.*, 1991) ein Sauerstoff des β -Phosphats und die Hydroxyl-Gruppe des konservierten Ser17 durch das Mg^{2+} -Ion gebunden. Die Bindungen sind durch gelbe Linien dargestellt.

Dies wurde auch für das Protein in Lösung durch EPR-Spektroskopie gezeigt, indem spezifisch am β -Phosphat markiertes $[\beta\text{-}^{17}\text{O}_4]\text{GDP}$ an Ras(wt), sowie an die

onkogenen Mutanten G12V, G12R/A59T (Feuerstein, *et al.*, 1987b) und G12V/A59T (Latwesen *et al.*, 1992) gebunden wurde. Als weiteren Liganden findet man in allen bisher bestimmten Kristallstrukturen die Hydroxylgruppe des Ser17. Die weiteren Bindungen sind gemäß den Kristallstrukturen von Ras•GDP (Milburn *et al.*, 1990; Tong *et al.*, 1991) zu Wassermolekülen ausgebildet (Abb. 5.1). Eine Ausnahme stellt die Struktur von Schlichting *et al.* (1990) dar. Hier wird noch die direkte Koordination des Mg^{2+} zur Carboxyl-Gruppe der Asp57-Seitenkette diskutiert.

In den bisherigen Veröffentlichungen von EPR-Untersuchungen an Ras•GDP werden, wie in den Röntgenkristall-Daten, ebenfalls 4 Wasserliganden in der primären Ligandensphäre des Metallions gefunden. Dies entspricht zunächst nicht den hier erhaltenen Ergebnissen, doch innerhalb dieser Arbeit wurde deutlich, dass Mutationen im Bereich der Bindungstasche des Nukleotids, wie z. B. Mutationen des Gly12 zu Valin oder des Thr35 zu Alanin eine Zunahme an Wasserliganden bewirken. So wurden in der Arbeitsgruppe von Reed die Q-Band-EPR-Untersuchungen von Ras in Lösung an onkogenen Mutanten durchgeführt (Smithers *et al.*, 1990; Latwesen *et al.*, 1992), bei denen es, wie im Fall der hier untersuchten onkogenen G12V-Mutante zu einer Erhöhung der Ligandenzahl kommen kann.

In weiteren EPR-Untersuchungen fanden Bellew *et al.*, (1996) ebenfalls 4 Wasserliganden bei Wildtyp-H-Ras und N-Ras. Diese Untersuchungen wurden jedoch an Ras im gefrorenen Zustand durchgeführt und wie es sich bei den hier durchgeführten Messungen herausstellte, nimmt die spektrale Auflösung im gefrorenen Zustand soweit ab, dass eine eindeutige Analyse der Spektren kaum möglich ist und so die Signifikanz der Ergebnisse dieser Simulationen in Frage zu stellen ist. So konnten auch die hier durchgeführten Messungen an Ras im gefrorenen Zustand bisher nicht eindeutig ausgewertet werden. Hierfür kommen zwei Ursachen in Frage: zum einen können inhomogene Beiträge der anisotropen Superhyperfeinkopplung und Nullfeldaufspaltungen höherer Ordnung bei gefrorenen Proben die Linien verbreitern und verkomplizieren, zum anderen könnte es beim Einfrieren der Proteinlösungen zu Veränderungen in der Koordinationssphäre kommen, wie man auch Unterschiede in Kristallstrukturen bei unterschiedlichen Temperaturen findet.

Als weiterer Ligand wird gemäß der Kristallstruktur von Schlichting *et al.* (1990) Asp57 diskutiert. Diese Struktur ist durch Hydrolyse von Ras•cagedGTP entstanden und die Auflösung ist nicht sehr hoch. Neuere gleichartige Röntgenkristall-Untersuchungen deuten darauf hin, dass Asp57, wie im Tri-Phosphat-gebundenen, auch im GDP-gebundenen Zustand über ein Wassermolekül zum Metallion koor-

diniert ist (Scheidig, 2002). Dafür sprechen auch die aus EPR-Untersuchungen erhaltenen, für eine Bindung zu große Abstände zwischen Asp57 und dem Mn^{2+} -Ion (Halkides *et al.*, 1994). Andererseits zeigten aber John *et al.* (1993), dass die Mutation des Asp57 zu Alanin die Affinität zwischen Ras•GDP und Mg^{2+} gegenüber dem Wildtyp-Protein um den Faktor 16 senkt, was wiederum für direkte Interaktion spricht. Innerhalb einem Abstand von etwa 0,4 – 0,5 nm befinden sich die Hauptketten-Carboxylgruppen des Tyr32 und Asp33 und könnten ebenfalls potenzielle Bindungspartner des Metallions darstellen. In der Kristallstruktur der verwandten GTPase RhoA ist im GDP-gebundenen Zustand das Threonin der Effektorschleife über seine Hauptketten-Carboxylgruppe direkt zum Mg^{2+} koordiniert (Wei *et al.*, 1997). Dies würde man jedoch gemäß der Ras•GDP-Struktur nicht erwarten, da hier die Seitenkette des Thr35 deutlich exponiert ist.

Zur Identifizierung des weiteren Liganden sind zunächst ENDOR-Experimente an ^{15}N -markierten Ras-Proben geplant, um zu überprüfen, ob Stickstoffatome an der weiteren Koordination beteiligt sind. Der nächste Schritt wäre der selektive Einbau markierter Aminosäure-Typen, wie es z. B. durch die zellfreie Proteinsynthese durchführbar ist. Weiterhin denkbar wäre der Einbau einer spezifisch markierten Aminosäure, wenn potenzielle Kandidaten als Bindungspartner in Frage kämen, wie es bereits von Halkides *et al.* (1994, 1996) mit Thr35 und Asp57 an Ras durchgeführt wurde. Aus den Ergebnissen dieser EPR-Untersuchungen wurde geschlossen, dass beide Aminosäuren nicht zum Metallion koordiniert sind.

Es stellt sich die Frage, welche physiologische Bedeutung die unterschiedlichen Konformationen haben könnten, die auch beim Wildtyp-Protein -wenngleich weniger ausgeprägt- auftreten. Prinzipiell sind für Ras•GDP innerhalb des Aktivierungs- bzw. Inaktivierungszyklus zwei funktionelle Zustände nötig: zum einen der Zustand direkt nach der GTP-Hydrolyse, wenn die γ -Phosphatgruppe zwar vom Nukleotid abgespalten, aber noch nicht freigesetzt ist, zum anderen ein offener Zustand der zur Dissoziation des GDP führt, um unter physiologischen Bedingungen die Bindung des GTP und somit die Aktivierung des Proteins zu ermöglichen.

5.3 Untersuchungen zur Dynamik der konformationellen Gleichgewichte in Ras•GppNHp-Komplexen

Im Gegensatz zu früheren ^{31}P -NMR-Messungen an verschiedenen Isoformen und Varianten von Ras, die bei Raumtemperatur oder noch höheren Temperaturen durchgeführt wurden (Rösch *et al.*, 1986; Campbell-Burk, 1989; John *et al.*, 1989,

1993; Franken *et al.*, 1993) stellten Geyer *et al.* (1996) bei Ras(wt)•GppNHp zum ersten mal die Aufspaltung der α - und β -Phosphorresonanzlinie bei tiefen Temperaturen fest. Diese ist durch das Vorhandensein mindestens zweier Zustände des Proteins in unmittelbarer Umgebung der Phosphatgruppen begründet, die sich im chemischen Austausch miteinander befinden. Dieser Austausch ist bei niedrigen Temperaturen um 278 K mit $k_1 = 60$ Hz langsam und bei Temperaturen von 303 K mit $k_1 = 3200$ Hz schnell im Vergleich zur NMR-Zeitskala Geyer *et al.* (1996). Da der Zustand 2 durch die Komplexbildung mit Effektoren stabilisiert wird, kann man sich diesen Zustand in etwa so vorstellen, wie man ihn in den Strukturen verschiedener Raps- und Ras-Effektorkomplexe in Röntgenkristallstruktur-Untersuchungen findet (Nassar *et al.*, 1995; Huang *et al.*, 1997, Vetter *et al.*, 1999); Pacold *et al.*, 2000, Scheffzek *et al.*, 2001).

Anders verhält es sich beim Zustand 1, der bei zahlreichen in dieser Arbeit untersuchten Ras-Mutanten dominiert, die Mutationen im Bereich der Schalter I-Region aufweisen. Dies tritt ebenfalls in abgestufter Form bei drei Mutanten auf, in denen die Angelstellen der Schalter I-Region einzeln oder beide zu Glycinen ausgetauscht wurden. Während die Einzelmутanten Ras(V29G) und Ras(I36G) Spektren mit einer deutlichen Verschiebung des Gleichgewichts zum Zustand 1 zeigen, zeigt die Doppelmутante nur noch eine schmale Resonanzlinie des β -Phosphats, die den Zustand 1 charakterisiert. Wie von Kuppens *et al.* (1999) für diese Mutanten postuliert, scheint der Austausch dieser Aminosäuren zu Glycin zu einer erhöhten Dynamik der Effektorschleife zu führen. Die Mutation des Thr35 zu Alanin oder Serin scheint somit ebenfalls eine Destabilisierung dieser Region zu bewirken, da beide Mutanten unter Berücksichtigung der Detektionsgrenze, die durch das Rauschen gegeben ist, ebenfalls zu über 95 % im Zustand 1 vorliegen. Das bedeutet, dass die Hydroxylgruppe des Thr35 alleine nicht ausreicht, sondern auch die Methylgruppe erforderlich ist, um den Schalter I in einer bestimmten Konformation (Zustand 2) zu stabilisieren, wie sie der Ras(wt) zeigt.

Einen weiteren Hinweis auf diese erhöhte Dynamik gibt die Kristallstruktur von Ras(T35S)•GppNHp. Hier sind beide Schalter-Regionen nicht aufgelöst, während die Gesamtstruktur weitgehend mit der des Wildtyp-Proteins übereinstimmt. Dies kann bedeuten, dass im Kristall dieser Mutante die Schalterregionen ungeordnet sind, also mehrere verschiedene Konformationen parallel eingenommen werden, oder dass beide Bereiche auch im Kristall eine hohe Dynamik aufweisen.

Die in Zusammenarbeit mit E. Brunner (Regensburg) durchgeführten MAS- ^{31}P -NMR-Messungen (*magic angle spinning*) zeigen, dass Ras(wt)•GppNHp auch im Kristall in mindestens zwei Konformationen vorliegt, wie man es auch bei diesem Protein in Lösung findet. Das erhaltene Spektrum lässt sich unter Annahme zweier Zustände mit einer Gleichgewichtskonstanten von $K_{12}=2$ simulieren. Dabei scheint zwischen den beiden Zuständen ebenfalls ein chemischer Austausch stattzufinden, mit Austauschraten, die bei Raumtemperatur im Millisekunden-Bereich liegen (Brunner, 2002). Wenn man diese Ergebnisse zusammenfasst und davon ausgeht, dass es sich im Zustand 1 des Wildtyps um eine gleichartige strukturelle Situation handelt, wie man sie auch bei den Thr35-Mutanten findet, so liegt es nahe, dass man in der Röntgenstruktur von Ras(wt)•GppNHp in den Bereichen der Schalter-Regionen nur den Anteil der Moleküle sehen kann, der sich in den ^{31}P -NMR-Experimenten im Zustand 2 widerspiegelt. Dagegen sollten die Schalterregionen der Moleküle, die sich im Zustand 1 befinden, ebenso wie die Serin-Mutante keine detektierbaren Elektronendichten liefern.

