

Białka oddziałujące z kwasami nukleinowymi

Prof. dr hab. Jacek Otlewski, Instytut Biochemii i Biologii Molekularnej Uniwersytetu Wrocławskiego, Wrocław

Od wczesnych lat 90. kieruję na Uniwersytecie Wrocławskim grupą młodych badaczy. Zespół nasz zaczął formować się około 15 lat temu i liczył początkowo kilka osób, a z czasem rozrósł się do grupy około 20 badaczy, w tym 11 doktorantów. Prowadzone przez nas badania dotyczyły zawsze zagadnień związanych ze strukturą i funkcją białek. Początkowo prowadziliśmy głównie badania biochemiczne, z czasem wprowadziliśmy liczne pomiary fizykochemiczne, metody biologii molekularnej, a w ostatnich latach także badania strukturalne metodami krystalografii i jądrowego rezonansu magnetycznego. Badania nasze obejmowały szereg podstawowych aspektów, takich jak stabilność białek, mechanizm ich zwijania oraz specyficznego rozpoznania. Właśnie kompleksy typu białko-białko były i są nadal wiodącym tematem badawczym w prowadzonym przeze mnie zespole. W pierwszej części mojego wystąpienia chciałbym uzasadnić, dlaczego badania strukturalne i fizykochemiczne kompleksów białkowych są kluczowe dla zrozumienia procesów molekularnych przebiegających w żywej komórce.

Wprowadzenie

Sekwencjonowanie genomów licznych organizmów, w tym genomu człowieka, dostarczyło długiej listy genów kodujących białka. Dla osoby przypatrującej się rozwojowi biologii z zewnątrz mogłoby się wydawać, że ustalenie katalogu makrocząsteczek budujących komórkę otwiera prostą drogę do zrozumienia funkcjonowania komórki czy nawet organizmu. Tak jednak nie jest. Sekwencje genomów dają nam stosunkowo mało informacji o funkcjach, jakie pełnią te makrocząsteczki. Składa się na to kilka przyczyn. Wprawdzie sekwencje genomowe w prosty sposób można przełożyć na sekwencje aminokwasowe, z których zbudowane są białka, ale ciągle nie dostarczają one informacji o strukturze trójwymiarowej makrocząsteczek. Tymczasem kluczem do zrozumienia funkcji białek jest właśnie poznanie ich struktury przestrzennej. Przypuszcza się powszechnie, że z pomocą w modelowaniu struktur białek w oparciu o ich sekwencje aminokwasowe mogą przyjść metody bioinformatyczne. W metodach tych dokonuje się ciągle

postęp, jednak by poznać strukturę makrocząsteczek z pewnością przez długi jeszcze czas będziemy musieli opierać się na żmudnych, drogich i zaawansowanych technikach, takich jak krystalografia czy magnetyczny rezonans jądrowy. Obecnie dostępna lista struktur przestrzennych białek jest wysoce niekompletna, w szczególności dlatego, że pokaźna część białek funkcjonuje w stanie związanym z błoną biologiczną. Poznanie struktury tej ważnej grupy białek jest niezwykle trudne. Białka podlegają także znacznej liczbie modyfikacji chemicznych, zachodzących już po skończeniu procesu ich syntezy, takich jak przyłączenie grupy fosforanowej, proteoliza wiązań peptydowych czy glikozylacja. Przypuszcza się, że przeciętne białko ludzkie może istnieć przynajmniej w kilkunastu chemicznie odmiennych formach. Modyfikacje takie są kluczowe, gdyż mogą zasadniczo zmieniać własności strukturalne i funkcjonalne białek. Co również istotne z punktu widzenia tematu wykładu, w żywej komórce najczęściej funkcjonalne są nie wolne cząsteczki białek, ale złożone kompleksy zbudowane z kilku, kilkunastu czy nawet kilkudziesięciu makrocząsteczek. Tak duże ugrupowania makrocząsteczek nie są stabilne w czasie i po spełnieniu funkcji poszczególne ich składniki mogą ulec dysocjacji. Przykładami wyjątkowo skomplikowanych kompleksów białkowych są: por jądrowy o masie 50 do 100 milionów daltonów, który reguluje i kontroluje transport makrocząsteczek między cytoplazmą a wnętrzem jądra komórki; polimeraza RNA, rybosom, w którym zachodzi biosynteza białek, czy syntaza katalizująca tworzenie ATP. Powstawanie kompleksów białkowych zachodzi zwykle ze znaczną specyficznością, natomiast sama energia oddziaływania białek może być bardzo zróżnicowana. Energię taką zwykle mierzy się obserwując przy jak niskich stężeniach białek może tworzyć się kompleks. Im stężenia umożliwiające powstawanie kompleksu są niższe, tym energia stabilizująca kompleks jest silniejsza.

