



HAL
open science

Etude structurale des petites protéines G : Rap2A dans un complexe non catalytique avec le GTP et Arf6 en complexe avec du GDP

Julie Menetrey

► **To cite this version:**

Julie Menetrey. Etude structurale des petites protéines G : Rap2A dans un complexe non catalytique avec le GTP et Arf6 en complexe avec du GDP. Biochimie [q-bio.BM]. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2000. Français. NNT : . tel-00004186

HAL Id: tel-00004186

<https://theses.hal.science/tel-00004186>

Submitted on 15 Jan 2004

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THESE de DOCTORAT de l'UNIVERSITE de PARIS 6

Spécialité:

Biophysique Moléculaire

Présentée par

Julie Ménétreay

Pour obtenir le grade de DOCTEUR de l'UNIVERSITE PARIS 6

Sujet de la thèse:

Etude structurale des petites protéines G :
Rap2A dans un complexe non catalytique avec le GTP
et
Arf6 en complexe avec le GDP

Soutenue le 5 Décembre 2000

devant le jury composé de :

M^r Paul VIGNY

M^{me} Anne DEBANT

M^{me} Eva PEBAY-PEYROULA

M^r André MENEZ

M^{me} Christine LAMBERT

M^{me} Jacqueline CHERFILS

Président

Rapportrice

Rapportrice

Examineur

Examinatrice

Directrice de thèse

Remerciements

Je tiens à te remercier Jacqueline pour avoir encadré ma thèse avec autant de dynamisme, pour avoir largement contribué à mes premiers pas de scientifique, et pour avoir fait de ces quatre années une expérience riche et instructive.

Encore merci

Je remercie Joël Janin et tout le LEBS pour m'avoir accueillie pendant ces quatre années.

Je tiens à remercier les membres de mon jury de thèse pour avoir accepté de rapporter et d'examiner mon travail de thèse.

Je remercie le centre de recherche de Zéneca-Pharma de Reims, dirigé par Mr Patrice SIRET pour leur soutien financier et l'accueil qu'ils m'ont réservé à chacune de mes visites.

Je remercie l'IFSBM pour leur soutien financier et pour la qualité et la diversité de leur formation.

Je tiens à remercier nos collaborateurs : l'équipe de Marc Chabre de l'Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire et l'équipe de Jean-Renaud Garel du Laboratoire d'Enzymologie et de Biochimie Structurales pour nous avoir préparé des dizaines de milligramme de protéines (qui cristallisent !!!).

À Annie, Gérard, Louis, Nicolas, Petya, Philippe et Sebastiano, compagnons de bureau, de paillasse et de clavier, pour vos bons conseils et votre aide, pour les discussions sérieuses et beaucoup moins sérieuses, pour tous ces bons moments passé en votre compagnie (pauses bananes incluses) ...: **Un grand merci.**

À mes parents et ma sœur,
Pour m'avoir donné les moyens de réussir et avoir cru en moi
À Miguel,
Pour ton soutien de tous les jours et tout le reste...

Sommaire abrégé

Remerciements.....	1
Sommaire abrégé.....	3
Sommaire.....	4
Liste des figures et tableaux.....	8
Abréviations.....	10
Avant-propos	11
<u>Introduction : Structures des petites protéines G</u>	14
▪ I-Définition d'une petite protéine G.....	14
▪ II-Changements de conformation induits par le cycle structural GDP/GTP des petites protéines	23
▪ III-Caractéristiques structurales des petites protéines G.....	27
▪ Annexe de l'Introduction.....	33
<u>Chapitre 1 : Etude structurale de la protéine Rap2A dans un complexe non catalytique avec le GTP</u>	35
▪ I-Généralités.....	37
▪ II-Etude structurale de Rap2A dans un complexe non catalytique avec le GTP.....	51
<u>Chapitre 2 : L'étude structurale de la protéine Arf6 en complexe avec le GDP suggère une base structurale pour la spécificité des facteurs d'échange GDP/GTP</u>	63
▪ I-Généralités.....	65
▪ II-Etude structurale de Arf6 en complexe avec du GDP.....	89
<u>Conclusions générales et perspectives</u>	99
<u>Annexes</u>	104
Références.....	117

Sommaire

Remerciements	1
Sommaire abrégé	3
Sommaire	4
Liste des figures et tableaux	8
Abréviations	10
Avant-propos	11

Introduction : La structure des petites protéines G

<u>I-Définition d'une petite protéine G</u>	16
A-Cycle moléculaire GDP/GTP des petites protéines G	16
B-Structure générale d'une petite protéine G	17
1-Repliement général	17
2-Configuration du site nucléotidique	18
a-Motifs caractéristiques	18
b-Magnésium	20
C-Association des petites protéines G à la membrane	21
1-Association constitutive à la membrane	21
2-Association partielle à la membrane	21
3-Ran ne s'associe pas à la membrane	22
<u>II- Changements de conformation induits par le cycle structural GDP/GTP des petites protéines G</u>	23
A-Changements de conformation communs aux petites protéines G : Switch I et Switch II	23
1-Switch I	23
2-Switch II	25
B-Changements de conformation particuliers à une famille	26
1-L'Interswitch et l'hélice N-Terminale des protéines ARF	26
2-Switch C-Terminal de la protéine Ran	26
<u>III- Caractéristiques structurales des petites protéines G</u>	27
A-Repliement général	27
1-Insertion d'une hélice chez les protéines RHO	27
2-L'hélice N-Terminale des protéines ARF	28
3-Extension C-Terminale de Ran	28
4-Autres caractéristiques	29
a-Différences structurales au niveau de la "conformation ouverte" du Switch I entre les protéines Arf1/6-GDP et Ran-GDP	29

b-Résidu "charnière" à la fin du Switch I chez les protéines ARF, RAN et RAB	29
c-Interswitch : région flexible des petites protéines G	29
B-Site nucléotidique	
1-La glutamine catalytique du motif PM3 est remplacée par une thréonine chez les protéines Rap	30
2-Les protéines ARF ne possèdent pas de motif G1	30
3-Variabilité du motif G2 dans la famille RHO	31
a-L'asparagine du motif G2 n'est pas conservée chez Rac1 et CDC42	31
b-La lysine du motif G2 n'est pas conservée chez CDC42	31
4-Autres caractéristiques	31
a-La lysine du motif G3 n'est pas conservée chez Rac1, CDC42 et Arf	31
b-Conséquence de la conformation ouverte du Switch I de Ran-GDP sur le motif G1	32

<u>Annexes de l'Introduction</u> : Méthodologies employées pour décrire structuralement les petites protéines G dans l'Introduction.....	33
1-Superposition des structures du tableau 1	33
2-Alignement de séquences des petites protéines G listées dans le tableau 1 "basé sur la structure"	33
3-Superposition des Interswitch de petites protéines G	34

Chapitre 1 : Etude de la protéine Rap2A dans un complexe non catalytique avec le GTP

<u>I-Généralités</u>	37
A-La famille des protéines RAS	37
1-La sous-famille Ras	38
2-La sous-famille R-Ras	39
3-La sous-famille Ral	40
4-La protéine Rheb	41
5-Les protéines Rin et Rit	42
B-La sous-famille Rap	43
1-Généralités	43
2-Les protéines Rap1	44
3-Les protéines Rap2	46
C-Cycle structural GDP/GTP de Rap2A	48

<u>II-Etude structurale de Rap2A dans un complexe non catalytique avec le GTP</u>	51
A-Article 1	51
B-Données expérimentales	54
1-Collecte et traitements des données	54
2-Remplacement moléculaire et affinement de la structure	55
C-Commentaires post-publication	57

1-La tyrosine 32.....	57
a-Interaction tyrosine 32/phosphate gamma chez les petites protéines G.....	57
b-Les petites protéines G qui ne possèdent pas de tyrosine 32.....	58
c-Compétition entre la tyrosine 32 et "l'arginine finger" des GAP.....	59
d-Rôle de la tyrosine 32.....	60
2-Flexibilité des régions Switch.....	61

Chapitre 2-L'étude de la protéine Arf6 en complexe avec le GDP suggère une base structurale pour la spécificité des facteurs d'échange GDP/GTP

<u>I-Généralités</u>	65
A-La famille des protéines ARF	65
1-La sous-famille Arf.....	66
2-la sous-famille Arl.....	67
a-Sous-groupe ARL4.....	68
b- Arl1, 2, 3, 5.....	68
3-La protéine ARD1.....	69
4-La protéine Sar1.....	69
5-La protéine ARP.....	70
B-Les protéines régulatrices des protéines Arf	70
1-Les ArfGEF.....	70
a-Domaine sec7.....	70
b-Mécanisme d'échange du nucléotide de Arf1 par un domaine sec7.....	71
c-Les différentes familles de ArfGEF.....	71
d-Spécificités des ArfGEF pour les protéines Arf.....	72
e-Spécificités des ArfGEF pour les phosphoinositols.....	72
2-Les ArfGAP.....	73
a-Domaine GAP.....	73
b-Mécanisme d'hydrolyse du GTP de Arf1 par une GAP.....	73
c-Autres fonctions des ArfGAP.....	75
d-Spécificités des ArfGAP pour les protéines Arf.....	76
e-Spécificité des ArfGAP pour les phosphoinositols.....	76
C-Arf1 et les protéines de la classe I et II	76
1-Localisations.....	76
2-Fonctions et partenaires.....	77
3-Le cycle GDP/GTP de Arf1 est associé à un cycle cytosol/membrane.....	80
D-Arf6	82
1-Localisations.....	83
2-Fonctions.....	84
3-Les particularités biochimiques de Arf6.....	88

II-Etude structurale de Arf6 en complexe avec du GDP	89
A-Article 2	89
B-Données expérimentales	91
1-Cristallisation de Arf6-GDP.....	91
2-Collecte et traitement des données cristallographiques.....	92
3-Remplacement moléculaire et affinement de Arf6-GDP.....	93
C-Particularités de la structure	95
1-Absence du magnésium dans le site nucléotidique.....	95
2-Présence d'une molécule de DTT au niveau de la cystéine du motif G3 [CAT].....	97

Conclusions générales et perspectives	99
--	----

Annexes

Annexe A Article de l'étude du cycle GDP/GTP structural de Rap2A.....	104
Annexe B Article de l'étude structurale du domaine sec7 du facteur d'échange ARNO des protéines Arf.....	106
Annexe C Essais de cristallisation de Arf1 Δ 17 en complexe avec du GTP γ S et en complexe avec le domaine sec7 du facteur d'échange ARNO.....	108
Annexe D Cristallisation et collecte des données cristallographiques de Arf6-GTP γ S.....	112
Références	117

Liste des Figures et Tableaux

Face à la page

Avant-propos

Fig.1 : Arbre de la super-famille des petites protéines G.....	12
---	----

Introduction

Fig.2 : Cycle moléculaire GDP/GTP des petites protéines G.....	16
Fig.3 : Repliement général des petites protéines G.....	17
Fig.4 : Alignement de séquences "basé sur la structure" des petites protéines G du tableau I et pourcentage d'identité et de similarité de séquence avec H-Ras.....	18
Tableau I : Informations sur les structures de petites protéines G utilisées pour les descriptions structurales faites à l'Introduction.	18
Fig.5a : Motifs caractéristiques des petites protéines G.....	19
Fig.5b : Position structurale des motifs caractéristiques.....	19
Fig.6 : Schéma de la configuration du site nucléotidique des petites protéines G.....	20
Fig.7 : Modifications lipidiques trouvées chez les petites protéines G.....	21
Fig.8 : Changements de conformation au cours du cycle GDP/GTP de H-Ras, RhoA, Arf1 et Ran.....	24
Fig.9 : Insertion d'une hélice chez les protéines RHO et d'un "crochet" chez Ypt51 par rapport au repliement général.....	27
Fig.10 : Vue stéréographique de la superposition de l'Interswitch des petites protéines G..	29

Chapitre 1

Fig.11 : Dendrogramme de la famille RAS.....	37
Fig.12 : Alignement de séquences des protéines humaines de la famille RAS et pourcentage d'identité et de similarité de séquence entre elles.....	38
Fig.13 : Vue stéréographique des changements de conformation du cycle structural GDP/GTP et des régions flexibles de Rap2A.....	49
Fig.14 : Interactions faites par la tyrosine 32 au niveau du site nucléotidique de Rap2A-GTP.....	50
Fig.15 : Formules du R_{sym} , du facteur R , du facteur R_{free} , du facteur de corrélation et de la densité électronique de type aFo-bFc.....	56

Fig.16: Cristaux de Rap2A-GTP.....	54
Tableau II: Flexibilité des Switch I et II des petites protéines G.....	61

Chapitre 2

Fig.17: alignement de séquences des protéines ARF et pourcentage de similarité et d'identité de séquence entre elles.....	65
Fig.18 : Représentation schématique des familles ArfGEF et ArfGAP.....	71
Fig.19 : Mécanisme d'activation de Arf1 par sa GEF en présence de membrane.....	81
Fig.20 : Structures tridimensionnelles de Arf1.....	82
Fig.21 : Cristal de Arf6-GDP.....	92
Tableau III : Statistiques du remplacement moléculaire de Arf6-GDP.....	94
Fig.22 : Densité électronique de la cystéine 159 et de la molécule de DTT.....	98

Annexes

Fig.23 : Mécanisme d'activation des petites protéines G par un facteur d'échange GDP/GTP.....	109
Fig.24 : Cristaux de Arf6-GTP γ S.....	113
Fig.25 : Méthode de congélation des cristaux dans de l'éthane liquide.....	114

Abréviations

ADNc : Acide désoxyribonucléique complémentaire

AMPC: Adénosine mono phosphate cyclique

AP : Adaptor protein

COP : COatomer Proteins

DAG : Diacylglycérol

DTT : Dithiothreitol

EDTA : EthyleneDiaminoTetraAcetic acid

ESRF: European Synchrotron Radiation facility

E. Coli : *Escherichia Coli*

GAP : GTPase Activating Protein

GDP : Guanosine 5'-diphosphate

GTP : Guanosine 5'-triphosphate

GTP γ S : Guanosine 5'-(γ -thio)triphosphate

GDPNHP : Guanylyl β , γ -imidodiphosphate

GDPCH₂P : Guanylyl β , γ -methylenediphosphonate

GEF : Guanine nucleotide Exchange Factor

LURE : Laboratoire pour l'Utilisation du Rayonnement Electro-magnétique

PA : acide phosphatidique

PC : phosphatidylcholine

PCR : Polymerase Chain Reaction

PIP : Phospho-Inositol monophosphate

PIP₂ : Phospho-Inositol diphosphate

PIP₃ : Phospho-Inositol triphosphate

PKA : Protein Kinase A

PKC : protein Kinase C

PLD : phospholipase D

r.m.s.d. : root mean square deviation

Avant-propos

Les petites protéines G représentent une super-famille de protéines (environ 100 protéines) classées en 5 familles principales : RAS, RAB, RHO, RAN et ARF chacune constituée par des sous-familles (fig.1). Elles sont impliquées dans des processus cellulaires fondamentaux et divers, comme la différenciation et la prolifération cellulaire, l'organisation et la dynamique du cytosquelette, et les transports intracellulaires. Le dysfonctionnement de ces protéines peut entraîner des pathologies humaines comme le cancer, l'inflammation, le diabète et pourrait être impliqué dans le contrôle de l'entrée de pathogènes dans les cellules. Une compréhension détaillée des mécanismes moléculaires qui régulent les petites protéines G permettrait d'imaginer de nouvelles approches pour l'identification et la conception d'inhibiteurs.

Les petites protéines G sont des "interrupteurs moléculaires", c'est-à-dire qu'elles alternent entre un état inactif et un état actif. Ce processus est la conséquence d'un cycle moléculaire et structural GDP/GTP. La petite protéine G en complexe avec du GDP est inactive. Le GDP est échangé contre du GTP, ce qui a pour effet d'activer la protéine en induisant des changements de conformation qui lui permettent d'interagir avec des effecteurs (partenaires cellulaires spécifiques de la forme GTP). L'hydrolyse du GTP en GDP + phosphate inorganique a pour effet de désactiver la protéine qui change à nouveau de conformation, ce qui l'empêche d'interagir avec les effecteurs. Les petites protéines G ne fonctionnent pas seules, elles sont activées par un facteur d'échange GDP/GTP (GEF) et désactivées par une protéine activatrice de la GTPase (GAP), sans ces deux protéines régulatrices le cycle GDP/GTP des petites protéines G n'est pas fonctionnel.

Nous avons choisi au laboratoire de nous intéresser aux mécanismes structuraux de la régulation moléculaire des petites protéines G. Pour cela, nous étudions les petites protéines G et leurs partenaires d'un point de vue structural, par diffraction des rayons X.

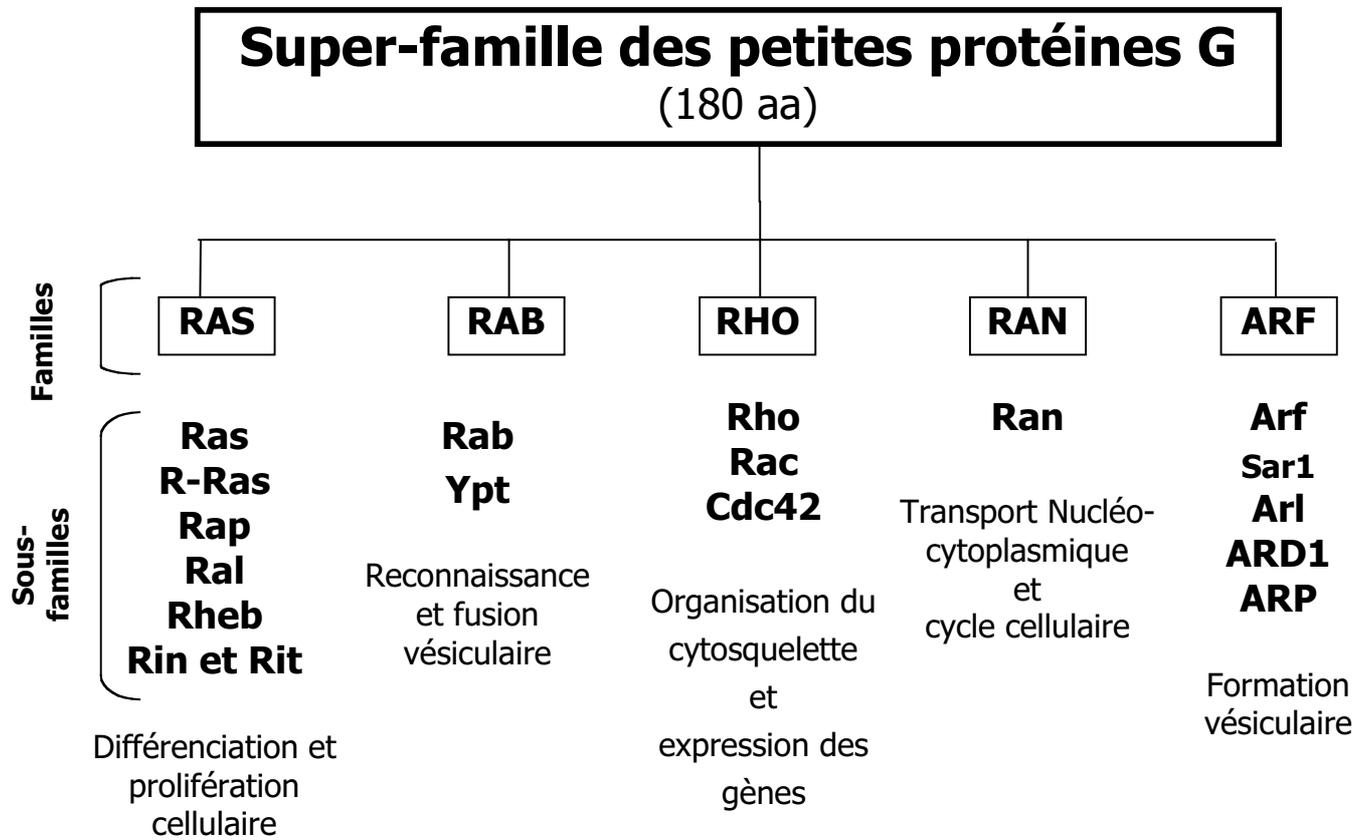


Figure 1: Arbre de la super-famille des petites protéines G.

Les thèmes abordés au cours de mon travail de thèse portent sur la protéine Rap2A, homologue de H-Ras et les protéines Arf. Je présenterai les deux principaux projets sur lesquels j'ai travaillé : l'étude structurale de la protéine Rap2A dans un complexe non catalytique avec le GTP et l'étude structurale de la protéine Arf6 en complexe avec du GDP. La structure de Rap2A en complexe avec du GTP représente une forme non catalytique de la protéine, car la présence du GTP dans le site nucléotidique suggère que celui-ci n'a pas été hydrolysé. Cette structure a permis de confirmer la présence d'une nouvelle interaction au niveau du site nucléotidique. Le rôle de cette interaction sera discuté. De plus, nous avons discuté les transitions désordre/ordre des régions Switch de Rap2A, et avons élargi notre discussion aux régions Switch des petites protéines G pour qui les structures sont connues (Chapitre 1-II-C-2). L'étude structurale de la petite protéine G Arf6 en complexe avec du GDP a permis de mettre en évidence que deux protéines proches (84 % de similarité de séquence) pouvaient avoir des structures assez différentes pour être reconnues par des partenaires distincts. De plus, nous avons montré qu'une différence de séquence entre Arf1 et Arf6, en dehors du site nucléotidique est responsable de l'élimination d'une interaction dans le site nucléotidique (Chapitre 2-II-A). Cette observation a permis à nos collaborateurs de montrer par mutagenèse dirigée basée sur la structure que ce résidu est responsable de la différence d'affinité des deux protéines pour le GDP.

L'analyse des structures de Rap2A et Arf6 a nécessité que j'acquière une vue d'ensemble sur la structure des petites protéines G, mais aussi une vue d'ensemble sur les différentes protéines qui constituent chaque sous-famille à laquelle appartiennent les protéines Rap2A et Arf6. C'est pourquoi, l'introduction de ce manuscrit décrit en détail la structure des petites protéines G. Cette description permettra de poser les bases structurales nécessaires à l'analyse de la structure de Rap2A-GTP (Chapitre 1) et de Arf6-GDP (Chapitre 2). Et c'est pourquoi, les deux chapitres qui présentent l'étude structurale de Rap2A et de Arf6 seront introduits par une description générale des différentes protéines qui constituent la sous-famille RAS et ARF. Ces descriptions permettront de mettre en évidence les différences que peuvent posséder des protéines à forte homologie de séquence, et de se poser la

question de savoir sur quelles bases structurales ces différences peuvent être générées.

L'étude structurale de Rap2A dans un complexe non catalytique avec le GTP et l'étude structurale de Arf6 en complexe avec du GDP ont fait l'objet d'une publication dans *PROTEINS Structure, Function and Genetics* et *Nature Structural Biology* respectivement. Ces deux articles sont présentés dans ce manuscrit et serviront de base aux discussions.

Les conclusions générales et les perspectives de ce travail seront présentées à la suite de l'étude structurale de Rap2A et de Arf6. Dans ce paragraphe, nous discuterons des bases structurales qui permettent à des protéines fortement homologues d'être distinguées par les mêmes partenaires cellulaires. Nous généraliserons cette discussion à la super-famille des petites protéines G. De plus, nous discuterons de la difficulté de prédire des modèles de petite protéine G à partir d'un homologue au vu des résultats surprenants que nous avons observés en résolvant la structure de Arf6-GDP.

Les projets auxquels j'ai participé au cours de ma thèse seront présentés en annexe. L'étude structurale du domaine sec7 d'un facteur d'échange humain des protéines Arf qui a fait l'objet d'une publication dans *Nature* sera présentée en annexe B. Les essais de cristallisation effectués sur la protéine Arf1 Δ 17 en complexe avec un analogue non hydrolysable du GTP et en complexe avec le domaine sec7 de ARNO seront présentés en annexe C. Et pour finir l'obtention de cristaux de Arf6 en complexe avec du GTP γ S et la préparation de conditions de cryogénie pour ces cristaux seront présentés en annexe D.

Introduction

Structures des petites protéines G

Introduction- La structure des petites protéines G

Depuis la résolution des premières structures de H-Ras en 1988 ((de Vos, 1988), (Milburn, 1990) et (Pai, 1990)), plusieurs structures de petites protéines G fixant du GDP ou du GTP (en général des analogues non hydrolysables du GTP, comme le GTP γ S ou le GDPNHP) ont été résolues (tab.I), ainsi que des structures de petites protéines G en complexe avec leurs protéines régulatrices ou leurs effecteurs. Nous connaissons maintenant la structure d'au moins une petite protéine G dans chaque famille et pour certaines d'entre elles sous différentes formes (forme GDP, GTP et en complexe avec une autre protéine).

Cette Introduction a pour objet de décrire en détail la structure des petites protéines G connues en complexe avec du GDP et du GTP (tab.1), ainsi que les régions impliquées dans les changements de conformation au cours du cycle structural GDP/GTP. Les régions qui changent de conformation au cours du cycle GDP/GTP des petites protéines G ont été appelées Switch I et Switch II (Milburn, 1990). De nombreuses études ont montré que ces régions étaient aussi les principaux sites d'interactions des partenaires cellulaires (effecteurs et protéines régulatrices) qui sont des protéines très différentes en structure, en taille et en séquence.

La description structurale des petites protéines G a déjà été à maintes reprises présentée dans différentes revues. La description présentée ici couple les informations regroupées dans ces revues et un travail personnel d'analyse faite au cours de ma thèse (voir méthodologie présentée en annexe de l'Introduction).

Dans un premier temps, la définition d'une petite protéine G sera abordée d'un point de vue moléculaire (cycle GDP/GTP et association à la membrane) et d'un point de vue structural (repliement général et configuration du site nucléotidique). La définition structurale d'une petite protéine G présentée ici sera utilisée comme référence dans la suite du manuscrit. Un alignement de séquences "basé sur la structure" des petites protéines G connues sera présenté, ceci pour faciliter les différentes descriptions faites dans cette introduction. L'association des petites

protéines G à la membrane est abordée d'une façon générale dans le but d'introduire les commentaires faits au début des Chapitres 1 et 2 sur les différentes modifications lipidiques des protéines de la famille RAS et ARF. Dans un second temps et à la lumière de résultats structuraux récents, les changements de conformation communs aux petites protéines G (Switch I et II) au cours du cycle structural GDP/GTP seront décrits, ainsi que ceux qui sont particuliers à une protéine donnée. Pour finir et toujours à la lumière de résultats structuraux récents, les principales caractéristiques structurales du repliement général des petites protéines G en complexe avec du GDP ou des analogues du GTP seront présentées, ainsi que les caractéristiques au niveau du site nucléotidique.

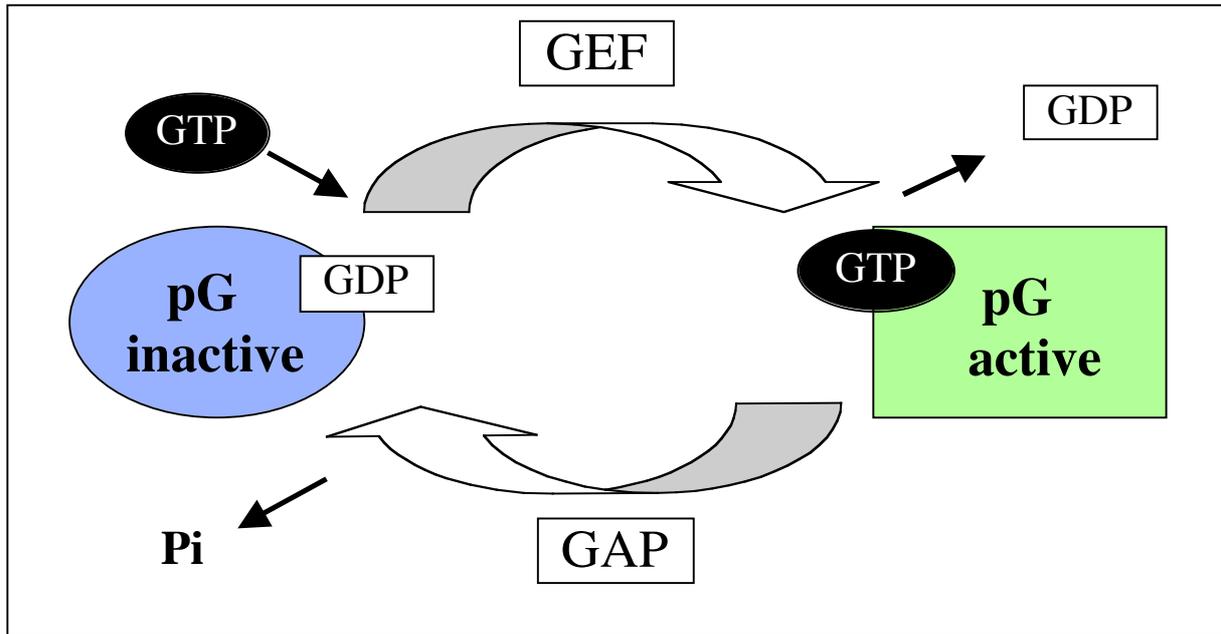


Figure 2-Cycle moléculaire GDP/GTP des petites protéines G (pG) : Les petites protéines G sont capables de lier du GDP (forme inactive), de l'échanger contre du GTP (forme active) et d'hydrolyser ce dernier en GDP+ phosphate inorganique. Ce cycle induit des changements de conformation qui leur permettent d'interagir avec différents partenaires cellulaires. Le cycle GDP/GTP des petites protéines G ne fonctionne pas seul, il est régulé par un facteur d'échange GDP/GTP (GEF) et par une protéine activant la GTPase intrinsèque des petites protéines G (GAP).

I-DÉFINITION D'UNE PETITE PROTÉINE G

Les petites protéines G appartiennent à une grande famille de protéines capables de fixer en alternance du GDP et du GTP. Elles sont appelées petites protéines G, car contrairement aux autres protéines G (protéines hétérotrimériques, EF-Tu, Dynamin, GBP...) elles sont composées d'une seule sous-unité et celle-ci est plus petite (environ 20 kDa). Les petites protéines G décrivent un cycle moléculaire GDP/GTP en association à la membrane qui leur permet d'être fonctionnelles dans la cellule (fig.2). Les différentes structures de petites protéines G ont montré que ces dernières partagent un repliement similaire.

A-Cycle moléculaire GDP/GTP des petites protéines G (fig.2)

L'activité des petites protéines G est contrôlée par le nucléotide qui lui est associé. La forme liant le GDP est inactive et n'induit aucun signal cellulaire. L'échange du GDP contre du GTP active la protéine en induisant des changements de conformation (réarrangements structuraux) qui lui permettent d'interagir avec des effecteurs (partenaires cellulaires de la forme GTP). Les signaux induits par la forme active sont interrompus par l'hydrolyse du GTP en GDP + phosphate inorganique. La petite protéine G est alors désactivée, elle fixe le GDP et relâche le phosphate inorganique. Les petites protéines G possèdent une faible activité d'échange GDP/GTP intrinsèque et une faible activité GTPasique intrinsèque qui ne leur permettent pas d'être fonctionnelles. C'est pourquoi le cycle moléculaire GDP/GTP des petites protéines G est régulé par un facteur d'échange GDP/GTP (GEF, Guanine nucleotide Exchange Factor) qui catalyse l'étape d'activation, et une protéine activatrice de la GTPase (GAP, GTPase Activating Protein) qui catalyse l'étape d'inactivation (fig.2).

D'autres régulateurs peuvent intervenir au cours du cycle moléculaire GDP/GTP des petites protéines G. Les protéines inhibitrices de la dissociation du nucléotide (GDI, Guanine Dissociation Inhibitor) participent à la régulation du cycle GDP/GTP des protéines de la famille RHO et RAB. Elles inhibent la dissociation du GDP et permettent aux protéines RHO et RAB de se dissocier des membranes (voir Introduction-I-C-2). De plus, il a été montré que certains effecteurs de petite

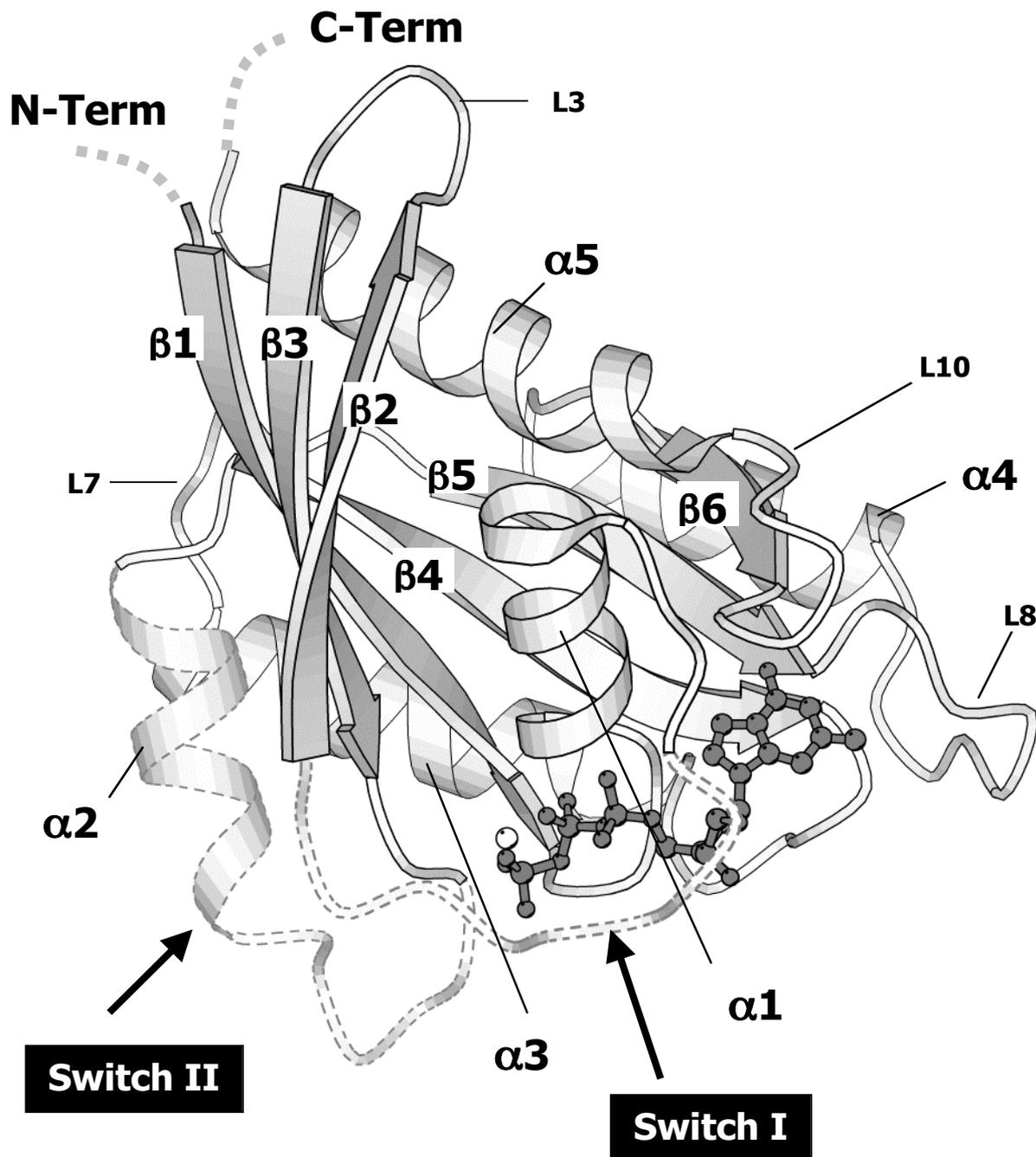


Figure 3: Repliement général des petites protéines G

Le nucléotide présenté ici est un GTP, afin de situer le phosphate gamma. Le nucléotide est en gris et le magnésium est représenté par une sphère blanche. Les régions switch sont présentées en pointillées car ce sont des régions qui changent de conformation. Les régions N- et C-Termiales sont variables en longueur, en séquence et en structure, c'est pourquoi elles ne sont pas représentées. La structure secondaire est annotée, les boucles qui sont discutées dans le manuscrit sont indiquées.

protéine G pouvaient participer à la régulation du cycle GDP/GTP en augmentant l'activité GTPase de la GAP ((Bischoff, 1995) et (Golberg, 1999)).

B-Structure générale des petites protéines G

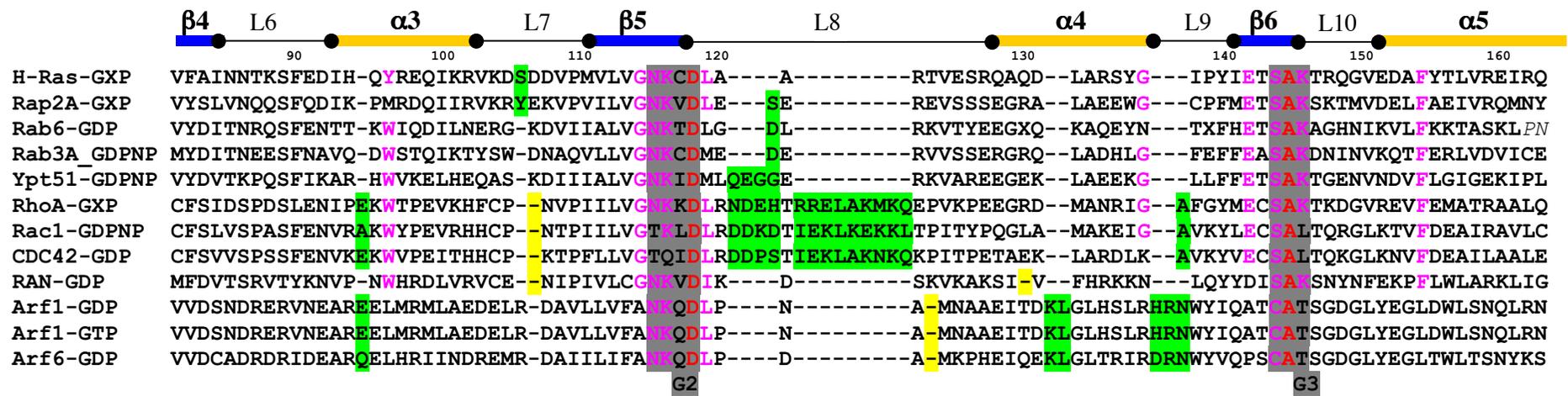
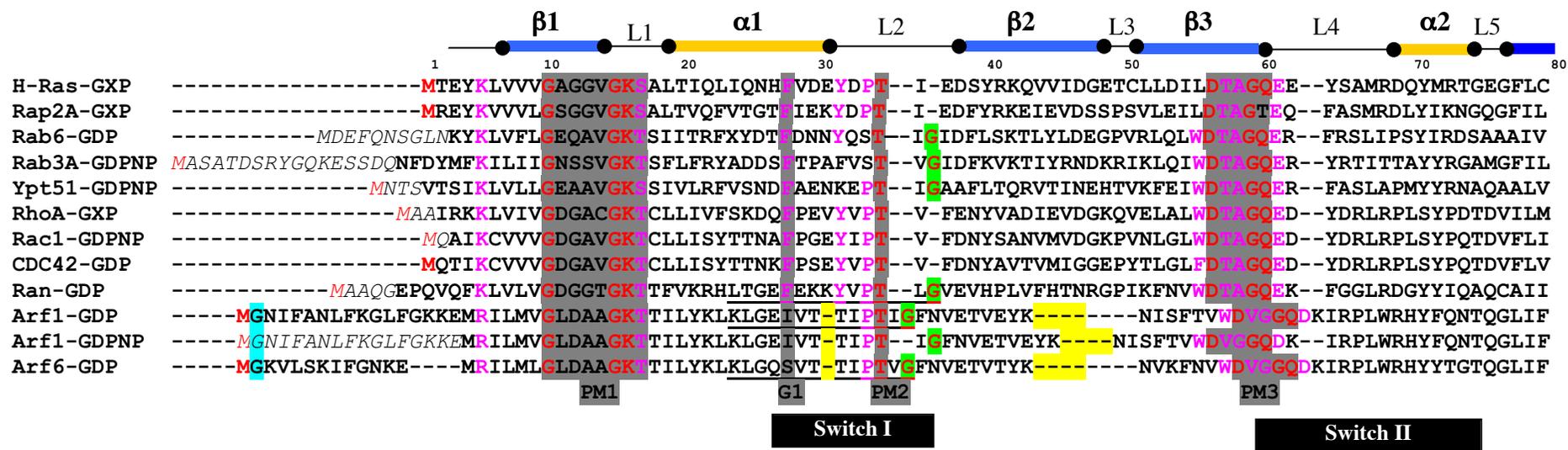
Nous connaissons maintenant la structure d'au moins une petite protéine G de chaque famille, sous la forme GDP et/ou GTP (tab.I). À partir de ces structures, le repliement général d'une petite protéine G, c'est-à-dire le domaine structural commun à chaque petite protéine G ainsi que la configuration du site nucléotidique peuvent être définis et décrits.

1-Repliement général

Le repliement général des petites protéines G a été défini à partir de la superposition des structures du tableau I (voir méthodologie en annexe de l'Introduction), comme étant le repliement consensus de toutes les structures de petites protéines G. Certaines régions ne présentent pas de conformation consensus : parmi celles-ci on retrouve les régions qui changent de conformation au cours du cycle structural GDP/GTP (Switch I et II). De plus, les régions N et C-Termiales des petites protéines G ont été exclues de la définition du repliement général car elles sont variables en séquence, en longueur et en structure d'une petite protéine G à l'autre.

Le repliement général des petites protéines G est décrit par une structure globulaire composée par un feuillet β central de 6 brins (1 antiparallèle et 5 parallèles), qui est entouré par 5 hélices α (fig.3). Le N- et C-Terminus (tronqués) du repliement général des petites protéines G sont structuralement proches et se trouvent à l'opposé du site nucléotidique.

Un alignement de séquences "basé sur la structure" (voir méthodologie dans l'annexe de l'Introduction) des structures de petites protéines G listées dans le tableau 1, qui a permis de définir le repliement général est présenté ici (fig.4). La structure secondaire du repliement général des petites protéines G est indiquée sur



		170	180	Identité/similarité de séquence
H-Ras-GXP	<i>HKLRKLNPPDESGPGCMSCK</i> CVLS -----			100/100%
Rap2A-GXP	<i>AAQPKDDPCCSA</i> CNIQ -----			45/70%
Rab6-GDP	<i>LDNTNNNEANVVVDIQLTNNSNKNDKNMLSKCL</i> -----			25/46%
Rab3A-GDPNP	<i>KMSESLDTADLAVTGAKQGPQLTDQQAPPHQD</i> CAC -----			24/47%
Ypt51-GDPNP	<i>KTAEEQNSASNERESNNQRVDLNAANDGTSANSA</i> CSC -----			27/51%
RhoA-GXP	<i>ARRGKKKSG</i> CLVL -----			29/47%
Rac1-GDPNP	<i>PPPVKRRKR</i> CLLL -----			31/46%
CDC42-GDP	<i>PPEPKSRRC</i> VLL -----			30/46%
Ran-GDP	<i>DPNLEFVAMPALAPPEVMDPALAAQYEHDL</i> EAQTTALPDEDDDL			20/35%
Arf1-GDP	<i>QK</i> -----			14/36%
Arf1-GTP	<i>QK</i> -----			14/36%
Arf6-GDP	-----			13/36%

Figure 4: Alignement de séquences "basé sur la structure" des petites protéines G du tableau 1 et pourcentage d'identité et de similarité de séquence avec H-Ras.

L'alignement de séquences de ces protéines a été fait avec le programme CLUSTALW, il a été rectifié sur une base structurale, c'est-à-dire que les résidus structurellement équivalents de chaque protéine ont été alignés (voir méthodologie en annexe du chapitre 1). Ce travail a été fait pour toutes les structures du tableau 1, dans le cas où l'alignement de séquences "basé sur la structure" d'une même protéine dans deux formes distinctes est équivalent, une seule séquence est présentée (GXP), sinon le nucléotide présent sera précisé. Les régions N-terminales et C-terminales n'ont pas été alignées, sauf celles de Arf1-GDP par rapport à celles de Arf6-GDP. Les résidus indiqués en italiques sont absents de la structure. La numérotation de H-Ras est indiquée au dessus de sa séquence. La structure secondaire du repliement général d'une petite protéine G (chap1-I-B-1) est représentée au-dessus de l'alignement de séquence. Les traits bleus représentent les brins β , et les traits jaunes les hélices α . Les pourcentages d'identité et de similarité de séquence entre H-Ras et les autres protéines sont présentés à la fin de l'alignement de séquence. Les résidus en rouge respresentent les résidus strictement conservés, les résidus en rose représentent les résidus conservés à 1 ou 2 résidus prés. Les résidus indiqués en italique sont les résidus absents de la structure. Les motifs caractéristiques sont surlignés en gris et annotés. Les tirets surlignés en jaune sont des délétions par rapport aux autres séquences. Les résidus surlignés en vert sont des insertions par rapport aux autres séquences. Les résidus surlignés en indigo représentent les motifs qui subissent des modifications lipidiques. Les résidus en bleu représentent les motifs polybasiques. Les résidus en vert représentent un motif riche en proline. Les résidus soulignés en noir sont les résidus d'un switch I en conformation ouverte, ces résidus sont structurellement différents des résidus appartenant à un switch I en conformation fermée, et ne sont par conséquent pas alignés sur une base structurale.

	PDB	Résolution (Å)	Résidus présents dans la structure/ Longueur (aa)	Mutation(s)	Référence	Espèce
H-Ras-GDP	4Q21	2	1-171/ 189	non	Milburn, 90	Humain
H-Ras-GDPNP	5P21	1,3	1-166/ 189	non	Pai, 90	Humain
Rap2A-GDP	1KAO	1,7	1-167/ 183	non	Cherfils, 97	Humain
Rap2A-GTP	3RAP (Chaîne R)	2,2	1-167/ 183	non	Cherfils, 97 Ménétreay, 99	Humain
Rab6A-GDP	1D5C	2.3	11-172/ 208	non	Chattopadhyay, 00	<i>Plasmodium falciparum</i>
Rab3A-GDPNP	3RAB	2	18-186/ 220	non	Dumas, 99	Rat
Ypt51-GDPNP	1EK0	1,5	5-174/ 210	non	Esters, 00	levure
RhoA-GDP	1FTN	2,1	4-180/ 193	F25N	Wei, 97	Humain
RhoA-GTPγS	1A2B	2,4	4-181/ 193	G14V	Ihara, 98	Humain
Rac1-GDPNP	1MH1	1,4	1-182/ 192	M1P et F78S	Hirshberg, 97	Humain
CDC42-GDP	1A4R (Chaîne A)	2,5	1-190/ 191	G12V	Rudolph, 99	Humain
Ran-GDP	1BYU (Chaîne B)	2,1	2-216/ 216	non	Stewart, 98	Canin
Arf1-GDP	1HUR (Chaîne A)	2	2-181/ 181	non	Amor, 94	Humain
Arf1-GDPNP	Fournie par l'auteur	1,8	18-181/ 181	non	Golberg, 98	Humain
Arf6-GDP	1E0S	2,2	2-174/ 175	non	Ménétreay, 00	Humain

Tableau I: Informations sur les structures de petites protéines G utilisées pour les descriptions structurales faites au chapitre 1.

Ce tableau liste toutes les structures qui ont permis d'établir la description structurale des petites protéines G présentée dans le chapitre 1.

cette figure. Cet alignement de séquences "basé sur la structure" servira de support pour les descriptions dans la suite du chapitre.

2-Configuration du site nucléotidique

La configuration du site nucléotidique en présence de GDP et d'analogue du GTP a été définie à partir de la superposition des structures listées dans le tableau I (voir méthodologie en annexe de l'Introduction), comme étant la configuration consensus de toutes les structures. Le site nucléotidique est composé par des motifs caractéristiques présents chez toutes les petites protéines G (fig.5a). Ces motifs caractéristiques sont composés par des résidus "clés" pour la fixation et l'hydrolyse du nucléotide. Il existe 5 motifs qui caractérisent les petites protéines G, certains interagissent avec la guanine (Gx) et d'autres avec les phosphates du nucléotide et le magnésium (PMx) (fig. 5b). Les interactions consensus faites entre le nucléotide et le magnésium avec la protéine sont décrites sur la figure 6 (pour revue voir (Kjeldgaard, 1996)).

a-Motifs caractéristiques

Motif PM1 ou "P-Loop". Le motif PM1 [Gx₁x₂x₃x₄GK(S/T)] aussi appelé "P loop" (Phosphate binding loop) (pour revue voir (Saraste, 1990)) se trouve au niveau de la boucle L1 (fig.3 et 5b). Les groupes NH de la chaîne principale de la P-loop sont tournés vers les phosphates du nucléotide, neutralisant ainsi les charges négatives des phosphates. Les deux glycines conservées du motif PM1 [Gx₁x₂x₃x₄GK(S/T)] possèdent des conformations autorisées uniquement pour les glycines, elles imposent à la "P-loop" une conformation conservée (Pai, 1990). Les chaînes latérales des résidus x_n (résidus quelconques) sont tournées vers l'extérieur du site nucléotidique et ne forment pas d'interactions avec les phosphates du nucléotide. La "P-loop" est stabilisée par des liaisons hydrogènes : une première entre le carbonyle du résidu x₃ [Gx₁x₂x₃x₄GK(S/T)] et la chaîne latérale de la lysine du motif G2 [NKxD], et une seconde entre le carbonyle de la seconde glycine [Gx₁x₂x₃x₄GK(S/T)] et la chaîne latérale de l'asparagine du motif G2 [NKxD] (fig.6). La chaîne latérale de la

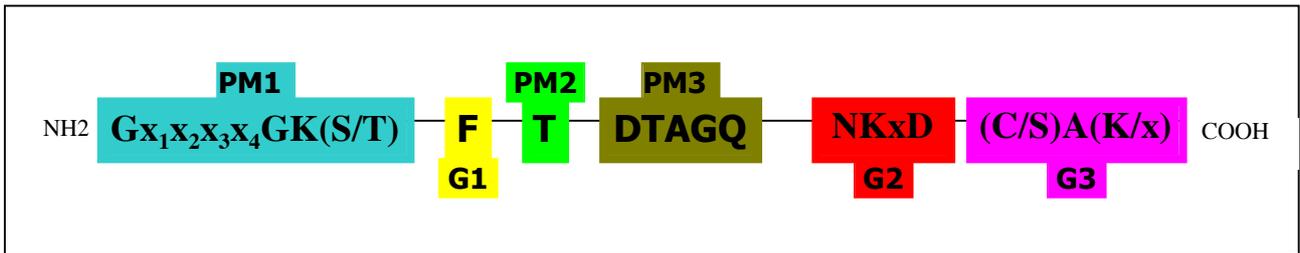


Figure 5a : Motifs caractéristiques des petites protéines G. Les motifs PM_x (Phosphate-Magnésium) reconnaissent les phosphates et le magnésium, alors que les motifs G_x (Guanine) reconnaissent la guanine. Les résidus 'x' représentent n'importe quel résidu.

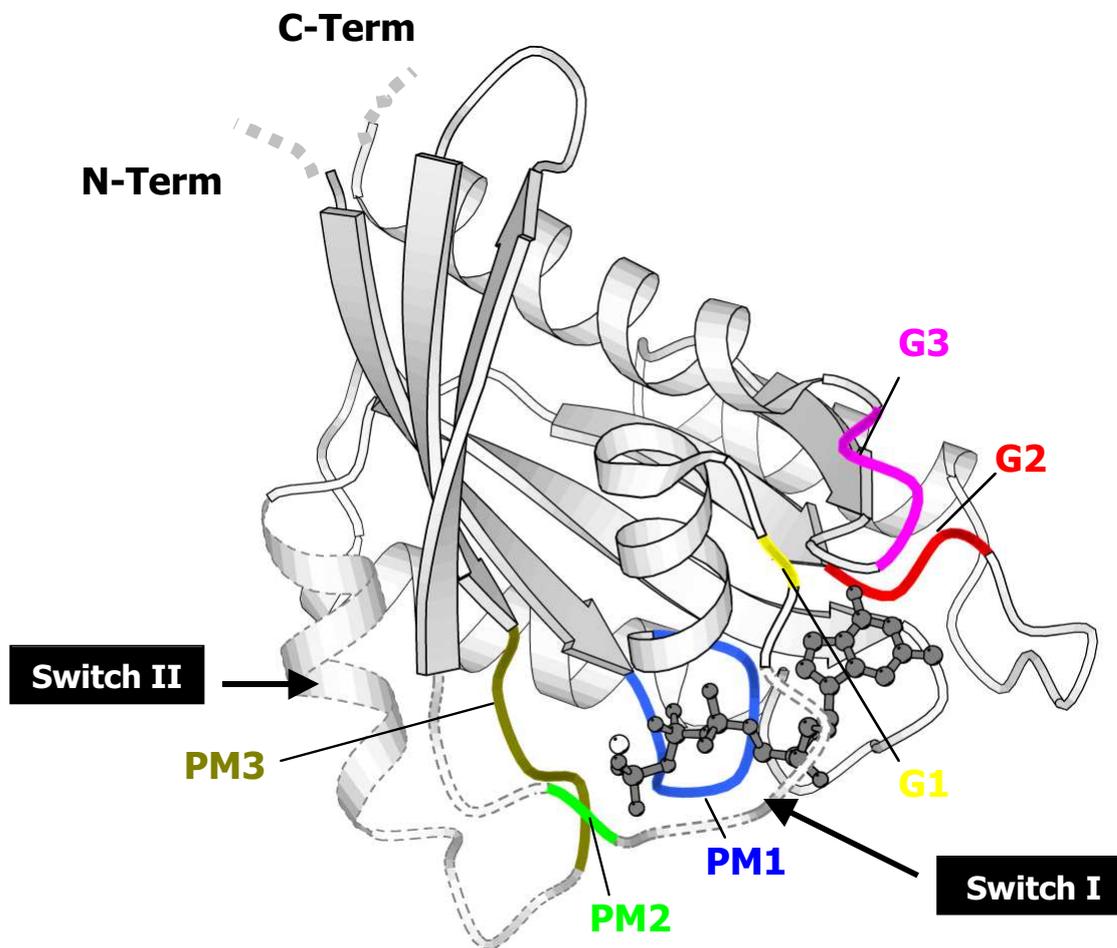


Figure 5b : Positions structurales des motifs caractéristiques.

Les motifs caractéristiques sont présentés en couleurs et sont annotés. Le nucléotide présenté est un GTP, afin de situer le phosphate gamma. Le nucléotide est en gris et le magnésium est représenté par une sphère blanche. Les régions Switch sont représentées en pointillé car ce sont des régions qui changent de conformation. Les régions hypervariables N- et C-Termiales ne sont pas représentées.

lysine conservée du motif PM1 [Gx₁x₂x₃x₄GK(S/T)] interagit avec les phosphates β et γ du nucléotide. Le groupement NH de la chaîne principale de la sérine/thréonine conservée [Gx₁x₂x₃x₄GK(S/T)] interagit avec le phosphate β du nucléotide, et l'hydroxyle de sa chaîne latérale interagit avec le magnésium. Ce résidu joue un rôle important dans la stabilisation du nucléotide, sa mutation peut entraîner la formation d'un dominant négatif de la protéine (pour revue voir (Feig, 1999)). En fait, il s'agit d'un mutant qui a une affinité plus faible pour le nucléotide que la protéine sauvage (Cool, 1999), ce qui a pour effet de dissocier facilement le nucléotide de la petite protéine G, qui va se stabiliser en s'associant à sa GEF. Chez H-Ras, le résidu x₂ [Gx₁x₂x₃x₄GK(S/T)] est une glycine, cette position est l'un des principaux sites de mutation oncogénique de H-Ras (glycine 12) (pour revue voir (Seeburg, 1984)).

Motifs G1 . Le motif G1 [F] est composé par une phénylalanine (sauf chez les protéines ARF) et se trouve au niveau du Switch I (fig.5b). Le cycle de la phénylalanine est positionné perpendiculairement au cycle de la guanine (fig.6). Elle forme avec la lysine du motif G2 [NKxD] située à plat de l'autre côté de la guanine, une pince hydrophobe autour de la guanine qui la stabilise et la positionne (fig.6). La phénylalanine du motif G1 [F] est stabilisée par la chaîne latérale de la lysine du motif G3 [(C/S)A(K/x)] par contacts hydrophobes (fig.6).

Motifs PM2 et PM3 . Le motif PM2 [T] se trouve au niveau du Switch I et le motif PM3 [DTAGQ] au niveau du Switch II (fig.5b). Suite aux réarrangements structuraux de ces deux régions au cours du cycle structural GDP/GTP, l'hydroxyle de la thréonine conservée du motif PM2 [T] et le groupe NH de la glycine conservée du motif PM3 [DTAGQ] forment des liaisons hydrogènes avec le phosphate gamma du GTP. La glutamine du motif PM3 [DTAGQ] est le résidu catalytique impliqué dans l'hydrolyse du GTP. Il active une molécule d'eau nucléophile qui est responsable de l'hydrolyse du GTP et/ou qui stabilise l'état de transition de la réaction d'hydrolyse (pour revue voir (Hilgenfeld, 1995) et (Maegley, 1996)). La mutation de cette glutamine conduit à un mutant positif de la protéine, c'est-à-dire un mutant défectueux pour la GTPase. Chez H-Ras, cette position est un second site de mutation oncogénique (glutamine 61) (pour revue voir (Der, 1986)).

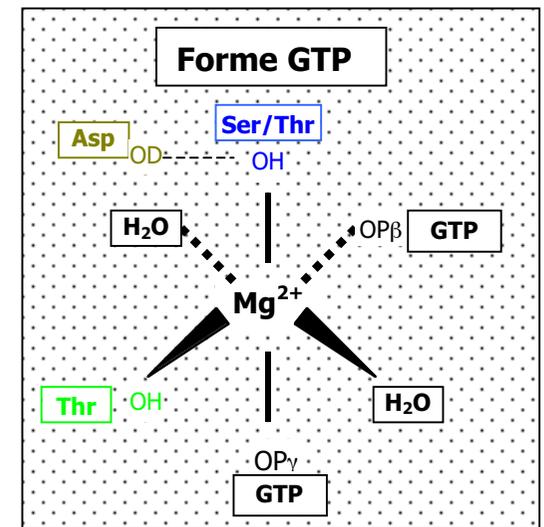
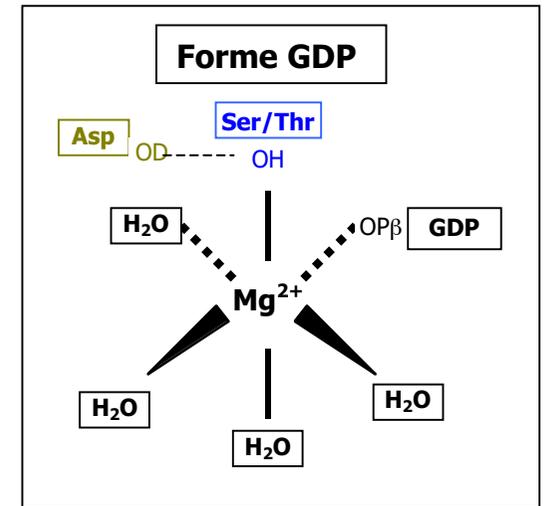
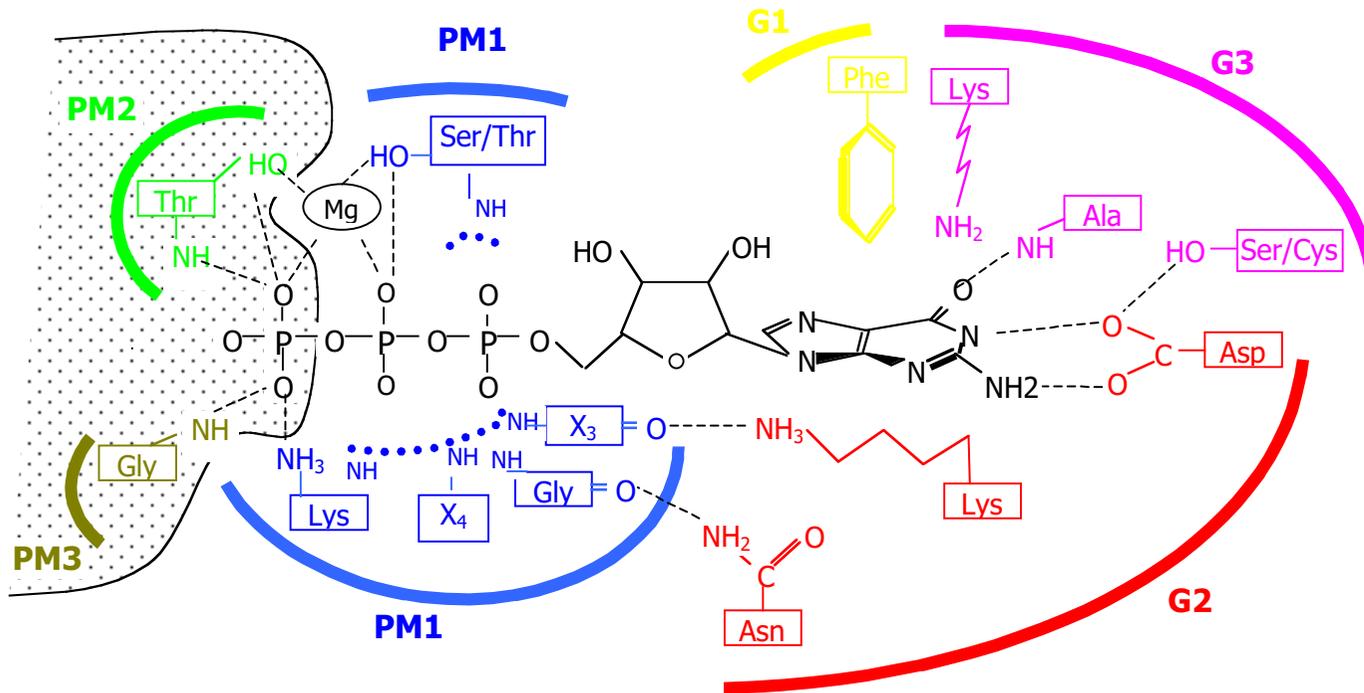


Figure 6: Schéma de la configuration du site nucléotidique des petites protéines G

Les interactions non surlignées par un motif pointillé sont présentes pour les formes GDP et GTP des petites protéines G. Les interactions surlignées par un motif pointillé ne sont présentes que pour les formes GTP. Les résidus qui interagissent avec le nucléotide et le magnésium sont colorés avec les mêmes codes de couleurs que la fig.5a et 5b .

Motif G2 . Le motif G2 [NKxD] se trouve au niveau de la boucle L8 (fig.5b). Le carboxylate de l'aspartate conservé du motif G2 [NKxD] forme 2 liaisons hydrogènes avec l'azote N1 et le groupe NH2 en position 2 de la guanine (fig.6). Ces interactions sont responsables de la haute spécificité des petites protéines G pour la guanine. L'asparagine du motif G2 [NKxD] stabilise la "P-loop" en formant une liaison hydrogène avec le carbonyle de la seconde glycine du motif PM1 [Gx₁x₂x₃x₄GK(S/T)] (fig.6). Enfin, la chaîne latérale de la lysine du motif G2 [NKxD] forme une liaison hydrogène avec le carbonyle du résidu x₃ du motif PM1 [Gx₁x₂x₃x₄GK(S/T)] (fig.6).

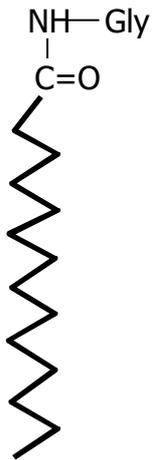
Motif G3 . Le motif G3 [(C/S)A(K/x)] se trouve au niveau de la boucle L10 (fig.5b). Le groupe NH de l'alanine conservée du motif G3 [(C/S)A(K/x)] forme une liaison hydrogène avec le carbonyle en position 6 de la guanine (fig.6). Cette interaction est aussi responsable de la haute spécificité de la protéine pour la guanine. La chaîne latérale de la cystéine/serine du motif G3 [(C/S)A(K/x)] stabilise l'aspartate conservé du motif G2 [NKxD] en formant une liaison hydrogène avec le carboxylate de ce dernier (fig.6). Le dernier résidu de ce motif est en général une lysine ; dans ce cas, la chaîne latérale de la lysine est située parallèlement au cycle de la phénylalanine du motif G1 [F] (fig.6), la stabilisant par contacts hydrophobes.

b-Magnésium

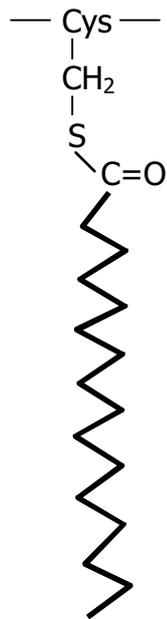
Le magnésium stabilise le nucléotide au sein du site nucléotidique. Il est lui-même stabilisé par la protéine (fig.6). Le magnésium est un cation qui possède une coordination octaédrique (6 ligands). Dans la forme GDP des petites protéines G, le magnésium a pour ligand : un des oxygènes du phosphate beta, l'hydroxyle de la serine/thréonine du motif PM1 [Gx₁x₂x₃x₄GK(S/T)] et 4 molécules d'eau (fig.6). Dans la forme GTP, le magnésium a pour ligand : l'un des oxygènes des phosphates gamma et béta, l'hydroxyle de la serine/thréonine du motif PM1 [Gx₁x₂x₃x₄GK(S/T)], l'hydroxyle de la thréonine du motif PM2 [T] et 2 molécules d'eau (fig.6).

ACYLATION

Myristate

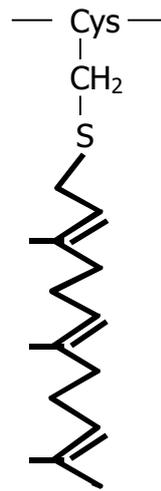


Palmitate



ISOPRÉNYLATION

Farnésyl
(C15)



géranyl-géranyl
(C20)

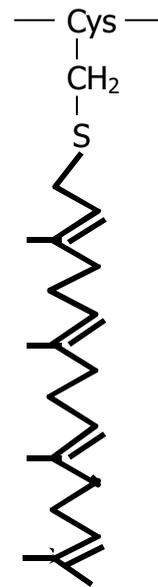


Figure 7: Modifications lipidiques des petites protéines G

C-Association des petites protéines G à la membrane

Les petites protéines G ont des comportements différents d'une famille à l'autre vis-à-vis des membranes. En effet, elles peuvent être constitutivement associées aux membranes, être partiellement associées aux membranes ou ne pas s'associer aux membranes. Les petites protéines G s'associent aux membranes *via* des modifications lipidiques (fig.7) et/ou des régions polybasiques capables d'interagir avec les têtes anioniques des phospholipides ancrés dans la membrane.

1-Association constitutive à la membrane

La famille des protéines RAS est retrouvée constitutivement associée à la membrane (plasmique), cette association est due à deux composantes (pour revue voir (Magee and Marshall, 1999)). La première est la farnésylation (fig.7) de la cystéine appartenant au motif de prénylation Caax (où 'a' est un résidu aliphatique et 'x' un résidu quelconque) en C-Terminus de la protéine, suivie de la protéolyse des trois derniers résidus (aax) et pour finir la carboxyméthylation de la cystéine farnésylée. La seconde composante est la palmitoylation (S-acylation) (fig.7) d'une cystéine adjacente à la cystéine farnésylée (cas de N-Ras, H-Ras et K-Ras-4A) ou la présence d'un motif polybasique, capable d'interagir électrostatiquement avec les têtes anioniques des phospholipides ancrés dans la membrane (cas de K-ras4B).

2-Association partielle à la membrane

Les protéines des familles RHO, RAB et ARF décrivent un cycle association/dissociation à la membrane qui est couplé à leur cycle GDP/GTP. En effet, la forme GTP de ces protéines est exclusivement associée aux membranes, alors que la forme GDP est partiellement associée aux membranes.

La forme GDP des protéines RHO et RAB est partiellement associée aux membranes. En effet, une fraction de la forme GDP est identifiée dans le cytosol, et dans ce cas elle est associée à une protéine GDI (Guanine Dissociation Inhibitor). Le GDI extrait de la membrane la forme GDP de ces protéines, en protégeant le groupement lipidique du milieu cytosolique (Hoffmann , 2000). La forme GDP peut se réassocier aux membranes lorsqu'elle se dissocie du GDI (pour revue voir (Geyer and Wittinghofer, 1997)). Comme les protéines RAS, les protéines RHO sont isoprénylées

sur la cystéine C-Terminale appartenant au motif "Caax". Les protéines RhoA et RhoC sont géranyl-géranylées, alors que la protéine RhoB est soit géranyl-géranylée soit farnésylée. De plus, ces protéines subissent la protéolyse des trois derniers résidus (aax) C-Terminaux, puis la carboxyméthylation de la cystéine isoprénylée. Pour finir, RhoA et RhoC sont palmytoylées sur une cystéine adjacente à la cystéine géranyl-géranylée, alors que RhoB possède un motif polybasique capable d'interagir électrostatiquement avec les têtes anioniques des phospholipides ancrés dans la membrane (Adamson, 1992).

Les protéines RAB possèdent des motifs de prénylation variables en séquence et susceptibles d'être géranyl-géranylés (Cxxx, CxC, CC, CCx, CCxx, CCxxx). Le processus d'association des protéines RAB aux membranes n'est pas encore bien compris, en effet la prénylation de ces protéines n'explique pas, à elle seule leur différente localisation (pour revue voir (Chavrier and Goud, 1999)).

La forme GDP des protéines ARF, contrairement à celle des protéines RHO et RAB peut se trouver dans le cytosol sans être associée à aucune autre protéine (voir Chapitre 2-I-C-3). Les protéines ARF sont myristoylées (fig.7) sur une glycine en position 2, cette modification lipidique n'est pas suffisante pour associer fortement les protéines ARF aux membranes. L'extension N-Terminale des protéines ARF s'associe directement aux membranes par contacts hydrophobes (Antonny, 1997) (voir chapitre 2-I-C-3).

3-Ran ne s'associe pas à la membrane

Les protéines RAN ne sont pas associées aux membranes, elles sont situées majoritairement dans le nucléoplasme (Bischoff and Ponstingl, 1991). Elles ne possèdent pas de site de modification lipidique équivalente à celles des protéines RAS, RHO, RAB ni à celle des protéines ARF.

II- Changements de conformation induits par le cycle structural GDP/GTP des petites protéines G

Les petites protéines G décrivent des changements de conformation au cours de leur cycle structural GDP/GTP qui leur permettent d'interagir avec des partenaires cellulaires distincts, et ainsi de jouer un rôle "d'interrupteur moléculaire" au sein de la cellule. Le terme "changement de conformation" utilisé ici définit les réarrangements structuraux de certaines régions induits par le cycle moléculaire GDP/GTP.

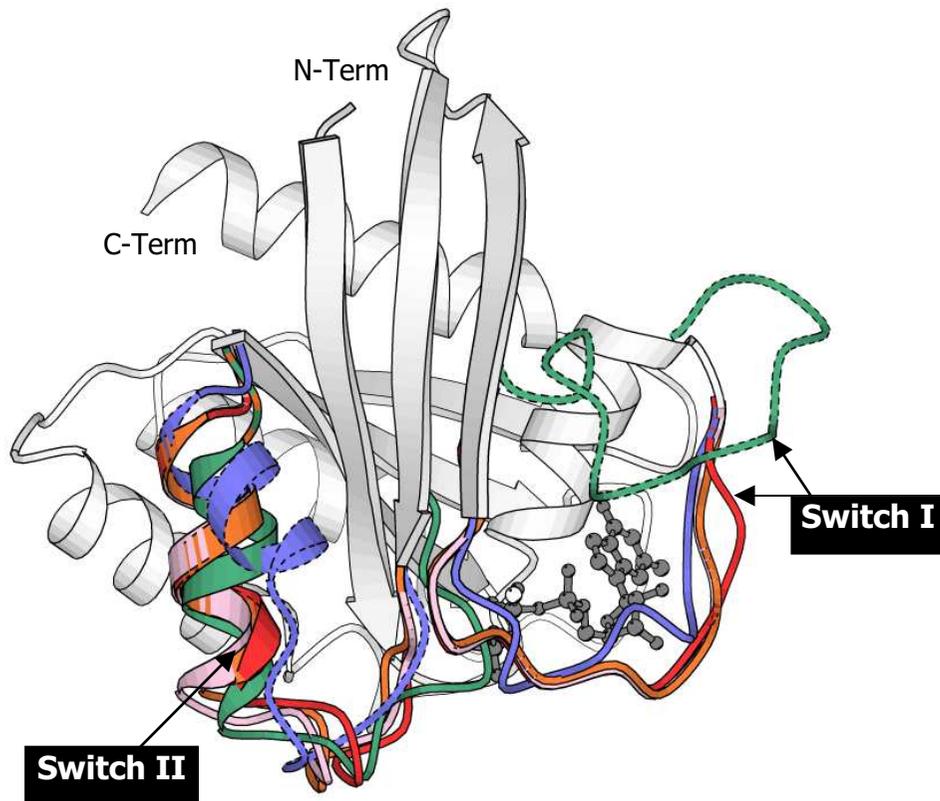
A- Changements de conformation communs aux petites protéines G : Switch I et Switch II

L'étude du cycle structural GDP/GTP de 5 petites protéines G (H-Ras, Rap2A, RhoA, Arf1 et Arf6 (références des structures dans le tableau 1)) a permis de caractériser les changements de conformation communs à la super-famille des petites protéines G au cours du cycle GDP/GTP. Ces changements de conformation ont lieu au niveau de deux régions qui ont été appelées Switch I et Switch II (Milburn, 1990). De plus, les structures de certaines de ces protéines en complexe avec leurs protéines régulatrices ont permis d'observer que les régions Switch I et II qui sont les principaux site d'interaction avec les différentes protéines régulatrices adoptent des conformations différentes de celles qui sont observées pour les formes GDP et GTP.

1-Switch I

Le Switch I est situé au niveau de la boucle L2 (fig.3). Les changements de conformation du Switch I ont une amplitude et une longueur plus ou moins importantes selon la petite protéine G et selon le partenaire qui lui est associé. De plus, différentes conformations ont été observées, selon la nature du nucléotide et selon la nature de la protéine régulatrice qui lui est associée.