5.4 Einfluss der Thr35-Mutationen auf die Bindung des Mg^{2+} -Ions und des Nukleotids

Während man in der Kristallstruktur von Ras(wt)•Triphosphat-Komplexen die Hydroxylgruppe des konservierten Thr35 (gemäß Ras-Nomenklatur) an das Mg^{2+} und dessen Hauptketten-Amidgruppe an das γ -Phosphat gebunden findet (Pai *et al.*, 1990), sollte man im Fall der beiden Thr-Mutanten Unterschiede in dieser Koordination erwarten. Wird Ser17, welches ebenfalls über seine Hydroxyl-Gruppe zum Mg^{2+} -Ion koordiniert ist und einen Hauptketten-Kontakt zum β -Phosphat ausbildet zu Alanin mutiert, so wird die Affinität sowohl zum Mg^{2+} -Ion als auch zum Nukleotid so weit herabgesetzt, dass es Austauschfaktoren komplexiert und als eine dominant negative Mutante fungieren kann (John *et al.*, 1993). Da die Ras(T35A)-Mutante nicht über seine Seitenkette an das Metallion binden kann, ist es fraglich, ob die Bindung zum γ -Phosphat noch ausgebildet wird. In Lösung scheint diese Bindung aber auch bei Ras(wt)•GppNHp eher schwach ausgebildet zu sein, da EPR-Untersuchungen für eine Bindung untypisch große Abstände zwischen dem Metallion und verschiedenen Seitenkettenatomen des Thr35 zeigen konnten (Halkides *et al.*, 1994, 1996; Bellew *et al.*, 1996). Sowohl die Kristallstruktur von Ras(T35S)•GppNHp als auch die ^{31}P -NMR-Untersuchungen deuten

darauf hin, dass es durch die Dynamik der Schalter I-Region zu keiner Interaktion zwischen Thr35 und dem γ -Phosphat des Nukleotids kommt. Des weiteren wurden in dieser Arbeit ^{31}P -NMR-Untersuchungen zur Spin-Gitter-Relaxation der Phosphate von GppNHp im Komplex mit Ras(wt) und Ras(T35A) durchgeführt. Dabei wurde im Fall des γ -Phosphats im Ras(T35A)•GppNHp-Komplex mit einer T_1 -Zeit von 6,3 s, sowohl gegenüber dem α - und β -Phosphat im Komplex der Mutante, als auch im Vergleich zum γ -Phosphat des Ras(wt)-Komplexes mit 5,8 s eine signifikant längere T_1 -Relaxationszeit erhalten. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass in der Mutante das γ -Phosphat weniger Kontakte zum Protein- Mg^{2+} -Komplex aufweist, als das α - und β -Phosphat in der Mutante, aber auch als das γ -Phosphat im Wildtyp-Komplex. Dabei muss berücksichtigt werden, dass sich Ras(wt) gemäß den ^{31}P -NMR-Spektren ebenfalls zu etwa 35 % in einem Zustand ähnlich dem der Mutante befinden sollte. Dadurch, dass beim Wildtyp durch den schnellen chemischen Austausch eine Mischung der beiden Zustände in die Auswertung einging, würde man für den Zustand 2 eine noch kürzere T_1 -Zeit erwarten. Unter Berücksichtigung des Konformationsgleichgewichts zwischen den beiden Zuständen bei Ras(wt)•GppNHp, kann man so für den Zustand 2 eine T_1 -Zeit von etwa 5,5 s abschätzen.

Die Ergebnisse der DSC-Experimente konnten durch die irreversible Präzipitation des Proteins nicht quantitativ ausgewertet werden, jedoch war auch hier die Tendenz zu erkennen, dass sich Ras(wt) in der GppNHp-gebundenen Form erst bei etwas höherer Temperatur entfaltet als Ras(T35S) bzw. (T35A). Auch das spricht für eine festere Bindung des Nukleotids im Komplex.

Um Unterschiede bezüglich der Mg^{2+} -Bindung von Ras(wt), (T35S) und der Alanin-Mutante Ras(T35A) zu untersuchen, wurde die Dissoziation zwischen Ras und mant-GppNHp in Abhängigkeit von der freien Magnesiumkonzentration bestimmt. Es zeigte sich, dass die Mg^{2+} -Affinität zu Ras(T35S) und Ras(T35A) im Komplex mit mGppNHp im Vergleich zum Wildtyp um den Faktor 3 bzw. 4 niedriger ist. Das bedeutet, dass das Vorhandensein der Hydroxylgruppe alleine nicht ausreicht, um eine Affinität zu erreichen, die gleich zu der zwischen Wildtyp und dem Mg^{2+} -Ion wäre. Trotzdem findet man für die T35A-Mutante, der diese Hydroxylgruppe fehlt, noch immer eine Affinität in der Größenordnung, die der des Wildtyps entspricht. Das weist darauf hin, dass die Orientierung der Thr35-Seitenkette vielmehr durch das gebundene Mg^{2+} -Ion stabilisiert wird, als dass die Bindung des Metallions durch die Hydroxyl-Gruppe des Thr35 begünstigt würde. Weiterhin muss man be-

rücksichtigen, dass gemäß den Ergebnissen der ^{31}P -NMR-Spektroskopie Ras(wt) sich im GppNHp-Komplex zu über 30 % in einem gleichartigen Zustand, wie die Mutanten befindet, von dem man annehmen kann, dass es hier zu keiner Wechselwirkung zwischen Thr35 und dem Metallion kommt. Dadurch lassen sich die eher kleinen Unterschiede der Mg^{2+} -Affinität erklären. Unter gleichen experimentellen Bedingungen konnte für Ras(wt)•mGDP eine Mg^{2+} -Affinität von $4,0\ \mu\text{M}$ gezeigt werden. Der hier bestimmte Wert liegt nahe an einer über einen Radioaktiv-Assay bestimmten Affinität von $2,8\ \mu\text{M}$ (John *et al.*, 1993). Dies spricht ebenfalls dafür, dass Thr35 nur einen geringen Anteil an der Mg^{2+} -Stabilisierung hat, wenn man von der Ras•GDP-Kristallstruktur ausgehend annimmt, dass im inaktiven Zustand die Thr-Seitenkette deutlich vom Metallion entfernt liegt und somit keine direkte Interaktion möglich sein sollte.

In den Dissoziationsraten des mGppNHp von Ras bei Mg^{2+} -Sättigung sind die Unterschiede zwischen den beiden Thr35-Mutanten und dem Wildtyp ebenfalls gering und liegen im Vergleich zum Wildtyp ($2,2 \cdot 10^{-4}\ \text{s}^{-1}$) um den Faktor 2 (T35S) bzw. 3,5 (T35A) niedriger. Dies kann ebenfalls ein Hinweis dafür sein, dass bei beiden Thr35-Mutanten im GppNHp gebundenen Zustand sowohl Ser35, als auch besonders Ala35 in Lösung nicht zum Mg^{2+} koordiniert sind und somit auch keine Interaktion zwischen der Hauptketten-Amidgruppe des Thr35 und dem γ -Phosphat ausgebildet ist. Die Serin-Mutante sollte dann aber innerhalb dieser dynamischen Bewegung zumindest kurzzeitig den Komplex in der Art des Wildtyps stabilisieren und somit den Unterschied zwischen den beiden Thr-Mutanten bewirken. Weiterhin könnte die Dissoziation des Nukleotids/Nukleotid- Mg^{2+} -Komplexes durch das Vorliegen dieser strukturell offenen Konformation, die man bei einer frei beweglichen Schleife erhält, vereinfacht werden. Diese Ergebnisse korrelieren mit den Beobachtungen aus den ^{31}P -NMR-Spektren. Wenn man davon ausgeht, dass sich die Konformation mit der frei beweglichen Effektorschleife im Zustand 1 der α - und β -Resonanzlinien widerspiegelt, liegen die Thr-Mutanten überwiegend und Ras(wt) nur zu 35 % in diesem Zustand vor.

5.5 Ras(T35S): eine *partial loss-of-function* Mutante

Die Proteine der Ras-Superfamilie können meist mit verschiedenen Effektorproteinen spezifisch wechselwirken und können dadurch unterschiedliche Zellantworten bewirken. Die Mutante Ras(T35S) wurde ursprünglich als eine Mutante identifiziert die nicht mehr in der Lage ist bestimmte Signalwege anzuschalten, eine

sogenannte *partial loss-of-function* Mutante (White *et al.*, 1995). *Pull-down Assays* und Zwei-Hybrid-Experimente in Hefe deuteten darauf hin, dass ausschließlich die Wechselwirkung zwischen Ras und RalGDS unterbrochen wird, während die anderen Signalwege weitgehend ungestört bleiben. Somit wurde diese Mutante zu einem Werkzeug für zahlreiche Untersuchungen, in denen die Beteiligung von RalGDS an bestimmten Signalwegen untersucht wurde (Akasaka *et al.*, 1996; Rodriguez-Viciana *et al.*, 1996, 1997; Khosravi-Far *et al.*, 1996; White *et al.*, 1996; Joneson *et al.*, 1996a,b; Wolthuis *et al.*, 1996; Kinoshita *et al.*, 1997; Xue *et al.*, 2000; Tanaka *et al.*, 2002). Quantitative Untersuchungen zur Interaktion zwischen Ras(T35S) und verschiedenen Effektoren mittels der GDI-Methode, sowie die *stopped flow*- und ITC-Untersuchungen, die innerhalb dieser Arbeit durchgeführt wurden, zeigen jedoch, dass alle hier untersuchten Effektor-RBDs eine deutlich niedrigere Affinität zur Ras(T35S) als zum Wildtyp-Protein aufweisen. Während die Affinität zwischen RalGDS-RBD und der Serin-Mutante verglichen mit Ras(wt) um 3-4 Größenordnungen abnimmt, wird die Bindung zur Raf-RBD durch diese Mutation etwa um den Faktor 40-60 schwächer. Aber auch die Affinitäten zu weiteren Effektoren wie AF6-RBD und Byr2-RBD sind um mindestens eine Größenordnung niedriger. Da die Affinität zwischen Ras(wt) und Raf-RBD jedoch deutlich höher als zu den anderen untersuchten Ras-Bindedomänen ist, ist die herabgesetzte Affinität immer noch hoch genug, um unter physiologischen Bedingungen eine ausreichende Komplexbildung zu ermöglichen. Die Ergebnisse lassen vermuten, dass neben den Signalwegen über RalGDS auch andere Wege durch diese Serin-Mutante beeinträchtigt werden.

5.6 ³¹P-NMR-Untersuchung der Komplexbildung zwischen Ras•GppNHp und Effektoren

5.6.1 Komplexbildung zwischen Ras(wt)•GppNHp und Effektoren

Ras(wt)•GppNHp liegt in Lösung in einem Gleichgewicht zwischen zwei Zuständen vor (Geyer *et al.*, 1996). Wird die Ras-Bindedomäne (RBD) verschiedener Effektoren gebunden, so wird der Zustand 2 stabilisiert. Dies konnte bereits für die Komplexbildung zwischen Ras(wt)•GppNHp und den RBDs der Raf-Kinase (Geyer *et al.*, 1996), des RalGDS (Geyer *et al.*, 1997) und AF6 (Linnemann *et al.*, 1999) durch ³¹P-NMR-Spektroskopie gezeigt werden. Titriert man die RBDs dieser Effektoren zu Ras(wt)•GppNHp, so nehmen im ³¹P-NMR-Spektrum mit zunehmender

Konzentration der RBD die Signale des Zustands 1 ab, während die Population des Zustands 2 im entsprechenden Maße zunimmt. Bei einem molaren Verhältnis von etwa 1:1 liegt Ras(wt) nahezu vollständig im Zustand 2 vor.

Diese Beobachtung konnte im Rahmen dieser Arbeit auch für Byr2-RBD (Tu *et al.*, 1997) und Nore1-RBD (Vavvas *et al.*, 1998) gezeigt werden. Die Komplexbildung zwischen Ras(wt) und den RBDs der Raf-Kinase und RaIGDS wurde innerhalb der Arbeit ebenfalls unter gleichen Bedingungen durchgeführt, um einen direkten Vergleich der erhaltenen Werte der chemischen Verschiebung durchführen zu können. Die Verschiebungswerte der Phosphatgruppen weichen in den verschiedenen Komplexen leicht voneinander ab. Das ist zu erwarten, da jeweils unterschiedliche Interaktionen zwischen Ras und den Effektoren eingegangen werden und somit die Umgebung der Phosphate zumindest leicht verschieden sein sollte. In allen Fällen verschwindet jedoch die Linie des Zustands 1 zu Gunsten einer Resonanzlinie die nahe bei der des Zustands 2 des freien Ras-Proteins liegt. Es ist schwierig aus den ^{31}P -NMR-Daten Rückschlüsse auf Unterschiede in den komplexen Interaktionen zwischen Ras und den Effektor-RBDs zu schließen, es scheint jedoch, dass in allen Fällen im Ras-Protein durch die Effektorbindung eine dem Zustand 2 ähnliche Konformation stabilisiert wird.

