



Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg
Medizinische Fakultät Mannheim
Dissertations-Kurzfassung

**Mutationsanalyse der Interaktionsoberfläche von aktiviertem Gαq
mit RhoGEF25**

Autor: Franca-Maria Uhlemann
Institut: Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und
Toxikologie
Doktorvater: Prof. Dr. T. Wieland

Monomere GTPasen der Rho-Familie spielen eine entscheidende Rolle bei der Regulation multipler zellulärer Prozesse, wie der Genexpression, der Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts, Proliferation, gerichteter Migration und Apoptose. Bis heute ist jedoch nur wenig über die unmittelbar beteiligten akzessorischen Proteine und Signaltransduktionswege bekannt. Ziel dieser Arbeit war es daher, die Funktion des Gαq/11-spezifischen Guaninnukleotid-Austauschfaktors (GEF) RhoGEF25 näher zu charakterisieren.

RhoGEF25 besitzt im Gegensatz zu den RhoGEFs der p115RhoGEF-Familie, keine offensichtliche aus der Aminosäuresequenz ableitbare funktionelle Interaktionsdomäne. Die RhoGEFs der p115RhoGEF-Familie interagieren über die RGS-Domäne des jeweiligen RhoGEFs mit Gα und werden so durch Membranbindung aktiviert. Weiter besitzen diese RhoGEFs zahlreiche funktionelle Domänen über die die RhoA-Aktivität moduliert werden kann. RhoGEF25 besitzt außerhalb des DH-PH-Tandems keine weiteren funktionellen Domänen und liegt zudem bereits in der basalen Konformation membrangebunden vor.

Durch Analyse der Kristallstruktur von RhoGEF25 und Einbringen von Punktmutationen wurde gezeigt, dass der Kernbereich des RhoGEF25-Gαq/11-Komplexes den C-Terminus der PH-Domäne, die sogenannte PH-Extension (Aminosäuren 471-481), umfasst und zusätzlich durch einzelne in der DH- sowie der PH-Domäne gelegene Aminosäuren stabilisiert wird. In dieser Arbeit wurden die korrelierenden biochemischen Daten erhoben und gezeigt, dass diese mit den physikalischen übereinstimmen. Als Aktivierungsmechanismus wird aktuell eine Änderung der räumlichen Anordnung der PH-Domäne zur DH-Domäne mit konsekutiver Freigabe der RhoA-Bindungsstelle vermutet. Letztlich wäre zum Beweis dieser These die Kristallstruktur und somit die Konformation des basalen RhoGEF25 interessant.

Basierend auf Sequenzhomologien, insbesondere der 100%-igen Übereinstimmung der PH-Domänen von RhoGEF25, Trio und Duet, wurde angenommen, dass sie eine neue Dbl-Unterfamilie bilden. Durch funktionelle Analysen zeigte sich, dass Trio und Duet ebenfalls an der Gαq/11 abhängigen RhoA-Aktivierung beteiligt sind. Somit können RhoGEF25, Trio und Duet bei enger struktureller, sowie funktioneller Verwandtschaft als neue Dbl-Subfamilie klassifiziert werden.

Das Multidomänen-RhoGEF Trio ist ein evolutionär hoch konserviertes Protein und der einzige Vertreter der RhoGEF25-Familie in Invertebraten wie *C.elegans*. Nun konnte bestätigt werden, dass Unc-73, das orthologe Protein zum humanen Trio in *C. elegans*, ein potenter Gαq/11 ist. Unc-73 ist also nicht nur strukturell, sondern auch funktionell dem humanen Trio äquivalent. Der Unc-73Gαq/11-Komplex wird durch dieselbe in der DH-Domäne gelegene Aminosäure stabilisiert wie RhoGEF25. Dieser Befund unterstützt nicht nur die These zur Bedeutung dieser Aminosäure in der Stabilisierung der Gαq-RhoGEF-Interaktion, sondern lässt vermuten, dass die humanen RhoGEFs Kalirin/Duet und RhoGEF25 ihren Ursprung in Duplikationen des unc73-Gens haben.