

Abstract:

Structural and Biophysical Characterisation of the small GTPase Rab6a and its Effectors BicaudalD2, p150^{glued} and PIST

Kleine GTPasen aus der Familie der Rab-Proteine üben als molekulare Schalter eine entscheidende Rolle im vesikulären Transport aus. Rab6a wurde als Regulator des Mikrotubuli-abhängigen, vesikulären retrograd Transports identifiziert. Wie bei allen kleinen GTPasen basiert auch die Funktion von Rab6a auf dem Wechsel zwischen einer aktiven, GTP gebundenen, und einer inaktiven, GDP gebundenen, Konformation, der durch Guaninnukleotid-Austauschfaktoren (GEF) und GTPase-aktivierenden Proteinen (GAP) moduliert wird. Diese zeitliche Steuerung der Schalterfunktion wird ergänzt durch ein Element räumlicher Spezifität, das auf der Interaktion des GTP gebundenen Rabs mit einer Vielzahl spezifischer Effektorproteine beruht. Die Dauer dieser Interaktion wird bestimmt durch intrinsische bzw. GAP vermittelte Hydrolyseaktivität des Rab Proteins. Die intrinsischen Hydrolyseraten variieren innerhalb der Rab-Familie stark, was im Allgemeinen mit Unterschieden in der spezifischen physiologischen Funktion der einzelnen Rabs assoziiert wird. Die Variationen der GTPase Aktivität lassen sich anhand der an der Nukleotidbindung beteiligten, hochkonservierten Aminosäuren nicht erklären, sollten sich jedoch in der Struktur der einzelnen GTPase manifestieren.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte, für eine möglichst detaillierte Beschreibung der Hydrolyserate-bestimmenden Faktoren, Strukturinformation von Rab6a in seiner aktiven Konformation ermittelt werden. Des Weiteren sollten die potentiellen Rab6a Effektorproteine BicaudalD2, p150^{glued} und PIST sowie ihre Wechselwirkungen mit der kleinen GTPase weitergehend charakterisiert werden. Zentrale Fragestellung dieser Arbeit war es, welche strukturellen und biochemischen Charakteristika Rab6a und seine drei potentiellen Effektoren besitzen müssen um miteinander zu interagieren und somit die entsprechenden Transportschritte zu ermöglichen.

Zu diesem Zweck wurden von Rab6a verkürzte Expressionskonstrukte hergestellt um die Kristallisation und Strukturaufklärung des Proteins zu ermöglichen. Da die drei untersuchten Effektorproteine ursprünglich nicht in ausreichenden Mengen erhalten werden konnten und sich als vergleichsweise schwer handhabbar herausstellten, mussten zunächst Methoden für eine hinreichende Überexpression entwickelt werden. Die so erhaltenen Proteinproben von hoher Qualität sollten die kinetische und thermodynamische Charakterisierung der Wechselwirkungen mit Rab6a gewährleisten. Ferner sollten verkürzte Expressionskonstrukte der Effektoren die eventuelle strukturelle Charakterisierung und biophysikalische Analyse, der für die Wechselwirkung mit Rab6a verantwortlichen coiled-coil Domänen, ermöglichen.

Untersuchungen der intrinsischen GTPase-Aktivität zeigten, dass Rab6a, mit einer Hydrolyserate von $5 \times 10^{-6} \text{s}^{-1}$, die langsamste bisher bei einer Rab GTPase gemessene Umsetzung von GTP aufweist. Diese besonders niedrige

Hydrolyseaktivität erlaubte erstmalig die Kristallisation eines Rab Proteins in seiner natürlichen GTP-gebundenen Konformation. Die Struktur von Rab6a Δ 12C Δ 33 konnte mit einer Auflösung von 1.8 Å bestimmt werden. Vergleiche mit den Strukturen anderer Rab Proteine, insbesondere mit dem *P. falciparum* Rab6a Homolog in seiner GDP Konformation, zeigen das Rab6a die typische Faltung der kleinen GTPasen einnimmt und erlauben die Beschreibung des Übergangs zwischen aktiver und inaktiver Konformation. Ferner wird große Übereinstimmung zwischen GTP-gebundenem Rab6a und Rab Proteinen in Komplex mit dem Nukleotidanalogue GppNHp beobachtet. Rab6a spezifische Merkmale sind zum einen ein, die Nukleotidbindungstasche abschirmendes, Tyrosin (Tyr 42), das in analoger Weise zu einem ähnlich positionierten Histidin in Rab4a und einem Tyrosin in der kleinen GTPase RHEB durch seine sperrige Seitenkette Einfluss auf Nukleotidaustausch und -hydrolyse haben könnte. Zum anderen zeigt Rab6a erhöhte Flexibilität eines für die Katalyse essentiellen Glutamins, was einer effiziente Hydrolyse des Nukleotids im Weg steht. In Abwesenheit entsprechender GAPs ist Rab6a quasi konstitutiv aktiv, was in Betracht auf seine physiologische Funktion durchaus erklärbar scheint. Die mit der Kontrollfunktion von Rab6a assoziierten Transportprozesse erstrecken sich von der Zellperipherie, durch den Golgi Apparat, bis zum endoplasmatischen Retikulum, wofür die Erhaltung der aktiven, für Effektorbindung zugänglichen, Konformation bis zum Erreichen der Zielmembran notwendig wäre.