In allen vier Ras-Effektor-Komplexen sollte die chemische Umgebung des α -Phosphats sehr ähnlich sein, da man hier gleiche Werte der chemischen Verschiebung erhält. Ebenfalls findet man im Komplex von Ras mit den RBDs von Byr2 und RaIGDS für alle drei Phosphate ähnliche Werte in den jeweiligen chemischen Verschiebungen, während die Komplexe mit Raf-RBD und Nore1-RBD sich deutlich voneinander unterscheiden. Die RBDs von Raf, RaIGDS und Byr2 interagieren alle über ein Inter-Protein- β -Faltblatt mit der Schalter I-Region des Ras-Proteins (Nassar *et al.*, 1995; Huang *et al.*, 1997; Vetter *et al.*, 1999; Scheffzek *et al.*, 2001). Dabei finden die Wechselwirkungen aber über jeweils andere Aminosäuren statt. Die Struktur des Ras•Nore1-Komplexes wurde bisher noch nicht gelöst.

5.6.2 Komplexbildung zwischen Thr35-Mutanten von Ras und Effektoren

Für Ras(T35S) und Ras(T35A)•GppNHp findet man im ^{31}P -NMR-Spektrum nur Resonanzlinien, die denen des Zustands 1 des Wildtyp-Proteins entsprechen. Nach Titration von Raf-RBD verhalten sich die beiden Mutanten jedoch unterschiedlich. Durch Titration von Ras(T35S) sowohl mit Raf-RBD als auch mit

RaIGDS-RBD entstehen neue Resonanzlinien mit Verschiebungswerten, die denen des Wildtyp-RBD-Komplexes entsprechen, während die Signale des freien Ras-Nukleotidkomplexes abnehmen. Für die Titration mit RaIGDS-RBD sind jedoch deutlich höhere Konzentrationen nötig um die Serin-Mutante vollständig in den Zustand 2 zu überführen. Aus den experimentellen Daten konnte hier eine Gleichgewichtsdissoziationskonstante zwischen Ras(T35S)•GppNHp und RaIGDS-RBD von etwa 360 μM abgeschätzt werden. Dagegen erfahren die Resonanzlinien der Alanin-Mutante bei der Titration mit Raf-RBD zwar eine Linienverbreiterung, die auf eine Bindung der Effektor-RBD hindeutet, jedoch kommt es hier zu keiner deutlichen Änderung in den chemischen Verschiebungen. Für die Alanin-Mutante wurde selbst bei millimolarer Konzentration keine Bindung mit RaIGDS-RBD erhalten.

Die Ergebnisse zeigen, dass die Hydroxylgruppe des Threonin bzw. Serin notwendig ist, um das Ras-Protein in den Zustand 2 zu überführen. Weiterhin scheint es, dass die Methylgruppe des Threonin das Ras(wt) in einer Konformation stabilisiert, die zur korrekten Effektorbindung notwendig ist und die Affinität zum Effektor deutlich erhöht. Ras(T35S) ist zwar in der Lage die Effektoren zu binden und die richtige Konformation anzunehmen, jedoch sind durch das Fehlen der Methylgruppe die Affinitäten soweit herabgesetzt, dass unter physiologischen Konzentrationen zu RaIGDS keine effektive Bindung mehr erreicht wird. Dagegen ist die Affinität der Raf-RBD zum Wildtyp-Protein sehr hoch, so dass selbst die verringerte Affinität der Serin-Mutante noch hoch genug ist, um unter *in vivo*-Bedingungen zu einer Bindung und Aktivierung der Raf-Kinase zu führen.

5.6.3 Komplexbildung weiterer Schalter I-Mutanten mit Raf-RBD

Innerhalb dieser Arbeit wurde auch die Dynamik weiterer Schalter I-Mutanten von Ras in der GppNHp-gebundenen Form mittels ^{31}P -NMR-Spektroskopie untersucht. Es scheint, als ob das empfindliche Gleichgewicht, das im Wildtyp-Protein zwischen den beiden Zuständen 1 und 2 vorliegt, durch das Zusammenwirken der Wechselwirkung mehrerer Aminosäuren in diesem Bereich erreicht wird. So führten die Mutationen der Aminosäuren V29, Y32, T35, I36 und Y40 der hier untersuchten Ras-Varianten zu einer mehr oder weniger starken Verschiebung des Gleichgewichts zu Gunsten des Zustands 1. Dies ist ein weiterer Hinweis dafür, dass der Zustand 1 weniger eine definierte Konformation darstellt, als vielmehr eine frei bewegliche Schalter I-Region, die aus der Destabilisierung der Konformation des Zustands 2 durch diese verschiedenen Mutationen resultiert. Wäh-

rend die Signale des α -Phosphats bei den unterschiedlichen Mutanten sehr stark variieren, erhält man in allen Mutanten eine β -Phosphatlinie deren chemische Verschiebung nahezu identisch mit der des Zustands 1 des Wildtyp-Proteins ist. Zwei Tyr32-Mutanten, Ras(Y32R) und (Y32F), zeigen auch in der Resonanzlinie des γ -Phosphats eine Aufspaltung.

Bei mehreren dieser Mutanten wurde auch die Auswirkung der Effektor-Bindung untersucht. Die *partial loss-of-function* Ras(Y40C), interagiert *in vivo* zwar noch mit PI(3)K, jedoch nicht mehr mit der Raf-Kinase oder RalGDS. Während Tyr40 direkt in der Bindung zwischen RalGDS und Ras involviert ist, findet man im Ras-Raf-Komplex allenfalls eine indirekte Beteiligung dieses Tyrosins an der Bindung. In der ^{31}P -NMR-Untersuchungen zeigt diese Mutante ein sehr ähnliches Verhalten wie Ras(T35S). Die Affinität zwischen der Y40C-Mutante und Raf-RBD ist jedoch deutlich herabgesetzt. Es zeigt sich hier ebenfalls, dass durch diese Mutationen wahrscheinlich weniger die direkte Interaktion, als vielmehr durch eine erhöhte Dynamik der Schalter-Regionen, die Affinität zum Effektor reduziert wird.

Nach Titration der Tyr32-Mutanten mit Raf-RBD erhält man ebenfalls Änderungen der chemischen Verschiebungen zu niedrigerer Frequenz, die jedoch im Vergleich zu Ras-Varianten, die dieses Tyr32 besitzen kleiner ist. Dies kann damit begründet werden, dass in erster Linie die Orientierung der aromatischen Seitenkette des Tyr32 für die Änderung der chemischen Verschiebung in den Zuständen 1 und 2 verantwortlich ist (Geyer *et al.*, 1996).

5.7 Assoziation von Effektor-RBD an Ras•mGppNHp

Die Ergebnisse der ^{31}P -NMR-Untersuchungen zeigen, dass Ras(wt) im Komplex mit Mg^{2+} •GppNHp, Mg^{2+} •GppCH₂p und aller Wahrscheinlichkeit nach auch im Komplex mit anderen Triphosphat-Nukleotiden in einem Gleichgewicht zwischen zwei Zuständen Ras(1) und Ras(2) (entsprechend den Zuständen 1 und 2) existiert. Wenn man diese Ergebnisse berücksichtigt, kann man die Assoziation zwischen Ras und Effektor-RBDs im einfachsten Fall mit folgendem Schema (Abb.5.2) beschreiben:

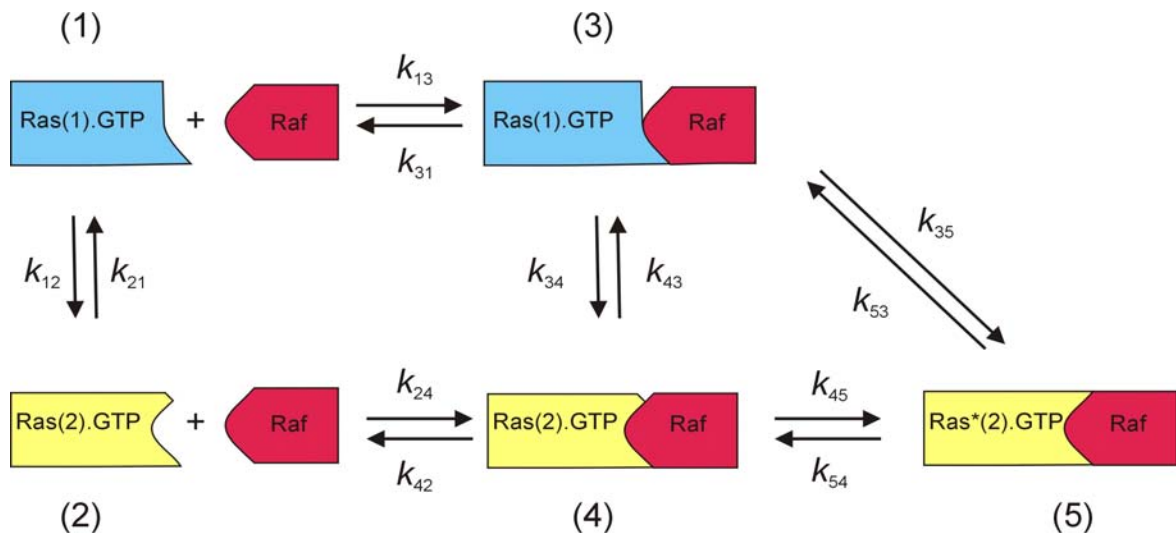
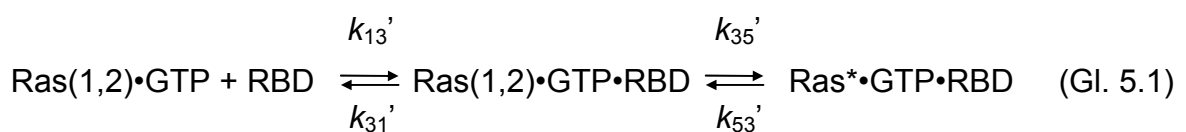


Abb. 4.2: Schema zur Interaktion zwischen Ras und Effektoren. In diesem Schema sind die zwei Zustände berücksichtigt, wie man sie in der ^{31}P -NMR-Spektroskopie an verschiedenen Ras•Triphosphat-Nukleotidkomplexen findet (hier als GTP dargestellt).

Die Geschwindigkeitskonstanten k_{12} und k_{21} , die bei Raumtemperatur in der Größenordnung von $500\text{--}1000\text{ s}^{-1}$ liegen, sowie die zugehörige Gleichgewichtskonstante von freiem Ras im Komplex mit GppNHp bzw. GppCH₂p mit K_{12} von etwa 2 können aus den ^{31}P -NMR-Experimenten entnommen werden. Die Werte der chemischen Verschiebung deuten darauf hin, dass sich Ras im stabilen Komplex mit der Effektor-RBD (Ras(2)*•Mg²⁺•GTP•RBD) in einem ähnlichen aber nicht identischen Zustand befindet, wie im Zustand 2 der nicht RBD-gebundenen Form. *Stopped flow*-Experimente zur Assoziationskinetik zwischen Effektor-RBDs und Ras im Komplex mit dem fluoreszierenden GTP-Analogon mGppNHp lassen jedoch eine ausreichende Beschreibung durch ein Zwei-Schritt-Modell zu. So können die Assoziationskinetiken befriedigend angepasst werden, indem man einen schnellen, einleitenden Bindungsschritt mit schwacher Affinität annimmt, der durch eine deutlich langsamere Isomerisierungsreaktion in einen Komplex mit fester Bindung gefolgt wird (Sydor *et al.*, 1998) (Gl. 5.1).



Das vereinfachte Schema (Abb. 5.2) ist ein spezieller Fall, des allgemeineren Modells (GL. 5.1), wenn die Ratenkonstanten k_{13} , k_{31} , k_{35} und k_{53} gleich k_{24} , k_{42} ,

k_{45} und k_{54} sind. Wenn diese Konstanten ähnlich sind, so kann man sie durch Kinetik-Experimente jedoch kaum voneinander trennen. Das Gleichgewicht kann dann meist durch die reduzierte Gleichung beschrieben werden. Die Gleichgewichtsdissoziationskonstante K_D zwischen der RBD und Ras mit der Konzentration $c_f = [\text{Ras}(1) \cdot \text{Mg}^{2+} \cdot \text{GTP}] + [\text{Ras}(2) \cdot \text{Mg}^{2+} \cdot \text{GTP}]$ ist dann $K_D = k_{53}' \cdot K_{13}' / k_{35}'$. Diese vereinfachte Gleichung berücksichtigt jedoch nicht die aus den NMR-Experimenten bekannten Gleichgewichte zwischen den zwei verschiedenen Zuständen.