Oddziaływanie białko-białko jest korzystne, gdy kontaktujące się powierzchnie cechuje wysoki poziom komplementarności kształtu. Komplementarność dotyczy także rejonów polarnych, hydrofobowych i naładowanych elektrycznie oddziałujących białek. Powstały kompleks białko-białko stabilizowany jest dzięki temu znaczną liczbą wiązań wodorowych, van der Waalsa i oddziaływań elektrostatycznych. Dodatkowo, w kompleksie znaczna część powierzchni hydrofobowej oddziałujących białek zostaje przesłonięta od cząsteczek rozpuszczalnika, co także jest źródłem znacznej stabilizacji oddziaływań białko-białko. Zrozumienie, które z tych oddziaływań stabilizują kompleks, a które wywierają efekt przeciwny, nie jest proste. Zwykle nawet

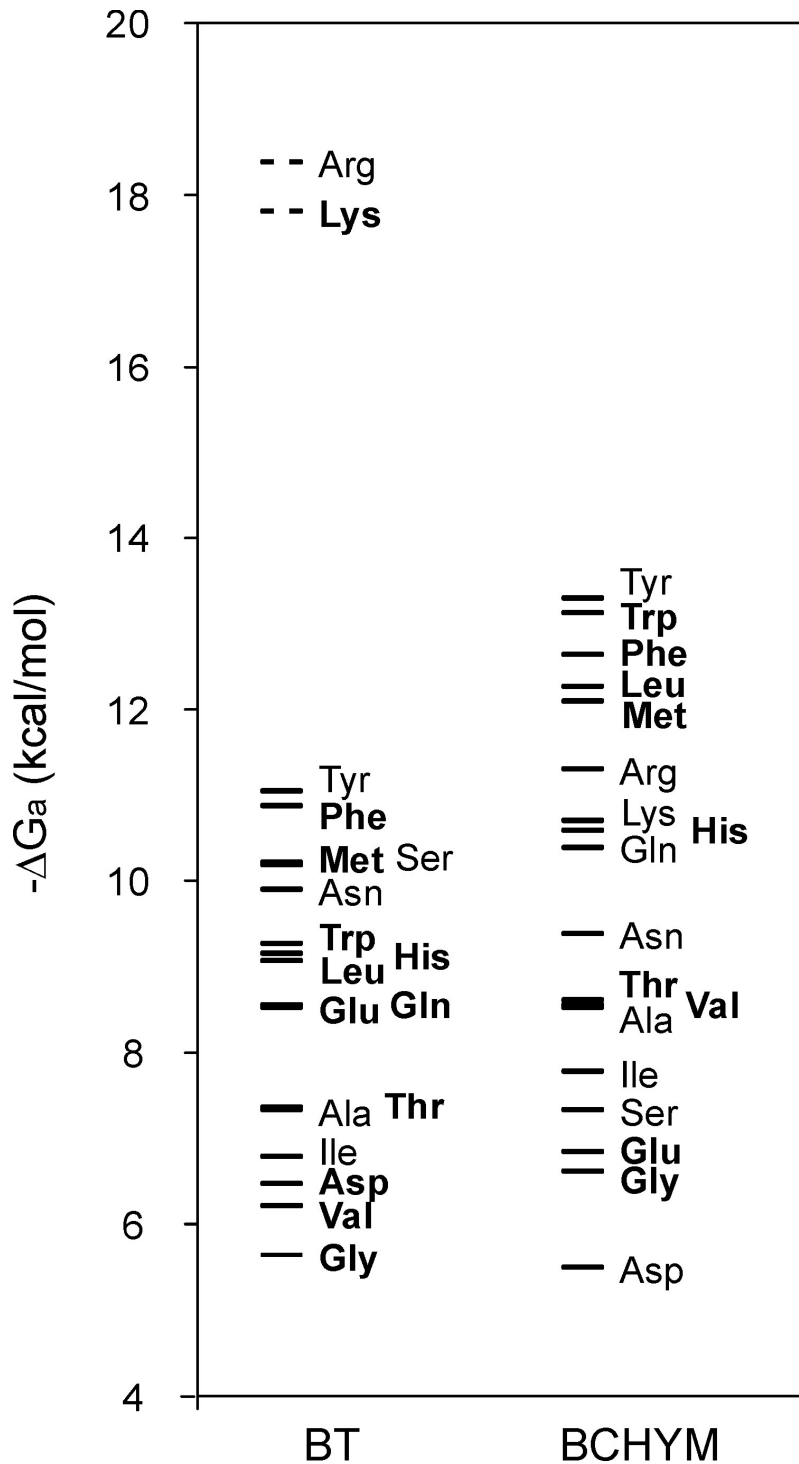
dostępność struktur przestrzennych kompleksu i wolnych składników nie tłumaczy w pełni tendencji określonych par białek do utworzenia oddziaływania. Podobnie trudne jest modelowanie oddziaływań białko-białko z użyciem zaawansowanych programów obliczeniowych i graficznych.