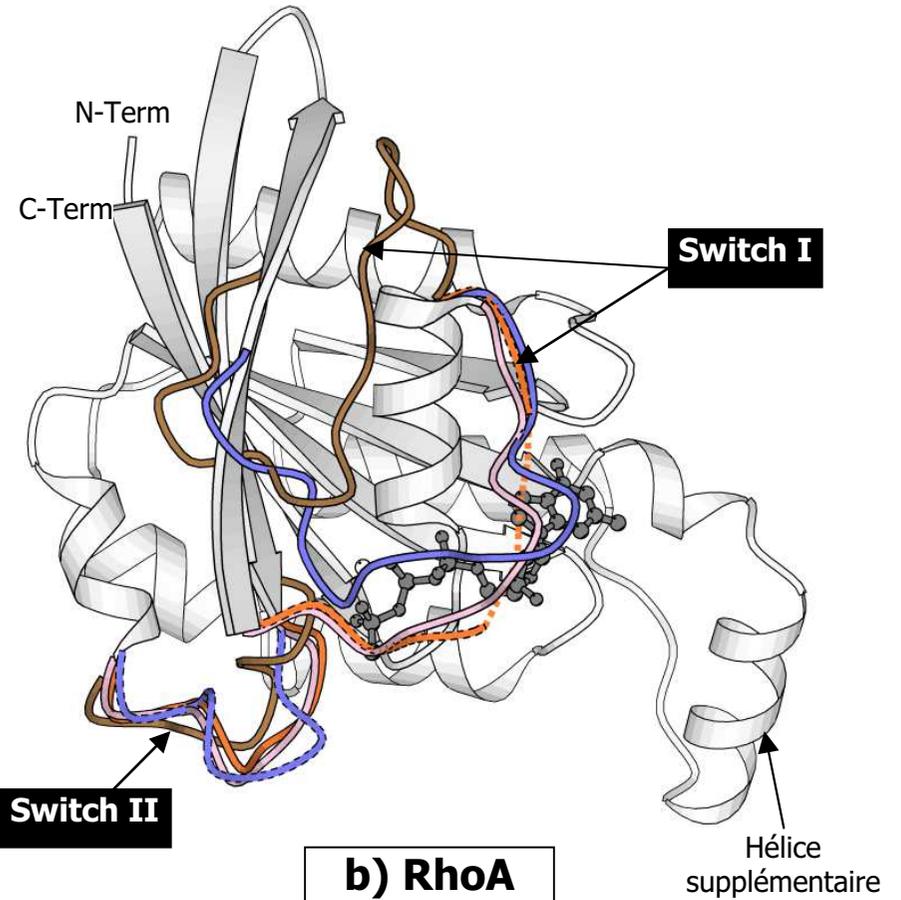
Conformations des formes GDP. Deux types de conformations ont été observées pour la forme GDP des petites protéines G. La première conformation ou "conformation fermée" correspond à un Switch I au voisinage des phosphates du



a) H-Ras

La conformation des régions switch des différentes structures de H-Ras est indiquée en couleur sur le repliement général de H-Ras en gris, en trait noir continu lorsque la région est ordonnée, en pointillé noir lorsque la région est désordonnée. Le nucléotide est représenté en gris foncé et le magnésium par une sphère blanche.

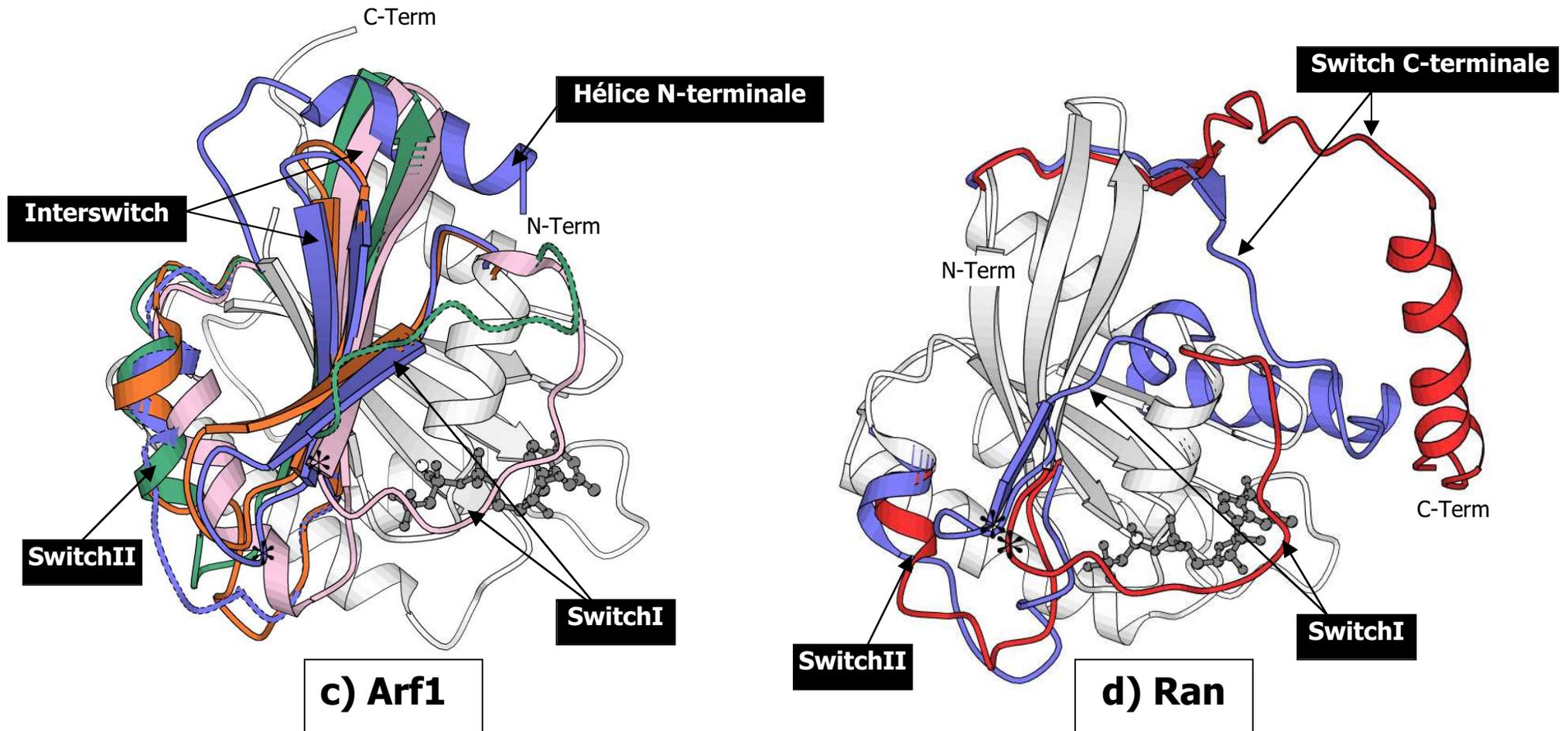
- | | |
|--|---|
| — H-Ras-GDP (4Q21) | — H-Ras-GDPNP (5P21) |
| — H-Ras/SOS (1BKD) | — H-Ras-GTP/Ral (1LFD) |
| — H-Ras-GDP-AlF ₃ /p120GAP (1WQ1) | |



b) RhoA

La conformation des régions switch des différentes structures de RhoA est indiquée en couleur sur le repliement général de RhoA en gris, en trait noir continu lorsque la région est ordonnée, en pointillé noir lorsque la région est désordonnée et en gros pointillé de couleur lorsque les résidus n'ont pas été modélisés. Le nucléotide est représenté en gris foncé et le magnésium par une sphère blanche.

- | | |
|--|---|
| — RhoA-GTP _γ S (1A2B) | — RhoA-GDP (1FTN) |
| — RhoA-GDP-AlF ₄ /RhoGAP (1TX4) | |
| — RhoA-GDP sans Mg (1DPF) | |



La conformation des régions switch des différentes structures de Arf1 est indiquée en couleur sur le repliement général de Arf1 en gris, en trait noir continu lorsque la région est ordonnée, en pointillé noir lorsque la région est désordonnée. Le nucléotide est représenté en gris foncé et le magnésium par une sphère blanche. L'astérisque représente la position de la glycine "charnière".

- | | |
|---|--|
| █ Arf1-GDP (1HUR) | █ Arf1 Δ 17-GDPNP |
| █ Arf1 Δ 17-GDP/Arf-GAP1 | █ Arf1 Δ 17/sec7-Gea2 |

La conformation des régions switch des différentes structures de Arf1 est indiquée en couleur sur le repliement général de Arf1 en gris, en trait noir continu lorsque la région est ordonnée, en pointillé noir lorsque la région est désordonnée. Le nucléotide est représenté en gris foncé et le magnésium par une sphère blanche. L'astérisque représente la position de la glycine "charnière" commentée au chapitre 1-III-A-4-b.

- | | |
|--|--|
| █ Ran-GDP (1BYU) | █ Ran-GTP/RanBD1 (1RRP) |
|--|--|

Figure 8 : Changements de conformation au cours du cycle GDP/GTP de H-Ras, RhoA, Arf1 et Ran

GDP, recouvrant le nucléotide. Dans cette conformation, le Switch I est fréquemment désordonné (conformation adoptée par les Switch I des structures de Ras-GDP, de Rap2A-GDP, de CDC42-GDP et de RhoA-GDP (références dans le tableau 1)) (fig. 8a). La seconde conformation ou "conformation ouverte" correspond à un Switch I éloigné du site nucléotidique, ne recouvrant pas le nucléotide. Les Switch I des structures de Arf1-GDP, Arf6-GDP et Ran-GDP (références dans le tableau 1) adoptent une "conformation ouverte", le Switch I est ordonné et replié en un court brin β (β_{2E}) formant avec le brin β_2 un feuillet antiparallèle (fig. 8b et 8c). Les brins β_{2E} et β_2 sont reliés par un β -turn de type II chez Arf1-GDP et Arf6-GDP (présence d'une glycine en position 3) et un β -turn de type I chez Ran-GDP (présence d'une glycine en position 4). Dans le cas de la structure de RhoA-GDP sans magnésium (Shimizu, 2000), la conformation du Switch I adopte aussi une "conformation ouverte", contrairement à la conformation fermée adoptée par la structure de RhoA-GDP en présence de magnésium (Wei, 1997).

Conformation des formes GTP. Un seul type de conformation a été observé pour les formes GTP, proche de la "conformation fermée" de la forme GDP. La présence du phosphate gamma permet au Switch I d'adopter une conformation générale plus stable. En effet, le phosphate gamma du GTP forme une interaction consensus avec l'hydroxyle de la thréonine conservée du motif PM2 [T].

Conformation des complexes avec les protéines régulatrices. Deux structures de petites protéines G en complexe avec leur facteur d'échange ont été résolues (Ras-SOS (Boriack-Sjodin, 1998) et Arf1 Δ 17-ARNO (Goldberg, 1998)). Ces structures ont permis d'observer que la conformation du Switch I de Ras et de Arf1 Δ 17 en complexe avec leur GEF forme de larges contacts avec cette dernière et adopte une "conformation ouverte" (éloignée du site nucléotidique). Cette conformation est différente de celle qui a été observée pour la forme GDP de Arf et Ran : elle permet l'accès du site nucléotidique à la GEF.

Plusieurs structures de l'état de transition de petite protéine G (Ras, RhoA, CDC42) en complexe avec leur GAP ((Scheffzek, 1997), (Rittinger, 1997b) et (Nassar, 1998)) ont été résolues. Dans ces complexes, le Switch I qui est impliqué dans

l'interaction avec la GAP adoptent une "conformation fermée" similaire à celle du Switch I de la forme GTP de ces protéines. Cependant, alors que la conformation du Switch I des formes GTP de ces protéines est stable, celle du complexe avec la GAP est beaucoup moins stable (voir chapitre 1-II-C-2).

La structure de CDC42-GDP en complexe avec Rho-GDI1 (Hoffman, 2000) montre que le Switch I adopte une conformation fermée différente de celle de la forme GDP.

2-Switch II

Le Switch II est localisé au niveau de la boucle L4 et de l'hélice $\alpha 2$ (fig.3). La conformation du Switch II des formes GDP des petites protéines G est, en général désordonnée (tab.II dans Chapitre 1) (fig.8a, 8b et 8c). La présence du phosphate gamma, permet au début du Switch II d'adopter une conformation consensus plus stable (fig. 8). En effet, le phosphate gamma du GTP forme une interaction consensus avec le groupe NH de la glycine conservée du motif PM3 [DTAGQ]. L'hélice $\alpha 2$ est une région qui change de conformation et d'orientation dans les structures de H-Ras et de Arf1 au cours du cycle structural GDP/GTP, mais pas chez Rap2A et RhoA. Ces observations indiquent que le Switch II des petites protéines G varie en longueur d'une petite protéine G à l'autre. La conformation de l'hélice $\alpha 2$ est identique dans la forme GTP pour toutes les petites protéines G dont la structure est connue.

Comme le Switch I, le Switch II interagit directement avec les protéines régulatrices, il adopte des conformations différentes de celles qui sont observées pour les formes GDP et GTP seules.

Les Switch I et II sont des régions qui peuvent adopter de multiples conformations, de façon plus ou moins stable selon la nature du nucléotide et selon les protéines auxquelles les petites protéines G sont associées. Cette caractéristique structurale définit comme "plasticité structurale" (plastique : qui est susceptible de se déformer et de conserver sa nouvelle forme) permet aux petites protéines G d'interagir de façon spécifique avec différents partenaires.

B- Changements de conformation particuliers à une famille

Les régions Switch I et Switch II ne sont pas les seules régions qui changent de conformation au cours du cycle structural GDP/GTP des petites protéines G. Des changements de conformation particuliers à une famille donnée ont été observés chez les protéines ARF ((Goldberg, 1998) et (Pasqualato, en cours de rédaction)) (fig.8c) et chez la protéine Ran ((Vetter, 1999a), (Vetter, 1999b) et (Chook and Blobel, 1999)) (fig.8d).

1- L'Interswitch et l'hélice N-Terminale des protéines ARF

La région qui se situe entre les Switch I et II, composée par la succession du brin $\beta 2$, de la boucle L3 et du brin $\beta 3$, change de conformation au cours du cycle structural GDP/GTP des protéines Arf1 et Arf6. Parce que, cette région se trouve entre les régions Switch I et II, nous l'avons nommée "Interswitch" (Menetrey, 2000). L'Interswitch translate de 2 résidus de l'intérieur (forme GDP) vers l'extérieur (forme GTP) de la protéine (fig.8b). Le changement de conformation de l'Interswitch a un effet direct sur la conformation des Switch I et II, et sur la conformation de l'hélice N-Terminale des protéines ARF (voir Chapitre 2-C-3).

2-Switch C-Terminal de la protéine Ran

Un changement de conformation particulier nommé "Switch C-Terminal" impliquant l'extension C-Terminale de la protéine Ran a été décrit en comparant les structures de Ran-GDP et des complexes Ran-GTP/RanBD1 (Vetter, 1999b) et Ran-GDPNHP/Karyopherin- $\beta 2$ ((Vetter, 1999a) et (Chook and Blobel, 1999)) (la structure de Ran-GTP n'est pas résolue) (Fig. 8c). Bien que ce changement de conformation ne soit pas observé de façon classique, c'est-à-dire à partir de la comparaison des structures de Ran-GDP et de Ran-GTP, il semble clair que celui-ci soit la conséquence du cycle structural GDP/GTP de Ran. En effet, si la conformation de la région C-Terminale de Ran-GDP (proche du site nucléotidique) ne change pas, la région C-Terminale gênerait stériquement le retour du Switch I vers le nucléotide (la conformation du Switch I dans les structures de Ran-GDPNHP/RanBD1 et Ran-GDPNHP/Karyopherin- $\beta 2$ est une "conformation fermée", ce qui est probablement le cas chez Ran-GTP).

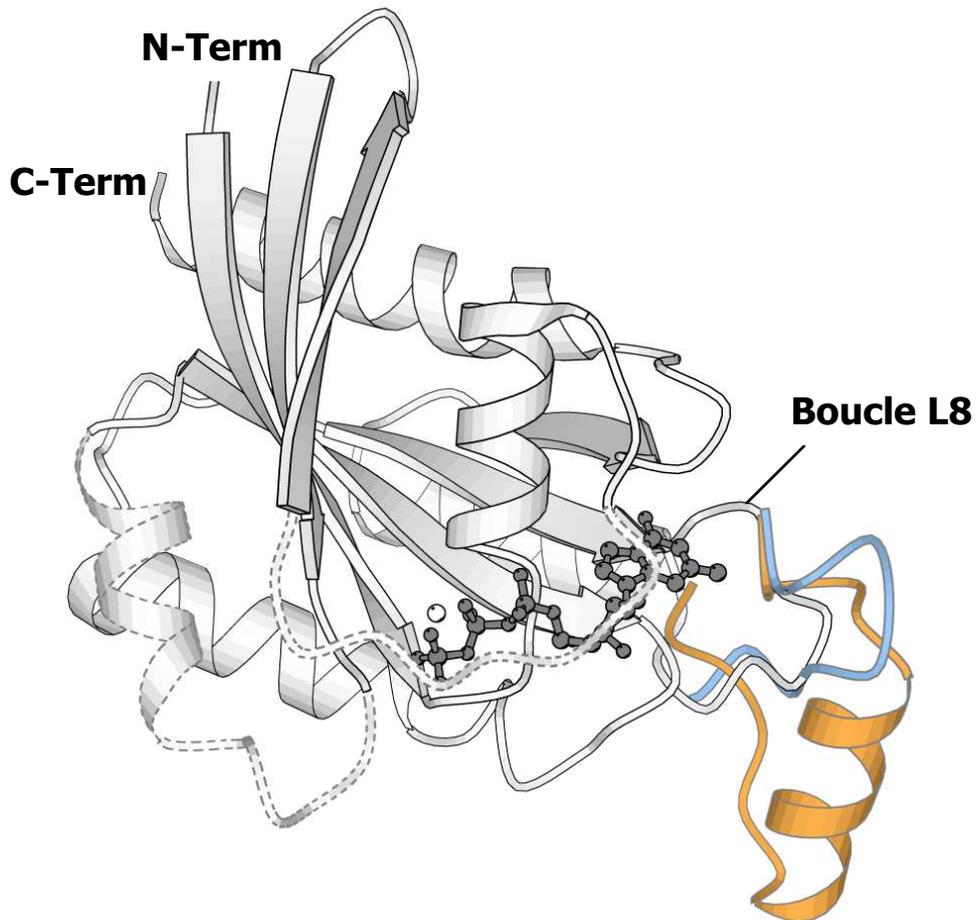


Figure 9: Insertion d'une hélice chez les protéines RHO et d'un "crochet" chez Ypt51 par rapport au repliement général.

Les insertions au niveau de la boucle L8 sont indiquées en couleur, orange pour l'hélice de la famille des protéines RHO et bleu pour le crochet de la protéine Ypt51. Ces insertions sont indiquées sur le repliement général des petites protéines G (en gris).

III-Caractéristiques structurales des petites protéines G

Les études structurales des petites protéines G présentées dans le tableau 1 ont illustré le fait que ces protéines partagent un repliement structural général commun. De plus, ces études ont montré que ces protéines possèdent des caractéristiques structurales au niveau du repliement général et du site nucléotidique propre à chacune. Ces caractéristiques vont leur permettre d'être reconnues et d'être distinguées les unes des autres par leurs partenaires. Ce paragraphe décrit les caractéristiques structurales majeures des petites protéines G d'une part au niveau du repliement général et d'autre part au niveau du site nucléotidique.

A-Repliement général

1-Insertion d'une hélice chez les protéines RHO

Les protéines de la famille RHO possèdent une insertion de 13 résidus (fig.4) au niveau de la boucle L8 repliée en hélice, insérée dans le repliement général des petites protéines G (fig. 9) (références dans le tableau I). Cette hélice est présente quelle que soit la nature du nucléotide fixé (structures connues pour la forme GDP et GTP), et quel que soit le complexe formé (structures connues avec GAP, GDI et effecteurs). La conformation de cette extension semble consensus aux protéines de la famille RHO. Pour l'instant, aucune structure de protéine RHO en complexe avec un partenaire ne montre que cette hélice est impliquée dans l'interface d'interaction. Il semble probable que cette caractéristique structurale soit un site de reconnaissance spécifique des protéines RHO par rapport aux autres petites protéines G par leurs partenaires.

La protéine Ypt51 possède une insertion de 3 résidus au niveau de la même boucle que l'insertion hélicoïdale des protéines RHO. Cette insertion forme un crochet à la surface de la protéine (Fig.9) (Esters, 2000), suggérant aussi une base structurale de discrimination entre Ypt51 et les autres protéines de la famille RAB qui ne possèdent pas d'insertion à cet endroit.

2-L'hélice N-Terminale des protéines ARF

Les protéines ARF possèdent une extension N-Terminale de 13 à 17 résidus (fig.4). la structure de Arf1-GDP ((Amor, 1994), (Greasley, 1995)) et de Arf6-GDP (Menetrey, 2000) montrent que cette extension est repliée en hélice amphiphile (une face hydrophobe et une face hydrophile). Dans la forme GDP de Arf1 et Arf6, cette hélice est plaquée face hydrophobe contre une poche hydrophobe de la protéine (fig.8c). Bien que nous ne connaissions pas la conformation de l'hélice dans la forme GTP de Arf1, des études biochimiques (Antonny, 1997) ont montré que la face hydrophobe de cette hélice s'associe directement aux membranes, lorsque la protéine fixe du GTP. De plus la structure de Arf1 Δ 17-GDPNHP en absence de l'hélice N-Terminale (Goldberg, 1998) montre que la poche hydrophobe (où l'hélice N-Terminale se plaquait dans la forme GDP) est obstruée par la nouvelle conformation de l'Interswitch (fig.8c) (II-B-1). Ces résultats suggèrent que l'hélice N-Terminale change de conformation au cours du cycle moléculaire GDP/GTP.

3-Extension C-Terminale de Ran

Ran possède une extension C-Terminale de 40 résidus (fig.4). Les structures de Ran en complexe avec du GDP (Stewart, 1998) et en complexe avec différents effecteurs ((Vetter, 1999b), (Chook and Blobel, 1999)) ont montré que cette extension est repliée en un brin (β 7) et une hélice α (α 6) (fig.8d). Dans la structure de Ran-GDP, l'extension C-Terminale est plaquée contre la protéine et l'hélice α 6 se positionne proche du site nucléotidique (le Switch I de Ran-GDP est dans une "conformation ouverte", éloigné du site nucléotidique et ne gêne pas la conformation de l'extension C-Terminale). Les deux structures de Ran-GDPNHP en complexe avec des effecteurs (RanBD1 et Karyopherin- β 2) montrent que l'extension C-Terminale conserve la même structure secondaire que celle qui a été observée pour la structure de Ran-GDP, mais est déplacée vers le solvant ou vers l'effecteur (fig.8d). L'extension C-Terminale de Ran est une région qui change de conformation au cours du cycle GDP/GTP (voir II-B-2).

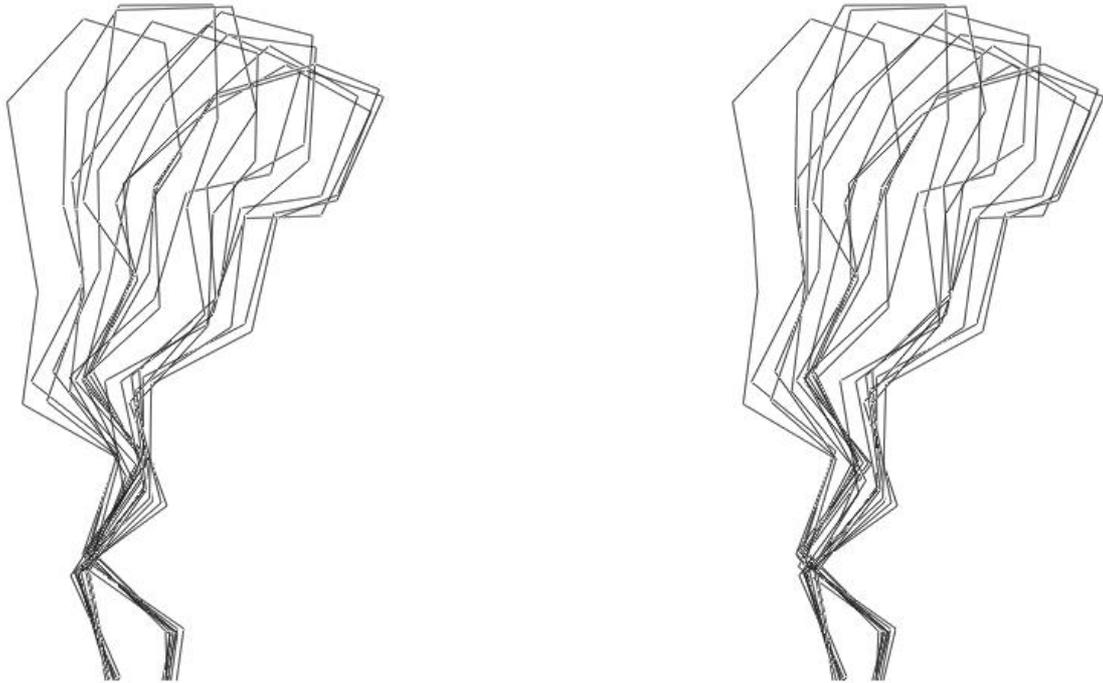


Figure 10: Vue stéréographique d'une superposition de l'interswitch des petites protéines G (sauf protéines Arf).

Les interswitch ont été superposés au niveau des 3 résidus de base de chaque brin. Le brin de droite est le brin β_2 , celui de gauche β_3

4-Autres caractéristiques...

a-Différences structurales au niveau de la "conformation ouverte" du Switch I entre les protéines Arf1/6-GDP et Ran-GDP. Le Switch I de Ran-GDP est dans une conformation ouverte (voir II-A-1), il forme un court brin β qui s'associe au feuillet β du repliement général, comme Arf1-GDP et Arf1-GDP. Par contre, le début du Switch I (boucle L2) de Ran-GDP est replié en une courte hélice (Stewart, 1998), non observée pour les Switch I des formes GDP de Arf1 et Arf6.

b-Résidu "charnière" à la fin du Switch I chez les protéines ARF, RAN et RAB. L'alignement de séquences "basé sur la structure" des petites protéines (fig. 4) met en évidence l'insertion d'une glycine à la fin du Switch I chez les protéines Arf1, Arf6 (ainsi que les autres protéines ARF), Ran, Rab3, Rab6 et Ypt51 (ainsi que les autres protéines RAB). Cette glycine ne possède pas d'équivalent chez les protéines de la famille RAS et RHO. Les structures de Arf1-GDP et de Arf6-GDP montrent que cette glycine fait partie du β -turn que forme le feuillet antiparallèle $\beta 2E-\beta 2$ (3^{ème} résidu du β -turn). Elle fait aussi partie du β -turn formé par le feuillet antiparallèle $\beta 2E-\beta 2$ de Ran-GDP (4^{ème} résidu). Ces observations suggèrent que ce résidu contribue aux importants changements de conformation du Switch I de ces protéines. Chez les protéines RAB, cette glycine est très conservée : dans la structure de Rab6-GDP, mais pas dans celle de Rab3A-GDPNHP et de Ypt51-GDPNHP, elle fait partie d'un crochet dirigé vers la surface de la protéine (fig.9) (Chattopadhyay, 2000). Ce résidu est un résidu "charnière", c'est-à-dire qu'il peut adopter différentes conformations, ce qui permet à certaine région de la protéine de décrire des changements de conformation plus ou moins important selon la nature du résidu "charnière" (Cas de Arf1, Arf6, Ran, ainsi que le facteur d'élongation EF-Tu (Kjeldgaard, 1993) et (Polekhina, 1996)).

c-Interswitch : région flexible des petites protéines G. L'Interswitch ($\beta 2-L3-\beta 3$) est une région susceptible d'effectuer un mouvement de corps rigide de plus ou moins grande amplitude d'une structure d'une petite protéine G à l'autre. En effet, l'Interswitch conserve sa structure secondaire, mais change sa position par rapport au reste de la structure. Ce phénomène est observable pour une même petite

protéine G, à ligand identique (flexibilité observée pour les 3 structures de Rap2A-GTP ((Cherfils, 1997) et (Menetrey and Cherfils, 1999)) ou à ligands différents, et aussi d'une petite protéine G à l'autre (fig.10) (voir méthodologie dans l'annexe de l'Introduction). La boucle de l'Interswitch forme un β -turn variable en séquence d'une petite protéine G à l'autre. Les protéines ARF possèdent un Interswitch (β 2-L3- β 3) plus court en séquence de 4 résidus par rapport aux autres petites protéines G, ce qui entraîne un raccourcissement structural de l'Interswitch d'une longueur de 2 résidus (2 résidus sur chaque brins). De plus, l'Interswitch des protéines ARF est une région qui change de conformation au cours du cycle structural GDP/GTP (voir Introduction-II-2-a).

B-Site nucléotidique

1-La Glutamine catalytique du motif PM3 est remplacée par une thréonine chez les protéines RAP

La glutamine du motif PM3 [DTAGQ] est le résidu catalytique impliqué dans l'activité GTPase des petites protéines G. Cette glutamine est conservée chez toutes les petites protéines G sauf chez les protéines Rap, pour lesquelles elle est remplacée par une thréonine. Il a été montré que l'activité GTPasique de Rap1 est 10 fois plus faible que celle de Ras (Noda, 1993), effet potentiel de la substitution de la glutamine catalytique en thréonine.

2-Les protéines ARF ne possèdent pas de motif G1 [F]

Chez les protéines ARF, la phénylalanine du motif G1 [F] n'est pas conservée. Chez Arf1, elle est remplacée par une isoleucine et chez Arf6, par une serine. Les structures de la forme GDP de Arf1 ((Amor, 1994), (Greasley, 1995)) et de Arf6 (Menetrey, 2000) montre que le Switch I, région où se trouve l'isoleucine et la serine adopte une "conformation ouverte", ce qui a pour effet d'éloigner ces résidus du site nucléotidique. Chez Arf6-GDP, la sérine est responsable de l'élimination d'une interaction dans le site nucléotidique, ce qui a pour effet de diminuer l'affinité de la protéine pour le GDP (voir article 2 dans Chapitre 2-II-A, (Menetrey, 2000)). Dans la

forme GTP de Arf1 (Goldberg, 1998) et de Arf6 (Pasqualato, en cours de rédaction) ces résidus se rapprochent du site nucléotidique, mais ne forment aucune interaction avec le nucléotide ni avec des résidus en interaction avec le nucléotide. Ces observations suggèrent que les protéines ARF ne possèdent pas de motif G1 décrivant le même rôle que les autres petites protéines G.

3-Variabilité du motif G2 dans la famille RHO

a-L'asparagine du motif G2 n'est pas conservée chez Rac1 et CDC42. De manière générale, l'asparagine du motif G2 [NKxD] forme une liaison hydrogène avec la chaîne principale de la "P-Loop" (motif G1). Chez les protéines Rac1 et CDC42, cette asparagine est remplacée par une thréonine. Les structures de Rac1-GDPNHP et de CDC42-GDP montrent que cette thréonine est structuralement équivalente à l'asparagine. En effet, comme l'asparagine, elle forme une liaison hydrogène avec la chaîne principale de la "P-loop" (au niveau du même résidu).

b-La lysine du motif G2 n'est pas conservée chez CDC42. De manière générale, la chaîne aliphatique de la lysine du motif G2 [NKxD] stabilise par contacts hydrophobes la guanine et forme une liaison hydrogène avec la chaîne principale de la "P-loop" (fig.6). Cette lysine est remplacée par une glutamine chez CDC42. La structure de CDC42-GDP montre que cette dernière est structuralement équivalente à la lysine, sa chaîne aliphatique stabilise par contacts hydrophobes la base et interagit avec la chaîne principale de la "P-loop".

4-Autres caractéristiques....

a-La lysine du motif G3 n'est pas conservée chez les protéines Rac1, CDC42 et Arf . De manière générale, la chaîne aliphatique de la lysine du motif G3 [(C/S)A(K/x)] se plaque le long de la phénylalanine du motif G1 [F], la stabilise et la positionne par contacts hydrophobes (fig.6). Chez Rac1 et CDC42 la lysine du motif G3 [(C/S)A(K/x)] est une leucine. Les structures de Rac1-GDPNHP et CDC42-GDP montrent que cette leucine joue dans une moindre mesure le même rôle hydrophobe que la lysine. Chez les protéines Arf, la lysine du motif G3 [(C/S)A(K/x)] est

remplacée par une thréonine, qui pointe sa chaîne latérale vers la guanine, permettant la formation d'interactions faibles avec celle-ci.

b-Conséquence de la conformation ouverte du Switch I de Ran-GDP sur le motif G1 . De manière générale, la phénylalanine du motif G1 [F] qui se situe au niveau du Switch I, forme des interactions hydrophobes importantes avec la guanine du nucléotide (voir Introduction-I-B-2-a). Lorsque le Switch I est dans une conformation ouverte, ce qui est le cas pour Ran-GDP (fig.6), le motif G1 [F] est exclu du site nucléotidique. La structure de Ran-GDP montre que la lysine du motif G3 [(C/S)A(K/x)], qui est décalée de 1,7Å ($C\alpha-C\alpha$) par rapport à sa position classique (fig.6) stabilise par contacts hydrophobes la phénylalanine. La longue chaîne aliphatique de la lysine est parallèle au plan de la base, et forme avec la lysine du motif G2 [NKxD] une pince hydrophobe autour de la guanine. Il est à noter que dans la structure de Ran-GDPNHP/RanBD1 (Vetter, 1999b), la phénylalanine du motif G1 [F] et la lysine du motif G3 [(C/S)A(K/x)] reprennent leurs positions classiques (fig.6).

Annexe de l'Introduction

Méthodologies employées pour décrire structuralement les petites protéines G dans l'Introduction.

1-Superposition des structures du tableau 1

Dans le but de comparer les différentes structures du tableau 1, ces dernières ont été superposées avec l'option "rigid" du logiciel TURBO (Roussel) en appliquant un seuil de 0,6Å pour chaque cycle d'affinement (2^e étape). L'affinement est effectué à partir d'une première superposition (1^e étape) basée sur des paires de résidus structuralement conservés qui sont données par le manipulateur. Ici, la superposition de chaque structure listées dans le tableau 1 a été faite par rapport à la structure de Rap2A-GTP (Menetrey et Cherfils, 1999), en superposant les résidus structuralement conservés du site nucléotidique : la lysine et la serine/thréonine du motif PM1 [Gx₁x₂x₃x₄GK(S/T)], l'aspartate et la lysine du motif G2 [NKxD], l'alanine du motif G3 [(C/S)A(K/x)] et la phénylalanine du motif G1 [F] (pour superposer les protéines ARF, le résidu du motif G1 [F], qui n'est pas conservé a été exclu).

2-Alignement de séquences des petites protéines G listées dans le tableau 1 "basé sur la structure"

Un alignement de séquences classique des différentes protéines du tableau 1 a été effectué avec le programme CLUSTALW (Thompson, 1994) sur Internet (http://www.infobiogen.fr/services/analyseseq/cgi-bin/clustalw_in.pl#OPTREE). Cet alignement de séquence a été corrigé sur une base structurale (travail personnel), c'est-à-dire que chaque résidu a été aligné par rapport aux résidus structuralement équivalents des autres protéines. Ce travail a été fait pour toutes les structures du tableau I après leur superposition (voir Introduction-Annexe-1). Les structures d'une même protéine fixant du GDP ou du GTP ont été traitées distinctement. Les régions hypervariables N- et C-Terminales sont présentées dans l'alignement de séquences, mais n'ont pas été alignées.

3-Superposition des Interswitch des petites protéines G

Afin de comparer les Interswitch de chaque structure du tableau I, ceux-ci ont été superposés structurellement (comme décrit dans Introduction-Annexe-1). La première étape de la superposition a été faite au niveau de 3 résidus en N-Terminale du brin $\beta 2$ et 3 résidus en C-Terminal du brin $\beta 3$, définissant la base du feuillet ($\beta 2$ -L3- $\beta 3$). Cette superposition ne tient pas compte de la superposition du reste de la structure, par conséquent les informations qui seront observées doivent être analysées avec précaution.

Chapitre 1

Etude structurale de la petite
protéine G Rap2A dans un complexe
non catalytique avec le GTP

Chapitre 1 : Etude structurale de la protéine Rap2A dans un complexe non-catalytique avec le GTP

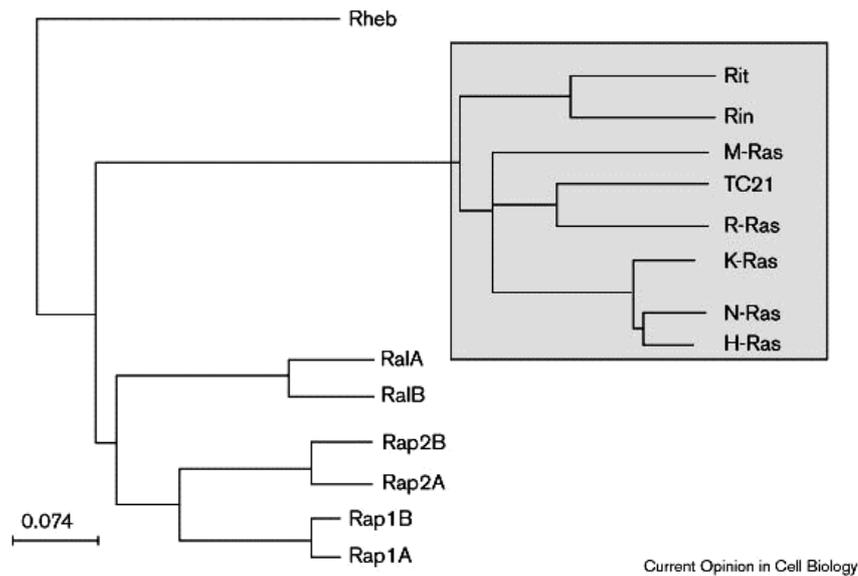
L'étude structurale de la protéine Rap2A était en cours à mon arrivée au laboratoire, et faisait l'objet d'une collaboration avec l'équipe de Jean-Renaud Garel du laboratoire d'Enzymologie et de Biochimie Structurale. Au cours de mon stage de DEA, j'ai participé à l'affinement des structures de Rap2A en complexe avec son vrai substrat le GTP et avec du GDP. Cette étude a fait l'objet d'une publication dans l'EMBO Journal (article dans l'annexe A). Puis, une nouvelle forme cristalline de Rap2A-GTP a été cristallisée, j'ai effectué au cours de mon stage doctoral l'étude structurale de cette nouvelle forme cristalline par remplacement moléculaire à une résolution de 2,2Å. Ce travail a fait l'objet d'une publication dans PROTEINS Structure, Function and Genetics.

L'étude structurale de la nouvelle forme cristalline de Rap2A en complexe avec son vrai substrat, le GTP a permis de mettre en évidence qu'il s'agissait d'une forme non catalytique de Rap2A. En effet, le GTP et le site nucléotidique de Rap2A sont parfaitement définis dans la densité électronique, ce qui suggère que la protéine n'a pas hydrolysé le GTP. L'étude d'une nouvelle forme cristalline de Rap2A-GTP est intéressante dans le sens où des formes cristallines différentes d'une même protéine apportent des informations structurales complémentaires sur la conformation de certaines régions. En effet, certaines régions de la protéine sont enfouies dans des contacts cristallins (autres molécules du cristal), contraignant la conformation de ces régions de manière artificielle. De plus, cette nouvelle forme cristalline a été résolue à une meilleure résolution que la première structure de Rap2A-GTP (Annexe A, (Cherfils, 1997), ce qui permettra d'obtenir des informations structurales plus précises.

L'étude structurale de Rap2A dans un complexe non catalytique avec le GTP a permis de confirmer l'observation d'une nouvelle interaction au niveau du site

nucléotidique, qui avait été faite lors de la résolution de la première structure de Rap2A-GTP (Cherfils, 1997). Cette interaction est faite par la tyrosine 32 du Switch II avec le phosphate gamma du GTP. Sa présence dans la forme non-catalytique de Rap2A-GTP semble indiquer qu'elle stabilise la forme GTP de la protéine. De plus, alors que le Switch II de la première forme cristalline de Rap2A-GTP est enfoui dans un contact cristallin, celui de la nouvelle forme cristalline ne l'est que partiellement, ce qui a permis de discuter la flexibilité de cette région. Nous avons étendu cette discussion aux Switch I et II de toutes les structures de petites protéines G disponibles dans les banques de données.

Ce chapitre est introduit par une description générale des différentes sous-familles de la famille RAS, ainsi qu'une description plus détaillée des protéines de la sous-famille Rap qui font l'objet de l'étude structurale présentée ici. Ces généralités sont abordées afin de mettre en évidence les différences observées entre des protéines qui partagent 60 à 70% de similarité de séquence. L'étude structurale de Rap2A dans un complexe non catalytique avec le GTP sera abordée dans la seconde partie de ce chapitre. L'analyse complète de la structure est présentée dans l'article "Structure of the small G protein Rap2 in a non-catalytic complex with GTP" de Julie Ménétrey et Jacqueline Cherfils, et sera introduite par un résumé des points forts de cette étude. Certains résultats de l'étude structurale qui n'ont pas été mentionnés dans l'article seront présentés. De plus, les discussions présentées dans l'article seront reprises à la lumière de nouvelles structures de petites protéines G résolues depuis 1999. Ces discussions portent sur le rôle de l'interaction entre la tyrosine 32 et le phosphate gamma et sur la flexibilité des régions Switch chez les petites protéines G.



Current Opinion in Cell Biology

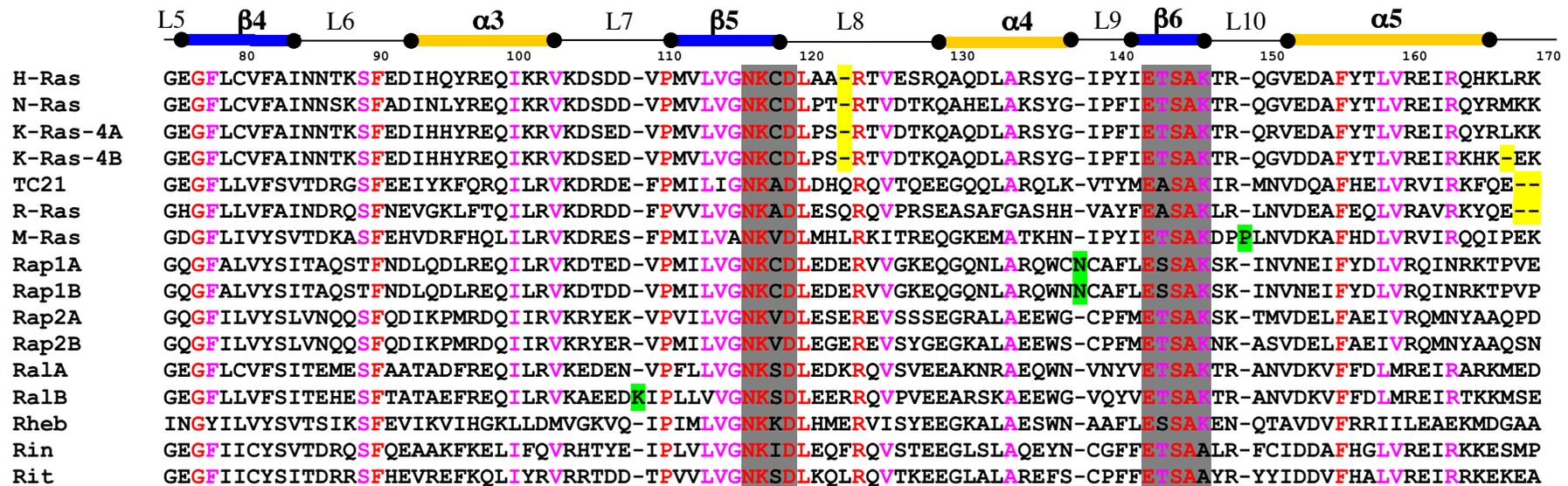
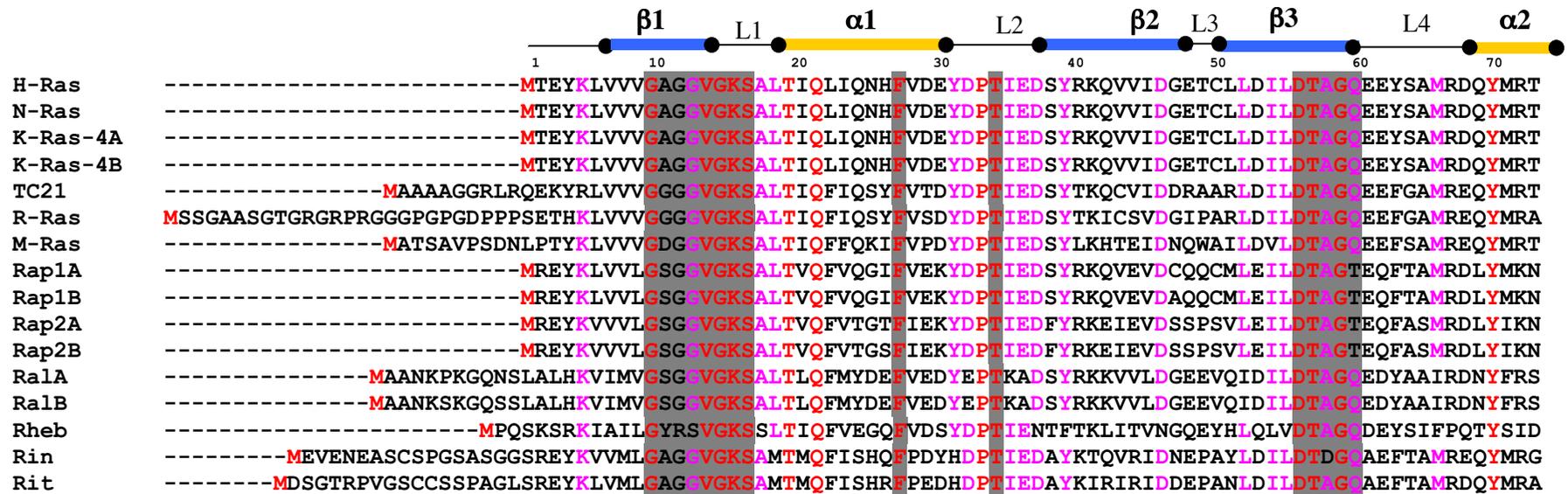
Figure 11 : Dendrogramme de la famille RAS. Figure empruntée à (Reuther and Der, 00). La longueur des branches est proportionnelle à la divergence de séquence estimée entre chaque protéine. Les protéines de la famille RAS ont été divisées en deux groupes, basés sur la capacité de mutant déficient dans la GTPase à induire la transformation cellulaire de fibroblastes NIH 3T3. L'encadré gris regroupe les protéines qui sont capables d'induire la transformation cellulaire, les autres protéines ne l'induisent pas seules.

I-GÉNÉRALITÉS

La première partie de ce paragraphe présente, d'une manière générale les différences observées entre les différentes sous-familles de la famille RAS. La famille des protéines RAS regroupe les sous-familles Ras, Rap, Ral, la protéine Rheb et plus récemment découvertes les protéines Rin et Rit qui forment une sous-famille (fig.11). Un alignement de séquences des protéines humaines de la famille RAS est présenté figure 10a, celui-ci met en évidence les différences de séquences existant entre ces protéines, ainsi que l'identité et la similarité de séquence qu'elles partagent. La seconde partie de ce paragraphe porte de façon plus détaillée sur les propriétés moléculaires et cellulaires des protéines Rap1 et Rap2, permettant ainsi de mettre en évidence leurs différences. Pour finir, les points forts de l'étude du cycle structural GDP/GTP de Rap2A, résolue précédemment seront résumés (Cherfils, 1997). La structure de Rap2A-GTP (forme hexagonale) de cette étude sera utilisée comme référence pour l'étude de la nouvelle forme cristalline de Rap2A-GTP (forme monoclinique). L'article de cette étude est reporté en annexe A.

A-La famille des protéines RAS (pour revue voir (Reuther and Der, 2000) et (Bos, 1998)).

Les protéines de la famille RAS possèdent des caractéristiques au niveau de leur structure primaire qu'on ne retrouve pas chez les autres familles de petites protéines G (RAB, RHO, ARF et RAN). Par exemple, en aval du motif PM1 [Gx1x2x3x4GK(S/T)], au niveau de l'hélice α_1 , une glutamine et une thréonine sont conservées uniquement chez les protéines de la famille RAS (fig.4 et fig.12). De même, au niveau du brin β_4 une glycine et une phénylalanine et au niveau du brin β_5 une proline sont conservées uniquement chez les protéines de la famille RAS (fig.4 et fig.12). De plus, le motif caractéristique G3 [(C/S)A(K/x)] (voir Introduction-I-B-2-a) est accolé à deux résidus conservés, un glutamate et une thréonine. Les protéines RAS partagent une région effectrice potentielle (au niveau du Switch I) fortement similaire. Ces caractéristiques permettent à ces protéines d'être classées



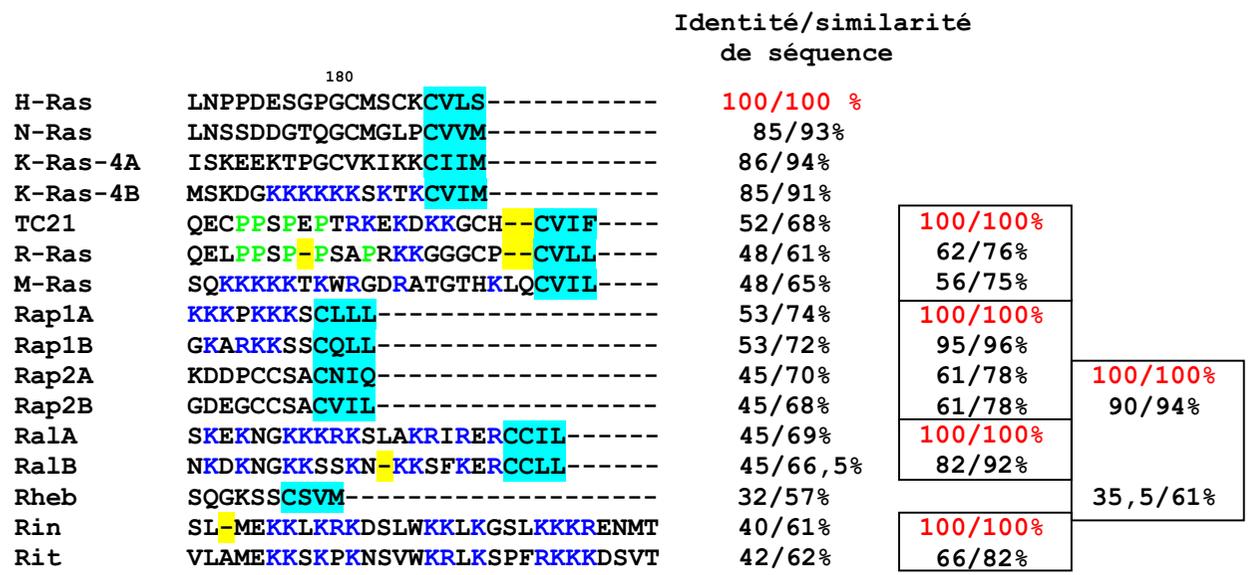


Figure 12 :Alignement de séquences des protéines humaines de la famille RAS et pourcentage d'identité et de similarité de séquence entre elles. L'alignement de séquences a été fait sur les protéines humaines de la famille RAS avec le programme CLUSTALW. Les régions N-Terminales ne sont pas alignées et les régions C-terminales sont alignées seulement pour chaque sous-famille. La numérotation de H-Ras a été indiquée au-dessus de sa séquence. La structure secondaire de H-Ras est représentée au-dessus de l'alignement de séquence. Les traits bleus représentent les brins β , et les traits jaunes les hélices α . Les résidus en rouge représentent les résidus strictement conservés, les résidus en rose représentent les résidus conservés à 1 ou 2 résidus près. Les motifs caractéristiques sont surlignés en gris et annotés. Les tirets surlignés en jaune sont des délétions par rapport aux autres séquences. Les résidus surlignés en vert sont des insertions par rapport aux autres séquences.. Les motifs Caax de prénylation en C-Terminus sont surlignés en indigo, les résidus des motifs polybasiques sont représentés en bleu et les résidus des motifs PxxP, motifs de reconnaissance aux domaines SH3 sont représentés en vert. Les pourcentages d'identités et de similarités de séquence sont indiqués à la fin de l'alignement de séquence, ceux-ci sont présentés en colonne et/ou encadrés, ils ont été calculés par rapport à la protéine pour qui l'identité/similarité de séquence est indiquée en rouge et est égale à 100/100 %.

dans la même famille, de partager des partenaires identiques et des fonctions proches et d'être distinguées des autres familles des petites protéines G.

Cependant, les régions C-Terminale et dans une moindre mesure N-Terminale de ces protéines sont divergentes en séquence. De plus, certaines protéines de la famille RAS possèdent des insertions et/ou des délétions de séquence au niveau de leur structure primaire. Ces différences suggèrent qu'elles puissent être distinguées les unes des autres par des partenaires différents.

1-La sous-famille Ras

La sous-famille Ras comprend 4 protéines : H-Ras, N-Ras, K-Ras4A et K-Ras4B (les deux protéines K-Ras4 résultent d'un épissage alternatif). Ces protéines sont presque identiques sauf au niveau de leur région C-Terminale. Cette région contient un motif de prénylation Caax (C pour cystéine, a pour résidu aliphatique et x pour résidu quelconque), qui est farnésylé sur la cystéine, puis les 3 derniers résidus (aax) sont protéolysés, et la cystéine farnésylée est carboxyméthylée. De plus, les protéines H-Ras, N-Ras et K-Ras4A sont palmitoylées sur une cystéine adjacente à la cystéine farnésylée, alors que K-Ras4B possède un motif polybasique riche en lysine capable d'interagir avec des phospholipides anioniques ancrés dans la membrane.

Les protéines Ras ont acquis leur notoriété comme étant le produit de gènes trouvés mutés dans environ 15 % des tumeurs humaines (pour revue voir (Bos, 1989)). Elles sont exprimées de façon ubiquitaire et sont localisées sur la face interne de la membrane plasmique (Hancock, 1990). Un certain nombre de protéines sont susceptibles d'interagir avec la forme GTP de Ras, mais à ce jour seulement 3 familles de protéines semblent être des effecteurs des protéines Ras. Parmi ces 3 familles, on trouve la famille des serine/thréonine kinase Raf qui sont les effecteurs de Ras les mieux décrits. La voie de signalisation MAP kinases activée par la cascade Ras->Raf->MEK->ERK (MEK: mitogen-activated protein (MAP) kinase ou ERK kinase, et ERK: extracellular-signal-regulated kinase) est la voie de signalisation la mieux décrite à ce jour dans la littérature. Elle est activée par des facteurs de croissance et des mitogènes, et conduit à la croissance et la différenciation cellulaire (pour revue voir (Denhardt, 1996)). La PI-3 kinase est un autre effecteur des

protéines Ras, cet enzyme est un hétérodimère composé par une sous-unité régulatrice, p85 et une sous-unité catalytique, p110. Ras active le complexe p85-p110 en interagissant directement avec la sous-unité catalytique p110 (Rodriguez-Viciano, 1996). Récemment, il a été établi que les membres de la famille des RalGEF, facteurs d'échange des petites protéines G Ral (même famille que les protéines Ras) sont aussi des effecteurs des protéines Ras. L'activation des RalGEF par Ras suggère un mécanisme par lequel les protéines Ral sont activées par des signaux extracellulaires (pour revue voir (Wolthuis and Bos, 1999)).

Certaines études semblent indiquer que malgré de très fortes similarités de séquence, les protéines de la sous-famille Ras puissent avoir des fonctions distinctes. Des expériences délétant l'un mais pas les autres gènes de la sous-famille Ras montrent que K-Ras, mais pas H-Ras ou N-Ras est essentiel pour le développement ((Umanoff, 1995) et (Johnson, 1997)). De plus, les inhibiteurs de la farnésyltransférase développés comme étant des drogues contre les protéines Ras, sont efficaces sur H-Ras mais pas sur K-Ras ou N-Ras ((Cox and Der, 1997) et (Oliff, 1999)).

2-La sous-famille R-Ras

La sous-famille R-Ras (R=Related) est constituée par trois protéines: R-Ras, R-Ras2/TC21 et R-Ras3/M-Ras, ces protéines partagent 75% de similarité de séquence entre-elles et 65 % avec H-Ras. R-Ras possède une extension de 26 résidus en N-Terminus par rapport à H-Ras, riche en proline et en glycine. TC21 et M-Ras possèdent une extension N-Terminale de 10 résidus, qui ne possèdent aucune similarité de séquence avec celle de R-Ras (fig.12). La sous-famille R-Ras possède un motif de prénylation Caax en C-Terminus qui est géranyl-géranylé contrairement à celui de la sous-famille Ras qui est farnésylé (Reuther and Der, 2000). De plus, TC21 et R-Ras possèdent une cystéine adjacente au motif Caax qui est un site potentiel de palmitoylation. M-Ras et TC21 possèdent un motif polybasique riche susceptible d'interagir avec des phospholipides anioniques ancrés dans la membrane. R-Ras possède 3 motifs de liaison au domaine SH3 de type II PxxP (où P est une proline et x n'importe quel résidu) en C-Terminus (fig.12). Une étude *in vitro* a montré qu'un fragment du domaine SH3 de Nck interagit avec R-Ras, indépendamment de la

nature du nucléotide au niveau des motifs PxxP (Wang, 2000). TC21 possède aussi un motif PxxP en C-Terminus. Ces observations suggèrent que R-Ras et TC21 possèdent un ou plusieurs sites potentiels d'interaction avec des partenaires possédant un domaine SH3, indépendamment du cycle GDP/GTP. Ce motif est aussi présent chez CDC42, une petite protéine G de la famille des RHO (fig.4).

Comme Ras, les mutants constitutivement activés des protéines R-Ras sont susceptibles de promouvoir la transformation cellulaire et d'altérer la différenciation cellulaire. Les protéines de la sous-famille R-Ras peuvent être activées par les facteurs d'échange des protéines de la sous-famille Ras, suggérant que ces protéines puissent être stimulées par les mêmes signaux extracellulaires. De plus, les protéines R-Ras interagissent avec la majorité des effecteurs des protéines Ras, suggérant qu'elles puissent aussi activer les mêmes voies de signalisation (pour revue voir (Reuther and Der, 2000)). Cependant, il a été montré que la protéine R-Ras pouvait aussi avoir des fonctions distinctes de celles des protéines Ras. Par exemple, R-Ras peut induire l'apoptose des cellules de la moelle osseuse suite à l'appauvrissement de l'interleukine 3 dans le milieu, et peut augmenter l'adhésion cellulaire induit par les intégrines ((Wang, 1995) et (Zhang, 1996)). De plus, R-Ras n'active pas efficacement les protéines de la familles Raf et les protéines RalGEF comme le font les protéines Ras ((Marte, 1997) et (Urano, 1996)). Ces observations suggèrent que R-Ras puisse interagir avec des effecteurs distincts de ceux des protéines Ras.

3-La sous-famille Ral

La sous-famille des protéines Ral est constituée par deux isoformes RalA et RalB, elles partagent 92 % de similarité de séquence (elles diffèrent principalement au niveau de leur C-Terminus) (Chardin and Tavitian, 1989) et environ 68% avec H-Ras. Les protéines Ral possèdent une extension de 11 résidus en N-Terminus par rapport à H-Ras. De plus, elles possèdent en C-Terminus un motif de prénylation Caax géranyl-géranylé contrairement à celui des protéines de la sous-famille Ras qui est farnésylé, et un motif polybasique (Jilkina and Bhullar, 1996).

Les protéines Ral sont ubiquitaires et sont localisées au niveau de la membrane plasmique et des vésicules d'endocytose et d'exocytose (Feig, 1996). Jusqu'à récemment peu de chose était connues sur la régulation et la fonction des

protéines Ral. Cela a changé lorsqu'il a été montré que les facteurs d'échange des protéines Ral (RalGDS, rgl et Rfl), interagissent avec la forme GTP de différentes protéines de la famille RAS, dont l'oncogène H-Ras (pour revue voir (Wolthuis and Bos, 1999)). Ces observations suggèrent que les protéines Ral puissent être activées par certaines protéines de la famille RAS. RalA interagit avec la calmoduline, suggérant qu'elle puisse réguler une voie de signalisation intracellulaire dépendante du Ca^{2+} , distincte de la voie de signalisation de Ras (Wang, 1997). De plus, RalA interagit directement avec la PLD1 au niveau de résidus N-Terminaux,, indépendamment du nucléotide qu'elle fixe, mais n'a aucun effet sur l'activité PLD (Luo, 1998). Deux laboratoires ont identifié simultanément un effecteur de RalA par double hybride ((Jullien-Flores, 1995) et (Cantor, 1995)), cette protéine a été appelée respectivement RLIP1/RalBP1. L'interaction entre RalA-GTP et RLIP1/RalBP1 requiert que la région effectrice de RalA soit intacte.

4-La protéine Rheb

Rheb est la protéine la plus divergente de la famille RAS : elle partage 57 % de similarité de séquence avec H-Ras et 61% avec Rap2A. Des analyses *in vitro* et *in vivo* montrent que comme Ras, Rheb est farnésylée au niveau d'un motif de prénylation Caax (Clark, 1997). Rheb possède deux résidus encombrants au niveau du motif PM1 [$Gx_1x_2x_3x_4GK(S/T)$] : une tyrosine en position x_1 et une arginine en position x_2 . Chez Ras le résidu x_2 est une glycine, la mutation de cette glycine en arginine rend Ras constitutivement actif (Seeburg, 1984). Ce résultat suggère qu'une arginine à cette position inhibe l'hydrolyse du GTP intrinsèque ou par la GAP, en empêchant par exemple certaines interactions de se former. De plus, alors que le résidu x_3 est une glycine conservée chez les autres membres de la famille RAS, Rheb possède une sérine.

Le gène de Rheb a été identifié parce qu'il est rapidement induit suite à l'activité synaptique des neurones dans le cerveau (Ras homologue enriched in brain) (Yamagata, 1994). Par la suite, il a été montré que Rheb est exprimée de façon ubiquitaire (Clark, 1997). Rheb sauvage ou Rheb constitutivement activée (Q61L) n'induit pas la transformation des fibroblastes NIH 3T3 (Clark, 1997), comme H-Ras. Deux études ont proposé une fonction biologique potentielle pour Rheb, conduisant à

deux conclusions opposées. Dans un cas, il a été montré *in vitro*, que Rheb interagit avec Raf-1, et que cette interaction antagonise l'effet oncogène de Ras, suggérant que Rheb ait une fonction distincte de celle de Ras (Clark, 1997). Dans un autre cas, il a été montré que Rheb interagit Raf-1 et semble le réguler. Contrairement à Ras, cette interaction est régulée par des facteurs de croissance en combinaison avec des agents qui augmentent le niveau de l'AMPc (Yee and Worley, 1997). Dans les deux cas, Rheb semble fonctionner de manière distincte de Ras.

5-Les protéines Rin et Rit

Les protéines Rin et Rit ont été découvertes très récemment, elles partagent 82 % de similarité de séquence entre elles et 62% avec H-Ras. Rin et Rit possèdent des extensions N- et C-Ternales, respectivement d'une vingtaine et d'une dizaine de résidus par rapport à H-Ras. Ces extensions présentent une faible homologie de séquence entre elles. Une caractéristique de ces 2 protéines, par rapport aux autres protéines de la famille RAS, est l'absence d'un motif de prénylation en C-Terminus ; par contre elles possèdent un motif polybasique long (fig.12) (Lee, 1996). Rin possède un motif PM3 [DTAGQ] particulier, en cela que l'alanine conservée pour toutes les autres protéines de la famille RAS est remplacée par un aspartate. La chaîne latérale de l'aspartate de Rin peut former de nouvelles interactions au niveau du site nucléotidique ou modifier la conformation du motif PM3, entraînant des particularités spécifiques au niveau de l'hydrolyse du GTP. Les protéines ARF possèdent un motif PM3 de type [DVGGQ], les structures de la forme GDP de Arf1 ((Amor, 1994) et (Greasley, 1995)) et de Arf6 (Menetrey, 2000) montrent que ce motif est décalé de deux résidus par rapport à une position classique (repliement général). Ce déplacement a pour effet de placer l'aspartate à la place de la première glycine [DVGGQ] (Goldberg, 1998), ce qui entraîne des modifications au niveau des interactions du site nucléotidique. Shao et coll. qui ont étudié les caractéristiques biochimiques de Rin et Rit, n'ont observé aucune différence majeure au niveau de l'hydrolyse du GTP de ces deux protéines par rapport à celle de Ras (Shao, 1999), suggérant que les différences de séquences au niveau du motif PM3 de la protéine Rin n'influencent pas la GTPase. Rit, comme les autres petites protéines G est exprimée de façon ubiquitaire, alors que Rin est exclusivement exprimée dans les

neurones ; elles sont associées à la membrane plasmique. Rin interagit avec la calmoduline, comme RalA. Ce résultat permet de proposer que Rin soit impliquée dans la signalisation induite par le calcium dans les neurones (Lee, 1996). La forme GTP de Rin et Rit interagit avec certains effecteurs de Ras, comme RalGDS, Rfl et RGL3, mais pas avec les protéines Raf et la sous-unité p110 de la PI 3-Kinase ((Shao and Andres, 2000) et (Shao, 1999)).

B-La sous-famille Rap

1-généralités

Les protéines Rap ont été clonées et/ou purifiées, dans un court laps de temps par différents laboratoires et par différentes techniques. Les gènes de Rap1A et de Rap2A humains ont été identifiés par analogie de séquence avec le gène Dras3, précédemment identifié chez la drosophile (Pizon, 1988). Rap1B humain a été identifiée par le même laboratoire très peu de temps après en utilisant la même stratégie (Pizon, 1988). De plus, Rap1A (appelé alors Krev-1) a été identifiée à partir d'une banque d'ADN complémentaire de fibroblaste humain, basé sur sa capacité à réverser le phénotype de v-Ki-Ras transformé (Kitayama , 1989). Une petite protéine G de 22 kDa appelée Smg p21, qui a été purifiée, séquencée et clonée à partir d'une banque d'ADN de cerveau bovin, s'est révélée être identique à Rap1B (Kawata, 1988). La dernière protéine Rap, Rap2B a été identifiée par PCR à partir d'une banque d'ADN complémentaire provenant de plaquettes (Ohmstede, 1990).

La sous-famille Rap est composée par 4 protéines, Rap1A, Rap1B, Rap2A et Rap2B. Les protéines Rap1A/B et Rap2A/B partagent 78% de similarité de séquence entre elles, les formes A et B de chaque protéine (Rap1 et Rap2) partagent 96% de similarité de séquence entre elles, et toutes les protéines Rap partagent 70% de similarité de séquence avec H-Ras (fig.12). Les protéines Rap possèdent toutes un motif de prénylation Caax en C-Terminus. Rap1A, Rap1B et Rap2B semblent être géranyl-géranyllées, alors que Rap2A semble être, comme les protéines Ras farnésylée. De plus, les protéines Rap1 possèdent un motif polybasique en C-Terminus, alors que les protéines Rap2 possèdent 2 cystéines adjacentes au motif de prénylation, susceptibles d'être palmitoylées. Une caractéristique des protéines Rap

par rapport aux autres protéines de la super-famille des petites protéines G est la substitution de la glutamine catalytique du motif PM3 [DTAGQ] par une thréonine. Cette différence ne semble pas être la conséquence de l'isolement d'une protéine mutée, puisque les protéines Rap ont été isolées par différents laboratoires, avec différentes techniques et dans différents organismes (humain, drosophile, levure) et/ou types cellulaires, et toutes présentent cette différence. Il a été montré que l'activité GTPasique de Rap1 est 10 fois plus faible que celle de Ras (Noda, 1993), effet potentiel de la substitution de la glutamine catalytique en thréonine.

2- Les protéines Rap1

Les protéines Rap1 sont exprimées de façon ubiquitaire, et sont retrouvées de façon abondantes dans les plaquettes, les neutrophiles et dans le cerveau. Alors que Ras est principalement localisée au niveau de la membrane plasmique, la localisation de Rap1 semble être plus variable et dépendre du type cellulaire. Les protéines Rap1 ont été identifiées au niveau de l'appareil de golgi dans les fibroblastes (Beranger, 1991) et au niveau des endosomes tardifs et des lysosomes dans les fibroblastes et les macrophages (Pizon, 1994). Dans les neutrophiles, les protéines Rap1 ont été identifiées au niveau de la membrane plasmique et des granules spécifiques qui fusionnent avec la membrane plasmique sous la stimulation des neutrophiles ((Maridonneau-Parini et de Gunzburg, 1992) et (Quinn, 1992)). Dans les plaquettes, les protéines Rap1 ont été identifiées au niveau de la membrane plasmique et des granules α (Berger, 1994). La localisation des protéines Rap1 est régulée par la phosphorylation d'une sérine en N-Terminus (serine 180 pour Rap1A et serine 179 pour Rap1B) par la protéine kinase A (PKA) (kinase dépendante de l'AMPc) (Lerosey, 1991). Les protéines Rap1 possèdent une région effectrice (Switch I) presque identique à celle de Ras (fig.12).

Activation de Rap1. Comme Ras, une large gamme de signaux extracellulaires, incluant des facteurs de croissances, des cytokines et des molécules impliquées dans l'adhésion cellulaire, régulent Rap1 (pour revue voir (Zwartkuis et Bos, 1999)). De plus, Rap1 peut être activée par des messagers secondaires comme l'AMPc, le calcium et le diacylglycérol (DAG) (Zwartkuis, 1998). Ces messagers secondaires

activent des RapGEF, qui activeront à leur tour les protéines Rap. Parmi ces facteurs d'échange, on trouve Epac (Exchange protein activated by cAMP) et cAMP-GEFII (de Rooij, 1998), qui interagissent avec l'AMPc et sont activés par ce dernier. On trouve aussi CalDAG-GEFI, qui possède un domaine susceptible d'interagir avec le calcium et un autre domaine susceptible d'interagir avec le diacylglycérol (Kawasaki, 1998). L'activation des protéines Ras et Rap1 par leurs facteurs d'échange ne semblent pas se faire par le même mécanisme. En effet, le mutant Ras-S17N qui est défectueux pour fixer le nucléotide s'associe de façon stable avec sa GEF, par contre la même mutation chez Rap1, ne conduit pas à la formation d'un complexe Rap1S17N avec sa GEF, C3G. Ces résultats suggèrent que Rap1-S17N, contrairement à Ras-S17N n'agit pas comme un dominant négatif, *in vivo* (van den Berghe, 1997).

Fonctions et partenaires de Rap1. La fonction de Rap1 a tout d'abord été associée à sa capacité de réverser l'activité induite dans les cellules NIH 3T3 transformées par H-Ras (Kitayama, 1989). Ce résultat a conduit à l'hypothèse que Rap1 pouvait antagoniser Ras en s'associant à des effecteurs communs. Comme le domaine effecteur de Rap1 est presque identique à celui de Ras, Rap1 peut s'associer aux effecteurs de Ras, en particulier Raf1, empêchant Ras de pouvoir transformer les cellules NIH 3T3. Il semble maintenant clair que Rap1 possède des fonctions cellulaires qui lui sont propres. La première évidence que Rap1, comme Ras est impliquée dans la transduction du signal, provient de l'observation que l'augmentation du niveau de l'AMPc par l'activation soit du récepteur de la prostaglandine E1 soit de l'adénylate cyclase induit une augmentation de la forme GTP de Rap1 (Altschuler, 1995). Rap1 semble impliquée dans différents processus cellulaires comme le contrôle de l'adhésion cellulaire et la régulation du cycle cellulaire. Cependant, peu d'information est disponible à ce sujet (pour revue voir (Zwartkruis et Bos, 1999)). Il a également été montré que Rap1 s'associe au cytochrome c dans les neutrophiles humains, suggérant un rôle pour Rap1 au niveau du système générant des ions superoxydes (Quinn, 1992)). De plus, Rap1 se copurifie avec le cytochrome b558, composant du complexe NADPH oxydase humain (Maly, 1994). Le rôle de Rap1 dans la régulation du système de la NADPH oxydase n'est pas encore complètement établi.

In vitro, Rap1 interagit avec la plupart des partenaires de Ras, mais ne les active pas forcément. Rap1 interagit avec la P120-GAP, une GAP de Ras, mais n'est pas désactivée par cette GAP ((Frech, 1990), (Hata, 1990)). Rap1 interagit avec Raf-1, mais contrairement à Ras ne l'active pas. De plus, l'interaction de Rap1 avec Raf-1 semble être régulée par la phosphorylation de Rap1, suggérant que l'interaction de Rap1 et de Ras avec Raf-1 soit régulée différemment (Hu, 1999). Par contre, *in vivo*, Rap1 interagit avec et active B-Raf, un homologue de Raf-1 (Ohtsuka, 1996). Les facteurs d'échange de Ral (RalGDS, Rgl et Rlf) interagissent directement avec Rap1-GTP *in vitro* et *in vivo* ((Spaargaren et Bischoff, 1994), (Wolthuis, 1996) et (Kishida, 1997)). Ras et Rap1 interagissent avec RalGDS et Rlf *in vivo*, mais seule Ras induit l'activation de Ral *in vivo* ((Kishida, 1997) et (Urano, 1996)). De plus, *in vitro* alors que H-Ras interagit avec Raf-RBD avec une forte affinité ($K_d=20\text{nM}$) et avec RGL-RBD (facteur d'échange de Ral) avec une faible affinité ($K_d=1\mu\text{M}$), Rap1A montre un comportement opposé (Herrmann, 1996). Ces résultats suggèrent que Ras et Rap1 régulent différemment ces effecteurs. Au moins une protéine, Krit1 (Krev-interacting trapped 1) interagit fortement avec Rap1-GTP, et seulement faiblement avec Ras-GTP, suggérant que Rap1 puisse aussi avoir des effecteurs distincts de ceux de Ras (Serebriiskii, 1997).

Ces différents résultats montrent que malgré un domaine effecteur presque identique, Ras et Rap1 possèdent des partenaires différents et sont impliquées dans des mécanismes différents.

3- Rap2

les protéines Rap2A/B partagent 78% de similarité de séquence avec les protéines Rap1A/B. Une différence de séquence importante au niveau du Switch I entre les protéines Ras/Rap1 et Rap2 a été observée, il s'agit du résidu 39 qui est chez Ras/Rap1 une sérine et chez Rap2 une phénylalanine. La phénylalanine est plus encombrante que la sérine et ne possède pas un groupement hydroxyle susceptible de former des liaisons hydrogènes comme la sérine (Pizon, 1988). Cette différence

peut être un site de distinction entre les protéines Rap2 et les protéines Rap1/Ras. Bien que les protéines Rap2 possèdent une sérine en N-Terminus, elles ne sont pas phosphorylées *in vitro* et *in vivo* par la PKA et la PKC, comme le sont les protéines Rap1 (Lerosey, 1991).

La régulation de Rap2 est mal connue. Les facteurs d'échange GDP/GTP de Rap1: C3G, Epac, CalDAG-GEF1, PDZ-GEF1 et GFR sont efficaces sur Rap2, *in vitro* (Ohba, 2000). Les GAP de Rap1, Rap1GAPII et SPA-1, stimulent la GTPase de Rap2 de façon moins efficace que celle de Rap1. De plus, le temps de demi-vie de Rap2-GTP dans des cellules 293T est plus longue que celle de Rap1-GTP, indiquant que la faible sensibilité des GAP pour Rap2 entraîne un rapport GTP/GDP de la protéine élevé (Ohba, 2000).

Les fonctions physiologiques des protéines Rap2A sont aussi mal connues. Rap2 a été identifiée au niveau du réticulum endoplasmique dans les fibroblastes (Ohba, 2000), mais aussi au niveau de l'appareil de Golgi dans les macrophages et les fibroblastes, comme Rap1 (Pizon, 1994). Dans les neutrophiles, Rap2 a été identifiée au niveau des granules spécifiques qui fusionnent avec la membrane plasmique sous la stimulation des neutrophiles, comme les protéines Rap1 (Maridonneau-Parini et de Gunzburg, 1992). Contrairement à Rap1, Rap2 n'antagonise pas la transformation induite par Ras dans les cellules NIH 3T3. De plus, Rap2 n'induit pas, comme H-Ras de transformation cellulaire (Jimenez, 1991).