Hiermit kann die nicht-lineare Abhängigkeit der Ratenkonstante dieser angenommenen Reaktion pseudo-erster-Ordnung von der RBD-Konzentration erklärt werden. Sie wurde experimentell für Ras(wt) und die T35S-Mutante im Komplex mit mGppNHp in dieser Arbeit und für Ras(wt) und Ras(Y32W)•GppNHp von Sydor *et al.* (1999) gezeigt wurde. Die Isomerisierungsreaktion, die durch k_{35}' charakterisiert ist, wird bei steigender Konzentration von Raf-RBD geschwindigkeitsbestimmend, so dass man für Ras(wt) und Ras(T35S) eine Sättigungskinetik für die Assoziation zwischen RBD und Ras erhält. Die daraus ermittelte Assoziationsrate zwischen Raf-RBD und Ras(wt) ist mit 415 s^{-1} bei 10°C nicht identisch, aber dennoch ähnlich zu der Austauschrate zwischen den beiden Zuständen, die aus den ^{31}P -NMR-Experimenten für Ras(wt)•GppNHp mit 280 Hz bei 10°C erhalten wurden (Geyer *et al.*, 1996).

Das ^{31}P -NMR-Spektrum von Ras(wt)•mGppNHp lässt durch seine gegenüber dem GppNHp-gebundenen Ras etwas breiteren Resonanzlinien auch etwas höhere Austauschraten erwarten. Für die Komplexbildung zwischen Raf-RBD und Ras(T35S)•mGppNHp erhält man in *stopped flow*-Experimenten, die unter gleichen Messbedingungen durchgeführt wurden, eine im Vergleich zum Ras(wt) etwa 40fach größere Gleichgewichtsdissoziationskonstante. Ebenfalls verringert sich die Rate der Isomerisierungsreaktion etwa um den Faktor 2 auf 211 s^{-1} .

Deutlich anders verhält sich die Ras(T35A)-Mutante. Bereits in der Änderung des Fluoreszenzsignals führt die Bindung der Effektor-RBD hier im Gegensatz zu Ras(wt) und T35S zu einer Zunahme der Intensität des Fluoreszenzsignals. Das deutet darauf hin, dass der Fluorophor durch die Effektorbindung eine hydrophobere Umgebung erfährt. Desweiteren erhält man für Ras(T35A) eine lineare Assoziationskinetik, wenn steigende Konzentrationen der Effektor-RBD zugegeben werden. Dies zeigt zum einen, dass sich Ras(wt) und Ras(T35S) in der Art der Komplexbildung von Ras(T35A) unterscheiden sollten, zum anderen scheint die Effektor-Bindung bei der Alanin-Mutante entweder einem Ein-Schritt-Mecha-

nismus zu folgen, oder beide Schritte laufen sehr schnell ab, so dass sie im durchgeführten Experiment noch nicht geschwindigkeitsbegrenzend wurden. Ras(T35A) kann durch die fehlende Hydroxylgruppe im Gegensatz zum Wildtyp-Protein an Aminosäureposition 35 keine Bindung zum Mg^{2+} -Ion ausbilden. Bei Ras(T35S) sollte diese Bindung allenfalls zu einem geringen Teil ausgebildet werden können, da man im ^{31}P -NMR-Spektrum ebenfalls nur den Zustand 1 findet. Wenn jedoch die Effektor-RBD an Ras(T35S) bindet wird es in einer dem Wildtyp-Komplex ähnlichen Konformation stabilisiert, die in der ^{31}P -NMR-Spektrum durch den Zustand 2 charakterisiert ist und von der Alanin-Mutante auch nach Effektorbindung nicht eingenommen wird. Dies lässt vermuten, dass der Effektor-gebundene Zustand von Ras(T35S) und Ras(wt) in den ^{31}P -NMR-Untersuchungen (Zustand 2) die hoch affine Bindung nach dem Isomerisierungsschritt darstellen. Die Mutante T35A sollte somit nur die wenig affine Bindung zum Effektor zeigen, oder den Effektor auf eine andere Art und Weise binden, die weder zu einer Änderung der chemischen Verschiebung noch zum Sättigungsverhalten in der Assoziationskinetik führt.

5.8 Einfluss unterschiedlicher Triphosphate auf die konformationellen Gleichgewichte von Ras

Neben GppNHp sind GppCH₂p und GTP γ S zwei weitere langsam hydrolysierende GTP-Analoga, die häufig zur Darstellung des aktiven Zustands von Guaninnukleotid-bindenden Proteinen in Bindungsstudien, sowie auch in der Strukturbestimmung verwendet werden. Das Interesse lag darin, wie sich diese beiden GTP-Analoga auf die dynamischen Gleichgewichte von Ras auswirken. In Abb. 5.3 sind die Phosphatgruppen von GTP und den verschiedenen Analoga schematisch dargestellt. Bei GppNHp und GppCH₂p wird die Hydrolyserate stark verlangsamt, indem das Sauerstoffatom, das die Brücke zwischen β - und γ -Phosphat bildet durch eine Imido- bzw. Methylengruppe ersetzt ist. Im Fall von GTP γ S bleibt dieser Brückensauerstoff erhalten. Durch das Ersetzen eines Sauerstoffatoms des γ -Phosphats durch ein Schwefelatom, liegt das γ -Phosphat weniger polarisiert vor, wodurch die Hydrolyserate ebenfalls stark verlangsamt wird. GTP γ S ist im Vergleich zu den beiden anderen GTP-Analoga weniger stabil.

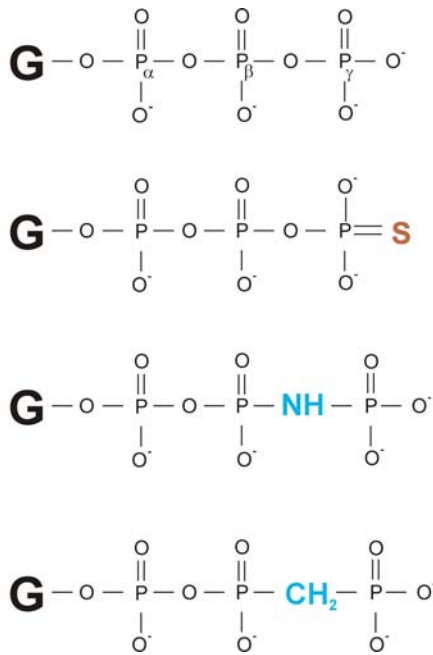


Abb. 5.3: Häufig verwendete Triphosphatnukleotide.

G = Guanosin

Von oben nach unten:

Guanosin-5'-triphosphat (GTP),

Guanosin-5'-O-(3-Thiotriphosphat) (GTP_γS),

Guanosin-5'-(β,γ-imido)triphosphat (GppNHp),

Guanosin-5'-(β,γ-methyleno)triphosphat (GppCH₂p)

Es wurde bereits gezeigt (Geyer *et al.*, 1996), dass sich Ras(wt)•GppNHp in einem Gleichgewicht zwischen zwei Konformationen befindet mit Austauschraten die bei Raumtemperatur im Millisekundenbereich liegen. Dagegen zeigten Ras(wt) und verschiedene onkogene Ras-Mutanten in erster Näherung nur je eine Resonanzlinie für das α-, β- und γ-Phosphat, wenn sie im Komplex mit GTP vorlagen (Geyer *et al.*, 1996). Das konnte zunächst bedeuten, dass sich Ras(wt) in der GTP-gebundenen Form überwiegend in nur einer Konformation befindet, oder sich zwei oder mehrere Konformationen selbst bei einer niedrigen Temperatur von 278 K im schnellen Austausch zueinander befinden, woraus nur eine gemittelte Linie resultieren würde.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit entsprechen jedoch mehr der Hypothese des festen Zustands, da die Bindung von Effektorproteinen an Ras(wt)•GTP neben der Linienverbreiterung nur zu minimalen Änderungen der chemischen Verschiebung führt. Wenn man darüberhinaus die Beobachtungen dieser Arbeit an Ras•GppNHp mit denen von Ras im GTP-gebundenen Zustand vergleicht, so würde man erwarten, dass analog zu den Messungen mit den Nukleotidanaloga die Anteile von Ras(wt)•GTP, die sich im Zustand 1 befinden, Resonanzlinien zeigen, wie die T35S-Mutante. Es sind zwar zum Teil kleine Linien mit ähnlichen Verschiebungswerten in den Ras(wt)-Spektren zu beobachten, jedoch sind die Populationen zu gering, um sie eindeutig gegen das Rauschen abzugrenzen. Ein deutlicher Hinweis hierzu könnte aus einem Sättigungs-Transfer-Experiment ge-

wonnen werden, bei dem die Resonanzfrequenz des Zustands 1 gesättigt wird. Bei der Mutante Ras(T35A) in der GTP-gebundenen Form erhält man nur je eine Resonanzlinie für jedes Phosphat. Diese hier erhaltenen Signale unterscheiden sich in ihren chemischen Verschiebungen jedoch deutlich von denen des Wildtyp-Proteins. Ähnlich wie im GppNHp-gebundenen Zustand erfahren die Signale wiederum nur sehr geringe Änderungen in den chemischen Verschiebungen, wenn Raf-RBD bindet. Die Affinität von RafGDS scheint auch zur GTP-gebundenen Form der Alanin-Mutante zu gering zu sein um unter diesen Bedingungen einen Komplex zu bilden. Anders verhält sich die T35S-Mutante, die auch in diesem Fall eine Mittelstellung einnimmt. Im freien, also nicht-Effektor-gebundenem Zustand, zeigt sie eine Aufspaltung der Resonanzlinien, die zum einen chemische Verschiebungswerte der Alanin-Mutante aufweisen, jedoch zu etwa 26 % auch Linien mit Verschiebungswerten die denen des Wildtyps gleichen. Dies wird besonders im Fall des γ -Signals deutlich sichtbar. Nach Effektorbindung wird das Gleichgewicht wieder völlig in den Zustand 2 verschoben. Die Resonanzlinien weisen dabei Werte der chemischen Verschiebung auf, die denen der Wildtyp-Signale entsprechen. Es scheint also, dass sich im physiologisch relevanten GTP-gebundenen Komplex die Serin-Mutante bereits ohne gebundenem Effektorprotein zu einem deutlichen Anteil in der Wildtyp-analogen Konformation befindet.

Für GppCH₂p erhält man sowohl im Komplex mit Ras(wt) als auch mit den beiden Thr35-Mutanten sehr ähnliche Ergebnisse wie für die Ras•GppNHp-Komplexe. Ras(wt)•GppCH₂p liegt ebenfalls in mindestens zwei Zuständen vor, die auch hier besonders in der Aufspaltung Resonanzlinien des α - und β -Phosphats zu erkennen sind und eine Gleichgewichtskonstanten $K_{12} = [2]/[1]$ von 2 aufweisen. Dieses Populationsverhältnis wurde unter den hier durchgeführten Präparations-, Mess- und Simulationsbedingungen auch für Ras(wt)•GppNHp gefunden. Die Resonanzlinien des höher besetzten Zustands, die zu niedrigerer Frequenz verschoben sind, wurden auch hier als Zustand 2 bezeichnet. Die Simulation der durchgeführten Messreihe von Ras(wt)•GppCH₂p bei unterschiedlichen Temperaturen erbrachte ebenfalls sehr ähnliche Resultate, wie es bereits von Geyer *et al.* (1996) für GppNHp-gebundenes Ras gezeigt wurde. So weist der Ras(wt)•GppCH₂p-Komplex Austauschraten k_1 von 80 Hz bei 278 K und 3500 Hz bei 303 K auf während für den GppNHp-Komplex mit 60 Hz bzw. 3200 Hz bestimmt wurden. Nach Effektorbindung entstehen hier jedoch neue Resonanzlinien die ebenfalls ähnliche Werte der chemischen Verschiebung aufweisen, wie die des Zustands 2. Hier sind die Unterschiede relativ zum Zustand 2 des nicht Effektor-gebundenen

Zustands jedoch größer als bei Ras(wt)•GppNHp. Während Ras(T35S)•GppCH₂p wieder nur im Zustand 1 vorliegt, wird es nach Bindung der Effektor-RBD wieder in eine Konformation überführt, die der des Wildtyp-Proteins im Effektor-RBD-Komplex sehr ähnlich sein sollte.

