Abstract

The small GTPase Rab2B protein plays crucial role in controlling intracellular vesicle trafficking by acting like a molecular switch in between GDP-bound inactive and GTP-bound active states. The emerging view considers this protein to be moderately flexible and carcinogenic in nature. The interplay of structure modulation, conformational changes and pH sensitivity relevant to the function has recently garnered much attention. The thesis titled '**Understanding the Energy Landscape of the Small GTPase Rab2B in Crowded Milieu: Structure Modulation, Intermediate Formation and pH Dependence**' is focused on understanding the correlation between activity, conformational flexibility, structure and kinetics of small GTPase Rab2B (UniProt Id: 2A5J) under cell-mimicking crowded environments. The thesis entails a comprehensive investigation of the aspects that link refolding kinetics to the intermediate formation within fraction of seconds and hence modulation of the overall energy landscape of the protein under different conditions, through fluorescence based spectroscopic studies.

Chapter 1 explores Rab2B's structure and function, emphasizing how excluded volume effect and soft interactions impact protein structure in crowded environments. This chapter also discusses about several factors like chemical denaturants, temperature, pH and pressure, which affect protein's stability. Various techniques and mechanisms regarding protein folding have also been discussed in this chapter.

Chapter 2 discusses methodologies, including plasmid transformation, protein expression, purification and biophysical characterization. Techniques such as UV-Visible spectrophotometry, steady-state as well as time-resolved fluorescence and stopped-flow, for studying the refolding kinetics of Rab2B including analyses of kinetic parameters, have been detailed in this chapter.

Chapter 3 addresses the formation of intermediates at specific crowder concentrations of Ficoll 70 and PEG 8 under partially denaturing circumstances caused by urea. The study focuses on local and global changes within the protein in terms of chemical stability, thermal stability, varying hydrophobicity and quenching phenomena with respect to the nature and concentration of the crowder.

Chapter 4 delves into the specific effects of different molecular weight PEGs on Rab2B's folding, linking intrinsic fluorescence and structural changes. Apart from exploring the refolding kinetics of the native protein, this study also highlights various combinations of studies to develop an understanding regarding intermediate formation of Rab2B.

Chapter 5 analyzes how varying pH levels and crowding conditions alter Rab2B's structural and functional properties. Considering the overexpression of Rab2B in colon adenocarcinoma, studies at pH 5 and 7.4 underscore the overall impact of pH and macromolecular crowding on the stability and interactions of Rab2B, highlighting the implications for oncogenic properties.

Lastly, **Chapter 6** summarizes key findings and suggests future research directions to further investigate Rab2B's energy landscape under mixed macromolecular crowding conditions. Also, possibilities of several other studies like smFRET and solvation dynamics, followed by site directed mutagenesis of the wild type Rab2B protein have been discussed in this chapter.

सारांश

छोटा जीटीपीएज़ रैब2बी प्रोटीन जीडीपी-बद्ध निष्क्रिय और जीटीपी-बद्ध सक्रिय अवस्थाओं के बीच एक आणविक स्विच की तरह कार्य करके अंतःकोशिकीय पुटिका परिवहन को नियंत्रित करने में महत्वपूर्ण भूमिका निभाता है। उभरते मत के अनुसार, यह प्रोटीन मध्यम रूप से लचीला और प्रकृति में कैंसरकारी है। संरचना मॉड्यूलेशन, संरूपणीय परिवर्तन और पीएच संवेदनशीलता के बीच परस्पर क्रिया, जो इसके कार्य से संबंधित है, ने हाल ही में बहुत ध्यान आकर्षित किया है। 'भीड़भाड़ वाले वातावरण में छोटे जीटीपीएज़ रैब2बी के ऊर्जा परिदृश्य को समझना: संरचना मॉड्यूलेशन, मध्यवर्ती निर्माण और पीएच निर्भरता' शीर्षक वाला शोध प्रबंध कोशिका-अनुरूप भीड़भाड़ वाले वातावरण में छोटे जीटीपीएज़ रैब2बी (यूनिप्रोट आईडी: 2A5J) की गतिविधि, संरूपणीय लचीलेपन, संरचना और गतिकी के बीच सहसंबंध को समझने पर केंद्रित है। शोध प्रबंध में प्रतिदीप्ति-आधारित स्पेक्ट्रोस्कोपिक अध्ययनों के माध्यम से उन पहलुओं की व्यापक जांच शामिल है जो पुन: तह गतिकी को सेकंड के अंश के भीतर मध्यवर्ती निर्माण से जोड़ते हैं और इस प्रकार विभिन्न परिस्थितियों में प्रोटीन के समग्र ऊर्जा परिदृश्य के मॉड्यूलेशन का अध्ययन करते हैं।