Białka oddziałują między sobą poprzez wytworzenie siatki oddziaływań obejmujących zwykle 15 do 20 reszt aminokwasowych położonych na powierzchni, które w utworzonym kompleksie kontaktują się z powierzchniowym aminokwasami oddziałującego partnera białkowego. Rola, jaką pełnią poszczególne aminokwasy w stabilizacji kompleksu jest bardzo zróżnicowana. Najczęściej nie więcej niż dwie-trzy reszty aminokwasowe, położone w centralnym rejonie kontaktujących się powierzchni, wytwarzają zasadnicze oddziaływania i pełnią rolę tzw. miejsc gorących oddziaływania białko-białko. Pozostałe, zwykle umieszczone na peryferiach kontaktujących się powierzchni, tylko w znikomym stopniu stabilizują kompleks. Ustalenie, które z kontaktujących się aminokwasów pełnią rolę miejsc gorących odbywa się zwykle poprzez wprowadzanie pojedynczych mutacji w rejon kontaktu jednego z białek. Porównanie stopnia destabilizacji kompleksu wywołanego poszczególnymi mutacjami pozwala zidentyfikować miejsce gorące. Problem miejsc gorących oddziaływania białko-białko zilustruję poniżej na przykładzie białkowych inhibitorów proteaz serynowych.

Wpływ pozycji P1 inhibitora BPTI na energetykę oddziaływania z proteazami

Inhibitory proteaz serynowych są małymi białkami, które hamują proteazy poprzez utworzenie wysoce stabilnych kompleksów białkowych. W strukturze typowego kompleksu proteaza-inhibitor wypukła pętla wiążąca proteazę oddziałuje z wklęsłym rejonem centrum aktywnego enzymu. Nasze zainteresowania dotyczyły w szczególności zasadowego trzustkowego inhibitora trypsyny, powszechnie znanego pod skrótem BPTI. Mimo że w tworzeniu kompleksu z proteazą uczestniczy ogółem około 15 reszt aminokwasowych inhibitora, tylko jeden aminokwas, zajmujący tzw. pozycję P1, pełni rolę dominującą, określoną wcześniej jako miejsce gorące. Pozycja ta jest silnie eksponowana do rozpuszczalnika i położona w centralnej części pętli wiążącej proteazę. W kompleksie z enzymem tworzy ona szereg oddziaływań w obrębie kieszeni S1 enzymu, która w zasadniczym stopniu określa specyficzność proteazy. W zależności od aminokwasu wprowadzonego w pozycję P1 stała asocjacji z proteazami może wahać się w granicach 5 (oddziaływanie z chymotrypsyną) lub