Analog zum GTP-gebundenen Zustand verhält sich Ras(wt), wenn es das Analogon GTP γ S gebunden hat. Auch hier erhält man für jedes Phosphat nur eine Resonanzlinie. Nach Effektorbindung verändern sich die Werte der chemischen Verschiebung nur in engen Grenzen. Die beiden Mutanten Ras(T35S) und (T35A) zeigen dagegen eine deutliche Aufspaltung der Resonanzlinien, die hier als Zustand 1 und 1' definiert wurden. Dies ist besonders deutlich bei den Resonanzlinien des γ -Phosphats zu sehen. Im Gegensatz zu Ras(T35A) zeigt die höher besetzte Linie des γ -Phosphats bei Ras(T35S) eine etwas zu niedrigerer Frequenz verschobene Schulter, die eine ähnliche chemische Verschiebung aufweist, wie die γ -Phosphatlinie des Wildtyps. Nach Bindung von Raf-RBD erhält man für die Serin-Mutante eine Linie mit ebenfalls sehr ähnlichen Verschiebungswerten wie beim Wildtyp, während die Resonanzlinien der Alanin-Mutante durch die Effektor-Bindung nur geringe Änderungen in der chemischen Verschiebung erfahren. Die Aufspaltung in die zwei Zustände bleibt bei der T35A-Mutante auch nach Effektorbindung beibehalten. Es scheint also, dass die Aufspaltung der Resonanzlinien bei den beiden Thr35-Mutanten in Zustand 1 und 1' mit einem Populationsverhältnis von 2:1 durch das an das γ -Phosphat gebundene Schwefelatom verursacht wird. Denkbar wäre der Unterschied, ob das Schwefelatom des Nukleotids im Komplex an das Mg²⁺ gebunden ist oder nicht. Die fest koordinierte Struktur des Ras(wt)•GTP γ S sollte dann die weniger besetzte Konformation nicht ermöglichen. Die Zustände 1 und 1' befinden sich ebenfalls in einem chemischen Austausch. Die Simulation der experimentellen Spektren aus der Temperaturreihe von Ras(T35S)•GTP γ S erbrachte ebenfalls Austauschraten, die im Bereich der Raten des Ras(wt)•GppNHp oder Ras(wt)•GppCH₂p gefunden wurden. Obwohl es nahe liegt, dass es sich hier um einen anderen Effekt handelt, der durch das Schwefelatom verursacht wird, so sollte die Orientierung dieses Schwefels doch mit dem dynamischen Gleichgewicht zwischen der offenen mobilen Form und der stabilen Konformation der Schalter I-Region direkt verknüpft sein.

Wildtyp-Ras zeigt in der GTP- und GTP γ S-gebundenen Form jeweils nur eine Konformation, die ähnlich der des Ras-Effektorkomplexes ist. Im Komplex mit den Analoga GppNHp und GppCH₂p existiert es in zwei Zuständen, die sich im

chemischen Austausch befinden, mit Austauschraten die bei Raumtemperatur im Millisekundenbereich liegen. Eine dieser Konformationen wird durch die Bindung von Effektoren stabilisiert. Der Unterschied zwischen GTP und GTP γ S einerseits und GppNHp und GppCH₂p auf der anderen Seite liegt im Vorhandensein des Brückensauerstoffs zwischen β - und γ -Phosphat. In der Struktur von Ras(wt)•GTP findet man die Hauptketten-Amidgruppe von Gly13 über eine Wasserstoffbrücke zu diesem Sauerstoff koordiniert (Scheidig *et al.*, 1999).

5.9 Einfluss verschiedener GTP-Analoga auf die Effektorbindung von Ras

ITC-Untersuchungen der Bindung von Raf-RBD an Ras(wt) im Komplex mit unterschiedlichen GTP-Analoga zeigen, dass die Affinitäten weitgehend unbeeinflusst von der Art des gebundenen Tri-Phosphats sind. Die ermittelten Assoziationskonstanten liegen alle bei etwa $2,5 \mu\text{M}^{-1}$. Entsprechende Messungen an der Mutante Ras(T35S) zeigen, dass die Affinitäten im Vergleich zum Wildtyp-Protein jeweils um etwa eine Größenordnung niedriger liegen, wie es auch unter etwas anderen Bedingungen in den *stopped flow*-Experimenten gezeigt wurde. Die ermittelten Bindungskonstanten von Raf-RBD an Ras(T35S) im Komplex mit den unterschiedlichen GTP-Analoga weisen ebenfalls nur geringe Unterschiede auf. Hier kann man jedoch die Tendenz feststellen, dass die Affinität bei Ras(T35S) im GTP γ S-Komplex am höchsten ist und im Komplex mit GppNHp um den Faktor 1,5 bzw. 2 im GppCH₂p-Komplex geringer ist. Dass die Werte innerhalb der Wildtyp-Messungen bzw. der Messreihe an der Mutante sehr ähnlich sind, überrascht nicht, wenn man berücksichtigt, dass in beiden Fällen die Unterschiede im konformationellen Gleichgewicht, die eine unterschiedliche Affinität bewirken könnten nur bei etwa 20-30 % liegen. Während die Änderungen der freien Energie bei der Bindung der Raf-RBD an die verschiedenen Ras-Nukleotidkomplexe, gemäß der geringen Änderungen in der Affinität, ähnlich sind, kann man deutliche Unterschiede in den Beiträgen der Enthalpie und Entropie erkennen, die sich aber kompensieren.

Die Unterschiede in den erhaltenen ΔH° - und $T\Delta S^\circ$ -Werten, kann man mit Hilfe der NMR-Daten erklären. Während sich Ras(wt)•GTP γ S nur in einer Konformation befindet, die der Effektor-gebundenen Form zumindest sehr ähnlich scheint, existiert Ras(wt) im Komplex mit GppNHp bzw. GppCH₂p zu etwa 35 % im Zustand mit einer mobilen Effektorschleife, die durch die Effektorbindung aber in den festen

Zustand überführt wird. Deshalb ist hier die Änderung der Entropie kleiner als im Ras•GTP γ S-Komplex, für den man annimmt, dass sich hier die Effektorschleife bereits vor Effektorbindung in der richtigen Konformation befindet.

5.10 Hydrolyseeigenschaften von Ras(T35S)

Der Hydrolysemechanismus kleiner GTPasen ist noch immer Gegenstand aktueller Forschung. Mutationen des Thr35 zu Serin oder Alanin führen bei Ras neben den Auswirkungen auf die Effektorbindung auch zu einer Senkung der intrinsischen Hydrolyserate. Bei Ras(wt) ist die Hydroxylgruppe des Thr35 an das Mg²⁺-Ion gebunden und über seine Hauptketten-Amidgruppe zum γ -Phosphat koordiniert. Die Ergebnisse der ³¹P-NMR-Spektroskopie und auch der Kristallstruktur der T35S-Mutante sprechen dafür, dass die beiden Kontakte zum Metallion und γ -Phosphat innerhalb der Dynamik der Schalterregionen allenfalls kurzzeitig existieren. Die Bindung der Hydroxylgruppe zum Metallion ist für die Hydrolyse nicht essenziell, da auch Ras(T35A) in der Lage ist GTP zu hydrolysieren, wenn auch mit einer um eine Größenordnung langsameren Rate. Die Hydrolyserate des Ras(T35S) liegt zwischen der Rate der Alanin-Mutante und der des Wildtyps. Dies könnte man damit erklären, dass die ³¹P-NMR-Spektren von Ras(T35S)•GTP zu etwa 26 % in einer dem Wildtyp entsprechenden Konformation vorliegen, in der die Hydrolyse mit einer schnelleren Rate stattfindet und zu 74 % im Zustand wie die Alanin-Mutante. Da die Alanin-Mutante auch GTPase-Aktivität zeigt und sich die beiden Zustände der Serin-Mutante im Gleichgewicht befinden, sollte sich die Hydrolyseraten der Serin-Mutante aus Anteilen der beiden anderen Varianten zusammensetzen. Wenn man die Gewichtung einsetzt, die man aus der NMR für die jeweiligen Populationen erhält, um so die resultierende Rate der parallel laufenden Hydrolysereaktionen zu bestimmen, führt dies im Rahmen der Fehlergenauigkeit zu der Rate, die experimentell für die Serin-Mutante bestimmt wurde. Ras(T35A) ist in der Lage GTP in einer gegenüber den onkogenen Mutanten hohen Rate zu hydrolysieren. Das zeigt, dass die Koordination des Thr35 zum Mg²⁺-Ion für diese Reaktion nicht erforderlich ist, oder dass die Hydrolyse hier einem etwas andersartigen Mechanismus folgt.

Obwohl die intrinsische GTPase-Aktivität der Serin-Mutante im Vergleich zum Wildtyp etwa um den Faktor 3 verringert ist, ließ sich die Mutante in Gegenwart von im Unterschuss vorliegenden GAP zu höheren Hydrolyseraten beschleunigen als der Wildtyp. Weiterhin fiel auf, dass die Hydrolysereaktion beim Wildtyp einer

linearen Kinetik folgt, während sie bei der T35S-Mutante exponentiell verläuft. Dies könnte auf einer unterschiedlichen Michaelis-Konstanten K_m bei der beschleunigten Hydrolyse-Reaktion des Wildtyps bzw. der Mutante liegen. Wenn der K_m -Wert für Ras(T35S) viel größer als der für den Wildtyp wäre, so hätte das zur Folge, dass die Aktivität mit sinkender Konzentration von Ras(T35S)•GTP einer scheinbar exponentiellen Form folgt, obwohl sie eigentlich einer integrierten Michaelis-Menten-Gleichung gehorchen müsste. Bei Ras(wt) dagegen bleibt die Aktivität über den Verlauf der Messung konstant, so dass man eine lineare Kinetik erhält.

Für die Funktion von GAP wird angenommen, dass es bei Ras über einen Arginin-Seitenkette den Übergangszustand der Hydrolysereaktion stabilisiert, wie es in der Komplexstruktur von Ras•GDP•AlF₃ mit RasGAP gezeigt wurde (Scheffzek *et al.*, 1997). Durch die Bindung dieser Arginin-Seitenkette an das γ -Phosphat werden negative Ladungen neutralisiert, die durch die Phosphoryl-Transferreaktion entstehen. Unterschiede könnten verschiedene Dissoziationsraten zwischen GAP, Ras(wt) und der Mutante sein, die wiederum durch eine unterschiedliche Dissoziationsrate des freiwerdenden Phosphats verursacht werden könnte. Bei einer höheren Dissoziationsrate wäre bei einem Unterschuss von GAP im Gleichgewicht das GAP wieder schneller verfügbar, um an ein anderes GTP-beladenes Ras-Molekül zu binden.

Bisherige in dieser Arbeit durchgeführte ³¹P-NMR-Untersuchungen zur Komplexbildung zwischen Ras(wt)•GppNHp und dem GAP NF1-333 lieferten kein Ergebnis. Bei einer Titration zu einem Verhältnis NF1:Ras von 1:1 kam es zu keiner Linienverbreiterung, die auf eine Bindung des deutlich größeren Moleküls hingewiesen hätte. Andererseits wurde von Ahmadian *et al.* (1997) durch Fluoreszenzmessungen ein K_D von 150 nM für den Komplex zwischen H-Ras(wt)•mGppNHp und NF1-333 bestimmt, so dass in den hier eingesetzten Konzentrationen Ras weitgehend im Komplex vorliegen sollte. Es ist jedoch schwierig abzuschätzen, welcher Anteil des isolierten NF1-Proteins wirklich aktiv ist und überhaupt an Ras binden kann.