Dans le but d'élucider la fonction biologique de Rap2, différentes études ont cherché avec le système du double hybride des effecteurs de Rap2 (en utilisant comme cible Rap2G12V, mutant défectueux dans l'hydrolyse du GTP). De cette manière, une nouvelle protéine a été identifiée, RPIP8 (RaP2 Interacting Protein 8), dont l'interaction avec Rap2 nécessite que son domaine effecteur soit intact. Par double hybride, RPIP8 n'interagit pas avec les protéines Ras, Rap1 et Ral, suggérant que RPIP8 soit un effecteur spécifique de Rap2. RPIP8 est préférentiellement exprimée dans les cellules neuronales et endocrines, cependant sa fonction n'est pas encore établie (Janoueix-Lerosey, 1998). Rap2, comme Rap1 interagit faiblement avec c-Raf, alors que Ras interagit très fortement avec c-Raf (Nancy, 1999). De

plus, Rap2 comme Rap1 et Ras interagit avec les facteurs d'échange GDP/GTP des protéines Ral (RalGDS, RGL et Rlf) *in vitro*. Cependant tandis que les protéines Ral sont activées par Ras, ni Rap2 ni Rap1 ne conduisent *in vivo* à l'activation des protéines Ral ((Nancy, 1999) et (Zwartkruis, 1998)). RGS14, identifiée comme étant une GAP spécifique de la sous-unité α de Go, est un effecteur de Rap2 et de Rap1 mais pas de Ras. Le fait que RGS14 soit identifiée dans le cerveau de souris comme Rap2 et $G\alpha_o$, mais pas comme Rap1 suggère que RGS14 permet à Rap2 de réguler la voie de signalisation des récepteurs couplés aux protéines G jusqu'à la protéine hétérotrimérique Go (Traver , 2000). Rap2 s'associe avec le cytosquelette des plaquettes en interagissant directement avec les filaments d'actines de façon indépendante à l'état d'activation de la protéine (Torti , 1999). La PI 3-Kinase n'interagit pas, *in vitro* avec Rap2A, le nucléotide présent, contrairement à Ras (Rodriguez-Viciano , 1994).

Ces différents résultats montrent que bien que Rap1 et Rap2 partagent 78 % de similarité de séquence, elles ne sont pas régulées de la même manière et possèdent des effecteurs spécifiques.

C-Cycle structural GDP/GTP de Rap2A

Des études structurales sur Rap1 ont été entrepris par Nassar et Coll., dans le but de comprendre sur quelles bases structurales Rap1 interagit avec les mêmes effecteurs que Ras sans les activer. Deux structures du complexe entre Rap1 et le domaine RBD de Raf1 ont été résolues (Nassar, 1996; Nassar, 1995), l'un avec Rap1 sauvage et l'autre avec Rap1 mutée au niveau de deux résidus qui diffèrent entre Ras et Rap1 au niveau du Switch I (ces résidus ont été mutés par ceux de Ras, E30D et K31E). De la même manière, pour essayer de comprendre comment Rap2 n'antagonise pas l'effet oncogène de Ras, l'étude structurale de Rap2A a été entreprise par notre laboratoire.

Au cours de mon stage de DEA, j'ai participé à la résolution des structures de Rap2A en complexe avec du GDP, du GTP et un analogue non hydrolysable du GTP,

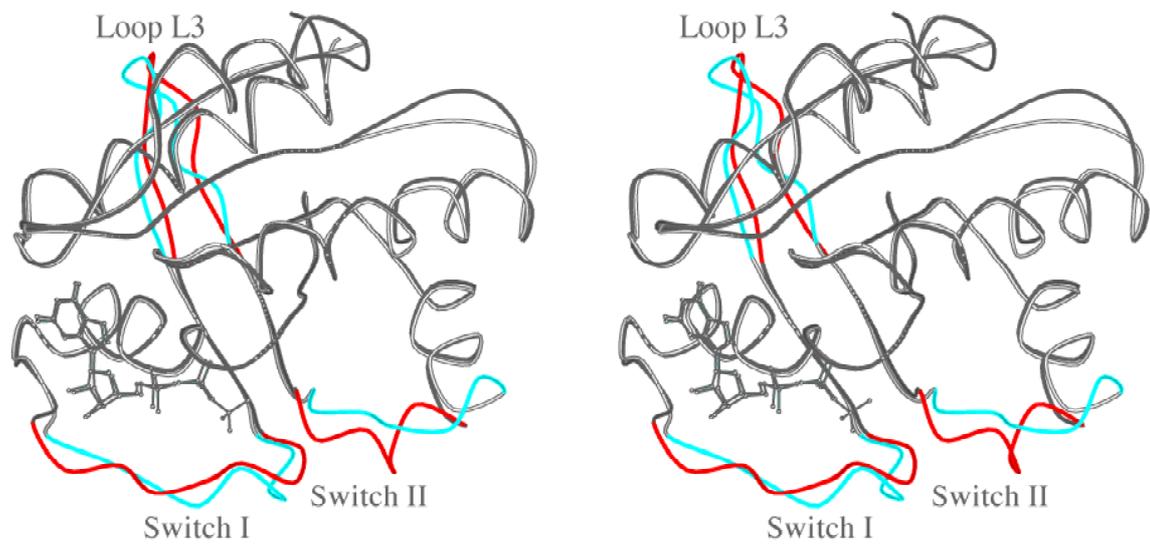


Figure 13 : Vue stéréographique des changements de conformation du cycle structural GDP/GTP et des régions flexibles de Rap2A. Rap2A-GDP est présentée en blanc et Rap2A-GTP en noir. Les régions switch I et switch II qui changent de conformations et la boucle L3 qui est flexible sont en couleur, respectivement en bleu et en rouge.

le GTP γ S: cette étude a fait l'objet d'une publication dans l'EMBO Journal. L'analyse complète du cycle structural GDP/GTP de Rap2A est présentée dans l'article en annexe A. Les points forts de cette étude sont repris dans ce paragraphe.

- La structure des formes triphosphates des petites protéines G n'est connue que pour des protéines en complexe avec des analogues non hydrolysable du GTP (le GTP γ S, le GDPNHP et le GDPCH₂P). La structure de Rap2A-GTP est la première structure de petite protéine G en complexe avec son vrai substrat, le GTP. Depuis la résolution de cette structure, d'autres structures de petites protéines G en complexe avec leur vrai substrat le GTP ont été résolues : Ras-GTP (Scheidig, 1999), le complexe Rab3A^{Q81L}-GTP/Rabphilin3 (Ostermeier et Brunger, 1999)).
- La résolution de la forme GDP et GTP de Rap2A a permis d'étudier pour la seconde fois le cycle structural GDP/GTP d'une petite protéine G (le premier cycle structural GDP/GTP a été résolu pour H-Ras). Cette étude a permis d'observer si la nature des changements de conformation induits au cours du cycle GDP/GTP étaient la même pour toutes les petites protéines G et surtout si les changements de conformation étaient localisés au même endroit, et avaient les mêmes amplitudes et les mêmes longueurs. Le cycle structural GDP/GTP de Rap2A montre que les changements de conformation sont principalement localisés au niveau des Switch I et II (fig.13) comme cela avait été précédemment décrit pour H-Ras (Milburn, 1990). Cependant, contrairement à H-Ras, l'hélice α 2 de Rap2A (résidus 66 à 75) ne change pas de conformation au cours du cycle GDP/GTP et ne fait donc pas partie du Switch II de Rap2A (résidus 58 à 66).
- Le cycle structural GDP/GTP de Rap2A est caractérisé par une transition désordre/ordre. En effet, la structure de Rap2A-GDP montre que les Switch I et II sont désordonnés, alors que dans la structure de Rap2A-GTP ils sont ordonnés. Cependant, le Switch II de la structure de Rap2A-GTP est enfouie dans un contact cristallin, suggérant que l'état ordonné du Switch II soit peut-être un artefact de la cristallisation.

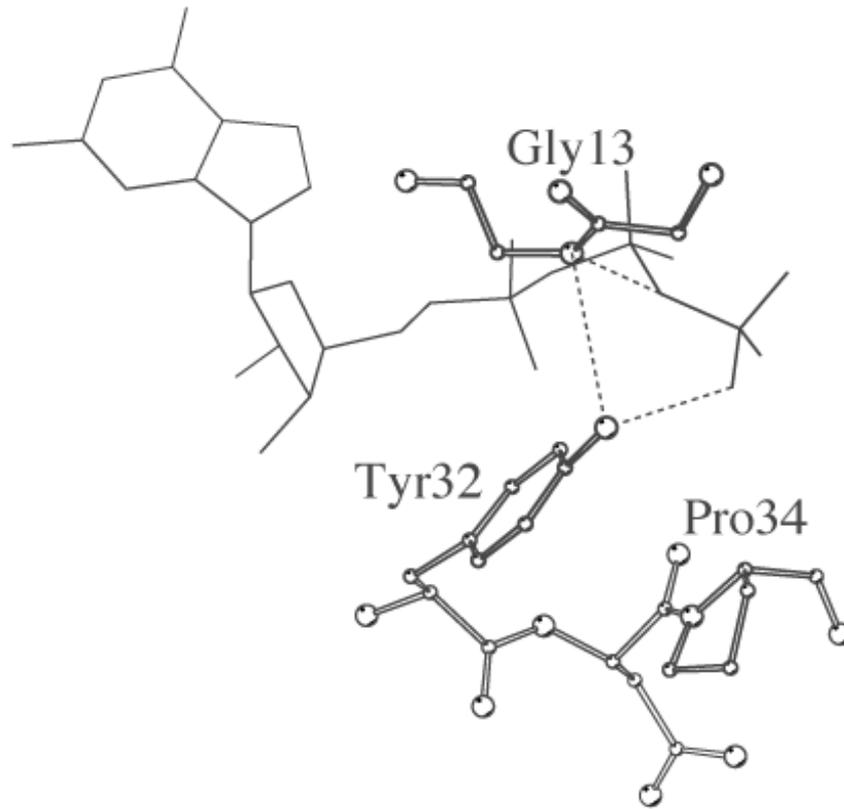


Figure 14 : Interactions faites par la tyrosine 32 au niveau du site nucléotidique de Rap2A-GTP. Les liaisons hydrogènes sont représentées en pointillé.

- Une nouvelle interaction au niveau du site nucléotidique, a été observée dans la structure de Rap2A-GTP, pour la première fois. La tyrosine 32 qui appartient au Switch I/région effectrice et est placée entre le motif G1 [F₂₈] et le motif PM2 [T₃₅], forme une liaison hydrogène avec l'oxygène du phosphate gamma du GTP. La tyrosine 32 forme également une liaison hydrogène avec le groupe NH de la glycine 13, qui elle même interagit avec l'oxygène reliant le phosphate gamma au phosphate beta (P_γ-O-P_β). De plus, le cycle aromatique de la tyrosine 32 est empilé par contacts hydrophobes sur le cycle de la proline 34 (Fig.14). Dans la structure Rap2A-GDP, la tyrosine 32 pointe vers l'exterieur du site nucléotidique. La conservation de la tyrosine 32 chez les petites protéines G, suggère que ce résidu joue un rôle structural ou fonctionnel au niveau du site nucléotidique. De plus, la tyrosine 32 semble être impliquée dans la reconnaissance d'effecteur: le mutant Y32F de H-Ras interagit avec Raf mais n'active plus, et ne reconnaît plus Byr2, un effecteur de Ras chez *schizosaccharomyces pombe* (Akasaka , 1996).

Il est possible de modéliser Rap2 à la place de Rap1 dans la structure du complexe Rap1/Raf1-RBD sans gêne stérique de la part de la phénylalanine 39 (sérine chez Rap1 et Ras). Cependant, la présence d'une phénylalanine à la place d'une sérine peut entraîner des réarrangements structuraux d'ordre plus général. Comme, un changement de conformation au niveau de la chaîne principale du Switch I, dans ce cas il est difficile de prédire un modèle d'interaction entre Rap2A et Raf1-RBD. De plus, la nature de ces deux résidus est différente : une sérine est susceptible de former deux liaisons hydrogènes, une donneuse et une accepteuse alors qu'une phénylalanine ne le peut pas. Une phénylalanine est susceptible de former de larges interactions hydrophobes, ce qui n'est pas le cas d'une sérine. Par conséquent, la nature de l'interaction entre Rap1 et Rap2 avec Raf1-RBD sera différente.

II-Structure de Rap2A dans un complexe non catalytique avec le GTP

L'étude structurale de Rap2A dans un complexe non catalytique avec du GTP est présentée dans cette partie. L'analyse complète de cette étude est présentée dans l'article "Structure of Rap2A in a non-catalytic complex with GTP" de Julie Ménétrey et Jacqueline Cherfils, publié dans PROTEINS Structure, Function and Genetics. L'article sera introduit par un résumé des points forts de cette étude. Puis, certains résultats de l'étude structurale qui n'ont pas été mentionnés dans l'article seront présentés. Pour finir, des commentaires post-publication seront apportés et permettront de reprendre la discussion présentée dans l'article.

A-Article 1

L'étude structurale de Rap2A dans un complexe non catalytique avec le GTP a fourni la seconde structure de Rap2A en complexe avec du GTP (voir figure 1b de l'article 1), la première a été résumé au paragraphe I-C (voir publication dans l'annexe A, (Cherfils, 1997)). La structure de la nouvelle forme cristalline de Rap2A-GTP a été résolue à une meilleure résolution que la première structure. Dans le texte, la distinction entre les deux structures sera faite en mentionnant leur forme cristalline, la première structure de Rap2A-GTP a cristallisé dans une forme hexagonale (Cherfils, 1997), la seconde (celle présentée ici) dans une forme monoclinique. De plus, l'unité asymétrique de la forme monoclinique contient deux molécules de Rap2A-GTP. Les résultats présentés ici ont été observés pour les deux molécules, dans le cas contraire la distinction sera faite. L'étude structurale de Rap2A dans un complexe non catalytique avec le GTP a permis de mettre en évidence que :

- La densité électronique du GTP et des résidus du site nucléotidique est bien définie (voir figure 1a de l'article 1), ce qui indique qu'il n'y a pas eu hydrolyse du GTP dans le cristal. Comme l'activité GTPasique de Rap2A est mesurable en solution ($0,005 \text{ min}^{-1}$) (Lerosey, 1991), la structure présente dans le cristal représente une conformation non catalytique de Rap2A.

- L'interaction de la tyrosine 32 avec le phosphate gamma du GTP, observée pour la forme hexagonale est aussi observée pour la forme monoclinique de Rap2A-GTP (voir figure 1c de l'article 1). Cette interaction a été observée dans de nouvelles structures de petites protéines G seules (voir figure 2a dans l'article 1) ou en complexe avec un effecteur, suggérant que ce soit une interaction générale aux petites protéines G, plutôt qu'une interaction particulière à Rap2A. Certaines petites protéines G ne possèdent pas cette tyrosine : dans le cas de Rab3A-GDPNHP deux interactions sont observées avec le phosphate gamma, l'une avec la Ser31 et l'autre avec la Ser53 (voir figure 2a dans l'article 1). Ces deux nouvelles interactions au niveau du site nucléotidique de Rab3A semblent jouer le même rôle que celle faite entre la tyrosine 32 et le phosphate gamma des autres petites protéines G. Les structures de petites protéines G en complexe avec leur GAP ont permis de mettre en évidence le fait que "l'arginine finger" des GAP détruit cette interaction pour accéder au nucléotide (voir figure 2b de l'article 1). Sa présence dans la structure de Rap2A dans un complexe non catalytique avec le GTP semble suggérer qu'elle n'est pas impliquée dans l'hydrolyse du GTP. Le rôle de cette interaction n'est pas encore clair et nécessiterait d'être étudié.
- Une transition désordre/ordre des Switch I et II au cours du cycle GDP/GTP de Rap2A a été décrite pour la forme hexagonale. Toutefois, d'importants contacts cristallins au niveau du Switch II de la forme hexagonale ne permettent pas de repousser l'influence de l'empilement cristallin. Les Switch II de la nouvelle forme cristalline (monoclinique) sont pas ou peu impliqués dans des contacts cristallins (voir figure 3 dans l'article 1). Les switch II de la forme monoclinique sont partiellement ordonnés : en effet au delà des résidus 60 et 61, la densité électronique est mal définie. Ces nouvelles observations suggèrent qu'au cours du cycle GDP/GTP, le Switch I de Rap2A est complètement stabilisé, alors que le Switch II n'est que partiellement stabilisé.
- L'état de la flexibilité des régions Switch I et II des structures de petite protéine G seule ou en complexe avec un partenaire a été reporté dans cet article (voir table II dans l'article 1). Ces informations ont permis de mettre en évidence que les

régions Switch des petites protéines G sont des régions plus ou moins flexibles d'une forme à l'autre de la protéine et d'une protéine à l'autre. L'état de désordre/ordre de ces régions est un moyen pour les partenaires de distinguer les différentes formes et les différentes petites protéines G.

Structure of the Small G Protein Rap2 in a Non-Catalytic Complex With GTP

J. Ménétrey and J. Cherfils*

Laboratoire d'Enzymologie et Biochimie Structurales, Centre National de la Recherche Scientifique, Gif sur Yvette, France

ABSTRACT We report a novel crystal form of the small G protein Rap2A in complex with GTP which has no GTPase activity in the crystal. The asymmetric unit contains two complexes which show that a conserved switch I residue, Tyr 32, contributes an extra hydrogen bond to the γ -phosphate of GTP as compared to related structures with GTP analogs. Since GTP is not hydrolyzed in the crystal, this interaction is unlikely to contribute to the intrinsic GTPase activity. The comparison of other G protein structures to the Rap2-GTP complex suggests that an equivalent interaction is likely to exist in their GTP form, whether unbound or bound to an effector. This interaction has to be released to allow the GAP-activated GTPase, and presumably the intrinsic GTPase activity as well. We also discuss the definition of the flexible regions and their hinges in the light of this structure and the expanding database of G protein structures. We propose that the switch I and switch II undergo either partial or complete disorder-to-order transitions according to their cellular status, thus defining a complex energy landscape comprising more than two conformational states. We observe in addition that the region connecting the switch I and switch II is flexible in Rap2 and other G proteins. This region may be important for protein-protein interactions and possibly behave as a conformational lever arm, as characterized for Arf. Taken together, these observations suggest that the structural mechanisms of small G proteins are significantly driven by entropy-based free energy changes. *Proteins* 1999;37:465–473. © 1999 Wiley-Liss, Inc.

Key words: G protein; structure; GTPase; flexibility; Ras; disorder; hinge residue

INTRODUCTION

Small G proteins of the Ras superfamily are classically described as proteins with two states, each interacting with different partners in the cell. These states depend on the nature of the bound nucleotide, GDP in the inactive form and GTP in the active form. Their alternance is regulated by guanine nucleotide exchange factors (GEF), GTPase activating proteins (GAP) and, for the Rho and Rab subfamilies, guanine nucleotide dissociation inhibitors (GDI). The two states were first described in conformational terms for the archetype member of the superfamily, p21Ras.^{1,2} The three-dimensional structures of representative members of other subfamilies as well as various

complexes of small G proteins with effectors and regulatory proteins have recently added tremendous knowledge to the two-state operational definition (reviewed in Geyer and Wittinghofer³). One of the most recent developments has been the disclosure of an extraordinary diversity beyond the Ras structural paradigm. It is now well established that small G proteins display variations in their unbound structures, in the nature of conformational changes between their GDP and GTP forms, in the fold and probably the mechanism of their GEFs and GAPs, and in the nature of the conformational changes and protein-protein interactions of their complexes with regulatory proteins and effectors. While individual three-dimensional structures have proved invaluable for understanding particular mechanisms, as a collection they are essential to understand the general principles that drive the structural features of small G proteins.

Studies on Ras illustrate how investigations on a particular G protein extended to other G proteins. Ras and its relatives from the Rap subfamily are involved in signal transduction cascades which yield to responses in cell growth or morphogenesis (reviewed in Bos⁴). Activation of Ras is induced by receptor tyrosine kinases through the Grb2/SOS pathway and by calcium and/or diacylglycerol through the Ras-GRF and Ras-GRP nucleotide exchange factors. In turn, Ras activates various effectors, including the Ser/Thr kinase Raf (reviewed in Marshall⁵). The Rap subfamily is closely related to Ras and comprises the Rap1A, Rap1B, Rap2A, and Rap2B isoforms. Rap1 was first studied as a Ras antagonist.^{6,7} In support to this potential function, Rap1 binds to the Ras effectors Raf and to RasGAP, but the interaction is non-productive. However, Rap1 can be activated independently of Ras, and its potential alternative function in cellular morphogenesis is now actively investigated.⁴ The cellular properties of Rap2 are markedly different from those of Ras and Rap1. Most notably, Rap2 is unable to revert the transformed phenotype of activated Ras in fibroblasts, unlike Rap1.⁸ Rap1 and Rap2 display several sequence differences with Ras and between each other in their nucleotide sensor (or switch) regions. In particular, the replacement of Gln 61 by Thr in both Rap1 and Rap2 lowers their intrinsic GTPase

Grant sponsor: Association pour la Recherche contre le Cancer; Grant sponsor: Zéneca Pharma.

*Correspondence to: Jacqueline Cherfils, Laboratoire d'Enzymologie et Biochimie Structurales, Centre National de la Recherche Scientifique, 91198 Gif sur Yvette, France. E-mail: cherfils@lebs.cnrs-gif.fr
Received 8 April 1999; Accepted 8 June 1999

relative to Ras and impairs their response to RasGAP.⁹ Rap2 is able to interact with several Ras and Rap1 partners in vitro, but effectors and GEFs that distinguish between Rap1 and Rap2 have also been identified.^{10–13} At present it is unclear whether the Rap2 isoform performs a function related to that of Rap1. The Ras and Rap proteins thus summarize many structural issues regarding small G proteins, for instance: what is the range of conformational changes and their associated free energies; are these conformations selected or induced by effectors and regulators; how are isoforms or closely related proteins within a subfamily distinguished by their cellular partners; what is the role, if any, of the intrinsic GTPase activity of unbound or effector-bound G proteins? We reported earlier the crystal structure of Rap2-GDP, Rap2-GTP γ S, and Rap2-GTP¹⁴ which showed that the GDP/GTP structural transition of Rap2 differs in amplitude and extent from that of Ras, despite their close relationship. In addition, we identified a novel interaction provided by a switch I residue with the γ -phosphate of GTP, which we proposed to exist in most small G proteins. Here we report a novel crystal form of Rap2 in complex with its substrate GTP which has no GTPase activity in the crystal. We address the question of the role of a general γ -phosphate interacting residue in the switch I for the GTPase mechanism, and discuss the extent and the role of disorder-to-order transitions as a general mechanism of small G protein regulation. These features are discussed in the light of the expanding database of small G protein structures.

MATERIAL AND METHODS

Crystallization And Data Collection

Truncated human Rap2A (residues 1–167) was purified as described¹⁴ and concentrated to 10 mg/ml. The protein, which was initially in the GDP form, partially converted to the GTP form after several months of storage at -80°C , possibly by trace contamination of an *Escherichia coli* enzyme capable of catalyzing the phosphorylation of GDP. Three non-isomorphous crystal forms were obtained by the hanging drop method under similar conditions containing 20–25% PEG 8000, Tris/HCl 100 mM pH 8 and 100 mM of either LiSO_4 or MgCl_2 . Two crystal forms were often observed in the same drops, but replacement of Rap2-GTP crystals by the Rap2-GDP form occurred with time. Hexagonal Rap2-GTP crystal and the new crystal form could also be obtained by exchanging GDP to GTP prior to crystallization. Crystals used in this experiment were obtained with GTP-loaded Rap2. The new crystal form was stable for several weeks, in contrast to the hexagonal Rap2-GTP form.¹⁴ Cryoprotection was achieved by adding a solution of 24% PEG 8000, 25% PEG 400, 100 mM Tris/HCl pH 8 in 5-fold excess to the drop before flash freezing. A single crystal (a thin rod of $350 \times 100 \times 30 \mu\text{m}^3$) was used for diffraction data collection on beam line D2AM at the ESRF synchrotron center (Grenoble, France) at a wavelength of 0.9798 Å using a CCD camera. The frames were converted to pseudo-MAR format by IMAC (written by M. Roth) and

TABLE I. Statistics for X-Ray Structure Determination

Space group	$P2_1$
Unit cell parameter	$a = 41.01\text{Å}$ $b = 59.83\text{Å}$ $c = 68.44\text{Å}$ $\beta = 97.07^{\circ}$
Measured reflections	144323
Unique reflections	16388
Completeness (%)	97.5
Resolution range (Å)	16–2.2
Molecular replacement with Rap2A-GDP	$R = 38.4\%$ $\text{Corr} = 58.2$
Molecular replacement with Rap2A-GTP	$R = 36.9\%$ $\text{Corr} = 61.4\%$
Rsym (%)	7.2
R-factor (%)	21.1
R-free (%)	26.2
R.m.s.d bond length (Å)	0.008
R.m.s.d bond angles ($^{\circ}$)	2.065
Average B factor (Å^2)	24.5
Number of water molecules	93

processed by DENZO and SCALEPACK.¹⁵ Statistics are given in Table I.

Molecular Replacement and Structure Refinement

Molecular replacement was performed with AMORE¹⁶ with two molecules in the asymmetric unit using either Rap2-GDP or hexagonal Rap2-GTP as an initial model. Equivalent solutions were obtained with either model, with slightly better statistics for Rap2-GTP (Table I). Electron density maps with either Rap2-GDP or Rap2-GTP were computed with omission of the nucleotide. Both showed a strong density connected to the β -phosphate of GDP, indicating that the bound nucleotide was GTP. Refinement was carried out with X-PLOR 3.851¹⁷ or X-PLOR 98 (MSI, Molecular Simulations) using the maximum likelihood target function and a model of bulk solvent, in alternance with graphical building using TURBO¹⁸ and the CCP4 suite¹⁹ for SIGMAA-weighted maps. The final structure has an R-factor of 21.1% (R-free 26.2% for 9% omitted reflections) and good stereochemistry (Table I). The overall structure contains two molecules of Rap2-GTP-Mg²⁺ and 93 water molecules. Coordinates have been deposited in the PDB with code 3RAP.

RESULTS AND DISCUSSION

Protein-GTP Interactions

The asymmetric unit contains two molecules, each with a GTP nucleotide bound at the active site (Fig. 1a, b). The electron density for GTP and GTP-interacting residues is well defined, indicating that no hydrolysis has occurred in the crystal (Fig. 1a). Since Rap2 has a measurable GTPase activity in solution (rate constant of 0.005 min^{-1}),²⁰ the present Rap2-GTP structure represents a non-catalytic conformation of the protein which is trapped in the crystal. We analyze below the interactions of the Rap2 protein with GTP in order to understand why the GTPase activity is compromised in the complex.

The classical interactions of G protein/GTP complexes are observed for both Rap2-GTP complexes in the asymmet-

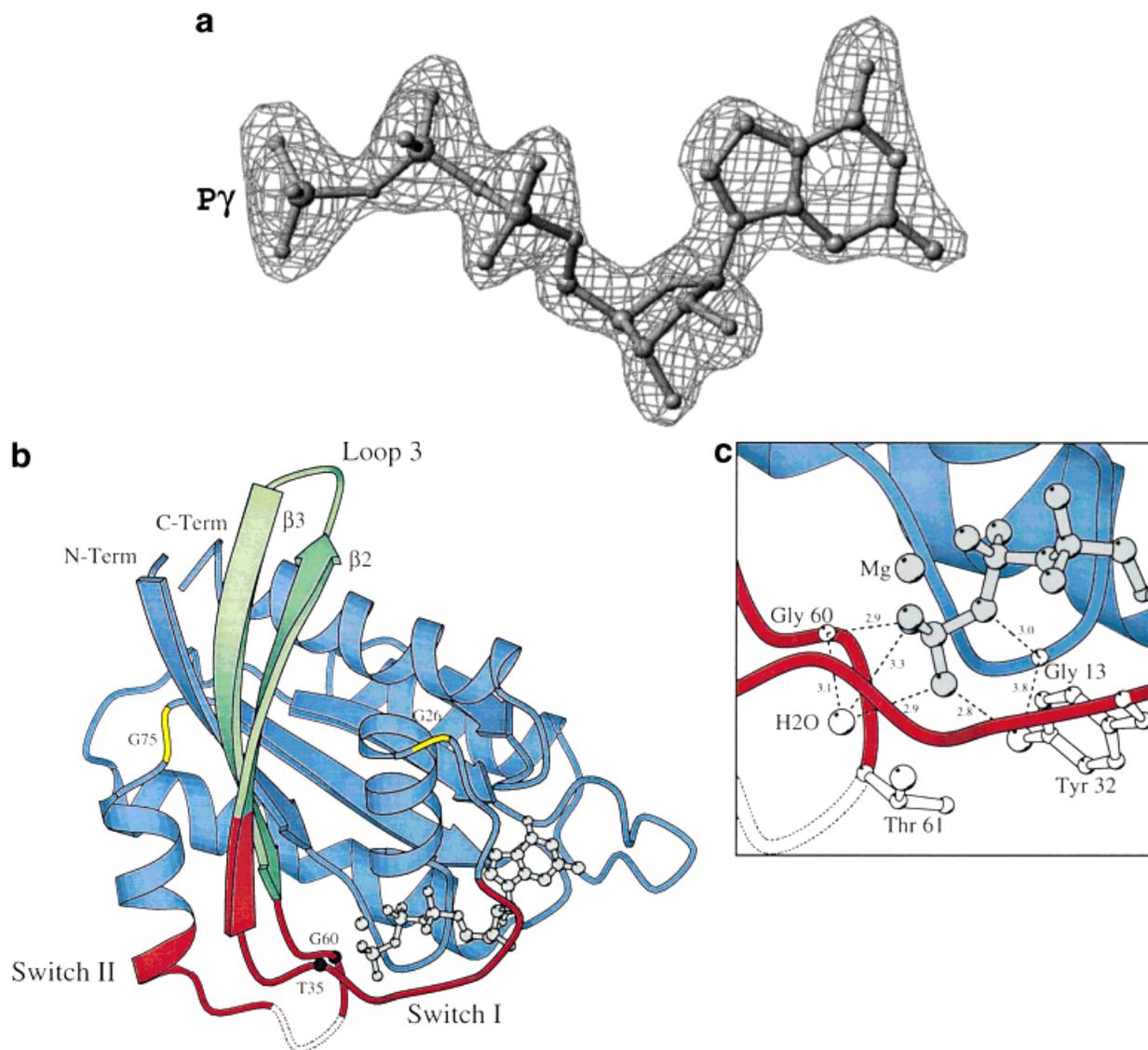


Fig. 1. The Rap2-GTP complex. **a**) $|F_o| - |F_c|$ electron density map of GTP with the nucleotide omitted from the computation, contoured at 3σ . **b**) Overall view of one subunit. Regions described in the text are highlighted in color. The ill-defined region is in dotted lines. **c**) Close-up view of the GTP binding site. Orientations in **b**) and **c**) are the same.

ric unit, including the interaction of the γ -phosphate with Thr 35 in the switch I and Gly 60 in the switch II. Both molecules display a hydrogen bond between the γ -phosphate of GTP and the hydroxyl of Tyr 32 in the switch I (Fig. 1c). Tyr 32 interacts also with the amide NH of Gly 13, which in turn interacts with the oxygen that bridges the β - and γ -phosphates of GTP. Tyr 32 is conserved in many G proteins, but its interaction with the γ -phosphate of GTP analogs is not always present in crystal structures. This interaction is present in both monoclinic and hexagonal Rap2-GTP crystal forms, but not in isomorphous hexagonal crystals of Rap2-GTP γ S.¹⁴ This clearly demonstrates that it is not an artifact of crystal packing, and suggests that nucleotide analogs may disfavor this interaction in other G protein structures.

The switch II of Rap proteins has a Thr at position 61, where most G proteins have a Gln residue which activates the attacking nucleophilic water molecule and/or stabilizes the transition state of the GTPase reaction.^{21,22} This substitution is responsible for the 10-fold reduction of the intrinsic GTPase activity of Rap1 as compared to the related Ras proteins.⁹ In our non-catalytic complex, the position of Thr 61, but not the precise conformation of its side chain, is defined in the electron density. The residue points towards the side chain of Tyr 32 and is close to the nucleophilic water molecule (Fig. 1c). In contrast to Rap2-GTP in the hexagonal crystal, this water molecule is well defined, presumably because of the higher resolution of the present structure. It interacts with the same γ -phosphate oxygen as Tyr 32, suggesting that Tyr 32 may somehow

influence its activation (see below). The conformation of Thr 61 in Rap2 is reminiscent of Gln 61 in other G protein active forms, such as Rac-GDPNP where Gln 61 interacts with the nucleophilic water molecule.²³ It also resembles Thr 61 in the complex of a Rap1 mutant with the Ras binding domain of Raf.²⁴ However, the weak electron density of the Thr 61 side chain suggests that this residue is not involved in a strong interaction with the attacking water molecule nor with Tyr 32. Importantly, it has only a loose interaction with the γ -phosphate of GTP, unlike Gln 61 in the complexes of Ras and Rho with their respective GAPs.^{25–27} In order to fulfill an equivalent role during catalysis, Thr 61 should thus undergo, at least, a moderate conformational change.

On the Role of a Third γ -Phosphate-Interacting Residue in Small G Proteins

Recent crystal structures of small G proteins with GTP or GTP analogs provide growing evidence that these proteins have three, rather than two residues interacting with the γ -phosphate of GTP. Besides Rap2, the interaction between the γ -phosphate of GTP and the conserved tyrosine in switch I has been observed in RhoA^{Val14}-GTP γ S²⁸ (Fig. 2a), in the Ran-GDPNP-RanBD2 complex²⁹ and between Tyr 32 and AlF₃ in the complex of Cdc42-GDP-AlF₃ with a Cdc42GAP mutant devoid of the arginine finger.²⁷ It is also reported in the Rap1-GDPNP/RafRBD complex²⁴ although not in a similar complex with a Rap1 mutant,³⁰ (PDB entry 1GUA). It is not observed in cryofrozen, photoactivated Ras-GTP, presumably because Tyr 32 forms an equivalent interaction with a neighboring GTP molecule in the crystal.³¹ ³¹P NMR experiments on Ras suggest that Tyr 32 interacts with the GTP nucleotide in solution.³² These observations confirm our earlier prediction that this interaction is likely to be general rather than represent a peculiarity of Rap2.³² Consequently, the arginine fingers of Ras- and Rho-GAPs compete with this tyrosine for interacting with the γ -phosphate and have to push this residue away to establish the GAP/GTP interaction^{25–27} (Fig. 2b). A restriction to the generalization of the presence of a third γ -phosphate interacting residue in small G proteins was previously the observation that Rab proteins do not have a conserved tyrosine equivalent to Tyr 32. The Rab3-GTP³³ and Rab3-GTP/Rabphilin³⁴ structures solve this issue by demonstrating that Rab proteins have two additional serines in interaction with the γ -phosphate, one is switch I and the other in the P-loop (Fig. 2a). Thus G proteins turn out to have a third residue in addition to the invariant Thr (switch I) and Gly (switch II) to recognize the γ -phosphate of the GTP nucleotide. Arf is an exception, as it has no residue with an hydroxyl group close to the conserved Thr; interestingly, its switch I is shortened by one residue as compared to other G proteins.

Yet, little is known about the actual role of this interaction. We rule out, since no hydrolysis occurs in our crystals, that Tyr 32 may have a role in catalysis. One possibility is that it will serve to drive and/or stabilize the conformation of the switch I in the GTP form.³ We argue that the invariant Thr is sufficient to drive the organization of the

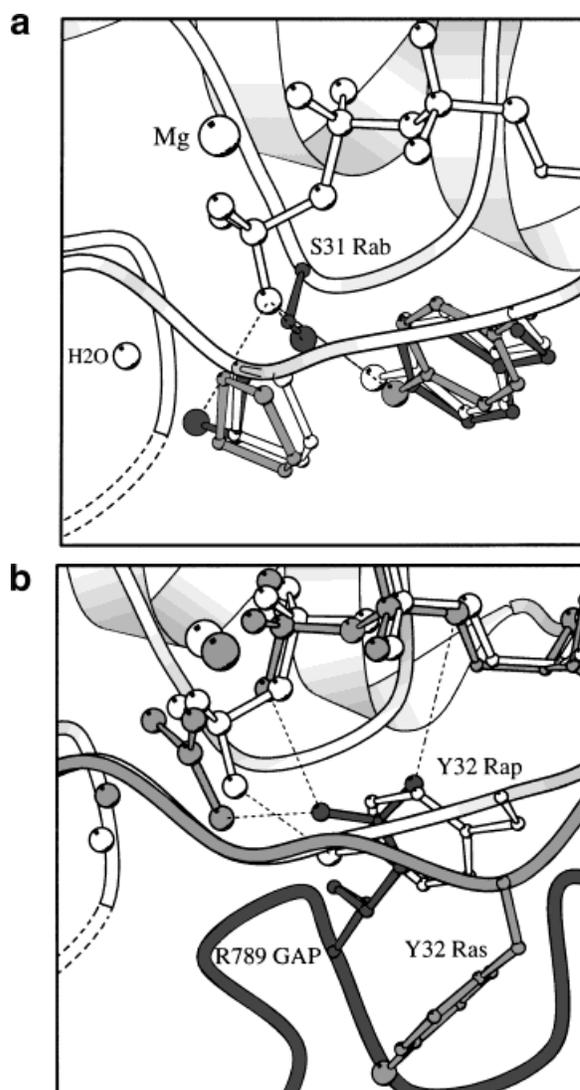


Fig. 2. Interaction of Tyr 32 with the γ -phosphate of GTP in the Rap2-GTP complex (in white) compared to other G proteins alone or in complex with GAPs. The orientation is the same as in Figure 1. **a**) Comparison of Rap2-GTP with RhoA^{Val14}/GTP γ S (Pro 31 and Tyr 34 in light grey, PDB entry 1A2B) and Rab3A^{Leu81}/GTP/Rabphilin3A (Ser 31 in the P-loop, Ser 53, and Phe 56 in switch I, dark grey). In Rab3, the tyrosine is replaced by Phe 51 and two serines interact with the γ -phosphate of GTP. Ser 53 is equivalent in sequence to Pro 34 in Rap2. For clarity, only one main-chain trace is shown. **b**) Comparison of Rap2-GTP with the arginine finger of RasGAP (dark grey) and Tyr 32 of Ras (light grey) in the Ras/RasGAP/GDP/AlF₃ complex.

switch I, on the basis that in several structures that do not display this interaction, the switch I still adopts a conformation similar to that of Rap2 or RhoA^{Val14}.^{2,23} An alternative explanation could be that this interaction is tailored to time the basic GTPase activity by giving rise to a GTPase-incompetent configuration at the GTP binding site. We proposed earlier that the hydroxyl of Tyr 32 may divert the NH of Gly 13 from stabilizing the β — γ bridging oxygen,¹⁴ a role that may be fulfilled by Ser 31 in the P-loop of Rab3 as well.^{33,34} The GTPase activity of Rab3 is indeed increased

by mutagenesis of Ser 31 to Gly, which could also be attributed to steric hindrance for the catalytic Gln in switch II.³³ Another possibility, however, is that the nucleophilic properties of the catalytic water molecule and/or its ability to align with the phosphorus are affected by Tyr 32 or any equivalent residue, as both form a hydrogen bond with the same γ -phosphate oxygen (Figs. 1c, 2a). Since a similar conformation of Tyr 32 is observed in the Rap1-GDPNP/RafRBD complex, the GTPase activity may be compromised in this complex as well.²⁴

These observations address again the long-standing issue of whether the intrinsic GTPase activity of small G proteins acts as an actual timer to the “on” signal, or is an artifactual consequence of GTP binding to an incomplete GTPase site. In the first hypothesis, activated G proteins would be turned off by either their basic GTPase or their GAPs; in the second, solely by their GAPs. Elongation factors were first proposed to function as timers, with their GTPase activity “proof-reading” the binding of the cognate tRNA by comparing of the time-scale for GTP hydrolysis to that of tRNA binding.³⁵ The proof-reading principle is clearly not of general application to G protein functions, but it could be generalized into a principle of molecular timer. There seems, indeed, to exist a correlation between the cellular function of G proteins and the lifetime of their GTP-bound form. For instance, stimulation of Ras by endothelin yields two activation phases with different durations,³⁶ one of which coincides with the half life of GTP.³⁷ Proteins of the Rho family have a low but measurable GTPase activity, but interestingly, the Rnd subfamily has no GTPase, suggesting that an eventual role for a basic GTPase is suppressed in Rnd.³⁸ Recently, Rab proteins have also been proposed to perform a proof-reading function at the tethering stage of vesicle traffic.³⁹ It would therefore be of great interest to design mutants from which this issue could be tested in vivo. The Ras protein, whose structures are now described alone and in complex with exchange factor, GAP and effector would be, once again, particularly well-suited for such an investigation.

Disorder-to-Order Transitions in the Switch II of Rap2

The guanine nucleotide binding site of G proteins is built up from a combination of highly conserved regions including the phosphate binding P-loop, and regions of variable sequence called the switch I and switch II regions. Whereas the conserved regions have the same conformation in the GDP and GTP forms, the switch regions have been shown to undergo structural changes upon GTP binding.^{1,2,14,28,40–43} The switch regions bind weakly or not at all to the GDP nucleotide, and are therefore unlikely to contribute to the high affinity of G proteins for the GDP nucleotide. In contrast, both the switch I and switch II interact with GTP or GTP analogs, in particular at the γ -phosphate. We discussed previously how the GDP/GTP transition of the switch I and II in Rap2 is essentially a disorder-to-order

transition.¹⁴ In particular, the switch II of Rap2-GTP in the hexagonal crystal form was found to have a well-defined electron density, although its B-factors were higher than on average in the protein. Yet we could not rule out the influence of crystal contacts on the sole basis of a single molecule. Here we find that the stabilization of the switch II is indeed incomplete and limited to the invariant Gly 60 and to a lesser extent to Thr 61 (Fig. 3). In one molecule of the asymmetric unit, the chain trace is broken after Thr 61 and residues 62–63 are poorly defined, but the switch II is ordered beyond Phe 64 which forms aromatic/aromatic crystal contacts. In the second molecule, the switch II is disordered for residues 62–66 and has clear density after Met 67 which is buried in a hydrophobic interaction with a neighbor molecule. Thus, in the absence of crystal contacts, the switch II is disordered beyond the invariant Gly 60 and Thr 61. The moderate stabilization of the switch II by GTP or GTP analogs was reported before in other G proteins NMR and X-ray structures (Table II). This suggests that GTP alone is not sufficient to stabilize the conformation of the switch II, although in general it stabilizes the conformation of the switch I. However, the Gly 60/GTP interaction is sufficient to configure the distal region of the switch II, comprising helix 2, into a consensus structure.^{14,44}

Structural Properties of the Switch I/Switch II Connecting Region

The L3 loop (residues 45–55), opposite to the nucleotide binding site, connects the two β -strands that follow switch I and precede switch II (Fig. 1a). In addition to the switch regions, this loop is flexible in both the GDP and hexagonal GTP forms of Rap2.¹⁴ In the present structure, it is disordered in one molecule but becomes ordered in the other one upon crystal contacts. This region was reported to be flexible for most G proteins structures solved so far, which may account for its different conformation between the GDP and GTP forms of Ras and of Rho. Interestingly, the recent crystal structures of the Rab3-GTP/Rabphilin³⁴ and Ran-GDPNP/RanBD2²⁹ complexes revealed that this region is involved in effector recognition. In addition, it behaves as a third structural switch in the crystal structure of the G protein Arf, coupling the N-terminus helix to the nucleotide site.⁴³ These properties suggest that the β 2-L3- β 3 region may be a target for protein-protein interactions for other G proteins, and possibly serve a nucleotide-dependent switch-like role mediated by its structural flexibility. Several reports on Ras and Rho support this hypothesis. In Ras, extensive mutagenesis of the L3 loop showed that several mutations impair interactions with effectors, which suggested that it functions as a “constitutive effector” region for an as yet unknown partner.⁴⁵ Such an effect was also described for the Rho subfamily, where the L3 loop is involved in the differential activation of phospholipase D by RhoA and not Cdc42.⁴⁶ In addition, Gln 41 in the β 2-strand is the target of the C3 toxin only when Rho is in the GDP form (reviewed in Aktories⁴⁷).

The β 2-L3- β 3 region, in addition to connecting the two switches, is also flanked by the N- and C-terminus (Fig. 1a).

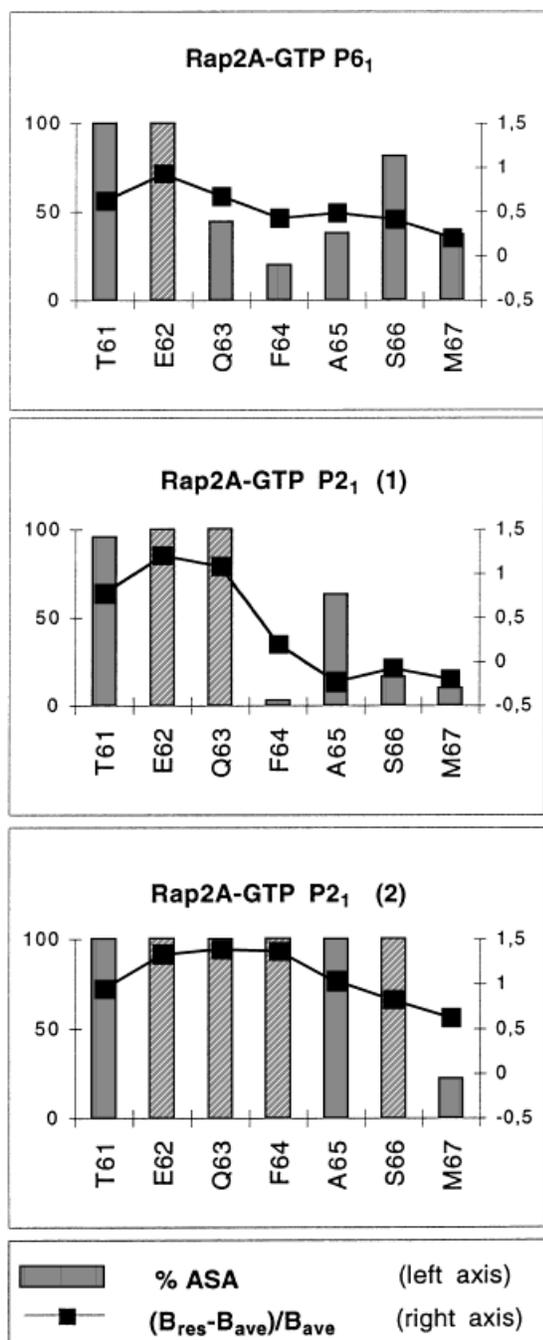


Fig. 3. The flexibility of switch II correlates with its solvent accessibility in the crystal. The flexibility is expressed as $(B_{residue} - B_{average})/B_{average}$; the accessibility is the ratio of the accessible surface area in the crystal to this area in the absence of crystal contacts. Hatched bars indicate disordered residues.

Monomeric and heterotrimeric G proteins bear membrane-interacting acyl groups on either their N-terminus (a myristate in Arf and $G\alpha$) or their C-terminus (an isoprene in other small G proteins). Thus the L3 loop is on the side of G proteins that probably faces the membrane, a location favorable for relaying information from the membrane to

TABLE II. Structural Plasticity at the Switch I and Switch II in Small G Proteins Structures[†]

Protein	Switch I	Switch II	Buried surface area (Å ²)	PDB
Ras.GDP	+	-		4Q21
Ras.GDPNP	++	+		5P21
Ras.GDP.AIF ₃ -RasGAP	+	++	3145	1WQ1
Ras-SOS	-	++	3600	1BKD*
Ras.GDPNP-RalGDS	++	++	1150	1LFD°
Rap2A.GDP	+	-		1KAO
Rap2A.GTP	++	+		3RAP
Rap1A.GDPNP-RafRBD	++	++	1175	1GUA
Arf.GDP	++	-		1RRG
Arf.GDPNP	++	++		*
Arf-Gea2	-	++	2680	*
RhoA.GDP	++	-		1FTN
RhoA.GTP γ S	++	++		1A2B
RhoA.GDP.AIF ₄ ⁻ -RhoGAP	-	++	2280	1TX4
CDC42.GDP.AIF ₄ ⁻ -CDC42GAP	++	++	2259	1GRN
CDC42.GDPNP-RhoGAP	-	++	1807	1AM4
Rac.GDPNP	-	++		1MH1
Ran.GDP	++	+		1BYU
Ran.GDP-NTF2	++	++	1640	1A2K
Ran.GTP-RanBD1	++	+	5640	1RRP
Rab3.GTP	++	+		3RAB
Rab3.GTP-Rabphilin	+	+	2800	1ZBD

[†]The stabilization increases from - (disordered, as the switch II in Rap2-GDP), + (partially ordered as the switch I in Rap2-GDP), ++ (fully ordered, as the switch II in Ras-SOS). The degree of stabilization is approximated by comparing the B factors in the switch regions I and II relative to the average B factors for each structure and/or by residues missing in the electron density and/or by the corresponding publications. The definition of the switch regions corresponds to the largest conformational changes (for instance in the presence of GEFs) rather than the difference between the GDP and GTP states. °: Entries not yet accessible in the PDB. *: Coordinates are a gift from their authors.

the site of the nucleotide. We surmise that the L3 loop could play such a role in two cases. One is the case of Rab and Rho proteins, which bind GDIs through their isoprenylated C-terminus. The interaction results in the inhibition of GDP release on the other side of the protein. This effect may reasonably be attributed to an interaction of GDI with the β 2-L3- β 3 region, which in turn may stabilize the binding of the GDP nucleotide. The second case is the activation of heterotrimeric G proteins by membrane receptors. The β 2-L3- β 3 region of $G\alpha$ is close to its C-terminus, which interacts with the receptor, and to its N-terminal helix, which interacts with the membrane and with $G\beta$. Bourne and co-workers hypothesized recently that the β -subunits may serve as a relay for the GEF signal induced by the activated receptor.⁴⁸ We suggest that the β 2-L3- β 3 region of $G\alpha$ may act in concert by sensing the signal through the N- and/or C-terminus and relaying

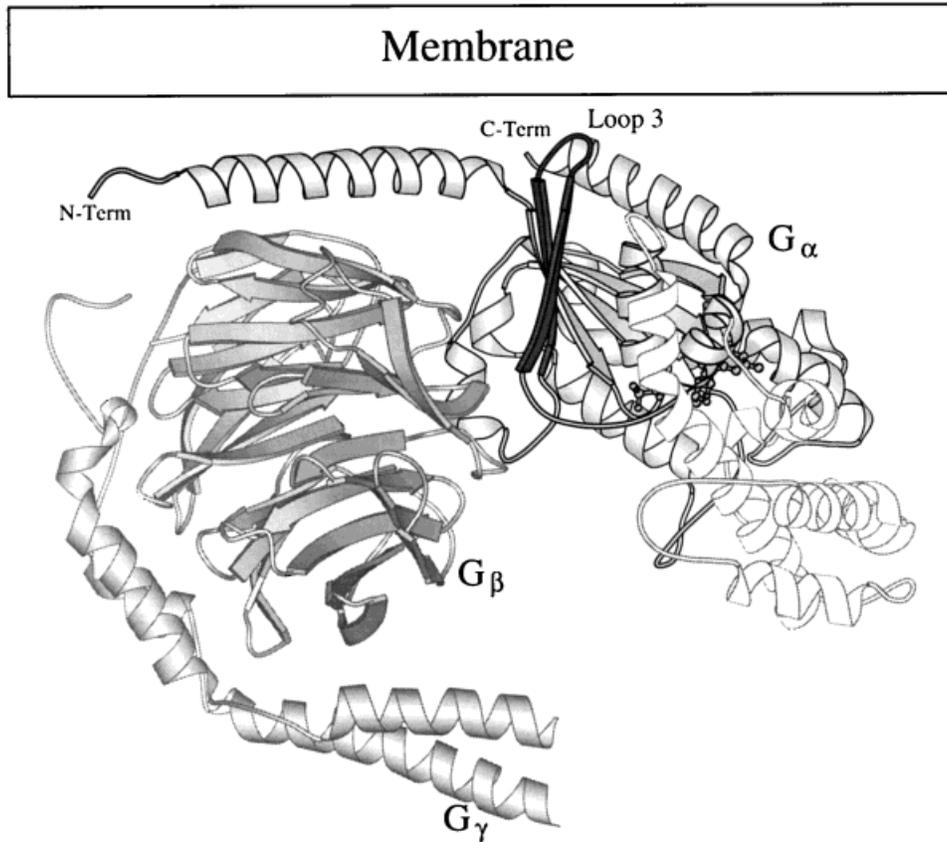


Fig. 4. The $\beta 2$ -Loop3- $\beta 3$ region in heterotrimeric G proteins. Structure of the G protein heterotrimer $G_{\alpha 1}\beta_1\gamma_2$ ⁵⁵ highlighting the G domain of G_{α} (dark lines) and the $\beta 2$ -Loop3- $\beta 3$ region (dark grey). The $\beta 2$ -Loop3- $\beta 3$ region is close to the receptor-interacting C-terminus and membrane-

interacting N-terminus of G_{α} . The orientation of the G domain of G_{α} is as Rap2 in Figure 1b. The probable location of the membrane and receptor is at the top of the figure.

it to the nucleotide site (Fig. 4), a situation that may have similarities to the structural activation of Arf.⁴³ In both cases, the involvement of the L3 loop can be tested by mutagenesis experiments.

Structural Flexibility and the Free Energy of Activating Small G Proteins

The set of Rap2 structures (Cherfils et al.¹⁴; this work) shows that two disorder-to-order-transitions occur upon GTP binding: the switch I is fully stabilized while the switch II is only partially stabilized at the invariant glycine and at the distal helix 2 region. We know from the expanding database of G proteins structures, either alone or in complex with effectors or regulatory proteins, that the switch I and switch II can undergo further disorder/order transitions in both directions (Table II). In particular, the switch I can be further disorganized and the switch II further stabilized by GAPs or exchange factors.^{25,26,43,49} In addition, different partners can stabilize different switch II conformations, as in the Ras-GAP and Ras-SOS complexes.^{25,49} This extends the basic concept that G proteins have only two conformations: they rather have a complex free energy landscape, driven in part by the entropic components of the order/disorder transitions. This situa-

tion is not unprecedented in nucleotide binding regulatory proteins. For instance, it is well-documented for the activation of the cell-cycle kinase cdk2 which is incrementally stabilized by binding the cyclin, then by phosphorylation of the T-loop while full stabilization is probably achieved only in the presence of the protein substrate.⁵⁰

Why do disorder-to-order transitions, which are entropically disfavored, occur as a general mechanism in regulatory proteins? The stabilization of a flexible structure is probably energetically better suited for multiple recognition modes, as observed for instance for Ras, than actual conformational changes. Not surprisingly, protein-protein interfaces of G proteins with GAPs, exchange factors and effectors are often unusually large (Table II; Lo Conte et al.⁵¹), thereby contributing a large enthalpic gain that compensates for the loss in entropy. Important residues in the process of disorder-to-order transitions are the hinge residues, which are found typically at the extremities of the switch regions and are often glycine residues. Small energetic differences at these hinge residues between closely related G proteins may be used by effectors and regulatory proteins to distinguish between them. This applies in particular to the Rap and Ras subfamilies. Rap and Ras proteins are closely related in both their switch I

and switch II regions, yet exchange factors have now been identified that are unequally active on the Rap isoforms and/or distinguish between the Ras and Rap families.^{10,12,13} Among other differences, Rap proteins have a glycine (Gly 26) at the beginning of switch I (Fig. 1b) whereas Ras has an asparagine. Hinge motions of the switch I will in principle be facilitated with Gly as compared to other residues, which may contribute (in addition to other residues, van den Berghe and Cool⁵²) to the discrimination of Ras subfamily members by specific exchange factors. Indeed, the mutation of Asn 26 to Gly in Ras affects signal transduction.⁵³ Ras has another glycine at the end of switch II (Gly 82 in yeast Ras2), which is critical for its activation by exchange factors⁵⁴ but does not contact cdc25-SOS in the Ras-SOS complex.⁴⁹ These substitutions may yield subtle adjustment of the free energy barriers between the sub-states, either by restraining the flexibility of the switch I or switch II or by introducing a strain at the non-glycine hinge. Substitution of hinge glycine by other residues, as well as replacement of other key switch residues by prolines, occur in one or several isoforms within each subfamily, for instance Gly/Asn at the end of switch II in Arf isoforms or Glu/Pro at the beginning of switch II in Rho/Rnd. Such substitutions should prove a valuable strategy in the laboratory to design G proteins with altered entropic properties.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Isabelle Auzat for protein purification, Michel Roth for help at the D2AM beam line (ESRF), Gérard Le Bras for expert assistance, Birgitta Olofsson and Joël Janin for discussions. Coordinates for Ras/SOS, Arf/Gea2, and Rab3/Rabphilin were kindly provided by their authors.

REFERENCES

- de Vos AM, Tong L, Milburn MV, et al. Three-dimensional structure of an oncogene protein: catalytic domain of human c-H-ras p21. *Science* 1988;239:888–893.
- Pai EF, Kabsch W, Krengel U, Holmes KC, John J, Wittinghofer A. Structure of the guanine-nucleotide-binding domain of the Ha-ras oncogene product p21 in the triphosphate conformation. *Nature* 1989;341:209–214.
- Geyer M, Wittinghofer A. GEFs, GAPs, GDIs and effectors: taking a closer (3D) look at the regulation of Ras-related GTP-binding proteins. *Curr Opin Struct Biol* 1997;7:786–792.
- Bos JL. All in the family? New insights and questions regarding interconnectivity of Ras, Rap1 and Ral. *Embo J* 1998;17:6776–6782.
- Marshall CJ. Ras effectors. *Curr Opin Cell Biol* 1996;8:197–204.
- Pizon V, Chardin P, Lerosey I, Olofsson B, Tavitian A. Human cDNAs rap1 and rap2 homologous to the Drosophila gene Dras3 encode proteins closely related to ras in the “effector” region. *Oncogene* 1988;3:201–204.
- Kitayama H, Sugimoto Y, Matsuzaki T, Ikawa Y, Noda M. A ras-related gene with transformation suppressor activity. *Cell* 1989;56:77–84.
- Jimenez B, Pizon V, Lerosey I, Beranger F, Tavitian A, de Gunzburg J. Effects of the ras-related rap2 protein on cellular proliferation. *Int J Cancer* 1991;49:471–479.
- Frech M, John J, Pizon V, et al. Inhibition of GTPase activating protein stimulation of Ras-p21 GTPase by the Krev-1 gene product. *Science* 1990;249:169–171.
- van den Berghe N, Cool RH, Horn G, Wittinghofer A. Biochemical characterization of C3G: an exchange factor that discriminates between Rap1 and Rap2 and is not inhibited by Rap1A(S17N). *Oncogene* 1997;15:845–850.
- Janoueix-Lerosey I, Pasheva E, de Tand MF, Tavitian A, de Gunzburg J. Identification of a specific effector of the small GTP-binding protein Rap2. *Eur J Biochem* 1998;252:290–298.
- de Rooij J, Zwartkruis FJ, Verheijen MH, et al. Epac is a Rap1 guanine-nucleotide-exchange factor directly activated by cyclic AMP. *Nature* 1998;396:474–477.
- Kawasaki H, Springett GM, Mochizuki N, et al. A family of cAMP-binding proteins that directly activate Rap1. *Science* 1998;282:2275–2279.
- Cherfils J, Ménétrey J, Le Bras G, Janoueix-Lerosey I, de Gunzburg J, Garel JR, Auzat I. Crystal structures of the small G protein Rap2A in complex with its substrate GTP, with GDP and with GTPgammaS. *Embo J* 1997;16:5582–5591.
- Otwiński Z. Oscillation data reduction program. In: Sawyer L, Isaacs N, Bailey S, editors. CCP4 study weekend: data collection and processing. Warrington, UK: Daresbury Laboratory; 1993. p 56–62.
- Navaza J. AMoRe: an automated package for molecular replacement. *Acta Crystallogr A* 1994;50:157–163.
- Brünger AT, Karplus M, Petsko GA. Crystallographic refinement by simulated annealing: application to crambin. *Acta Crystallogr A* 1989;45:50–61.
- Roussel A, Inisan AG, Cambillaud C. TURBO. AFMB and Bio-Graphics, Marseille, France.
- The CCP4 suite: program for protein crystallography. *Acta Crystallogr D* 1994;50:760–763.
- Lerosey I, Chardin P, de Gunzburg J, Tavitian A. The product of the rap2 gene, member of the ras superfamily. Biochemical characterization and site-directed mutagenesis. *J Biol Chem* 1991;266:4315–4321.
- Hilgenfeld R. How do the GTPases really work? *Nat Struct Biol* 1995;2:3–6.
- Maegley KA, Admiraal SJ, Herschlag D. Ras-catalyzed hydrolysis of GTP: a new perspective from model studies. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:8160–8166.
- Hirshberg M, Stockley RW, Dodson G, Webb MR. The crystal structure of human rac1, a member of the rho-family complexed with a GTP analogue. *Nat Struct Biol* 1997;4:147–152.
- Nassar N, Horn G, Herrmann C, Scherer A, McCormick F, Wittinghofer A. 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* 1995;375:554–560.
- Scheffzek K, Ahmadian MR, Kabsch W, et al. The Ras-RasGAP complex: structural basis for GTPase activation and its loss in oncogenic Ras mutants. *Science* 1997;277:333–338.
- Rittinger K, Walker PA, Eccleston JF, Smerdon SJ, Gamblin SJ. Structure at 1.65 Å of RhoA and its GTPase-activating protein in complex with a transition-state analogue. *Nature* 1997;389:758–762.
- Nassar N, Hoffman GR, Manor D, Clardy JC, Cerione RA. Structures of Cdc42 bound to the active and catalytically compromised forms of Cdc42GAP. *Nat Struct Biol* 1998;5:1047–1052.
- Ihara K, Muraguchi S, Kato M, et al. Crystal structure of human RhoA in a dominantly active form complexed with a GTP analogue. *J Biol Chem* 1998;273:9656–9666.
- Vetter IR, Nowak C, Nishimoto T, Kuhlmann J, Wittinghofer A. Structure of a Ran-binding domain complexed with Ran bound to a GTP analogue: implications for nuclear transport. *Nature* 1999;398:39–46.
- Nassar N, Horn G, Herrmann C, Block C, Janknecht R, Wittinghofer A. Ras/Rap effector specificity determined by charge reversal. *Nat Struct Biol* 1996;3:723–729.
- Scheidig AJ, Burmester C, Goody RS. Use of caged nucleotides to characterize unstable intermediates by X-ray crystallography. *Methods Enzymol* 1998;291:251–264.
- Geyer M, Schweins T, Herrmann C, Prisner T, Wittinghofer A, Kalbitzer HR. Conformational transitions in p21ras and in its complexes with the effector protein Raf-RBD and the GTPase activating protein GAP. *Biochemistry* 1996;35:10308–10320.
- Dumas JJ, Zhu Z, Connolly JL, Lambright DG. Structural basis of activation and GTP hydrolysis in rab proteins. *Structure* 1999;7:413–423.
- Ostermeier C, Brunger AT. Structural basis of Rab effector specificity: crystal structure of the small G protein Rab3A com-

- plexed with the effector domain of rabphilin-3A. *Cell* 1999;96:363–374.
35. Ninio J. Kinetic amplification of enzyme discrimination. *Biochimie* 1975;57:587–595.
 36. Foschi M, Chari S, Dunn MJ, Sorokin A. Biphasic activation of p21ras by endothelin-1 sequentially activates the ERK cascade and phosphatidylinositol 3-kinase. *Embo J* 1997;16:6439–6451.
 37. John J, Frech M., Wittinghofer, A. Biochemical properties of Ha-ras encoded p21 mutants and mechanism of the autophosphorylation reaction. *J Biol Chem* 1988;263:11792–11799.
 38. Foster R, Hu KQ, Lu Y, Nolan KM, Thissen J, Settleman J. Identification of a novel human Rho protein with unusual properties: GTPase deficiency and in vivo farnesylation. *Mol Cell Biol* 1996;16:2689–2699.
 39. Ungermann C, Sato K, Wickner W. Defining the functions of trans-SNARE pairs. *Nature* 1998;396:543–548.
 40. Amor JC, Harrison DH, Kahn RA, Ringe D. Structure of the human ADP-ribosylation factor 1 complexed with GDP. *Nature* 1994;372:704–708.
 41. Greasley SE, Jhoti H, Teahan C, et al. The structure of rat ADP-ribosylation factor-1 (ARF-1) complexed to GDP determined from two different crystal forms. *Nat Struct Biol* 1995;2:797–806.
 42. Wei Y, Zhang Y, Derewenda U, et al. Crystal structure of RhoA-GDP and its functional implications. *Nat Struct Biol* 1997;4:699–703.
 43. Goldberg J. Structural basis for activation of ARF GTPase: mechanisms of guanine nucleotide exchange and GTP-myristoyl switching. *Cell* 1998;95:237–248.
 44. Berghuis AM, Lee E, Raw AS, Gilman AG, Sprang SR. Structure of the GDP-Pi complex of Gly203→Ala α 1: a mimic of the ternary product complex of α -catalyzed GTP hydrolysis. *Structure* 1996;4:1277–1290.
 45. Fujita-Yoshigaki J, Shirouzu M, Ito Y, et al. A constitutive effector region on the C-terminal side of switch I of the Ras protein. *J Biol Chem* 1995;270:4661–4667.
 46. Bae CD, Min DS, Fleming IN, Exton JH. Determination of interaction sites on the small G protein RhoA for phospholipase D. *J Biol Chem* 1998;273:11596–11604.
 47. Aktories K. Rho proteins: targets for bacterial toxins. *Trends Microbiol* 1997;5:282–288.
 48. Iiri T, Farfel Z, Bourne HR. G-protein diseases furnish a model for the turn-on switch. *Nature* 1998;394:35–38.
 49. Boriack-Sjodin PA, Margarit SM, Bar-Sagi D, Kuriyan J. The structural basis of the activation of Ras by Sos. *Nature* 1998;394:337–343.
 50. Johnson LN, Lowe ED, Noble ME, Owen DJ. The structural basis for substrate recognition and control by protein kinases. *FEBS Lett* 1998;430:1–11.
 51. Lo Conte L, Chothia C, Janin J. The atomic structure of protein-protein recognition sites. *J Mol Biol* 1999;285:2177–2198.
 52. van den Berghe N, Cool HR, Wittinghofer A. Discriminatory residues in Ras and Rap for guanine Nucleotide Exchange Factor recognition. *Biochemistry* 1999;274:11078–11085.
 53. Shirouzu M, Fujita-Yoshigaki J, Ito Y, Koide H, Nishimura S, Yokoyama S. A glutamic acid residue at position 31 of Ras protein is essential to the signal transduction for neurite outgrowth of PC12 cells and the stimulation of GTPase activity by GAPRas. *Oncogene* 1992;7:475–480.
 54. Kavounis C, Verrotti AC, De Vendittis E, et al. Role of glycine-82 as a pivot point during the transition from the inactive to the active form of the yeast Ras2 protein. *FEBS Lett* 1991;281:235–239.
 55. Wall MA, Coleman DE, Lee E, Iniguez-Lluhi JA, Posner BA, Gilman AG, Sprang SR. The structure of the G protein heterotrimer Gi α 1 β 1 γ 2. *Cell* 1995;83:1047–1058.

B-Données expérimentales

Nous avons résolu la structure de Rap2A dans un complexe non-catalytique avec le GTP, par remplacement moléculaire en utilisant comme modèle Rap2A-GTP (forme hexagonale), à une résolution de 2,2 Å (Cherfils, 1997).

La protéine Rap2A humaine de type sauvage et tronquée de sa région C-Terminale (168-183) a été exprimée dans *E. Coli*, et purifiée (voir détails dans (Cherfils, 1997) en annexe A) par nos collaborateurs Isabelle Auzat et Jean-Renaud Garel du Laboratoire d'Enzymologie et de Biochimie Structurale du CNRS à Gif-sur-Yvette.

1-Collecte et traitements des données

Obtention des cristaux. Dans un premier temps, nous avons obtenu des cristaux de Rap2A en complexe avec le vrai substrat des petites protéines G, le GTP (forme hexagonale) (voir préparation de la protéine et condition de cristallisation dans ((Cherfils, 1997), en annexe A). Les cristaux bipyramidaux de la forme hexagonale Rap2A-GTP (fig.16a) se désagrègent environ une semaine après leur cristallisation (fig.16b), probablement à la suite de l'hydrolyse du GTP dans le cristal. Dans un second temps, la protéine Rap2A-GTP a cristallisé dans une seconde forme cristalline (forme monoclinique) (Fig.16c), soit de manière concomitante à la cristallisation de la forme hexagonale, soit suite à la désagrégation des cristaux bipyramidaux de la forme hexagonale (fig.16b). Cette nouvelle forme cristalline ne ressemble ni aux cristaux bipyramidaux de Rap2A-GTP, ni aux cristaux de Rap2A-GDP, et est stable pendant plusieurs semaines.

Collecte des données cristallographiques. Un jeu de données de diffraction des rayons X d'un cristal unique de la nouvelle forme cristalline de Rap2A-GTP a été enregistré, sur la ligne D2AM de l'ESRF à Grenoble en cryogénie (fine baguette de 350x100x30 μm^3). Le cristal a diffracté jusqu'à une résolution de 2,2 Å. Les données cristallographiques sont complètes à 97,5 %. Le R_{sym} (fig.15), qui est un facteur de la qualité interne des mesures des réflexions équivalentes pour chaque réflexion unique est faible, indiquant que les intensités du jeu de données cristallographiques sont bien mesurées (voir table 1 dans l'article 1).

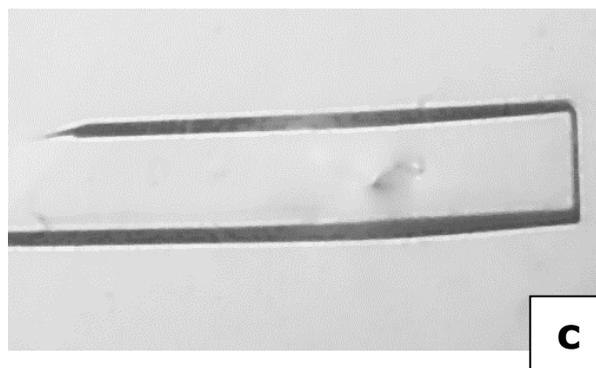
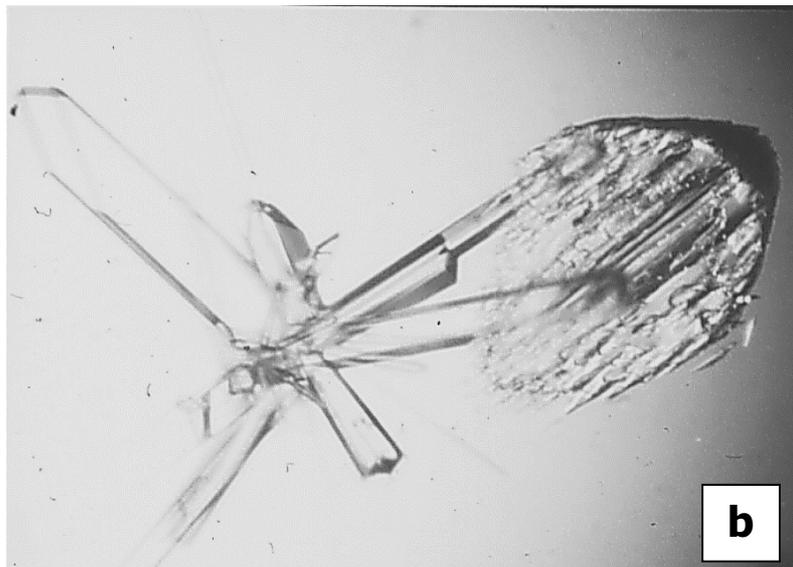
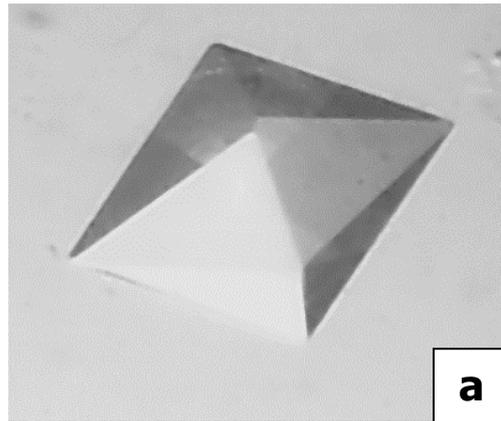


Figure 16 : Cristaux de Rap2A-GTP.

- a) Forme cristalline hexagonale ($300 \times 200 \times 200 \mu\text{m}^3$) (Cherfils,97).
- b) Forme cristalline hexagonale en cours de désagrégation (gauche) et cristaux de la forme cristalline monoclinique de Rap2A apparus au début de l'étape de désagrégation de la forme cristalline hexagonale.
- c) Forme cristalline monoclinique de Rap2A (fine baguette de $500 \times 100 \times 30 \mu\text{m}^3$).

Traitements des données cristallographiques. Le traitement des données a été fait avec les programmes DENZO et SCALEPACK (Otwinowski, 1993) et a permis de définir le groupe d'espace du cristal : $P2_1$. Les statistiques du traitement des données sont données dans la table 1 de l'article 1.

A partir du volume de la maille (166659 \AA^3) et du poids moléculaire de Rap2A (20,6 kDa), il a été estimé que deux molécules de Rap2A sont présentes dans l'unité asymétrique (Matthews, 1968).

Pour pouvoir déterminer les paramètres de chaque atome de la protéine (les 3 coordonnées spatiales (x,y,z) et le facteur d'agitation thermique), il faut connaître un nombre beaucoup plus grand de données expérimentales indépendantes (données connues) que de paramètres (données inconnues). Rap2A est composée par 2658 atomes et le GTP par 66 atomes, on doit déterminer au moins $2 \times (4 \times 2724) = 10896$ paramètres (les deux molécules de Rap2A dans l'unité asymétrique sont traitées distinctement). Le jeu de données que nous avons enregistré est composé de 16388 réflexions indépendantes. Le nombre de données connues (réflexions) est supérieur au nombre de données inconnues (coordonnées spatiales et facteur d'agitation thermique), ce qui permettra théoriquement de résoudre la structure.