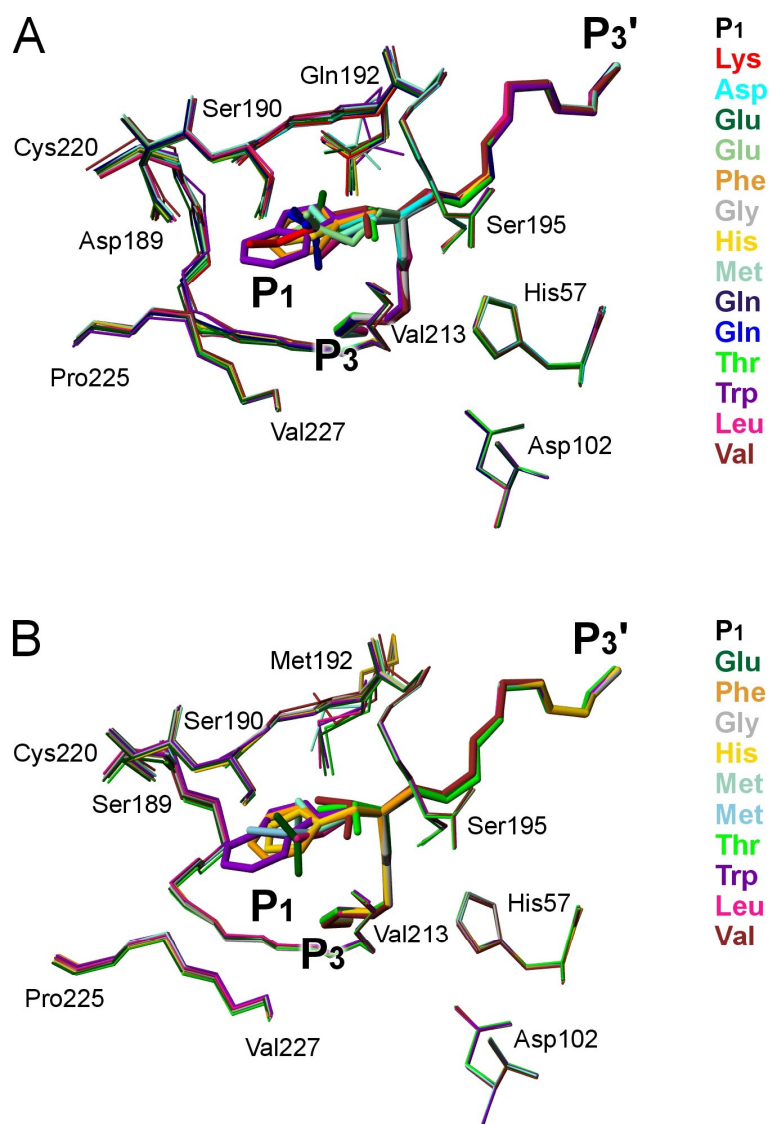
nawet 9 rzędów wielkości (oddziaływanie z trypsyną) (Rys. 1). Oznacza to, że usunięcie optymalnego aminokwasu w pozycji P1 może spowodować utratę nawet 75% energii oddziaływania z enzymem. Jakie są tego przyczyny?



Rys. 1. Energie asocjacji zmierzone dla oddziaływania mutantów BPTI podstawionych w pozycji P1 z proteazami bydłecyimi - trypsyną i chymotrypsyną.

Współpracując z grupą prof. A. Smalasa na Uniwersytecie Tromso w Norwegii ustaliliśmy z wysoką rozdzielczością struktury krystaliczne 12 kompleksów mutantów

P1 inhibitora BPTI z trypsyną i 9 z chymotrypsyną (Rys. 2). Duży udział w pracach nad określeniem tych struktur miała dr Honorata Czapińska, która objęta była programem Subsydium. Otrzymała ona także stypendium młodego badacza Fundacji, a jej doktorat został wyróżniony przez recenzentów i zgłoszony do nagrody Premiera RP.



Rys. 2. Orientacja łańcuchów bocznych aminokwasów wprowadzonych w pozycję P1 dla kompleksów z trypsyną (A) i chymotrypsyną (B).

Połączenie danych strukturalnych z danymi o energetyce oddziaływania umożliwiło nam dogłębną interpretację uzyskanych danych, którą można podsumować następująco:

1. Zarówno w przypadku kompleksów mutantów BPTI z trypsyną, jak i chymotrypsyną brak jest zmian strukturalnych towarzyszących tworzeniu kompleksu, innych niż wynikające z oddziaływania reszty P1 z kieszenią S1. Tak więc ogromne efekty energetyczne wynikające z podstawień reszty P1 pochodzą całkowicie tylko z lokalnych oddziaływań w obrębie kieszeni S1 enzymu.
2. W przypadku trypsyny głównym źródłem specyficzności jest oddziaływanie elektrostatyczne pomiędzy Asp189 położonym na dnie kieszeni S1 a dodatnio naładowaną resztą Lys lub Arg pozycji P1 inhibitora. Drugim źródłem energii asocjacji jest przesłonięcie od cząsteczek rozpuszczalnika części hydrofobowej łańcucha bocznego tych aminokwasów. Porównując energie asocjacji mutantów Lys, Met i Gly mogliśmy oszacować wielkość obu tych efektów: para jonowa dostarcza około 7,5 kcal/mol, zaś efekt hydrofobowy około 4,6 kcal/mol. Wiązanie reszt aminokwasowych innych niż Lys i Arg zachodzi z dużo niższą energią asocjacji. Niemniej, reszty Phe, Trp i Leu oddziałują stosunkowo silnie z kieszenią S1 trypsyny. Warto nadmienić, że wiązaniu reszt hydrofobowych towarzyszy nieznaczne rozszerzenie kieszeni S1, co przypuszczalnie wynika z tendencji do unikania bliskich kontaktów z polarnymi ścianami tej kieszeni.
3. Z innych czynników strukturalnych towarzyszących oddziaływaniu P1-S1 w trypsynie należy wymienić: (i) zmiany w liczbie i dynamice cząsteczek wody obecnych w kieszeni S1, (ii) podwójne konformacje i nieoptymalne kąty torsyjne przyjmowane przez łańcuchy boczne niektórych aminokwasów P1, (iii) zmiany w dynamice ścian kieszeni, jak i łańcucha bocznego reszty P1, (iv) konflikty steryczne łańcuchów bocznych rozgałęzionych na węglu β . Z badanych przez nas 13 aminokwasów, tylko łańcuch boczny Lys charakteryzuje się optymalnym oddziaływaniem z kieszenią.
4. Oddziaływania mutantów BPTI z chymotrypsyną są mniej skomplikowane. Efekty energetyczne korelują z objętością (lub powierzchnią) łańcucha bocznego wprowadzanego w pozycję P1 aminokwasu. Efekt hydrofobowy jest więc główną siłą odpowiedzialną za reakcje asocjacji tych białek. Wiązaniu

optymalnych aminokwasów (Leu, Phe, Trp) towarzyszy kurczenie się kieszeni S1. Niekorzystne efekty energetyczne występują w przypadku aminokwasów ujemnie naładowanych i rozgałęzionych na węglu β . Reszty Lys i Arg wiążą się natomiast zdumiewająco dobrze, co wynika ze zgiętej konformacji ich łańcucha bocznego, umożliwiającej tworzenie wiązań wodorowych z grupami karbonylowymi u wejścia do kieszeni.

Zastosowanie metod ewolucji *in vitro* do otrzymania silnych wariantów inhibitora

Przedstawiona powyżej analiza strukturalna pozwoliła zrozumieć nam szereg przyczyn ogromnej destabilizacji kompleksu białko-białko wywołanej wprowadzaniem nieoptymalnych reszt aminokwasowych na powierzchnię kontaktu. Chciałbym teraz rozważyć, czy jest możliwe, aby otrzymać wariant inhibitora o znacznie zmienionych właściwościach w stosunku do inhibitora występującego w przyrodzie? Taką pożądaną właściwością byłoby silniejsze oddziaływanie z enzymem proteolitycznym, co mogłoby prowadzić do zastosowań terapeutycznych, gdyż niekontrolowana aktywność szeregu proteaz jest przyczyną wielu poważnych chorób.

Stosując metodę ukierunkowanej mutagenezy możemy stosunkowo łatwo otrzymać wariant białka o nieznacznie zmienionej sekwencji, a następnie zbadać jego właściwości. Z punktu widzenia naszych potrzeb, właściwości wariantu białka zawierającego pojedynczą mutację mogą być tylko do pewnego stopnia przewidywalne. Innymi słowy, otrzymanie jednego wariantu inhibitora zwykle nie zapewni nam sukcesu, jeżeli chodzi o znaczną zmianę zdolności hamowania proteazy. Jeżeli jednak otrzymamy większą liczbę wariantów i scharakteryzujemy je pod kątem interesujących nas właściwości hamujących proteazę, to jest spora szansa, że część z tych wariantów będzie wykazywać pożądaną właściwość. Wiąże się to jednak z każdorazowym oczyszczaniem i charakteryzowaniem wariantów białka. Następnie możemy wprowadzić korzystne mutacje jednocześnie i uzyskać mutant wielokrotny. Zwykle taki wariant charakteryzuje się znacznie korzystniejszymi właściwościami niż mutanty pojedyncze. W omawianym przypadku, inhibitor z wieloma wprowadzonymi mutacjami będzie zapewne silniej i specyficzniej hamował wybrane proteazy.