5.11 Hydrolyse von GTP γ S

Es ist bekannt, dass GTP γ S im Vergleich zu GppNHp oder GppCH₂p ein deutlich weniger stabiles GTP-Analogon ist. In den ³¹P-NMR-Messungen, die mit diesem Analogon gebunden an Ras durchgeführt wurden, fällt auf, dass nicht -wie man es

erwarten würde- an Ras-gebundenes GDP und freies Thiophosphat resultieren, sondern dass neben den Resonanzlinien des gebundenen GDP eine Resonanzlinie mit der typischen Verschiebung von freiem Phosphat und wahrscheinlich H_2S entstehen. Zunächst sind zwei Möglichkeiten denkbar: entweder wird zunächst der Schwefel abgespalten und anschließend das GTP von Ras hydrolysiert, oder das Thiophosphat wird abgespalten und in einer schnellen Reaktion zu Phosphat und H_2S gespalten. Während Thiophosphat alleine unter den für diese Messungen verwendeten Pufferbedingungen stabil ist, konnte durch die Zugabe von Ras(wt)•GDP eine Spaltung des Thiophosphats zu Phosphat und H_2S bewirkt werden. Es besteht also die Möglichkeit, dass die Thio- γ -Phosphatgruppe zunächst vom Nukleotid abgespalten wird und anschließend in einem weiteren Schritt zu H_2S und freiem Phosphat hydrolysiert wird. Da diese Reaktion mit ähnlicher Rate auch durch Ras•GppNHp und auch vom Komplex Ras•Raf-RBD katalysiert wurde, scheint es als ob diese Reaktion nicht direkt in der Nukleotid-Bindetasche stattfindet. Andererseits wurde die Rate drastisch gesenkt, wenn EDTA in die Probe gegeben wurde, welches um das im aktiven Zentrum gebundene Mg^{2+} -Ion konkurriert, dadurch die Dissoziationsrate des Nukleotids erhöht und zu einer Destabilisierung des Proteins führen sollte. Dies spricht dafür, dass nicht eine einzelne exponierte Aminosäure ausreicht, um diese Reaktion zu katalysieren, wenn man davon ausgeht, dass das Thiophosphat nicht im Mg^{2+} -Komplex vorliegen muss. Weiterhin zeigten andere Proteine, wie Aprotinin oder BSA unter sonst gleichen Messbedingungen keine derartige Aktivität. Auch ein weiteres Mitglied der Ras-Superfamilie, die kleine GTPase Ran konnte diese Reaktion ebenfalls nicht zu einer ähnlichen Rate beschleunigen. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass es sich um ein Ras-spezifischeres Phänomen zu handeln scheint. Deshalb wurden noch mehrere Ras-Mutanten untersucht. Ras(T35A) und die Doppelmutante Ras(V29G/I36G) zeigen in der GppNHp-gebundenen Form nur Resonanzlinien die dem Zustand 1 des Wildtyp-Spektrums entsprechen, für die man annehmen kann, dass es sich um eine offene, dynamische Form des Proteins handelt. Beide zeigten keine Aktivität. Dagegen fand bei Ras(T35S)•GppNHp allein und im Komplex mit Raf-RBD die Reaktion statt, jedoch mit einer deutlich langsameren Rate als beim Wildtyp. Beide zeigten keine katalytische Aktivität, während der Wildtyp unabhängig davon, ob im Di- oder Triphosphat-gebundenen Zustand mit relativ hoher Rate dazu in der Lage war, die Reaktion zu katalysieren. Die einzelnen Reaktionen laufen zu schnell ab, als dass man die Zwischenzustände in der ^{31}P -NMR beobachten könnte.

6 Zusammenfassung

Das Guaninnukleotid-bindende Protein Ras ist als molekularer Schalter in Signaltransduktionswegen involviert, die Zellwachstum, Differenzierung, Zellzyklus und Apoptose regulieren. Dabei wechselt Ras zwischen einer inaktiven, GDP-gebundenen und einer aktiven, GTP-gebundenen Form. In der aktiven, angeschalteten Konformation kann Ras mit hoher Affinität verschiedene Effektoren wie Raf-Kinase oder RalGDS binden. Mutationen im Ras-Protein, die zu einem Verlust der intrinsischen und Gap-induzierten GTPase-Aktivität führen, tragen zur Tumorbildung bei.

Mn²⁺-EPR-Experimente von Ras in H₂¹⁷O zeigten, dass das Mn²⁺-Ion in verschiedenen Ras•GDP-Komplexen in Lösung unterschiedlich koordiniert ist. Das gebundene Mn²⁺-Ion weist in Abhängigkeit von der Ras-Variante eine unterschiedliche Anzahl von Wasserliganden auf. So wurden im Komplex von Ras(wt) und der Mutante T35S drei, bei T35A 3,8 und bei G12V vier direkte Wasserliganden des Metallions erhalten. Die Kristallstrukturen von Ras(wt)•GDP zeigen im Gegensatz zu den Ergebnissen der hier an Ras in Lösung durchgeführten EPR-Messungen vier gebundene Wasserliganden. In Lösung sollte eine weitere Koordination des Metallions zum Nukleotid oder Protein ausgebildet sein.

³¹P-NMR-Spektren an Ras•GDP in Lösung weisen bei Ras(wt) und den Mutanten T35S und T35A zwei Populationen auf mit Gleichgewichtskonstanten K_{12} von 0,3, 0,2 bzw. 0,5. Dagegen kommt die onkogene Mutante Ras(G12V) nur in einer Population vor. Die ³¹P-NMR-Experimente scheinen die gleichen Konformationsunterschiede wie die EPR-Daten zu zeigen.

Für die GppNHp-gebundene Form von Ras(wt) wurde bereits gezeigt, dass Ras in Lösung in zwei Konformationen vorliegt, die sich im chemischen Austausch befinden, Zustand 1 und 2. Der Zustand 2 wird durch Effektorbindung stabilisiert. Die Bindung der RBDs von Byr2 und Nore1 an Ras(wt)•GppNHp stabilisieren ebenfalls den Zustand 2. In den chemischen Verschiebungen gleicht das Spektrum des Ras•Byr2-Komplexes dem des Ras•RalGDS-Komplexes. Der Ras•Raf-RBD-Komplex und der Komplex mit Nore1 ergeben deutlich unterschiedliche chemische Verschiebungen.

Die Ras-Schalter I-Mutanten Y32R, T35A, T35S, Y40C, V29G, I36G, V29G/I36G liegen in der GppNHp-Form nahezu vollständig im Zustand 1 vor. Während Ras(T35S) und Y40C sowie Y32R und die Glycin-Doppelmutante durch Effektorbindung in den Zustand 2 überführt werden können, ist dies bei Ras(T35A) nicht möglich. Die Hydroxylgruppe des Thr35 scheint notwendig zu sein, um die Konformation des Zustands 2 einnehmen zu können.

In der Kristallstruktur von Ras(T35S)•GppNHp sind beide Schalter-Regionen nicht sichtbar, während die Gesamt-Struktur sehr ähnlich zum Wildtypprotein ist.

^{31}P -MAS-NMR-Messungen am Kristallpulver von Ras(wt)•GppNHp zeigen, dass Ras(wt) auch im Kristall in mindestens zwei Zuständen vorliegt. Die Resonanzlinien können durch Lorentzlinien unter Annahme einer Gleichgewichtskonstanten $K_{12} = 2$ beschrieben werden.

In ^{31}P -NMR-Experimenten verhält sich Ras(wt)•GppCH₂p analog zum GppNHp-Komplex. Es liegt in zwei Zuständen mit einer Gleichgewichtskonstante $K_{12} = 2$ vor, die sich im chemischen Austausch miteinander befinden, mit Austauschraten $k_1 = 80$ Hz bei 278 K und 1600 Hz bei 298 K und $\Delta G^\ddagger = 57$ kJ/mol; $\Delta H^\ddagger = 113$ kJ/mol und $\Delta S^\ddagger = 194$ J/mol K.

Der Vergleich des GTP-Analogons GTP γ S mit GTP im Komplex mit Ras(wt) zeigt, dass Ras im Komplex mit beiden Tri-Phosphat-Nukleotiden gemäß dem ^{31}P -NMR-Spektrum nur in einem Zustand vorliegt. Die Effektorbindung führt zu keiner Änderung der chemischen Verschiebung.

Die Methylgruppe von Thr35 ist notwendig um die Schalter 1-Region von Ras in einer Konformation (Zustand 2) zu stabilisieren, die der Effektor-gebundenen Konformation sehr ähnlich ist. Dieser Zustand 2 ist nötig, um Affinitäten zwischen Ras und seinen Effektoren zu erreichen, die für eine Interaktion unter physiologischen Bedingungen notwendig ist.

Durch ^{31}P -NMR-Experimente wurde gezeigt, dass das Phosphat-Analogon BeF_3^- auch an freies Ras•GDP bindet. In Gegenwart von Effektor-RBD wird die Affinität deutlich erhöht. Die Effektorbindung führt nur zu minimalen Veränderungen in der chemischen Verschiebungen gegenüber freiem Ras•GDP• BeF_3^- ($\delta_\alpha = -11,4$ ppm, $\delta_\beta = -5,19$ ppm), so dass man annehmen kann, dass BeF_3^- auch ohne gebundenen Effektor auf eine Weise an Ras•GDP bindet, die der Orientierung des γ -Phosphats entspricht.

7 Literaturverzeichnis

Ahmadian, M.R., Hoffmann, U., Goody, R.S. & Wittinghofer, A. (1997a) Individual rate constants for the interaction of Ras proteins with GTPase-activating proteins determined by fluorescence spectroscopy. *Biochemistry* **36**, 4535-4541.

Ahmadian, M.R., Stege, P., Scheffzek, K. & Wittinghofer, A. (1997b) Confirmation of the Arginine-finger Hypothesis for the GAP-Stimulated GTP-Hydrolysis Reaction of Ras. *Nature Structural Biology* **4**, 686-689.

Ahmadian, M.R., Mittal, R., Hall, A. & Wittinghofer, A. (1997c) Aluminum fluoride associates with the small guanine nucleotide binding proteins. *FEBS Letters* **408**, 315-318.

Akasaka, K., Tamada, M., Wang, F., Kariya, K., Shima, F., Kikuchi, A., Yamamoto, M., Shirouzu, M., Yokoyama, S. et al. (1996) Differential structural requirements for interaction of Ras protein with its distinct downstream effectors. *Journal of Biological Chemistry* **271**, 5353-5360.

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.

Andrew, E.R., Bradbury, A. & Eades, R.G. (1958) NMR Spectra from a Crystal Rotated at High speed. *Nature* **182**, 1659-1663.

Bae, C.D., Min, D.S., Fleming, I.N. & Exton, J.H. (1998) Determination of interaction sites on the small G protein RhoA for phospholipase D. *Journal of Biological Chemistry* **273**, 11596-11604.

Barbacid, M. (1987) Ras genes. *Annual Review of Biochemistry* **56**, 779-827.

Bellew, B.F., Halkides, C.J., Gerfen, G.J., Griffin, R.G. & Singel, D.J. (1996) High frequency (139.5 GHz) electron paramagnetic resonance characterization of Mn(II)-H₂(17)O interactions in GDP and GTP forms of p21 ras. *Biochemistry* **35**, 12186-12193.

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.

Bourne, H.R., Sanders, D.A. & McCormick, F. (1990) The GTPase superfamily: a conserved switch for diverse cell functions. *Nature* **348**, 125-132.

Bourne, H.R., Sanders, D.A. & McCormick, F. (1991) The GTPase superfamily: conserved structure and molecular mechanism. *Nature* **349**, 117-127.

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.

Brinkmann, T., Daumke, O., Herbrand, U., Kuhlmann, D., Stege, P., Ahmadian, M.R. & Wittinghofer, A. (2002) Rap-specific GTPase activating protein follows an alternative mechanism. *Journal of Biological Chemistry* **277**, 12525-12531.

Brunner, E. (2002) Uni-Regensburg, persönliche Mitteilung.

Campbell, S.L., Khosravi-Far, R., Rossman, K.L., Clark, G.J. & Der, C.J. (1998) Increasing complexity of Ras signaling. *Oncogene* **17**, 1395-1413.

- Campbell-Burk, S.** (1989) Structural and dynamic differences between normal and transforming N-ras gene products: a ^{31}P and isotope-edited ^1H NMR study. *Biochemistry* **28**, 9478-9484.
- Evans, J.N.S.** (1995) *Biomolecular NMR Spectroscopy*. Oxford University Press, 154.
- Farrar, C.T., Halkides, C.J., Singel, D.J.** (1997) The frozen solution structure of p21 ras determined by ESEEM spectroscopy reveals weak coordination of Thr35 to the active site metal ion. *Structure* **5**, 1055-1066.
- Feher, V.A. & Cavanagh, J.** (1999) Millisecond-timescale motions contribute to the function of the bacterial response regulator protein Spo0F. *Nature* **400**, 289-293.
- Feuerstein, J., Goody, R.S. & Wittinghofer, A.** (1987a) 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.** (1987b) 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.
- Franken, S.M., Scheidig, A.J., Krengel, U., Rensland, H., Lautwein, A., Geyer, M., Scheffzek, K., Goody, R.S., Kalbitzer, H.R., Pai, E.F., et al.** (1993) Three-dimensional structures and properties of a transforming and a nontransforming glycine-12 mutant of p21H-ras. *Biochemistry* **32**, 8411-8420.
- Geyer, M.** (1995) Dissertation, Uni-Regensburg
- 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.
- 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., Assheuer, R., Klebe, C., Kuhlmann, J., Becker, J., Wittinghofer, A. & Kalbitzer, H.R.** (1999) Conformational states of the nuclear GTP-binding protein Ran and its complexes with the exchange factor RCC1 and the effector protein RanBP1. *Biochemistry* **38**, 11250-11260.
- Gronwald, W., Huber, F., Grünwald, P., Spörner, M., Wohlgemuth, S., Herrmann, C. & Kalbitzer, H.R.** (2001) Solution structure of the Ras binding domain of the protein kinase Byr2 from *Schizosaccharomyces pombe*. *Structure* **9**, 1029-1041.
- Halkides, C.J., Farrar, C.T., Larsen, R.G., Redfield, A.G. & Singel, D.J.** (1994) Characterization of the active site of p21 ras by electron spin-echo envelope modulation spectroscopy with selective labeling: comparisons between GDP and GTP forms. *Biochemistry* **33**, 4019-4035.
- Halkides, C.J., Bellew, B.F., Gerfen, G.J., Farrar, C.T., Carter, P.H., Ruo, B., Evans, D.A., Griffin, R.G. & Singel, D.J.** (1996) High frequency (139.5 GHz) electron paramagnetic resonance spectroscopy of the GTP form of p21 ras with selective ^{17}O labeling of threonine. *Biochemistry* **35**, 12194-12200.