2-Remplacement moléculaire et affinement de la structure

Remplacement moléculaire. Les données cristallographiques comprises entre 10 et $3,5 \text{ \AA}$ ont été utilisées pour effectuer le remplacement moléculaire des 2 molécules de l'unité asymétrique avec le programme AMORE (Navaza, 1994). Les modèles utilisés pour le remplacement moléculaire sont d'une part Rap2A-GDP et d'autre part Rap2A-GTP (forme hexagonale) (Cherfils, 1997). En effet, bien que les cristaux de la nouvelle forme cristalline soient apparus dans des conditions où Rap2A était chargée en GTP, il semblait probable que le GTP ait été hydrolysé. Tout d'abord, parce que Rap2A possède une activité GTPasique en solution non négligeable ($0,005 \text{ min}^{-1}$) (Lerosey, 1991), qui lui permet d'hydrolyser le GTP en GDP + phosphate inorganique. Et aussi, parce que contrairement aux cristaux de la forme hexagonale de Rap2A-GTP, les cristaux de la nouvelle forme cristalline sont stables pendant plusieurs semaines, suggérant que l'hydrolyse du GTP n'a pas lieu dans le cristal

$$R_{sym}(I) = \frac{\sum_{hkl} \sum_i |I_i(hkl) - \overline{I(hkl)}|}{\sum_{hkl} \sum_i I_i(hkl)}$$

$$FacteurR = \frac{\sum_{hkl} \left\| |F_{obs}(hkl)| - k|F_{calc}(hkl)| \right\|}{\sum_{hkl} |F_{obs}(hkl)|}$$

$$R_{free} = \frac{\sum_{hkICT} \left\| |F_{obs}(hkl)| - k|F_{calc}(hkl)| \right\|}{\sum_{hkICT} |F_{obs}(hkl)|}$$

$$Corr\u00e9lation = \frac{\sum_{hkl} \left\langle \left(|F_{obs}(hkl)| - \langle |F_{obs}(hkl)| \rangle \right) \cdot \left(|F_{calc}(hkl)| - \langle |F_{calc}(hkl)| \rangle \right) \right\rangle}{\sqrt{\left\langle \left(|F_{obs}(hkl)| - \langle |F_{obs}(hkl)| \rangle \right)^2 \right\rangle \cdot \left\langle \left(|F_{calc}(hkl)| - \langle |F_{calc}(hkl)| \rangle \right)^2 \right\rangle}}$$

$$\rho(x, y, z) = \frac{1}{V} \sum_{hkl} \left(a \cdot |F_{obs}(hkl)| - b \cdot |F_{calc}(hkl)| \right) \exp(i\Phi_{calc}(hkl)) \cdot \exp(-2\pi i(hx + ky + lz))$$

$F_{obs}(hkl)$: Facteur de structure observ\u00e9 de la r\u00e9flexion (hkl)

$F_{calc}(hkl)$: Facteur de structure calcul\u00e9 de la r\u00e9flexion (hkl)

k : Coefficient d'\u00e9chelle

a, b : Coefficients de pond\u00e9ration

I(hkl) : Intensit\u00e9 de la r\u00e9flexion (hkl)

hkICT : r\u00e9flexions (hkl) incluses uniquement dans l'ensemble test (T)

Figure 15: formules du Rsym, du facteur R, du facteur Rfree, du facteur de corr\u00e9lation et de la densit\u00e9 \u00e9lectronique de type aFo-bFc

(mais avant la cristallisation). Les solutions du remplacement moléculaire avec d'une part Rap2A-GDP et d'autre part Rap2A-GTP (forme hexagonale) ont été identifiées clairement et sont équivalentes. Les statistiques du remplacement moléculaire sont légèrement meilleurs pour Rap2A-GTP (table I dans l'article 1). De plus, les cartes de densité électronique calculées en omettant le nucléotide montrent, pour les deux molécules de l'unité asymétrique la présence d'un troisième phosphate, indiquant que le nucléotide lié à Rap2A est du GTP (voir figure 1a dans l'article 1).

Affinement de la structure. L'affinement des structures de Rap2A-GTP a été effectué en alternant des affinements graphiques et énergétiques. Les deux molécules de l'unité asymétrique ont été affinées séparément, dans le but de modéliser des boucles adoptant des conformations différentes. Les affinements graphiques ont été effectués avec le logiciel TURBO (Roussel). Les affinements énergétiques ont été effectués dans un premier temps avec le logiciel X-Plor3.851 (Brünger , 1989) en utilisant des méthodes de convergences utilisant le formalisme des moindres carrés et dans un second temps avec le logiciel X-Plor98 (MSI) en utilisant des méthodes de convergence utilisant le formalisme des maximum de vraisemblance. Les cartes de densité électronique sont calculées par la combinaison pondérée des données expérimentales et des données calculées (fig.15). La pondération des données permet de s'affranchir le plus possible du biais introduit par les données calculées du modèle. Les cartes $2F_{\text{obs}}-F_{\text{calc}}$ et $F_{\text{obs}}-F_{\text{calc}}$ ont été calculées avec les programmes du package CCP4 (Collaborative Computing Project number 4). Les régions de la protéine qui sont mal modélisées ont été reconstruites en utilisant des cartes de densité électronique calculées en omettant ces régions du calcul, ce qui a pour effet de diminuer l'erreur dû au modèle.

Qualité du modèle. Après l'affinement du modèle la qualité de celui-ci est évaluée par un certain nombre de critères, qui incluent les facteurs R et Rfree, et les écarts quadratiques moyens par rapport à une stéréochimie idéale (rmsd) des longueurs et des angles de liaisons. Le facteur R est un indicateur de la qualité de l'accord entre le module des facteurs de structure expérimentaux (Fobs) et les modules des facteurs

de structure calculés (F_{calc}) du modèle (fig.15). Plus le facteur R est faible, plus l'exactitude du modèle est juste. Cependant, il a été montré que le facteur R pouvait atteindre des valeurs basses, correspondant à un affinement biaisé au cours de l'affinement du modèle. Brünger suggéra d'améliorer ce problème en introduisant le calcul d'un facteur R libre (R_{free}) (Brünger, 1992). Le calcul du facteur R_{free} consiste à diviser les réflexions uniques du jeu de donnée en deux ensembles : un ensemble Test (T) et un ensemble travail (W). L'ensemble test (T) est une sélection aléatoire de 5 à 10 % des réflexions uniques du jeu de données, l'ensemble travail (W) comprendra le reste des réflexions uniques. L'affinement énergétique du modèle sera effectué avec les réflexions de l'ensemble travail (W) seules, en omettant les réflexions de l'ensemble test (T). Le facteur R_{free} sera calculé avec les réflexions de l'ensemble test (T) seulement. L'intérêt de calculer ce facteur est que si le modèle structural est réellement amélioré au cours de l'affinement alors le facteur R et le facteur R_{free} diminueront tous les deux. Si le facteur R diminue seul, comme le résultat de l'affinement du bruit, le facteur R libre ne diminuera pas mais augmentera, donnant une indication sur l'exactitude réelle du modèle. Au cours de l'affinement de la structure de Rap2A-GTP, les facteurs R et R_{free} ont diminué de 43,8 et 44,1%, jusqu'à une valeur respectivement de 21,1% et 26,2%. L'écart quadratique moyen par rapport à une stéréochimie idéale des longueurs et des angles de liaison est égal respectivement à 0,008Å et 2,065°, indiquant que les deux structures de l'unité asymétrique de Rap2A-GTP possèdent une bonne stéréochimie.

C-Commentaires post-publication

1-La tyrosine 32

Le nombre grandissant de structures de petites protéines G en complexe avec du GDP, des analogues du GTP, des protéines régulatrices (GEF, GAP et GDI) et des effecteurs, nous apporte de nouvelles informations sur le rôle de la tyrosine 32 ou d'homologues au niveau du site catalytique.

a-Interaction tyrosine 32/phosphate gamma chez les autres petites protéines G. L'interaction de la tyrosine 32 avec le phosphate gamma du GTP a été

décrite pour la première fois pour Rap2A-GTP (fig.14) (Cherfils, 1997). Depuis cette interaction a été retrouvée et décrite pour d'autres petites protéines G. Tout d'abord, l'interaction tyrosine 32/phosphate gamma a été observée pour un analogue non-hydrolysable du GTP, dans la structure de RhoA^{V14}-GTP γ S (Ihara, 1998). De plus, cette interaction a été observée pour la majorité des structures de complexe de petites protéines G avec leur effecteur, comme Ras/RalGDS (Huang, 1998), RhoA/Pkn (Maesaki, 1999), Ran/RanBP2 (Vetter, 1999b), Ran/Importin β (Vetter, 1999a), ainsi que Rap1/Raf1RBD, alors qu'elle n'est pas observée pour le même complexe entre un mutant de Rap1 (E30D-K31E) au niveau du Switch I et Raf1-RBD ((Nassar, 1996) et (Nassar, 1995)). De plus, l'interaction n'est pas observée pour les structures des formes GDP des petites protéines G. Lorsque la petite protéine G, vide de nucléotide est en complexe avec sa GEF (Switch I est repoussé par la GEF en dehors du site nucléotidique), la tyrosine 32 n'est plus dans le site nucléotidique. Ces observations confirment le fait que cette interaction est générale et non particulière à la protéine Rap2A.

b-Les petites protéines G qui ne possèdent pas de tyrosine 32. Alors que les protéines des familles RAS, RAN et RHO possèdent toutes une tyrosine au niveau du Switch I, les protéines de la famille RAB ne possèdent pas toutes une tyrosine 32 (ou équivalent). En effet, Rab3A, par exemple possède une phénylalanine (F51) équivalente en séquence à la tyrosine 32, celle-ci ne peut comme la tyrosine 32, interagir avec le phosphate gamma du nucléotide. La structure de Rab3A-GDPNHP (Dumas, 1999) a permis de comprendre comment Rab3A supplée à ce manque. En effet, 2 sérines, l'une au niveau de la P-loop (S31), l'autre au niveau du Switch I (S53) sont en interaction avec le phosphate gamma du nucléotide, ces interactions s'ajoutent aux interactions classiques sans les modifier (Dumas, 1999). De plus, la phénylalanine 51 est structurellement positionnée au même endroit que la tyrosine 32 suggérant que l'encombrement stérique généré par la tyrosine 32 dans le site nucléotidique, est reproduit par la phénylalanine (fig.2a de l'article 1). Par contre, la structure de Ypt51-GDPNHP, montre que la lysine 36, équivalente en séquence à la tyrosine 32 n'interagit pas avec le phosphate gamma et que aucun autre résidu du site nucléotidique ne semble jouer le rôle de la tyrosine 32 (Esters, 2000). De plus, la

lysine 36 de Ypt51 est substituée par une arginine chez Ypt52 (R86), il a été proposé que la présence de cette arginine au niveau du phosphate gamma du nucléotide joue le rôle de "l'arginine finger" d'une GAP, ceci pouvant expliquer la différence d'activité GTPasique intrinsèque de Ypt52 ($0,086\text{min}^{-1}$ à 30°C) par rapport à Ypt51 ($0,005\text{min}^{-1}$ à 30°C) (Esters, 2000). Les protéines de la famille ARF ne possèdent pas une tyrosine équivalente en séquence à la tyrosine 32, mais une thréonine, trop petite pour atteindre le phosphate gamma (Goldberg, 1998). De plus, les structures de Arf1 Δ 17-GDPNHP (Goldberg, 1998) et Arf6-GTP γ S (en cours de rédaction) montrent qu'aucun autre résidu de substitution n'interagit avec le phosphate gamma du nucléotide. Les protéines Rin et Rit qui appartiennent à la famille de RAS, chez qui la tyrosine 32 est conservée, possèdent une histidine à la place de la tyrosine 32. Il serait intéressant de savoir comment se comporte cette histidine dans la structure de Rin-GTP et Rit-GTP.

c-Compétition entre la tyrosine 32 et "l'arginine finger" des GAP. La tyrosine 32 est en compétition avec "l'arginine finger" de RasGAP, de RhoGAP et de CDC42GAP pour l'interaction avec le phosphate gamma. En effet, les structures Ras-GDP-AIF $_4$ /RasGAP (Scheffzek, 1997), RhoA-GDP-AIF $_4$ /RhoGAP (Rittinger, 1997b) et CDC42-GDP-AIF $_3$ /CDC42GAP (Nassar, 1998) montrent que "l'arginine finger" de la GAP poussent la tyrosine vers l'extérieur du site nucléotidique, ce qui permet à son groupement guanidium de prendre la place du groupement hydroxyle de la tyrosine 32, et ainsi d'interagir avec le nucléotide (fig.2b de l'article 1). L'arginine des GAP interagit simultanément avec le phosphate gamma, le phosphate beta, l'oxygène reliant ces deux derniers phosphates (P β -O-P γ) et le groupe NH du résidu x $_3$ du motif PM1 [GX $_1$ X $_2$ X $_3$ X $_4$ GK(S/T)] (glycine 13 chez Ras). La présence de "l'arginine finger" est nécessaire pour l'expulsion de la tyrosine 32 du site nucléotidique. En effet, les structures cdc42-GDP-AIF $_3$ /cdc42GAP et cdc42(R305A)-GDP-AIF $_3$ /cdc42GAP (Nassar, 1998), l'une avec "l'arginine finger" et l'autre sans montrent que sans "l'arginine finger", la tyrosine 32 conserve sa position en interaction avec le fluorure d'aluminium (équivalent du phosphate gamma, dans cette structure).

d-Rôle de la tyrosine 32. Le rôle de la tyrosine 32 n'est pas encore clairement établi. Nous excluons qu'elle puisse contribuer à l'hydrolyse intrinsèque de la petite protéine G : en effet notre structure, Rap2A-GTP montre clairement qu'aucune hydrolyse n'a eu lieu dans le cristal alors que l'interaction entre la tyrosine 32 et le phosphate gamma est présente. De plus, il semble peu probable que l'interaction entre la tyrosine 32 et le phosphate gamma contribue à la configuration et/ou à la stabilisation du Switch I. En effet, les Switch I des structures Rap2A-GTP et Rap2A-GTP γ S, la première avec l'interaction et la seconde sans l'interaction partagent la même configuration. Il semble plus probable que la tyrosine 32 joue un rôle au niveau de la régulation négative (temporisation) de l'hydrolyse intrinsèque des petites protéines G. En effet, la position de la tyrosine 32 au niveau du phosphate gamma du nucléotide gêne de façon stérique la glutamine (ou la thréonine dans le cas des protéines Rap) catalytique du motif PM3 [DTAGQ] qui ne peut plus se positionner pour l'hydrolyse du GTP. De la même manière, la sérine 53 de Rab3A-GDPNHP gênerait de façon stérique le retour de la glutamine 81 vers le phosphate gamma. De plus, la tyrosine 32 interagit avec le même oxygène du phosphate gamma que la molécule d'eau nucléophile ce qui peut avoir pour effet de changer les propriétés nucléophiles de la molécule d'eau. De plus, d'une façon générale la tyrosine 32 interagit aussi avec le groupement NH de la chaîne principale du résidu x_3 du motif PM1 [G x_1 X x_2 X x_3 X x_4 GK(S/T)] qui a pour rôle de stabiliser le nucléotide via une interaction avec l'oxygène reliant le phosphate beta et le phosphate gamma, la première interaction peut modifier l'importance de la seconde. Il a été montré que la mutation de la sérine 31 de Rab3A a pour effet d'augmenter la GTPase intrinsèque de Rab3A, suggérant pour ce résidu un rôle stabilisateur de la forme GTP (Brondyk, 1993).

La tyrosine 32 semble être un site de reconnaissance pour différents partenaires cellulaires, lorsque celle-ci n'est pas en interaction avec le phosphate gamma du nucléotide mais dirigée vers l'extérieur de la protéine. En effet, chez cdc42 la mutation Y32K montre que la tyrosine est critique pour l'interaction avec la GEF (Li et Zheng, 1997). De plus, la récente structure de CDC42-GDP/RhoGDI1

Proteines	Switch I	Switch II	PDB
Ras-GDP	+	-	4Q21
Ras-GDPNP	++	+	5P21
Ras-GDP.AIF ₃ /RasGAP	+	++	1WQ1
Ras-∅/SOS	-	++	1BKD
Ras-GDPNP/RalGDS	++	++	1LFD
Rap2A-GDP	+	-	1KAO
Rap2A-GTP	++	+	3RAP
Rap1A-GDPNP/RafRBD	++	++	1GUA
Arf1-GDP	++	-	1RRG
Arf1-GDPNP	++	++	*
Arf1-∅/Gea2	-	++	*
Arf1-GDP/Arf1GAP	++	++	*
Arf6-GDP	++	++	1E0S
Arf6-GTP γ S	++	++	*
RhoA.GDP	++	-	1FTN
RhoA.GTP γ S	++	++	1A2B
RhoA.GDP.AIF ₄ ⁻ /RhoGAP	-	++	1TX4
RhoA-GTP γ S/Pkn	++	++	1CXZ
CDC42-GDP	++	++	1AN0
CDC42.GDP.AIF ₄ ⁻ /CDC42GAP	++	++	1GRN
CDC42.GDPNP/RhoGAP	-	++	1AM4
CDC42-GDP/RhoGDI1	++	++	1DOA
CDC42-GDPNP/PAK-1	++	+	1EOA
CDC42-GDPNP/Ack	++	+	1CF4
Rac1.GDPNP	-	++	1MH1
Rac2-GDP/LyGDI	++	++	1DS6
Ran.GDP	++	+	1BYU
Ran.GDP/NTF2	++	++	1A2K
Ran.GDPNP/RanBD1	++	+	1RRP
Ran-GDPNP/Importin β	++	++	1IBR
Ran-GDPNP/Karyopherin- β 2	++	+	1QBK
Rab3A-GDPNP	++	+	3RAB
Rab3A-GTP/Rabphilin3	+	+	1ZBD
Rab6-GDP	+	+	1D5C
Ypt51-GDPNP	++	++	1EK0

Tableau II: Flexibilité des switch I et II des petites protéines G. La flexibilité des switch I et II des petites protéines G a été établie à partir des structures connues de petites protéines G en comparant les facteurs d'agitations thermiques des switch I et II par rapport au facteur d'agitation thermique moyen de la structure et/ou par la mauvaise définition de la densité électronique reportée dans la publication. La flexibilité des switch va de désordonnée (-), à ordonnée (++), en passant par partiellement ordonnée (+). Les coordonnées sont un don de leur auteur (*). La petite protéine G est vide de nucléotide (\emptyset).

(Hoffman, 2000) montre que la tyrosine est impliquée via une molécule d'eau dans l'interface avec RhoGDI1.

2-Flexibilité des régions Switch I et II

Précédemment nous avons décrit la transition GDP/GTP de Rap2A comme étant essentiellement une transition désordre/ordre (Cherfils, 1997). Cependant, il n'a pas été possible à partir de cette structure seule, d'éliminer l'influence d'un contact cristallin au niveau du Switch II de Rap2A-GTP. Dans la nouvelle forme cristalline de Rap2A-GTP, nous observons que la stabilisation du Switch II est incomplète et limitée à la glycine 60 et dans une moindre mesure à la thréonine 61 (fig.3 de l'article 1). En conclusion, toutes les structures de Rap2A résolues au laboratoire montrent que deux transitions désordre/ordre au cours du cycle structural GDP/GTP de Rap2A ont lieu : le Switch I est complètement stabilisé et le Switch II partiellement stabilisé suite à la fixation du GTP.

Nous avons précédemment reporté la flexibilité des Switch I et II des structures de petites protéines G seules ou en complexe (table II dans l'article 1). Ce tableau a été actualisé au vue des dernières structures de petites protéines G seules ou en complexe résolue (tab.II).

Le Switch I de la forme GDP est en général partiellement ordonné, alors que le Switch II peut être ordonné ou désordonné selon la protéine. La présence du GTP, conduit le Switch I à s'ordonner (sauf Rac1-GDPNHP) et le Switch II est partiellement ordonné. Deux structures de petites protéines G vide de nucléotide en complexe avec leur GEF sont connues (Ras-SOS et Arf1 Δ 17-Gea2), dans les deux cas le Switch I est partiellement ordonné et le Switch II ordonné. La connaissance de deux structures est insuffisante pour généraliser l'état de la flexibilité des Switch I et II dans le cas des petites protéines G en complexe avec leur GEF. Les structures de petites protéines G en complexe avec leur GAP montrent que le Switch I peut être ordonné et désordonné selon la protéine, alors que le Switch II est de façon générale ordonné. Les structures de petites protéines G en complexe avec leurs effecteurs montrent que le Switch I est ordonné et le Switch II plutôt partiellement ordonné.

Ces observations permettent pour le moment d'observer une tendance générale de l'organisation des Switch I et II selon la forme de la petite protéine G. Cependant, on observe certaines exceptions qui semblent indiquer que l'état de désordre/ordre des Switch puisse être aussi un moyen de distinction entre les petites protéines G.

Chapitre 2

L'étude structurale de la petite protéine G Arf6 en complexe avec du GDP suggère une base structurale pour la spécificité des facteurs d'échange

Chapitre 2: L'Etude structurale de la protéine Arf6 en complexe avec du GDP suggère une base structurale pour la spécificité des facteurs d'échange GDP/GTP

L'étude des protéines Arf est un projet qui a débuté au laboratoire en 1996 en collaboration avec l'équipe de Marc Chabre de l'Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire du CNRS. Dans le cadre de cette collaboration, nous nous sommes intéressés au cycle structural GDP/GTP de Arf6.

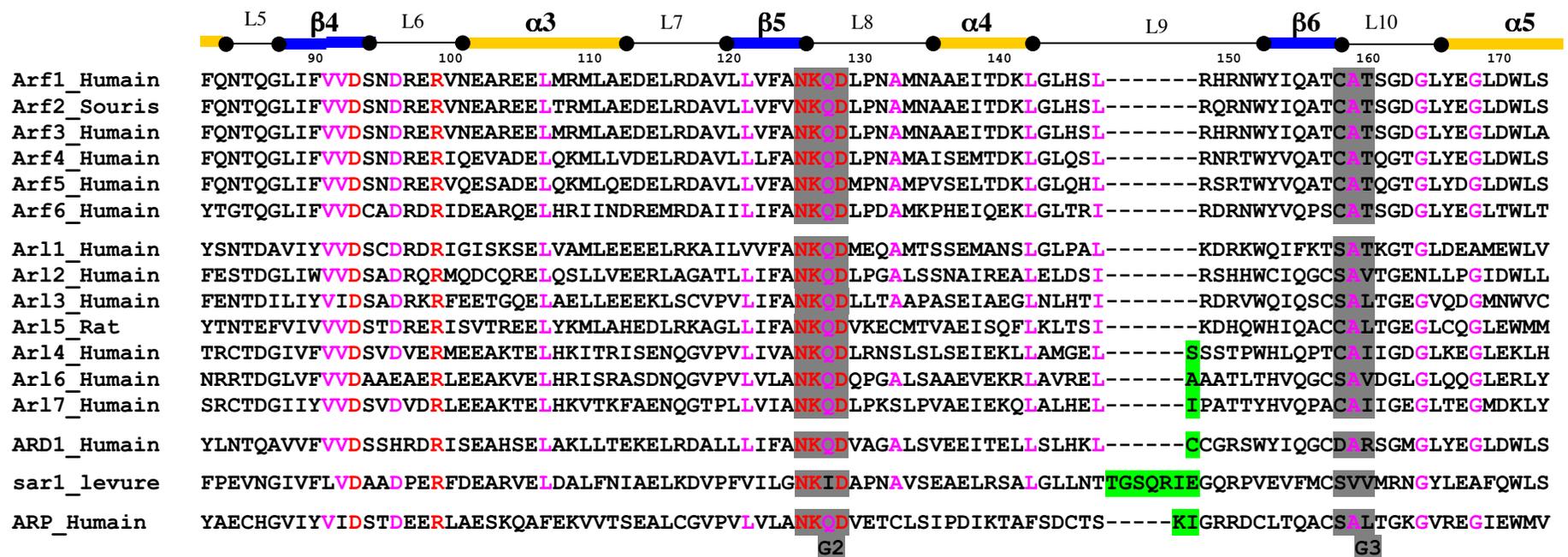
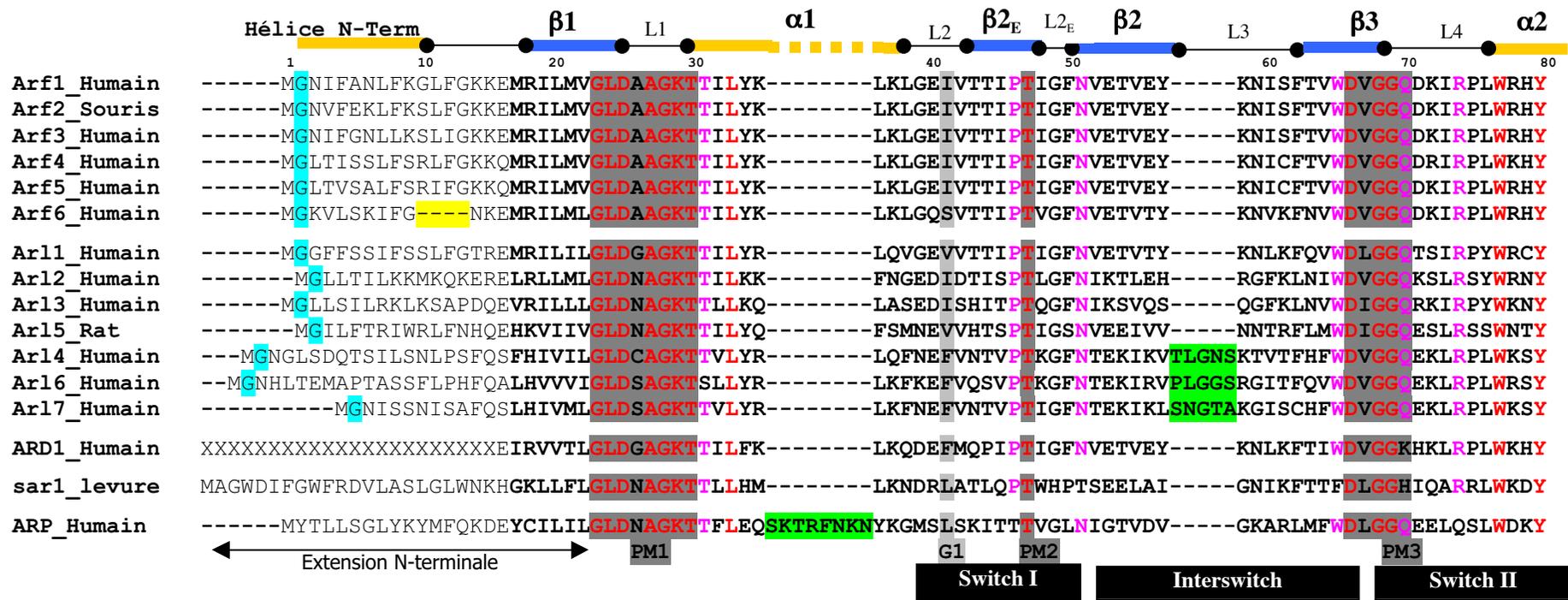
Le cycle structural GDP/GTP de Arf1 isoforme de Arf6 (84% de similarité de séquence) est déjà connu. Alors pourquoi étudier le cycle structural de Arf6 ? Parce que malgré leur très forte similarité de séquence Arf1 et Arf6 divergent sur différents aspects : alors que, Arf1 a été identifiée au niveau de l'appareil de Golgi, Arf6 a été identifiée au niveau de la membrane plasmique et des endosomes. Alors que, Arf1 alterne entre une forme cytosolique et une forme associée à la membrane, Arf6 est principalement retrouvée associée à la membrane. Alors que *in vitro*, Arf1 échange son nucléotide uniquement en présence de lipide, Arf6 peut le faire sans la présence de lipide. De plus, bien que Arf1 et Arf6 fonctionnent toutes les deux comme des régulateurs du transport vésiculaire, elles semblent le faire de manière distincte. Toutes ces observations, nous ont amené à nous demander sur quelles bases structurales ces différences pouvaient être générées.

J'ai résolu la structure de Arf6 en complexe avec le GDP par remplacement moléculaire, à une résolution de 2,2 Å. Ce travail a fait l'objet d'une publication dans *Nature Structural Biology*, qui sera présentée dans ce chapitre. Par la suite, j'ai cristallisé Arf6 en complexe avec du GTP γ S (voir Annexe D), ce qui a permis de résoudre la structure de Arf6-GTP γ S et d'étudier le cycle structural GDP/GTP de Arf6 (Pasqualato, en cours de rédaction).

L'étude structurale de Arf6 en complexe avec du GDP a permis de mettre en évidence que deux protéines très proches en séquence pouvaient adopter des conformations assez différentes pour être distinguées l'une de l'autre par différents

partenaires. Les principaux partenaires des formes GDP des petites protéines G sont leurs facteurs d'échange (GEF). La structure de Arf6-GDP suggère une base structurale pour la spécificité des facteurs d'échange. De plus, cette étude a montré qu'une différence de séquence entre Arf6 et Arf1 (respectivement Ser38 et Ile42) en dehors du site nucléotidique est responsable de l'élimination d'une interaction au niveau du site nucléotidique. Cette observation a permis à nos collaborateurs d'étudier par mutagenèse dirigée basée sur la structure le rôle de ce résidu, et de montrer qu'il est responsable de la différence d'affinité de Arf1 et de Arf6 pour le GDP.

Ce chapitre est introduit par une description générale des différentes sous-familles de la famille ARF ; ainsi qu'une description plus détaillée des protéines Arf1 d'une part et Arf6 d'autre part. Ces généralités sont présentées dans le but de mettre en évidence les différences observées entre des protéines proches (elles partagent 60 à 98 % de similarité de séquence). L'étude structurale de Arf6 en complexe avec du GDP sera présentée dans la seconde partie de ce chapitre. L'analyse complète de la structure est présentée dans l'article "Structure of Arf6-GDP suggests a basis for guanine nucleotide exchange factors specificity" de Julie Ménétrety et coll., et sera introduite par la présentation des points forts de cette étude. Certains résultats de l'étude structurale qui n'ont pas été mentionnés dans l'article seront présentés et discutés.



		Identité/similarité de séquence			
					
Arf1_Humain	NQLRNQK-----	100/100%			
Arf2_Souris	NQLKNQK-----	96,6/97,8%			
Arf3_Humain	NQLKNKK-----	96,1/98,9%			
Arf4_Humain	NELSKR-----	80,1/91,0%	100/100%	63,3/80,5%	
Arf5_Humain	HELSKR-----	80,1/89,5%	90,0/96,7%	63,3/82,7%	
Arf6_Humain	SNYKS-----	66,8/83,9%		100/100%	
Arl1_Humain	ETLKSrq-----	57,0/79,0%	100/100%		
Arl2_Humain	DDISSRIFTAD-----	44,5/69,2%	40,0/67,0%		
Arl3_Humain	KNVNAKKK-----	42,9/70,6%	43,5/69,0%		
Arl5_Rat	SRLKIR-----	48,0/74,0%	49,0/71,8%		
Arl4_Humain	DMI I KRRK MLRQ Q KKKR	41,5/64,0%	37,0/57,0%	100/100%	
Arl6_Humain	EMIL KR KK AA RGG KKRR	37,8/62,6%	31,0/55,0%	59,7/82,1%	
Arl7_Humain	EMIL KR RS LK Q KKKR -	43,4/66,9%	37,0/57,0%	67,5/87,0%	
ARD1_Humain	RQLVAAGVLDVA-----	54,5/68,4%			
sar1_levure	QYI-----	33,3/54,3%			
ARP_Humain	KCVVRNVHRPPRQRDIT	28,9/56,2%			

Figure 17 : Alignement de séquences des protéines ARF et pourcentage d'identité et de similarité de séquence entre elles.

L'alignement de séquences de ces protéines a été fait avec le programme CLUSTALW. Les régions N-terminales et C-terminales n'ont pas été alignées et les résidus de ces régions sont représentés en clair. Les régions N-terminale et C-terminale de Arf1 et de Arf6 ont été alignées entre elles. Le domaine G de la protéine ARD1 est présenté seul, son domaine GAP a été éliminé de l'alignement de séquence, les résidus X de la séquence de ARD1 représentent les résidus C-Terminaux du domaine GAP. La numérotation de Arf1 est présentée juste au dessus de sa séquence. La structure secondaire de Arf1-GDP est représentée par des traits bleus qui représentent les brins β et des traits jaunes qui représentent les hélices α . Les résidus en rouge respresentent les résidus conservés, les résidus en rose représentent les résidus conservés à 1 ou 2 résidus prés. Les motifs caractéristiques sont surlignés en gris foncé. Le motif G1 [F] qui n'existe pas chez les protéines ARF est surligné en gris clair à titre indicatif. Les tirets surlignés en jaune sont des délétions de la séquence par rapport aux autres séquences. Les résidus surlignés en vert sont des insertions de la séquence par rapport aux autres séquences. Les résidus surlignés en indigo représentent les glycine en position 2 qui sont des motifs potentiels de myristylation. Les résidus en bleu représentent les motifs polybasiques capables d'interagir avec la membrane. Les pourcentages d'identités et de similarités de séquence sont indiqués à la fin de l'alignement de séquence, ceux-ci sont présentés en colonne et/ou encadré, ils ont été calculés par rapport à la protéine pour qui l'identité/similarité de séquence est indiquée en rouge et est égale à 100/100 %.

I-Généralités

La première partie de ce paragraphe présente d'une manière générale les différences observées entre les sous-familles de la famille ARF. La famille des protéines ARF est constituée par les sous-familles Arf, Arl, la protéine ARD1, la protéine Sar1 et la protéine ARP. Un alignement de séquences des protéines de la famille ARF est présenté figure 17, celui-ci met en évidence les différences de séquences entre ces protéines, ainsi que l'identité et la similarité de séquence qu'elles partagent. La seconde partie de ce paragraphe porte sur la sous-famille Arf, à laquelle appartient Arf6. Parce que la structure de Arf6-GDP suggère une base structurale pour la spécificité des facteurs d'échange, la description des protéines régulatrices des protéines Arf seront présentées. De plus, les propriétés moléculaires et cellulaires de Arf1, paradigme de la famille Arf et de Arf6 seront présentées de façon plus détaillée, permettant ainsi de mettre en évidence leurs différences.

A-La famille des protéines ARF

La famille des protéines ARF possède seulement 5 motifs caractéristiques, contrairement aux autres familles de petites protéines G. Les motifs PM1 [GLDxAGKT], PM2 [T], PM3 [DxGG(Q/x)], G2 [NK(Q/x)D] et G3 [(C/S)A(T/x)] sont conservés chez les protéines ARF, par contre le motif G1 [F] n'est pas conservé (fig.17). Les protéines ARF ont en commun un certain nombre de résidu comme la leucine 34, la tyrosine 81, l'aspartate 93, l'arginine 99 et le tryptophane 78 (numérotation de Arf1) qui ne sont pas conservés chez les autres familles de petites protéines G (fig.4 et fig.17). Une autre caractéristique des protéines ARF par rapport aux autres familles de petites protéines G est la présence d'une extension N-Terminale plus ou moins longue. Contrairement aux autres familles des petites protéines G (sauf la famille RAN), les protéines ARF ne possèdent pas de motif de prénylation en C-Terminus permettant la modification de celles-ci, mais un motif potentiel de myristoylation en N-Terminus. Ces caractéristiques permettent aux protéines de la famille ARF d'être distinguées des autres familles de petites protéines G. De plus, les régions N-Terminales de ces protéines sont divergentes en séquence et en longueur. Certaines protéines ARF possèdent des insertions et/ou des délétions

de séquence les unes par rapport aux autres. Ces différences suggèrent que les protéines de la famille ARF sont aussi distinguables les unes des autres.

1-La sous-famille Arf

Les protéines de la sous-famille Arf ont été les premières protéines de la famille ARF à être identifiées. Elles sont les plus étudiées et servent de modèle pour la famille des protéines ARF.

Découverte des protéines Arf. La toxine du Choléra est le produit de sécrétion de *Vibrio cholerae*, responsable en grande partie des fortes diarrhées caractéristiques des symptômes du choléra. La sous-unité A de la toxine du choléra (CT-A) est une ADP-ribosyltransférase, qui a pour principal substrat cellulaire la sous-unité α de la protéine G hétérotrimérique Gs (protéine G stimulatrice de l'adénylate cyclase). En 1984, Kahn et Gilman montrent qu'un co-facteur d'environ 20 kDa stimule l'ADP-ribosylation de Gs α par CT-A en présence de GTP. Cette activité sera appelée "activité ARF" (Kahn et Gilman, 1984), le co-facteur a été nommé ADP-Ribosylation Factor (ARF) (pour revue voir (Tsuchiya, 1991)).

Les protéines Arf forment une sous-famille de 6 isoformes chez les mammifères ; elles sont regroupées en 3 classes selon leur taille et leur homologie de séquence (Tsuchiya, 1991). Arf1, Arf2 et Arf3 composent la classe I, Arf4 et Arf5 la classe II, et Arf6 seule la classe III. Chez l'Homme seulement 5 protéines Arf ont été identifiées : Arf2 identifiée dans les tissus bovins, de rat et de souris, n'a pas été retrouvée (si elle existe) chez d'autres mammifères (Tsuchiya, 1991). De plus, seulement 3 protéines Arf ont été identifiées chez la levure : *Arf1* et *Arf2*, qui sont homologues aux protéines Arf de la classe I. Alors que, *Arf3* qui possède environ 55 % d'identité de séquence avec toutes les autres protéines Arf de mammifère et de levure représenterait une nouvelle classe. Les protéines Arf existent chez toutes les cellules eucaryotes (homme, souris, rat, vache, grenouille, mouche à fruit, levure, *Arabidopsis*), mais pas dans le génome de *E. Coli* (Kahn, 1988). Elles représentent entre 0.03 et 0.1 % de la totalité des protéines des cellules eucaryotes. Dans certains tissus comme ceux du cerveau ou des ovaires, elles abondent jusqu'à 1 % de la

totalité des protéines. Les protéines Arf sont localisées principalement au niveau de l'appareil de Golgi (Classe I et II), des compartiments endosomaux et de la membrane plasmique (Classe III). De plus, il est maintenant clairement établi que Arf1 alterne entre une localisation cytosolique et une localisation associée à la membrane (voir paragraphe I-C-1 et I-D-1). Il a été montré que *Arf1* et *Arf2* de levure sont fonctionnellement redondantes et sont impliquées dans la sécrétion et la voie d'endocytose (Stearns, 1990a). Chacune des protéines Arf de mammifère restaure les phénotypes induits par la délétion des deux *Arf* de levure (Kahn, 1991), suggérant qu'elles soient aussi impliquées dans les transports vésiculaires. De plus, il a été montré que les protéines Arf activent l'activité PLD ((Cockcroft, 1994), (Brown, 1993), (Ktistakis, 1995) et (Massenburg, 1994)). La PLD (phospholipase D) hydrolyse la phosphatidylcholine (PC) en acide phosphatidique (PA) et choline. Le lien entre ces deux fonctions s'il y en a un n'est pas encore clair. Les protéines Arf possèdent une affinité pour les nucléotides de l'ordre du nM et une activité GTPasique trop faible pour être mesurée ($<0.0015\text{mn}^{-1}$) (Kahn et Gilman, 1986).

L'alignement de séquences des protéines de la sous-famille Arf (fig.17) montre que la séquence de leurs motifs caractéristiques sont identiques et que celles de leurs régions Switch I et II sont fortement similaires, alors que les séquences de leurs régions N-Terminale et C-Terminale sont divergentes. Les protéines Arf possèdent une extension de 13 (*Arf6*) à 17 (*Arf1*) résidus en N-Terminus, qui est myristoylée (fig.7) au niveau de la glycine en position 2 (fig.17) (Kahn, 88).

2- La sous-famille Arl

Les protéines Arl (Arf-like) représentent une sous-famille de 7 isoformes. Les protéines Arl possèdent des motifs caractéristiques fortement similaires en séquence mais pas identiques, comme c'est le cas pour les protéines Arf. Ces protéines possèdent entre 63 et 67 % de similarité de séquence avec les protéines Arf. Les protéines Arl possèdent un motif de myristylation en N-Terminus (fig.17), mais contrairement aux protéines Arf, elles ne sont pas myristoylées. De plus, elles possèdent une activité GTPasique ($0,008/0,005\text{mn}^{-1}$) plus importante que les protéines Arf ($<0,0015\text{mn}^{-1}$), et une dépendance pour le magnésium et les lipides

beaucoup moins importante au cours de l'échange du nucléotide. Ces protéines peuvent être classées en 2 sous-groupes.

a-Sous-groupe ARL4. Les protéines Arl 4, 6 et 7 forment le sous-groupe appelé "ARL4", sur la base de similarité de séquence et de propriétés biochimiques. En effet, elles possèdent une région effectrice fortement similaire en séquence, une extension de 5 résidus au niveau de l'Interswitch (β 2-L3- β 3) et une extension C-Terminale unique composée de 9 résidus basiques (arginines/lysines) par rapport aux autres protéines de la sous-famille Arl. Ces 3 isoformes partagent entre 82 à 87 % de similarité de séquence et environ 55% avec les autres isoformes Arl. Arl4 et 6 possèdent des extensions N-Terminales respectivement de 20 et 21 résidus, alors que Arl7 possède une insertion plus courte de 13 résidus, suggérant une base structurale pour distinguer Arl7 de Arl4 et de Arl6. Les protéines ARL4 possèdent le motif caractéristique G1 [F], absent chez les autres protéines ARF (sauf ARD1) (fig.17). De plus, la vitesse de dissociation du nucléotide des protéines ARL4 est plus élevée que celle de Arf1 et de ARP (Jacobs , 1999). Le motif polybasique en C-Terminus de ces protéines semble être responsable de leur localisation au niveau du compartiment nucléaire (Jacobs, 1999).

b-Arl 1, 2, 3 et 5. Les isoformes Arl1, Arl2, Arl3 et Arl5 partagent environ 70 % de similarité de séquence. Comme les protéines Arf, elles possèdent une extension N-Terminale de 16-17 résidus (fig.17). Arl1 est associée à l'appareil de Golgi, comme Arf1 (Lowe, 1996). Il a été montré qu'en présence de lipides, Arl1 humain possède une "activité ARF" et stimule la PLD, mais de façon moins efficace que Arf1 (Hong, 1998). La protéine Arl184 de rat, qui possède 55 % d'identité de séquence avec Arl1 humain, semble impliquée dans la sécrétion régulée (Icard-Liepkalns, 1997). La protéine BART (Binder of Arl Two) a été identifiée pour sa capacité à interagir avec Arl2-GTP *in vivo* et *in vitro*, mais pas avec Arl2-GDP, la conséquence de cette interaction n'est pas encore connue (Sharer et Kahn, 1999). De plus, il a été montré que Arl2, échange son nucléotide en absence de lipides et de détergents, contrairement à Arf1 (Clark, 1993), régule *in vitro* les interactions entre la tubuline et le cofacteur D, protéine chaperonne de la tubuline (Bhamidipati, 2000). Une étude

récente a montré que Arl3 interagit avec la PDE delta (sous-unité delta de la cGMP phosphodiesterase) et que cette interaction stabilise la forme GTP de Arl3 (Linari , 1999).

3-La protéine ARD1

ARD1 (Arf-Ribosylation Domain 1), découverte en 1986 est une protéine ubiquitaire de 64 kDa. Elle est constituée par 2 domaines : un domaine C-Terminal de 18 kDa, homologue aux protéines ARF (68 % de similarité de séquence avec Arf1) et un domaine N-Terminal de 46 kDa homologue aux ArfGAP. L'extension N-Terminale des protéines ARF n'existent pas chez ARD1, en effet le domaine GAP de ARD1 se trouve en N-Terminus du domaine homologue aux protéines ARF. Comme les protéines ARL4, et contrairement aux autres protéines ARF, ARD1 possède le motif caractéristique G1 [F]. De plus, ARD1 possède une lysine à la place de la glutamine catalytique conservée du motif PM3 [DxGG(Q/K)]. ARD1 a été identifiée au niveau de l'appareil de Golgi et des lysosomes, et serait impliquée dans les transports vésiculaires au niveau de ces compartiments (Vitale, 1998).

4-La protéine Sar1

La protéine Sar1 (Secretion-Associated and Ras-superfamily-related gene) a été découverte en 1989 chez la levure, comme étant impliquée dans la sécrétion (Nakano et Muramatsu, 1989). Sar1 partage 54 % de similarité de séquence avec les protéines Arf et possède la plus longue extension N-Terminale de la famille ARF (23 résidus), ainsi qu'une extension de 6 résidus avant le motif caractéristique G3 [(C/S)A(T/x)]. Elle ne possède pas de site de myristoylation en position 2 (la glycine en position 3 ne semble pas être un site potentiel). Sar1 possède une activité GTPasique très faible du même ordre de grandeur que celle de Arf1 ($<0,0015\text{mn}^{-1}$). La protéine Sar1 possède une histidine (comme EF-Tu) à la place de la glutamine catalytique conservée du motif PM3 [DxGGQ]. Sar1 est impliquée dans le transport vésiculaire entre le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi *via* le recrutement du manteau COPII. Cependant, elle alterne entre une localisation cytosolique et une localisation associée à la membranaire, comme Arf1. Pourtant Sar1 ne possède pas de modification lipidique, contrairement à Arf1. Elle est recrutée à la membrane *via* le

domaine cytoplasmique N-Terminal de son facteur d'échange transmembranaire Sec12 (pour revue voir (Schekman et Orci, 1996) et (Springer, 1999)).

5-La protéine ARP

ARP (ARF-Related Protein) est une protéine ubiquitaire, qui a été découverte en 1995. Elle représente la protéine la plus divergente de la famille ARF (56 % de similarité de séquence avec Arf1). Comme Arf1, ARP possède une extension N-Terminale de 17 résidus. ARP est exclusivement identifiée à la membrane plasmique, bien qu'elle ne possède aucun site de modification lipidique connu (pas de motifs de myristoylation). De plus, elle possède une insertion de 8 résidus entre le motif caractéristique PM1 [GLDxAGKT] et la région effectrice. ARP semble, dans une certaine mesure d'hydrolyser son nucléotide sans la présence de membrane et de GAP (Schurmann, 1995). Elle serait impliquée dans une voie qui inhibe l'activité PLD stimulée par les protéines Arf (Schurmann, 1999). ARP possède un homologue chez la levure, *yAr13* avec qui elle partage 43 % d'identité de séquence. *yAr13* n'est pas localisée à la membrane plasmique comme ARP, mais dans le cytosol. Elle serait impliquée dans les transports vésiculaires entre le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi, et l'appareil de Golgi et les vacuoles. *yAr13* ne possède pas "d'activité ARF" (Huang, 1999).

B-Les protéines régulatrices des protéines Arf

Le cycle GDP/GTP des petites protéines G est régulé par des protéines régulatrices: un facteur d'échange GDP/GTP (GEF) qui favorise la dissociation du GDP et une protéine activatrice de la GTPase (GAP) qui catalyse l'hydrolyse du GTP. Les facteurs d'échange (GEF) des protéines Arf ont été réunis sous le nom de "ArfGEF". Les protéines activatrices de la GTPase des protéines Arf ont été réunies sous le nom de "ArfGAP".

1-Les ArfGEF

a-Domaine sec7. Bien que, les facteurs d'échange identifiés pour les protéines Arf possèdent des domaines différents, ils partagent tous un domaine d'environ 200

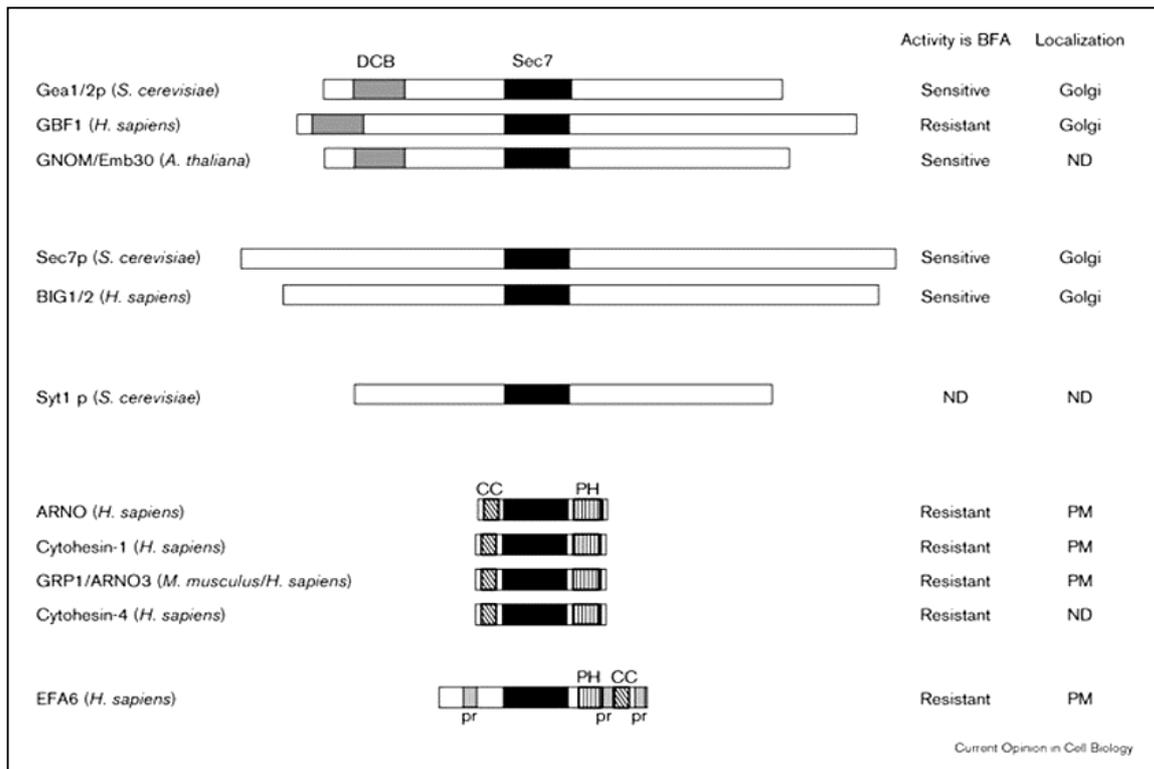


Figure 18a: Représentation schématique de la Famille des ArfGEF. Figure empruntée à (J. Donaldson et C. Jackson, 2000). Les domaines sec7 sont représentés en noir. Les domaines DCB (Dimerization and cyclophilin binding) sont représentés en gris. Les domaines PH (Pleckstrin Homology) sont représentés par un motif strié verticalement. Les domaines coiled-coil sont représentés par un motif strié obliquement. EFA6 possède des domaines riches en proline indiqués par les lettres "pr".

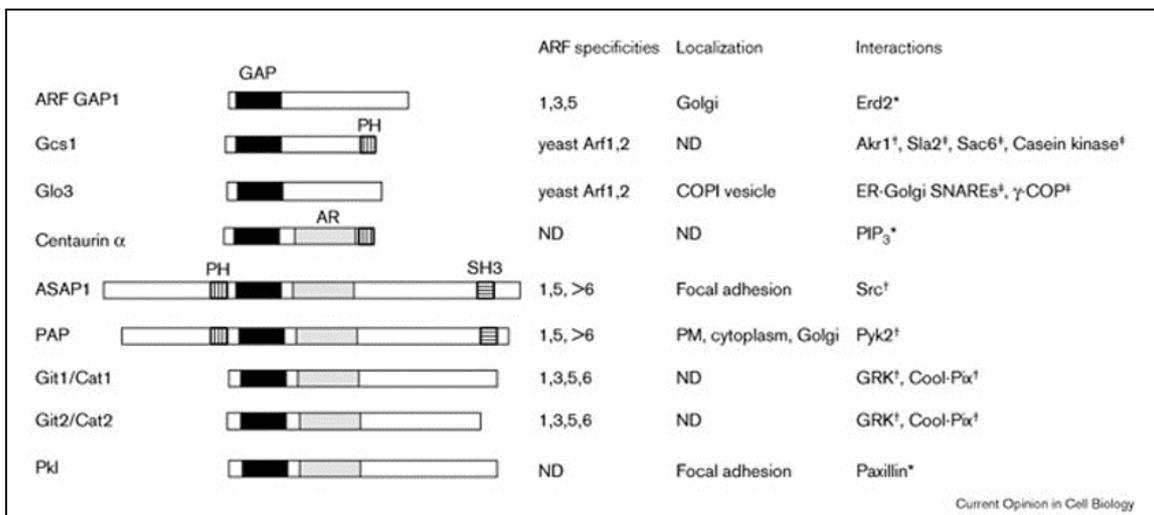


Figure 18b: Représentation schématique de la Famille des ArfGAP. Figure empruntée à (J. Donaldson et C. Jackson, 2000). Gcs1 et Glo3 sont des protéines de levure, les autres sont des protéines de mammifère. Les domaines GAP sont représentés en noir. Les domaines PH (Pleckstrin Homology) sont représentés par un motif strié verticalement. Les domaines SH3 sont représentés par un motif strié horizontalement. Les domaines "ankyrin repeat" sont représentés par les lettres "R". Not Determined "ND".

acides aminés. Ce domaine est appelé "domaine sec7", parce qu'il possède une forte homologie de séquence avec le domaine sec7 de la protéine SEC7 de levure. Il a été montré que le domaine sec7 isolé active l'échange GDP/GTP des protéines Arf tronquées de leur extension N-Terminale en solution (Chardin, 1996). Les domaines sec7 des ArfGEF possèdent deux motifs conservés. Le premier appelé "motif 1" [FRLPGE] est le plus conservé, sauf pour EFA6 [LALMGE]. Le second, appelé "motif 2" est plus grand et contient de nombreux résidus hydrophobes (voir fig.1b de l'article présentée en annexe B).

b-Mécanisme d'échange du nucléotide de Arf1 par un domaine sec7. La structure de Arf1 Δ 17/sec7-Gea2 vide de nucléotide (Goldberg, 1998) montre que le domaine sec7 forme une large interaction avec le Switch II de Arf1 Δ 17-GDP, et maintient le Switch I éloigné du site nucléotidique, pour permettre à une de ses boucles (motif1) de pénétrer dans celui-ci. Le glutamate 156 du motif 1 du domaine sec7 est introduit proche du site magnésium/phosphate gamma, la mutation de ce résidu en lysine réduit d'un facteur 1200 l'activité d'échange, suggérant un rôle catalytique pour ce résidu (Beraud-Dufour, 1998). Golberg a proposé un mécanisme où le glutamate expulse par gêne stérique et électrostatique le magnésium et le GDP de Arf1 (Goldberg, 1998). Ce mécanisme d'échange a été appelé, par analogie à "l'arginine finger" des GAP, le "Glutamate Finger" (Beraud-Dufour, 1998).

c-Les différentes familles de ArfGEF (pour revue voir (Jackson et Casanova, 2000) et (Donaldson et Jackson, 2000)). Les ArfGEF peuvent être classés en deux sous-familles sur la base de leur taille, de similarités de séquence et de leur sensibilité à la Bréfeldine A (BFA) (fig.18a). La BFA est une phytotoxine qui détruit l'intégrité de l'appareil de Golgi en bloquant certaines étapes du transport vésiculaire régulées par les protéines Arf (pour revue voir (Chardin et McCormick, 1999)).

Les grandes ArfGEF (>100kDa) possèdent des homologues dans tous les organismes examinés, et sont donc probablement impliquées dans des processus conservés dans l'évolution. La BFA inhibe l'activité d'échange de la plupart de ces protéines *in vitro* (fig.18). La sous-famille des grandes ArfGEF peut être subdivisée en deux groupes en fonction de similarité de séquence: le premier groupe inclut

Gea1, Gea2, GNOM/Emb30 et GBF1, le second inclut SEC7 de levure, BIG1 et BIG2 (fig.18a). Les petites ArfGEF (<100 kDa) ne possèdent pas d'homologue chez la levure, suggérant qu'elles soient impliquées dans des processus spécifiques aux cellules eucaryotes supérieures. La BFA n'inhibe pas l'activité d'échange de ces protéines, *in vitro* (fig.18a). La sous-famille des petites ArfGEF peut aussi être subdivisée en deux groupe en fonction de similarité de séquence: le première inclut ARNO, la Cytohesine1 et GRP1/ARNO3, le second inclut EFA6, seule (fig.18a).

Les ArfGEF sont principalement cytosoliques, mais elles s'associent à la membrane pour activer les protéines Arf. Les petites ArfGEF possèdent un domaine PH (Pleckstrin Homology) (fig.18a) qui interagit avec les phosphoinositols (PIP2 ou PIP3) insérés dans la membrane, et une région polybasique en C-Terminus qui renforce l'interaction de la GEF à la membrane. Parmi les autres domaines qui définissent ces protéines, on trouve des domaines coiled-coil impliqués dans les processus d'homodimérisation, des domaines riches en prolines et des domaines dont la fonction est encore inconnue (fig.18a).

d-Spécificité des ArfGEF pour les protéines Arf. *In vitro*, ARNO, Cytohesin1 et GRP1 catalysent l'échange nucléotidique plus efficacement sur Arf1 que sur les autres protéines Arf (Jackson et Casanova, 2000). Cependant, *in vivo* ARNO et GRP1 co-localisent à la membrane plasmique comme Arf6 ((Venkateswarlu et Cullen, 2000), (Frank, 1998) et (Langille, 1999)). La spécificité de ces ArfGEF pour les protéines Arf semblent être dépendant de leur localisation cellulaire. Pour EFA6, la situation est plus claire, car elle active *in vitro* Arf6 beaucoup plus efficacement que Arf1, et est impliquée *in vivo* comme Arf6 dans le transport du recyclage des vésicules endosomales et le réarrangement du cytosquelette au niveau de la membrane plasmique (Franco, 1999).

e-Spécificité des ArfGEF pour les phosphoinositols. La spécificité des ArfGEF se fait aussi à travers leur domaine PH (Pleckstrin Homology), qui permet aux ArfGEF de s'associer spécifiquement à la membrane en interagissant avec des phosphoinositols spécifiques. En effet, *in vitro* le domaine PH de GRP1 possède une affinité plus importante pour le PIP3 que pour le PIP2, alors que le domaine PH de

ARNO interagit aussi bien avec le PIP2 que le PIP3 (Klarlund, 2000). GRP1 possède un motif diglycine au niveau du domaine PH (Pleckstrin Homology), chez ARNO ce motif est constitué par trois glycines. L'addition d'une glycine supplémentaire au motif "diglycine" de GRP1 augmente l'affinité de son domaine PH pour le PIP2, et a peu d'effet sur l'affinité pour le PIP3. Alors que, la délétion d'une glycine sur le motif triglycine correspondant du domaine PH de ARNO réduit de façon importante l'affinité de ARNO pour le PIP2 mais pas celle pour le PIP3 (Klarlund, 2000).

2-Les ArfGAP (pour revue voir (Donaldson et Jackson, 2000) et (Donaldson, 2000)).

La GTPase des petites protéines G correspond à l'activité d'hydrolyse intrinsèque du GTP en GDP + phosphate inorganique de la protéine. La GTPase des petites protéines G est très faible, elle est catalysée par une protéine activatrice de la GTPase, une GAP.

a-Domaine GAP. Les ArfGAP sont des protéines multidomaines qui ont toutes en commun un domaine appelé GAP, d'environ 70 acides aminés, qui active l'activité GTPasique des protéines Arf (fig.18b). Les domaines GAP possèdent un motif "zinc finger" (CxxCX₁₆₋₁₇CxxC, ('C' pour cystéine, 'x' pour n'importe quel résidu)) en N-Terminus nécessaire pour l'activité GAP des ArfGAP (Cukierman, 1995). De plus, ces domaines possèdent tous une arginine conservée, proche du motif "zinc Finger" critique pour l'hydrolyse du GTP. En effet, la mutation de cette arginine en lysine diminue de 100.000 fois l'activité GAP de ASAP1 et PAP β ((Randazzo, 2000) et (Mandiyan, 1999)). Ces résultats suggèrent un mécanisme "arginine finger" pour l'hydrolyse du GTP des protéines Arf par leur GAP, comme cela a été proposé pour les petites protéines G Ras et Rho (pour revue voir (Ahmadian, 1997)).

b-Mécanisme d'hydrolyse du GTP de Arf1 par une GAP.

Mécanisme "Arginine Finger". Les structures de Ras et de RhoA avec leur GAP ont permis de définir un mécanisme d'hydrolyse du GTP qui leur est commun (pour revue voir (Ahmadian, 1997)). Dans un premier temps, la GAP stabilise et oriente le

Switch II de la petite protéine G, en particulier la glutamine du motif PM3 [DVGGQ] responsable de l'hydrolyse du GTP. Dans un second temps, la GAP introduit une arginine dans le site nucléotidique de la petite protéine G, qui interagit avec le phosphate gamma du GTP, et ainsi stabilise l'état de transition de la réaction d'hydrolyse. Ce mécanisme implique une arginine catalytique, c'est pourquoi il a été appelé "Arginine Finger".

L'hydrolyse du GTP des protéines Arf par leur GAP est-il aussi un mécanisme "Arginine Finger" ? Toutes les ArfGAP possèdent une arginine conservée proche de leur motif "zinc finger". La structure du domaine GAP de Arf-GAP1 en complexe avec Arf1 Δ 17-GDP (Goldberg, 1999) a été résolue. Il est à noter qu'il ne s'agit pas d'une ArfGAP en présence de son substrat, la forme GTP mais de son produit, la forme GDP. Les observations structurales faites sur cette structure ne semblent pas être en faveur d'un mécanisme "arginine finger" pour Arf-GAP1. En effet, aucun résidu du domaine GAP de Arf-GAP1 n'est à moins de 15 Å du site nucléotidique de Arf1 Δ 17-GDP. Les deux arginines conservées de Arf-GAP1 qui auraient pu jouer le rôle "d'arginine finger" sont impliquées soit dans une interaction à l'interface des deux protéines, soit dans des interactions stabilisatrices au niveau du motif "zinc finger". De plus, Golberg a montré que la présence du coatomère (effecteur de Arf1) augmente 1000 fois l'hydrolyse du GTP de Arf1 Δ 17 par Arf-GAP1 en solution (Goldberg, 1999). A partir de ces résultats, Golberg a proposé que Arf-GAP1 stabilise le Switch II de Arf1 Δ 17 en agissant à distance du site nucléotidique et en laissant le domaine effecteur (Switch I) libre. Le coatomère peut alors s'associer au complexe Arf1/Arf-GAP1 pour former un complexe ternaire, et ainsi augmenter l'affinité de Arf-GAP1 pour Arf1 et/ou assister Arf-GAP1 pour orienter la machinerie de la GTPase de Arf1. Golberg propose aussi que le coatomère peut suppléer une arginine au niveau du site nucléotidique de Arf1, permettant que le GTP soit hydrolysé par un mécanisme "Arginine Finger" (Goldberg, 1999).

Cependant, une étude récente a montré qu'en présence de vésicule, Arf-GAP1 stimule, par elle-même l'activité GTPasique de Arf1 myristoylée et chargée en GTP, et que la présence du coatomère n'a aucun effet additionnel sur la GTPase (Szafer, 2000). De plus, la structure du domaine GAP de PAP β (une ArfGAP, voir fig.18b) a

été résolue et montre que l'arginine conservée des ArfGAP se trouve à la surface de la protéine, et est entourée par des résidus hydrophobes. La mutation de ces résidus hydrophobes diminue l'activité catalytique de PAP β , suggérant que cette région soit le site d'interaction avec les protéines Arf et qu'elle emploie un mécanisme "arginine finger" pour hydrolyser le GTP (Mandiyan, 1999). Ces deux résultats sont contradictoires avec le modèle proposé par Golberg (Goldberg, 1999). La structure de l'état de transition Arf1-GDP-AIF₄/Arf-GAP1 et/ou de Arf1 Δ 17-GTP/Arf-GAP1 apporterait des informations complémentaires qui permettraient de mieux comprendre comment les protéines Arf sont désactivées.

c-Autres fonctions des ArfGAP. Les ArfGAP sont des protéines multidomaines, qui ont été très souvent identifiées comme des partenaires cellulaires de protéines impliquées dans la transduction du signal. En plus du domaine GAP, certaines de ces protéines possèdent des domaines "ankyrin repeat" impliqués dans l'interaction protéine/protéine, des domaines PH (Pleckstrin Homology) impliqués dans l'interaction avec les membranes, et des domaines SH3 impliqués dans l'interaction protéine/protéine avec des régions riches en proline (fig.18b).

Arf-GAP1 est recrutée au niveau de l'appareil de Golgi par Erd2, un récepteur reconnaissant le motif KDEL (Aoe, 1997). De plus, GIT1 est recrutée par un récepteur à 7 hélices transmembranaires (récepteur couplé aux protéines G) à la membrane plasmique. GIT1 a été isolée comme étant un partenaire de GRK, une kinase des récepteurs couplés aux protéines G (Premont, 1998), il régule l'internalisation du récepteur à la suite d'une stimulation par un ligand. La surexpression de GIT1 inhibe spécifiquement l'internalisation des récepteurs couplés aux protéines G qui sont normalement internalisés par la voie d'endocytose contrôlée par la clathrine (Claing, 2000). GIT1 est une ArfGAP active sur toutes les protéines Arf, même Arf6 (Vitale, 2000). Ces observations suggèrent que les protéines Arf soient couplées aux voies de signalisation induites par les récepteurs à 7 hélices transmembranaires. De plus, ASAP1 localise au niveau des adhésions focales en réponse à des facteurs de croissance, et au niveau du repliement membranaire formé par l'actine corticale (Randazzo, 2000). D'autres ArfGAP ont été identifiées comme interagissant avec des protéines des adhésions focales. Pkl (Paxillin-kinase-

linker) et Cat1/2 (Cool-associated, tyrosine phosphorylated) interagissent respectivement avec la Paxillin (Turner, 1999) et Cool/PIX (GEF pour CDC42) (Bagrodia, 1999). Gcs1 est une Arf-GAP de levure qui régule le cytosquelette d'actine *in vivo*, et interagit directement avec l'actine *in vitro* (Blader, 1999).

d-Spécificité des ArfGAP pour les protéines Arf. Les ArfGAP n'ont pas toutes la même spécificité pour les protéines Arf. Arf-GAP1 n'est pas active sur les protéines Arf de la classe I et II, mais pas sur la classe III (fig.18b). Par contre, les protéines GIT1 et GIT2 sont actives sur Arf1 et sur Arf6 (Vitale, 2000).

e-Spécificité des ArfGAP pour les phosphoinositol. Les ArfGAP interagissent avec les phospholipides ancrés dans la membrane, où elles pourront rencontrer et réguler les protéines Arf. Les protéines ASAP1 et PAP sont activées, *in vitro* par du PIP2 (Brown, 1998), (Andreev, 1999)), alors que Arf-GAP1 est activée, *in vitro* par du PIP2 et le DAG (Vitale, 2000). De plus, les protéines GIT1 et GIT2 sont activées, *in vitro* par du PIP3.

C-Arf1 et les protéines de la classe I et II

La protéine caractérisée en 1984 par Kahn et Coll., qui stimule l'ADP-ribosylation de G_{α} par CT-A (I-A-1) est en fait Arf1. Arf1 est l'isoforme la plus abondante de la famille Arf (90% des protéines Arf présentes dans une cellule). De ce fait et parce que, les autres protéines Arf ont été identifiées plus tardivement, Arf1 a été beaucoup plus caractérisée que ses isoformes et est un paradigme pour la famille des protéines ARF. Les classes I et II des protéines Arf semblent être similaires du point de vue de leur localisation et de leur fonction.

1-Localisations

Arf1 et Arf3 ont été identifiées par immunofluorescence et immunodétection par microscope électronique principalement au niveau de l'appareil de Golgi (Stearns, 1990b), et au niveau des endosomes (Whitney, 1995). Arf4 et 5 ont aussi été

identifiées au niveau des endosomes (Whitney, 1995). De plus, Arf5 a été identifiée au niveau de l'appareil de Golgi (Tsai, 1992).

2-Fonctions et partenaires

Des effecteurs sont des partenaires cellulaires qui interagissent avec la forme active des petites protéines G, et qui sont activés, transportés et/ou recrutés par celles-ci. Les effecteurs de Arf1 constituent une famille grandissante de protéines variées en séquence, en structure et en fonction.

Transport vésiculaire. Arf1 est impliquée dans le recrutement de certains constituants de manteaux protéiques, permettant le bourgeonnement des vésicules recouvertes d'un manteau (pour revue voir (Roth, 1999) et (Chavrier et Goud, 1999)).

Les vésicules COPI (Coatome proteins I) participent aux transports antérograde et rétrograde du réticulum endoplasmique à l'appareil de Golgi, et aux transports de la voie d'endocytose (pour revue voir (Cosson et Letourneur, 1997)). En 1991, les protéines Arf ont été identifiées comme composants protéiques des vésicules COPI accumulées au niveau de l'appareil de Golgi en présence de GTP γ S (Serafini, 1991). Une interaction directe entre Arf1-GTP et les sous-unités β et γ du coatomère a été mise en évidence par une approche de "photocross-linking" dirigée sur des résidus de Arf1 ((Zhao, 1997) et (Zhao , 1999)).

L'adaptateur AP1 (Adaptor proteins 1) des vésicules à Clathrine est impliqué dans les transports du réseau trans-golgien vers les endosomes et les lysosomes (pour revue voir (Pearse et Robinson, 1990)). Arf1-GTP γ S (et Arf5-GTP γ S, (Liang, 1997)) est nécessaire au recrutement de l'adaptateur AP1 aux membranes golgiennes ((Stamnes et Rothman, 1993) et (Traub, 1993)).

L'adaptateur AP3, plus récemment identifié est impliqué dans le trafic membranaire au niveau des endosomes/lysosomes. AP3 a été identifié comme étant un composant des vésicules non recouvertes de clathrine. Cependant, il a été montré par immunofluorescence et immunodétection par microscopie électronique, que AP3 colocalise avec la clathrine (Dell'Angelica , 1997). De même, Arf1-GTP γ S contrôle *in vitro* le recrutement des adaptateurs AP3 sur les membranes endosomales, et sur les

vésicules synaptiques de cellules neuronales et les vésicules de sécrétion des cellules neuroendocrines ((Faundez, 1998) et (Ooi, 1998)).

Les protéines GGA (Golgi-localizing, Gamma-adaptin ear homology, ARF binding protein) ont été très récemment identifiées comme étant des effecteurs directs des formes actives de Arf1 et Arf3. Les protéines GGA possèdent un domaine C-Terminal qui partage 70 % d'identité de séquence avec le domaine "oreille" des γ -adaptines. Cependant, contrairement aux γ -adaptines les GGA ne sont pas associées aux vésicules de clathrine, ni avec aucun des composants du complexe AP1. Les GGA sont des composants du manteau régulés par Arf1, impliqués dans le transport à travers le réseau trans-golgien et entre ce dernier et les lysosomes. ((Boman, 2000), (Hirst, 2000) et (Dell'Angelica, 2000)).

Le contrôle du recrutement de l'ensemble de ces manteaux donne à Arf1 un rôle central dans le trafic vésiculaire.

Régulation de la voie métabolique des lipides. Les enzymes qui modifient les lipides jouent un rôle important, mais encore mal compris dans le trafic membranaire. (Pour revue voir (Roth, 1999)).

La PLD (phospholipase D) hydrolyse la phosphatidylcholine (PC) en acide phosphatidique (PA) et choline. Le PA est, entre autres, un activateur de la phosphatidylinositol-4-phosphate 5 Kinase (PI(4)P5-Kinase) (Moritz, 1992) et un messenger secondaire de différents et importants processus cellulaires comme la transduction du signal, la différenciation cellulaire et les transports vésiculaires (pour revue voir (Exton, 1998)). Arf1-GTP γ S stimule une activité PLD à la membrane golgienne ((Cockcroft, 1994), (Brown, 1993) et (Ktistakis, 1995)).

La PI(4)P5-Kinase est une enzyme qui phosphoryle des phosphoinositol monophosphate (PIP) en phosphoinositol diphosphate (PIP₂). Le PIP₂ est un phospholipide membranaire important qui influence nombre d'évènements dans la cellule comme le trafic membranaire, la dynamique de l'actine et les cascades de signalisation à la membrane plasmique (pour revue voir (Toker, 1998)). De plus, il est un facteur nécessaire à l'activation de la PLD (Liscovitch, 1994) et recrute à la membrane certaines ArfGEF et ArfGAP *via* un domaine PH (Pleckstrin Homology). Le

PIP₂ est reporté comme étant localisé au niveau de l'appareil de Golgi, des lysosomes/endosomes et de la membrane plasmique (Roth, 1999). Arf1-GTP interagit directement avec la PI(4)P5-Kinase de type I, et est responsable de la synthèse de PI(4,5)P₂ au niveau de l'appareil de Golgi (Jones, 2000). De plus il a été montré que Arf (purifiée à partir du cytosol de cerveau de bovins) recrute la PI(4)-Kinase β et une PI(4)P5-Kinase inconnue au niveau de l'appareil de Golgi, ce qui a pour effet de stimuler la synthèse de PI(4)P et de PI(4,5)P₂ de façon GTP-dépendant, et ceci de façon indépendante à l'activation des protéines du manteaux et de la PLD (Godi, 1999). L'acide phosphatidique (PA produit de l'hydrolyse de la phosphatidylcholine (PC) par la PLD est un activateur spécifique de la PI(4)P5-Kinase, stimulant ainsi la synthèse de PIP₂ (Moritz, 1992).

La capacité des protéines Arf à réguler la production de PIP₂, plus ou moins indirectement par l'activation de la PLD ou de la PI(4)P5-Kinase, suggère que les protéines Arf permettent le recrutement à la membrane des ArfGAP et des ArfGEF. Roth a proposé un modèle qui suggère que les protéines Arf s'autorégulent *via* la régulation de la production du PIP₂ (pour revue voir (Roth, 1999)).

Autres partenaires. Il a été montré que certaines protéines interagissaient directement avec Arf1 ou les protéines de la classe I ou II. Peu d'informations sont disponibles sur les phénotypes engendrés par ces interactions dans la cellule, c'est pourquoi nous resterons très prudents quant au terme d'effecteur pour ces protéines.

L'Arfaptine 1 (Arf-apto ("apto" en grec="se fixe à")) a été identifiée par double hybride comme interagissant avec Arf3-Q71L, mutant défectueux pour la GTPase (Kanoh, 1997). L'Arfaptine 1 est recrutée au niveau de l'appareil de Golgi ce qui en ferait une cible privilégiée de Arf1. Des données récentes semblent indiquer que l'Arfaptine 1 interagit aussi bien avec Arf1-GTP que Arf1-GDP. Il semblerait également qu'elle puisse interagir avec d'autres petites protéines G (Communication personnelle du laboratoire de Marc Chabre). Ceci pose le problème de la spécificité de l'Arfaptine 1 et de son rôle réel comme effecteur de Arf1.

Arf1-GDP interagit avec les sous-unités $\beta\gamma$ des protéines G hétérotrimériques *in vitro* en présence de vésicules de phospholipides, mais on ne connaît pas encore le rôle physiologique de cette interaction (Franco, 1995b).

La queue C-Terminale de MKLP1 (Mitotic Kinesin-Like Protein) a été identifiée comme interagissant avec Arf3-Q71L (mutant défectueux pour la GTPase) par double hybride. La queue C-Terminale de MKLP1 ne possède pas d'homologie de séquence avec d'autres partenaires des protéines Arf. De plus, il a été montré par mutagenèse dirigée qu'une dizaine de résidus au niveau des régions Switch I et II de Arf3 activée, perdaient la capacité d'interagir directement avec MKLP1 (Boman, 1999).