Jest też jednak i inne podejście, które umożliwia nam szybsze wygenerowanie w inhibitorze pożądaných właściwości. Opiera się ono o zastosowanie metod selekcji

biologicznej przeprowadzonej na dużej bibliotece sekwencji białkowych. Biblioteka taka to zbiór sekwencji liczący nawet miliony wariantów, które prezentowane są na powierzchni faga w taki sposób, że każda z cząstek faga przedstawia inną sekwencję białkową. Co istotne, białka prezentowane są w formie natywnej i pełni funkcjonalnej. Bibliotekę taką możemy otrzymać wykorzystując stosunkowo zaawansowane metody biologii molekularnej. Jeżeli bibliotekę taką poddać selekcji polegającej na wzbogacaniu jej na immobilizowanej proteazie, to stosując kilka rund takiej selekcji możemy uzyskać pulę fagów prezentującą warianty białka silnie oddziałujące z proteazą. Identyfikacja silnie wiążących wariantów jest prosta i odbywa się poprzez sekwencjonowanie fragmentu DNA faga zawierającego gen prezentowanego białka. Metoda ta, nazywana czasem ewolucją w probówce, umożliwia więc szybką selekcję ogromnej liczby kombinatorycznych wariantów sekwencji białka.

Metodę tą zastosowaliśmy w naszych badaniach wielokrotnie, między innymi właśnie do selekcji wariantów inhibitora BPTI silnie oddziałujących z wybranymi proteazami serynowymi. Nasza biblioteka zawierała 32 tysiące wariantów cechujących się alternatywnymi sekwencjami w rejonie pętli wiążącej proteazę. Selekcja tej biblioteki wobec dwóch proteaz trzustkowej chymotrypsyny i elastazy pozwoliła nam zidentyfikować warianty sekwencji inhibitora, które wzbogaciły się w czasie kolejnych rund postępowania. Warianty te posiadały od dwóch do czterech podstawień aminokwasowych w stosunku do oryginalnej sekwencji inhibitora BPTI.

Nadprodukowane w bakteriach i oczyszczone warianty wykazywały ogromny wzrost stałej asocjacji z proteazami. W przypadku wyselekcjonowanych wariantów inhibitora chymotrypsyny wzrost stałej asocjacji wynosił kilkaset razy, zaś w przypadku wariantów hamujących elastazę nawet blisko 10 milionów razy. Wszystkie warianty cechowały się prawidłowym zwinięciem łańcucha polipeptydowego i znaczną stabilnością.

Małe GTPazy oraz ich regulatory – białka GAP i GEF

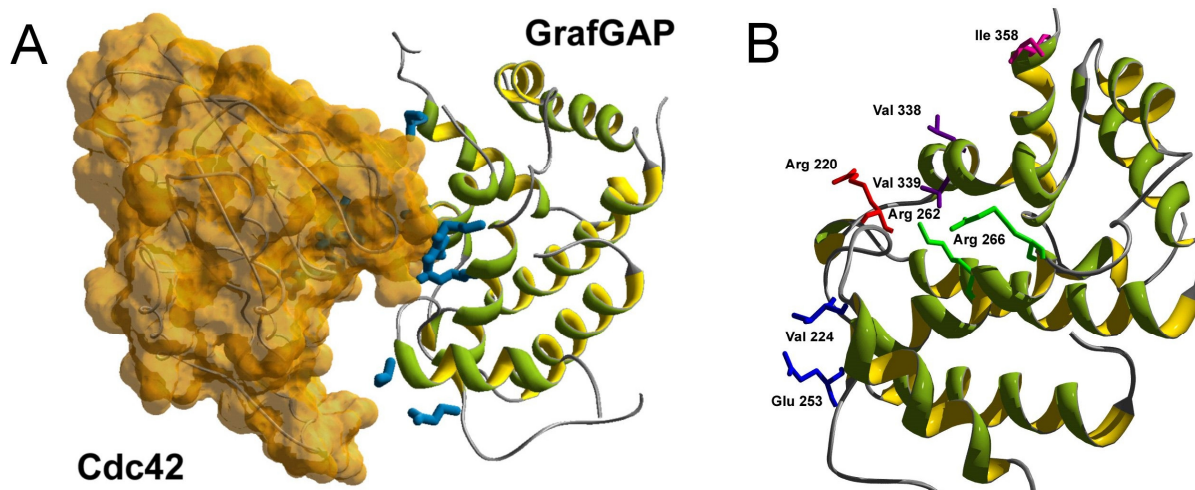
Chciałbym teraz przejść do innego wątku naszych badań nad oddziaływaniami białko-białko. Dotyczy on GTPaz z rodziny Rho, które są ważną grupą białek regulujących szkielet komórki. GTPazy te bardzo wolno hydrolizują GTP do GDP, a formy tych białek związane z GTP i GDP definiują odpowiednio ich stan funkcjonalnie aktywny i nieaktywny. Wiązaniu i hydrolizie GTP towarzyszą znaczne

