

Doctoral Thesis ETH No. 16659

Structure-function studies of CRM1-related nuclear
transport complexes, the human Obg-like ATPase 1,
and the 4-hydroxy-2,3-trans-nonenal reductase
AKR11C1 from *Bacillus halodurans*

A dissertation submitted to the
SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY ZURICH
for the degree of
DOCTOR OF SCIENCES

presented by
TOBIAS MARQUARDT
Dipl.-Biochem., University of Hannover
born April 14, 1975
citizen of Germany

accepted on the recommendation of
Prof. Dr. Fritz K. Winkler, examiner
Prof. Dr. Ulrike Kutay, co-examiner

2006

Zusammenfassung

Die vorliegende Doktorarbeit umfasst die Ergebnisse von drei Projekten, deren Ziel die Identifikation und molekulare Charakterisierung von Struktur-Funktionsbeziehungen von Proteinen und Proteinkomplexen war. Im ersten Teil werden die Versuche zur Röntgenstrukturbestimmung des humanen Exportrezeptors CRM1 (*chromosome maintenance region 1*) im Komplex mit seinem Effektorprotein RanBP3 (Ran bindendes Protein 3), RanGTP und zu befördernde Ladung präsentiert. In der eukaryontischen Zelle ist das genomische Material von der Kernmembran umschlossen. Der Stoffaustausch von Makromolekülen zwischen dem Zellkern und dem umgebenden Zytoplasma erfolgt durch Kernporen und wird von speziellen Transportrezeptoren bewerkstelligt. CRM1 ist der vielseitigste Exportrezeptor. Er exportiert Proteine, die ein Leucin-reiches Kerntransportsignal (NES; *nuclear export signal*) tragen und, über Adapterproteine, ribosomale Untereinheiten und verschiedene Arten von RNA. CRM1 bindet seine Ladung in Gegenwart von RanGTP und setzt sich nach erfolgter Hydrolyse von RanGTP zu RanGDP im Zytoplasma wieder frei. Vollständiges CRM1 konnte alleine nicht kristallisiert werden. Es besitzt eine superhelikale Struktur, deren Flexibilität mit den Kristallisationsproblemen in Zusammenhang gebracht wird. Um mögliche mit der Flexibilität von CRM1 verbundene Kristallisationsprobleme zu umgehen, wollte ich CRM1 im Komplex mit RanBP3 kristallisieren. Da RanBP3 CRM1 spezifisch bindet und die Wechselwirkungen zwischen CRM1-RanGTP und bestimmten Ladungen stabilisiert, wurde erwartet, dass diese Komplexe rigider und zur Kristallisation besser geeignet wären.

Die Charakterisierung von rekombinant produziertem CRM1 und RanBP3 zeigte die hohe Reinheit und Homogenität der Proteine. CD-Spektroskopie-Messungen zeigten, dass RanBP3 grösstenteils unstrukturiert ist und nur die Ran-bindende Domäne Sekundärstruktur aufweist. Eine Zunahme an Sekundärstruktur im Komplex mit CRM1 konnte nicht beobachtet werden. Aufgrund dieser Ergebnisse wird ein Modell vorgeschlagen, wie RanBP3 möglicherweise CRM1-vermittelten Export durch funktionsbezogene Faltung seiner intrinsisch nicht gefalteten N-terminalen Region beeinflusst. Versuche, stabile ternäre und quaternäre Komplexe mit RanGTP und Ladung zu identifizieren und zu charakterisieren, sowie Kristallisationsversuche mit den entsprechenden Proteinmischungen waren erfolglos.

Der zweite Teil umfasst die strukturelle und funktionelle Charakterisierung von hOLA1 (humane OBG-ähnliche ATPase 1). hOLA1 ist das humane Homolog von YchF, einem universell konservierten Protein mit unbekannter Funktion, das eine Unterfamilie der OBG-ähnlichen GTPasen bildet. Kristallstrukturen von YchF zeigten, dass es eine zentrale GTPase-Domäne besitzt, die von einem *coiled-coil* und einer TGS (*ThrRS*, GTPase,