- Herrmann, C., Martin, G.A. & Wittinghofer, A.** (1995) Quantitative analysis of the complex between p21ras and the Ras-binding domain of the human Raf-1 protein kinase. *Journal of Biological Chemistry* **270**, 2901-2905.
- 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.
- Hiratsuka, T.** (1983) New ribose-modified fluorescent analogs of adenine and guanine nucleotides available as substrates for various enzymes. *Biochimica et Biophysica Acta* **742**, 496-508.
- 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.
- Huang, L., Wenig, X., Hofer, F., Martin, G.S. & Kim, S.H.** (1997) Three-dimensional structure of the Ras-interacting domain of RalGDS. *Nature Structure Biology* **4**, 609-615.
- Huang, L., Hofer, F., Martin, G.S. & Kim, S.H.** (1998) Structural basis for the interaction of Ras with RalGDS. *Nature Structure Biology* **5**, 422-426.
- Hubbell, W.L., Cafiso, D.S. & Altenbach, C.** (2000) Identifying conformational changes with site-directed spin labeling. *Nature Structural Biology* **7**, 735-739.
- Ishima, R., & Torchia, D.A.** (2000) Protein dynamics from NMR. *Nature Structural Biology* **7**, 740-743.
- Ito, Y., Yamasaki, K., Iwahara, J., Terada, T., Kamiya, A., Shirouzu, M., Muto, Y., Kawai, G., Yokoyama, S., Laue, E. D. et al.** (1997) Regional polyesterism in the GTP-bound form of the human c-Ha-Ras protein. *Biochemistry* **36**, 9109-9119.
- 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.
- John, J., Frech, M. & Wittinghofer, A.** (1988) Biochemical properties of Ha-ras encoded p21 mutants and mechanism of the autophosphorylation reaction. *Journal of Biological Chemistry* **263**, 11792-11799.
- John, J., Frech, M., Feuerstein, J., Goody, R.S. & Wittinghofer, A.** (1989) in *Guanine-Nucleotide-Binding-Proteins*. (Hrsg.: Bosch, L., Kraal, B. & Partmegiani A.), Plenum, New York, 209-214.
- 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.
- John, J., Rensland, H., Schlichting, I., Vetter, I., Borasio, G.D., Goody, R.S. & Wittinghofer, A.** (1993) Kinetic and structural analysis of the Mg(2+)-binding site of the guanine nucleotide-binding protein p21H-ras. *Journal of Biological Chemistry* **268**, 923-929.
- Joneson, T., McDonough, M., Bar-Sagi, D. & Van Aelst, L.** (1996a) RAC regulation of actin polymerization and proliferation by a pathway distinct from Jun kinase [published erratum appears in *Science* (1997) **276**, 185]. *Science* **274**, 1374-1376.

- Joneson, T., White, M. A., Wigler, M. H. & Bar-Sagi, D.** (1996b) Stimulation of membrane ruffling and MAP kinase activation by distinct effectors of RAS. *Science* **271**, 810-812.
- Kalbitzer, H.R., Goody, R.S. & Wittinghofer, A.** (1984) Electron-paramagnetic-resonance studies of manganese(II) complexes with elongation factor Tu from *Bacillus stearothermophilus*. Observation of a GTP hydrolysis intermediate state complex. *European Journal of Biochemistry* **141**, 591-597.
- Kensch, O., Restle, T., Wohrl, B.M., Goody, R.S. & Steinhoff, H.J.** (2000) Temperature-dependent equilibrium between the open and closed conformation of the p66 subunit of HIV-1 reverse transcriptase revealed by site-directed spin labelling. *Journal of Molecular Biology* **301**, 1029-1039.
- Khokhlatchev, A., Rabizadeh, S., Xavier, R., Nedwidek, M., Chen, T., Zhang, X., Seed, B. & Avruch, J.** (2002) Identification of a novel ras-regulated proapoptotic pathway. *Current Biology* **12**, 253-265.
- Khosravi-Far, R., White, M. A., Westwick, J. K., Soltski, P. A., Chrzanowska, W., Van Aelst, L., Wigler, M. H. & Der, C. J.** (1996) Oncogenic Ras activation of Raf/mitogen-activated protein kinase-independent pathways is sufficient to cause tumorigenic transformation. *Molecular and Cellular Biology* **16**, 3923-3933.
- Kinoshita, T., Shirouzu, M., Kamiya, A., Hashimoto, K., Yokoyama, S. & Miyajima, A.** (1997) Raf/MAPK and rapamycin-sensitive pathways mediate the anti-apoptotic function of p21Ras in IL-3-dependent hematopoietic cells. *Oncogene* **15**, 619-627.
- Kuppens, S., Diaz, J.F. & Engelborghs, Y.** (1999) Characterization of the hinges of the effector loop in the reaction pathway of the activation of ras-proteins. Kinetics of binding of beryllium trifluoride to V29G and I36G mutants of Ha-ras-p21. *Protein Science* **8**, 1860-1866.
- Laemmli, U.K.** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Latwesen, D.G., Poe, M., Leigh, J.S. & Reed, G.H.** (1992) Electron paramagnetic resonance studies of a ras p21-MnII·GDP complex in solution. *Biochemistry* **31**, 4946-4950.
- 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.
- 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.
- Linnemann, T., Kiel, C., Herter, P. & Herrmann, C.** (2002) The activation of RalGDS can be achieved independently of its Ras binding domain. Implications of an activation mechanism in Ras effector specificity and signal distribution. *Journal of Biological Chemistry* **277**, 7831-7837.
- Lowy, D.R. & Willumsen, B.M.** (1993) Function and regulation of ras. *Annual Review of Biochemistry* **62**, 851-891.
- Mackay, D.J. & Hall, A.** (1998) Rho GTPases. *Journal of Biological Chemistry* **273**, 20685-20688.

- Maurer, T. & Kalbitzer, H.R.** (1996) Indirect Referencing of ^{31}P and ^{19}F NMR Spectra. *Journal of Magnetic Resonance* **113B**, 177-178.
- 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.
- Moore, M.S.** (1998) Ran and nuclear transport. *Journal of Biological Chemistry* **273**, 22857-22860.
- Moss, J. & Vaughan, M.** (1998) Molecules in the ARF orbit. *Journal of Biological Chemistry* **273**, 21431-21434.
- Mott, H.R., Owen, D., Nietlispach, D., Lowe, P.N., Manser, E., Lim, L. & Laue, E.D.** (1999) Structure of the small G protein Cdc42 bound to the GTPase-binding domain of ACK. *Nature* **399**, 384-388.
- Nageswara Rao, B. D.** (1989) *Methods Enzymology* **176**, 279-311.
- Nakano, A., Miyazawa, T., Nakamura, S. & Kaziro, Y.** (1980) ^{31}P NMR study of the guanine nucleotide binding of elongation factor Tu from *Thermus thermophilus*. *FEBS Letters* **116**, 72-74.
- 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.
- Pacold, M.E., Suire, S., Perisic, O., Lara-Gonzalez, S., Davis, C.T., Walker, E.H., Hawkins, P.T., Stephens, L., Eccleston, J.F. & Williams, R.L.** (2000) Crystal structure and functional analysis of Ras binding to its effector phosphoinositide 3-kinase gamma. *Cell* **103**, 931-943.
- 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.
- Raiford, D.S., Fisk, C.G. & Becker, E.D.** (1979) *Analytical Chemistry* **51**, 2050-1051.
- Reinstein, J., Schlichting, I., Frech, M., Goody, R.S. & Wittinghofer, A.** (1991) p21 with a phenylalanine 28→leucine mutation reacts normally with the GTPase activating protein GAP but nevertheless has transforming properties. *Journal of Biological Chemistry* **266**, 17700-17706.
- Rittinger, K., Walker, P.A., Eccleston, J.F., Nurmahomed, K., Owen, D., 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-Viciana, P., Warne, P. H., Vanhaesebroeck, B., Waterfield, M. D. & Downward, J.** (1996) Activation of phosphoinositide 3-kinase by interaction with Ras and by point mutation. *EMBO Journal* **15**, 2442-2451.
- Rodriguez-Viciana, 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.

- Rohrer, M., Prisner, T.F., Brüggmann, O., Käss, H., Spoerner, M., Wittinghofer, A. & Kalbitzer, H.R. (2001) Structure of the metal-water complex in Ras•GDP studied by high-field EPR spectroscopy and ^{31}P NMR spectroscopy. *Biochemistry* **40**, 1884-1889.
- Rosch, P., Wittinghofer, A., Tucker, J., Sczakiel, G., Leberman, R., Schlichting, I. (1986) ^{31}P -NMR spectra of the Ha-ras p21.nucleotide complexes. *Biochemical and Biophysical Research Communication* **135**, 549-555.
- 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.
- Saraste, M., Sibbald, P.R. & Wittinghofer, A. (1990) The P-loop--a common motif in ATP- and GTP-binding proteins. *Trends in Biochemical Sciences* **15**, 430-434.
- Schägger, H. & von Jagow, G. (1987) Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Analytical Biochemistry* **166**, 368-379.
- 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., Gruenewald, P., Wohlgemuth, S., Kabsch, W., Tu, H., Wigler, M., Wittinghofer A. & Herrmann, C. (2001) The Ras-Byr2RBD complex: Structural basis for Ras effector recognition in yeast. *Structure* **9**, 1043-1050.
- Scheidig, A. (2002) MPI-Dortmund, persönliche Mitteilung.
- Scheidig, A.J., Burmester, C. & Goody, R.S. (1999) The pre-hydrolysis state of p21(ras) in complex with GTP: new insights into the role of water molecules in the GTP hydrolysis reaction of ras-like proteins. *Structure* **7**, 1311-1324.
- 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 p21ras from guanosine 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.
- Shaka, A.J., Baker, P.B. & Freeman, R. (1985) Computer-optimized decoupling scheme for wideband applications and low-level operation. *Journal of Magnetic Resonance* **64**, 547-552.
- 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.

- 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.
- Seewald, M.J., Korner, C., Wittinghofer, A. & Vetter, I.R.** (2002) RanGAP mediates GTP hydrolysis without an arginine finger. *Nature* **415**, 662-666.
- Selvin, P.R.** (2000) The renaissance of fluorescence resonance energy transfer. *Nature Structural Biology* **7**, 730-734.
- Smithers, G.W., Poe, M., Latwesen, D.G. & Reed, G.H.** (1990) Electron paramagnetic resonance measurements of the hydration of Mn(II) in ternary complexes with GDP and ras p21 proteins. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **280**, 416-420.
- Spoerner, M., Herrmann, C., Vetter, I.R., Kalbitzer, H.R. & Wittinghofer, A.** (2001) Dynamic properties of the Ras switch I region and its importance for binding to effectors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**, 4944-4949.
- Steiner, G.** (2001) Dissertation, Uni-Regensburg
- Sydor, J. R., Engelhard, M., Wittinghofer, A., Goody, R.S. & Herrmann, C.** (1998) Transient kinetic studies on the interaction of Ras and the Ras-binding domain of c-Raf-1 reveal rapid equilibration of the complex. *Biochemistry* **37**, 14292-14299.
- Tanaka, Y., Nakayamada, S., Fujimoto, H., Okada, Y., Umehara, H., Kataoka, T. & Minami, Y.** (2002) H-Ras/mitogen-activated protein kinase pathway inhibits integrin-mediated adhesion and induces apoptosis in osteoblasts. *Journal of Biological Chemistry* **277**, 21446-21452.
- Tocque, B., Delumeau, I., Parker, F., Maurier, F., Multon, M.C. & Schweighoffer, F.** (1997) Ras-GTPase activating protein (GAP): a putative effector for Ras. *Cellular Signalling* **9**, 153-158.
- Tong, L.A., de Vos, A.M., Milburn, M.V. & Kim, S.H.** (1991) Crystal structures at 2.2 Å resolution of the catalytic domains of normal ras protein and an oncogenic mutant complexed with GDP. *Journal of Molecular Biology* **217**, 503-516.
- Tu, H., Barr, M., Dong, D.L. & Wigler, M.** (1997) Multiple regulatory domains on the Byr2 protein kinase. *Molecular & Cellular Biology* **17**, 5876-5887.
- 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.
- Valencia, A., Chardin, P., Wittinghofer, A. & Sander, C.** (1991) The ras protein family: evolutionary tree and role of conserved amino acids. *Biochemistry* **30**, 4637-4648.
- 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., Linnemann, T., Wohlgemuth, S., Geyer, M., Kalbitzer, H.R., Herrmann, C. & Wittinghofer, A.** (1999) Structural and biochemical analysis of Ras-effector signaling via RalGDS. *FEBS Letters* **451**, 175-180.
- Vetter, I.R. & Wittinghofer, A.** (2001) The guanine nucleotide-binding switch in three dimensions. *Science* **294**, 1299-1304.