PICK1 (Protein Interacting with C Kinase 1) a été identifiée par double hybride comme interagissant avec Arf1/3 activées, mais pas avec Arf5/6 activées ni avec les formes GDP des protéines Arf. PICK1 possède une région homologue aux Arfaptines 1 et 2, qui interagissent directement avec les protéines Arf. Cependant, Arf1 et Arf3 activées n'interagissent pas avec le domaine homologue aux Arfaptine de PICK1, mais avec un domaine PDZ (motif qui participe à l'organisation de multicomplexes protéiques ("scaffold")) (Takeya, 2000).

L'Arfophiline interagit par double hybride avec Arf5-Q71L, mutant défectueux pour la GTPase, contrairement à Arf3-Q71L. Par double hybride, il a été montré que la chimère N3-Arf5-Q71L (extension N-Terminale de Arf5-Q71 remplacée par celle de Arf3) n'interagit pas avec l'Arfophiline, alors que la chimère N5-Arf3-Q71L (extension N-Terminale de Arf3-Q71 remplacée par celle de Arf5) interagit avec l'Arfophiline, suggérant que l'extension N-Terminale de Arf5 est le site d'interaction directe de l'Arfophiline. Ces résultats suggèrent que l'Arfophiline est un partenaire spécifique de la classe II et non de la classe I des protéines Arf. L'Arfophiline recombinante surexprimée dans des cellules CHO-K1 est identifiée par fractionnement dans le cytosol et au niveau des fractions membranaires en association avec Arf5Q71 (mutant défectueux pour la GTPase). Le rôle cellulaire de l'Arfophiline n'est pas encore établi (Shin, 1999).

3-Le cycle GDP/GTP de Arf1 est associé à un cycle cytosol/membrane

Le cycle GDP/GTP de Arf1 est particulier par rapport aux autres petites protéines G, en cela que l'échange du nucléotide (étape d'activation) nécessite que

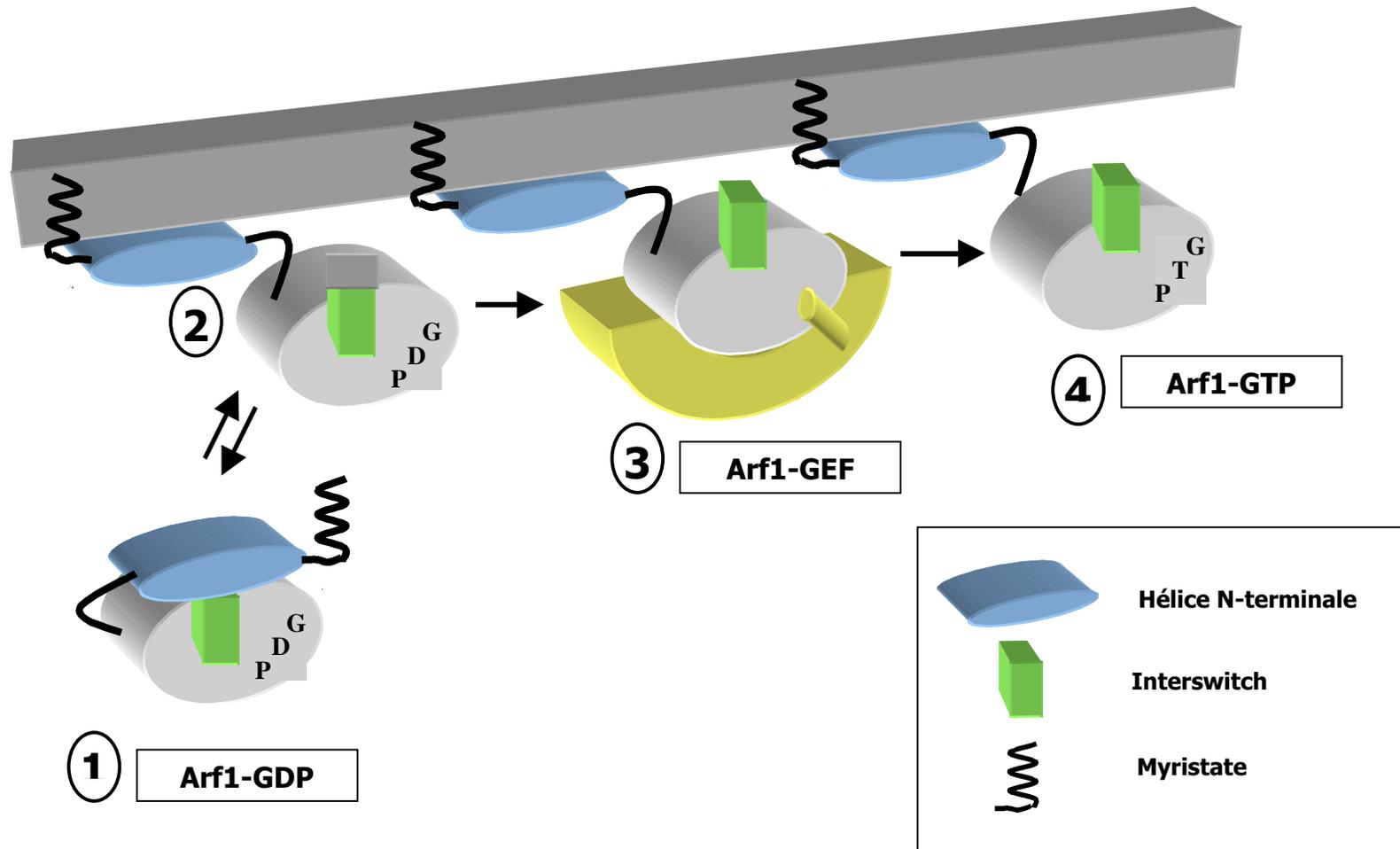


Figure 19 : Mécanisme d'activation de Arf1 par sa GEF en présence de membrane

La forme inactive de Arf1 liée au GDP alterne entre une forme cytosolique : hélice N-terminale plaquée contre la protéine et interswitch rentré (1) et une forme fixée à la membrane (2). Arf1-GDP fixée à la membrane s'associe avec sa GEF. Le complexe Arf1/GEF vide de nucléotide (3) se trouve à la membrane : interswitch en position sortie, empêchant l'hélice N-Terminale fixée à la membrane de se plaquer a nouveau contre la protéine, et le doigt glutamate de la GEF dans le site nucléotidique. La forme active liée au GTP reste fixée aux membranes : interswitch sorti (4)

Arf1 s'associe à la membrane, et que l'hydrolyse du GTP (étape d'inactivation) conduit à la dissociation de Arf1 de la membrane. L'étape d'activation de Arf1 a été largement étudiée *in vitro*, et a permis de proposer un modèle. L'étape d'inactivation de Arf1 est encore mal comprise et fait l'objet de controverses (Chapitre 2-I-B-2-d).

Mécanisme d'activation de Arf1 (fig.19). Arf1-GDP alterne entre une forme majoritairement cytosolique et une forme faiblement associée à la membrane (Franco, 1995a). *In vitro*, la présence de lipide est indispensable pour que Arf1 échange son nucléotide (Kahn et Gilman, 1986), suggérant que *in vivo* Arf1 s'associe aux membranes avant de pouvoir être activée. L'association de Arf1 à la membrane nécessite la présence de l'extension N-Terminale. En effet, il a été montré que Arf1 tronquée de ses 17 premiers résidus échange son nucléotide sans la présence de lipide (Kahn, 1992). La structure de Arf1-GDP (fig.20a) ((Amor, 1994), (Greasley, 1995)) montre que l'extension N-Terminale est repliée en une hélice amphiphile, et que la face hydrophobe de cette hélice est plaquée contre une poche hydrophobe de la protéine. La mutation des résidus hydrophobes de l'hélice N-Terminale augmente la dissociation de Arf1 des membranes, suggérant que ces résidus sont en interaction directe avec la membrane (Antonny, 1997). Antonny et coll. proposent que l'hélice N-Terminale de Arf1-GDP "bascule" pour venir interagir avec la membrane: cette association protéine/membrane plus l'insertion du myristate dans la membrane semble être le moyen utilisé par Arf1 pour s'associer à la membrane.

A la membrane, Arf1 rencontre son facteur d'échange (GEF) ; alors que Arf1-GDP est faiblement associée à la membrane, Arf1 en complexe avec son facteur d'échange est fortement associée aux membranes (Paris, 1997). Cette différence d'affinité peut être expliqué par les changements de conformation de Arf1 induits par son facteur d'échange. En effet, la structure de Arf1 Δ 17/sec7-Gea2 vide de nucléotide et en absence de l'hélice N-Terminale de Arf1 (Arf1 Δ 17 ; pour permettre au complexe d'être soluble) (fig.20c) (Goldberg, 1998), montre que l'Interswitch (région β 2-L3- β 3) est translaté vers la poche hydrophobe où l'hélice N-Terminale se trouvait dans la structure de Arf1-GDP. Il a été proposé que l'interaction du facteur d'échange avec Arf1 induise le déplacement de l'Interswitch dans la poche hydrophobe ; celle-ci étant laissée vacante par l'hélice N-Terminale qui est plaquée

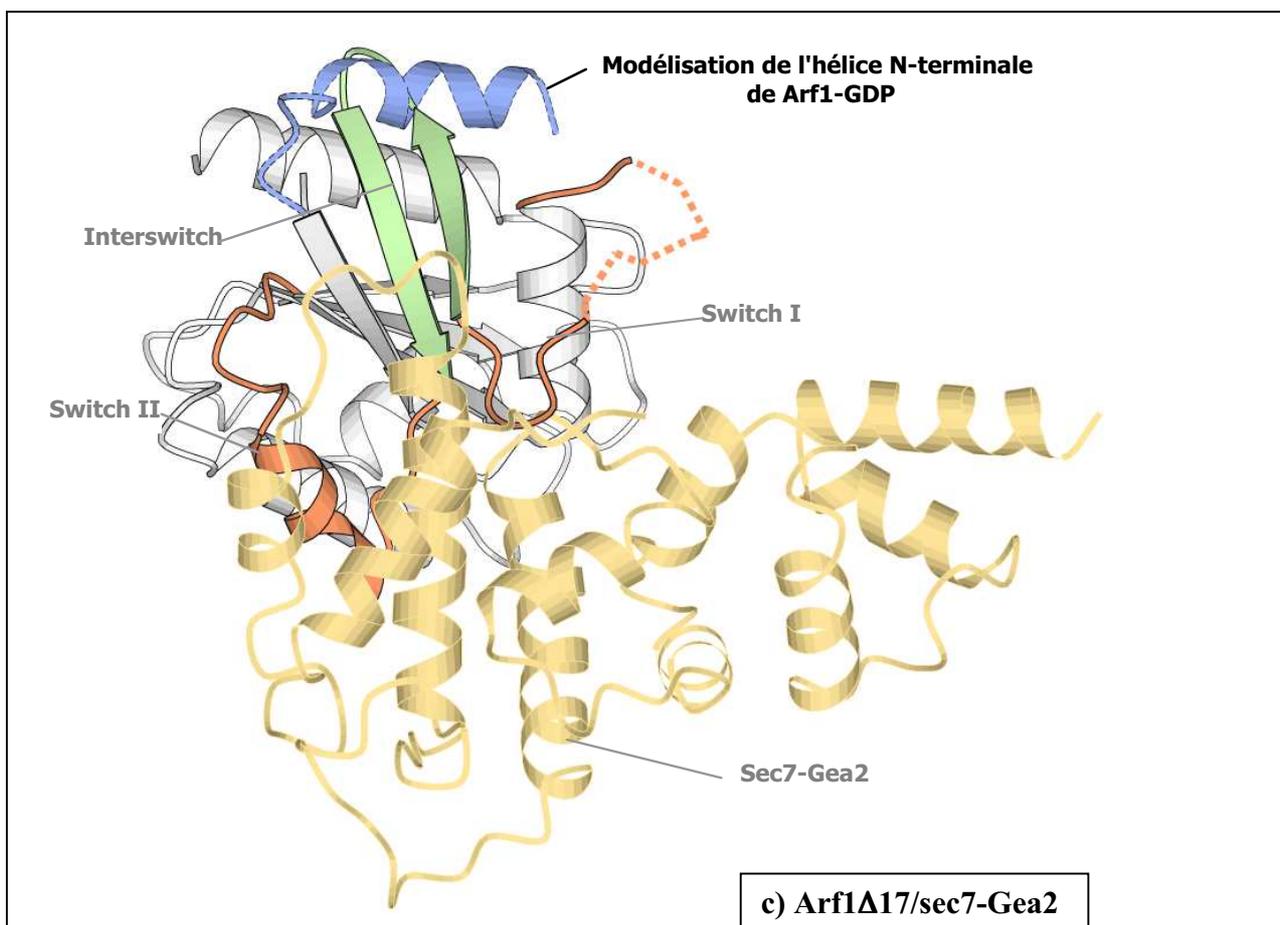
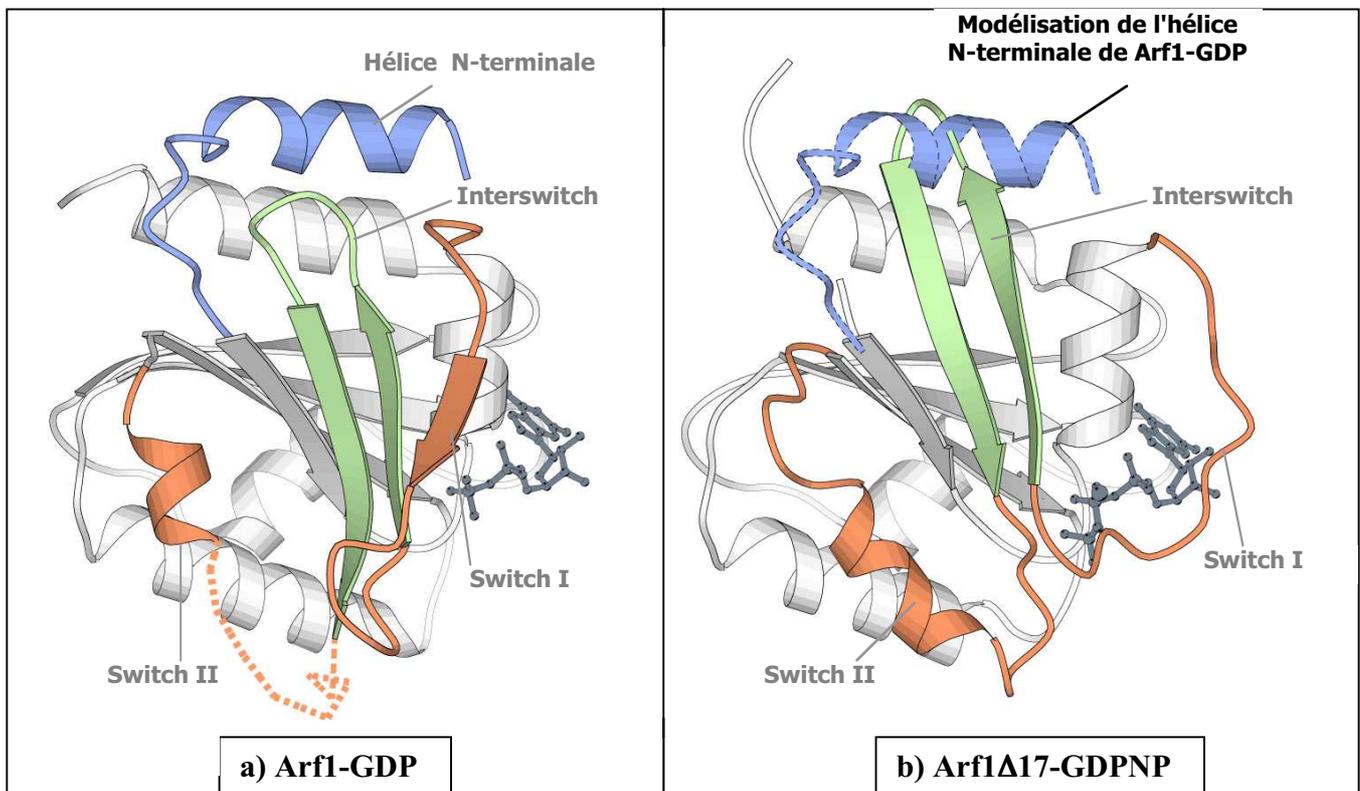


Figure 20: Structures tridimensionnelles de Arf1. a) Structure de Arf1-GDP b) structure de Arf1 Δ 17-GDPNP c) Structure de Arf1 Δ 17/sec7-Gea2.

Les nucléotides sont représentés en gris foncé, les switch I et II en orange, l'Interswitch en vert et l'hélice N-Terminale en bleu. La ArfGEF, Sec7-Gea2 est colorée en jaune. Les régions désordonnées dans le cristal sont indiquées par des pointillés. L'hélice N-terminale de Arf1-GDP a été modélisée sur les figures b) et c) dans le but de montrer l'encombrement créé par la conformation "sortie" de l'interswitch de Arf1 Δ 17-GDPNP et de Arf1 Δ 17/sec7-Gea2.

contre la membrane. Le changement de conformation de l'Interswitch empêche l'hélice N-Terminale de basculer contre la protéine et empêche Arf1 de retourner dans le cytosol (Goldberg, 1998). Le facteur d'échange va expulser le GDP du site nucléotidique, qui sera remplacé par du GTP en plus grande quantité dans la cellule (voir mécanisme d'échange Chapitre 2-I-B-1-b). Le facteur d'échange se dissocie de Arf1-GTP.

Arf1-GTP est exclusivement et fortement associée aux membranes (Kahn et Gilman, 1986). La structure de Arf1 Δ 17-GDPNHP tronquée de son extension N-Terminale (pour permettre à la protéine d'être soluble et donc cristallisable) (fig.20b) (Goldberg, 1998) montre que l'Interswitch est dans la même position que celui du complexe Arf1 Δ 17/sec7-Gea2 vide de nucléotide, c'est-à-dire translaté vers la poche hydrophobe. Cette position est encombrante pour le retour de l'hélice N-Terminale vers la protéine, et défavorise la dissociation de Arf1 de la membrane.

D-ARF6

Arf6 a été identifiée en 1991 par Tsuchiya et collaborateurs par le criblage d'une librairie en utilisant comme sonde l'ADNc de Arf2 bovin (Tsuchiya, 1991). Arf6 est identique au produit du gène de poulet CPS1 identifié en 1986, excepté pour une différence de séquence, la sérine 158 de Arf6 est substituée par une thréonine chez CSP1p (Alsip et Konkel, 1986). Arf6 est la protéine la plus divergente de la famille Arf, plus précisément au niveau de la région N-Terminale et dans la moitié C-Terminale (fig.17). Cependant, les régions qui interagissent avec les effecteurs sont presque identiques (Switch I et II). Arf6 est exprimée de façon ubiquitaire, mais pas de manière aussi abondante que son isoforme Arf1. Seuls les tissus ovariens expriment Arf6 de façon importante et inexplicée, soit 0.2% de la totalité des protéines (Cavenagh, 1996).

Arf6 a fait l'objet de différentes études qui ont permis de montrer qu'elle différait des autres protéines Arf à divers égards.

1-Localisations

Arf6, contrairement à Arf1 n'est pas localisée au niveau de l'appareil de Golgi, mais est, d'une façon générale, trouvée soit à la membrane plasmique, soit sur des compartiments de type endosomal. Toutefois, la localisation de Arf6 ne semble pas être généralisable d'un type cellulaire à l'autre et d'un niveau d'expression à l'autre, de plus certains résultats semblent contradictoires.

En effet des observations par immunodétection par microscopie électronique dans les cellules CHO révèlent que l'expression d'un mutant constitutivement actif de Arf6 (Arf6Q67L) induit la localisation de la protéine à la membrane plasmique, alors qu'un mutant constitutivement inactif de Arf6 (Arf6T27N) induit la localisation de la protéine au niveau des endosomes précoces (D'Souza-Schorey, 1995) et d'un compartiment endosomal de recyclage périnucléaire (D'Souza-Schorey, 1998). Cependant, Cavenagh et coll. ont montré par immunofluorescence avec un anticorps monoclonal spécifique de Arf6 que Arf6 endogène se trouve uniquement à la membrane plasmique dans les cellules CHO (Cavenagh, 1996). D'autre part, la stimulation de cellule chromaffine (par une solution de Locke contenant soit 10 μ M de nicotine soit 59mM de K⁺) induit la translocation de Arf6 endogène des granules de sécrétion à la membrane plasmique (Caumont, 1998). De plus, dans les cellules épithéliales (cellules MDCK et LLCPK1), Arf6 sauvage et Arf6Q67L (mutant défectueux pour la GTPase) sont retrouvées à la membrane apicale, et Arf6T27N (mutant défectueux pour la fixation du nucléotide) est retrouvée à la membrane basolatérale (Altschuler, 1999). Alors que, Arf1 alterne entre une localisation cytosolique et associée à la membrane (Kahn et Gilman, 1986), les différentes études sur Arf6 (citées précédemment) ne mentionnent pas l'existence d'une fraction cytosolique de la protéine. Cependant, dans différents types cellulaires en différenciation 5 à 50% de Arf6 endogène a été identifiée dans le cytosol, par fractionnement subcellulaire en utilisant un anticorps monoclonal spécifique de Arf6 (Yang, 1998). De plus, dans les cellules CHO, Arf6 endogène est identifiée uniquement associée à la membrane lorsque le fractionnement subcellulaire est fait en présence d'EDTA (agent chélateur) (Cavenagh, 1996). Dans les mêmes conditions, mais sans EDTA et à concentration physiologique de magnésium, Arf6 est retrouvée en quantité non négligeables dans le cytosol (Gaschet et Hsu, 1999).

2-Fonctions

Transport vésiculaire. La surexpression de Arf6 sauvage ou de Arf6-Q67L (mutant défectueux pour la GTPase) dans les cellules CHO conduit à la redistribution des récepteurs de la transferrine à la surface de la cellule, et à la diminution de la concentration intracellulaire de la transferrine. Cette étude suggère que Arf6 joue un rôle de régulateur dans l'endocytose induit par les récepteurs (D'Souza-Schorey, 1995). Dans les cellules HeLa, Arf6 joue un rôle dans la régulation de la voie de recyclage des membranes, de la membrane plasmique vers un compartiment "tubulaire" non identifié (Radhakrishna et Donaldson, 1997). L'expression de mutants de Arf6 défectueux pour l'hydrolyse du GTP (Q67L) ou pour la fixation du nucléotide (T27N) inhibe la phagocytose d'érythrocyte recouvert d'IgG par les macrophages, suggérant que Arf6 joue un rôle important dans la phagocytose induite par les récepteurs Fc γ (Zhang , 1998). Arf1 est impliquée dans le recrutement de différentes protéines du manteaux, qu'en est-il pour Arf6 ? Bien que la surexpression de Arf6T27N dans les fibroblastes conduise à l'accumulation massive de vésicules d'endocytose recouvertes d'un manteau protéique, il a été montré que Arf6 n'altère ni la distribution de COPI ni celle de la γ -adaptine au cours de ce processus (Peters , 1995). Dans les cellules HeLa, la surexpression de Arf6T27N n'affecte pas non plus la distribution de l'adaptateur AP3 des vésicules à clathrine (Ooi, 1998). Par contre, dans les cellules épithéliales, la surexpression de Arf6-Q67L conduit à l'augmentation de bourgeons recouverts de clathrine sur la surface apicale de la membrane plasmique. Ceci suggère que Arf6 est un régulateur de la voie d'endocytose induite par la clathrine à la surface apicale des cellules épithéliales (Altschuler, 1999).

La stimulation de cellules chromaffines intactes déclenche la rapide dissociation de Arf6 des granules de sécrétion, cette dissociation peut être bloquée par du fluorure d'aluminium (un activateur des protéines G hétérotrimériques). Ces résultats suggèrent que Arf6 participe dans les cellules chromaffines à l'exocytose contrôlée par les protéines G hétérotrimériques (Galas, 1997). De plus, il a été proposé que ce processus soit concomitant à l'activation d'une activité PLD à la membrane plasmique (Caumont, 1998). Dans les adipocytes 3T3 L1 stimulés par l'insuline, un peptide correspondant à la région N-Terminale de Arf6 inhibe le transport du glucose et la translocation du récepteur GLUT4. Il a été suggéré que Arf6 joue un rôle dans la

redistribution à la membrane plasmique du récepteur GLUT4 (Millar, 1999). Toutefois, cette suggestion semble être controversée, en effet l'infection dans des adipocytes 3T3 L1 d'adénovirus recombinants exprimant Arf6 sauvage n'affecte ni le transport du glucose, ni la distribution du récepteur GLUT4 (ni le récepteur GLUT1). Par contre, la sécrétion de l'adipsine, une protéase à sérine spécifiquement exprimée dans les adipocytes est augmentée par l'expression de Arf6 sauvage (Yang et Mueckler, 1999).

Régulateur de la voie métabolique des lipides. Comme les autres protéines de la famille Arf, Arf6 est impliquée dans la régulation d'enzymes qui modifient les lipides. Arf6-GTP γ S stimule l'activité PLD *in vitro*, de façon aussi efficace, dans les mêmes conditions que Arf1 et Arf5 (Massenburg, 1994). Dans le cytosol de cerveau bovin, une protéine Arf a été purifiée et identifiée comme étant un activateur de la Phosphatidylinositol 4-Phosphate 5-Kinase α [PI(4)P5K α] (Honda, 1999). *In vitro*, cette activation nécessite la présence de PA, produit de l'hydrolyse du phosphatidylcholine (PC) par la PLD. Dans des cellules HeLa il a été observé par immunofluorescence que PI(4)P5K α colocalise avec Arf6 au niveau de repliement membranaire de la membrane plasmique, et non avec Arf1 et Arf5. Ces résultats suggèrent que la PI(4)P5K α est un effecteur directe de Arf6 au niveau des repliements de la membrane plasmique (Honda, 1999). De plus, dans les cellules HeLa, la stimulation de la Phosphatidylinositol 3-Kinase [PI3K] par un agoniste active une voie qui conduit à la translocation de Arf6 à la membrane plasmique, phénomène qui indique une augmentation de la forme GTP de Arf6 (Venkateswarlu et Cullen, 2000).

Réarrangement du cytosquelette d'actine. Des cellules HeLa transfectées avec Arf6 sauvage, étiquetée par un épitope et traitées avec du fluorure d'aluminium, composé chimique qui semble activer indirectement la protéine Arf1 (Finazzi, 1994) induit une redistribution de Arf6 et de l'actine au niveau de site particulier de la membrane plasmique, qui avec le temps forme des protubérances. Les accumulations d'actines sont différentes de celles qui sont observées dans des cellules transfectées avec RhoA ou Rac1 (pour revue voir (Van Aelst et D'Souza-

Schorey, 1997)). Ces résultats suggèrent un rôle pour Arf6 au niveau du réarrangement du cytosquelette d'actine à la membrane plasmique dans les cellules HeLa (Radhakrishna , 1996).

Dans des cellules CHO, la surexpression de Arf6-Q67L, mutant défectueux pour la GTPase remodèle le cytosquelette d'actine en induisant la polymérisation de l'actine sous la membrane plasmique. Ce réarrangement du cytosquelette est inhibé lorsque Arf6-Q67L est co-exprimée avec des mutants tronqués de POR1, protéine qui interagit avec Rac1 et qui est impliquée dans la formation des protubérances de la membrane, alors qu'il n'est pas inhibé lorsque Arf6-Q67L est co-exprimée avec un mutant dominant négatif de Rac1 (S17N) (D'Souza-Schorey , 1997). De plus, une interaction directe entre Arf6 et POR1 a été observée par double hybride (Chien, 1991) et par des tests d'interactions *in vitro*. Ces tests ont permis d'observer aussi que la forme GTP de Arf6 interagit préférentiellement avec POR1 (D'Souza-Schorey, 1997). Ces résultats suggèrent que la protéine POR1 joue un rôle régulateur important dans le réarrangement du cytosquelette induit par Arf6 et Rac1 à la membrane plasmique (D'Souza-Schorey, 1997). Dans des cellules de différents types, les protéines Arf6 et Rac1 endogènes colocalisent au niveau de la membrane plasmique et au niveau du compartiment endosomal périnucléaire. Quel est le lien entre Arf6 et Rac1 au niveau du réarrangement du cytosquelette ? Dans des cellules HeLa, l'expression d'un mutant défectueux pour la fixation du nucléotide de Arf6 (T27N) inhibe le réarrangement du cytosquelette observé lorsque Rac1 sauvage ou Rac1-Q61L sont exprimées. Par contre la co-expression d'un mutant défectueux dans la GTPase de Rac1 (T17N) avec Arf6 sauvage n'inhibe pas les protubérances induites après traitement des cellules par du fluorure d'aluminium. Ces résultats suggèrent que Arf6 puisse par elle-même altérer l'actine corticale et influencer la capacité de Rac1 à former des accumulations d'actines (Radhakrishna , 1999).

Est-ce que la régulation du trafic membranaire induit par Arf6 est couplée à l'organisation de l'actine du cytosquelette induit par Arf6 ? En effet, dans les cellules chromaffines, Arf6 est impliquée dans l'exocytose régulée, processus qui requiert l'organisation du cytosquelette d'actine (Caumont, 1998). Ce résultat ne permet pas de déterminer si Arf6 utilise le réarrangement du cytosquelette d'actine à la

membrane plasmique pour la régulation du trafic membranaire. D'autres études seraient nécessaires pour clarifier le lien entre ces deux fonctions.

Désensibilisation des récepteurs des protéines G hétérotrimériques. La désensibilisation des récepteurs couplés aux protéines G hétérotrimériques est un phénomène ubiquitaire caractérisé par l'inhibition de l'activité des effecteurs sous la stimulation persistante d'agonistes.

Le récepteur à l'hormone gonadotrope chorionique, activé par l'hormone lutéotrope (LH/CGR) appartient à la famille des récepteurs à 7 hélices transmembranaires qui transduisent le signal *via* les protéines G hétérotrimériques et des effecteurs dont l'adénylate cyclase. D'une part, la préincubation de ARNO activée dans des cellules folliculaires réduit l'activation de l'adénylate cyclase induite par LH/CGR, d'autre part d'un peptide équivalent à la région N-Terminale de Arf6 bloque la désensibilisation de l'activation de l'adénylate cyclase induit par LH/CGR. D'autre part, la préincubation d'un peptide équivalent à la région N-Terminale de Arf1. Ces résultats suggèrent que la désensibilisation de LH/CGR dépend de l'activation de Arf6 (Mukherjee, 2000). De plus, la surexpression de la protéine GIT1, ArfGAP active sur les protéines Arf (Arf6 incluse) dans des cellules HEK293 conduit à une diminution de la séquestration à la surface de la cellule du récepteur β 2-adrenergique couplé aux protéines G hétérotrimériques. L'inhibition de la séquestration du récepteur conduit à l'augmentation de la phosphorylation et de la désensibilisation de celui-ci. De plus, ces effets nécessitent la présence du domaine GAP de GIT1. Ces résultats suggèrent une fonction de régulation pour les protéines Arf dans l'endocytose du récepteur β 2-adrenergique (Premont, 1998).

Le rôle de Arf6 dans ces processus doit maintenant être étudié.

Autres partenaires. Des expériences d'immunoprécipitation et de "cross-linking" chimique dans des cellules chromaffines suggèrent que Arf6 interagisse avec le complexe $\beta\gamma$ des protéines G hétérotrimériques (Galas, 1997).

3-Les particularités biochimiques de Arf6

Arf6 est unique dans la famille des protéines Arf pour sa capacité à être activée sans la présence de lipide et de détergent (Price, 1992). En effet, alors que Arf1 entière (non myristoylée) ne peut pas être activée sans la présence de membrane, Arf6-GTP (non myristoylée) peut l'être. Par conséquent, Arf6 entière (non myristoylée) peut être étudiée en solution et être cristallisée entière quel que soit le nucléotide qui lui est fixé, contrairement à Arf1 entière (non myristoylée) qui ne peut pas être cristallisée lorsqu'elle est associée à du GTP. De plus, comme Arf1, Arf6 ne possède pas d'activité GTPase intrinsèque mesurable (Welsh, 1994).

II-Etude structurale de ARF6 en complexe avec du GDP

L'étude structurale de Arf6 en complexe avec du GDP est présentée dans cette partie. L'analyse complète de cette étude est présentée dans l'article "Structure of Arf6-GDP suggests a basis for nucleotide exchange factors specificity" de Julie Ménétrey et Collaborateurs, publiée dans Nature Structural Biology. L'article sera introduit par une présentation des points forts de cette étude. De plus, les données expérimentales de l'étude structurale qui n'ont pas été mentionnées dans l'article seront présentées.

A-Article 2

L'analyse de la structure de Arf6-GDP est reportée dans la publication jointe au manuscrit. Je présente ici les points forts de cette analyse :

- Le repliement structural général de Arf6-GDP est similaire au repliement général des petites protéines G ($\alpha 5\beta 6$) et plus particulièrement au repliement particulier de Arf1-GDP ($\alpha 6\beta 7$). L'hélice N-Terminale et l'Interswitch de Arf6-GDP ont la même conformation que ceux de Arf1-GDP, suggérant que Arf6-GDP possède les caractéristiques structurales permettant à Arf1-GDP d'être cytosolique (voir fig.1b dans l'article 2).
- La structure de Arf6-GDP révèle que les régions Switch sont les régions qui divergent le plus avec la structure de Arf1-GDP. Bien que Arf1 et Arf6 aient des régions Switch I et II presque identiques en séquence (fig.4), ceux-ci sont structurellement différents (voir fig.1b dans l'article 2). Ces différences structurales sont la conséquence de différences de séquence ponctuelles situées aux positions charnières des Switch I et II (voir fig.2a dans l'article 2). Les régions Switch I et II sont les principaux sites d'interaction avec les partenaires cellulaires des petites protéines G. En conséquence, bien que possédant des sites de reconnaissance presque identiques en séquence, la structure de ces régions permet aux différents partenaires cellulaires de Arf1-GDP et de Arf6-GDP (principalement leur facteur d'échange) de les distinguer.

- Une différence de séquence Arf1-Ile42/Arf6-Ser38 éloignée du site nucléotidique est responsable de l'élimination d'une interaction stabilisatrice au niveau du site nucléotidique chez Arf6 (voir fig.3a de l'article 2), suggérant un rôle important pour ce résidu au niveau de l'échange du nucléotide. Le rôle de ce résidu a pu être étudié par nos collègues de l'institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire par mutagénèse dirigée basée sur la structure, et a permis de confirmer l'importance de ce résidu pour l'affinité des protéines Arf1 et Arf6 pour le GDP (voir fig.3b et 3c dans l'article 2).

letters

Structure of Arf6–GDP suggests a basis for guanine nucleotide exchange factors specificity

Julie Ménétrey¹, Eric Macia², Sebastiano Pasqualato¹, Michel Franco² and Jacqueline Cherfils¹

¹Laboratoire d'Enzymologie et Biochimie Structurales, CNRS, Avenue de la Terrasse, 91198 Gif-sur-Yvette, France. ²Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire, CNRS, 660 Route des Lucioles, 06560 Valbonne, France.

Arf6 is an isoform of Arf that localizes at the periphery of the cell where it has an essential role in endocytotic pathways. Its function does not overlap with that of Arf1, although the two proteins share ~70% sequence identity and they have switch regions, whose conformation depends on the nature of the guanine nucleotide, with almost identical sequences. The crystal structure of Arf6–GDP at 2.3 Å shows that it has a conformation similar to that of Arf1–GDP, which cannot bind membranes with high affinity. Significantly, the switch regions of Arf6 deviate by 2–5 Å from those of Arf1. These differences are a consequence of the shorter N-terminal linker of Arf6 and of discrete sequence changes between Arf6 and Arf1. Mutational analysis shows that one of the positions which differs between Arf1 and Arf6 affects the configuration of the nucleotide binding site and thus the nucleotide binding properties of the Arf variant. Altogether, our results provide a structural basis for understanding how Arf1 and Arf6 can be distinguished by their guanine nucleotide exchange factors and suggest a model for the nucleotide/membrane cycle of Arf6.

Small GTP binding proteins of the ADP ribosylation factor (Arf) family are ubiquitously involved in membrane trafficking events¹. The most divergent members of the mammalian Arf family, Arf1 and Arf6, have distinct cellular functions despite sharing 67% sequence identity². Arf1 regulates the recruitment of vesicle coat polymers, including COPI1, to the Golgi apparatus. No role in recruiting a vesicle coat polymer has been identified to date for Arf6, which acts at the plasma membrane where it may couple endosomal membrane traffic to aspects of actin organization^{3–8} and control regulated endocytosis and exocytosis^{9–11}. Arf proteins interact with various regulatory and effector proteins¹², including a growing number of guanine nucleotide exchange factors (ArfGEFs) bearing a catalytic Sec7 domain¹³. Identifying the specificity of these ArfGEFs for a particular Arf is currently an important issue for understanding the function of Arf proteins *in vivo*.

Arf proteins undergo the GDP/GTP structural cycle that is common to small GTP binding proteins, but they also feature a unique membrane driven switch. Biochemical and crystallographic studies have provided a consistent picture of how this dual nucleotide/membrane switch functions in Arf1 (refs 14–18). Arf1–GDP partitions between the cytosol and a low affinity complex with membranes, whereas Arf1–GTP associates tightly with membranes. This stable interaction is mediated by the myristoylated N-terminal helix, which flips open upon binding GTP and inserts into the lipid bilayer. Communication between the N-terminal helix and the nucleotide binding site, which are located on opposite sides of the protein, is mediated by two β-strands and a β-hairpin loop that connect the switch I and II regions (called the interswitch region hereafter; Fig. 1b)¹⁷. The interswitch region is

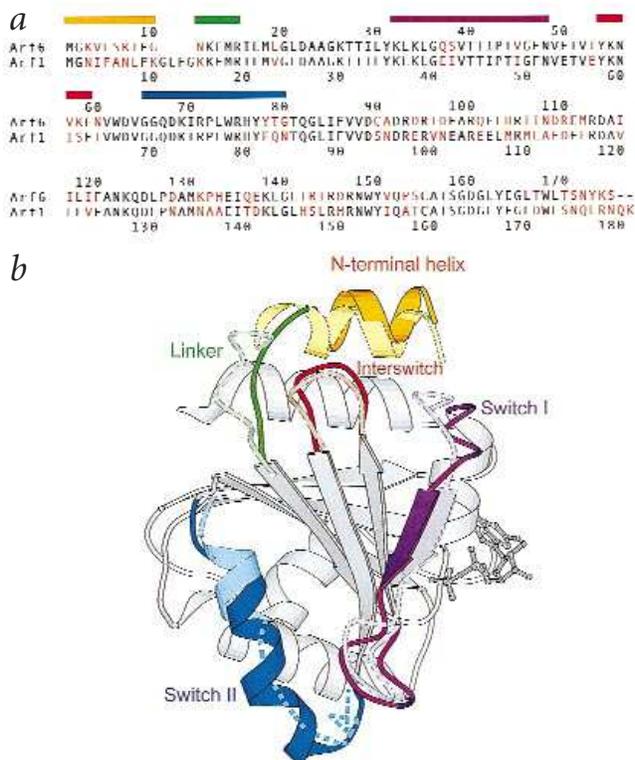


Fig. 1 Structure of Arf6–GDP. **a**, Structure-based sequence alignment. Residues that differ between Arf1 and Arf6 are in red. **b**, Superposition of Arf1–GDP¹⁴ and Arf6–GDP. The superposition excluded the N-terminal helix and linker, the switch regions and the interswitch loop (r.m.s. deviation of α is 0.6 Å). Superimposable regions and the GDP nucleotide are in gray and are shown only for Arf6 for clarity. GDP is shown as a ball-and-stick model. Diverging regions are shown for both Arf1 and Arf6, with Arf6 in bright colors and a continuous outline, and Arf1 in pastel shades and a dotted outline. The N-terminal helix is yellow, the linker green, the switch I purple, the switch II blue and the interswitch loop red. The flexibility of the switch II in Arf1 is denoted by dashed lines. The figure was drawn with Molscript³⁶.

retracted in the protein core in Arf1–GDP and protrudes into the N-terminal helix pocket in Arf1–GTP, thus ensuring that Arf1 is activated at the surface of a membrane.

The switch I and II regions form the major sites for the interaction of Arf proteins with their cellular partners. Surprisingly, these sequences are almost identical among Arf proteins, suggesting that they may have the same three-dimensional structure. The finding that Arf6 localizes primarily to membranes, unlike Arf1 which is mostly cytosolic when bound to GDP, and that its N-terminus, which interacts with membranes in the Arf1–GTP complex, is shorter than that of Arf1, raises the possibility that its membrane/nucleotide cycle may differ from that of Arf1 (refs 19–21). Here we report the crystal structure of Arf6–GDP, which reveals that a small number of sequence differences outside the switch regions result in conformational differences between Arf1 and Arf6 in the switch regions. Mutating one of these residues, S38I (Ser 38 and Ile 42 are equivalent residues in Arf6 and Arf1, respectively), converts the GDP-binding properties of Arf6 to those of Arf1. Thus, GDP-bound Arf1 and Arf6 have different conformations. This could explain how ArfGEFs discriminate between Arf1 and Arf6 and suggests a model for the GDP/GTP cycle of Arf6.

Arf6: topology for the nucleotide/membrane switch

The crystal structure of full length, non-myristoylated Arf6–GDP

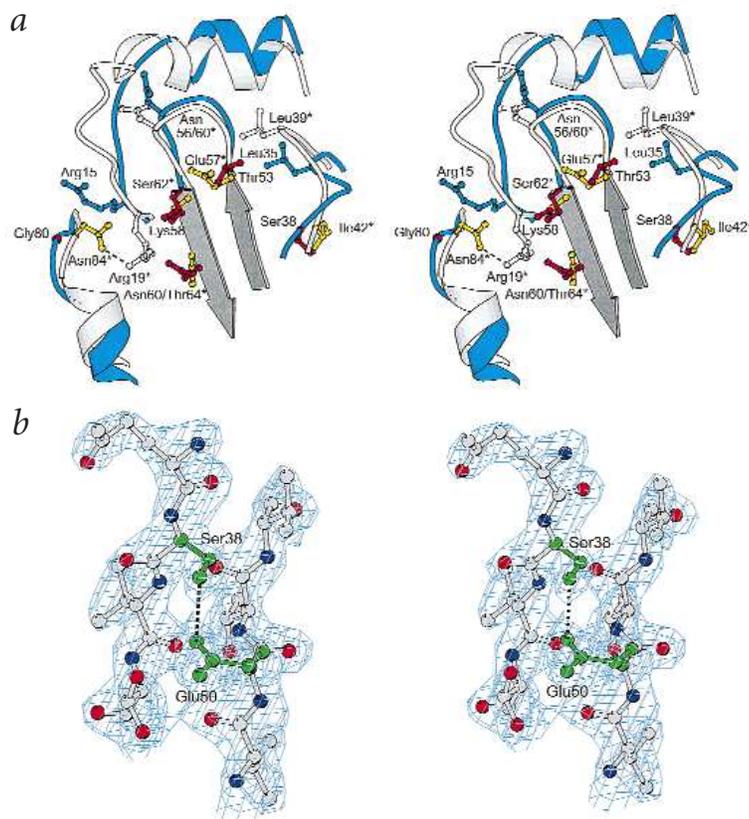


Fig. 2 Structural changes between Arf1 and Arf6. **a**, Close-up view of the most divergent regions. Arf6 is shown in blue, Arf1 in white. Differences are located at the N-terminal helix, the linker, the switch I and II regions and the interswitch loop. Sequence changes important for the distinctive conformation of Arf6 are shown in red; their counterparts in Arf1 are in yellow and are labeled with an asterisk. The β -strands in the interswitch region have similar conformations in Arf1 and Arf6 and are shown for Arf6 only (in gray). The orientation is as in Fig. 1b. **b**, Stereo view of the $F_0 - F_2$ electron density map near the Ser 38–Glu 50 hydrogen bond, contoured at 3σ , with shown residues omitted from the calculation.

was solved at 2.28 Å resolution (Fig. 1). The N-terminus, which is shorter than that of Arf1 by four residues, is folded into an α -helix that is positioned in the hydrophobic pocket opposite the nucleotide binding site, similar to that of Arf1–GDP. The missing residues do not shorten the helix as expected from sequence alignments, but instead shorten the linker that connects the helix to the protein core. As observed in Arf1–GDP, the interswitch region is buried in the protein core and interacts with the switch I region, which forms an ordered β -strand. Thus, it is likely that the structural principles for the activation of Arf6 closely mimic those for the activation of Arf1, including rearrangements of the N-terminus and the interswitch region (S.P. J.M. & J.C. unpublished observations from the low resolution structure of Arf6–GTP γ S). As a consequence, the localization of Arf6–GDP to membranes in cells does not arise from the inability of its N-terminal helix to bind in a pocket in the protein core (see below).

Conformation of the switch regions

The switch machinery in Arf1 comprises the N-terminal helix and its linker to the protein core, the interswitch and the switch I and II regions^{14–18}. The structure of Arf6–GDP reveals that the switch components are also the regions where Arf1 and Arf6 diverge most, while other regions have essentially the same main chain conformation (Fig. 1b).

The switch II region of Arf6–GDP has an ordered conformation, in contrast to Arf1–GDP, which is highly flexible. Because there are only weak crystal contacts near the switch II region, it is unlikely that the conformation observed here is due to crystal packing. It forms a 3_{10} -helix as the switch II in Arf1–GTP (ref. 17; Fig. 1b) except that it is rotated by 25° so that the DVGGQ motif at its N-terminal end cannot bind the γ -phosphate of GTP. The difference in the degree of order between Arf1 and Arf6 can be accounted for by the length of the linker, and by sequence changes

in the switch II and interswitch regions (Fig. 2). In Arf1, Arg 19 in the linker and Asn 84 in the C-terminal region of switch II form a hydrogen bond that cannot form in Arf6 between Arg 15 and Gly 80. This leaves an empty space that is filled by the side chains of Lys 58 and Asn 60 from the interswitch region, which are bulkier than Ser 62 and Thr 64 in Arf1 and push the switch II region by its C-terminal end.

The switch I region in Arf6 is displaced essentially as a rigid body by 2 Å on average compared to Arf1–GDP (Fig. 1b). This displacement involves the interswitch region and an alternative interaction for Ser 38 (Ile 42 in Arf1) near the GDP binding site. The largest deviations are found upstream of switch I, up to over 5 Å near Gly 36 (Gly 40 in Arf1). Two residues, Leu 35 (Leu 39 in Arf1) and Asn 56 (Asn 60 in Arf1), which are buried in Arf1–GDP, are exposed in Arf6–GDP. This allows the interswitch region in Arf6 to pivot relative to two hinge residues, Thr53 and Lys58 (Glu57 and Ser62 in Arf1), thereby pushing the switch I by its N-terminal end. The shift of the switch I region is strengthened by a hydrogen bond between Ser 38 and Glu 50 in the interswitch region that cannot be made by Ile 42 in Arf1 (Figs 2b, 3a, see below).

In contrast, the structure of Arf6–GDP shows that regions where the sequences are different, such as the binding site for Arf GTPase activating protein (ArfGAP) in the C-terminal half of the protein²², have the same backbone conformation in Arf1 and Arf6. Thus, regions where the sequences are divergent but the conformation is the same combine with regions of similar sequence but different conformations to build Arf proteins with unique structures.

Role of the sequence difference at Ser 38/Ile 42
The replacement of Ile 42 (Arf1) by Ser 38 (Arf6) is the only one that affects the configuration of the nucleotide binding site, driving Glu 50 (Glu 54 in Arf1) to form alternative interactions (Fig. 3a). The Glu 50–Ser 38 hydrogen bond in Arf6 is replaced in Arf1 by a hydrogen bond between Glu 54 and Thr 31 (refs 14,16,22), the invariant threonine that binds Mg^{2+} and the β -phosphate of GDP. Glu 54 is therefore in the coordination sphere of Mg^{2+} in Arf1 whereas Glu 50 in Arf6 is not.

Role of the sequence difference at Ser 38/Ile 42

To assess the role of Ser 38/Ile 42 in the affinity of Arf isoforms for GDP, we compared the kinetics of GDP dissociation from $\Delta 17$ Arf1 and $\Delta 13$ Arf6, with or without mutations at this position (Fig. 3b). At physiological Mg^{2+} concentration (1mM), $\Delta 13$ Arf6 exchanged GDP about four times faster than did $\Delta 17$ Arf1. Replacement of Ser 38 by Ile in Arf6 reduced the rate of GDP dissociation to its level in Arf1. Conversely, replacement of Ile 42 by Ser in Arf1 increased its GDP dissociation rate to that of Arf6.

Since Ser 38 withdraws Glu 50 from the coordination sphere of Mg^{2+} in Arf6–GDP, we studied the dissociation of GDP as a func-

letters

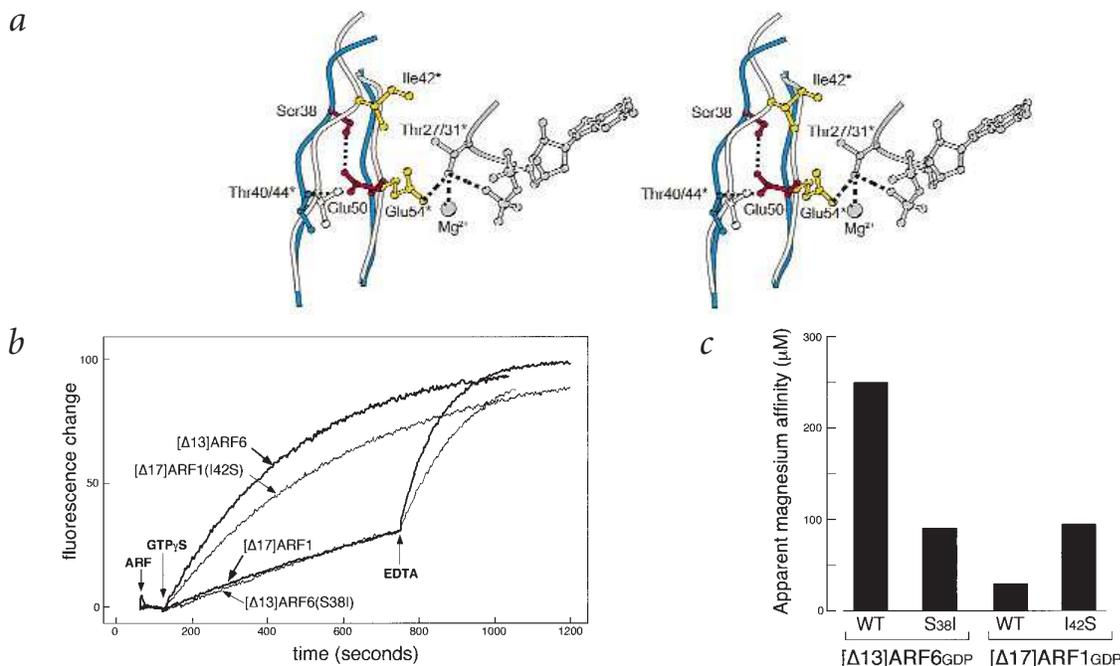


Fig. 3 Role of the Ser 38–Glu 50 hydrogen bond. **a**, Stereo view of the interactions of Ser 38 in Arf6 and Ile 42 in Arf1. Hydrogen bonds and the interaction of Mg^{2+} with Thr31 in Arf1–GDP are indicated by dashed lines. Ser 38 forms a hydrogen bond with Glu 50, which replaces a hydrogen bond in Arf1 between Glu 54 and Thr 31. Thr 27 and GDP in Arf6 have the same conformation as Thr 31 and GDP in Arf1 and are not shown for clarity. The Mg^{2+} ion is not present in all Arf1–GDP structures, and may be replaced by an ammonium ion in Arf6–GDP. **b**, Kinetics of spontaneous GDP/GTP exchange from $\Delta 13$ Arf6 and $\Delta 17$ Arf1 carrying either a Ser or an Ile at position 38 (Arf6) or 42 (Arf1). Fluorescence changes are expressed as the percentage of maximal fluorescence. Measurements were performed at physiological free Mg^{2+} concentration (1 mM). GDP dissociation rates are higher for both Arf1 and Arf6 when the residue is a Ser ($3 \times 10^{-3} s^{-1}$ for $\Delta 13$ Arf6, $6 \times 10^{-4} s^{-1}$ for $\Delta 13$ Arf6(S38I), $7 \times 10^{-4} s^{-1}$ for $\Delta 17$ Arf1 and $2 \times 10^{-3} s^{-1}$ for $\Delta 17$ Arf1(I42S)). **c**, Apparent affinity for Mg^{2+} of $\Delta 13$ Arf6 (wild type or S38I) and $\Delta 17$ Arf1 (wild type or I42S) estimated from the $[^3H]GDP$ dissociation rate as a function of Mg^{2+} concentration. A Ser residue lowers the affinity for Mg^{2+} compared to Ile for both Arf isoforms.

tion of Mg^{2+} concentration (Fig. 3c). The apparent affinity for Mg^{2+} was higher for Arf1 and Arf6 carrying an isoleucine than for their counterparts with a serine. Thus, the nature of the residue at position 38 (or 42 in Arf1) modulates the kinetics of GDP dissociation by allowing or preventing Glu 50 to stabilize Mg^{2+} in the nucleotide binding site; this also confirms that the structure of Arf6–GDP in the crystal is relevant to its conformation in solution. This endows the Thr 31/Glu 54 tandem in Arf1–GDP, but not Thr 27/Glu 50 in Arf6–GDP, with a role similar to that of the Ser 17/Asp 57 pair in Ras²³. Since Glu 54 interacts with the exchange factor in the nucleotide-free complex of Arf1 with the yeast ArfGEF Gea2 (ref. 17), its alternative conformation in Arf6 may also contribute to the recognition of Arf6 by specific exchange factors.

Structural basis for the specificity of ArfGEFs

Switch regions are pivotal for the communication of small G proteins with regulatory and effector proteins. As the sequences in these regions are almost identical in Arf1 and Arf6, one would predict that they would have the same conformation and that they would not be readily distinguishable by the different proteins that interact with them. The major finding of our structural and biochemical study of Arf6–GDP is that sequence differences between Arf6 and Arf1 outside the switch regions result in structural differences in the switch regions. These differences result in distinctive nucleotide binding properties and are large enough to affect protein–protein interactions. Thus, Arf6–GDP displays structural features that allow it to be distinguished from Arf1–GDP. Major partners of GDP-bound G proteins are their GEFs. GEFs form an initial, low affinity complex with GDP-bound G proteins that isomerize to form the high affinity, nucleotide-free complex²⁴.

Kinetics experiments have shown that several ArfGEFs have a marked preference for either Arf1 or Arf6 that depends on their Sec7 domain^{25–29}, although the issue of specificity is unclear in the case of the ARNO family of ArfGEFs. The EFA6 ArfGEF, for instance, catalyzes GDP dissociation from Arf6 but does not act on Arf1 (ref. 28). In addition, the catalytic residues of Sec7 domains, which bind the switch regions of Arf proteins^{17,30}, display sequence variations that may influence their interactions with Arf. We propose that a certain Arf is recognized by a specific ArfGEF at the initial GDP-containing complex stage, rather than at the nucleotide-free stage. Moreover, we suggest that GDP-bound Arf1 and Arf6 are distinguishable by the different conformations and flexibility of their switch regions. Recognition by ArfGEFs of their cognate Arf proteins may also contribute to ensure that GTP bound Arfs are correctly localized, as the localization of ArfGEFs is likely to control that of Arf proteins. Subsequent isomerization of the switch regions may eventually yield a nucleotide-free transition complex in which the conformations of the switch regions in Arf1 and Arf6 become similar as in the Arf1–Gea2 complex¹⁷, provided that specific interactions at the initial stage have prevented the isoforms from being mixed up. This also suggests that while specificity is required when Arf proteins are in the GDP-bound form, further discrimination is probably provided by the assembly of functional complexes, such as coatomers, into which incorporation of illegitimate effectors or regulators becomes unlikely.

The structure of Arf6–GDP and our comparative analysis of GDP dissociation rates also provide novel insights into the unconventional cellular cycle of Arf6. Our results reveal that Arf6 has the structural framework of the dual membrane/nucleotide switch that was described for Arf1. Thus, its predominant localization to mem-

Table 1 Statistics for X-ray structure determination

Space group	P6 ₃ 22
Unit cell parameter	a = b = 55.66 Å, c = 194.95 Å, α = β = 90°, γ = 120°.
Measured reflections	76,362
Unique reflections	8,748
Completeness (%)	98.5
Resolution range (Å)	30–2.28
R _{sym} (%)	6.4
R-factor (%)	17.2
R _{free} (%)	23.4
R.m.s. deviations	
Bond lengths (Å)	0.011
Bond angles (°)	2.217
Average B-factor (Å ²)	17.9
Number of water molecules	92

branes, which is not affected in mutants locked in the GDP form⁶, is not due to its inability to adopt the conformation that has low affinity for membranes. This observation suggests that Arf6–GDP may interact with a membrane bound protein, and such interaction may also inhibit GDP dissociation from Arf6 *in vivo*, thus preventing its higher spontaneous rate of GDP dissociation to yield constitutive activation. The only partners of GDP bound Arf proteins described to date are the βγ-subunits of heterotrimeric G proteins^{9,31}, whose role in the function of Arf6 is still unclear.

In conclusion, differences at the N-terminus linker combine with discrete sequence changes to define a conformation of the switch regions in Arf6–GDP that distinguish it from that of Arf1–GDP. These differences could explain how different GEFs discriminate between different Arfs. Because multiple regions contribute to the differences between Arf1 and Arf6 it is unlikely that Arf1 and Arf6 can be interconverted solely by switching their N-terminal helices. The structure of Arf6–GDP provides a striking illustration that proteins with sequence identity as high as 70% may turn out to have unexpectedly divergent conformations that are directly relevant to how they function in the cell.

Methods

Structure determination. Human ARF6 cDNA was subcloned into the pET3a vector, expressed in the BL21 (DE3) strain of *Escherichia coli* and purified to homogeneity. Arf6 was loaded with GDP prior to crystallization by incubation with 2 mM EDTA and 5 mM GDP, followed by addition of 5 mM MgCl₂. A unique crystal appeared after several months in a hanging drop containing equal volumes of Arf6–GDP at 5.8 mg ml⁻¹ and 2 M ammonium sulfate in 0.1 M Tris/HCl at pH 8.5. Diffraction data were collected at 4 °C at the LURE synchrotron on beamline W32 (λ = 0.963 Å). Intensities were integrated with DENZO and scaled with SCALEPACK³². The crystal belonged to space group P6₃22, with one molecule per asymmetric unit and 35% solvent.

Statistics for the structure determination are summarized in Table 1. The structure was solved by molecular replacement with AMoRe³³ using Arf1–GDP (PDB accession code 1HUR) as a search model¹⁴. Refinement was carried out with the maximum likelihood method implemented in Xplor98 (MSI), in alternation with graphical building using TURBO-FRODO³⁴. Electron density in the vicinity of the GDP phosphates was not compatible with interacting distances of Mg²⁺ (2.1–2.3 Å range), and was modeled as a NH₄⁺ ion. Cys 155 displays additional electron density that was modeled as a dithiothreitol (DTT) molecule.

Mutagenesis and kinetics. Δ17Arf1, Δ13Arf6, Δ17Arf1(I42S) and Δ13Arf6(S38I) were expressed in *E. coli*, purified as described³⁵ and loaded with GDP by incubation for one hour at 37 °C in the presence of 1 μM free Mg²⁺ and 200 μM GDP. Proteins were dialyzed

against 50 mM HEPES at pH 7.5, 100 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 1 mM DTT and 5 μM GDP (HKM buffer).

Spontaneous nucleotide exchange from the different constructs was monitored by tryptophan fluorescence³⁵ at 37 °C with 1 μM of Arf protein in HKM buffer (1 mM free Mg²⁺). The reaction was initiated by the addition of 50 μM GTPγS. As Δ17Arf1 and Δ13Arf6(S38I) have a slow spontaneous exchange, EDTA was injected after 12 min reaction in order to reach the plateau. The exchange activity was expressed as a percentage of the total amount of protein loaded with GTPγS represented by the plateau. Data were fitted as a single exponential where the rate constant is the off rate of GDP.

The apparent affinity of the different constructs for Mg²⁺ was assayed by measuring [³H]GDP dissociation rates at variable concentrations of Mg²⁺ as described¹⁵. Briefly, Arf proteins were incubated in a twofold excess of [³H]GDP (~1000 dpm pmol⁻¹) for 15 min at 37 °C in HKM buffer containing 2 mM EDTA (free [Mg²⁺] ~1 μM). Proteins were then diluted to 1 μM in the same buffer containing free Mg²⁺ concentrations ranging from 1 μM to 10 mM. Nucleotide dissociation was monitored as the loss of protein bound radiolabel following addition of 0.1 mM GDP. The apparent affinity for Mg²⁺ was estimated as the magnesium concentration that causes 50% of the maximum variation of the rate of GDP dissociation (EC50).

Coordinates. Coordinates and structure factors have been deposited in the Protein Data Bank (accession code 1E0S).

Acknowledgments

We thank the staff at the LURE synchrotron for making beamline W32 available to us, M. Chabre, P. Chardin and F. Luton for critical reading of the manuscript, and M. G. Partisani for technical support. The Δ17Arf1(I42S) plasmid is a kind gift from S. Robineau. This work was supported by the Association pour la Recherche sur le Cancer and by ZenecaPharma.

Correspondence should be addressed to J.C. email: cherfils@lebs.cnrs-gif.fr

Received 2 March, 2000; accepted 13 April, 2000.

- Roth, M.G. *Cell* **97**, 149–152 (1999).
- Chavrier, P. & Goud, B. *Curr. Opin. Cell Biol.* **11**, 466–475 (1999).
- D'Souza-Schorey, C., Li, G., Colombo, M.I. & Stahl, P.D. *Science* **267**, 1175–1178 (1995).
- Peters, P.J. *et al. J. Cell Biol.* **128**, 1003–1017 (1995).
- D'Souza-Schorey, C., Boshans, R.L., McDonough, M., Stahl, P.D. & Van Aelst, L. *EMBO J.* **16**, 5445–5454 (1997).
- D'Souza-Schorey, C. *et al. J. Cell Biol.* **140**, 603–616 (1998).
- Honda, A. *et al. Cell* **99**, 521–532 (1999).
- Radhakrishna, H., Al-Awar, O., Khachikian, Z. & Donaldson, J.G. *J. Cell Sci.* **112**, 855–866 (1999).
- Galas, M.C. *et al. J. Biol. Chem.* **272**, 2788–2793 (1997).
- Millar, C.A., Powell, K.A., Hickson, G.R., Bader, M.F. & Gould, G.W. *J. Biol. Chem.* **274**, 17619–17625 (1999).
- Yang, C.Z. & Mueckler, M. *J. Biol. Chem.* **274**, 25297–25300 (1999).
- Moss, J. & Vaughan, M. *J. Biol. Chem.* **273**, 21431–21434 (1998).
- Jackson, C.L. & Casanova, J.E. *Trends Cell Biol.* **10**, 60–67 (2000).
- Amor, J.C., Harrison, D.H., Kahn, R.A. & Ringe, D. *Nature* **372**, 704–708 (1994).
- Franco, M., Chardin, P., Chabre, M. & Paris, S. *J. Biol. Chem.* **270**, 1337–1341 (1995).
- Greasley, S.E. *et al. Nature Struct. Biol.* **2**, 797–806 (1995).
- Goldberg, J. *Cell* **95**, 237–248 (1998).
- Béraud-Dufour, S., Paris, S., Chabre, M. & Antony, B. *J. Biol. Chem.* **274**, 37629–37636 (1999).
- Cavenagh, M.M. *et al. J. Biol. Chem.* **271**, 21767–21774 (1996).
- Yang, C.Z., Heimberg, H., D'Souza-Schorey, C., Mueckler, M.M. & Stahl, P.D. *J. Biol. Chem.* **273**, 4006–4011 (1998).
- Gaschet, J. & Hsu, V.W. *J. Biol. Chem.* **274**, 20040–20045 (1999).
- Goldberg, J. *Cell* **96**, 893–902 (1999).
- John, J. *et al. J. Biol. Chem.* **268**, 923–929 (1993).
- Cherfils, J. & Chardin, P. *Trends Biochem. Sci.* **24**, 306–311 (1999).
- Franco, M. *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 9926–9931 (1998).
- Klarlund, J.K. *et al. J. Biol. Chem.* **273**, 1859–1862 (1998).
- Claude, A. *et al. J. Cell Biol.* **146**, 71–84 (1999).
- Franco, M. *et al. EMBO J.* **18**, 1480–1491 (1999).
- Morinaga, N., Adamik, R., Moss, J. & Vaughan, M. *J. Biol. Chem.* **274**, 17417–17423 (1999).
- Béraud-Dufour, S. *et al. EMBO J.* **17**, 3651–3659 (1998).
- Franco, M., Paris, S. & Chabre, M. *FEBS Lett.* **362**, 286–290 (1995).
- Otwinowski, Z. In *Data collection and processing* (eds Sawyer, N.I.L. & Bailey, S.) 56–62 (SERC Daresbury Laboratory, UK; 1993).
- Navaza, J. *Acta Crystallogr. A* **50**, 157–163 (1994).
- Roussel, A. & Cambillau, C. In *Silicon graphics geometry partners directory* (ed. Silicon Graphics) 81 (Silicon Graphics, Mountain View, California; 1991).
- Antony, B., Béraud-Dufour, S., Chardin, P. & Chabre, M. *Biochemistry* **36**, 4675–4684 (1997).
- Esnouf, R.M. *Acta Crystallogr. D* **55**, 938–940 (1999).

B-Données expérimentales

Nous avons résolu la structure de Arf6-GDP à une résolution de 2,2 Å par remplacement moléculaire en utilisant comme modèle Arf1-GDP (code PDB 1HUR) ((Amor, 1994) et ((Greasley, 1995)).

La protéine Arf6 humaine, entière, non myristoylée et de type sauvage a été exprimée dans *E. Coli* et purifiée par nos collaborateurs de l'Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire du CNRS de Valbonne : Michel Franco et Eric Macia.

1-Cristallisation de Arf6-GDP

Echange du nucléotide. Pour être cristallisée, Arf6 doit être homogène, ce qui n'était pas le cas ici. En effet, une partie de la protéine est liée au GDP l'autre au GTP. Par conséquent, pour obtenir une préparation homogène de Arf6-GDP, nous devons échanger les nucléotides présents (GDP et GTP) contre celui que nous désirons, le GDP. Pour cela, Arf6 est placée en présence d'EDTA, pour chélater le magnésium libre dans la solution, et celui présent dans le site nucléotidique. La chélation du magnésium aura pour effet d'augmenter la dissociation du nucléotide de la protéine. Arf6 vidée de son nucléotide est alors mise en présence d'un excès de GDP. Puis, la réaction de chélation du magnésium par l'EDTA est contrebalancée par l'ajout d'un excès de magnésium. Le magnésium est à nouveau disponible pour stabiliser le nucléotide au sein de la protéine. Arf6 est alors chargée en GDP en présence de magnésium.

Cristallisation. Arf6-GDP a été préparée dans une solution de Tris/HCl 50mM pH 8, MgCl₂ 4mM, DTT 1mM et 5mM de GDP. Nous avons obtenu un unique cristal de taille moyenne (environ 200x100x50µm³) (fig.21) par diffusion de solvant en phase gazeuse en goutte pendante à 18°C. La goutte contenait à volume égal (1µl /1µl) : Arf6-GDP à 5,8mg/ml et une solution de cristallisation composée par du sulfate d'ammonium à 2M et du Tris/HCl à 100mM pH 8.5. Nous n'avons pas réussi dans les mêmes conditions, ni dans d'autres à reproduire cette forme cristalline ni d'autres de Arf6-GDP. Nous avons stabilisé le cristal dans une solution de 2.2 M de Sulfate

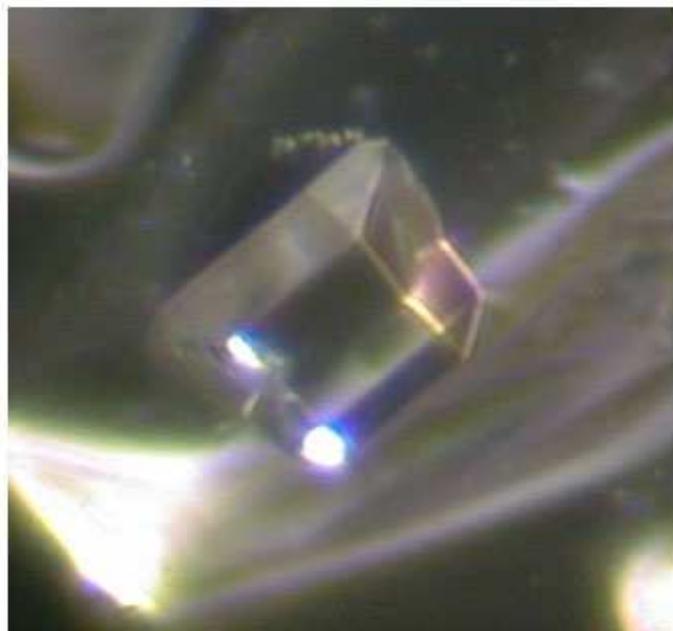
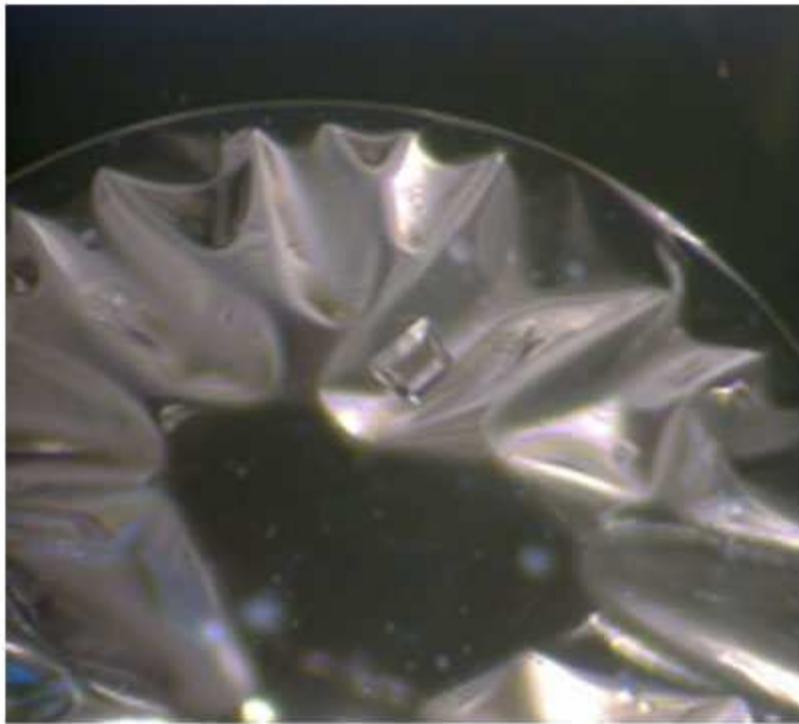


Figure 21: Cristal de Arf6-GDP. Taille $200 \times 100 \times 50 \mu\text{m}^3$. Cristallisation de Arf6-GDP par la méthode de diffusion de solvant en phase gazeuse en goutte pendante. La goutte contenait à égal volume Arf6-GDP (5,8mg/ml) et du sulfate d'ammonium (2M) et Tris/HCl (100mM, pH 8,5).

d'Ammonium (100mM Tris/HCl pH 8.5), puis l'avons monté en capillaire pour l'exposer aux rayons X à 4°C.

Une caractéristique particulière de ce cristal est le temps qui lui a été nécessaire pour apparaître : environ 8 mois. La présence d'une molécule de DTT fixée par liaison covalente sur la cystéine 159 de Arf6-GDP dans notre cristal (Chapitre 2-II-C-2) a pu modifier à un moment donné les paramètres physico-chimiques dans la goutte. De plus, il est possible qu'au cours des 8 mois la graisse qui scelle la lamelle au puits ait séchée, ce faisant les conditions de cristallisation dans la goutte et dans le puits ont pu être modifiées par évaporation. Il est possible aussi, qu'au cours du temps un équilibre se soit établi entre les ions ammonium du sulfate d'ammonium et l'ammoniac, cet équilibre aura eu pour effet de faire varier la valeur du pH dans la goutte. L'un ou l'autre de ces paramètres peut avoir joué un rôle dans la cristallisation de Arf6-GTP γ S.

2-Collecte et traitement des données cristallographique

Collecte des données cristallographiques. Un jeu de données cristallographiques a été enregistré sur ce cristal à 4°C au synchrotron du LURE à Orsay, à une longueur d'onde de 0.9637 Å. Le cristal a diffracté entre 30 et 2.3 Å. Le R_{sym} (fig.15), qui est un facteur de la qualité interne des mesures des réflexions équivalentes pour chaque réflexion unique est faible, indiquant que les intensités du jeu de données cristallographiques sont bien mesurées. Ce jeu est complet à 98,5 %. (Voir statistique dans la table 1 de l'article 2).

Traitement des données cristallographiques. Le traitement des données cristallographiques a été effectué avec les logiciels DENZO et SCALEPACK (Otwinowski, 1993). L'indexation des taches de diffractions des rayons X a permis de caractériser le système cristallin auquel appartient le cristal de Arf6-GDP : il s'agit du système cristallin hexagonal. Après avoir indexé et intégré les données cristallographiques dans les différentes classes de Laue cohérentes avec le système hexagonal, nous avons poursuivi le traitement des données avec les groupes d'espaces constituant la classe de Laue pour lequel les meilleures statistiques ont été obtenues. Il s'agit des groupes d'espaces $P6_122$, $P6_222$, $P6_322$, $P6_422$ et $P6_522$.

Ces groupes d'espaces peuvent être classés en 3 sous-groupes selon les conditions d'existence des réflexions. Les extinctions systématiques des réflexions ont permis de distinguer entre les 3 sous-groupes, lequel était le bon. Les extinctions systématiques identifiées sont cohérentes avec les conditions d'existence des réflexions du sous-groupe composé par les groupes d'espaces $P6_122$ et $P6_522$ ($(0,0,l)$ avec $l=6n$). A ce stade du traitement, ces deux groupes d'espaces ne peuvent être distingués, le remplacement moléculaire permettra de le faire (voir les statistiques dans la table 1 dans l'article 2).

A partir du volume de la maille (519808 \AA^3) et du poids moléculaire de Arf6 (20 kDa), il a été estimé qu'une molécule de Arf6 est présente dans l'unité asymétrique (Matthews, 1968).

Pour pouvoir déterminer les paramètres de chaque atome de la protéine (les 3 coordonnées spatiales (x,y,z) et le facteur d'agitation thermique), il faut connaître un nombre beaucoup plus grand de données expérimentales indépendantes (données connues) que de paramètres (données inconnues). Arf6 est composée par 1398 atomes et le GDP par 33 atomes, on doit déterminer au moins $4 \times 1431 = 5724$ paramètres. Le jeu de données que nous avons enregistré est composé de 8748 réflexions indépendantes. Le nombre de données connues (réflexions) est donc supérieur au nombre de données inconnues (coordonnées spatiales et facteur d'agitation thermique), ce qui permettra théoriquement de résoudre la structure.

