



Doctoral Thesis

Crystal structures of the selenocysteine-tRNA specific elongation factor SelB and functional implications

Author(s):

Leibundgut, Marc André

Publication Date:

2005

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-004945744> →

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](#).

**Crystal structures of the selenocysteine-tRNA
specific elongation factor SelB and functional
implications**

A dissertation submitted to the
Swiss Federal Institute of Technology Zürich

for the degree of Doctor of Natural Sciences

presented by

Marc André Leibundgut
Dipl.-Biol. Univ. LMU München

born December 10, 1970
from Rüegsau (BE)

Prof. Dr. Nenad Ban, Examiner
Prof Dr. Ulrike Kutay, Coexaminer

2005

Summary

Selenium is a trace element that is incorporated into proteins in the form of the 21st amino acid selenocysteine (Sec). It is found in the active centers of oxidoreductases, where it is directly involved in catalysis due to its specific chemical properties. In all three kingdoms of life, *Archaea*, *Eukarya* and *Bacteria*, the selenocysteine incorporation machinery induces the ribosome to recode a UGA stop codon as a Sec codon. UGA recoding only occurs in the presence of a SECIS (Sec inserting sequence) element, a cis-acting mRNA hairpin motif further downstream of the UGA codon. As a result, translation is not terminated but Sec is incorporated into the growing polypeptide chain. The other components of the recoding machinery are Sec-tRNA^{Sec}, whose UCA anticodon is complementary to the UGA stop codon, and SelB, an EF1A/EF-Tu translation elongation factor homologue, which specifically binds Sec-tRNA^{Sec} but not other tRNAs. In bacteria, SelB recognizes the SECIS element directly with an additional RNA binding domain (domain IV), whereas in archaea, this additional domain is proposed to interact with an adapter protein that in turn binds the SECIS element, a situation that has been observed for mammalian SelB. Therefore, by interacting specifically with all components of the recoding machinery, SelB is the key player in this complicated process.

In this thesis, the X-ray structures of SelB from the archaeon *Methanococcus maripaludis* in the apo-, GDP- and GppNHp-bound forms are presented. All three SelB structures reveal an EF-Tu:GTP-like domain arrangement. Upon binding of the GTP analogue GppNHp, a conformational change of the Switch 2 region in the GTPase domain leads to the exposure of residues in SelB, which in the case of EF-Tu are involved in clamping the 5' phosphate of tRNA. In the aminoacyl-binding pocket of SelB domain II, two positively charged residues are important for SelB function *in vivo* and probably compensate for the negative charge of selenocysteine. A conserved extended loop in domain III of SelB may be responsible for specific interactions with tRNA^{Sec} and act as a ruler for measuring the extra long acceptor arm. Domain IV of SelB adopts a β barrel fold and is flexibly tethered to domain III. The overall domain arrangement of SelB resembles a “chalice” observed so far only for initiation factor IF2/eIF5B. In a model of SelB bound to the ribosome, domain IV points towards the 3' mRNA entrance cleft ready to interact with the downstream secondary structure element.

Zusammenfassung

Selen ist ein Spurenelement, welches in Form von Selenocystein (Sec), der einundzwanzigsten Aminosäure, in Proteine eingebaut wird. Sec befindet sich im aktiven Zentrum von Oxidoreduktasen, wo es auf Grund seiner spezifischen chemischen Eigenschaften direkt an der katalytischen Reaktion beteiligt ist. In allen drei Abstammungslinien, *Archaea*, *Eukarya* und *Bacteria*, wird das Ribosom durch einen speziellen Mechanismus so umprogrammiert, dass ein UGA-Stopcodon als Selenocystein-Codon gelesen wird. Dieser Prozess wird „Recodierung“ (*recoding*) genannt und findet nur in Anwesenheit eines in *cis* wirksamen mRNA-Sekundärstrukturelements statt (des SECIS-Elements, von Sec-inserterende Sequenz), welches sich weiter unterhalb des UGA-Codons befindet. Auf diese Weise wird, statt die Translation zu beenden, Sec in die wachsende Polypeptidkette eingebaut. Die anderen Komponenten dieser Recodierungs-Maschinerie sind die Sec-tRNA^{Sec}, die mit ihrem UCA-Anticodon das UGA-Codon erkennt, und der Translations-Elongationsfaktor SelB. SelB ist homolog zu EF1A/EF-Tu, bindet aber ausschliesslich Sec-tRNA^{Sec}. Ausserdem erkennt bakterielles SelB das SECIS-Element mit einer zusätzlichen vierten Domäne. Man nimmt an, dass in Archaeobakterien ein Adapterprotein das SECIS-Element erkennt, welches wiederum an diese Domäne bindet. Dieser Mechanismus konnte für SelB aus Säugetieren gezeigt werden. SelB ist also das Schlüsselmolekül für den Einbau von Selenocystein, indem es mit allen beteiligten Komponenten interagiert.

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurden die Röntgenstrukturen von archaeobakteriellem SelB in der GDP-, GppNHp- und der nukleotidfreien Form ermittelt. Bei allen drei SelB-Strukturen sind die Proteindomänen so angeordnet, dass sie der Konformation von EF-Tu:GTP sehr ähnlich sind. Nach der Bindung des GTP-Analogs GppNHp ändert sich bei SelB nur die Konformation der Switch 2 - Region in der GTPase-Domäne. Dadurch werden Aminosäuren, die bei EF-Tu:GTP an der Bindung des 5'-Phosphat-Endes der tRNA beteiligt sind, freigegeben. In der Aminoacyl-Bindetasche von SelB-Domäne II befinden sich zwei positiv geladene Aminosäuren: Sie sind *in vivo* für die Funktion von SelB wichtig und kompensieren wahrscheinlich die negative Ladung von Selenocystein. In Domäne III von SelB befindet sich eine kurze Insertion. Diese zusätzlichen Aminosäuren sind möglicherweise an basenspezifischen Interaktionen mit der tRNA^{Sec} beteiligt oder „messen“ den ausser-

gewöhnlich langen Akzeptor-Arm der tRNA^{Sec}. Domäne IV von SelB ist mit Domäne III flexibel verbunden und bildet eine tonnenförmige Struktur aus β -Faltblättern (*β barrel*). Die Gesamtstruktur von SelB ähnelt einem molekularen „Kelch“, einer Konformation, wie sie bisher nur bei Initiationsfaktor IF2/eIF5B beobachtet worden ist. Wird die Struktur von SelB ans Ribosom modelliert, zeigt Domäne IV in Richtung der mRNA-Eintrittsstelle und ist somit optimal positioniert, um mit dem SECIS-Element zu interagieren.