zmiany konformacyjne w dwóch rejonach, które odpowiadają za specyficzne rozpoznanie grupy fosforanowej γ , zwanych przełącznikiem I i II. Małe GTPazy z rodziny Rho podlegają precyzyjnej regulacji przez dwie grupy białek. Pierwsza grupa to białka zwane GEF, które wydajnie przyspieszają wymianę GDP na GTP, przyczyniając się w ten sposób do reaktywacji formy aktywnej GTPazy. Druga grupa to białka nazywane GAP, które wydajnie przyspieszają szybkość hydrolizy GTP przez GTPazę i w ten sposób skracają czas trwania formy aktywnej. Liczba znanych regulatorów typu GEF i GAP dla GTPAZ rodziny Rho jest bardzo duża, mimo że samych GTPaz jest stosunkowo niewiele. Niektóre z tych białek regulatorowych są specyficzne wobec jednej GTPazy, inne zaś wykazują szersze spektrum oddziaływania. Celem naszych badań było ustalenie, które z reszt aminokwasowych kontaktujących się z GTPazą decydują o sile i specyficzności rozpoznania. Zadanie to wymaga na wstępie opracowania strukturalnego modelu oddziaływania GTPazy z białkiem regulatorowym. Model taki ustaliliśmy w obu przypadkach stosując jednak odmienne metody.

W przypadku regulatora typu GEF obiektem naszych badań było wielodomenowe białko PDZ-RhoGEF zbudowane z 1522 reszt aminokwasowych. Jak inne białka GEF, PDZ-RhoGEF katalizuje reakcje wymiany GDP na GTP, w ten sposób aktywując białko RhoA. Reakcja wymiany przeprowadzana jest przez domenę DH, której w białkach GEF skierowanych wobec GTPaz rodziny Rho, zawsze towarzyszy domena PH. Obie te domeny stanowią integralny tandem, w którym domena PH moduluje aktywność domeny DH w sposób nie do końca ustalony. W naszej grupie otrzymaliśmy dwa rozpuszczalne fragmenty białka PDZ-RhoGEF: tandem domen DH i PH oraz izolowaną domenę DH. Pomiarzy zdolności wymiany GDP/GTP przeprowadziliśmy w odniesieniu do trzech głównych przedstawicieli GTPaz z rodziny Rho: RhoA, Cdc42 i Rac1. Wyniki doświadczeń pokazały wysoką specyficzność tandemu DH/PH z białka PDZ-RhoGEF w kierunku RhoA, niewielką stymulację wymiany na Cdc42 i brak efektu w stosunku do Rac1. Izolowana domena DH jest tylko w bardzo niewielkim stopniu zdolna do przeprowadzenia reakcji wymiany na RhoA (całkowity brak wymiany na Cdc42 i Rac1), co może sugerować znaczący udział domeny PH bądź wysoko sprzężoną kooperację obu domen w tym procesie. Mamy więc tutaj do czynienia ze znacznie bardziej złożonym modelem oddziaływania białko-białko, gdyż dotyczy on trzech składników: z jednej strony domen DH i PH, a z drugiej GTPazy.

specyficzność DH/PH w kierunku RhoA jest 6 unikatowych mostków solnych: Arg873^{DH} - Arg5^{RhoA}, Arg872^{DH} - Asp76^{RhoA}, Arg868^{DH} - Asp45^{RhoA}, Arg868^{DH} - Glu54^{RhoA} i Arg867^{DH} - Glu40^{RhoA}, nieobecnych we wcześniejszych strukturach podobnych kompleksów. Obecnie jesteśmy w trakcie przeprowadzania analizy mutacyjnej tych oddziaływań, wprowadzając podstawienia aminokwasowe zarówno w domenę DH, jak i w RhoA. Pierwsze wyniki analizy mutacyjnej tych oddziaływań wskazują, że rola dwóch pierwszych mostków solnych w specyficznym rozpoznaniu RhoA jest mniej istotna, niż dwóch kolejnych. Co ciekawe, zmutowanie niewielkiego regionu oddziaływania pomiędzy domeną PH i RhoA (Ser1065^{PH} - Glu97^{RhoA}) nie powoduje znacznego spadku aktywności tandemu DH/PH. Wydaje się więc, że rola domeny PH w katalizowaniu reakcji wymiany nie polega na tworzeniu bezpośredniego oddziaływania z GTPazą. Nasze badania wskazują raczej, że rola domeny PH jest pośrednia i polega na stabilizacji właściwej konformacji domeny DH w stosunku do RhoA. Wskazuje na to wynik mutacji reszty Asn929^{DH}, która spina GTPazę z domeną PH. Usunięcie tej reszty asparaginy powoduje znaczny spadek aktywności tandemu.