3-Remplacement moléculaire et Affinement

Remplacement moléculaire. Le remplacement moléculaire de Arf6-GDP a été effectué avec AMoRe 97 (Navaza, 1994) dans une gamme de résolution de 15 à 3,5 Å en utilisant deux modèles : Arf1-GDP (code PDB 1HUR) ((Amor, 1994) et (Greasley, 1995)) (fig.20a ; voir Chapitre 2-I-C-3) et Arf1 Δ 17-GDPNHP (fig.20b ; voir Chapitre 2-I-C-3) (coordonnées fournies par l'auteur) (Goldberg, 1998). En effet, nous ne savons pas si la structure de Arf6-GDP serait proche du repliement particulier observé pour Arf1-GDP ((Amor, 1994) et (Greasley, 1995)) ou du repliement général observé pour Arf1 Δ 17-GDPNHP (voir Chapitre 2-I-C). Contrairement à Arf1-GDP, Arf6-GDP est *in vivo* trouvée principalement associée aux membranes et se charge en GTP sans la présence de membrane, *in vitro*. C'est

	P6₁22	P6₅22
Arf1-GDP	Facteur R = 47,7 % Corrélation = 32,2%	Facteur R = 54,8% Corrélation = 16,1 %
Arf1Δ17-GDPNP	Facteur R = 52% Corrélation = 25,4%	

Tableau III: Statistiques du remplacement moléculaire de Arf6-GDP. Le remplacement moléculaire a été fait dans une gamme de résolution allant de 15 à 3,5 Å avec le programme AMORE (Navaza, 94).

pourquoi, la structure de Arf6-GDP pouvait être différente de celle de Arf1-GDP au niveau de l'Interswitch et de l'hélice N-Terminale. Nous avons donc effectué le remplacement moléculaire de Arf6-GDP en utilisant comme modèle d'une part Arf1-GDP (sans modification du modèle) et d'autre part Arf1 Δ 17-GDPNHP (sans modification du modèle), dans les groupes d'espaces P6₁22 et P6₅22 distinctement. Le facteur R et le facteur de corrélation (fig.15), indicateurs de la qualité de l'accord entre les facteurs de structures observés et calculés pour le remplacement moléculaire sont les meilleurs pour la solution en P6₁22 en utilisant comme modèle Arf1-GDP (tab.III).

Affinement de Arf6-GDP. L'affinement de Arf6-GDP n'a rencontré aucune difficulté particulière, les cartes de densité électronique étaient bien définies sur toutes la structure (chaîne latérales comprises), même là où le modèle (Arf1-GDP) divergeait. Il a donc été possible dans un premier temps de construire presque entièrement la structure de Arf6-GDP graphiquement. Puis, des minimisations énergétiques ont été réalisées avec le logiciel X-plor98 (MSI, 1998) en utilisant des méthodes de convergences utilisant les maximums de vraisemblance. Pour finir, des molécules d'eau en interaction avec la protéine ont pu être modélisées dans des îlots de densité électronique. (Voir les statistiques de l'affinement dans la table 1 de l'article 2). Les cartes de densité électronique sont calculées par la combinaison pondérée des données expérimentales et des données calculées (fig.15). La pondération des données permet de s'affranchir le plus possible du biais introduit par les données calculées du modèle. Les cartes $2F_{obs}-F_{calc}$ et $F_{obs}-F_{calc}$ ont été calculées avec les programmes du package CCP4 (Collaborative Computing Project number 4). Les régions de la protéine qui sont mal modélisées ont été reconstruites en utilisant des cartes de densité électronique calculées en omettant ces régions du calcul, ce qui aura pour effet de diminuer l'erreur dû au modèle.

Qualité du modèle. Après l'affinement de la structure, la qualité du modèle est évaluée par un certain nombre de critères, qui incluent les facteurs R et Rfree, et les écarts quadratiques moyens par rapport à une stéréochimie idéale (rmsd) des longueurs et des angles de liaisons. Au cours de l'affinement de la structure de Arf6-

GDP, les facteurs R et Rfree ont diminué de 55 et 58% jusqu'à une valeur de 17,2% et 23,4 % respectivement. L'écart quadratique moyen par rapport à une stéréochimie idéale des longueurs et des angles de liaisons est égal respectivement à 0,011Å et 2,217°, indiquant que la structure de Arf6-GDP possède une bonne stéréochimie (table 1 de l'article 2).

C-Particularités de la structure

1-Absence du magnésium dans le site nucléotidique

Le magnésium est un co-facteur essentiel pour les petites protéines G. Il a été montré chez H-Ras, Rab5 et Rab7 que le magnésium possède une forte affinité (nM) pour la forme GTP et une affinité plus modérée (μ M) pour la forme GDP de ces protéines ((John, 1993) et (Simon, 1996)) (description de la coordination du magnésium dans le site nucléotidique des petites protéines G dans la figure 6).

Résultat. Au cours de l'affinement de la structure, plusieurs îlots de densité électronique ont été observés au niveau du site du magnésium. La configuration particulière et l'intensité de ces îlots de densité électronique, nous a amené à nous demander si nous étions en présence d'un site classique contenant du magnésium (fig.6) ou d'un réseau de molécules d'eau sans magnésium. En effet, la densité électronique de ces îlots est faible. Cependant, il est possible que le magnésium soit présent avec un taux d'occupation inférieur à 1, et dans ce cas expliquerait pourquoi la densité électronique est faible. Nous avons éliminé cette possibilité car bien que la position du GDP (principalement le phosphate β) et de la thréonine du motif PM1 [T] soient correctement positionnées pour coordonner le magnésium (fig.6), les îlots de densité électronique ne sont pas coordonnés par 6 ligands de façon à obtenir une coordination octaédrique caractéristique du magnésium (avec des distances caractéristiques magnésium/ligands autour de 2Å). De plus, nos collaborateurs Eric Macia et Michel Franco ont montré en suivant la vitesse de dissociation du $[H_3]GDP$ (fig.3c dans l'article 2) que Arf6 Δ 13 (50 μ M) a une affinité moins importante pour le Mg^{2+} que Arf1 Δ 17 (250 μ M).

Présence d'un ion ammonium dans le site nucléotidique ? La cristallisation de Arf6-GDP s'est faite dans des conditions contenant 2M de sulfate d'ammonium ((NH₄)₂SO₄). Il a été montré, que le sulfate d'ammonium à des concentrations supérieures à 100mM, augmente la vitesse de dissociation du GDP de c-H-Ras d'un facteur 1000 à 10.000 (Mistou , 1992). Dans ces conditions, il est fort probable que le magnésium soit éliminé du site nucléotidique et puisse être remplacé par un ion ammonium présent en concentration élevée dans le milieu. De plus, la coordination de l'atome décrit par la densité électronique observée à l'emplacement du magnésium est similaire à la coordination (distance, angle et nature chimique de la liaison) d'un ion ammonium proposé par Parello et Coll. dans la structure de la Parvalbumine résolue à 0.91 Å (Declercq, 1999) et par Samama et Coll. dans la structure d'un domaine de FixJ (Birck, 1999).

Les autres structures de petites protéines G sans magnésium. La structure de Arf1-GDP de rat (Greasley, 1995) possède un magnésium dans le site nucléotidique, avec un facteur d'agitation thermique élevé par rapport au facteur d'agitation thermique moyen de la structure. Ce magnésium possède une coordination à 5 ligands et un faible taux d'occupation. Ces observations ont conduit Greasley et Coll. à proposer que le magnésium de leur structure soit partiellement remplacé par une molécule d'eau, malgré la présence de 1mM de Mg²⁺ dans les conditions de cristallisation. De plus, ils ont étudié l'affinité de Arf1 de rat pour le GDP en absence de magnésium (chélaté par de l'EDTA), et ont montré que Arf1 de rat charge le GDP sans la présence de magnésium (Greasley, 1995). De plus, la structure de Arf1-GDP humain (Amor, 1994) possède un ion coordonné par 7 ligands dans le site nucléotide, interprété comme étant un Mg²⁺ par les auteurs. Greasley et Coll. proposent qu'il s'agisse plutôt d'un Ca²⁺, car ce cation présent dans les conditions de cristallisation (150mM) et contrairement au Mg²⁺ qui peut être coordonné par 7 ligands. Ces résultats semblent indiquer que la protéine Arf1-GDP se dissocie facilement, dans certaines conditions du magnésium. Greasley et Coll. proposent que la coordination particulière du magnésium de leur structure puisse être liée à la conformation particulière du Switch I (brin β_{2E}, conformation ouverte) qui expose le site nucléotidique au solvant (conformation ouverte du Switch I), et/ou au fait que le

motif PM3 [DVGGQ], habituellement impliqué dans la coordination du magnésium (fig.6) soit décalé de 2 résidus, ce qui aurait pour effet de modifier l'environnement du site nucléotidique. Très récemment, la structure de Arl3-GDP sans magnésium a été résolue (communication personnelle de Louis Renault). Les auteurs proposent que l'absence du magnésium ne soit pas la conséquence d'artefacts de cristallisation (présence de 2m de sulfate d'ammonium dans les conditions de cristallisation), mais plutôt la conséquence de propriétés intrinsèques de la protéine. Ils ont montré par fluorescence que Arl3 fixe aussi bien le mantGDP en présence de magnésium, qu'en absence de magnésium. De plus, la structure montre que la substitution du glutamate 54 de Arf1 (impliqué dans la coordination du magnésium) par une lysine (fig.17) gêne stériquement la présence du magnésium. Ces résultats semblent indiquer que la fixation du GDP de Arl3 soit indépendante du magnésium.

La structure de RhoA-GDP sans magnésium (Shimizu, 2000) (conséquence potentielle de la présence de 0,6M de Li_2SO_4 dans les conditions de cristallisation) montre que le Switch I adopte une conformation ouverte (éloigné du site nucléotidique) très différente de celle de la structure de RhoA-GDP- Mg^{2+} (conformation fermée proche du site nucléotidique, fig.8b) (Wei, 1997). Ces résultats montrent que l'absence de magnésium entraîne des changements de conformation importants au niveau du Switch I de RhoA.

2-présence d'une molécule de DTT au niveau de la cystéine du motif G3 [CAT] (fig.22)

Au cours de l'affinement de la structure de Arf6-GDP, une excroissance continue de densité électronique a été observée à l'extrémité de la cystéine 155. Le séquençage de l'ADN recombinant de Arf6 utilisé pour produire la protéine cristallisée a été effectué (séquençage fait à l'institut de Pharmacologie Moléculaire et cellulaire) et a montré qu'aucune mutation accidentelle n'avait eu lieu dans la protéine, et qu'il s'agissait bien d'une cystéine. Nous avons cherché ensuite quel type de composé chimique est susceptible de se fixer de façon covalente sur une cystéine, en accord avec les conditions de préparation et de cristallisation de Arf6. La molécule de DTT (Dithiothreitol) semble être le seul composé présent dans les conditions de

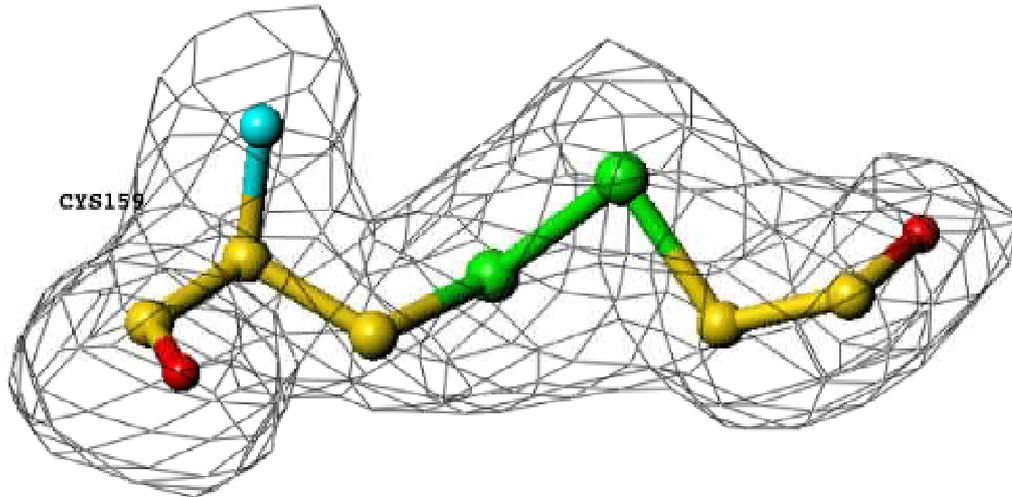


Figure 22: Densité électronique de la cystéine 159 et de la molécule de DTT . la carte de densité électronique (Fo-Fc à 2 sigma) a été calculée en omettant la cystéine et le DTT des calculs. Les atomes jaunes représentent les carbones, les rouges les oxygènes, le bleu l'azote et les verts les sulfures.

préparation de Arf6 susceptible de former une liaison covalente avec le soufre d'une cystéine. Le DTT est un réducteur, utilisé pour réduire les cystéines susceptibles de former des ponts disulfure. Une partie de la molécule de DTT a pu être modélisée dans l'excroissance de la densité électronique de la cystéine 155 ; l'autre moitié n'est pas définie par de la densité électronique.

Il est intéressant de noter que la cystéine 155 appartient au motif G3 [CAT] (voir Introduction-I-B-1) et que la présence de la molécule de DTT défavorise l'interaction classique de ce résidu avec l'aspartate du motif G2 [NKQD] (fig.6).

**Conclusions générales
et
perspectives**

Conclusions générales et perspectives

Les protéines Ras et les protéines Rap appartiennent à la même famille de petites protéines G et partagent environ 70 % de similarité de séquence. Ces protéines interagissent avec les mêmes partenaires, comme les protéines de la famille des serine/thréonine kinases, Raf ou les facteurs d'échange des protéines Ral, les Ral-GEF. Cependant, ces interactions n'activent pas les mêmes voies de signalisation, suggérant que celles-ci ne se fassent pas de la même manière. De plus, les protéines Ras et Rap1 sont activées ou activent des partenaires différents, comme certains facteurs d'échange ou certains effecteurs. Par exemple, GFR est un facteur d'échange spécifique des protéines Rap, mais pas des protéines Ras, malgré la présence d'un domaine CDC25, présent aussi chez les facteurs d'échange de Ras (Ichiba, 1999). De même, RGS14 qui est une GAP pour les sous-unités α des protéines G hétérotrimérique interagit avec les protéines Rap, mais pas avec H-Ras (Traver, 2000). Ces observations suggèrent que les protéines Ras et les protéines Rap sont, d'une part reconnues par les mêmes partenaires et d'autre part reconnues de façon plus spécifique par un partenaire en particulier. Les protéines Rap1 et Rap2 qui partagent 80 % de similarité de séquence interagissent avec des partenaires identiques, mais sont aussi reconnues par des partenaires spécifiques. Par exemple, le facteur d'échange C3G stimule la dissociation du GDP sur Rap1, mais pas sur Rap2 (van den Berghe, 1997). De la même manière, la protéine RPIP8 qui est un effecteur spécifique de Rap2 n'interagit pas avec Rap1 (Janoueix-Lerosey, 1998). Ces observations suggèrent que des protéines fortement similaires sont assez différentes pour être reconnues par des partenaires spécifiques.

De la même manière, les protéines Arf1 et Arf6 possèdent 84 % de similarité de séquence et des régions Switch presque identiques, suggérant que ces protéines auront une structure tridimensionnelle presque identique et partageront les mêmes partenaires. En effet, ces protéines sont activées et activent des partenaires identiques, comme le facteur d'échange ARNO, la protéine activatrice de la GTPase GIT1, ou la PLD. Pourtant, elles sont activées par ou activent des partenaires différents. EFA6 par exemple est un facteur d'échange spécifique de Arf6, il n'active

pas Arf1 (Franco, 1999). Par contre Arf-GAP1, une protéine activatrice de la GTPase est active sur Arf1, mais pas sur Arf6 (Vitale, 2000). Ces observations suggèrent, comme pour les protéines Ras et Rap, que les protéines Arf1 et Arf6 sont assez ressemblantes pour partager certains partenaires, mais sont aussi assez différentes pour être distinguées par des partenaires spécifiques.

Sur quelles bases structurales ces protéines sont-elles distinguées les unes des autres par des partenaires, alors qu'elles sont fortement similaires en séquence, voire presque identiques au niveau des régions connues pour être les sites de reconnaissance et d'interaction ?

Les petites protéines G changent de conformation au cours du cycle structural GDP/GTP ce qui permet à leur forme GDP et à leur forme GTP d'interagir avec des partenaires différents. Nous savons à partir des différentes structures de petites protéines G, seules et en complexe avec leurs effecteurs ou leurs protéines régulatrices, que le Switch I et le Switch II peuvent subir diverses transitions désordre/ordre au cours de leur cycle GDP/GTP (tableau II). En effet, le Switch I peut être davantage désorganisé et le Switch II davantage organisé par l'interaction avec leur GAP ou leur GEF ((Scheffzek, 1997), (Rittinger, 1997b), (Goldberg, 1998) et (Boriack-Sjodin, 1998)), qu'ils ne le sont en complexe, respectivement avec du GDP ou du GTP. De plus, différents partenaires cellulaires peuvent stabiliser différentes conformations des Switch I et II, comme RasGAP (Scheffzek, 1997) et SOS (Boriack-Sjodin, 1998). Ces observations tendent à élargir le concept basique définissant les petites protéines G comme ayant seulement deux états conformationnels, mais plutôt comme décrivant une multitude d'états conformationnels *via* des transitions désordres/ordres. De plus, nous avons montré que les changements de conformation au cours du cycle structural GDP/GTP de Rap2A varient en longueur par rapport à ceux de H-Ras (Cherfils, 1997). En effet, le Switch II de Rap2A (résidus 58-64) est plus court que celui de H-Ras (résidus 58-77). L'hélice α_2 qui fait partie du Switch II chez H-Ras, mais pas chez Rap2A possède une orientation différente dans la forme GDP des deux protéines. Cette différence contribue à la reconnaissance des partenaires des formes GDP des petites protéines

G, les facteurs d'échange GDP/GTP. Ces résultats montrent que les changements de conformation des petites protéines G ne sont pas équivalents d'une protéine à l'autre malgré de forte homologie de séquence.

Les petites protéines G possèdent une plasticité structurale, qui suggère une base structurale pour reconnaître différents partenaires et être distinguées les unes des autres.

De plus, nous avons montré que deux protéines ayant des régions Switch presque identique en séquence, pouvaient posséder des régions Switch structurellement assez différents pour être reconnues par différents partenaires cellulaires (Chapitre 2-II-A) (Menetrey, 2000). Ces différences de structures sont la conséquence de quelques différences de séquence situées à l'extérieur des régions Switch au niveau de régions charnières. Les alignements de séquences présentés au chapitre 1 et 2 pour les protéines de la famille RAS et de la famille ARF montrent que des différences de séquence sont observées pour ces protéines au niveau des régions charnières des régions Switch, suggérant que là aussi des modifications au niveau de la structure sont possibles. Les transitions désordre/ordre qui caractérisent les changements de conformation observés pour les petites protéines G sont plus ou moins facilités par la nature des résidus "charnières". Les résidus "charnières" se situent aux extrémités des régions qui change de conformations. Ils subissent des contraintes stéréochimiques importantes qui permettent les changements de conformation. Chez les petites protéines G, on retrouve fréquemment, mais pas toujours des glycines au niveau des régions "charnières" des Switch I et II. Les différences d'énergies mises en œuvre par ces résidus peuvent être un moyen pour les différents partenaires cellulaires de distinguer une protéine d'une autre. Par exemple, les protéines Rap possèdent une glycine au début du Switch I (gly26) (fig.10), remplacée par une asparagine chez Ras. La glycine facilitera les changements de conformation du Switch I des protéines Rap par rapport à ceux de Ras. Bien que, les résidus "charnières" puissent être des éléments critiques de la discrimination entre différentes protéines, ils ne sont en général pas impliqués dans l'interaction protéine/protéine. En effet, Ras possède une glycine à la fin du Switch II (Gly82 chez RAS2 de levure), qui est critique pour son activation par les facteurs d'échange (Kavounis , 1991), mais qui n'interagit pas avec CDC25-SOS dans la

structure du complexe Ras/RasSOS (Boriack-Sjodin, 1998). De plus, il a été montré que la mutation de l'asparagine 26 (résidu "charnière" du début du Switch I) chez Ras en glycine (résidu équivalent chez Rap) affecte la transduction du signal (Shirouzu, 1992). Ces différences de séquences produisent de subtiles variations au niveau de l'énergie mise en œuvre pour adopter de nouvelles conformations, soit en augmentant la flexibilité des Switch I et II (cas de la glycine) soit en limitant la flexibilité de façon plus ou moins importante. La substitution d'une glycine "charnière" par un autre résidu, ou la substitution d'un résidu quelconque par une proline, résidu possédant une stéréochimie particulièrement contrainte est observée dans au moins un isoforme de chaque famille. Par exemple, la substitution Gly/Asn à la fin du Switch II chez les protéines Arf ou la substitution Glu/Pro au début du Switch II entre Rho et Rnd. Un autre exemple de l'importance de la nature du résidu "charnière" est la présence d'une glycine à la fin du Switch I chez les protéines ARF, RAN et RAB, que les protéines RAS et RHO ne possèdent pas (fig.4), et qui semble permettre au Switch I des protéines Arf et Ran d'effectuer un changement de conformation GTP → GDP avec une amplitude plus importante que celui des protéines RAS et RHO (voir Introduction-III-B-2).

La modélisation moléculaire permet de proposer un modèle pour une protéine à partir de la structure d'un homologue, évitant ainsi les délais nécessaires à la résolution d'une structure par des méthodes expérimentales. La modélisation du cycle structural GDP/GTP de Rap2A à partir de celui de H-Ras n'aurait pas permis de prédire le raccourcissement du Switch II de Rap2A (voir article en annexe A). De même, la modélisation de Arf1-GDP à partir de H-Ras-GDP (36% de similarité de séquence) n'aurait pas permis de prédire la conformation ouverte du Switch I, ni la translation de l'Interswitch qui caractérise Arf1-GDP (voir Chapitre 2-I-C-3). De façon encore plus frappante, la modélisation de Arf6-GDP à partir de Arf1-GDP (84 % de similarité de séquence) n'aurait pas permis non plus de prédire les différences de structure au niveau des régions Switch sur la base de quelques différences de séquence en dehors de ces régions. Ces observations tendent à montrer que lorsqu'une protéine présente une question précise, celle-ci mérite d'être étudiée même si la structure d'un homologue est connue.

Pour comprendre encore mieux les bases structurales qui permettent aux petites protéines G, partageant de forte homologie de séquence d'être distinguées par différents partenaires, il serait intéressant d'essayer de répondre aux questions suivantes.

Les différences observées entre Arf1 et Arf6 qui partagent 84 % de similarité de séquence font de ces protéines un modèle intéressant à étudier. Nous avons montré que Arf1-GDP et Arf6-GDP possèdent des différences structurales assez importantes pour être distinguées par leur facteur d'échange. Mais dans ces conditions comment le facteur d'échange ARNO, qui est actif sur les deux protéines Arf *in vitro*, reconnaît-il deux protéines structurellement différentes ? Le mécanisme structural d'échange du nucléotide de Arf1 et de Arf6 par ARNO sont-ils différents l'un de l'autre ? Pour répondre à cette question, il serait intéressant de connaître la structure de Arf6 en complexe avec ARNO et de la comparer à la structure de Arf1 en complexe avec ARNO. De plus, l'étude structurale de Arf6 et de Arf1 en complexe avec des effecteurs communs aux deux protéines et des effecteurs spécifiques à l'une d'entre elles, permettrait de comprendre les bases structurales qui permettent la reconnaissance des différents effecteurs.

Annexes

Annexe A : Article de l'étude du cycle structural GDP/GTP de Rap2A humain

L'étude du cycle structural GDP/GTP de la petite protéines G Rap2A a été effectuée durant mon stage de DEA, dans le laboratoire d'enzymologie et de Biochimie Structurales (LEBS), par Jacqueline Cherfils. J'ai participé à l'affinement des structures de Rap2A-GDP et de Rap2A-GTP. Cette étude a fait l'objet d'une publication dans l'EMBO Journal, qui est présentée ici.

Ce travail a été effectué durant mon stage de DEA, et pour cette raison n'a aucune raison de figurer dans ce manuscrit de thèse. Cependant, j'ai souhaité présenter l'article dont il a fait l'objet car la présentation de l'étude structurale de Rap2A dans un complexe non catalytique avec le GTP (chapitre 1-II) s'appuie sur ce premier travail. La présence de cet article permettra au lecteur si il le souhaite de prendre connaissance de ce travail.

La résolution des structures de Rap2A a été faite par remplacement moléculaire, en utilisant comme modèle la structure modifiée de H-Ras-GDP (PDB 1q21) à une résolution de 1,7Å pour Rap2A-GDP et de 2,5Å pour Rap2A-GTP. Les points forts de cette étude sont les suivants:

- La structure de Rap2A-GTP est la première structure de petite protéines G en complexe avec son vrai substrat le GTP à avoir été résolue. Les petites protéines G possèdent une activité GTPasique qui leur permettent d'hydrolyser le GTP en GDP + phosphate inorganique. C'est pourquoi, des analogues non hydrolysables du GTP, comme le GTP γ S, le GDPNP ou le GDPCP sont utilisés pour la cristallisation. La faible activité GTPasique de Rap2A (0,005 mn⁻¹) (Lerosey, 1991), ainsi que l'empilement cristallin peuvent expliquer l'obtention de cristaux de Rap2A en présence de son vrai substrat le GTP.

- La résolution concomitante de la structure de Rap2A-GTP γ S (analogue non hydrolysable du GTP) et de la structure de Rap2A-GTP a permis de mettre en évidence que la présence d'un analogue non hydrolysable du GTP dans le site nucléotide plutôt que le vrai substrat (GTP n'entraînait pas de modification structurale d'ordre général).
- La structure de Rap2A-GTP a permis de mettre en évidence une nouvelle interaction au niveau du site nucléotidique qui n'est pas observée dans la structure de Rap2A-GTP γ S. Cette interaction est faite entre la tyrosine 32 du Switch I et le phosphate gamma du GTP, de la même manière que la thréonine 35 et la glycine 60 interagissent avec le phosphate gamma. La tyrosine 32 forme aussi une interaction avec le NH de la glycine 13, qui lui-même interagit avec l'oxygène qui relie le phosphate beta et gamma (P β -O-P γ) du GTP. De plus, le cycle aromatique de la tyrosine 32 est empilé par contacts hydrophobes sur la cycle de la proline 34.
- Les structures de Rap2A-GDP et de Rap2A-GTP ont permis d'observer pour la seconde fois le cycle structural GDP/GTP d'une petite protéine G, et ainsi de généraliser le modèle des changements de conformation des régions Switch proposé pour H-Ras (1^{ère} petite protéine G dont le cycle structural GDP/GTP a été étudié) (Milburn, 1990). De plus, le cycle structural GDP/GTP de Rap2A a permis de mettre en évidence que les changements de conformation des régions Switch pouvaient avoir des longueurs différentes.
- Le cycle structural GDP/GTP de Rap2A est caractérisé par une transition désordre/ordre des régions Switch I et Switch II. En effet, les Switch I et II de Rap2A-GDP sont désordonnés, l'échange du GDP contre du GTP stabilise ces deux régions *via* l'interaction de trois résidus de la protéine (Tyr32, Thr35 et Gly60) avec le phosphate gamma du GTP.

Crystal structures of the small G protein Rap2A in complex with its substrate GTP, with GDP and with GTP γ S

Jacqueline Cherfils¹, Julie Ménétrey,
Gérard Le Bras, Gisèle Le Bras,
Isabelle Janoueix-Lerosey²,
Jean de Gunzburg², Jean-Renaud Garel
and Isabelle Auzat

Laboratoire d'Enzymologie et de Biochimie Structurales,
UPR 9063-CNRS, Avenue de la Terrasse, 91198 Gif-sur-Yvette,
France and ²INSERM U-248, Institut Curie, Section de Recherche,
2, rue d'Ulm, 74231 Paris Cedex 05, France

¹Corresponding author
e-mail: cherfils@lebs.cnrs-gif.fr

The small G protein Rap2A has been crystallized in complex with GDP, GTP and GTP γ S. The Rap2A–GTP complex is the first structure of a small G protein with its natural ligand GTP. It shows that the hydroxyl group of Tyr32 forms a hydrogen bond with the γ -phosphate of GTP and with Gly13. This interaction does not exist in the Rap2A–GTP γ S complex. Tyr32 is conserved in many small G proteins, which probably also form this hydrogen bond with GTP. In addition, Tyr32 is structurally equivalent to a conserved arginine that binds GTP in trimeric G proteins. The actual participation of Tyr32 in GTP hydrolysis is not yet clear, but several possible roles are discussed. The conformational changes between the GDP and GTP complexes are located essentially in the switch I and II regions as described for the related oncoprotein H-Ras. However, the mobile segments vary in length and in the amplitude of movement. This suggests that even though similar regions might be involved in the GDP–GTP cycle of small G proteins, the details of the changes will be different for each G protein and will ensure the specificity of its interaction with a given set of cellular proteins.

Keywords: crystal structure/G proteins/GTP hydrolysis/Rap/Ras

Introduction

Small G proteins form a large family of structurally related proteins which have the essential property of cycling between a GDP- and a GTP-bound form, each recognizing separate sets of cellular partners (reviewed in Boguski and McCormick, 1993). The cycle is used to filter, amplify or time upstream input signals, depending on the spatiotemporal properties of the different subfamilies. The molecular features of the family likeness are well established from crystallographic studies of various small G proteins (reviewed in Hilgenfeld, 1995; Kjeldgaard *et al.*, 1996), but the structural differences between the GDP and GTP conformations have been described only for the H-Ras oncoprotein (reviewed in Bourne *et al.*,

1991; Valencia *et al.*, 1991). The high-resolution structures of H-Ras bound to GDP (Milburn *et al.*, 1990) and to the non-hydrolysable GTP analogues GPPNP (Pai *et al.*, 1990) and GPPCP (Milburn *et al.*, 1990) revealed two polypeptide stretches, termed switch I and II, that take on different conformations according to which nucleotide is bound. The switch I region (residues 30–40) had been mapped genetically as a site for interaction with effectors (Willumsen *et al.*, 1986), and the recent crystal structure of the H-Ras homologue Rap1A complexed with the Ras effector Raf has identified the molecular nature of these interactions (Nassar *et al.*, 1995, 1996). This region probably constitutes a general docking site for the effectors of small G proteins. The switch II region, on the other hand, is not essential for proper effector recognition, but may interact with guanine nucleotide exchange factors (reviewed in Polakis and McCormick, 1993). As most of these data were obtained for H-Ras, it remains essentially unsettled whether the numerous small G proteins of the Ras family undergo the same GDP/GTP structural transition as H-Ras (Valencia *et al.*, 1991).

The H-Ras structures, by locating essential protein–nucleotide interactions, have also been a reference in the longstanding debate on how the GTPase activity of small G proteins works (reviewed in Maegley *et al.*, 1996). The rate of hydrolysis of GTP is important for the duration of the association of the G protein with its GTP-specific partners, and it is usually very low (compiled in Zerial and Huber, 1995). The crystal structures of H-Ras define candidate residues for activation of the water molecule that attacks the γ -phosphate of GTP, and for the stabilization of the transition state of the GTPase reaction. It is not known, however, how the GTPase reaction is designed to act as a timer and/or wait for interactions triggered by GTPase-activating proteins (GAPs).

Rap proteins, which include Rap1A, Rap1B, Rap2A and Rap2B, have ~50% sequence identity with Ras proteins (reviewed in Bokoch, 1993). Rap1 was independently cloned by sequence homology (Pizon *et al.*, 1988) and by its ability to revert the transformed phenotype of v-Ki-Ras-transformed fibroblasts (Kitayama *et al.*, 1989), from which it was hypothesized that Rap1 may compete for binding to downstream targets of Ras. Although the physiological function of the Rap proteins is still unknown, it is now established that Rap1 binds to several Ras targets including p120–GAP (Frech *et al.*, 1990), and the Ras effectors Raf and RalGDS (Herrmann *et al.*, 1996). Indeed, the docking site for the Ras-binding domain of Raf (RafRBD) at the surface of Rap1A differs from that of H-Ras by only two amino acids (Nassar *et al.*, 1995). However, the intrinsic GTPase of Rap1A is not activated by p120–GAP (Frech *et al.*, 1990) and Rap1A does not activate c-Raf (Nassar *et al.*, 1996). Although the physiological relevance of this competition is not estab-

lished, it accounts well for the 'anti-Ras' effect of Rap1 under overexpression set-ups. Such effects are not observed with the other member of the family, Rap2 (Jimenez *et al.*, 1991): despite its identity of ~60% with Rap1, its overexpression is unable to antagonize the growth-promoting effects of Ras. Why Rap1 and Rap2 have differential pattern of cross-interactions with Ras targets is presently unexplained.

We report here a comprehensive crystallographic study of the GDP/GTP cycle of the small G protein Rap2A, which was crystallized with its natural ligand GTP, with GDP and with the GTP analogue GTP γ S. The GTP complex is the first report of the high-resolution structure of a G protein with its true substrate. GTP interacts with the G protein in a different way than previously reported for GTP analogues, including the Rap2A-GTP γ S complex. On the other hand, the comparison of the GDP/GTP structures of Rap2A with their Ras counterparts shows that Rap2A, in the context of the usual overall fold of G domains, undergoes conformational changes of different amplitude and location from those of H-Ras. Altogether, the Rap2A structures provide a new framework for discussing the GTPase mechanism and the structural switches that allow the segregation of GDP- from GTP-specific partners by small G proteins.

Results

Crystallization and structure determination of the Rap2A-GTP complex

Recombinant Rap2A was purified from *Escherichia coli* essentially in the GDP-bound form, which yielded monoclinic crystals of Rap2A-GDP with freshly purified protein. Under these conditions, protein stocks that had been stored for several months at -80°C yielded hexagonal crystals of Rap2A-GTP without any attempt to exchange GTP for GDP. The nucleotide content of the protein stock was tested by ion exchange chromatography, and revealed the presence of GMP, GDP and GTP in equal amounts. Reproducible crystals were indeed obtained by loading GTP onto Rap2A with the method used for GTP γ S. Rap2A-GTP crystals are stable for at least 1 week at 4°C , after which they begin to melt and are progressively replaced by monoclinic Rap2A-GDP crystals. The presence of nucleotides other than GDP may be attributed to the $2 \text{ GDP} \leftrightarrow \text{GMP} + \text{GTP}$ spontaneous equilibrium, or to the presence of trace amounts of an *E.coli* contaminating enzyme capable of catalysing this reaction, thereby regenerating GTP and stabilizing the crystals. The same causes were suspected for the presence of ADP and fructose-1,6-bisphosphate in crystals of phosphofructokinase grown with ADP and fructose-6-phosphate (P.Evans, personal communication).

At a wavelength of 1 \AA on the synchrotron beam lines, Rap2A-GTP crystals were stable enough for the collection of a complete data set. However, we found that the quality of the electron density map improved with diffraction amplitudes merged from two crystals that were exposed to X-rays for no more than 3 h, keeping GTP hydrolysis to a minimum. The stability of the GTP conformation during data collection is probably due to the low intrinsic GTPase rate of Rap2A ($2 \times 10^{-3}/\text{min}$ at 37°C ; Lerosey

et al., 1991), and possibly to an inhibitory effect arising from crystal packing forces.

Structure of Rap2A-GTP and comparison with Rap2A-GTP γ S

An overall view of the structure is shown in Figure 1A. The Rap2A-GTP electron density map unambiguously shows the GTP nucleotide (Figure 2). The switch I and switch II regions, defined by analogy to H-Ras as residues 30–37 and 60–75, are well defined. The ligands of the γ -phosphate of GTP are the hydroxyl groups of Tyr32 and Thr35, the amide nitrogen of Gly60, the NH_3^+ of Lys16 and the Mg^{2+} ion (Figure 3). Whereas most of these ligands are seen in other triphosphate structures of small G proteins, the Tyr32- γ -phosphate distance has never been observed closer than 3.9 \AA in H-Ras-GPPCP (Milburn *et al.*, 1990) or $4.3\text{--}4.8 \text{ \AA}$ in the Rap1A-GPPNP-RafRBD complexes (Nassar *et al.*, 1995, 1996; Geyer *et al.*, 1996), this being too long for a direct hydrogen bond. In Rap2A-GTP, the hydroxyl group of Tyr32 is located at 3.0 \AA from a γ -phosphate oxygen and protects it from contact with the solvent. Its configuration is stabilized by a hydrogen bond with the amide nitrogen of Gly13, and by the packing of its aromatic ring on the ring of Pro34 (Figure 4). The nitrogen of Gly13 also forms a hydrogen bond with the oxygen that bridges the β - and γ -phosphates. In the crystal structures of H-Ras and Rap1A with the GTP analogues GPPNP or GPPCP, the replacement of this oxygen by NH or CH_2 prevents the existence of the Gly13 hydrogen bond.

Crystals of Rap2A-GTP γ S, whose structure we also report at 3 \AA resolution, are isomorphous to the Rap2A-GTP crystals. Both structures are essentially similar, except that Tyr32 no longer forms a hydrogen bond with the corresponding atom of the γ -thiophosphate, which is probably the sulfur atom (Figure 5). The Tyr32- γ -thiophosphate distance is 7.2 \AA . The conformation of switch I and II and their interaction with the nucleotide are otherwise identical. Thus, the Tyr32- γ -phosphate hydrogen bond forms only in the presence of the true ligand, but is probably not essential for the triphosphate conformation of Rap2A nor for proper binding of the nucleotide. In particular, the position of Thr61 compares well between the GTP and GTP γ S complexes. The equivalent Gln61 in Ras is a site of oncogenic mutations, most of which impair catalysis (Der *et al.*, 1986). Indeed, mutation of Thr61 into Gln in Rap1A restores a GTPase rate similar to that of Ras (Frech *et al.*, 1990). The crystal structure of H-Ras-GPPNP suggests that Gln61 may either position or polarize the water molecule that attacks the γ -phosphate. In Rap2A-GTP, the O_γ of Thr61 is located 6 \AA from the γ -phosphate, and there is no density for a water molecule that would be positioned for nucleophilic attack.

The GDP/GTP structural cycle of Rap2A

In order to describe the GDP/GTP cycle of Rap2A, we have also determined the structure of its GDP-bound form. The 1.7 \AA resolution electron density of the Rap2A-GDP complex is clear for the protein, GDP, Mg^{2+} and 76 water molecules, plus a second Mg^{2+} site at a crystal interface (Figure 6). However, several residues in the switch regions I and II are disordered. The chain trace is unambiguous for residues 32–36 in the switch I, but their side chains

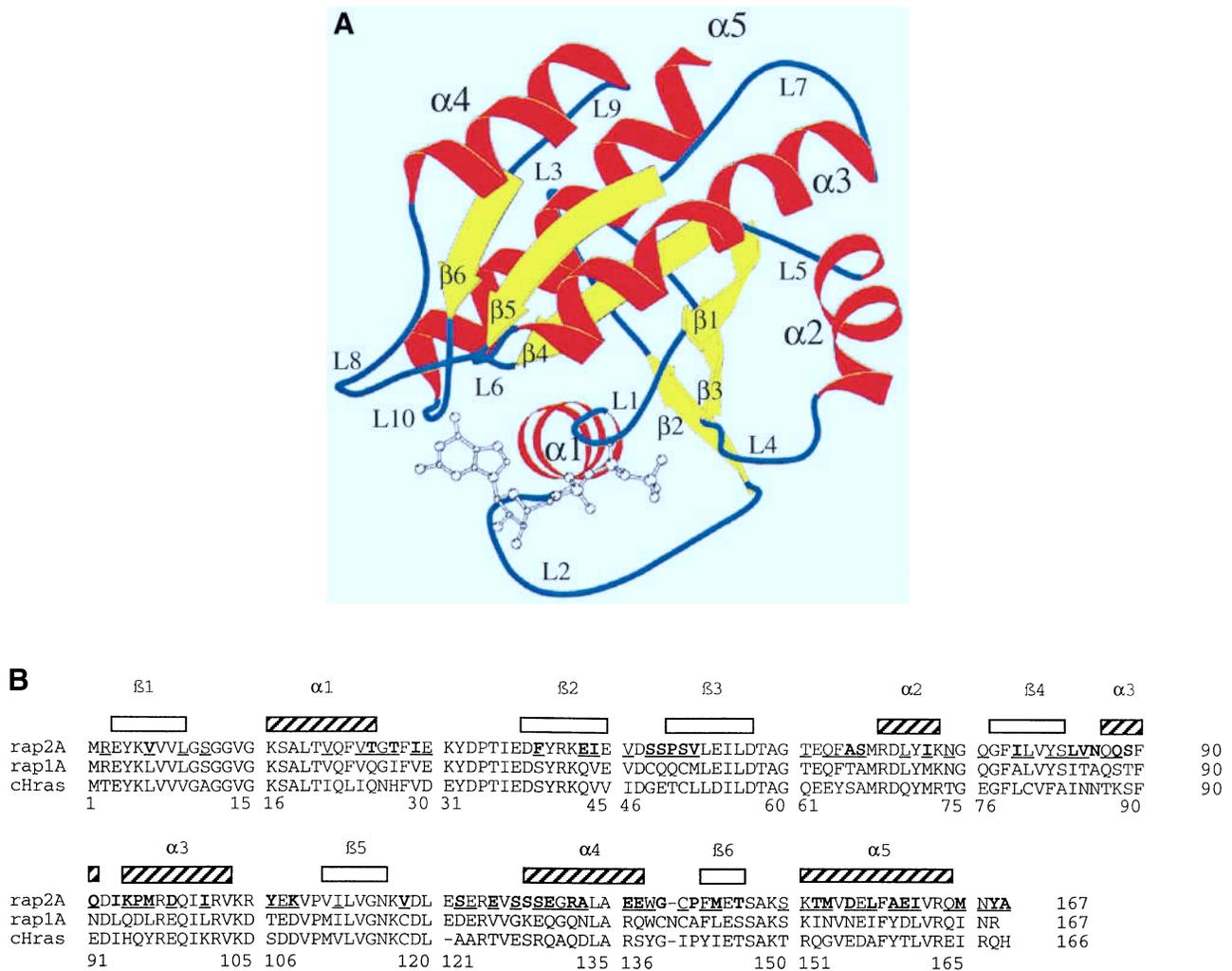


Fig. 1. Sequence and secondary structure of Rap2A. (A) Secondary structure of Rap2A–GTP. Figures 2, 4, 5, 7, 8, 9 and 10 are close-up views in the same orientation. (B) Sequence alignment of Rap2A, Rap1A and H-Ras. Amino acids of Rap2A that differ from Rap1A are shown in bold characters, those that differ from Ras are underlined. α -helices and β -strands (defined with DSSP) are shown as hatched and open boxes respectively.

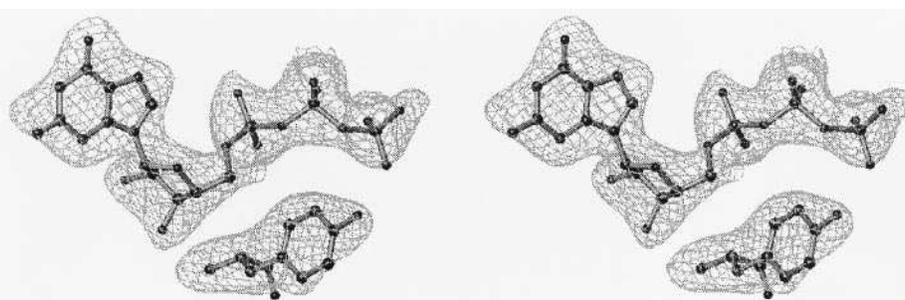


Fig. 2. $|F_o| - |F_c|$ electron density map of Rap2A–GTP at 2.5 Å resolution with GTP and Tyr32 omitted from the calculation, showing that the γ -phosphate of GTP and the position of Tyr32 are clearly identified in the electron density.

have weak densities, in particular Ile36. This region runs close to, but does not interact with, the GDP phosphates nor with Mg^{2+} . In this conformation, Tyr32 and Thr35 point towards the solvent. On the other hand, there is no interpretable density for residues 60–63, which form the N-terminal part of the switch II region. The rest of switch II forms a regular α -helix from Phe64 to Gly75, labelled α 2, whose density is well-defined.

The GDP/GTP cycle of Rap2A can be analysed by comparing its GDP and GTP complexes (Figure 7). The

γ -phosphate of GTP stabilizes an ordered conformation at the switch I and switch II regions. Tyr32 and Thr35 flip to the inside, while Ile36 is now exposed to the solvent. There is little movement of the Mg^{2+} ion as it gains an interaction with the γ -phosphate. The switch II region, in addition to forming an organized structure at residues 60–63, also rearranges helix α 2 into a 3_{10} helix from Thr61 to Ser66, while the α -helix from Met67 to Gly75 is retained. The orientation of the α -helix at residues 67–75 is unaffected by the GDP/GTP alternation, and retains its

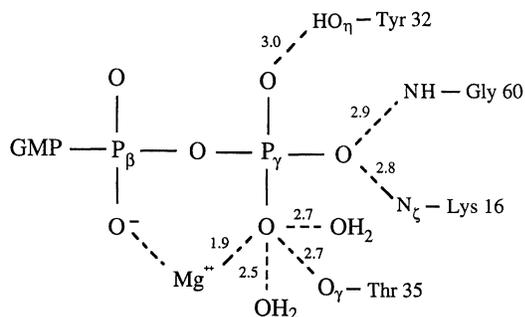


Fig. 3. Interactions of Rap2A with the γ -phosphate of GTP.

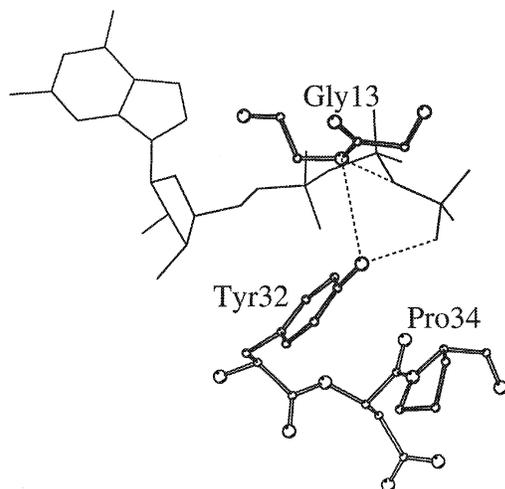


Fig. 4. The network of hydrogen bonds (dashed lines) at Tyr32, Gly13 and GTP. The nucleotide is shown as lines, protein atoms in ball-and-stick. Gly13 interacts with the β - γ bridge oxygen and Tyr32 with a γ -phosphate oxygen

packing on helix α 3. The response of Rap2A to GTP binding is thus characterized by a disorder-to-order transition at residues 32–36 (switch I) and 60–63 (switch II), probably driven by the interactions of Tyr32, Thr35 and Gly60 with the γ -phosphate of GTP, and by a rearrangement of the helical conformation from residues 64–66 of helix α 2. An eventual influence of crystal packing forces on the overall conformation of switch II cannot, however, be ruled out, since helix α 2 forms lattice contacts in both crystal forms. In addition to these changes, Rap2A-GDP and Rap2A-GTP also differ in the L3 loop, which undergoes a rigid body movement of ~ 2 Å amplitude from residues 47 to 51. The L3 loop connects two β -strands, one of which follows switch I while the other precedes switch II, but it is not in direct contact with the guanine nucleotide. If its structural change is a consequence of GTP binding, it is thus indirect.

Comparison of Rap2A with H-Ras and Rap1A

Our set of structures provides the first opportunity to determine to what extent the features of the structural switch of H-Ras are common to other small G proteins. Rap2A is related to H-Ras by 46% sequence identity (Figure 1B). The regions where Rap2A and H-Ras have diverging sequences, essentially loops, display different conformations, but outside switch I and switch II these regions are not affected by the GDP/GTP alternation.

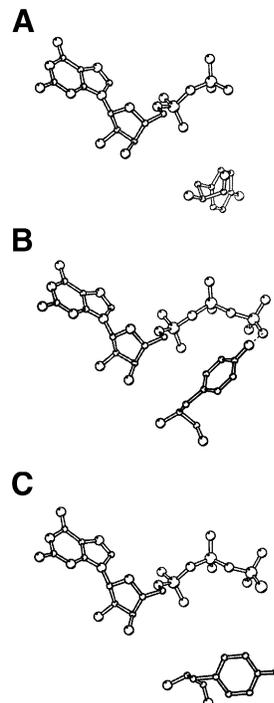


Fig. 5. The position of Tyr32 relative to the nucleotide in (A) Rap2A-GDP, (B) Rap2A-GTP and (C) Rap2A-GTP γ S. The hydrogen bond of Tyr32 to the γ -phosphate of GTP is in dashed lines. Tyr32 is exposed to the solvent in the Rap2A-GDP complex, and its distance to the sulfur of GTP γ S is 7 Å.

Both H-Ras and Rap2A undergo structural transitions at switch I and switch II and a small amplitude movement at loop L3 upon binding GTP (or a GTP analogue). Rap2A differs from H-Ras by three residues in switch I, but both proteins have Glu62, Met67, Arg68 and Asp69 in common in switch II. In the GDP structures, the disordered regions extend to the same residues: 31–36 in switch I, 60–63 in switch II. The switch I regions are essentially similar, except that the ribose 2'-hydroxyl of the nucleotide forms a hydrogen bond to the main chain carbonyl of Glu30 in Rap2A, while it is exposed to the solvent in H-Ras. Binding of GTP organizes an ordered conformation at switch I that is comparable for both proteins, with Thr35 binding to the γ -phosphate and to Mg^{2+} . The additional interaction of Tyr32 with the γ -phosphate that we see in Rap2A-GTP is not present in the complexes of H-Ras with GTP analogues, but we expect that it also exists in the H-Ras-GTP complex (see Discussion). Switch II residues 60–63, at the end of loop L4, undergo a disorder-to-order transition in both proteins, which brings the conserved Gly60 in contact with the γ -phosphate. Surprisingly, the structural rearrangements beyond residue 61 are markedly different (Figure 8). In H-Ras, the conformational change extends from residues 64 to 75, with a rigid body motion of helix α 2 which rotates by over 60° perpendicular to its axis. The hinge is located near Gly75, a residue that both proteins have in common. In Rap2A, helix α 2 does not rearrange beyond residue 66. In the GDP form, the $C\alpha$ - $C\alpha$ distances between H-Ras and Rap2A amount to 10 Å in switch II. These discrepancies vanish in the triphosphate conformations as the rotation of helix α 2 in H-Ras superimposes it onto helix α 2 of Rap2A. Yet the 3_{10} helix of residues 62–66 of Rap2A is

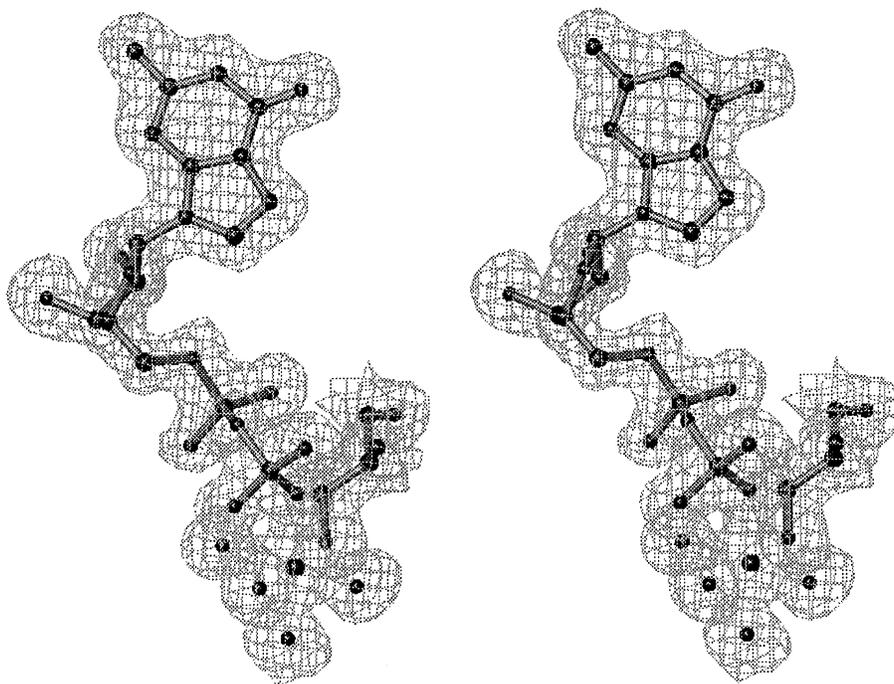


Fig. 6. $2|F_o|-|F_c|$ electron density map of Rap2A-GDP at 1.7 Å resolution, showing the GDP nucleotide, Mg^{2+} and its ligands Ser17 and four water molecules.

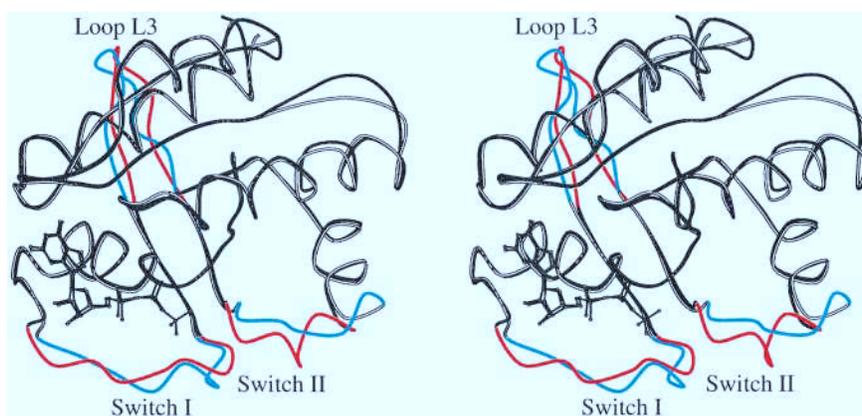


Fig. 7. The GDP/GTP structural changes of Rap2A. Rap2A-GDP is shown in white with the regions that undergo structural changes upon GDP/GTP alternation in blue. The corresponding regions of Rap2A-GTP are shown respectively in black and red.

not present in H-Ras. Thus, although the GDP/GTP structural changes of Rap2A and H-Ras are located in similar regions and the triphosphate structures display close similarities, Rap2A and H-Ras differ markedly in their GDP conformations, especially at switch II, which undergoes a smaller motion and is nine residues shorter in Rap2A than in H-Ras.

The structure of Rap2A-GTP can be further compared with that of Rap1-GPPNP in the complex with RafRBD. In contrast to Rap1A, Rap2A is unable to exert a Ras-antagonist activity (Jimenez *et al.*, 1991). Rap1A and Rap2A carry two substitutions in the docking site for RafRBD as compared with H-Ras, Glu30Asp and Lys31-Glu. Replacement of these two residues in Rap1A with their corresponding amino acids in H-Ras endows the mutant protein with the ability to activate ERK signalling (Nassar *et al.*, 1996). Rap2A has only one additional substitution, Ser39Phe. Whether the effect in signalling

can be attributed to these differences in sequence can be investigated by comparing the binding site for RafRBD on Rap1A to its counterparts in H-Ras-GPPNP and Rap2A-GTP. Not surprisingly, H-Ras-GPPNP fits readily in the RafRBD interface, but this is also true for Rap2A. Ser39, in Rap1, forms a hydrogen bond with the main chain of RafRBD, which cannot be established by Phe39 in Rap2A. Yet Phe39 can be accommodated in the interface by a small rotation of its side chain. This interaction seems to have limited functional consequences, since a Ser39Phe substitution in oncogenic Ras only reduces its transforming ability by one order of magnitude (J.de Gunzburg, unpublished observation). Thus, from the comparison of the triphosphate structures at the RafRBD interface, Rap2A appears very close to both H-Ras and Rap1A. The present study shows that the structural differences between Rap2A and H-Ras are larger in the diphosphate conformations. This may also be the case between

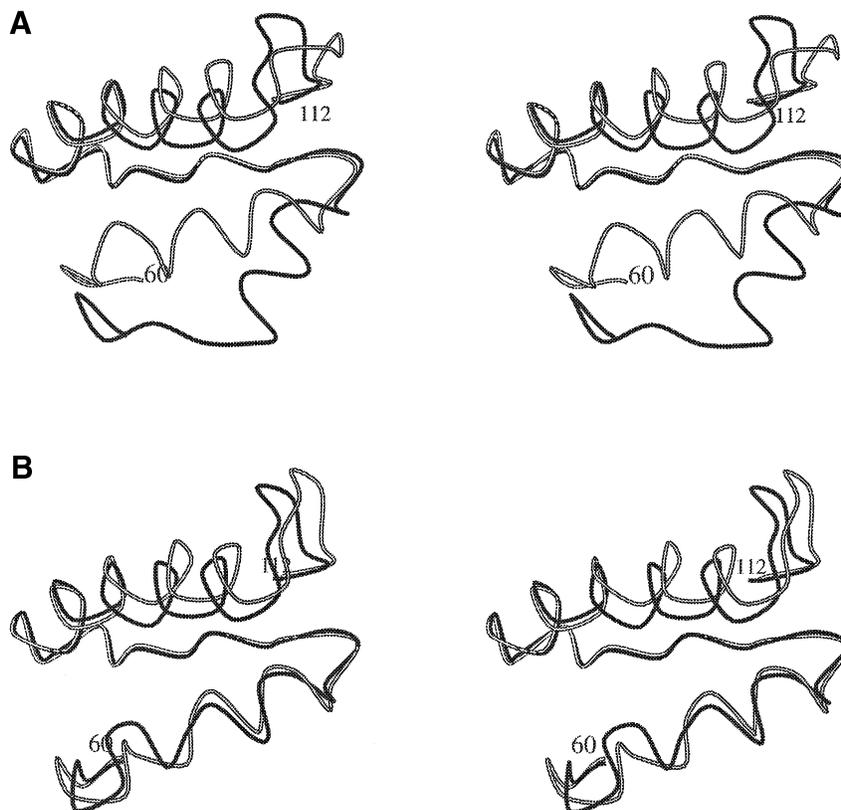


Fig. 8. The GDP/GTP structural changes at switch II in Rap2A (white) and H-Ras (black) from residues 60 to 112 (see Figure 1B for secondary structure elements). Comparison of (A) Rap2A-GDP with H-Ras-GDP and (B) Rap2A-GTP with H-Ras-GPPNP. Helix $\alpha 2$ has a different orientation in the GDP structures, but the triphosphate conformations are very similar. The shift at helix $\alpha 3$ is probably a consequence of the dissimilar GDP/GTP transitions at switch II.

Rap2A and Rap1A, suggesting that, besides non-structural features, such as their subcellular localization (Béranger *et al.*, 1991), or other effector-binding regions, such as the as yet unidentified region that interacts with the zinc finger domain of Raf (Luo *et al.*, 1997), differences between their GDP forms may contribute to their functional differences via the interaction with GDP-specific partners, for instance exchange factors.

Discussion

We have determined the structures of Rap2A in complex with GTP, GDP and GTP γ S, from which we analysed the GDP/GTP structural changes and, for the first time, the interactions of a small G protein with its natural substrate GTP. Our structures show that the GDP/GTP conformational changes are located at switch I and switch II as previously described for H-Ras, but the mobile segment in switch II is nine residues shorter and the amplitude of its movement markedly smaller than in H-Ras. On the other hand, the Rap2A-GTP structure resembles the Rap2A-GTP γ S complex and previously determined structures of H-Ras, but it displays a novel interaction of Tyr32 with the γ -phosphate of GTP and with Gly13. The results we have obtained for Rap2A on the GDP/GTP switch and the Tyr32-GTP interaction can now be discussed in the context of the superfamily of small G proteins.

Switch II may be responsible for the discrimination of GDP-specific partners

The ability to segregate 'upstream' from 'downstream' partners by means of their dissimilar GDP and GTP structures is the hallmark of proteins bearing G domains. In addition to the present structures of Rap2A, GDP and GTP forms are available for H-Ras, for the heterotrimeric G-proteins transducin- α and Gi α , and for the bacterial elongation factor EF-Tu (Kjeldgaard *et al.*, 1996 and references therein). All these proteins undergo structural transitions at their switch I and switch II regions. Switch I has proved to be a general structural sensor ensuring the GTP-specific recognition of small G proteins by their effectors, and in many cases mutations in this region interfere with their proper function. Switch I indeed forms the central part of the docking site for tRNA^{Phe} on EF-Tu-GPPNP (Nissen *et al.*, 1995), for RafRBD on Rap1A-GPPNP (Nassar *et al.*, 1995, 1996) and for RGS4 on Gi α -GDP-AlF₄⁻ (Tesmer *et al.*, 1997).

Switch II, at least beyond residues 60–63, is generally not critical for the interaction with effectors. It is involved in protein-protein interactions in the complex of EF-Tu with its nucleotide exchange factor EF-Ts (Kawashima *et al.*, 1996), and between G α -GDP and the β subunit (Wall *et al.*, 1995; Lambright *et al.*, 1996). In Ras proteins, mutations of this region impair the recognition of guanine nucleotide exchange factors (reviewed in Polakis and McCormick, 1993). The comparison of the GDP/GTP

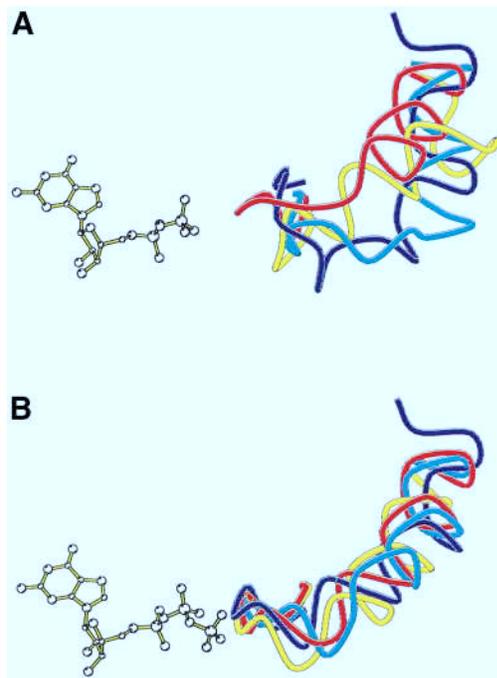


Fig. 9. The GDP/GTP structural transition at switch II in Rap2A (red), H-Ras (blue), transducin α (green) and EF-Tu (yellow). The orientations correspond to an overall superposition of the G domains onto Rap2A-GTP, excluding switch I and switch II. (A) The GDP complexes (H-Ras-GDP, file 4q21; transducin α -GDP, file 1tag; EF-Tu-GDP, file 1etu). (B) The triphosphate complexes (H-Ras-GPPNP, file 5p21; transducin α -GTP γ S, file 1tnd; EF-Tu-GPPNP, file 1eft). The GDP complex of EF-Tu is from *E.coli* and the GPPNP complex from *Thermophilus aquaticus*, but their switch II sequences are identical. The GDP to GTP motion of the switch II helix is different in all structures, but their GTP conformations are very similar. In Rap2A, the helix retains the same orientation in the GDP and GTP complexes; in H-Ras it undergoes a rigid body motion perpendicularly to its axis coupled with the unwinding of its N-terminus (Stouten *et al.*, 1991), a movement that also describes the transition at switch II in EF-Tu (Polekina *et al.*, 1996). In G α proteins, the corresponding helix rotates around its own axis but has no hinge motion (Noel *et al.*, 1993; Coleman *et al.*, 1994; Lambright *et al.*, 1994; Sondek *et al.*, 1994).

structural changes from available crystal structures suggests that switch II may consist of two subregions. One is directly related to the binding/hydrolysis of GTP, including Gly60 and two or three following residues, and the second is helix α 2. In the GDP-bound forms, the orientation of helix α 2 relative to the overall fold of the G domain varies markedly from one protein to the other (Figure 9A). On the other hand, its axis and position coincide in all triphosphate complexes (Figure 9B), as was previously observed by Berghuis *et al.* (1996). This variability may be a general property of helix α 2 in switch II of G domains, and may be involved in the recognition of their GDP-specific partners. The consensus configuration of helix α 2 in the GTP form would then promote the dissociation of GDP-specific targets and prevent their subsequent binding as long as the GTP state is maintained. The existence of two switch regions, each dedicated to the recognition of one set of partners and the segregation of the other, may ensure an optimal signal-to-noise ratio in the response of G proteins to cellular stimulations. Candidate GDP-specific partners of small G proteins are guanine nucleotide exchange factors (Boguski and

McCormick, 1993), guanine dissociation inhibitors (Wu *et al.*, 1996) and lipid transferases (Sanford *et al.*, 1993; Schiedel *et al.*, 1995). It is of course likely that the binding site for GDP-specific partners extends beyond helix α 2, thus providing additional affinity and/or specificity regardless of the nucleotide state.

Interaction of Tyr32 with the γ -phosphate of GTP in small G proteins

Up to now, the GDP/GTP conformational cycle of small G proteins has been inferred only from structures with GTP analogues such as GPPNP, GPPCP or caged GTP. Our study shows that the complex with the natural ligand GTP is similar to the complex with GTP γ S, and thus justifies most conclusions obtained from previous structures of G proteins with GTP analogues. However, the structure of Rap2A with GTP reveals a novel interaction of Tyr32 with an oxygen of the γ -phosphate of GTP and with the amide group of Gly13. In the GTP γ S complex, Tyr32 is shifted away from the corresponding atom. The Rap2A-GTP and Rap2A-GTP γ S complexes are otherwise identical, and form isomorphous crystals. Thus, the interaction of Tyr32 with GTP γ S is prevented solely by the presence of the γ -sulfur, but the conformation of switch I and II is similar whether GTP or a GTP analogue is bound. GTP γ S probably introduces a different charge distribution on the γ -(thio)-phosphate and/or modifies the polarizability of the β - γ P-O bonds as compared with GTP. This is probably also true for other analogues, and may account for the shifted position of Tyr32 in previously reported H-Ras and Rap1A triphosphate complexes. Some conclusions obtained with GTP analogues, in processes where Tyr32 would be a critical component, might therefore be questioned. The structure of H-Ras-GTP, investigated before in Laue experiments using caged GTP, did not identify the Tyr32-GTP hydrogen bond (Schlichting *et al.*, 1990). The method, however, has important limitations due to the incompleteness of the diffraction data and to structural changes associated with the binding of the caged compound (Scheidig *et al.*, 1995). The two different configurations of Tyr32 in Rap2A-GTP and Rap2A-GTP γ S may correspond to the two configurations of H-Ras suggested by 31 P NMR in the presence of GPPNP, while only one was detected with GTP (Geyer *et al.*, 1996). It is thus likely that in H-Ras and Rap1A also, Tyr32 forms a similar interaction with the γ -phosphate of GTP. Together with Ras and Rap, the small G proteins Rho, Ran and several Rabs have an equivalent in their sequence to tyrosine Tyr32. We surmise that their tyrosine also forms a hydrogen bond with GTP.

The interaction of Tyr32 with GTP suggests that its general conservation in small G proteins may have structural or functional advantages. Tyr32 is located three amino acids upstream of a threonine (Thr35 in Ras) which is extremely conserved in most G domains. The α subunits of heterotrimeric G proteins have a conserved arginine equivalent in sequence to Tyr32, which was shown from crystal structures to interact with the γ -phosphate of GTP γ S (Noel *et al.*, 1993; Coleman *et al.*, 1994), and with the transition state analogue AlF $_4^-$ in the presence of GDP (Coleman *et al.*, 1994; Sondek *et al.*, 1994). This arginine was suggested to stabilize the transition state of the GTPase reaction, and indeed its mutation to Cys or His

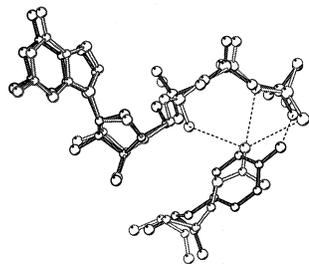


Fig. 10. Comparison of Tyr32 in Rap2A-GTP (black) and Arg174 in transducin α -GTP γ S (white, PDB file 1tnd). Tyr32 and Arg174 occupy a similar location relative to the nucleotide, and both form a hydrogen bond to the γ -phosphate of the guanine nucleotide, but only Arg174 interacts with the β - γ bridging oxygen.

reduces the GTPase activity of Gs (Landis *et al.*, 1989). Because small G proteins lack this arginine, it was proposed that their lower GTPase rates were due to the impossibility of forming such an interaction (reviewed in Maegley *et al.*, 1996). The Rap2A-GTP structure rules out this hypothesis, since Tyr32 occupies a location relative to GTP and forms a hydrogen bond with the γ -phosphate equivalent to that of Arg174 in transducin- α (Figure 10). The tyrosine of small G proteins and the arginine of trimeric G proteins may therefore play similar roles in GTP binding and/or hydrolysis. However, although tyrosine residues can in principle stabilize negative charge build-up in transition states, the mutation of Tyr32 into Phe, which abolishes the hydrogen bond, leaves the intrinsic GTPase of Ras essentially unchanged and decreases its activation by GAP only moderately (Yamasaki *et al.*, 1994). In addition, whereas mutations of the arginine are oncogenic in certain trimeric G proteins (Landis *et al.*, 1989), Tyr32 has not been reported as an oncogenic site in small G proteins. Thus, although the hydrogen bond to the γ -phosphate can form equally well with the tyrosine or the arginine, further differences between these residues must be investigated.

A first difference concerns the GDP/GTP rearrangements at these residues. In G α s, the arginine interacts with the β -phosphate of GDP, and does not have far to move to bind to the γ -phosphate of GTP. In contrast, Tyr32 flips outside-in on alternating the GDP and GTP conformations. The energetic cost of this movement may therefore moderate its contribution to catalysis. On the other hand, Tyr32 in Rap2A-GTP forms another hydrogen bond with the amide of Gly13, an interaction that the guanidinium of Arg174 cannot establish. Both Arg174 in transducin and Gly13 in H-Ras interact with the oxygen that bridges the β - and γ -phosphates, and have recently been proposed to stabilize the negative charge that develops on this oxygen at the transition state (Maegley *et al.*, 1996). In Rap2A-GTP, Gly13 is within distance of forming a hydrogen bond to either Tyr32 or to the bridge oxygen of GTP. Since the amide nitrogen can act as only a single hydrogen bond donor, the presence of Tyr32 may modulate the polarity of the Gly13-GTP interaction. In addition, the Rap2A-GTP maps lack electronic density corresponding to the attacking water molecule, suggesting that Tyr32 may disfavor the binding of the nucleophilic water molecule.

Besides its role in binding and/or hydrolysing GTP, Tyr32 is also important for the quality of the recognition

of the GTP-bound form of small G proteins by their partners (Stone *et al.*, 1988; Yamasaki *et al.*, 1994; Nassar *et al.*, 1995; Akasaka *et al.*, 1996; Wittinghofer and Nassar, 1996; Li and Zheng, 1997). The Tyr32Phe mutant Ras, for instance, binds to Raf but fails to activate it; on the other hand, it does not recognize Byr2, an effector of Ras in *Schizosaccharomyces pombe* (Akasaka *et al.*, 1996). Our results suggest that Tyr32 may also be important for the activation of GTP hydrolysis by GAP. Recent results suggest that p120GAP supplies Ras with active site residues (Mittal *et al.*, 1996; Scheffzek *et al.*, 1996). The Rap2A-GTP structure shows that Tyr32 covers the γ -phosphate of GTP and precludes a direct contact of a GAP side chain with γ oxygens. If the above hypothesis were verified, Tyr32 should therefore be displaced in order to promote a productive GAP association. Various structural approaches, including NMR (Kraulis *et al.*, 1994; Geyer *et al.*, 1996) and X-ray crystallography (Milburn *et al.*, 1990; Pai *et al.*, 1990; this work), have indeed confirmed that Tyr32 is a mobile residue (Figure 5). The finding that the hydrogen bond is disrupted when GTP is replaced by GTP γ S suggests that it is not very strong, and could thus be easily displaced upon interaction with GAP.

In conclusion, our study has emphasized the importance of elucidating the role of Tyr32 in catalysis, stabilization of the GTP conformation and binding/dissociation of protein targets. New mutational studies at position 32, in particular with smaller amino acids, are now needed to settle these issues. It has also been shown that differences between closely related small G proteins, and all the more so between different families, may affect not only the nature of the chemical groups that they present to their targets, but also the location and the amplitude of the structural switch. This may turn out to be an important parameter limiting the apparent promiscuity of recognition of small G proteins, such as Ras, Rap1 and Rap2, for their potential targets.

Materials and methods

Expression and purification of the Rap2A protein

The Rap2A protein was truncated at residue 167 by site-directed mutagenesis on a single-stranded M13 template by introducing a stop codon with oligonucleotide 5' CGC GAG TAC TAA GTG GTG GTG. The *Eco*RI-*Hind*III fragment containing the Rap2A-coding sequence was introduced into the expression plasmid ptae32 as described (Lerosey *et al.*, 1991). The recombinant vector was transformed into competent cells of an *E. coli* K12 strain (JS218) containing plasmid pEMR602 that overexpresses GroEL/GroES chaperones and provides tetracycline resistance (Bergès *et al.*, 1996). Expression of Rap2A was induced by IPTG. Cells were harvested by centrifugation, resuspended in 10 mM sodium phosphate buffer, pH 7.5, containing 150 mM NaCl, and broken with alumina in 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 5 mM Mg acetate, 1 mM EDTA, 2 mM DTT and 50 μ M GDP.

Rap2A was purified to homogeneity in three chromatographic steps, all performed at 4°C. The clear lysate was loaded onto a Matrex Red A column (Amicon) equilibrated with the extraction buffer. Rap2A eluted in the flow-through fraction, which was loaded on an ion-exchange QA Trisacryl column (BioSeptra) and extensively washed with the same buffer. The protein was eluted by a linear gradient of 0–0.4 M NaCl. The positive fractions were concentrated and loaded on a gel filtration column of Ultrogel AcA54 (BioSeptra). The protein preparation was shown to be pure by the presence of a single band on SDS-PAGE, and was stored at -80°C. The yield of 1 l of bacterial culture was 50 mg of pure protein, as compared with 0.5 mg in the absence of the chaperones.

Table I. Statistics for X-ray structure determination

Data set	Rap2-GDP	Rap2-GTP	Rap2-GTP γ S
Space group	P2 ₁	P6 ₁	P6 ₁
Unit cell	$a = 36.8$ $b = 35.3$ $c = 58.3$ $\beta = 106.6$	$a = b = 64.5$ $c = 84.2$	$a = b = 65.4$ $c = 84.5$
Measured reflections	131 709	46 223	26 504
Unique reflections	14 661	8828	4126
Completeness (%)	92.8	98.5	99
Resolution range (Å)	25–1.7	30–2.5	28–3.0
R_{sym} (%)	7.0	6.5	6.8
R -factor (%)	18.3	21.6	18.4
R.m.s.d. bond lengths (Å)	0.008	0.014	0.009
R.m.s.d. bond angles (°)	2.1	2.9	1.6
Average B factor (Å ²)	13.0	43	46
No. of water molecules	76	25	2

Crystallization of the Rap2A complexes

Crystals of Rap2A-GDP were obtained without exchanging the nucleotide bound to the protein as purified from *E.coli*. Crystals grew in hanging drops over wells containing 19% PEG 4000, 100 mM MgCl₂, 100 mM Tris, pH 7.5, at a protein concentration of 10 mg/ml. Crystals of Rap2A loaded with either GTP or with the GTP analogue GTP γ S were obtained after thorough degradation of bound GDP, using the following procedure: 5 mM EDTA was added to chelate the Mg²⁺ ion, then the protein was incubated for 30 min with agarose-coupled alkaline phosphatase to digest GDP. GTP γ S, which is not degraded by the phosphatase, was added at the beginning of the incubation, while GTP was added after the agarose beads had been removed by centrifugation. Both nucleotides were used at concentrations of 10–20 mM. Nucleotide exchange was stopped by excess MgCl₂, and remaining nucleosides and phosphate were removed by buffer exchange on Microcon 10. Crystals of Rap2A loaded with either GTP or GTP γ S were grown by the hanging drop method, with 25% PEG 8000, 100 mM LiSO₄, 100 mM Tris, pH 8, in the wells. The nucleotide content of the protein stock was monitored on an FPLC system (Pharmacia) using a 0–1 M NaCl gradient in 100 mM Tris, pH 7.5, on a MonoQ anion exchanger column.