SpoT) Domäne flankiert wird. Das Protein hat eine Hufeisenform. YchF bindet DNS. Obwohl die *in vivo* Funktion von hOLA1 und YchF unbekannt bleibt, zeigten unsere biochemischen Daten, dass hOLA1 eine signifikant höhere Affinität für ATP als für GTP besitzt. Um diese ATP-Spezifität zu erklären, lösten wir die Kristallstruktur von hOLA1 im Komplex mit dem nicht hydrolysierbaren ATP-Analogon AMPPCP.

hOLA1 besitzt die gleiche Gesamtstruktur wie YchF, mit geringen Unterschieden in den G-, *coiled-coil* und TGS Domänen. Der Triphosphatteil des Kofaktors wird durch ein umfassendes Netzwerk von Wasserstoffbrücken gebunden. Im Gegensatz hierzu bestehen keine direkten Wechselwirkungen zwischen der Ribose und dem Protein und nur wenige Kontakte zwischen der Adeninbase und hOLA1. Unsere Strukturdaten lassen vermuten, dass seine Spezifität für Adenin und der Ausschluss von Guanin, auf Wechselwirkungen zwischen der 6-NH₂ Gruppe des Adenins mit Asn²³⁰ und der Hauptketten-Carbonylgruppe von Leu²³¹ beruhen. GTP in gleicher Lage wird wahrscheinlich durch Abstossungskräfte zwischen dem O6-Sauerstoff und Haupt- und Seitenketten Sauerstoffen des Proteins ausgeschlossen. Des Weiteren zeigen wir, dass hOLA1 spezifisch an tRNA bindet und spekulieren über eine Rolle von hOLA1 im Translationsprozess.

Der dritte Teil, entstanden aus einem während der Doktorarbeit initiierten Projekt, befasst sich mit der strukturellen und funktionellen Charakterisierung der bislang unerforschten Aldo-Keto-Reduktase AKR11C1 aus *Bacillus halodurans*. Wir haben die apo- und NADPH-gebundene Struktur von AKR11C1 gelöst und führten Modellierungen und biochemische Studien mit möglichen Substraten durch.

Aldo-Keto-Reduktasen (AKRs) reduzieren Ketone und Aldehyde zu den entsprechenden Alkoholen. AKRs bilden eine grosse Superfamilie mit zur Zeit mehr als 120 Mitgliedern. Obwohl einige AKRs funktionell und strukturell sehr gut charakterisiert sind, ist die physiologische Rolle der meisten noch ungeklärt. AKR11C1 besitzt die AKR-typische Gesamtstruktur, ein (β/α)₈ TIM *barrel* mit zwei zusätzlichen Helices H1 und H2. Wie auch andere bakterielle AKRs, besitzt AKR11C1 einen verlängerten *loop* 3 und einen verkürzten *loop* 4. Wir beobachteten eine neuartige, nicht aromatische Stapelinteraktion mit dem Kofaktor und konnten zeigen, dass die geringe Aktivität mit kleinen Standardsubstraten wie Benzaldehyd oder DL-Glyceraldehyd konsistent mit dem beobachteten, sehr offenen aktiven Zentrum ist, das keine Bindungstasche für diese Substrate aufweist. Im Gegensatz dazu zeigen biochemische Studien unseres Kollaborators G. K. Balendiran (City of Hope, Duarte, USA), dass AKR11C1 eine NADPH-abhängige Aktivität für 4-Hydroxy-2,3-*trans*-nonenal (HNE) besitzt. Modellierungen mit HNE deuten darauf hin, dass sein gestreckter hydrophober Teil in einer durch hydrophobe Seitenketten geformten Furche von AKR11C1 bindet. Wir schliessen hieraus, dass AKR11C1 das erste strukturell charakterisierte Mitglied einer neuen Klasse von Aldo-Keto-Reduktasen ist, die Spezifität für Substrate mit langen aliphatischen Teilen besitzt.