Odmienne postępowanie przyjęliśmy analizując mechanizm specyficzności białka GAP wobec GTPaz. Obowiązujący w literaturze mechanizm działania białek GAP wskazuje, że funkcjonują one poprzez usztywnienie regionów przełącznikowych oraz przez dostarczenie do centrum aktywnego GTPazy katalitycznej reszty Arg. Badania nasze dotyczyły białka GrafGAP, którego struktura przestrzenna jest znana. Nasze wstępne wyniki pokazały, że białko to jest specyficzne wobec GTPazy Cdc42 oraz, w mniejszym stopniu, RhoA. Niestety, nie udało się nam otrzymać odpowiedniej jakości kryształów kompleksu białka GAP z tymi GTPazami. Jak wspomniałem, model takiego kompleksu jest potrzebny, aby precyzyjnie poznać miejsca kontaktu białek i zaproponować wprowadzenie odpowiednich mutacji, które określiłyby rolę poszczególnych oddziaływań. Problem ten obeszliśmy symulując kompleks białka GrafGAP z obiema GTPazami metodami dynamiki molekularnej (Rys. 4). Postępowanie takie jest możliwe, gdy znana jest struktura przestrzenna podobnego kompleksu. Na szczęście dysponowaliśmy opublikowaną strukturą kompleksu białka p50RhoGAP z GTPazą RhoA. W oparciu o ten kompleks zdołaliśmy wymodelować struktury interesujących nas kompleksów, wykorzystując podobieństwa sekwencji aminokwasowych p50RhoGAP i GrafGAP oraz obu GTPaz.



Rys. 4. A. Schemat rozpoznania GTPazy Cdc42 przez białko GrafGAP oparty o wynik symulacji metodą dynamiki molekularnej przeprowadzonej przez dr. Włodzimierza Apostoluka. B. Reszty aminokwasowe białka GrafGAP, które zmutowaliśmy w naszych badaniach.

W naszych badaniach skupiliśmy się na określeniu determinant specyficzności białka GrafGAP wobec członków rodziny Rho oraz zbadaniu wpływu poszczególnych miejsc kontaktu między białkiem GAP a GTPazę na energetykę oddziaływania oraz aktywność katalityczną. W tym celu zaprojektowaliśmy serię 11 mutantów białka GrafGAP obejmujących kluczowe dla oddziaływania dwa epitopy hydrofobowe oraz fragmenty zaangażowane w stabilizację rejonów przełącznikowych GTPazy. Jako technik pomiarowych użyliśmy mikrokalorymetrii miareczkującej oraz metod fluorescencyjnych. Stwierdziliśmy, że białko GrafGAP najsilniej oddziałuje z GTPazą Cdc42, 4 razy słabiej z RhoA i bardzo słabo z Rac1. Oddziaływania z analogami stanu podstawowego GTPaz są kilkadziesiąt razy słabsze niż z analogami ich stanu przejściowego. Z reszt aminokwasowych białka GrafGAP szczególnie istotne są Lys262 oraz Arg266, gdyż ich podstawienie innym aminokwasem znosi oddziaływanie oraz zdolność do hydrolizy GTP. Wysoce zachowywana wśród białek RhoGAP Lys262 pełni funkcje stabilizującą wobec katalitycznej reszty argininy. Analiza mutacji pozycji 266 wskazuje, że dla stabilizacji rejonu przełącznikowego II, zawierającego katalityczną resztę glutaminy, niezbędna jest obecność w tym rejonie ładunków pozytywnych. Istotne wyniki uzyskaliśmy dla podstawień reszt Val224 i Glu253. Efekt podstawień tych reszt jest zróżnicowany dla GTPaz: Cdc42 oraz RhoA, co wskazuje, że warunkują one specyficzność rozpoznania.