Data collection and structure determination

Diffraction data were collected at 4°C either on a Rigaku X-ray generator with R -axis image plates, or at the synchrotron beam lines W32 and W21 of LURE (Orsay) with Mar Research image plates. Intensities were integrated with Denzo and reduced and merged with Scalepack (Otwinowski, 1993). Molecular replacements were done with AMORE (Navaza, 1994). All structures were refined by several rounds of minimization and simulated annealing dynamics with X-plor including a model of bulk solvent (Brünger *et al.*, 1989), and graphical building was performed with TURBO (A.Roussel, A.G.Inisan and C.Cambillau, AFMB and BioGraphics, Marseille, France). Maps were computed with the CCP4 programs (1994), using figure-of-merit weighted amplitudes.

Rap2A-GDP crystals belong to space group P2₁, with $a = 36.7$ Å, $b = 35.2$ Å, $c = 58.3$ Å, $\alpha = 90^\circ$, $\beta = 106.8^\circ$, $\gamma = 90^\circ$, and contain one molecule per asymmetric unit and 30% solvent. The Rap2A-GDP complex was solved by molecular replacement using diffraction data collected on a single crystal on the laboratory X-ray generator. The search model was a modified H-Ras-GDP structure [Protein Data Bank (PDB) entry code 1q21], in which non-identical side chains (~50%) were turned into alanines. The initial R -factor after rigid body refinement was 52%, but the corresponding map clearly showed the classical overall fold with the six-stranded β -sheets, the guanine nucleotide and helices $\alpha 1$ and $\alpha 4$. Most loops, and helices $\alpha 2$, $\alpha 3$ and $\alpha 5$ were either not visible or poorly defined, and were progressively re-built. The structure was first refined to an R -factor of 16% at 2.3 Å resolution. Diffraction amplitudes to 1.7 Å were collected later at the synchrotron beam line on two crystals and merged with the Rigaku data, from which the Rap2A-GDP complex was further refined to an R -factor of 18.3% at 1.7 Å resolution.

Rap2A-GTP γ S and Rap2A-GTP crystals were very sensitive to X-ray damage and did not withstand freezing, thus precluding data collection at the Cu wavelength (1.54 Å). Crystal damage was less critical near 1 Å on synchrotron beam lines, where data could be collected. This sensitivity to X-rays is reflected in the high overall B factor. Crystals of Rap2A-GTP γ S and Rap2A-GTP are isomorphous and belong to space group P6₁, with $a = b = 65.3$ Å, $c = 84.4$ Å, and contain one molecule

per asymmetric unit and 53% solvent. Diffraction data for Rap2A-GTP γ S were collected on a single crystal. The Rap2A-GTP γ S complex was positioned by molecular replacement using the modified H-Ras-GDP complex, but the refinement was done with Rap2A-GDP which had been partially refined in the meantime. The final R -factor for the refined Rap2A-GTP γ S complex is 18.4% at 3 Å. Diffraction intensities for Rap2A-GTP were collected from two crystals and merged. Since these crystals were isomorphous to the crystals of Rap2A-GTP γ S, and were obtained after the Rap2A-GTP γ S structure had been refined, the structure could be solved by difference Fourier maps, and refined to an R -factor of 21.6% at 2.5 Å resolution. The free R -factor was used essentially to monitor the early stages of the molecular replacement procedure, but were not taken into account after additional data were collected at the synchrotron beam lines. For Rap2A-GDP, it was 26% for 10% missing data at 2.3 Å, and 26.1% for 5% missing data for Rap2A-GTP γ S at 3 Å. Crystallographic statistics are summarized in Table I.

Acknowledgements

We are grateful to O.Fayet for his generous gift of the JS218 strain and pEMR602 plasmid. We thank R.Fourme, W.Shepard and the staff at LURE for making outstations W32 and W21 on the wiggler line available to us. We thank J.Janin for critical reading of the manuscript and scientific discussions. This work was supported by grants from the Centre National de la Recherche Scientifique (UPR9063), the Association pour la Recherche sur le Cancer, the Université Paris 6 (927-0300) and Université Paris XI. The coordinates of the Rap2A complexes will be deposited to the Protein Data Bank.

References

- Akasaka, K. *et al.* (1996) Differential structural requirements for interaction of Ras protein with its distinct downstream effectors. *J. Biol. Chem.*, **271**, 5353–5360.
- Béranger, F., Tavitian, A. and de Gunzburg, J. (1991) Post-translational processing and subcellular localization of the ras-related rap2 protein. *Oncogene*, **6**, 1835–1842.
- Bergès, H., Joseph-Liauzun, E. and Fayet, O. (1996) Combined effects of the signal sequence and the major chaperone proteins on the export of human cytokines in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **62**, 55–60.
- Berghuis, A.M., Lee, E., Raw, A.S., Gilman, A.G. and Sprang, S.R. (1996) Structure of the GDP-Pi complex of Gly203→Ala G_i $\alpha 1$: a mimic of the ternary product complex of G _{α} -catalyzed GTP hydrolysis. *Structure*, **4**, 1277–1290.
- Boguski, M.S. and McCormick, F. (1993) Proteins regulating Ras and its relatives. *Nature*, **366**, 643–654.
- Bokoch, G.M. (1993) Biology of the Rap proteins, members of the ras superfamily of GTP binding proteins. *Biochem. J.*, **289**, 17–24.
- Bourne, H.R., Sanders, D.A. and McCormick, F. (1991) The GTPase superfamily: conserved structure and molecular mechanism. *Nature*, **349**, 117–127.
- Brünger, A.T., Karplus, M. and Petsko, G.A. (1989) Crystallographic refinement by simulated annealing: application to crambin. *Acta Crystallogr. A*, **45**, 50–61.

- Coleman, D.E., Berghuis, A.M., Lee, E., Linder, M.E., Gilman, A.G. and Sprang, S.R. (1994) Structure of active conformations of $G_{i\alpha}$ and the mechanism of GTP hydrolysis. *Science*, **265**, 1405–1412.
- Collaborative Computational Project No. 4 (1994) The CCP4 suite: programs for protein crystallography. *Acta Crystallogr. D*, **50**, 760–763.
- Der, C., Finkel, T. and Cooper, G.M. (1986) Biological and biochemical properties of human rasH genes mutated at codon 61. *Cell*, **44**, 167–176.
- Frech, M., John, J., Pizon, V., Chardin, P., Tavitian, A., Clark, R., McCormick, F. and Wittinghofer, A. (1990) Inhibition of GTPase activating protein stimulation of ras-p21 GTPase by the Krev-1 gene product. *Science*, **249**, 169–171.
- Geyer, M., Schweins, T., Herrmann, C., Prisner, T., Wittinghofer, A. and Kalbitzer, H.R. (1996) Conformational transitions in p21ras and its complexes with the effector protein Raf-RBD and the GTPase activating protein GAP. *Biochemistry*, **35**, 10308–10320.
- Herrmann, C., Spaargaren, M. and 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. *J. Biol. Chem.*, **271**, 6794–6800.
- Hilgenfeld, R. (1995) Regulatory GTPases. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **5**, 810–817.
- Jimenez, B., Pizon, V., Lerosey, I., Béranger, F., Tavitian, A. and de Gunzburg, J. (1991) Effects of the ras-related rap2 protein on cellular proliferation. *Int. J. Cancer*, **49**, 471–479.
- Kawashima, T., Berthet-Colominas, C., Wulff, M., Cusack, S. and Leberman, R. (1996) The structure of the *E. coli* EF-Tu-EF-TS complex at 2.5 Å resolution. *Nature*, **379**, 511–518.
- Kitayama, H., Sugimoto, Y., Matsuzaki, T., Ikawa, Y. and Noda, M. (1989) A ras-related gene with transformation suppressor activity. *Cell*, **56**, 77–84.
- Kjeldgaard, M., Nyborg, J. and Clark, B.F.C. (1996) The GTP binding motif: variations on a theme. *FASEB J.*, **10**, 1347–1368.
- Kraulis, P.J., Domaille, P.J., Campbell-Burk, S.L., Van Aken, T. and Laue, E.D. (1994) Solution structure and dynamics of ras p21-GDP determined by heteronuclear three- and four-dimensional NMR spectroscopy. *Biochemistry*, **33**, 3515–3531.
- Lambright, D.G., Noel, J.P., Hamm, H.E. and Sigler, P.B. (1994) Structural determinants for activation of the α -subunit of a heterotrimeric G protein. *Nature*, **369**, 621–628.
- Lambright, D.G., Sondek, J., Bohm, A., Skiba, N.P., Hamm, H.E. and Sigler, P.B. (1996) The 2.0 Å crystal structure of a heterotrimeric G protein. *Nature*, **379**, 311–319.
- Landis, C.A., Masters, S.B., Spada, A., Pace, A.M., Bourne, H.R. and Vallar, L. (1989) GTPase inhibiting mutations activate the α chain of Gs and stimulate adenylyl cyclase in human pituitary tumours. *Nature*, **340**, 692–696.
- Lerosey, I., Chardin, P., de Gunzburg, J. and Tavitian, A. (1991) The product of the rap2 gene, member of the ras superfamily. Biochemical characterization and site directed mutagenesis. *J. Biol. Chem.*, **266**, 4315–4321.
- Li, R. and Zheng, Y. (1997) Residues of the Rho family GTPases Rho and Cdc42 that specify sensitivity to Dbl-like guanine nucleotide exchange factors. *J. Biol. Chem.*, **272**, 4671–4679.
- Luo, Z., Diaz, B., Marshall, M.S. and Avruch, J. (1997) An intact Raf zinc finger is required for optimal binding to processed Ras and for Ras-dependent Raf activation *in situ*. *Mol. Cell. Biol.*, **17**, 46–53.
- Maegley, K.A., Admiraal, S.J. and Herschlag, D. (1996) Ras-catalyzed hydrolysis of GTP: a new perspective from model studies. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **93**, 8160–8166.
- Milburn, M.V., Tong, L., DeVos, A.M., Brünger, A., Yamizumi, Z., Nishimura, S. and Kim, S.-H. (1990) Molecular switch for signal transduction: structural differences between active and inactive forms of protooncogenic ras proteins. *Science*, **247**, 939–945.
- Mittal, R., Ahmadian, M.R., Goody, R.S. and Wittinghofer, A. (1996) Formation of a transition state analog of the Ras GTPase reaction by Ras-GDP, tetrafluoroaluminate and GTPase-activating proteins. *Science*, **273**, 115–117.
- Nassar, N., Horn, G., Herrmann, C., Scherer, A., McCormick, F. and 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.
- Nassar, N., Horn, G., Herrmann, C., Block, C., Janknecht, R. and Wittinghofer, A. (1996) Ras/Rap effector specificity determined by charge reversal. *Nature Struct. Biol.*, **3**, 723–729.
- Navaza, J. (1994) AMoRe: an automated package for molecular replacement. *Acta Crystallogr. A*, **50**, 157–163.
- Nissen, P., Kjeldgaard, M., Thirup, S., Polekhina, G., Reshetnikova, L., Clark, B.F.C. and Nyborg, J. (1995) Crystal structure of the ternary complex of the Phe-tRNAPhe, EF-Tu and a GTP analog. *Science*, **270**, 1464–1472.
- Noel, J.P., Hamm, H.E. and Sigler, P.B. (1993) The 2.2 Å crystal structure of transducin α complexed with GTP γ S. *Nature*, **366**, 654–663.
- Otwinowski, Z. (1993) Oscillation data reduction program. In Sawyer, L., Isaacs, N. and Bailey, S. (eds), *CCP4 Study Weekend: Data Collection and Processing*. Daresbury Laboratory, Warrington, UK, pp. 56–62.
- Pai, E.F., Krengel, U., Petsko, G.A., Goody, R.S., Kabsch, W. and 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 J.*, **9**, 2351–2359.
- Pizon, V., Chardin, P., Lerosey, I., Olofsson, B. and Tavitian, A. (1988) Human cDNAs rap1 and rap2 homologous to the *Drosophila* Dras3 encode proteins closely related to ras in the 'effector' region. *Oncogene*, **3**, 201–204.
- Polakis, P. and McCormick, F. (1993) Structural requirements for the interaction of p21^{ras} with GAP, exchange factors, and its biological effector target. *J. Biol. Chem.*, **268**, 9157–9160.
- Polekhina, G., Thirup, S., Kjeldgaard, M., Nissen, P., Lippmann, C. and Nyborg, J. (1996) Helix unwinding in the effector region of elongation factor EF-Tu-GDP. *Structure*, **4**, 1141–1151.
- Sanford, J.C., Pan, Y. and Wessling-Resnik, M. (1993) Prenylation of rab5 is dependent on guanine nucleotide binding. *J. Biol. Chem.*, **268**, 22773–22776.
- Scheffzek, K., Lautwein, A., Kabsch, W., Reza Ahmadian, M. and Wittinghofer, A. (1996) Crystal structure of the GTPase-activating domain of human p120GAP and implications for the interaction with ras. *Nature*, **384**, 591–596.
- Scheidig, A.J., Franken, S.M., Corrie, J.E.T., Reid, G.P., Wittinghofer, A., Pai, E.F. and Goody, R.S. (1995) X-ray crystal structure analysis of the catalytic domain of the oncogene product p21^{H-ras} complexed with caged GTP and Mant dGppNHp. *J. Mol. Biol.*, **253**, 132–150.
- Schiedel, A.C., Barnekow, A. and Mayer, T. (1995) Nucleotide induced conformation determines post translational isoprenylation of the ras related rab6 protein in insect cells. *FEBS Lett.*, **376**, 113–119.
- Schlichting, I. *et al.* (1990) Time-resolved X-ray crystallography study of the conformational change in Ha-Ras p21 protein on GTP hydrolysis. *Nature*, **345**, 309–315.
- Sondek, J., Lambright, D.G., Noel, J.P., Hamm, H.E. and Sigler, P.B. (1994) GTPase mechanism of G proteins from the 1.7 Å crystal structure of transducin α -GDP-AlF₄⁻. *Nature*, **372**, 276–279.
- Stone, J., Vass, W., Wilumsen, B. and Lowy, D. (1988) p21-ras effector domain mutants constructed by 'cassette' mutagenesis. *Mol. Cell. Biol.*, **8**, 3565–3569.
- Stouten, P.F.W., Sander, C., Wittinghofer, A. and Valencia, A. (1991) How does the switch II region of G-domains work? *FEBS Lett.*, **320**, 1–6.
- Tesmer, J.J.G., Berman, D.M., Gilman, A.G. and Sprang, S.R. (1997) Structure of RGS4 bound to AlF₄⁻-activated $G_{i\alpha 1}$: stabilization of the transition state for GTP hydrolysis. *Cell*, **89**, 251–261.
- Valencia, A., Chardin, P., Wittinghofer, A. and Sander, C. (1991) The ras protein family: evolutionary tree and role of conserved amino acids. *Biochemistry*, **30**, 4637–4648.
- Wall, M.A., Coleman, D.E., Lee, E., Iniguez-Llhi, J.A., Posner, B.A., Gilman, A.G. and Sprang, S.R. (1995) The structure of the G protein heterotrimer $G_{i\alpha 1\beta 1\gamma 2}$. *Cell*, **83**, 1047–1058.
- Willumsen, B.M., Papageorge, A.G., Kung, H.F., Behesi, E., Robin, T., Johnsen, M., Vass, W.C. and Lowy, D.R. (1986) Mutational analysis of a ras catalytic domain. *Mol. Cell. Biol.*, **6**, 2646–2654.
- Wittinghofer, A. and Nassar, N. (1996) How Ras-related proteins talk to their effectors. *Trends Biochem. Sci.*, **21**, 488–491.
- Wu, S.-K., Zeng, K., Wilson, I.A. and Balch, W.E. (1996) Structural insights into the function of the rab GDI superfamily. *Trends Biochem. Sci.*, **21**, 472–476.
- Yamasaki, K. *et al.* (1994) Site-directed mutagenesis, fluorescence, and two-dimensional NMR studies on microenvironments of effector region aromatic residues of human c-Ha-Ras protein. *Biochemistry*, **33**, 65–73.
- Zerial, M. and Huber, L.A. (eds) (1995) *Guidebook to the Small GTPases*. Oxford University Press, Oxford, UK.

Received on May 27, 1997; revised on June 30, 1997

Annexe B : Article de l'étude structurale du domaine sec7 du facteur d'échange ARNO humain des protéines Arf

L'étude structurale des protéines Arf est l'un des projets principaux du laboratoire. Ce projet a débuté suite à la découverte d'un nouveau facteur d'échange GDP/GTP humain de la protéine Arf1 : ARNO (Chardin, 1996), et est effectué en collaboration avec l'équipe de Marc Chabre de l'Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire. L'étude structurale du domaine sec7 du facteur d'échange humain ARNO des protéines Arf était déjà en cours, lorsque j'ai débuté mon stage doctoral. J'ai effectué l'affinement de la structure du domaine sec7 du facteur d'échange humain ARNO des protéines Arf.

La structure du domaine sec7 du facteur d'échange humain ARNO des protéines Arf (sec7-ARNO) a été résolue par la méthode MIRAS (remplacement moléculaire isomorphe avec diffusion anormale) à une résolution de 2Å. Les points forts de cette étude sont les suivants :

- La structure de sec7-ARNO est la première structure d'un domaine sec7 de facteur d'échange des protéines Arf à avoir été résolue.
- La structure de sec7-ARNO a permis de mettre en évidence la présence d'un sillon hydrophobe à la surface de la protéine, ainsi que la présence sur les flancs de ce sillon de résidus appartenant à deux motifs conservés des domaines sec7 des facteurs d'échange des protéines Arf.

Les informations apportées par l'étude structurale de sec7-ARNO ont permis à nos collaborateurs d'effectuer des travaux de mutagenèses dirigées sur les résidus à la surface du sillon hydrophobe. Ces travaux ont montré que la mutation de ces résidus diminuait plus ou moins (selon les résidus) l'activité catalytique de facteur

d'échange de sec7-ARNO, alors que la mutation d'un résidu éloigné du sillon n'avait aucun effet sur l'activité facteur d'échange. Ces résultats suggèrent que le sillon hydrophobe de sec7-ARNO soit le site d'interaction des protéines Arf.

and transport by a nuclear guanine nucleotide release protein and members of the Ras superfamily. *EMBO J.* **12**, 2929–2937 (1993).

5. Clark, K. L. & Sprague, G. F. Jr Yeast pheromone response pathway: characterization of a suppressor that restores mating to receptorless mutants. *Mol. Cell Biol.* **9**, 2682–2694 (1989).
6. Matsumoto, T. & Beach, D. Premature initiation of mitosis in yeast lacking RCC1 or an interacting GTPase. *Cell* **66**, 347–360 (1991).
7. Sazer, S. & Nurse, P. A fission yeast RCC1-related protein is required for the mitosis to interphase transition. *EMBO J.* **13**, 606–615 (1994).
8. Bischoff, F. R. & Ponstingl, H. Catalysis of guanine nucleotide exchange on Ran by the mitotic regulator RCC1. *Nature* **354**, 80–82 (1991).
9. Klebe, C., Prinz, H., Wittinghofer, A. & Goody, R. S. The kinetic mechanism of Ran-nucleotide exchange catalysed by RCC1. *Biochemistry* **34**, 12543–12552 (1995).
10. Lambright, D. G. *et al.* The 2.0 Å crystal structure of a heterotrimeric G protein. *Nature* **379**, 311–319 (1996).
11. Wall, M. A. *et al.* The structure of the G protein heterotrimer $G_{\alpha 1}\beta_1\gamma_2$. *Cell* **83**, 1047–1058 (1995).
12. Neer, E. J., Schmidt, C. J., Nambudripad, R. & Smith, T. F. The ancient regulatory-protein family of WD-repeat proteins. *Nature* **371**, 297–300 (1994).
13. Matynia, A. *et al.* Isolation and characterization of fission yeast *sns* mutants defective at the mitosis to interphase transition. *Genetics* (in the press).
14. Azuma, Y. *et al.* Conserved histidine residues of RCl are essential for nucleotide exchange on Ran. *J. Biochem.* **120**, 82–91 (1996).
15. Meindl, A. *et al.* A gene (RPRG) with homology of the RCC1 guanine nucleotide exchange factor is mutated in X-linked retinitis pigmentosa (RP3). *Nature Genet.* **13**, 35–42 (1996).
16. Roepman, R. *et al.* Positional cloning of the gene for X-linked retinitis pigmentosa 3: homology with the guanine-nucleotide-exchange factor RCC1. *Hum. Mol. Genet.* **5**, 1035–1041 (1996).
17. Seabra, M. C., Brown, M. S. & Goldstein, J. L. Retinal degeneration in choroideremia: deficiency of rab geranylgeranyl transferase. *Science* **259**, 377–381 (1993).
18. Rosa, J. L., Casaroli-Marano, R. P., Buckler, A. J., Vilaró, S. & Barbacid, M. P532, a giant protein related to the chromosome condensation regulator RCC1, stimulates guanine nucleotide exchange on ARF1 and Rab proteins. *EMBO J.* **15**, 4262–4273 (1996).
19. Kawashima, T., Berthet-Colominas, C., Wulff, M., Cusack, S. & Leberman, R. The structure of the *Escherichia coli* EF-Tu-EF-Ts complex at 2.5 Å resolution. *Nature* **379**, 511–518 (1996).
20. Wang, Y., Jiang, Y., Meyering-Voss, M., Sprinzl, M. & Sigler, P. B. Crystal structure of the EF-Tu-EF-Ts complex form *Thermus thermophilus*. *Nature Struct. Biol.* **4**, 650–656 (1997).
21. Otwinowski, Z. & Minor, W. in *Data Collection and Processing* (eds Sawyer, L., Isaacs, N. & Bailey, S.) 556–562 (SERC, Warrington, UK, 1993).
22. Kabsch, W. Automatic processing of rotation diffraction data from crystals of initially unknown symmetry and cell contents. *J. Appl. Crystallogr.* **26**, 795–800 (1993).
23. Collaborative Computational Project, N.4. The CCP4 suite: programs for protein crystallography. *Acta Crystallogr. D* **50**, 760–763 (1994).
24. Vellieux, F. M. D., Hunt, J. F., Roy, S. & Read, R. J. DEMON/ANGEL: a suite of programs to carry out density modifications. *J. Appl. Crystallogr.* **28**, 347–351 (1995).
25. Jones, T. A. & Kjeldgaard, M. Electron-density map interpretation. *Methods Enzymol.* **277**, 173–208 (1997).
26. Brünger, A. T. *X-PLOR Version 3.8* (Yale Univ., 1996).
27. Lamzin, V. S. & Wilson, K. S. Automated refinement of protein models. *Acta Crystallogr. D* **49**, 129–147 (1993).
28. Kraulis, P. J. Molscript: a program to produce both detailed and schematic plots of protein structures. *J. Appl. Crystallogr.* **24**, 946–950 (1991).
29. Merritt, E. A., Murphy, M. E. P. Raster3D Version 2.0. A program for photorealistic molecular graphics. *Acta Crystallogr. D* **50**, 869 (1994).

Acknowledgements. L.R. thanks the IBS/LCCP and the French Ministère de la Recherche et de l'Éducation for support and the staff at the European synchrotron radiation facility (ESRF) on the beam-line CRG D2AM for help. We thank the HFSP (A.W.); R. Schebaum for secretarial assistance; C. Nowak, N. Güllüm and M. Schulte-Spechtel for technical assistance; W. Kabsch and F. Vellieux for advice; the staff at the synchrotron facilities EMBL c/o DESY for support; B. Prakash for reading the manuscript and for discussions; and M. Hess for help with figures.

Correspondence and requests for materials should be addressed to A.W. (e-mail: alfred.wittinghofer@mpi-dortmund.mpg.de). Coordinates have been deposited at the Brookhaven Protein Data Bank, accession number A12.

Structure of the Sec7 domain of the Arf exchange factor ARNO

Jacqueline Cherfils, Julie Ménétrey, Magali Mathieu, Gérard Le Bras, Sylviane Robineau*, Sophie Béraud-Dufour*, Bruno Antonny* & Pierre Chardin*

Laboratoire d'Enzymologie et Biochimie Structurales, CNRS UPR 9063, 91198 Gif-sur-Yvette, France

* Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire du CNRS-UPR 411, 660 Route des Lucioles, Sophia Antipolis, 06560 Valbonne, France

Small G proteins switch from a resting, GDP-bound state to an active, GTP-bound state. As spontaneous GDP release is slow, guanine-nucleotide-exchange factors (GEFs) are required to promote fast activation of small G proteins through replacement of GDP with GTP *in vivo*¹. Families of GEFs with no sequence similarity to other GEF families have now been assigned to most families of small G proteins. In the case of the small G protein Arf1, the exchange of bound GDP for GTP promotes the

Table 1 Crystallographic statistics

Data collection			
Crystal	Native	EMTS*, 1 mM	K ₂ HgI ₄ , 1 mM
Resolution limits	16–2 Å	16–3 Å	15–2.6 Å
R _{sym} † (%)	4.2	9.4	9.1
Observed reflections	70,772	27,275	110,828
Unique reflections	16,226	4,816	7,849
Completeness (%)	97.6	98.6	100
MIRAS analysis			
Number of sites		3	2
Phasing power Iso/Ano‡		2.25/1.77	2.16/1.39
R _{cullis} Iso/Ano§		0.66/0.77	0.71/0.78
Refinement			
Resolution	15–2 Å		
R _{factor} /R _{free} ¶ (%)	18.2/22.6		
Average B (Å ²)	19.7		
Protein atoms	1,575		
Water molecules	142		
R.m.s.d. bond length§ (Å)	0.009		
R.m.s. bond angle (°)	2.049		

* Derivative crystals were soaked for 1–2 weeks in heavy atom salts.
† $R_{sym} = \sum_i (|I_i| - \langle I_i \rangle) / \sum_i \langle I_i \rangle$ where I_i and $\langle I_i \rangle$ are the observed and average intensity for the reflection i .

‡ $R_{cullis} = (\text{phase-integrated lack of closure}) / (F_{PH} - F_P)$ where F_{PH} and F_P are the derivative and the protein structure factors. ISO, isomorphous; Ano, anomalous.

§ Phasing power = $(\langle F_H \rangle / \text{phase-integrated lack of closure})$ where F_H is the calculated heavy atom structure factor.

¶ $R_{factor} = \sum_i (|F_o - F_c|) / \sum_i F_o$ where F_o and F_c are the observed and calculated structure factor amplitudes. R_{free} is calculated as R_{factor} for a random set of reflections (10%) not included in the refinement.

§ R.m.s.d., root mean square deviation from ideal values.

coating of secretory vesicles in Golgi traffic². An exchange factor for human Arf1, ARNO³, and two closely related proteins, named cytohesin 1 (ref. 4) and GPS1 (ref. 5), have been identified. These three proteins are modular proteins with an amino-terminal coiled-coil, a central Sec7-like domain and a carboxy-terminal pleckstrin homology domain. The Sec7 domain contains the exchange-factor activity³. It was first found in Sec7, a yeast protein involved in secretion⁶, and is present in several other proteins, including the yeast exchange factors for Arf, Gea1 and Gea2 (refs 7–9). Here we report the crystal structure of the Sec7 domain of human ARNO at 2 Å resolution and the identification of the site of interaction of ARNO with Arf.

The structure of the Sec7 domain of ARNO (Arf nucleotide-binding-site opener) was solved by X-ray diffraction, using multiple isomorphous replacement and anomalous scattering, and refined to an R_{factor} of 18.6% (Table 1). The protein is a flared cylinder of about 70 Å in length, with a diameter increasing from 20 Å at its N terminus to 40 Å at its C terminus (Fig. 1). It contains only helical secondary structures with 10 α-helices (labelled A to J), which stabilize the protein core mainly by hydrophobic and van der Waals interactions, with few hydrogen bonds. All helices and connecting loops have well-ordered electronic density except for residues 205–206 in loop H–I. Seven out of the ten loops feature one or two proline residues, all of which are conserved in most Sec7-homology sequences. The N-terminal helix extends by about three turns out of the protein core, but the rest of this helix packs against neighbouring helices. The helices are arranged in a distorted right-handed superhelix, which follows an axis from the N to the C terminus. A longer and more regular example of this superfold is found, for instance, in the Armadillo-repeat region of β-catenin¹⁰. No other all-helical structure found in the Protein Data Bank superimposes the fold of the ARNO Sec7 domain (ARNO-Sec7). ARNO-Sec7 bears no resemblance to the nucleotide-exchange factors EF-Ts^{11,12}, Mss4 (ref. 13) and GrpE¹⁴, nor to the exchange factor for Ran, regulator of chromosome condensation 1 (RCC1), which contains only β-sheets¹⁵. It is also unrelated to structures of other proteins that interact with G proteins, such as the GTPase-activating proteins for Ras¹⁶ and for Rho¹⁷.

Sec7 domains were previously defined by their primary structures

as polypeptides of ~200 amino acids^{3,8}. The Sec7 domain of ARNO can now be unambiguously delimited by the compact structure-spanning residues 52–246. Other sequences of Sec7 domains feature several insertions or deletions as compared with ARNO-Sec7. All of these insertions and deletions occur in surface loops that connect helices and are thus unlikely to disrupt the overall structural integrity. For instance, an insertion of 25 amino acids into the yeast Arf1 exchange factor Gea1 (ref. 7) occurs in the loop G–H, where it would not be expected to interfere with the overall fold or to modify the site of interaction with Arf1 (see below). Therefore, we propose that other Sec7 domains will adopt the same fold as ARNO-Sec7.

Full-length ARNO has an N-terminal coiled-coil domain involved in homodimerization (our unpublished results) and a C-terminal pleckstrin-homology (PH) domain^{3,4}. The N-terminal helix of ARNO-Sec7 protrudes from the globular core, forming an angle of ~60° with the axis of the superhelix, and could readily elongate into a coiled-coil. The C terminus of ARNO-Sec7, on the other hand, folds into a loop from Glu 241 to Pro 246 and forms

tight interactions with helices E, H and J, with Phe 243 wedged between Ile 238 and Leu 148, and Pro 242 and His 200 packed against each other. The last six residues are disordered in the electron density, indicating that this region, at least in the absence of the PH domain, is flexible.

Sec7 domains feature two highly conserved sequences. 151 FRLPGE 156 and 187 VLSFAVIMLNTSLH 200 (ARN-Sec7 numbering), which will be called motif 1 and motif 2, respectively. Motif 1 forms the surface loop F–G, whose structure is stabilized by packing interactions with helix αD. It is largely accessible to the solvent, except for residues Phe 151 and Pro 154. Motif 2 folds into helix αH, with one face packed on helices αI and αJ and the other exposed at the protein surface. Motif 1, motif 2 and several other conserved residues strikingly cluster on a concave region (Fig. 2). The groove is edged by the loop of motif 1 and the helix of motif 2, which face each other, with additional residues contributed by helix αF, helix αG and the C-terminal loop. The bottom of the groove forms a hydrophobic patch of ~15 Å in length and ~450 Å in surface area. Polar and charged residues line its sides, providing

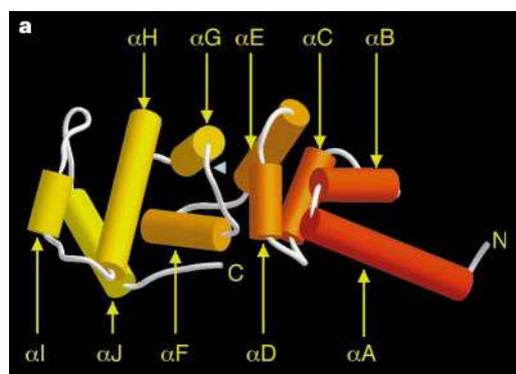


Figure 1 Structure of ARNO-Sec7. **a**, Overall view. The ten α-helices, numbered from A to J, are defined in Fig. 1b. They form a right-handed superhelix, coloured from red at the N terminus to yellow at the C terminus, whose axis is horizontal in the picture. Examples of this superfold are found in β-catenin¹⁰ and in a muramidase (Protein Data Bank entry 1SLY). The blue arrowhead marks the position of Glu 156 in loop F–G. **b**, Alignment of the ARNO-Sec7 sequence with sequences of homologous Sec7 domains from human cytohesin1, *Arabidopsis* EMB30, a *C. elegans* protein of unknown function, Gea1, a yeast exchange factor for Arf, and the secretion protein Sec7. The N- and C-terminal limits are as defined by the three-dimensional structure. The helices are shown in red boxes. Identical amino acids are boxed in black; conserved amino acids are shown in bold type. The two conserved motifs that form the putative Arf-binding site are boxed in blue. They fold into loop F–G and helix αH, respectively. The invariable residue Glu 156, which is involved in nucleotide exchange on Arf1, is indicated with a black arrowhead.

		αA					αB					αC																																																											
		60					70					80					90					100																																																	
ARNO	52	ANEGSKTILQQRNKKMAMGRKKFNMDPKKGIQFLVENE					LLQN--TPE					DIARFLYKGE																																																											
Cytohesin	53	STERKNMQRNKQVAMGRKKFNMDPKKGIQFLIENDLLRN--					TCEDIA					QFLYKGE																																																											
EMB30	552	VSFVRR RKYIKRRLMIGADHFNRPDKKGLFELQGTHTLL					FDKLDPO					SVA					CFFRYTA																																																						
<i>C. elegans</i>	25	YYTHPKSKEYHKIVVNGRKKFNQDEPKALDWLASRNVVAK--					DPQ					ALAWMKAGE																																																											
Gea1	532	EIDILKQRDRKTEF ILCVETFNEKAKKGIQMLIEKGFIDSD--					SNRDTA					SFLFLNN																																																											
Sec7	818	PTQFENLKRRTKALS ECTAI					FNNKPKKAI					PVL					IKKGF					KDD--SPI					SIAKWLLETE																																												
		αD					αE					αF																																																											
		110					120					130					140					150																																																	
ARNO	105	G-LNKTAIGDYLGERSE					LNLAVLHAFVDLHEFTDLNLVQALROFLWS					FRLPGE																																																											
Cytohesin	106	G-LNKTAIGDYLGERDEF					NIQVLHAFVELHEFTDLNLVQALROFLWS					FRLPGE																																																											
EMB30	607	G-LDKNVLGDFLGNHDEF					CVQVLENEFAGTEDEFQYMNLDLALRIFLET					FRLPGE																																																											
<i>C. elegans</i>	78	G-LSKSAIGE ILGDNRPF					ALETLDRF					TKEHKLHDVPIV					BALROYLFS					FRLPGE																																																	
Gea1	586	GRLNKKTI					GELLCD--PKKTSLL					KEFIDLDF					KGLRVDEA					IRILLTK					FRLPGE																																												
Sec7	872	G-LDMAVGDYLGE					GDDKNIAIMHAFVDEDF					TGM					SIVDALRS					FSLQS					FRLPGE																																												
		αG					αH																																																																
		160					170					180																																																											
ARNO	157	AQKIDRMMEFAQRYC					LQCNPG					VFQSTDTCY																																																											
Cytohesin	158	AQKIDRMMEFAQRYC					LQCNNG					VFQSTDTCY																																																											
EMB30	659	SOKIQRVDEAFSERY					YMQSPE					ILANKDAAL																																																											
<i>C. elegans</i>	130	SOKINRILE					RFAE					VYANQNP					SYGNADQAH																																																						
Gea1	637	SQQIERIV					EAFSSKY					SADQ					SNDRV					ELEDKKAGKNGSE					SMTEDDI					IHW					VQPDADSVF																																		
Sec7	924	GQKIDRF					MLKFAERF					VDQ					NPNF																																																						
		αH					αI					αJ																																																											
		190					200					210					220					230					240																																												
ARNO	187	VLSFAVIMLNTSLH					NPNVRDKP					GLERFV					AMNRGINE					GGDLPE					ELLRNLY					DSIR					NEPFFKIP																																		
Cytohesin	188	VLSFAVIMLNTSLH					NPNVKDKP					IVERF					TAMNRGINE					GGDLPE					ELLRNLY					ESIR					NEPFFKIP																																		
EMB30	689	VLSYSIMLNTDQH					NVQVKK					MTBED					LFI					RNNRHIN					GNDL					PREF					LSELF					HSIGNNEIRTT																													
<i>C. elegans</i>	159	TVAYSIMVNTLLH					NPNVKDKP					SLEKY					IEMNE					QOL					LRG					AIT					IEQL					TEVYSV					SVTQ					FKIP																			
Gea1	692	VLSYSIMLNTDSH					NEQVKD					HMTFDDY					SNNLR					G					CYNG					HDFPR					RWL					HKIY					TS					TRVKEI					VMP														
Sec7	963	VLSYSIMLNTDLH					SSQIKNK					MSLQ					EFL					ENN					EGIDN					G					RDL					PRDF					L					EGL					FNEI					ANNEI					KLI				

both donors and acceptors of hydrogen bonds (Fig. 3). The 'canyon' shape of this cluster of residues in ARNO-Sec7 and their high conservation in other sequences of Sec7 domains indicate that they may form the site for binding to Arf.

In *Arabidopsis* EMB30, charge reversal at the invariant Glu 658 (equivalent to Glu 156 in motif 1) produces severe defects in embryogenic differentiation⁸. To test the importance of this residue to nucleotide exchange on Arf1, Glu 156 was mutated to lysine in ARNO-Sec7. The mutant protein was unable to activate nucleotide exchange on myristoylated Arf1 (Fig. 4). Furthermore, structure-based mutagenesis of Arg 152 in motif 1 and of Met 194 and Asn 201 in motif 2 reduces the exchange activity by 5- to 100-fold (Fig. 4; S.B.-D. *et al.*, unpublished observations). In contrast, the mutation of Glu 117, which is further away from the groove, does not alter the nucleotide-exchange activity. Our structural and biochemical data are evidence that motifs 1 and 2 and the hydrophobic groove of ARNO define the binding site for Arf (Fig. 2b). The N-terminal coiled-coil domain in ARNO is far from the binding site for Arf1. On the other hand, the linker to the PH domain, and the PH domain itself, will be located next to the active site. However, binding of ARNO through its PH domain to vesicles containing phosphatidylinositol bisphosphate does not modify the intrinsic exchange activity of the Sec7 domain¹⁸.

Catalysis of nucleotide exchange on small G proteins by GEFs proceeds through the formation of a complex of the GEF and G protein; this complex stabilizes on release of the bound GDP^{11,12,15,19}. Then, GTP entry dissociates the complex. Such a tight 'transition state' complex has been seen between ARNO-Sec7 and the nucleotide-free form of a N-terminal truncated version of Arf1 (ref. 18).

The complex between nucleotide-free EF-Tu, a bacterial elongation factor with a guanine-nucleotide binding domain, and its exchange factor EF-Ts is, to date, the only model that describes the stereochemistry of nucleotide release from a G domain^{11,12}. EF-Ts wedges side chains in between the switch II region and its flanking helix, disrupting the coordination of the essential magnesium ion. Mutagenesis studies of p21^{ras} map the docking site for its exchange factors in regions equivalent to those on EF-Tu, including switch II (ref. 20) and helix $\alpha 3$ (ref. 21), indicating that the 'phosphate-side first' mechanism proposed for EF-Ts^{11,12} may operate for the exchange factors cdc25/SOS as well.

Arf1 is myristoylated on its N-terminal glycine and both the N-terminal helix and myristate are important for the nucleotide-exchange process in the presence of membranes²². ARNO was thus proposed to operate by binding to the myristate of Arf²³. However, ARNO as well as ARNO-Sec7 are effective on an N-terminal deletion mutant of Arf1 (ref. 18), ruling out an essential role for the fatty acid or the N-terminal helix in the catalytic process. In addition, mutation of Lys 73 into Glu in the switch II region of Arf1, which does not affect intrinsic GDP dissociation, abolishes the ability of ARNO to stimulate nucleotide exchange (data not shown), suggesting that switch II contributes to the binding site for ARNO. The switch II region of Arf1 (ref. 24) and other small G proteins has a flexible loop (residues 69–76 in Arf1) followed by helix $\alpha 2$ (77–85). Docking simulations using the crystal structure of unmyristoylated Arf1-GDP (ref. 24) indicate that the switch II region can be accommodated in the groove between motifs 1 and 2, with Arf burying a large surface area opposite its N-terminal helix. A model of interaction of the switch II of Arf with the groove of ARNO is reminiscent of the EF-Tu/EF-Ts complex and addresses the question of whether the exchange mechanism could be conserved among various members of the GTPase superfamily. However, as ARNO-Sec7 preferentially binds the nucleotide-free form of Arf¹⁸, which may adopt a different conformation as compared with Arf-GDP, the structure of the Arf1/ARNO-Sec7 complex will be needed for the detailed understanding of this interaction.

Nucleotide exchange on Ras and Rho proteins is mediated by protein modules of roughly the same size as the Sec7 domain, namely, the cdc25 and dbl domains, respectively (reviewed in ref. 1). These domains are predicted to be mostly helical according to secondary-structure-prediction algorithms, prompting us to investigate whether their primary structure is compatible with the all-helical fold found for ARNO-Sec7. A representative sequence of the cdc25 and dbl domains was threaded onto the structure of ARNO-Sec7 and compared with unrelated sequences²⁵. As neither cdc25 nor dbl emerged from the background, their overall structures may be unrelated to that of ARNO-Sec7. This does not rule out the possibility that they use similar catalytic mechanisms: this would not be unprecedented in regulation of small G proteins, as shown by the rasGAP and rhoGAP complexes^{16,17}. Both GAPs are mostly α -helical but with different folds; however, they use very similar mechanisms, positioning a catalytic arginine in the optimal conformation to promote nucleophilic attack of the γ -phosphate. The guanine-nucleotide-dissociation inhibitors for Rab²⁶ and Rho²⁷, too, have very different structures. Furthermore, the structure of the exchange factor for the small G protein Ran, RCC1, is a β -sheet propeller¹⁵ which bears no resemblance to the all- α -helical structure of ARNO-Sec7. It seems that although small G proteins have closely related structures, unrelated proteins have evolved to regulate them.

The structure of the Sec7 domain of ARNO has allowed us to locate the binding site for Arf and will provide a framework for further investigations of the nucleotide-exchange mechanism. In addition to functioning as a nucleotide exchange factor module for Arf, the Sec7 domain of the close homologue of ARNO, cytohesin 1, has been proposed to bind integrins and promote their adhesion to extracellular targets²⁸. It will be interesting to locate regions of the

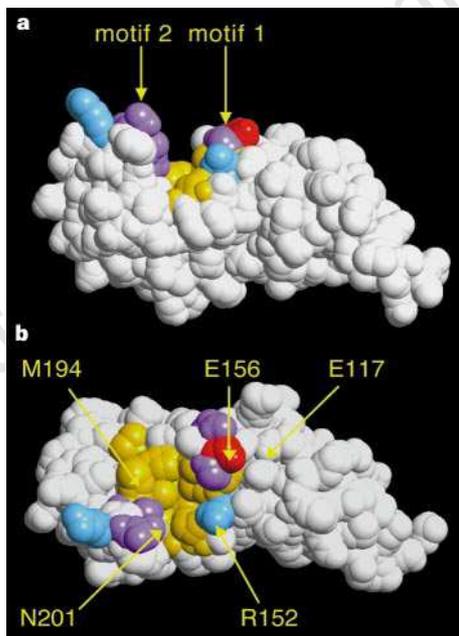


Figure 2 Topography of the conserved motives of ARNO-Sec7. **a, b**, The protein surface is shown in orthogonal views. The orientation in **b** is the same as in Fig. 1a and in **a** is rotated around a horizontal axis. Amino acids from motif 1 and motif 2 and conserved amino acids in contact with them form a connected surface, which has been coloured in yellow for hydrophobic residues, violet for polar residues, blue for basic residues and red for the acidic Glu 156. They define a groove at the protein surface; the bottom of this groove is hydrophobic and the sides are polar or charged. Residues from motif 1, motif 2, helix αF , helix αD and the C terminus contribute to the hydrophobic patch. The two sides of the groove are from motif 1 and motif 2 respectively, with Glu 156 largely exposed to the solvent. Sites of single mutations (Fig. 4) are shown in **b**. Mutants of Arg 152, Glu 156, Met 194 or Asn 201 are defective for nucleotide exchange on Arf1. In contrast, mutation of Glu 117, outside the Arf1-binding site, has no effect.

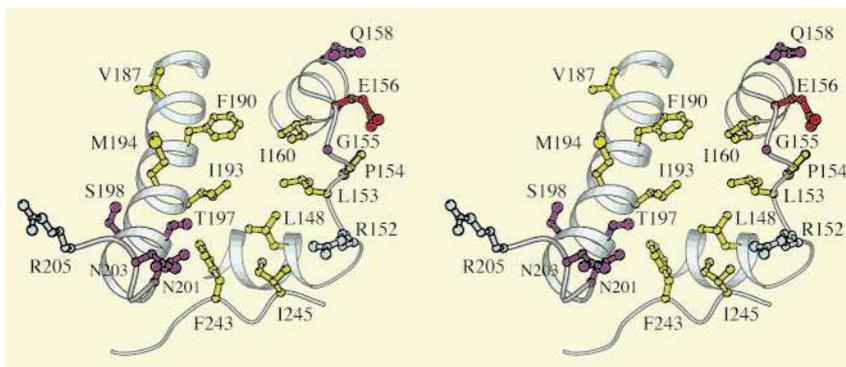


Figure 3 The putative site of binding to Arf. A close-up stereo view of Fig. 2b is shown, with the same orientation and colour-coding. Of the residues that compose the hydrophobic patch, Leu 148 in helix α F, Ile 160 in helix α G and Ile 193/Met 194 in motif 2 are invariant among Sec7 domains; Val 187 in motif 2 and Phe 243 in the C terminus are conserved; Phe 190 is generally replaced by tyrosine in other Sec7 domains and only Ile 245 in the C terminus is moderately

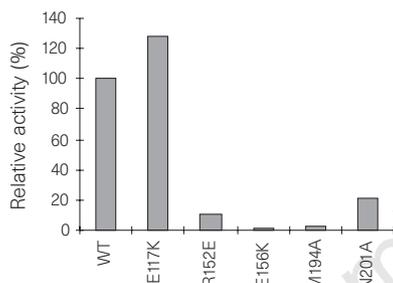


Figure 4 Nucleotide-exchange activity of ARNO-Sec7 mutants on Arf1. Catalysis of GDP-to-GTP exchange on myristoylated Arf1 by ARNO-Sec7 mutants was compared to the activity of wild-type ARNO-Sec7 (taken as a reference for 100% activity) as described in the Methods. All inactive mutants are from motif 1 and motif 2 on both sides of the hydrophobic groove (see Fig. 2). WT, wild-type.

Sec7 domain that might be involved in this process or in other protein-protein interactions. □

Methods

Crystallization. A truncated form of human ARNO (residues 51–252) encompassing the Sec7-homology domain was overexpressed in *Escherichia coli* and purified as described³. Crystals were grown in a hanging drop formed by a 1:1 mixture of the protein at 8 mg ml⁻¹ and the reservoir crystallization solution, containing 12.5% PEG 4000, 200 mM LiSO₄, 3.5% propanol and 1 mM DTT buffered in 100 mM EPPS at pH 8.5. Stabilization in cryoprotectant conditions was achieved by increasing the concentration of PEG 4000 and adding 20% glycerol. Heavy-atom derivatives were prepared in the stabilization solution supplemented with heavy-atom salts. The crystals belong to space group *P*2₁3 ($a = b = c = 89.78 \text{ \AA}$, $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$), with one molecule in the asymmetric unit.

Data collection and processing. The native and EMTS (ethyl mercury thiosalicylate) derivative data sets were collected at 4 °C on a Mar image plate at beam line W32 of the LURE synchrotron with $\lambda = 0.97 \text{ \AA}$ (Orsay). The K₂HgI₄ derivative data were recorded at the λ_2 absorption edge of Hg (1.0079 Å) at 100 K on a charge-coupled device (CCD) camera at beam line D2AM of the ESRF synchrotron (Grenoble). CCD images were converted to pseudo Mar images with IMAC (written by M. Roth). Data were processed with DENZO and scaled with SCALEPACK.

Phasing and refinement. Two heavy-atom sites were first located for the EMTS derivative from isomorphous difference Patterson maps using RSPS²⁹, and their parameters were refined with the maximum likelihood method

conserved. Acceptors and donors of hydrogen bonds in the presumed Arf-binding site are Arg 152/Glu 156 and the main chain NH of Gly 155 in motif 1, Gln 158 in helix α G, Thr 197/Ser 198 in motif 2, and Gln 201/Gln 203/Arg 205 in loop H-I. Arg 152, Glu 156, Gln 158 and Thr 197 are invariant; the other amino acids are conserved. All the amino acids shown in this figure are accessible to the solvent and could contribute to the binding of Arf.

implemented in SHARP³⁰. Subsequent identification of a third minor site in the EMTS derivative and of the two sites in the K₂HgI₄ derivative was carried out with the residual map facility in SHARP. Anomalous scattering was introduced in the heavy atoms parameter refinement at that stage for both derivatives. The ligands of the Hg atoms were found later to be the three cysteines of ARNO-Sec7, with the sites of the K₂HgI₄ derivative within 1 Å of the major sites of the EMTS derivative. Multiple isomorphous replacement combined with anomalous scattering (MIRAS) phases were improved by solvent flattening with SOLOMON²⁹ with a solvent content of 46%. The figure-of-merit weighted electron-density map at 10–2.6 Å resolution was easily interpretable at that stage, from which an initial model was built using program O. The initial *R* factor for that model was 38%. Experimental phases were not used later during refinement. Subsequent model building and positional refinement were carried out with TURBO and X-PLOR.

Site-directed mutagenesis and nucleotide-exchange assay. Mutants of ARNO-Sec7 were expressed in *E. coli* and purified as described for the wild-type protein³. Nucleotide exchange was measured by monitoring the intrinsic tryptophan fluorescence of Arf1 as described²². The assay was performed at 37 °C with 0.2 μM myristoylated Arf1-GDP, 0.1 μM ARNO-Sec7, 10 μM GTP and 0.4 mg ml⁻¹ unilamellar vesicles containing 70% phosphatidylcholine and 30% phosphatidylglycerol (S.B.-D. *et al.*, unpublished observations).

Structure analysis. Predictions of secondary structure were done with PHD (EMBL server www.embl-heidelberg.de). Docking of ARNO-Sec7 onto Arf1-GDP (ref. 24) (Protein Data Bank entry 1HUR) was performed manually and refined with an automated method based on surface complementarity of molecules treated as rigid entities. The *cdc25* and *dbl* domain sequences threaded onto the ARNO-Sec7 structure were from the mouse exchange factor for Ras, *cdc25*, and the human exchange factor for Rho, *Dbl*, respectively. A hundred unrelated sequences were threaded onto ARNO-Sec7 to provide a statistical background²⁵.

Received 21 November 1997; accepted 22 January 1998.

- Quilliam, L. A., Khosravi-Far, R., Huff, S. Y., Solski, P. A. & Der, C. J. Guanine nucleotide exchange factors: activators of the Ras superfamily of proteins. *Bioessays* **17**, 395–404 (1995).
- Scheckman, R. & Orci, L. Coat proteins and vesicle budding. *Science* **271**, 1526–1533 (1996).
- Chardin, P. *et al.* A human exchange factor for ARF contains Sec7- and pleckstrin-homology domains. *Nature* **384**, 481–484 (1996).
- Meacci, E., Tsai, S. C., Adamik, R., Moss, J. & Vaughan, M. Cytohesin-1, a cytosolic guanine nucleotide-exchange protein for ADP-ribosylation factor. *Proc. Natl Acad. Sci.* **94**, 1745–1748 (1997).
- Klarlund, J. K. *et al.* Signaling by phosphoinositide-3,4,5-trisphosphate through proteins containing pleckstrin and Sec7 homology domains. *Science* **275**, 1927–1930 (1997).
- Novick, P., Ferro, S. & Scheckman, R. Orders of events in the yeast secretory pathway. *Cell* **25**, 461–469 (1981).
- Peyroche, A., Paris, S. & Jackson, C. L. Nucleotide exchange on ARF mediated by yeast *Gea1* protein. *Nature* **384**, 479–481 (1996).
- Shevell, D. E. *et al.* EMB30 is essential for normal cell division, cell expansion, and cell adhesion in *Arabidopsis* and encodes a protein that has similarity to Sec7. *Cell* **77**, 1051–1062 (1994).
- Morinaga, N., Moss, J. & Vaughan, M. Cloning and expression of a cDNA encoding a bovine brain brefeldin A-sensitive guanine nucleotide-exchange protein for ADP-ribosylation factor. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **94**, 12926–12931 (1997).

10. Huber, A. H., Nelson, J. & Wies, W. I. Three-dimensional structure of the Armadillo repeat of β -catenin. *Cell* **90**, 871–882 (1997).

11. Kawashima, T., Berthet-Colominas, C., Wulff, M., Cusack, S. & Leberman, R. The structure of the *Escherichia coli* EF-Tu.EF-Ts complex at 2.5 Å resolution. *Nature* **379**, 511–518 (1996).

12. Wang, Y., Jiang, Y., Meyering-Voss, M., Spritzl, M. & Sigler, P. Crystal structure of the EF-Tu.EF-Ts complex from *Thermus thermophilus*. *Nature Struct. Biol.* **4**, 650–656 (1997).

13. Yu, H. & Schreiber, S. L. Structure of guanine-nucleotide-exchange factor human Mss4 and identification of its Rab-interacting surface. *Nature* **376**, 788–791 (1995).

14. Harrison, C. J., Hayer-Hartl, M., Di Liberto, M., Hartl, F. U. & Kuriyan, J. Crystal structure of the nucleotide exchange factor GrpE bound to the ATPase domain of the molecular chaperone DnaK. *Science* **276**, 431–435 (1997).

15. Renault, L. *et al.* The 1.7 Å crystal structure of the regulator of chromosome condensation (RCC1) reveals a seven-bladed propeller. *Nature* **392**, 97–101 (1998).

16. Scheffzek, K. *et al.* The ras-rasGAP complex: structural basis for GTPase activation and its loss in oncogenic mutants. *Science* **277**, 333–338 (1997).

17. Rittinger, K., Walker, P. A., Eccleston, J. F., Smerdon, S. J. & Gamblin, S. J. Structure at 1.65 Å of RhoA and its GTPase-activating protein in complex with a transition-state analog. *Nature* **389**, 758–762 (1997).

18. Paris, S. *et al.* Role of protein-phospholipid interactions in the activation of ARF1 by the guanine nucleotide exchange factor Arno. *J. Biol. Chem.* **272**, 22221–22226 (1997).

19. Jacquet, E., Baou, S. & Parmegiani, A. Characterization of a mammalian C-CDC25Mm exchange factor and kinetic properties of the exchange reaction intermediate p21.C-CDC25Mm. *Biochemistry* **34**, 12347–12354 (1995).

20. Verroti, A. C. *et al.* RAS residues that are distant from the GDP binding site play a critical role in dissociation factor-stimulated release of GDP. *EMBO J.* **11**, 2855–2862 (1992).

21. Segal, M., Willumsen, B. & Levitzki, A. Residues crucial for Ras interaction with GDP-GTP exchangers. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **90**, 5564–5568 (1993).

22. Antony, B., Béraud-Dufour, S., Chardin, P. & Chabre, M. N-terminal hydrophobic residues of the G-protein ADP-ribosylation factor-1 insert into membrane phospholipids upon GDP to GTP exchange. *Biochemistry* **36**, 4675–4684 (1997).

23. Schimmöller, F., Itin, C. & Pfeffer, S. Vesicle traffic: get your coat! *Curr. Biol.* **7**, R235–R237 (1997).

24. Amor, J. C., Harrison, D. H., Kahn, R. A. & Ringe, D. Structure of the human ADP-ribosylation factor 1 complexed with GDP. *Nature* **372**, 704–708 (1994).

25. Madej, T., Gibrat, J. F. & Bryant, S. H. Threading a database of protein cores. *Proteins Struct. Funct. Genet.* **23**, 356–369 (1995).

26. Schalk, I. *et al.* Structure and mutational analysis of Rab GDP-dissociation inhibitor. *Nature* **381**, 42–48 (1996).

27. Keep, N. H. *et al.* A modulator of rho family G proteins, rhoGDI, binds these G proteins via an immunoglobulin-like domain and a flexible N-terminal arm. *Structure* **5**, 623–633 (1997).

28. Kolanus, W. *et al.* α L β 2 integrin/LFA-1 binding to ICAM-1 induced by cytohesin-1, a cytoplasmic regulatory molecule. *Cell* **86**, 233–242 (1996).

29. Collaborative Computational Project No. 4. The CCP4 suite: programs for protein crystallography. *Acta Crystallogr. D* **50**, 760–763 (1994).

30. De la Fortelle, E. & Bricogne, G. Maximum-likelihood heavy-atom parameter refinement for multiple isomorphous replacement and multiwavelength anomalous diffraction methods. *Methods Enzymol.* **276**, 472–494 (1997).

Acknowledgements. We thank the staff at the LURE for making outstation W32 available to us; M. Roth at the ESRF for beamlight assistance at outstation D2AM; S. Bryant and T. Madej for the Protein Data Bank survey with VAST; J.-F. Gibrat for sequence-threading calculations; S. Paris for unpublished observations; and M. Chabre and J. Janin for discussions. This work was supported by the Association pour la Recherche contre le Cancer and by Zénéca Pharma (France). M.M. was supported by an EMBO fellowship.

Correspondence and requests for materials should be addressed to J.C. (e-mail: cherfils@lebs.cnrs-gif.fr). Coordinates have been deposited in the Brookhaven Data Bank under accession code 1PBV.

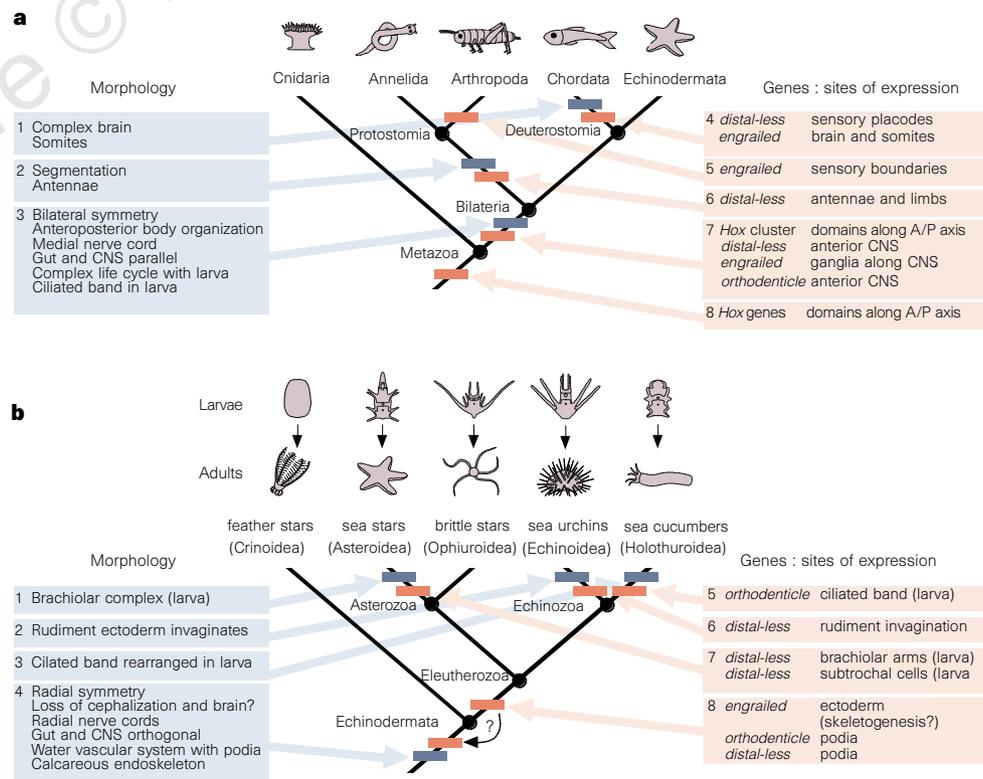
erratum

Radical alterations in the roles of homeobox genes during echinoderm evolution

Christopher J. Lowe & Gregory A. Wray

Nature **389**, 718–721 (1997)

The labelling of Fig. 1 of this Letter was incomplete in several places. The corrected figure is reproduced below.

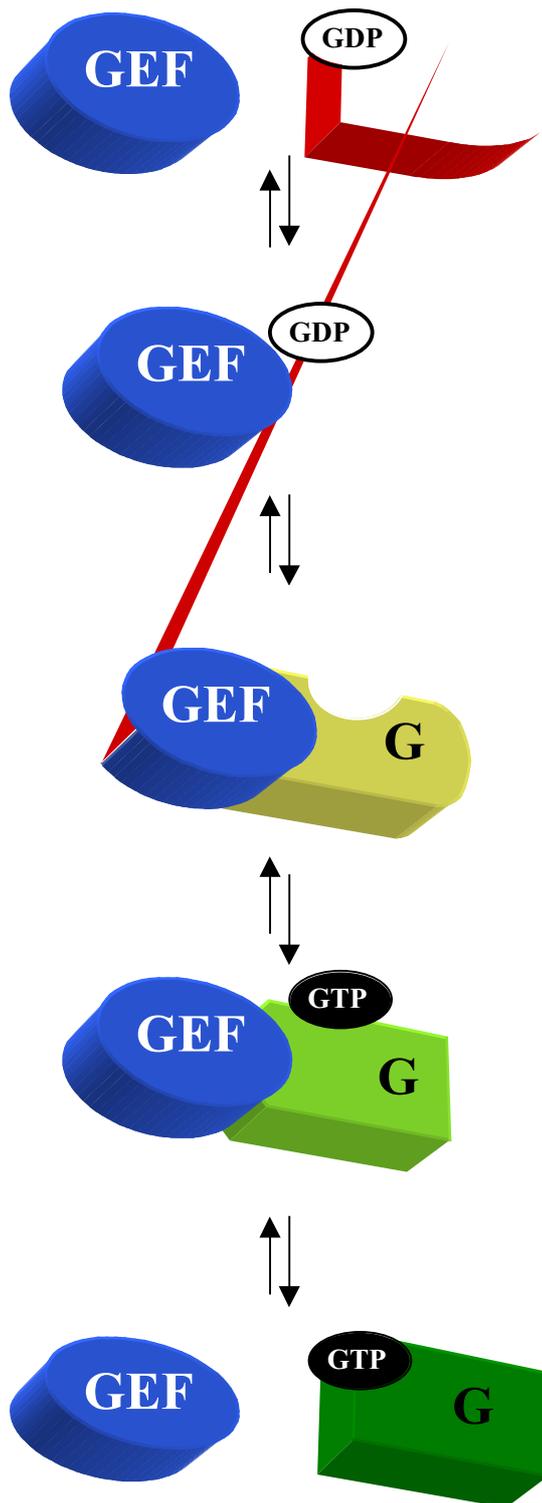


Annexe C : Essais de cristallisation de Arf1 Δ 17 en complexe avec du GTP γ S et en complexe avec son facteur d'échange sec7-ARNO

Suite à l'étude structurale du domaine sec7 du facteur d'échange humain ARNO des protéines Arf (sec7-ARNO) (Annexe B), nous nous sommes intéressés au mécanisme d'activation structural complet de Arf1 par le domaine sec7 de ARNO. Des généralités sur les facteurs d'échange des protéines Arf sont présentées dans le Chapitre 2-I-2-a et sur la protéine Arf1 en particulier dans le Chapitre 2-I-3.

Le projet principal de ma thèse portait sur l'étude structurale de Arf1 Δ 17 en complexe avec un analogue non hydrolysable du GTP, de Arf1 Δ 17 en complexe avec sec7-ARNO sauvage, et en complexe avec un mutant de sec7-ARNO (E156K). Durant une année, j'ai essayé d'obtenir des cristaux de ces trois différents complexes sans succès. Ce projet a pris fin lors de la publication des structures de Arf1 Δ 17 en complexe avec du GDPNHP et de Arf1 Δ 17 en complexe avec le domaine sec7 du facteur d'échange de levure Gea2 des protéines Arf, par Jonathan Golberg (Goldberg, 1998).

Mécanisme général d'activation d'une petite protéine G par un facteur d'échange. Les facteurs d'échange stimulent la dissociation du GDP fortement fixé à la petite protéine G en réponse à différents stimuli. Cette réaction se déroule en plusieurs étapes (fig.23) (Quilliam, 1995). Tout d'abord, le facteur d'échange forme un complexe de reconnaissance, de faible affinité avec la forme GDP de la petite protéine G (Klebe, 1995). Le GDP se dissocie alors du complexe, lequel devient un complexe binaire de forte affinité (vide de nucléotide) (Lai, 1993). Cet intermédiaire ne s'accumule pas dans la cellule, car il est rapidement dissocié par l'arrivée du GTP dans le site nucléotidique. *In vitro*, les facteurs d'échange sont aussi susceptibles de dissocier le GTP de la petite protéine G. Cependant, *in vivo* la concentration plus élevée du GTP par rapport au GDP et l'interaction de la forme GTP avec des effecteurs favorisent la réaction d'échange dans le sens GDP vers GTP. Le mécanisme général présenté dans la figure 23 implique que la forme vide de



Intermédiaire stable et vide de nucléotide.

Figure 23 : Mécanisme d'activation des petites protéines G (pG) par un facteur d'échange GDP/GTP (GEF). L'activation de la petite protéine G se fait en plusieurs étapes. La pG s'associe à la GEF pour former un complexe de reconnaissance de faible affinité pG-GDP/GEF, le GDP se dissocie de ce complexe, produisant un intermédiaire vide de nucléotide pG/GEF de forte affinité. Le GTP peut venir s'associer à la pG vide de nucléotide et former un second complexe ternaire pG-GTP/GEF qui se dissociera pour produire une PG active et une GEF libre d'effectuer un nouveau cycle.

nucléotide de la petite protéine G qui est instable n'existe pas dans la cellule seule ; elle est stabilisée par la formation d'un complexe avec son facteur d'échange.

Dans le but d'étudier le mécanisme structural complet de l'activation de Arf1 par ARNO, nous cherchions à déterminer les structures des différents complexes de la figure 23, qui n'avait pas encore été résolues. Les structures de Arf1-GDP ((Amor, 1994) et (Greasley, 1995)) et de sec7-ARNO (Cherfils , 1998) ont été résolues précédemment. C'est pourquoi, nous nous sommes intéressés à la forme GTP de Arf1 et aux différents complexes formés entre Arf1 et ARNO.

Présentation des constructions de Arf1 et de ARNO que nous avons utilisé pour étudier structurellement le mécanisme complet d'activation de Arf1 par ARNO. Arf1 a besoin de la présence de membrane pour être activée (Kahn et Gilman, 1986). Arf1 tronquée de ses 17 premiers résidus (Arf1 Δ 17) est activée sans la présence de membrane (Kahn, 1992), c'est pourquoi nous avons utilisé cette construction pour la cristallisation. Pour étudier le complexe de forte affinité entre Arf1 Δ 17 et ARNO, nous nous sommes restreint au domaine sec7 de ARNO, domaine qui porte l'activité d'échange et qui forme un complexe stable avec Arf1 Δ 17 (Paris, 1997). Le complexe de plus faible affinité entre Arf1 Δ 17-GDP et sec7-ARNO n'est pas stable en solution, il n'est donc pas possible de le cristalliser. Cependant, l'équipe de Marc Chabre a montré que le mutant E156K de sec7-ARNO interagit avec la forme GDP de Arf1 Δ 17 en absence de magnésium, de manière stable (Beraud-Dufour, 1998). Ainsi, l'étude structurale du complexe Arf1 Δ 17-GDP/E156K-sec7-ARNO, nous permettra d'obtenir des informations sur le complexe de faible affinité entre sec7-ARNO et Arf1 Δ 17-GDP.

Préparation et purification des différents complexes

- Arf1 Δ 17 en complexe avec un analogue non hydrolysable du GTP, le GTP γ S
Arf1 Δ 17 est mis en présence d'EDTA, pour chélater le magnésium libre dans la solution et celui présent dans le site nucléotidique. La chélation du magnésium aura pour effet de dissocier le nucléotide de la protéine. Arf1 Δ 17 vidée de son

nucléotide est alors mise en présence d'un excès de $\text{GTP}\gamma\text{S}$, et en présence de phosphatase alcaline (montée sur bille d'agarose) en quantité enzymatique. Les analogues non hydrolysables du GTP comme le $\text{GTP}\gamma\text{S}$, le GDPNHP et le GDPCH_2P sont de mauvais substrats pour la phosphatase alcaline, ce qui permet d'hydrolyser le GDP ou le GTP libre en guanosine + phosphates inorganiques, sans modifier l'analogue non hydrolysable du GTP, le $\text{GTP}\gamma\text{S}$ qui restera le seul nucléotide présent en solution. Puis, la réaction de chélation du magnésium est contrebalancée par l'ajout d'un excès de magnésium. Le magnésium est alors à nouveau disponible pour stabiliser le nucléotide au sein de la protéine. Arf1 Δ 17 est alors chargée en $\text{GTP}\gamma\text{S}$, en présence de magnésium. La phosphatase alcaline (montée sur bille d'agarose) est éliminée par une étape de centrifugation.

- Arf1 Δ 17 vide de nucléotide en complexe avec sec7-ARNO

sec7-ARNO et un excès de Arf1 Δ 17 sont mélangés et dialysés contre un tampon sans nucléotide et sans magnésium (Hepes 20mM pH8,2 et MgCl_2 1 μM). Ces conditions de dialyse vont entraîner la dissociation du magnésium ($K_d \sim 20\mu\text{M}$) et du nucléotide de Arf1 Δ 17. La forme vide de nucléotide de Arf1 Δ 17 se stabilise en formant un complexe binaire stable avec sec7-ARNO (Paris, 1997). Le complexe est ensuite purifié de l'excédant de Arf1 Δ 17 vide de nucléotide par chromatographie (gel filtration ou échangeuses d'ions).

- Arf1 Δ 17-GDP en complexe avec E156K-sec7-ARNO en absence de magnésium

E156K-sec7-ARNO et un excès de Arf1 Δ 17-GDP sont mélangés et dialysés contre un tampon sans magnésium et avec du GDP (Hepes 20mM pH8,2, MgCl_2 1 μM et GDP 1mM). Ces conditions de dialyse vont favoriser la formation du complexe ternaire Arf1 Δ 17-GDP/sec7-ARNO sans magnésium (Beraud-Dufour, 1998). De plus, il est possible de former de la même manière le complexe ternaire Arf1 Δ 17-GTP/E156K-sec7-ARNO en remplaçant le GDP par du GTP dans le tampon de dialyse. Le complexe est ensuite purifié de l'excédant de Arf1 Δ 17-GDP par chromatographie (gel filtration ou échangeuses d'ions).

Cristallisation des différents complexes. Des essais de cristallisations ont été effectués sur les différents complexes de Arf1 Δ 17, sans donner aucun résultat exploitable.

Différentes conditions de cristallisation ont été testées :

- ✓ Avec différents précipitants comme des sels, des précipitants polymériques et des solvants organiques (seuls ou en co-précipitants), et à différentes concentrations.
- ✓ Avec différents tampons de natures différentes et à des pH différents (pH 4 à 9).
- ✓ Avec différents additifs, comme des solvants organiques, du DTT, des sels...
- ✓ En faisant varier la concentration des différents complexes (de 3 à 12 mg/ml).
- ✓ Avec différentes méthodes de cristallisation, par diffusion de solvant en phase gazeuse (gouttes suspendues et assises) et par microbatch.
- ✓ A différentes températures (18 et 4 °C)

De plus, des essais de micro-ensemencements ont été réalisés en utilisant des cristaux de sec7-ARNO et de E156K-sec7-ARNO.

Obtention des cristaux de complexe de Arf1 Δ 17 par Jonathan Golberg.

Jonathan Golberg a obtenu des cristaux de Arf1 Δ 17-GDPNHP en concentrant la protéine à 50 mg/ml (concentration élevée que nous n'avions pas testée). Comme nous, Jonathan Golberg a tenté d'obtenir des cristaux du complexe vide de nucléotide entre Arf1 Δ 17 et sec7-ARNO sans succès, malgré de nombreux essais (Goldberg, 1998). C'est pourquoi, il a choisi de tester des homologues du domaine sec7 de ARNO. Il a obtenu des cristaux de Arf1 Δ 17 vide de nucléotide en complexe avec le domaine sec7 de Gea2, facteur d'échange de levure, à une concentration (très) élevé de 80 mg/ml (Goldberg, 1998).

Annexe D : Cristallisation et collecte des données cristallographiques de Arf6-GTP γ S

Dans le but de résoudre le cycle structural GDP/GTP de Arf6 et de connaître, pour la première fois la conformation de la forme GTP d'une protéine Arf en présence de son hélice N-Terminale, nous avons résolu la structure de Arf6-GTP γ S à une résolution de 2,8Å. Dans un premier temps, j'ai cristallisé, et préparé les cristaux pour la collecte de données cristallographiques en cryogénie. Et dans un second temps, Sebastiano Pasqualato au laboratoire a résolu la structure par remplacement moléculaire. Les généralités sur la protéine Arf6 et la famille à laquelle elle appartient sont présentées au Chapitre 2.

