



Doctoral Thesis

Structural and biochemical analysis of the human Obg-like ATPase 1

Author(s):

Koller-Eichhorn, Roland

Publication Date:

2007

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-005368288> →

Rights / License:

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#) →

This page was generated automatically upon download from the [ETH Zurich Research Collection](#). For more information please consult the [Terms of use](#).

Diss. ETH No. 17064

Structural and Biochemical Analysis of the Human Obg-like ATPase 1

A dissertation submitted to the

SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY ZURICH

For the degree of

DOCTOR OF NATURAL SCIENCES

Presented by

ROLAND KOLLER-EICHHORN

Dipl. Natw. ETH

Born, 11.01.1976
Citizen of Nesslau (SG)

Accepted on the recommendation of

Prof. Dr. U. Kutay, examiner
Prof. Dr. M. Peter, co-examiner

2007

SUMMARY

Nucleotide binding protein of the superclass of P-loop GTPases and related ATPases (P-loop NTPases) perform many essential functions in all kingdoms of life.

The Obg family of GTPases constitutes a group of ancient proteins of the TRAFAC class. Phylogenetic analysis of these GTPases revealed that they appear to assemble in four protein clusters and define the distinct Obg/CgtA, Drg/Rbg, Nog1, and Ola1/YchF subfamilies.

While Obg, the founding member of this GTPase family, has been extensively characterized in bacteria, Ola1/YchF-like proteins are hardly investigated.

Biochemical characterization of the human protein OLA1 uncovered that hOLA1 binds and hydrolyzes ATP more efficiently than GTP. Additionally, biochemical analysis of the bacterial and yeast homologs of hOLA1 revealed that ATPase activity is a general but previously missed feature of the Ola1/YchF subfamily of Obg-related proteins. Interestingly, Ola1-like proteins revealed to behave very similarly to the Obg-like GTPases – just the nucleotide specificity is different. Both subfamilies are characterized by moderate nucleotide affinity with fast nucleotide dissociation and display only low intrinsic nucleotide hydrolysis activity *in vitro*. To explain the altered nucleotide specificity of Ola1-like proteins, we have solved the crystal structure of hOLA1 bound to the non-hydrolysable ATP analog AMPPCP. Comparison with GTP bound Ras disclosed that the triphosphate moiety of both nucleotides is similarly bound through a tight network of hydrogen bonds while the conformation of hOLA1's G4 loop appears to build an extended β -sheet conformation, whereas it shows a zigzag-like conformation in Ras. Accordingly, interactions of the G4 motif with the base are different in hOLA1 and Ras-like GTPases and thus lead to the altered nucleotide specificity.

To elucidate the cellular function of hOLA1, both *in vitro* and *in vivo* approaches were used. Interestingly, we found several potential interaction partners of hOLA1 including tRNA, both ribosomal subunits, the tRNA synthetase complex and several proteins needed for translation initiation. Furthermore, aminoacylated tRNA appears to strongly activate the intrinsic hydrolysis activity of hOLA1 and might play a crucial role in regulation of the hOLA1 ATPase activity. Even though the role of hOLA1 in the cell could not be examined in detail, tRNA might exhibit a potential link between the different processes hOLA1 might be involved in and awaits further investigations.

ZUSAMMENFASSUNG

In allen zellulären Organismen werden viele essentielle Funktionen von Nukleotid bindenden Proteinen (GTPasen und ATPasen) der P-loop Superklasse ausgeführt.

Eine Gruppe von evolutionär ursprünglichen GTPasen begründet die Proteinfamilie Obg, die der TRAFAC Klasse zugeordnet wird. Phylogenetische Untersuchungen haben gezeigt, dass die Proteine dieser Familie vier verschiedene Proteincluster bilden und entsprechend vier Subfamilien definieren, nämlich Obg/CgtA, Drg/Rbg, Nog1 und Ola1/YchF.

Während die biochemischen Eigenschaften von Obg, jenem Protein, welche die ganze Proteinfamilie begründet, in Bakterien umfangreich untersucht wurden, gibt es bisher kaum Untersuchungen zu den Ola1/YchF ähnlichen Proteinen.

Die biochemische Charakterisierung von dem humanen Protein OLA1 haben wider Erwarten gezeigt, dass hOLA1 viel effizienter ATP bindet und hydrolysiert als GTP. Die Untersuchung der homologen Proteine aus Bakterien und Hefe haben zudem gezeigt, dass die Spezifität für ATP ein allgemeines Merkmal dieser Subfamilie ist. Beim Vergleich mit Obg-ähnlichen Proteinen stellte sich interessanterweise heraus, dass sich die beiden Subfamilien trotz unterschiedlicher Nukleotidspezifität in ihren biochemischen Eigenschaften sehr ähnlich sind. Beide weisen nur eine moderate Affinität für das entsprechende Nukleotid auf, die durch eine hohe Dissoziationsrate gekennzeichnet ist und zeigen in *in vitro* Experimenten eine tiefe intrinsische ATPase Aktivität.

Um die geänderte Nukleotidspezifität von Ola1-ähnlichen Proteinen genauer zu verstehen, wurde die Kristallstruktur von hOLA1 mit gebundenem AMPPCP, einem nicht hydrolysierbaren ATP-ähnlichen Molekül gelöst. Beim Vergleich dieser Struktur mit GTP gebundenem Ras hat sich herausgestellt, dass sich die beiden Moleküle in der Art und Weise wie sie den Triphosphatrest des Nukleotides durch ein enges Netzwerk von Wasserstoffbrücken binden, kaum unterscheiden. Im Gegensatz dazu weisen sie markante Unterschiede in der Konformation der G4 Schlaufe aus. Während das G4 Motiv von hOLA1 eine erweiterte β -Faltblatt Konformation annimmt, ähnelt die G4 Konformation von Ras mehr einem Zickzackkurs. Entsprechend unterscheiden sich die beiden Moleküle bezüglich der Interaktionen, die sie mit dem gebundenen Nukleotid eingehen können, was zu der entsprechenden Spezifitätsänderung führt.

Um die zelluläre Funktion von hOLA1 zu untersuchen, wurden *in vitro* und *in vivo* Ansätze verfolgt und verschiedene potentielle Interaktionspartner von hOLA1 konnten identifiziert werden. Zu diesen gehören tRNA, beide ribosomalen Untereinheiten, der tRNA-Synthetase-Komplex und verschiedene Proteine, die zur Initiation der Proteintranslation benötigt werden. Aminoacylierte tRNA scheint zudem die intrinsische ATPase Aktivität von hOLA1 zu stimulieren und könnte demzufolge eine wichtige Rolle in der Regulation

derselben spielen. Wenn auch die Funktion von hOLA1 nicht im Detail geklärt werden konnte, so scheint es doch so, dass die tRNA einen potenziellen Link zwischen den verschiedenen Prozessen, in denen hOLA1 möglicherweise involviert ist, darstellen könnte. Weitere Untersuchungen sind aber nötig, um das genauer zu untersuchen.