Die Effektorproteine BicaudalD2, p150_{glued} und PIST, sowie ihre Wechselwirkungen mit Rab6a, wurden zunächst mittels analytischer Gelpermeations-Chromatographie untersucht. Dabei wurde für den Komplex von Rab6a mit PIST ein höheres als zu erwartendes Elutionsvolumen beobachtet. Gleiches galt auch für verkürzte Effektor Konstrukte, die, mit dem Ziel nur die Rab6a bindenden coiled-coil Domänen zu isolieren, in einem limitierten Proteaseverdau der Effektor Proteine und ihrer Komplexe mit Rab6a identifiziert worden waren. Durch NMR-spektroskopische Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass diese maximal verkürzten Effektor Fragmente intrinsisch unstrukturiert sind bzw. zu Agglomeration neigen, wofür auch ihr ungewöhnliches Laufverhalten in der Gelpermeations-Chromatographie spricht. Für eine kinetische und thermodynamische Charakterisierung der Wechselwirkungen zwischen Rab6a und den drei untersuchten Effektoren wurde die minimale Rab6a-bindende Domäne von BicaudalD2, Aminosäuren 540 bis 1041 von p150_{glued} sowie PIST in voller Länge für fluoreszenz-spektroskopische (stopped-flow) und kalorimetrische (ITC) Untersuchungen verwendet. Die Ergebnisse dieser unabhängigen Methoden bestätigen sich gegenseitig und lassen den Schluss zu, dass die untersuchten Rab6a-Effektor Komplexe in einer 1:1 Stöchiometrie vorliegen, die Effektorproteine jedoch mit K_d -Werten von 1.5 μ M für bicD2_minimal, 2.4 μ M für p150 und 2.7 μ M für PIST vergleichsweise niedrige Affinität zu Rab6a aufweisen. *Single-turnover* Hydrolyseexperimente mit den Komplexen zeigten, dass die Bindung der Effektoren an Rab6a einen Einfluss auf die intrinsische GTPase-Aktivität haben kann. Dies führt im Fall der Rab6a-bindenden Domäne von BicaudalD2 sowie bei p150 zu einer Halbierung der Hydrolyserate von Rab6a, während für die Bindung von

PIST keine Veränderung der GTPase-Aktivität nachweisbar ist. Obwohl ausreichende Mengen der Rab6a-Effektor Komplexe isoliert werden konnten, scheint deren Stabilität nicht ausreichend für eine erfolgreiche Kristallisation zu sein.

Es erscheint möglich, dass die Affinität nur der einzelnen Effektoren zu Rab6a niedrig ist. Für die untersuchten Effektoren werden in Aminosäuresequenzanalysen neben coiled-coils auch weitere andere Bindungsdomänen vorhergesagt. Weiterhin besteht für verschiedene Rab Effektoren der Verdacht, dass diese ihre Funktion im Zusammenspiel mit anderen Rab Effektoren ausüben, was einige Studien auch für BicaudalD2 und dynamin(p150_{glued}) nahe legen. Sollten Rab6a Effektoren tatsächlich modular sein, wäre es wahrscheinlich, dass ihre Affinität nur zum funktionellen Komplex aus GTPase und weiteren Effektoren hoch ist.

Auf dieser Hypothese aufbauend, könnten sich Experimente zur Rab6a Effektor Wechselwirkung mit verschiedenen Kombinationen von Effektor Proteinen anschließen, was die für den Rab6a-kontrollierten retrograd Transport notwendigen Signalwege weiter beleuchten würde. Voraussetzung für eine weitergehende detaillierte Charakterisierung der Effektoren wäre die Generierung neuer Konstrukte, welche die Strukturaufklärung dieser Proteine und ihrer Komplexe mit Rab6a ermöglichen. Auf den Strukturdaten von Rab6a basierend könnten Mutationsstudien zeigen, ob ein Austausch des Tyrosin 42 gegen Glycin oder Serin die erwartete Erhöhung der Hydrolyserate bewirkt. Dies würde helfen die molekulare Basis für die großen Unterschiede der intrinsischen Hydrolyseraten innerhalb der Familie der Rab Proteine zu erklären.

Keywords:

Rab, RabGTPase, Rab6a, Rab-Effektoren, BicaudalD2, PIST, p150, Dynactin, GOPc, Vesikeltransport, retrograder Vesikeltransport, Hydrolyseaktivität, Struktur, Röntgenkristallographie, NMR, Kinetik, ITC, stopped-flow