Cristallisation de Arf6-GTP γ S

Des essais de cristallisation ont été réalisés sur les différents complexes de Arf6 suivants :

- Arf6-GTP : les protéines Arf ont une activité GTPasique trop faible pour être mesurée $<0,0015\text{mn}^{-1}$, par conséquent la cristallisation de Arf6 avec son vrai substrat le GTP est envisageable. L'échange du nucléotide a été effectué comme pour Arf6-GDP décrit au -II-B-1/échange du nucléotide
- Arf6-GTP γ S : l'échange du nucléotide a été réalisé comme pour Arf1 Δ 17-GTP γ S décrit dans l'annexe C/Préparation des différents complexes
- Arf6-GDPNHP : l'échange du nucléotide a été réalisé comme pour Arf1 Δ 17-GTP γ S décrit dans l'annexe C/Préparation des différents complexes

En utilisant les méthodes de cristallisation suivantes :

- Diffusion de solvant en phase gazeuse (gouttes assises et gouttes suspendues).
- Microbatch (avec des huiles qui préviennent complètement ou partiellement l'évaporation de la solution de cristallisation, respectivement de l'huile de paraffine et une mixture (1:1) d'huile de paraffine et d'huile de silicone)

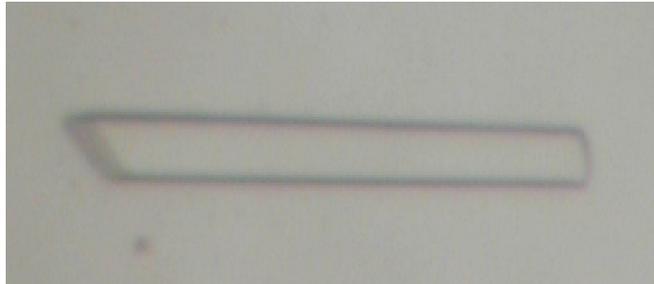
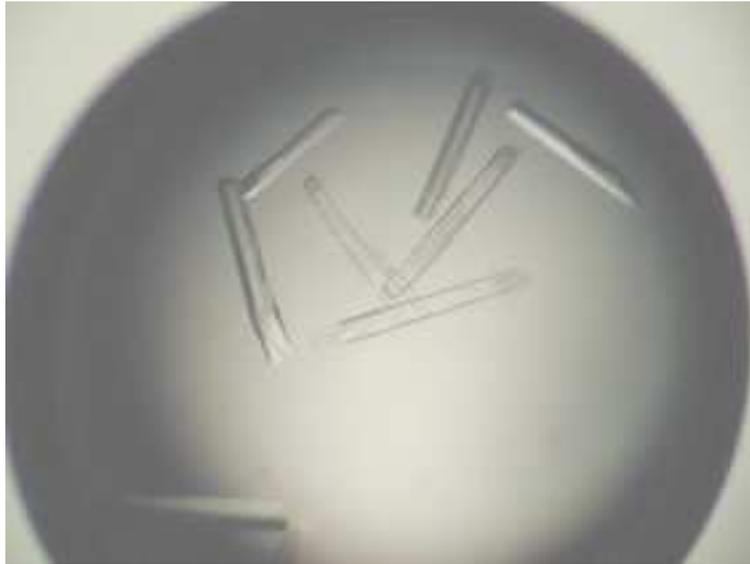


Figure 24: Cristaux de Arf6-GTP γ S. Cristallisation de Arf6-GTP γ S par la méthode de diffusion de solvant en phase gazeuse, avec une goutte pendante. La goutte contenait à volume 2/1: Arf6-GTP γ S (10 mg/ml) et une solution comprenant du PEG 4000 ~20%, acétate de sodium à 100mM pH4.6, sulfate d'ammonium à 200mM, DTT à 1mM et MgCl₂ à 5mM

En faisant varier les conditions suivantes :

- ✓ Différents précipitants (Sels, précipitants polymériques et solvant organique)
- ✓ Différents tampons à différents pH
- ✓ Différents additifs (DTT, MgCl₂, Sels...)
- ✓ Différentes températures (18°C et 4°C)
- ✓ Différentes concentrations des complexes (de 4 à 46 mg/ml)
- ✓ La taille des gouttes et le rapport volume de la solution protéique sur volume de la solution de cristallisation

Les cristaux qui ont été obtenus ont permis d'effectuer les manipulations suivantes :

- Des trempages et de la cocrystallisation ont été faits en utilisant des lanthanides (lanthanides : Eu(NO₃)₃, TbCl₃ et LuCl₃ à 5mM). Les lanthanides sont susceptibles de remplacer le magnésium dans le site nucléotidique et sont utilisés comme atomes lourds pour résoudre la structure par remplacement isomorphe ((Wei, 1997), (Longenecker, 1999)).
- Micro-ensemencement (à partir de cristaux de Arf6-GTP_γS)
- Macro-ensemencement (à partir de cristaux de Arf6-GTP_γS)
- Ajout de protéine après la cristallisation à même la goutte

Résultats

Les plus beaux cristaux ont été obtenus avec Arf6-GTP_γS à une concentration de ~10mg/ml, par la méthode de diffusion de solvant en phase gazeuse (gouttes suspendues et assises (2:2)), à 18°C. Ils ont cristallisé dans les conditions suivantes : PEG 4000 ~20%, acétate de sodium à 100mM pH4.6, sulfate d'ammonium à 200mM, DTT à 1mM et MgCl₂ à 5mM (fig.24). Après la cristallisation, l'ajout de 1μl de Arf6-GTP_γS (~10mg/ml) permet aux cristaux de poursuivre leur croissance sans affecter la qualité de diffraction du cristal. Cependant, ces conditions de cristallisation n'ont pas permis d'obtenir des données cristallographiques à une résolution inférieure à 2,8Å.

Préparation des conditions de congélation des cristaux de Arf6-GTP γ S

De plus en plus, les données cristallographiques sont collectées à des températures cryogéniques (-170°C). Les cristaux sont placés dans une solution cryoprotectante et sont très rapidement congelés ("flash cooling") pour prévenir la cristallisation de l'eau dans les canaux de solvant du cristal et du solvant enveloppant le cristal. Cette technique offre de multiples avantages par rapport à la collecte de données cristallographiques de cristaux à 4°C. En effet, les dommages dus aux radiations sont minimisés, souvent les limites de la résolution augmentent et les paramètres d'agitation thermique diminuent (conséquence d'un système mieux ordonné). De plus, les techniques de congélation permettent de stocker et de transporter facilement les cristaux congelés.

Les cristaux de Arf6-GTP γ S ont été trempés dans différentes conditions de cryogénie. Les conditions de cryogénie reprennent les conditions de cristallisation (la concentration de PEG4000 a été diminuée) plus un agent cryoprotectant. Nous avons testé les cryoprotectants suivants:

- PEG400 (15-20%)
- Glycérol (15-20%)
- Xylitol (20%)
- MPD (15-20%)
- Ethylène Glycol (10-15%)

Les conditions contenant du glycérol (~15%), de l'éthylène glycol (~15%) et du PEG 400 (~20%) n'ont pas entraîné de dommage sur les cristaux. Ces cristaux ont été congelés rapidement par deux techniques différentes qui n'ont pas endommagé les cristaux :

- ✓ Congélation dans l'éthane liquide (fig.25)
- ✓ Congélation dans l'azote liquide

Itinéraire du cristal qui a permis de résoudre la structure de Arf6-GTP γ S.

Protéine : Arf6-GTP γ S à une concentration de 8,6 mg/ml

Méthode de cristallisation : diffusion de solvant en phase gazeuse, dans une goutte suspendue contenant 2 μ l de la solution protéique et 1 μ l de la solution de cristallisation.

Solution de cristallisation : PEG 4000 17%
Sulfate d'ammonium 200mM
Acétate de sodium 100mM à pH 4,6
MgCl₂ 5mM
DTT 1mM

Taille du cristal : section \sim 50x50 μ m²

1 mois après...

Manipulation faite sur le cristal : Ajout de 1 μ l de Arf6-GTP γ S à une concentration de 7 mg/ml à même la goutte de cristallisation (lamelle rescellée sur le même puits).

2 semaines après...

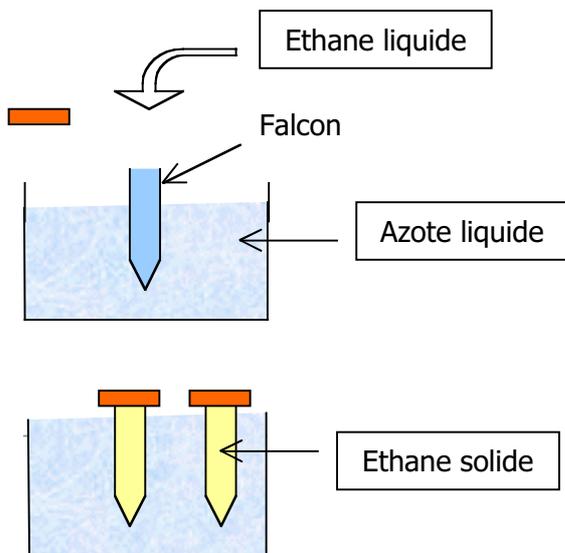
Trempe dans solution cryoprotectante : PEG4000 20%
Sulfate d'ammonium 200mM
Acétate de sodium 100mM à pH4,6
MgCl₂ 5mM
DTT 1mM
PEG 400 25%

La stabilisation du cristal dans ces conditions a été faite en 3 trempages successifs de 10 minutes, en augmentant la concentration du cryoprotectant (PEG 400 : 8%, 16% et 25%).

Congélation du cristal : le cristal a été immédiatement congelé dans de l'éthane liquide (fig.25) et stocké dans un "Dewar" rempli d'azote liquide.

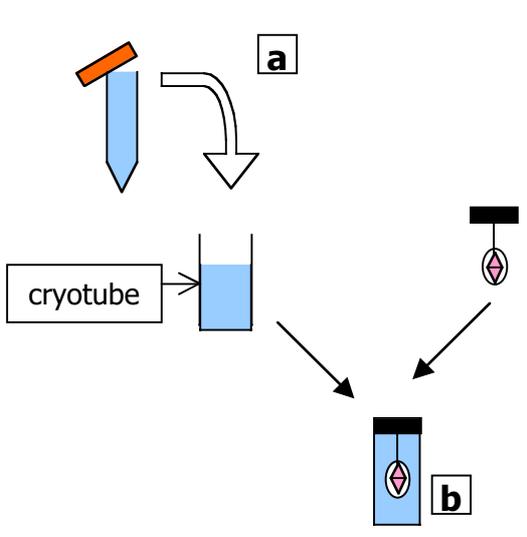
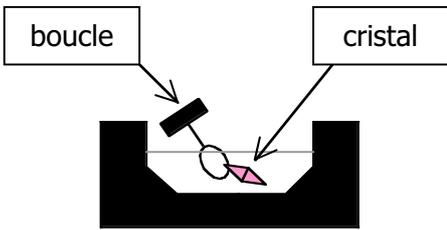
1 mois après, au synchrotron...

Décongélation/Recongélation du cristal : Le cristal de Arf6-GTP γ S était pris dans un film de glace, ce qui est gênant pour la qualité des données de diffraction. C'est pourquoi, le cristal a été décongelé (mis à température ambiante) et recongelé rapidement dans un flux d'azote liquide pour éliminer le film de glace.

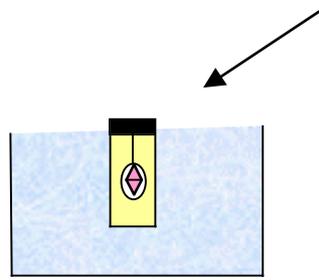


Etape 1: Préparer solution d'éthane liquide. Remplir un falcon® (10ml) d'éthane liquide. Le falcon® doit être placé dans un bain d'azote liquide pour éviter l'ébullition immédiate de l'éthane liquide au cours du remplissage. Reboucher le falcon® lorsque celui-ci est rempli (10ml d'éthane liquide permet de congeler environ 3 cristaux) et le stocker dans le bain d'azote liquide (63-77°K). A cette température l'éthane va se solidifier dans les falcon® (T° de fusion de l'éthane 101°K).

Etape 2 : Pêcher le cristal avec une boucle.
Le cristal, préparé pour la congélation (stabilisé et trempé dans des conditions de cryogénie) est pêché avec une boucle.



Etape 3 : Congélation du cristal.
a-Liquéfaction de l'éthane solide: en retirant le falcon® rempli d'éthane solide du bain d'azote liquide et en le plaçant à température ambiante. Attention à l'effet bouchon de champagne au cours de la liquéfaction, déboucher rapidement le falcon® avant la liquéfaction complète.
b-Congélation du cristal : la boucle où est pris le cristal est plongée dans un cryotube rempli d'éthane liquide.
Attention ces manipulations doivent être faites très rapidement pour éviter que la majorité de l'éthane liquide s'évapore



Etape 4: Stocker le cryotube dans de l'éthane liquide.
Le cryotube est placé rapidement dans un bain d'azote liquide, afin de solidifier l'éthane liquide autour du cristal.
Attention, ne pas immerger complètement le cryotube dans le bain d'azote liquide, car le cryotube possède un petit trou d'évacuation où l'azote liquide peut s'infiltrer et chasser l'éthane encore liquide.
Le cryotube pourra alors être stocker dans un dewar contenant de l'azote liquide, évitant ainsi la liquéfaction de l'éthane solide.

Figure 25: Méthode de congélation des cristaux dans de l'éthane liquide.

Collecte d'un jeu de données cristallographique : Un jeu de données cristallographiques a été enregistré à l'ESRF (Grenoble) sur la ligne ID14-1 ($\lambda=0,934\text{\AA}$) à une résolution de $2,8\text{\AA}$.

Conclusions

La structure de Arf6-GTP γ S a été résolue par remplacement moléculaire en utilisant comme modèle Arf1 Δ 17-GTP par Sebastiano Pasqualato. L'étude structurale de Arf6-GTP γ S fait l'objet de la préparation d'une publication (S. Pasqualato, J. Ménétrey, M. Franco et J. Cherfils).

Références

- Adamson, P., Marshall, C.J., Hall, A. and Tilbrook, P.A. (1992)** Post-translational modifications of p21rho proteins. *J Biol Chem*, 267, 20033-20038.
- Ahmadian, M.R., Stege, P., Scheffzek, K. and Wittinghofer, A. (1997)** Confirmation of the arginine-finger hypothesis for the GAP-stimulated GTP-hydrolysis reaction of Ras [letter]. *Nat Struct Biol*, 4, 686-689.
- Akasaka, K., Tamada, M., Wang, F., Kariya, K., Shima, F., Kikuchi, A., Yamamoto, M., Shirouzu, M., Yokoyama, S. and Kataoka, T. (1996)** Differential structural requirements for interaction of Ras protein with its distinct downstream effectors. *J Biol Chem*, 271, 5353-5360.
- Alsip, G.R. and Konkkel, D.A. (1986)** A processed chicken pseudogene (CPS1) related to the ras oncogene superfamily. *Nucleic Acids Res*, 14, 2123-2138.
- Altschuler, D.L., Peterson, S.N., Ostrowski, M.C. and Lapetina, E.G. (1995)** Cyclic AMP-dependent activation of Rap1b. *J Biol Chem*, 270, 10373-10376.
- Altschuler, Y., Liu, S., Katz, L., Tang, K., Hardy, S., Brodsky, F., Apodaca, G. and Mostov, K. (1999)** ADP-ribosylation factor 6 and endocytosis at the apical surface of Madin-Darby canine kidney cells. *J Cell Biol*, 147, 7-12.
- Amor, J.C., Harrison, D.H., Kahn, R.A. and Ringe, D. (1994)** Structure of the human ADP-ribosylation factor 1 complexed with GDP. *Nature*, 372, 704-708.
- Andreev, J., Simon, J.P., Sabatini, D.D., Kam, J., Plowman, G., Randazzo, P.A. and Schlessinger, J. (1999)** Identification of a new Pyk2 target protein with Arf-GAP activity. *Mol Cell Biol*, 19, 2338-2350.
- Antonny, B., Beraud-Dufour, S., Chardin, P. and Chabre, M. (1997)** N-Terminal hydrophobic residues of the G-protein ADP-ribosylation factor-1 insert into membrane phospholipids upon GDP to GTP exchange. *Biochemistry*, 36, 4675-4684.
- Aoe, T., Cukierman, E., Lee, A., Cassel, D., Peters, P.J. and Hsu, V.W. (1997)** The KDEL receptor, ERD2, regulates intracellular traffic by recruiting a GTPase-activating protein for ARF1. *Embo J*, 16, 7305-7316.
- Bagrodia, S., Bailey, D., Lenard, Z., Hart, M., Guan, J.L., Premont, R.T., Taylor, S.J. and Cerione, R.A. (1999)** A tyrosine-phosphorylated protein that binds to an important regulatory region on the cool family of p21-activated kinase-binding proteins. *J Biol Chem*, 274, 22393-22400.

- Beranger, F., Goud, B., Tavitian, A. and de Gunzburg, J. (1991)** Association of the Ras-antagonistic Rap1/Krev-1 proteins with the Golgi complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88, 1606-1610.
- Beraud-Dufour, S., Robineau, S., Chardin, P., Paris, S., Chabre, M., Cherfils, J. and Antonny, B. (1998)** A glutamic finger in the guanine nucleotide exchange factor ARNO displaces Mg²⁺ and the beta-phosphate to destabilize GDP on ARF1. *Embo J*, 17, 3651-3659.
- Berger, G., Quarck, R., Tenza, D., Levy-Toledano, S., de Gunzburg, J. and Cramer, E.M. (1994)** Ultrastructural localization of the small GTP-binding protein Rap1 in human platelets and megakaryocytes. *Br J Haematol*, 88, 372-382.
- Bhamidipati, A., Lewis, S.A. and Cowan, N.J. (2000)** ADP ribosylation factor-like protein 2 (Arl2) regulates the interaction of tubulin-folding cofactor D with native tubulin. *J Cell Biol*, 149, 1087-1096.
- Birck, C., Mourey, L., Gouet, P., Fabry, B., Schumacher, J., Rousseau, P., Kahn, D. and Samama, J.P. (1999)** Conformational changes induced by phosphorylation of the FixJ receiver domain. *Structure Fold Des*, 7, 1505-1515.
- Bischoff, F.R. and Ponstingl, H. (1991)** Catalysis of guanine nucleotide exchange on Ran by the mitotic regulator RCC1. *Nature*, 354, 80-82.
- Bischoff, F.R., Krebber, H., Smirnova, E., Dong, W., Ponstingl, H. (1995)** Co-activation of Ran-GTPase and inhibition of GTP dissociation by Ran-GTP binding protein RanBP1. *EMBO J.*, 14, 705-715.
- Blader, I.J., Cope, M.J., Jackson, T.R., Profit, A.A., Greenwood, A.F., Drubin, D.G., Prestwich, G.D. and Theibert, A.B. (1999)** GCS1, an Arf guanosine triphosphatase-activating protein in *Saccharomyces cerevisiae*, is required for normal actin cytoskeletal organization in vivo and stimulates actin polymerization in vitro. *Mol Biol Cell*, 10, 581-596.
- Boman, A.L., Kuai, J., Zhu, X., Chen, J., Kuriyama, R. and Kahn, R.A. (1999)** Arf proteins bind to mitotic kinesin-like protein 1 (MKLP1) in a GTP-dependent fashion. *Cell Motil Cytoskeleton*, 44, 119-132.
- Boman, A.L., Zhang, C., Zhu, X. and Kahn, R.A. (2000)** A family of ADP-ribosylation factor effectors that can alter membrane transport through the trans-Golgi. *Mol Biol Cell*, 11, 1241-1255.
- Boriack-Sjodin, P.A., Margarit, S.M., Bar-Sagi, D. and Kuriyan, J. (1998)** The structural basis of the activation of Ras by Sos [see comments]. *Nature*, 394, 337-343.

- Bos, J.L. (1989)** ras oncogenes in human cancer: a review [published erratum appears in Cancer Res 1990 Feb 15;50(4):1352]. Cancer Res, 49, 4682-4689.
- Bos, J.L. (1998)** All in the family? New insights and questions regarding interconnectivity of Ras, Rap1 and Ral. Embo J, 17, 6776-6782.
- Brondyk, W.H., McKiernan, C.J., Burstein, E.S. and Macara, I.G. (1993)** Mutants of Rab3A analogous to oncogenic Ras mutants. Sensitivity to Rab3A-GTPase activating protein and Rab3A-guanine nucleotide releasing factor. J Biol Chem, 268, 9410-9415.
- Brown, H.A., Gutowski, S., Moomaw, C.R., Slaughter, C. and Sternweis, P.C. (1993)** ADP-ribosylation factor, a small GTP-dependent regulatory protein, stimulates phospholipase D activity [see comments]. Cell, 75, 1137-1144.
- Brown, M.T., Andrade, J., Radhakrishna, H., Donaldson, J.G., Cooper, J.A. and Randazzo, P.A. (1998)** ASAP1, a phospholipid-dependent arf GTPase-activating protein that associates with and is phosphorylated by Src. Mol Cell Biol, 18, 7038-7051.
- Brünger, A., Karplus, M. and Petsko, G. (1989)** Crystallographic refinement by simulated annealing : application to crambin. Acta. Crystallogr. A, 45, 50-61.
- Brünger, A.T. (1992)** Nature (London), 355, 472-475.
- Cantor, S.B., Urano, T. and Feig, L.A. (1995)** Identification and characterization of Ral-binding protein 1, a potential downstream target of Ral GTPases. Mol Cell Biol, 15, 4578-4584.
- Caumont, A.S., Galas, M.C., Vitale, N., Aunis, D. and Bader, M.F. (1998)** Regulated exocytosis in chromaffin cells. Translocation of ARF6 stimulates a plasma membrane-associated phospholipase D. J Biol Chem, 273, 1373-1379.
- Cavenagh, M.M., Whitney, J.A., Carroll, K., Zhang, C., Boman, A.L., Rosenwald, A.G., Mellman, I. and Kahn, R.A. (1996)** Intracellular distribution of Arf proteins in mammalian cells. Arf6 is uniquely localized to the plasma membrane. J Biol Chem, 271, 21767-21774.
- Chardin, P. and McCormick, F. (1999)** Brefeldin A: the advantage of being uncompetitive. Cell, 97, 153-155.
- Chardin, P., Paris, S., Antonny, B., Robineau, S., Beraud-Dufour, S., Jackson, C.L. and Chabre, M. (1996)** A human exchange factor for ARF contains Sec7- and pleckstrin-homology domains. Nature, 384, 481-484.
- Chardin, P. and Tavitian, A. (1989)** Coding sequences of human ralA and ralB cDNAs. Nucleic Acids Res, 17, 4380.

- Chattopadhyay, D., Langsley, G., Carson, M., Recacha, R., DeLucas, L. and Smith, C. (2000)** Structure of the nucleotide-binding domain of plasmodium falciparum rab6 in the GDP-bound form [In Process Citation]. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 56, 937-944.
- Chavrier, P. and Goud, B. (1999)** The role of ARF and Rab GTPases in membrane transport. *Curr Opin Cell Biol*, 11, 466-475.
- Cherfils, J., Menetrey, J., Le Bras, G., Janoueix-Lerosey, I., de Gunzburg, J., Garel, J.R. and Auzat, I. (1997)** Crystal structures of the small G protein Rap2A in complex with its substrate GTP, with GDP and with GTPgammaS. *Embo J*, 16, 5582-5591.
- Cherfils, J., Menetrey, J., Mathieu, M., Le Bras, G., Robineau, S., Beraud-Dufour, S., Antony, B. and Chardin, P. (1998)** Structure of the Sec7 domain of the Arf exchange factor ARNO. *Nature*, 392, 101-105.
- Chien, C.T., Bartel, P.L., Sternglanz, R. and Fields, S. (1991)** The two-hybrid system: a method to identify and clone genes for proteins that interact with a protein of interest. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88, 9578-9582.
- Chook, Y.M. and Blobel, G. (1999)** Structure of the nuclear transport complex karyopherin-beta2-Ran x GppNHp [see comments]. *Nature*, 399, 230-237.
- Claing, A., Perry, S.J., Achiriloaie, M., Walker, J.K., Albanesi, J.P., Lefkowitz, R.J. and Premont, R.T. (2000)** Multiple endocytic pathways of G protein-coupled receptors delineated by GIT1 sensitivity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97, 1119-1124.
- Clark, G.J., Kinch, M.S., Rogers-Graham, K., Sebti, S.M., Hamilton, A.D. and Der, C.J. (1997)** The Ras-related protein Rheb is farnesylated and antagonizes Ras signaling and transformation. *J Biol Chem*, 272, 10608-10615.
- Clark, J., Moore, L., Krasinskas, A., Way, J., Battey, J., Tamkun, J. and Kahn, R.A. (1993)** Selective amplification of additional members of the ADP-ribosylation factor (ARF) family: cloning of additional human and Drosophila ARF-like genes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90, 8952-8956.
- Cockcroft, S., Thomas, G.M., Fensome, A., Geny, B., Cunningham, E., Gout, I., Hiles, I., Totty, N.F., Truong, O. and Hsuan, J.J. (1994)** Phospholipase D: a downstream effector of ARF in granulocytes. *Science*, 263, 523-526.
- Cool, R.H., Schmidt, G., Lenzen, C.U., Prinz, H., Vogt, D. and Wittinghofer, A. (1999)** The Ras mutant D119N is both dominant negative and activated. *Mol Cell Biol*, 19, 6297-6305.

- Cosson, P. and Letourneur, F. (1997)** Coatomer (COPI)-coated vesicles: role in intracellular transport and protein sorting. *Curr Opin Cell Biol*, 9, 484-487.
- Cox, A.D. and Der, C.J. (1997)** Farnesyltransferase inhibitors and cancer treatment: targeting simply Ras? *Biochim Biophys Acta*, 1333, F51-71.
- Cukierman, E., Huber, I., Rotman, M. and Cassel, D. (1995)** The ARF1 GTPase-activating protein: zinc finger motif and Golgi complex localization. *Science*, 270, 1999-2002.
- D'Souza-Schorey, C., Boshans, R.L., McDonough, M., Stahl, P.D. and Van Aelst, L. (1997)** A role for POR1, a Rac1-interacting protein, in ARF6-mediated cytoskeletal rearrangements. *Embo J*, 16, 5445-5454.
- D'Souza-Schorey, C., Li, G., Colombo, M.I. and Stahl, P.D. (1995)** A regulatory role for ARF6 in receptor-mediated endocytosis. *Science*, 267, 1175-1178.
- D'Souza-Schorey, C., van Donselaar, E., Hsu, V.W., Yang, C., Stahl, P.D. and Peters, P.J. (1998)** ARF6 targets recycling vesicles to the plasma membrane: insights from an ultrastructural investigation. *J Cell Biol*, 140, 603-616.
- de Rooij, J., Zwartkruis, F.J., Verheijen, M.H., Cool, R.H., Nijman, S.M., Wittinghofer, A. and Bos, J.L. (1998)** Epac is a Rap1 guanine-nucleotide-exchange factor directly activated by cyclic AMP [see comments]. *Nature*, 396, 474-477.
- de Vos, A.M., Tong, L., Milburn, M.V., Matias, P.M., Jancarik, J., Noguchi, S., Nishimura, S., Miura, K., Ohtsuka, E. and Kim, S.H. (1988)** Three-dimensional structure of an oncogene protein: catalytic domain of human c-H-ras p21. *Science*, 239, 888-893.
- Declercq, J.P., Evrard, C., Lamzin, V. and Parello, J. (1999)** Crystal structure of the EF-hand parvalbumin at atomic resolution (0.91 Å) and at low temperature (100 K). Evidence for conformational multistates within the hydrophobic core. *Protein Sci*, 8, 2194-2204.
- Dell'Angelica, E.C., Ohno, H., Ooi, C.E., Rabinovich, E., Roche, K.W. and Bonifacino, J.S. (1997)** AP-3: an adaptor-like protein complex with ubiquitous expression. *Embo J*, 16, 917-928.
- Dell'Angelica, E.C., Puertollano, R., Mullins, C., Aguilar, R.C., Vargas, J.D., Hartnell, L.M. and Bonifacino, J.S. (2000)** GGAs: a family of ADP ribosylation factor-binding proteins related to adaptors and associated with the Golgi complex. *J Cell Biol*, 149, 81-94.

- Denhardt, D.T. (1996)** Signal-transducing protein phosphorylation cascades mediated by Ras/Rho proteins in the mammalian cell: the potential for multiplex signalling. *Biochem J*, 318, 729-747.
- Der, C.J., Finkel, T. and Cooper, G.M. (1986)** Biological and biochemical properties of human rasH genes mutated at codon 61. *Cell*, 44, 167-176.
- Donaldson, J.G. (2000)** Filling in the GAPs in the ADP-ribosylation factor story [comment]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97, 3792-3794.
- Donaldson, J.G. and Jackson, C.L. (2000)** Regulators and effectors of the ARF GTPases. *Curr Opin Cell Biol*, 12, 475-482.
- Dumas, J.J., Zhu, Z., Connolly, J.L. and Lambright, D.G. (1999)** Structural basis of activation and GTP hydrolysis in Rab proteins. *Structure Fold Des*, 7, 413-423.
- Esters, H., Alexandrov, K., Constantinescu, A.T., Goody, R.S. and Scheidig, A.J. (2000)** High-resolution crystal structure of *S. cerevisiae* Ypt51(DeltaC15)-GppNHp, a small GTP-binding protein involved in regulation of endocytosis. *J Mol Biol*, 298, 111-121.
- Exton, J.H. (1998)** Phospholipase D. *Biochim Biophys Acta*, 1436, 105-115.
- Faundez, V., Horng, J.T. and Kelly, R.B. (1998)** A function for the AP3 coat complex in synaptic vesicle formation from endosomes. *Cell*, 93, 423-432.
- Feig, L.A. (1999)** Tools of the trade: use of dominant-inhibitory mutants of Ras-family GTPases. *Nat Cell Biol*, 1, E25-27.
- Feig, L.A., Urano, T. and Cantor, S. (1996)** Evidence for a Ras/Ral signaling cascade. *Trends Biochem Sci*, 21, 438-441.
- Finazzi, D., Cassel, D., Donaldson, J.G. and Klausner, R.D. (1994)** Aluminum fluoride acts on the reversibility of ARF1-dependent coat protein binding to Golgi membranes. *J Biol Chem*, 269, 13325-13330.
- Franco, M., Chardin, P., Chabre, M. and Paris, S. (1995a)** Myristoylation of ADP-ribosylation factor 1 facilitates nucleotide exchange at physiological Mg²⁺ levels. *J Biol Chem*, 270, 1337-1341.
- Franco, M., Paris, S. and Chabre, M. (1995b)** The small G-protein ARF1GDP binds to the Gt beta gamma subunit of transducin, but not to Gt alpha GDP-Gt beta gamma. *FEBS Lett*, 362, 286-290.
- Franco, M., Peters, P.J., Boretto, J., van Donselaar, E., Neri, A., D'Souza-Schorey, C. and Chavrier, P. (1999)** EFA6, a sec7 domain-containing exchange factor for ARF6, coordinates membrane recycling and actin cytoskeleton organization. *Embo J*, 18, 1480-1491.

- Frank, S.R., Hatfield, J.C. and Casanova, J.E. (1998)** Remodeling of the actin cytoskeleton is coordinately regulated by protein kinase C and the ADP-ribosylation factor nucleotide exchange factor ARNO. *Mol Biol Cell*, 9, 3133-3146.
- Frech, M., John, J., Pizon, V., Chardin, P., Tavitian, A., Clark, R., McCormick, F. and Wittinghofer, A. (1990)** Inhibition of GTPase activating protein stimulation of Ras-p21 GTPase by the Krev-1 gene product. *Science*, 249, 169-171.
- Galas, M.C., Helms, J.B., Vitale, N., Thierse, D., Aunis, D. and Bader, M.F. (1997)** Regulated exocytosis in chromaffin cells. A potential role for a secretory granule-associated ARF6 protein. *J Biol Chem*, 272, 2788-2793.
- Gaschet, J. and Hsu, V.W. (1999)** Distribution of ARF6 between membrane and cytosol is regulated by its GTPase cycle. *J Biol Chem*, 274, 20040-20045.
- Geyer, M. and Wittinghofer, A. (1997)** GEFs, GAPs, GDIs and effectors: taking a closer (3D) look at the regulation of Ras-related GTP-binding proteins. *Curr Opin Struct Biol*, 7, 786-792.
- Godi, A., Pertile, P., Meyers, R., Marra, P., Di Tullio, G., Iurisci, C., Luini, A., Corda, D. and De Matteis, M.A. (1999)** ARF mediates recruitment of PtdIns-4-OH kinase-beta and stimulates synthesis of PtdIns(4,5)P₂ on the Golgi complex [see comments]. *Nat Cell Biol*, 1, 280-287.
- Goldberg, J. (1998)** Structural basis for activation of ARF GTPase: mechanisms of guanine nucleotide exchange and GTP-myristoyl Switching. *Cell*, 95, 237-248.
- Goldberg, J. (1999)** Structural and functional analysis of the ARF1-ARFGAP complex reveals a role for coatamer in GTP hydrolysis. *Cell*, 96, 893-902.
- Greasley, S.E., Jhoti, H., Teahan, C., Solari, R., Fensome, A., Thomas, G.M., Cockcroft, S. and Bax, B. (1995)** The structure of rat ADP-ribosylation factor-1 (ARF-1) complexed to GDP determined from two different crystal forms. *Nat Struct Biol*, 2, 797-806.
- Hancock, J.F., Paterson, H. and Marshall, C.J. (1990)** A polybasic domain or palmitoylation is required in addition to the CAAX motif to localize p21ras to the plasma membrane. *Cell*, 63, 133-139.
- Hata, Y., Kikuchi, A., Sasaki, T., Schaber, M.D., Gibbs, J.B. and Takai, Y. (1990)** Inhibition of the ras p21 GTPase-activating protein-stimulated GTPase activity of c-Ha-ras p21 by smg p21 having the same putative effector domain as ras p21s. *J Biol Chem*, 265, 7104-7107.
- Herrmann, C., Horn, G., Spaargaren, M. and 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. *J Biol Chem*, 271, 6794-6800.
- Hilgenfeld, R. (1995)** How do the GTPases really work? [news; comment]. *Nat Struct Biol*, 2, 3-6.
- Hirst, J., Lui, W.W., Bright, N.A., Totty, N., Seaman, M.N. and Robinson, M.S. (2000)** A family of proteins with gamma-adaptin and VHS domains that facilitate trafficking between the trans-Golgi network and the vacuole/lysosome. *J Cell Biol*, 149, 67-80.
- Hoffman, G.R., Nassar, N. and Cerione, R.A. (2000)** Structure of the Rho family GTP-binding protein Cdc42 in complex with the multifunctional regulator RhoGDI. *Cell*, 100, 345-356.
- Honda, A., Nogami, M., Yokozeki, T., Yamazaki, M., Nakamura, H., Watanabe, H., Kawamoto, K., Nakayama, K., Morris, A.J., Frohman, M.A. and Kanaho, Y. (1999)** Phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase alpha is a downstream effector of the small G protein ARF6 in membrane ruffle formation. *Cell*, 99, 521-532.
- Hong, J.X., Lee, F.J., Patton, W.A., Lin, C.Y., Moss, J. and Vaughan, M. (1998)** Phospholipid- and GTP-dependent activation of cholera toxin and phospholipase D by human ADP-ribosylation factor-like protein 1 (HARL1). *J Biol Chem*, 273, 15872-15876.
- Hu, C.D., Kariya, K., Okada, T., Qi, X., Song, C. and Kataoka, T. (1999)** Effect of phosphorylation on activities of Rap1A to interact with Raf-1 and to suppress Ras-dependent Raf-1 activation. *J Biol Chem*, 274, 48-51.
- Huang, C.F., Buu, L.M., Yu, W.L. and Lee, F.J. (1999)** Characterization of a novel ADP-ribosylation factor-like protein (γ ARL3) in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*, 274, 3819-3827.
- Huang, L., Hofer, F., Martin, G.S. and Kim, S.H. (1998)** Structural basis for the interaction of Ras with RalGDS. *Nat Struct Biol*, 5, 422-426.
- Icard-Liepkalns, C., Ravassard, P., Liepkalns, V.A., Chatail, F. and Mallet, J. (1997)** An ADP-ribosylation-factor(ARF)-like protein involved in regulated secretion. *Eur J Biochem*, 246, 388-393.
- Ichiba, T., Hoshi, Y., Eto, Y., Tajima, N. and Kuraishi, Y. (1999)** Characterization of GFR, a novel guanine nucleotide exchange factor for Rap1. *FEBS Lett*, 457, 85-89.
- Ihara, K., Muraguchi, S., Kato, M., Shimizu, T., Shirakawa, M., Kuroda, S., Kaibuchi, K. and Hakoshima, T. (1998)** Crystal structure of human RhoA in a

- dominantly active form complexed with a GTP analogue. *J Biol Chem*, 273, 9656-9666.
- Jackson, C.L. and Casanova, J.E. (2000)** Turning on ARF: the Sec7 family of guanine-nucleotide-exchange factors. *Trends Cell Biol*, 10, 60-67.
- Jacobs, S., Schilf, C., Fliegert, F., Koling, S., Weber, Y., Schurmann, A. and Joost, H.G. (1999)** ADP-ribosylation factor (ARF)-like 4, 6, and 7 represent a subgroup of the ARF family characterization by rapid nucleotide exchange and a nuclear localization signal. *FEBS Lett*, 456, 384-388.
- Janoueix-Lerosey, I., Pasheva, E., de Tand, M.F., Tavitian, A. and de Gunzburg, J. (1998)** Identification of a specific effector of the small GTP-binding protein Rap2. *Eur J Biochem*, 252, 290-298.
- Jilkina, O. and Bhullar, R.P. (1996)** Generation of antibodies specific for the RalA and RalB GTP-binding proteins and determination of their concentration and distribution in human platelets. *Biochim Biophys Acta*, 1314, 157-166.
- Jimenez, B., Pizon, V., Lerosey, I., Beranger, F., Tavitian, A. and de Gunzburg, J. (1991)** Effects of the ras-related rap2 protein on cellular proliferation. *Int J Cancer*, 49, 471-479.
- John, J., Rensland, H., Schlichting, I., Vetter, I., Borasio, G.D., Goody, R.S. and Wittinghofer, A. (1993)** Kinetic and structural analysis of the Mg(2+)-binding site of the guanine nucleotide-binding protein p21H-ras. *J Biol Chem*, 268, 923-929.
- Johnson, L., Greenbaum, D., Cichowski, K., Mercer, K., Murphy, E., Schmitt, E., Bronson, R.T., Umanoff, H., Edelman, W., Kucherlapati, R. and Jacks, T. (1997)** K-ras is an essential gene in the mouse with partial functional overlap with N-ras [published erratum appears in *Genes Dev* 1997 Dec 1;11(23):3277]. *Genes Dev*, 11, 2468-2481.
- Jones, D.H., Morris, J.B., Morgan, C.P., Kondo, H., Irvine, R.F. and Cockcroft, S. (2000)** Type I phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase directly interacts with ADP-ribosylation factor 1 and is responsible for phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate synthesis in the golgi compartment. *J Biol Chem*, 275, 13962-13966.
- Jullien-Flores, V., Dorseuil, O., Romero, F., Letourneur, F., Saragosti, S., Berger, R., Tavitian, A., Gacon, G. and Camonis, J.H. (1995)** Bridging Ral GTPase to Rho pathways. RLIP76, a Ral effector with CDC42/Rac GTPase-activating protein activity. *J Biol Chem*, 270, 22473-22477.

- Kahn, R.A. and Gilman, A.G. (1984)** Purification of a protein cofactor required for ADP-ribosylation of the stimulatory regulatory component of adenylate cyclase by cholera toxin. *J Biol Chem*, 259, 6228-6234.
- Kahn, R.A. and Gilman, A.G. (1986)** The protein cofactor necessary for ADP-ribosylation of Gs by cholera toxin is itself a GTP binding protein. *J Biol Chem*, 261, 7906-7911.
- Kahn, R.A., Goddard, C. and Newkirk, M. (1988)** Chemical and immunological characterization of the 21-kDa ADP-ribosylation factor of adenylate cyclase. *J Biol Chem*, 263, 8282-8287.
- Kahn, R.A., Kern, F.G., Clark, J., Gelmann, E.P. and Rulka, C. (1991)** Human ADP-ribosylation factors. A functionally conserved family of GTP-binding proteins. *J Biol Chem*, 266, 2606-2614.
- Kahn, R.A., Randazzo, P., Serafini, T., Weiss, O., Rulka, C., Clark, J., Amherdt, M., Roller, P., Orci, L. and Rothman, J.E. (1992)** The amino Terminus of ADP-ribosylation factor (ARF) is a critical determinant of ARF activities and is a potent and specific inhibitor of protein transport. *J Biol Chem*, 267, 13039-13046.
- Kanoh, H., Williger, B.T. and Exton, J.H. (1997)** Arfaptin 1, a putative cytosolic target protein of ADP-ribosylation factor, is recruited to Golgi membranes. *J Biol Chem*, 272, 5421-5429.
- Kavounis, C., Verrotti, A.C., De Vendittis, E., Bozopoulos, A., Di Blasi, F., Zahn, R., Crechet, J.B., Parmeggiani, A., Tsernoglou, D. and Fasano, O. (1991)** Role of glycine-82 as a pivot point during the transition from the inactive to the active form of the yeast Ras2 protein. *FEBS Lett*, 281, 235-239.
- Kawasaki, H., Springett, G.M., Mochizuki, N., Toki, S., Nakaya, M., Matsuda, M., Housman, D.E. and Graybiel, A.M. (1998)** A family of cAMP-binding proteins that directly activate Rap1. *Science*, 282, 2275-2279.
- Kawata, M., Matsui, Y., Kondo, J., Hishida, T., Teranishi, Y. and Takai, Y. (1988)** A novel small molecular weight GTP-binding protein with the same putative effector domain as the ras proteins in bovine brain membranes. Purification, determination of primary structure, and characterization. *J Biol Chem*, 263, 18965-18971.
- Kishida, S., Koyama, S., Matsubara, K., Kishida, M., Matsuura, Y. and Kikuchi, A. (1997)** Colocalization of Ras and Ral on the membrane is required for Ras-dependent Ral activation through Ral GDP dissociation stimulator. *Oncogene*, 15, 2899-2907.
- Kitayama, H., Sugimoto, Y., Matsuzaki, T., Ikawa, Y. and Noda, M. (1989)** A ras-related gene with transformation suppressor activity. *Cell*, 56, 77-84.

- Kjeldgaard, M., Nissen, P., Thirup, S. and Nyborg, J. (1993)** The crystal structure of elongation factor EF-Tu from *Thermus aquaticus* in the GTP conformation. *Structure*, 1, 35-50.
- Kjeldgaard, M., Nyborg, J. and Clark, B.F. (1996)** The GTP binding motif: variations on a theme. *Faseb J*, 10, 1347-1368.
- Klarlund, J.K., Tsiaras, W., Holik, J.J., Chawla, A., Czech, M.P. (2000)** Distinct Polyphosphoinositide Binding Selectivities for Pleckstrin Homology Domains of GRP1-like Proteins Based on Diglycine Versus Triglycine Motifs. *J Biol Chem*, 275, 32816-32821.
- Klebe, C., Prinz, H., Wittinghofer, A. and Goody, R.S. (1995)** The kinetic mechanism of Ran--nucleotide exchange catalyzed by RCC1. *Biochemistry*, 34, 12543-12552.
- Ktistakis, N.T., Brown, H.A., Sternweis, P.C. and Roth, M.G. (1995)** Phospholipase D is present on Golgi-enriched membranes and its activation by ADP ribosylation factor is sensitive to brefeldin A. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92, 4952-4956.
- Lai, C.C., Boguski, M., Broek, D. and Powers, S. (1993)** Influence of guanine nucleotides on complex formation between Ras and CDC25 proteins. *Mol Cell Biol*, 13, 1345-1352.
- Langille, S.E., Patki, V., Klarlund, J.K., Buxton, J.M., Holik, J.J., Chawla, A., Corvera, S. and Czech, M.P. (1999)** ADP-ribosylation factor 6 as a target of guanine nucleotide exchange factor GRP1. *J Biol Chem*, 274, 27099-27104.
- Lee, C.H.J., Della, N.G., Chew, C.E. and Zack, D.J. (1996)** Rin, a neuron-specific and calmodulin-binding small G-protein, and Rit define a novel subfamily of ras proteins. *J Neurosci*, 16, 6784-6794.
- Lerosey, I., Chardin, P., de Gunzburg, J. and Tavitian, A. (1991)** The product of the rap2 gene, member of the ras superfamily. Biochemical characterization and site-directed mutagenesis. *J Biol Chem*, 266, 4315-4321.
- Li, R. and Zheng, Y. (1997)** Residues of the Rho family GTPases Rho and Cdc42 that specify sensitivity to Dbp-like guanine nucleotide exchange factors. *J Biol Chem*, 272, 4671-4679.
- Liang, J.O., Sung, T.C., Morris, A.J., Frohman, M.A. and Kornfeld, S. (1997)** Different domains of mammalian ADP-ribosylation factor 1 mediate interaction with selected target proteins. *J Biol Chem*, 272, 33001-33008.
- Linari, M., Hanzal-Bayer, M. and Becker, J. (1999)** The delta subunit of rod specific cyclic GMP phosphodiesterase, PDE delta, interacts with the Arf-like protein Arl3 in a GTP specific manner. *FEBS Lett*, 458, 55-59.

- Liscovitch, M., Chalifa, V., Pertile, P., Chen, C.S. and Cantley, L.C. (1994)** Novel function of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate as a cofactor for brain membrane phospholipase D. *J Biol Chem*, 269, 21403-21406.
- Longenecker, K., Read, P., Derewenda, U., Dauter, Z., Liu, X., Garrard, S., Walker, L., Somlyo, A.V., Nakamoto, R.K., Somlyo, A.P. and Derewenda, Z.S. (1999)** How RhoGDI binds Rho. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 55, 1503-1515.
- Lowe, S.L., Wong, S.H. and Hong, W. (1996)** The mammalian ARF-like protein 1 (Arl1) is associated with the Golgi complex. *J Cell Sci*, 109, 209-220.
- Luo, J.Q., Liu, X., Frankel, P., Rotunda, T., Ramos, M., Flom, J., Jiang, H., Feig, L.A., Morris, A.J., Kahn, R.A. and Foster, D.A. (1998)** Functional association between Arf and RalA in active phospholipase D complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95, 3632-3637.
- Maegley, K.A., Admiraal, S.J. and Herschlag, D. (1996)** Ras-catalyzed hydrolysis of GTP: a new perspective from model studies. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93, 8160-8166.
- Maesaki, R., Ihara, K., Shimizu, T., Kuroda, S., Kaibuchi, K. and Hakoshima, T. (1999)** The structural basis of Rho effector recognition revealed by the crystal structure of human RhoA complexed with the effector domain of PKN/PRK1. *Mol Cell*, 4, 793-803.
- Magee, T. and Marshall, C. (1999)** New insights into the interaction of Ras with the plasma membrane [comment]. *Cell*, 98, 9-12.
- Maly, F.E., Quilliam, L.A., Dorseuil, O., Der, C.J. and Bokoch, G.M. (1994)** Activated or dominant inhibitory mutants of Rap1A decrease the oxidative burst of Epstein-Barr virus-transformed human B lymphocytes. *J Biol Chem*, 269, 18743-18746.
- Mandiyan, V., Andreev, J., Schlessinger, J. and Hubbard, S.R. (1999)** Crystal structure of the ARF-GAP domain and ankyrin repeats of PYK2-associated protein beta. *Embo J*, 18, 6890-6898.
- Maridonneau-Parini, I. and de Gunzburg, J. (1992)** Association of rap1 and rap2 proteins with the specific granules of human neutrophils. Translocation to the plasma membrane during cell activation. *J Biol Chem*, 267, 6396-6402.
- Marte, B.M., Rodriguez-Viciano, P., Wennstrom, S., Warne, P.H. and Downward, J. (1997)** R-Ras can activate the phosphoinositide 3-kinase but not the MAP kinase arm of the Ras effector pathways [published erratum appears in *Curr Biol* 1997 Mar 1;7(3):197]. *Curr Biol*, 7, 63-70.
- Massenburg, D., Han, J.S., Liyanage, M., Patton, W.A., Rhee, S.G., Moss, J. and Vaughan, M. (1994)** Activation of rat brain phospholipase D by ADP-ribosylation

- factors 1,5, and 6: separation of ADP-ribosylation factor-dependent and oleate-dependent enzymes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91, 11718-11722.
- Matthews, B.W. (1968)** Solvent content of protein crystals. *J Mol Biol*, 33, 491-497.
- Menetrey, J. and Cherfils, J. (1999)** Structure of the small G protein Rap2 in a non-catalytic complex with GTP. *Proteins*, 37, 465-473.
- Menetrey, J., Macia, E., Pasqualato, S., Franco, M. and Cherfils, J. (2000)** Structure of Arf6-GDP suggests a basis for guanine nucleotide exchange factors specificity. *Nat Struct Biol*, 7, 466-469.
- Milburn, M.V., Tong, L., deVos, A.M., Brunger, A., Yamaizumi, Z., Nishimura, S. and Kim, S.H. (1990)** Molecular Switch for signal transduction: structural differences between active and inactive forms of protooncogenic ras proteins. *Science*, 247, 939-945.
- Millar, C.A., Powell, K.A., Hickson, G.R., Bader, M.F. and Gould, G.W. (1999)** Evidence for a role for ADP-ribosylation factor 6 in insulin-stimulated glucose transporter-4 (GLUT4) trafficking in 3T3-L1 adipocytes. *J Biol Chem*, 274, 17619-17625.
- Mistou, M.Y., Cool, R.H. and Parmeggiani, A. (1992)** Effects of ions on the intrinsic activities of c-H-ras protein p21. A comparison with elongation factor Tu. *Eur J Biochem*, 204, 179-185.
- Moritz, A., De Graan, P.N., Gispen, W.H. and Wirtz, K.W. (1992)** Phosphatidic acid is a specific activator of phosphatidylinositol-4-phosphate kinase. *J Biol Chem*, 267, 7207-7210.
- MSI. (1998)** Molecular Simulation Inc.
- Mukherjee, S., Gurevich, V.V., Jones, J.C., Casanova, J.E., Frank, S.R., Maizels, E.T., Bader, M.F., Kahn, R.A., Palczewski, K., Aktories, K. and Hunzicker-Dunn, M. (2000)** The ADP ribosylation factor nucleotide exchange factor ARNO promotes beta-arrestin release necessary for luteinizing hormone/choriogonadotropin receptor desensitization. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97, 5901-5906.
- Nakano, A. and Muramatsu, M. (1989)** A novel GTP-binding protein, Sar1p, is involved in transport from the endoplasmic reticulum to the Golgi apparatus. *J Cell Biol*, 109, 2677-2691.
- Nancy, V., Wolthuis, R.M., de Tand, M.F., Janoueix-Lerosey, I., Bos, J.L. and de Gunzburg, J. (1999)** Identification and characterization of potential effector molecules of the Ras-related GTPase Rap2. *J Biol Chem*, 274, 8737-8745.

- Nassar, N., Hoffman, G.R., Manor, D., Clardy, J.C. and Cerione, R.A. (1998)** Structures of Cdc42 bound to the active and catalytically compromised forms of Cdc42GAP. *Nat Struct Biol*, 5, 1047-1052.
- Nassar, N., Horn, G., Herrmann, C., Block, C., Janknecht, R. and Wittinghofer, A. (1996)** Ras/Rap effector specificity determined by charge reversal [see comments]. *Nat Struct Biol*, 3, 723-729.
- Nassar, N., Horn, G., Herrmann, C., Scherer, A., McCormick, F. and 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.
- Navaza, J. (1994)** AMoRe: an automated package for molecular replacement. *Acta Crystallographica A*, 50, 157-163.
- Noda, M. (1993)** Structures and functions of the K rev-1 transformation suppressor gene and its relatives. *Biochim Biophys Acta*, 1155, 97-109.
- Ohba, Y., Mochizuki, N., Matsuo, K., Yamashita, S., Nakaya, M., Hashimoto, Y., Hamaguchi, M., Kurata, T., Nagashima, K. and Matsuda, M. (2000)** Rap2 as a slowly responding molecular Switch in the Rap1 signaling cascade. *Mol Cell Biol*, 20, 6074-6083.
- Ohmstede, C.A., Farrell, F.X., Reep, B.R., Clemetson, K.J. and Lapetina, E.G. (1990)** RAP2B: a RAS-related GTP-binding protein from platelets. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87, 6527-6531.
- Ohtsuka, T., Shimizu, K., Yamamori, B., Kuroda, S. and Takai, Y. (1996)** Activation of brain B-Raf protein kinase by Rap1B small GTP-binding protein. *J Biol Chem*, 271, 1258-1261.
- Oliff, A. (1999)** Farnesyltransferase inhibitors: targeting the molecular basis of cancer. *Biochim Biophys Acta*, 1423, C19-30.
- Ooi, C.E., Dell'Angelica, E.C. and Bonifacino, J.S. (1998)** ADP-Ribosylation factor 1 (ARF1) regulates recruitment of the AP-3 adaptor complex to membranes. *J Cell Biol*, 142, 391-402.
- Ostermeier, C. and Brunger, A.T. (1999)** Structural basis of Rab effector specificity: crystal structure of the small G protein Rab3A complexed with the effector domain of rabphilin-3A. *Cell*, 96, 363-374.
- Otwinowski, Z. (1993)** Oscillation data reduction program. In Sawyer, L., Isaacs, N. and Bailey, S. (eds). *CCP4 Study Weekend: Data Collection and Processing*. Daresbury Laboratory, Warrington, UK, 56-62.

- Pai, E.F., Krengel, U., Petsko, G.A., Goody, R.S., Kabsch, W. and 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 J*, 9, 2351-2359.
- Paris, S., Beraud-Dufour, S., Robineau, S., Bigay, J., Antonny, B., Chabre, M. and Chardin, P. (1997)** Role of protein-phospholipid interactions in the activation of ARF1 by the guanine nucleotide exchange factor Arno. *J Biol Chem*, 272, 22221-22226.
- Pearse, B.M. and Robinson, M.S. (1990)** Clathrin, adaptors, and sorting. *Annu Rev Cell Biol*, 6, 151-171.
- Peters, P.J., Hsu, V.W., Ooi, C.E., Finazzi, D., Teal, S.B., Oorschot, V., Donaldson, J.G. and Klausner, R.D. (1995)** Overexpression of wild-type and mutant ARF1 and ARF6: distinct perturbations of nonoverlapping membrane compartments. *J Cell Biol*, 128, 1003-1017.
- Pizon, V., Chardin, P., Lerosey, I., Olofsson, B. and Tavitian, A. (1988)** Human cDNAs rap1 and rap2 homologous to the *Drosophila* gene *Dras3* encode proteins closely related to ras in the 'effector' region. *Oncogene*, 3, 201-204.
- Pizon, V., Desjardins, M., Bucci, C., Parton, R.G. and Zerial, M. (1994)** Association of Rap1a and Rap1b proteins with late endocytic/phagocytic compartments and Rap2a with the Golgi complex. *J Cell Sci*, 107, 1661-1670.
- Polekhina, G., Thirup, S., Kjeldgaard, M., Nissen, P., Lippmann, C. and Nyborg, J. (1996)** Helix unwinding in the effector region of elongation factor EF-Tu-GDP. *Structure*, 4, 1141-1151.
- Premont, R.T., Claing, A., Vitale, N., Freeman, J.L., Pitcher, J.A., Patton, W.A., Moss, J., Vaughan, M. and Lefkowitz, R.J. (1998)** beta2-Adrenergic receptor regulation by GIT1, a G protein-coupled receptor kinase-associated ADP ribosylation factor GTPase-activating protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95, 14082-14087.
- Price, S.R., Welsh, C.F., Haun, R.S., Stanley, S.J., Moss, J., and Vaughan, M. (1992)** Effects of phospholipid and GTP on recombinant ADP-ribosylation factors (ARFs), *J Biol Chem*, 267, 17766-17772.
- Quilliam, L.A., Khosravi-Far, R., Huff, S.Y. and Der, C.J. (1995)** Guanine nucleotide exchange factors: activators of the Ras superfamily of proteins. *Bioessays*, 17, 395-404.

- Quinn, M.T., Mullen, M.L., Jesaitis, A.J. and Linner, J.G. (1992)** Subcellular distribution of the Rap1A protein in human neutrophils: colocalization and cotranslocation with cytochrome b559. *Blood*, 79, 1563-1573.
- Radhakrishna, H., Al-Awar, O., Khachikian, Z. and Donaldson, J.G. (1999)** ARF6 requirement for Rac ruffling suggests a role for membrane trafficking in cortical actin rearrangements. *J Cell Sci*, 112, 855-866.
- Radhakrishna, H. and Donaldson, J.G. (1997)** ADP-ribosylation factor 6 regulates a novel plasma membrane recycling pathway. *J Cell Biol*, 139, 49-61.
- Radhakrishna, H., Klausner, R.D. and Donaldson, J.G. (1996)** Aluminum fluoride stimulates surface protrusions in cells overexpressing the ARF6 GTPase. *J Cell Biol*, 134, 935-947.
- Randazzo, P.A., Andrade, J., Miura, K., Brown, M.T., Long, Y.Q., Stauffer, S., Roller, P. and Cooper, J.A. (2000)** The Arf GTPase-activating protein ASAP1 regulates the actin cytoskeleton [see comments]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97, 4011-4016.
- Reuther, G.W. and Der, C.J. (2000)** The Ras branch of small GTPases: Ras family members don't fall far from the tree. *Curr Opin Cell Biol*, 12, 157-165.
- Rittinger, K., Walker, P.A., Eccleston, J.F., Nurmahomed, K., Owen, D., Laue, E., Gamblin, S.J. and 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. and Gamblin, S.J. (1997b)** Structure at 1.65 Å of RhoA and its GTPase-activating protein in complex with a transition-state analogue [see comments]. *Nature*, 389, 758-762.
- Rodriguez-Viciano, P., Warne, P.H., Dhand, R., Vanhaesebroeck, B., Gout, I., Fry, M.J., Waterfield, M.D. and Downward, J. (1994)** Phosphatidylinositol-3-OH kinase as a direct target of Ras [see comments]. *Nature*, 370, 527-532.
- Rodriguez-Viciano, P., Warne, P.H., Vanhaesebroeck, B., Waterfield, M.D. and Downward, J. (1996)** Activation of phosphoinositide 3-kinase by interaction with Ras and by point mutation. *Embo J*, 15, 2442-2451.
- Roth, M.G. (1999)** Lipid regulators of membrane traffic through the Golgi complex. *Trends Cell Biol*, 9, 174-179.
- Roussel, A., Inisan, A. and C., C.** TURBO. AFMB and BioGraphics, Marseille, France.
- Saraste, M., Sibbald, P.R. and Wittinghofer, A. (1990)** The P-loop - a common motif in ATP- and GTP-binding proteins. *Trends Biochem Sci*, 15, 430-434.
- Scheffzek, K., Ahmadian, M.R., Kabsch, W., Wiesmuller, L., Lautwein, A., Schmitz, F. and Wittinghofer, A. (1997)** The Ras-RasGAP complex: structural basis for

- GTPase activation and its loss in oncogenic Ras mutants [see comments]. *Science*, 277, 333-338.
- Scheidig, A.J., Burmester, C., Goody, R.S. (1999)** The pre-hydrolysis state of P21ras in complex with GTP : new insights into the role of water molecule in the GTP hydrolysis reaction of ras-like proteins. *Structure*, 7, 1311-1324.
- Schekman, R. and Orci, L. (1996)** Coat proteins and vesicle budding. *Science*, 271, 1526-1533.
- Schurmann, A., Massmann, S. and Joost, H.G. (1995)** ARP is a plasma membrane-associated Ras-related GTPase with remote similarity to the family of ADP-ribosylation factors. *J Biol Chem*, 270, 30657-30663.
- Schurmann, A., Schmidt, M., Asmus, M., Bayer, S., Fliegert, F., Kolling, S., Massmann, S., Schilf, C., Subauste, M.C., Voss, M., Jakobs, K.H. and Joost, H.G. (1999)** The ADP-ribosylation factor (ARF)-related GTPase ARF-related protein binds to the ARF-specific guanine nucleotide exchange factor cytohesin and inhibits the ARF-dependent activation of phospholipase D. *J Biol Chem*, 274, 9744-9751.
- Seeburg, P.H., Colby, W.W., Capon, D.J., Goeddel, D.V. and Levinson, A.D. (1984)** Biological properties of human c-Ha-ras1 genes mutated at codon 12. *Nature*, 312, 71-75.
- Serafini, T., Orci, L., Amherdt, M., Brunner, M., Kahn, R.A. and Rothman, J.E. (1991)** ADP-ribosylation factor is a subunit of the coat of Golgi-derived COP-coated vesicles: a novel role for a GTP-binding protein. *Cell*, 67, 239-253.
- Serebriiskii, I., Estojak, J., Sonoda, G., Testa, J.R. and Golemis, E.A. (1997)** Association of Krev-1/rap1a with Krit1, a novel ankyrin repeat-containing protein encoded by a gene mapping to 7q21-22. *Oncogene*, 15, 1043-1049.
- Shao, H. and Andres, D.A. (2000)** A novel RalGEF-like protein, RGL3, as a candidate effector for rit and Ras. *J Biol Chem*, 275, 26914-26924.
- Shao, H., Kadono-Okuda, K., Finlin, B.S. and Andres, D.A. (1999)** Biochemical characterization of the Ras-related GTPases Rit and Rin. *Arch Biochem Biophys*, 371, 207-219.
- Sharer, J.D. and Kahn, R.A. (1999)** The ARF-like 2 (ARL2)-binding protein, BART. Purification, cloning, and initial characterization. *J Biol Chem*, 274, 27553-27561.
- Shimizu, T., Ihara, K., Maesaki, R., Kuroda, S., Kaibuchi, K. and Hakoshima, T. (2000)** An open conformation of Switch I revealed by the crystal structure of a Mg²⁺-free form of RHOA complexed with GDP. Implications for the GDP/GTP exchange mechanism. *J Biol Chem*, 275, 18311-18317.

- Shin, O.H., Ross, A.H., Mihai, I. and Exton, J.H. (1999)** Identification of arfophilin, a target protein for GTP-bound class II ADP-ribosylation factors. *J Biol Chem*, 274, 36609-36615.
- Shirouzu, M., Fujita-Yoshigaki, J., Ito, Y., Koide, H., Nishimura, S. and Yokoyama, S. (1992)** A glutamic acid residue at position 31 of Ras protein is essential to the signal transduction for neurite outgrowth of PC12 cells and the stimulation of GTPase activity by GAPRas. *Oncogene*, 7, 475-480.
- Simon, I., Zerial, M. and Goody, R.S. (1996)** Kinetics of interaction of Rab5 and Rab7 with nucleotides and magnesium ions. *J Biol Chem*, 271, 20470-20478.
- Spaargaren, M. and Bischoff, J.R. (1994)** Identification of the guanine nucleotide dissociation stimulator for Ral as a putative effector molecule of R-ras, H-ras, K-ras, and Rap. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91, 12609-12613.
- Springer, S., Spang, A. and Schekman, R. (1999)** A primer on vesicle budding. *Cell*, 97, 145-148.
- Stamnes, M.A. and Rothman, J.E. (1993)** The binding of AP-1 clathrin adaptor particles to Golgi membranes requires ADP-ribosylation factor, a small GTP-binding protein. *Cell*, 73, 999-1005.
- Stearns, T., Kahn, R.A., Botstein, D. and Hoyt, M.A. (1990a)** ADP ribosylation factor is an essential protein in *Saccharomyces cerevisiae* and is encoded by two genes. *Mol Cell Biol*, 10, 6690-6699.
- Stearns, T., Willingham, M.C., Botstein, D. and Kahn, R.A. (1990b)** ADP-ribosylation factor is functionally and physically associated with the Golgi complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87, 1238-1242.
- Stewart, M., Kent, H.M. and McCoy, A.J. (1998)** The structure of the Q69L mutant of GDP-Ran shows a major conformational change in the Switch II loop that accounts for its failure to bind nuclear transport factor 2 (NTF2). *J Mol Biol*, 284, 1517-1527.
- Szafer, E., Pick, E., Rotman, M., Zuck, S., Huber, I. and Cassel, D. (2000)** Role of coatamer and phospholipids in GTPase-activating protein-dependent hydrolysis of GTP by ADP-ribosylation factor-1. *J Biol Chem*, 275, 23615-23619.
- Takeya, R., Takeshige, K. and Sumimoto, H. (2000)** Interaction of the PDZ domain of human PICK1 with class I ADP-ribosylation factors. *Biochem Biophys Res Commun*, 267, 149-155.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G. and Gibson, T.J. (1994)** CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting,

- position specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, 22,4673-4680.
- Toker, A. (1998)** The synthesis and cellular roles of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *Curr Opin Cell Biol*, 10, 254-261.
- Torti, M., Bertoni, A., Canobbio, I., Sinigaglia, F., Lapetina, E.G. and Balduini, C. (1999)** Interaction of the low-molecular-weight GTP-binding protein rap2 with the platelet cytoskeleton is mediated by direct binding to the actin filaments. *J Cell Biochem*, 75, 675-685.
- Traub, L.M., Ostrom, J.A. and Kornfeld, S. (1993)** Biochemical dissection of AP-1 recruitment onto Golgi membranes. *J Cell Biol*, 123, 561-573.
- Traver, S., Bidot, C., Spassky, N., Baltauss, T., De Tand, M.F., Thomas, J.L., Zalc, B., Janoueix-Lerosey, I. and Gunzburg, J.D. (2000)** RGS14 is a novel Rap effector that preferentially regulates the GTPase activity of Galphao. *Biochem J*, 350, 19-29.
- Tsai, S.C., Adamik, R., Haun, R.S., Moss, J. and Vaughan, M. (1992)** Differential interaction of ADP-ribosylation factors 1, 3, and 5 with rat brain Golgi membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89, 9272-9276.
- Tsuchiya, M., Price, S.R., Tsai, S.C., Moss, J. and Vaughan, M. (1991)** Molecular identification of ADP-ribosylation factor mRNAs and their expression in mammalian cells. *J Biol Chem*, 266, 2772-2777.
- Turner, C.E., Brown, M.C., Perrotta, J.A., Riedy, M.C., Nikolopoulos, S.N., McDonald, A.R., Bagrodia, S., Thomas, S. and Leventhal, P.S. (1999)** Paxillin LD4 motif binds PAK and PIX through a novel 95-kD ankyrin repeat, ARF-GAP protein: A role in cytoskeletal remodeling. *J Cell Biol*, 145, 851-863.
- Umanoff, H., Edelmann, W., Pellicer, A. and Kucherlapati, R. (1995)** The murine N-ras gene is not essential for growth and development. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92, 1709-1713.
- Urano, T., Emkey, R. and Feig, L.A. (1996)** Ral-GTPases mediate a distinct downstream signaling pathway from Ras that facilitates cellular transformation. *Embo J*, 15, 810-816.
- Van Aelst, L. and D'Souza-Schorey, C. (1997)** Rho GTPases and signaling networks. *Genes Dev*, 11, 2295-2322.
- van den Berghe, N., Cool, R.H., Horn, G. and Wittinghofer, A. (1997)** Biochemical characterization of C3G: an exchange factor that discriminates between Rap1 and Rap2 and is not inhibited by Rap1A(S17N). *Oncogene*, 15, 845-850.

- Venkateswarlu, K. and Cullen, P.J. (2000)** Signalling via ADP-ribosylation factor 6 lies downstream of phosphatidylinositide 3-kinase. *Biochem J*, 345 Pt 3, 719-724.
- Vetter, I.R., Arndt, A., Kutay, U., Gorlich, D. and Wittinghofer, A. (1999a)** Structural view of the Ran-Importin beta interaction at 2.3 Å resolution. *Cell*, 97, 635-646.
- Vetter, I.R., Nowak, C., Nishimoto, T., Kuhlmann, J. and Wittinghofer, A. (1999b)** Structure of a Ran-binding domain complexed with Ran bound to a GTP analogue: implications for nuclear transport. *Nature*, 398, 39-46.
- Vitale, N., Moss, J. and Vaughan, M. (1998)** Molecular characterization of the GTPase-activating domain of ADP-ribosylation factor domain protein 1 (ARD1). *J Biol Chem*, 273, 2553-2560.
- Vitale, N., Patton, W.A., Moss, J., Vaughan, M., Lefkowitz, R.J. and Premont, R.T. (2000)** GIT proteins, A novel family of phosphatidylinositol 3,4, 5-trisphosphate-stimulated GTPase-activating proteins for ARF6. *J Biol Chem*, 275, 13901-13906.
- Wang, B., Zou, J.X., Ek-Rylander, B. and Ruoslahti, E. (2000)** R-Ras contains a proline-rich site that binds to SH3 domains and is required for integrin activation by R-Ras. *J Biol Chem*, 275, 5222-5227.
- Wang, H.G., Millan, J.A., Cox, A.D., Der, C.J., Rapp, U.R., Beck, T., Zha, H. and Reed, J.C. (1995)** R-Ras promotes apoptosis caused by growth factor deprivation via a Bcl-2 suppressible mechanism. *J Cell Biol*, 129, 1103-1114.
- Wang, K.L., Khan, M.T. and Roufogalis, B.D. (1997)** Identification and characterization of a calmodulin-binding domain in Ral-A, a Ras-related GTP-binding protein purified from human erythrocyte membrane. *J Biol Chem*, 272, 16002-16009.
- Wei, Y., Zhang, Y., Derewenda, U., Liu, X., Minor, W., Nakamoto, R.K., Somlyo, A.V., Somlyo, A.P. and Derewenda, Z.S. (1997)** Crystal structure of RhoA-GDP and its functional implications [letter]. *Nat Struct Biol*, 4, 699-703.
- Welsh, C.F., Moss, J., and Vaughan, M. (1994)**, Isolation of recombinant ADP-ribosylation factor 6, a 20kDa Guanine Nucleotide-binding Protein, in an activated GTP-bound state, *J Biol Chem*, 269, 15583-15587.
- Whitney, J.A., Gomez, M., Sheff, D., Kreis, T.E. and Mellman, I. (1995)** Cytoplasmic coat proteins involved in endosome function [see comments]. *Cell*, 83, 703-713.
- Wolthuis, R.M., Bauer, B., van't Veer, L.J., de Vries-Smits, A.M., Cool, R.H., Spaargaren, M., Wittinghofer, A., Burgering, B.M. and Bos, J.L. (1996)** RalGDS-like factor (Rlf) is a novel Ras and Rap 1A-associating protein. *Oncogene*, 13, 353-362.

- Wolthuis, R.M. and Bos, J.L. (1999)** Ras caught in another affair: the exchange factors for Ral. *Curr Opin Genet Dev*, 9, 112-117.
- Yamagata, K., Sanders, L.K., Kaufmann, W.E., Yee, W., Barnes, C.A., Nathans, D. and Worley, P.F. (1994)** rheb, a growth factor- and synaptic activity-regulated gene, encodes a novel Ras-related protein. *J Biol Chem*, 269, 16333-16339.
- Yang, C.Z., Heimberg, H., D'Souza-Schorey, C., Mueckler, M.M. and Stahl, P.D. (1998)** Subcellular distribution and differential expression of endogenous ADP-ribosylation factor 6 in mammalian cells. *J Biol Chem*, 273, 4006-4011.
- Yang, C.Z. and Mueckler, M. (1999)** ADP-ribosylation factor 6 (ARF6) defines two insulin-regulated secretory pathways in adipocytes. *J Biol Chem*, 274, 25297-25300.
- Yee, W.M. and Worley, P.F. (1997)** Rheb interacts with Raf-1 kinase and may function to integrate growth factor- and protein kinase A-dependent signals. *Mol Cell Biol*, 17, 921-933.
- Zhang, Q., Cox, D., Tseng, C.C., Donaldson, J.G. and Greenberg, S. (1998)** A requirement for ARF6 in Fcγ receptor-mediated phagocytosis in macrophages. *J Biol Chem*, 273, 19977-19981.
- Zhang, Z., Vuori, K., Wang, H., Reed, J.C. and Ruoslahti, E. (1996)** Integrin activation by R-ras. *Cell*, 85, 61-69.
- Zhao, L., Helms, J.B., Brugger, B., Harter, C., Martoglio, B., Graf, R., Brunner, J. and Wieland, F.T. (1997)** Direct and GTP-dependent interaction of ADP ribosylation factor 1 with coatamer subunit beta. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94, 4418-4423.
- Zhao, L., Helms, J.B., Brunner, J. and Wieland, F.T. (1999)** GTP-dependent binding of ADP-ribosylation factor to coatamer in close proximity to the binding site for dilysine retrieval motifs and p23. *J Biol Chem*, 274, 14198-14203.
- Zwartkruis, F.J. and Bos, J.L. (1999)** Ras and Rap1: two highly related small GTPases with distinct function. *Exp Cell Res*, 253, 157-165.
- Zwartkruis, F.J., Wolthuis, R.M., Nabben, N.M., Franke, B. and Bos, J.L. (1998)** Extracellular signal-regulated activation of Rap1 fails to interfere in Ras effector signalling. *Embo J*, 17, 5905-5912.

Résumé

Les petites protéines G sont des protéines capables de fixer du GDP ou du GTP, ce qui va induire des changements de conformation au sein de la protéine qui lui permettront d'interagir avec des partenaires cellulaires distincts, et ainsi de jouer un rôle "d'interrupteur moléculaire". Le cycle GDP/GTP des petites protéines G ne fonctionne pas seul, il est régulé par un facteur d'échange GDP/GTP (GEF) et une protéine activatrice de la GTPase (GAP). Les petites protéines G sont impliquées dans des processus cellulaires fondamentaux et divers, comme la différenciation et la prolifération cellulaire, l'organisation et la dynamique du cytosquelette, et les transports intracellulaires. Un certain nombre de structures de petite protéine G sont maintenant connues, et ont permis de définir le repliement général des petites protéines G et les changements de conformation au cours du cycle GDP/GTP. Le premier projet porte sur l'étude structurale par diffraction des rayons X de la petite protéine G Rap2A, homologue de l'oncogène Ras dans un complexe non catalytique avec le GTP. Cette étude a permis de mettre en évidence la présence d'une nouvelle interaction au niveau du site nucléotidique entre la tyrosine 32 et le phosphate gamma du GTP. Et, nous avons montré que les changements de conformation de Rap2A au cours de son cycle GDP/GTP sont caractérisés par deux transitions désordre/ordre. Le second projet porte sur l'étude structurale par diffraction des rayons X de la petite protéine G Arf6 en complexe avec du GDP. Cette étude a montré que deux protéines qui possèdent une forte homologie de séquence peuvent avoir des structures assez différentes pour être distinguées. Les principaux partenaires des formes GDP des petites protéines G sont les GEF, ce qui suggère une base structurale pour la spécificité des GEF. En conclusion, nous discutons des bases structurales qui permettent aux petites protéines G d'être distinguées les unes des autres.

Mots clés : Petite protéine G, Structure tridimensionnelle, Rap2A, Arf6, Plasticité structurale, Flexibilité, Spécificité des facteurs d'échange GDP/GTP.

Abstract

Small G proteins are able to bind GDP or GTP in different conformations. The conformational changes between GDP-form and GTP-form allow small G proteins to bind different cellular partners and to play the role of a molecular switch in the cell. The GDP/GTP cycle of small G proteins doesn't work without Guanine nucleotide Exchange Factors (GEF) which exchange GDP for GTP and Guanine Activating Proteins (GAP) which hydrolyze GTP to GDP. Small G proteins are regulator of important cellular functions as cellular differentiation and growth, cytoskeleton dynamic and organization, and intracellular transports. Many small G protein structures are now resolved and allow to define general folding and conformational changes of these proteins. As a first project, we have resolved the structure of Rap2A, an oncogene Ras homologue in a non-catalytic complex with its natural ligand the GTP. This study shows a new interaction in nucleotide binding site between tyrosine 32 and the gamma phosphate of GTP. Moreover, we discuss the definition of flexible regions and their hinges for this structure and in the light of expanding database of small G protein structures. In other project, we have resolved the structure of Arf6 in complex with GDP. This study provide a structural basis to understand how Arf6 and Arf1, which share high sequence homology could be distinguished by their Guanine nucleotide Exchange Factor. Moreover, we have observed that one sequence difference between Arf1 (Ile42) and Arf6 (Ser38) outside the nucleotide binding site affects its configuration and the nucleotide binding properties. To conclude, we discuss the structural basis that could explain how small G proteins which share high sequence homology could be distinguished by partners.

Keywords : small G protein, Tridimensional structure, Rap2A, Arf6, Structural plasticity, Flexibility, Guanine nucleotide Exchange Factor specificity.