- Vojtek, A.B. & Der, C.J.** (1998) Increasing complexity of the Ras signaling pathway. *Journal of Biological Chemistry* **273**, 19925-19928.
- Walker, J.E., Saraste, M., Runswick, M.J. & Gay, N.J.** (1982) Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *EMBO Journal* **1**, 945-951.
- Wegener, A.A., Chizhov, I., Engelhard, M. & Steinhoff, H.J.** (2000) Time-resolved detection of transient movement of helix F in spin-labelled pharaonis sensory rhodopsin II. *Journal of Molecular Biology* **301**, 881-91.
- Wei, Y., Zhang, Y., Derewenda, U., Liu, X., Minor, W., Nakamoto, R.K., Somlyo, A.V., Somlyo, A.P. & Derewenda, Z.S.** (1997) Crystal structure of RhoA-GDP and its functional implications. *Nature Structural Biology* **4**, 699-703.
- Wes, P.D., Yu, M. & Montell, C.** (1996) RIC, a calmodulin-binding Ras-like GTPase. *EMBO Journal* **15**, 5839-5848.
- White, M.A., Nicolette, C., Minden, A., Poverino, A., Van Aelst, L., Karin, M. & Wigler, M.H.** (1995) Multiple Ras functions can contribute to mammalian cell transformation. *Cell* **80**, 533-541.
- White, M.A., Vale, T., Camonis, J.H., Schaefer, E. & Wigler, M.H.** (1996) A role for the Ral guanine nucleotide dissociation stimulator in mediating Ras-induced transformation. *Journal of Biological Chemistry* **271**, 16439-16442.
- Wiseman, T., Willistone, S., Brandts, J.F. & Lin, L.N.** (1989) Rapid measurement of binding constants and heats of binding using a new titration calorimeter. *Analytical Biochemistry* **179**, 131-137.
- Wittinghofer, A. & Pai, E.F.** (1991) The structure of Ras protein: a model for a universal molecular switch. *Trends in Biochemical Sciences* **16**, 382-387.
- 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- ein molekularer Schalter bei der Tumorentstehung. *Angewandte Chemie* **112**, 4360-4383.
- Wolthuis, R. M., Bauer, B., van't Veer, L. J., 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.
- Xue, L., Murray, J.H. & Tolkovsky, A.M.** (2000) The Ras/phosphatidylinositol 3-kinase and Ras/ERK pathways function as independent survival modules each of which inhibits a distinct apoptotic signaling pathway in sympathetic neurons. *Journal of Biological Chemistry* **275**, 8817-8824.
- 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.
- Zhao, J., Cheng, Y., Wang, Z. & Wang, J.** (2002) Probing the Binding States of GDP to Cdc42 Using Urea Interaction. *Biochemical and Biophysical research Communications* **291**, 1276-1282.

Veröffentlichungen zu denen Ergebnisse dieser Arbeit beigetragen haben:

Rohrer, M., Prisner, T.F., Brüggmann, O., Käss, H., Spoerner, M., Wittinghofer, A. & Kalbitzer, H.R. (2001) Structure of the metal-water complex in Ras•GDP studied by high-field EPR spectroscopy and ³¹P NMR spectroscopy. *Biochemistry* **40**, 1884-1889.

Spoerner, M., Herrmann, C., Vetter, I.R., Kalbitzer, H.R. & Wittinghofer, A. (2001) Dynamic properties of the Ras switch I region and its importance for binding to effectors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**, 4944-4949.

Gronwald, W., Huber, F., Grünewald, P., Spörner, M., Wohlgemuth, S., Herrmann, C., Wittinghofer, A. & Kalbitzer, H.R. (2001) Solution Structure of the Ras-binding domain of the protein kinase Byr2 from *Schizosaccharomyces pombe*. *Structure* **9**, 1029-1041.

Spoerner, M., Steiner, G., Herrmann, C., Schott, A., Wittinghofer, A. & Kalbitzer, H.R. Conformational states of the small GTPase Ras complexed with the GTP-analogs GppCH₂p and GTPγS and their implications for the interaction with effector proteins. Manuskript in Vorbereitung.

8 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AS	Aminosäuren: Alanin (A), Cystein (C), Phenylalanin (F), Glycin (G), Isoleucin (I), Arginin (R), Serin (S), Threonin (T), Valin (V), Tryptophan (W), Tyrosin (Y)
BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumin</i>)
C-Terminus	Carboxyende einer Polypeptidkette
DEAE	Diethylaminoethyl
DNase	Desoxyribonuklease
DSC	<i>digital scanning calorimetry</i>
DSS	2,2-Dimethyl-2-Silapentan-5-Sulfonat
DTE	1,4-Dithioerythritol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
em.	Emission
EPR	Elektronenspinresonanz (<i>electron paramagnetic resonance</i>)
ex.	Anregung (<i>excitation</i>)
FID	Freier Induktionsabfall (<i>free induction decay</i>)
FPLC	<i>Fast performance liquid chromatography</i>
g	Erdbeschleunigung
GAP	GTPase aktivierendes Protein
GDI	Guaninnukleotid-Dissoziationsinhibitor
GDP	Guanosin-5'-diphosphat
GEF	Guaninnukleotid Austauschfaktor (<i>guanine nucleotide-exchange factor</i>)
GppCH ₂ p	Guanosin-5'-(β,γ -methyleno)triphosphat
GppNHp	Guanosin-5'-(β,γ -imido)triphosphat
GST	Gluthation-S-transferase
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
GTP γ S	Guanosin-5'-O-(3-thiotriphosphat)
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure
HPLC	<i>High performance liquid chromatography</i>
IPTG	Isopropyl- β -D-1-thiogalaktosid
ITC	Isotherme Titrationskalorimetrie
K	Kelvin
k _{ass}	Assoziationsgeschwindigkeitskonstante

K _D	Gleichgewichtsdissoziationskonstante
kDa	Kilodalton
k _{diss}	Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante
k _{obs}	Beobachtete Assoziations-/Dissoziationsrate
M	mol·l ⁻¹
mant	N-Methylantraniloyl
mGXP	N-Methylantraniloyl-Guaninnukleotid
nm	Nanometer
NMR	Kernspinresonanz (<i>nuclear magnetic resonance</i>)
N-Terminus	Aminoende einer Polypeptidkette
OD ₆₀₀	Optische Dichte bei λ=600 nm
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphatpuffer (<i>phosphate buffered saline</i>)
PEG	Polyethylenglycol
PI(3)K	Phosphinositol(3)Kinase
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
ppm	10 ⁻⁶ (<i>parts per million</i>)
RBD	Ras-Bindedomäne
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>revolutions per minute</i>)
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
T35S	Mutation der Aminosäure 35 von Threonin zu Serin
Tab.	Tabelle
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U	Enzymatische Aktivität in μmol·min ⁻¹ (<i>unit</i>)
UV	Ultraviolett
wt	Wildtyp
ε	Extinktionskoeffizient
λ	Wellenlänge

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Regensburg, Juli 2002

.....

Michael Spörner

Danksagungen

Herrn Prof. Dr. Dr. Hans Robert Kalbitzer möchte ich *danke*, für die Überlassung des Themas, die zahlreichen Denkanstöße, Ideen und natürlich für die Einführung in die NMR-Spektroskopie.

Herrn Prof. Dr. Alfred Wittinghofer *danke* ich für die Betreuung und das entgegengebrachte Interesse für meine Arbeit. Der gesamten Abteilung I des Max-Planck-Instituts für Molekulare Physiologie in Dortmund gilt mein *Danke*, da ich hier für über 2 Jahre aufgenommen wurde, ohne das Gefühl zu haben, „nur“ ein Gast zu sein.

Herrn Prof. Dr. Thomas Prisner *danke* ich für die Einführung in die Simulation der EPR-Spektren und seiner Arbeitsgruppe für die Durchführung der EPR-Messungen und ihrer Diskussion.

Frau Dr. Ingrid Vetter *danke* ich für die hilfreichen Diskussionen und die Lösung der Kristallstruktur von Ras(T35S)•GppNHp.

Außerdem möchte Priv. Doz. Dr. Christian Herrmann, Dr. Astrid Krämer und Christina Kiel herzlich für die Einführung in die Kalorimetrie und Fluoreszenzspektroskopie und die damit verbundenen Diskussionen *danke*.

Herrn Prof. Dr. Eike Brunner und Adriana Campeanu *danke* ich für die Durchführung der MAS-³¹P-NMR-Messungen.

Dr. Axel Scheidig *danke* ich für die hilfreichen Tipps zur Kristallisation.

Danke sagen möchte ich auch Dorothee Kühlmann für die Klonierung mehrerer Ras-Mutanten und Sabine Wohlgemuth für die RBDs von Byr2 und Nore1. Beiden *danke* ich darüber hinaus für die Einführung in diverse Proteinpräparationen.

Christine Nowak *danke* ich für den Tausch von mant-Nukleotiden gegen Gummibärchen.

Rita Schebaum möchte ich für zahlreiche organisatorische Dinge danken.

Dr. Harry Kany *danke* ich für die Diskussionen bis früh in die Morgenstunden und die PC- und HPLC-spezifischen Tipps.

Dr. Guido Steiner *danke* ich für die Einführung in das Simulationsprogramm der ³¹P-NMR-Spektren.

Der ganzen Regensburger Arbeitsgruppe für das angenehme Arbeitsklima, die kritischen Diskussionen, aber auch die gemeinsamen Cocktailabende.....

Meinem Schreibernachbarn während der Zusammenschreibphase Dr. Wolfram Gronwald *danke* ich für die angenehme Atmosphäre und zahlreichen Diskussionen.

Carola Henche *danke* ich ganz herzlich für die unermüdliche Suche nach Tippfehlern und für alles

Ebenfalls möchte ich meinen Eltern herzlich danken, auf deren Unterstützung jeglicher Art ich immer zählen kann.

Lebenslauf

Michael Spörner

Persönliche Daten:

Geburtsdatum: 18.02.1971

Geburtsort: Bopfingen

Schule, Ausbildung und Studium:

08/77-05/90 Schulausbildung an der Grundschule und am Gymnasium in Bopfingen, Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

07/90-08/92 Soldat auf Zeit, Laufbahn zum Offizier der Reserve

11/92-05/97 Biologiestudium an der Universität Regensburg mit Schwerpunkten in Genetik, Mikrobiologie, Biophysik und Biochemie

06/97-05/98 Diplomarbeit an der Universität Regensburg bei Herrn Prof. Dr. W. Oertel am Lehrstuhl für Genetik über das Thema: *„Regulation der Thallus-entwicklung von Ulva mutabilis Foyt durch ectosymbiontische Bakterien“*
Abschluss: Diplom-Biologe

seit 11/98 Promotion am Institut für physikalische Biochemie und Biophysik bei Herrn Prof. Dr. Dr. H. R. Kalbitzer an der Universität Regensburg, Herrn Prof. Dr. Wittinghofer, Abteilung Strukturelle Biologie am Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie in Dortmund und Herrn Prof. Dr. T. Prisner am Institut für physikalische Chemie der Universität Frankfurt über das Thema: *„Konformationelle Dynamik des Ras-Proteins und ihre Bedeutung für die Effektor-Wechselwirkung“*