अध्याय 1 में Rab2B की संरचना और कार्यप्रणाली का विस्तृत वर्णन किया गया है, जिसमें इस बात पर बल दिया गया है कि भीड़भाड़ वाले वातावरण में बहिष्कृत आयतन प्रभाव और कोमल अंतःक्रियाएँ प्रोटीन संरचना को कैसे प्रभावित करती हैं। इस अध्याय में रासायनिक विकृतीकरण, तापमान, pH और दाब जैसे कई कारकों पर भी चर्चा की गई है, जो प्रोटीन की स्थिरता को प्रभावित करते हैं। प्रोटीन तह से संबंधित विभिन्न तकनीकों और प्रक्रियाओं पर भी इस अध्याय में विचार-विमर्श किया गया है।

अध्याय 2 में प्लास्मिड रूपांतरण, प्रोटीन अभिव्यक्ति, शुद्धिकरण और जैवभौतिकीय लक्षण वर्णन सहित कार्यप्रणालियों पर चर्चा की गई है। इस अध्याय में रैब2बी के पुनर्संयोजन गतिकी का अध्ययन करने के लिए यूवी-विजिबल स्पेक्ट्रोफोटोमेट्री, स्थिर-अवस्था और समय-समाधानित प्रतिदीप्ति तथा स्टॉप-फ्लो जैसी तकनीकों का विस्तृत वर्णन किया गया है, जिसमें गतिकी मापदंडों का विश्लेषण भी शामिल है।

अध्याय 3 में यूरिया द्वारा उत्पन्न आंशिक रूप से विकृतीकरण की परिस्थितियों में फिकोल 70 और पीईजी 8 की विशिष्ट क्राउडर सांद्रता पर मध्यवर्ती पदार्थों के निर्माण का वर्णन किया गया है। यह अध्ययन क्राउडर की प्रकृति और सांद्रता के संबंध में रासायनिक स्थिरता, ऊष्मीय स्थिरता, बदलती जलविरोधकता और शमन घटनाओं के संदर्भ में प्रोटीन के भीतर होने वाले स्थानीय और वैश्विक परिवर्तनों पर केंद्रित है।

अध्याय 4 में Rab2B की तह बनाने की प्रक्रिया पर विभिन्न आणविक भार वाले PEG के विशिष्ट प्रभावों का गहन अध्ययन किया गया है, जिसमें आंतरिक प्रतिदीप्ति और संरचनात्मक परिवर्तनों को आपस में जोड़ा गया है। मूल प्रोटीन की पुनर्तयन गतिकी का अध्ययन करने के अलावा, यह अध्ययन Rab2B के मध्यवर्ती निर्माण के बारे में समझ विकसित करने के लिए विभिन्न अध्ययनों के संयोजनों पर भी प्रकाश डालता है।

अध्याय 5 में विश्लेषण किया गया है कि कैसे अलग-अलग पीएच स्तर और भीड़भाड़ की स्थितियाँ Rab2B के संरचनात्मक और कार्यात्मक गुणों को बदल देती हैं। कोलन एडेनोकार्सिनोमा में Rab2B की अति-अभिव्यक्ति को ध्यान में रखते हुए, पीएच 5 और 7.4 पर किए गए अध्ययन Rab2B की स्थिरता और अंतःक्रियाओं पर पीएच और वृहदकीय भीड़भाड़ के समग्र प्रभाव को रेखांकित करते हैं, जिससे कैंसरजनक गुणों के निहितार्थों पर प्रकाश डाला गया है।

अंत में, अध्याय 6 में प्रमुख निष्कर्षों का सारांश दिया गया है और मिश्रित वृहद आणविक भीड़ की स्थितियों में Rab2B के ऊर्जा परिदृश्य की आगे जांच करने के लिए भविष्य के अनुसंधान दिशाओं का सुझाव दिया गया है। साथ ही, इस अध्याय में एसएमएफआरईटी और सॉल्वेशन डायनामिक्स जैसे कई अन्य अध्ययनों की संभावनाओं पर भी चर्चा की गई है, जिसके बाद वाइल्ड टाइप Rab2B प्रोटीन के साइट डायरेक्टेड म्यूटेशन पर भी विचार किया गया है।