Abstract

This thesis comprises the results of three projects, focused on structure-function studies of proteins and protein-protein complexes. In the first part, the efforts toward the X-ray structure determination of the human export receptor CRM1 (chromosome maintenance region 1) in complex with its effector RanBP3 (Ran binding protein 3), RanGTP, and cargo are presented. In the eukaryotic cell, the genomic material is enclosed by the nuclear envelope. Macromolecular exchange occurs through nuclear pore complexes (NPCs) by special transport receptors. CRM1 is the most versatile export receptor in nuclear transport. It exports cargo bearing leucine-rich nuclear export signals (NES) and, via adaptor proteins, ribosomal subunits, and different classes of RNAs. CRM1 binds to its cargo in the presence of RanGTP, and releases it upon hydrolysis of RanGTP to RanGDP in the cytoplasm. Full length CRM1 alone could not be crystallised. It folds into a super-helix, whose structural flexibility is suspected to be a problem in crystallisation. In order to alleviate possible crystallisation problems associated with CRM1 flexibility, I intended to crystallise a complex of CRM1 bound to RanBP3. As RanBP3 binds specifically to CRM1 and stabilises the CRM1-RanGTP interaction with certain cargoes, it was hoped that these complexes are more rigid and better suited for crystallisation.

Characterisation of recombinantly produced CRM1 and RanBP3 showed high purity and homogeneity. CD spectroscopy revealed that RanBP3 is largely unstructured and only its Ran binding domain possesses secondary structure. No increase in secondary structure was observed upon formation of the CRM1-RanBP3 binary complex. Based on these findings a model is proposed how RanBP3 could effect CRM1-mediated export by function-related folding of its intrinsically unfolded N-terminal region. Attempts to identify and characterise stable ternary or quaternary complexes with RanGTP and cargo were without success and crystallisation experiments with the corresponding mixtures failed.

The second part of the thesis comprises structural and functional characterisation of hOLA1 (human Obg-like ATPase 1). hOLA1 is the human homologue of YchF, a universally conserved protein of unknown function, which constitutes a subfamily of Obg-like GTPases. X-ray structures of YchF have shown a central GTPase domain that is flanked by a coiled-coil and a TGS (*ThrRS*, *GTPase*, *SpoT*) domain, which gives the protein a horseshoe-like appearance. YchF binds DNA. While the *in vivo* function of both hOLA1 and its YchF homologues remains unknown, our biochemical data showed that hOLA1 exhibits significant higher affinity for ATP than GTP. To explain this ATP specificity,

we solved the X-ray structure of hOLA1 being bound to AMPPCP, a non-hydrolysable ATP analogue.

hOLA1 shares the overall structure of YchF with little differences in the G-, coiled-coil, and TGS-domain. The cofactor's triphosphate moiety is bound through a network of H-bonds, involving main and side chain donors. In contrast, the ribose shows no direct interactions with the protein and there are only few contacts between the adenine base and hOLA1. Our structural data indicate that hOLA1's specificity for adenine and discrimination of guanine is based on interactions between the adenine 6-NH₂ group with Asn²³⁰ and the main chain carbonyl group of Leu²³¹. GTP binding in the same way is presumably disfavoured through repulsive forces between the main and side chain oxygens, and guanine's O6 oxygen. We further show that hOLA1 specifically binds tRNA, and speculate on a role of hOLA1 in the translation process.

The third part, developed from another project initiated during my thesis, comprises structural and functional characterisation of the so far uncharacterised aldo-keto reductase AKR11C1 from *Bacillus halodurans*. We solved the apo and NADPH bound structures of AKR11C1 and performed modelling and biochemical studies with putative substrates.

Aldo-keto reductases (AKRs) reduce ketones and aldehydes to the corresponding alcohols. AKRs constitute a large superfamily with presently more than 120 members, subdivided into 15 families and occurring in all forms of life. Although some AKRs are functionally and structurally well characterised, the physiological role of many is unknown. AKR11C1 shares the conserved overall structure of aldo-keto reductases, characterised by a (β/α)₈ TIM barrel with two additional helices, H1 and H2, located outside the barrel. Like other bacterial AKRs, AKR11C1 possesses an extended loop 3 and a short loop 4. We observed a novel non-aromatic stacking interaction with the cofactor and could show AKR11C1's very poor activity on standard small substrates such as benzaldehyde or DL-glyceraldehyde, consistent with the observed, very open active site lacking a binding pocket for these substrates. In contrast, biochemical studies in collaboration with G. K. Balendiran (City of Hope, Duarte, USA) have revealed an NADPH-dependent activity of AKR11C1 with 4-hydroxy-2,3-*trans*-nonenal (HNE) and modelling of HNE suggests that its elongated hydrophobic tail occupies a groove defined by hydrophobic side chains. We conclude that AKR11C1 is the first structurally characterised member of a new class of aldo-keto reductases with specificity for substrates with long aliphatic tails.