



Doctoral Thesis

Structural investigation of the GTPase activation in the E. coli SRP cycle

Author(s):

Schmitz, Nikolaus Balthasar

Publication Date:

2014

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-010222458> →

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. 21849

STRUCTURAL INVESTIGATION OF THE GTPASE
ACTIVATION IN THE *E. COLI* SRP CYCLE

A dissertation submitted to the

ETH Zurich

for the degree of

Doctor of Sciences of ETH Zurich (Dr. sc. ETH)

presented by

NIKOLAUS BALTHASAR SCHMITZ

Dipl. Biochem.

(Eberhard-Karls Universität Tübingen)

born: 23. August 1981

citizen of

Germany

accepted on the recommendation of:

Prof. Dr. Nenad Ban, examiner

Prof. Dr. Ulrike Kutay, co-examiner

2014

KURZFASSUNG

Proteine sind die Werkzeuge der Zelle. Ihre vielfältigen enzymatischen und strukturellen Eigenschaften erlauben es ihnen allerlei Funktionen sowohl innerhalb als auch ausserhalb der Zelle wahrzunehmen. Proteine können jedoch ihre zelluläre Aufgaben nur erfüllen, wenn sie zur richtigen Zeit an den richtigen Ort transportiert werden.

Insbesondere die korrekte Lokalisation von neu synthetisierten Proteinen stellt eine fundamentale Herausforderung für die Zelle dar. Die Proteinlokalisierung wird von einem molekularen Signal innerhalb der Aminosäuresequenz bestimmt. Fehlt ein solches Signal verbleibt das Protein im Zytosol der Zelle.

Der Signal-Erkennungspartikel (engl. Signal Recognition Particle: SRP) Zyklus ist ein universell konservierter Mechanismus, welcher den zielgerichteten Transport von Proteinen an deren Bestimmungsmembran vermittelt. Der SRP Zyklus findet sich in allen Lebewesen und ist sehr wahrscheinlich entwicklungsgeschichtlich gesehen das älteste Beispiel für einen solchen Mechanismus.

Während der Biosynthese des Proteins durch das Ribosom erkennt das SRP eine hydrophobe Signalsequenz am Aminoterminus. Der Signalerkennung folgt der Transport des Ribosomen-SRP Komplexes es zu der Membran des rauhen endoplasmatischen Retikulums in Eukaryoten oder zur Plasmamembran in Prokaryoten und Archäen.

An der Bestimmungsmembran bindet das Signalerkennungspartikel an den Signalerkennungspartikel-Rezeptor (SR). Daraufhin wird das naszierende Protein an einen Protein-transportierenden Kanal in der Membran (das Translokon) übergeben. Die Übergabe der naszierenden Kette ist an die GTP Hydrolyse von SRP und SR gekoppelt und stellt den zentralen Regulationspunkt im SRP-vermittelten Proteintransport dar.

Die Übergabe des Proteins an das Translokon wird durch eine dramatische Umlagerung des SRP-SR-Komplexes auf der molekularen Stufe ermöglicht. Bei dieser Umlagerung spielt die SRP RNS eine entscheidende Rolle. Die in dieser Arbeit beschriebene 3.9 Å Struktur des SRP-SR-Komplexes stellt die erste Beobachtung dieser Umlagerung dar und ermöglicht es die Rolle des distalen Teils der SRP RNS zu verstehen.

In der, ebenfalls beschriebenen, Nachfolge-Studie wird die hoch aufgelöste Kristallstruktur des Dimers der GTPasen von SRP und SR im

Komplex mit dem Tetraloop und dem distalen Teil der SRP RNS vorgestellt. Die Interaktion der GTPasen mit der SRP RNS am Tetraloop verdeutlicht die strukturelle Basis der SR-Rekrutierung und ergänzt bereits veröffentlichte, biochemische Daten.

Die atomare Struktur des Komplexes der GTPasen mit dem distalen Teil der SRP RNS und die darauf basierenden biochemischen Experimente demonstrieren, dass die Aktivierung der GTP Hydrolyse auf der Interaktion mit einer einzelnen ungepaarten Base der SRP RNS beruhen.

Die Aktivierung der GTPase Aktivität durch den distalen Teil der SRP RNS stellt einen eleganten molekularen Mechanismus dar, um die GTP Hydrolyse mit der Bereitstellung der vom Translokon benötigten Interaktionsflächen auf der ribosomalen Oberfläche zu koppeln. Unproduktive Abbrüche des Proteintransports, welche durch die frühzeitige Zersetzung von GTP verursacht werden, können so verhindert werden.

Die in dieser Arbeit präsentierten Forschungsergebnisse beleuchten die Schlüsselstellen der Regulation des SRP Zyklus. Ferner erweitern sie unsere Kenntnis über das elaborierte molekulare Wechselspiel zwischen dem Ribosom, dem SRP, dessen Rezeptor und dem Translokon. Dieses Wechselspiel ist für den erfolgreichen Proteintransport der Zelle unabdingbar und ist dadurch von zentraler Bedeutung für das Überleben jeder Zelle.

SUMMARY

Proteins are the tools of the cell. Their wealth of enzymatic and structural properties allows proteins to fulfil a plethora of functions inside and outside the cell. However, proteins can only attend their cellular functions, if they are transported to the correct location at the right time.

Especially the proper localization of newly synthesized proteins poses a fundamental challenge to the cell. The cellular localization of proteins is determined by a molecular signal in the amino acid sequence. Almost 40% of all proteins are targeted by a signal sequence to a specific location inside or outside of the cell. Absence of such a signal causes proteins to remain in the cytosol.

The Signal Recognition Particle (SRP) pathway is a universally conserved membrane protein targeting system, and most likely constitutes the evolutionary oldest mechanism for protein targeting.

The SRP recognizes a hydrophobic signal sequence in the amino terminus of a protein during biosynthesis by the ribosome. Upon signal recognition, the translating ribosome is targeted to the membrane of the endoplasmatic reticulum in eukaryotes. In bacteria and archea, the ribosome is targeted to the plasma membrane.

At the destination membrane, the SRP is bound by the SR and the newly synthesized polypeptide is transferred to a protein-conducting channel in the membrane, called translocon.

The handover of the nascent polypeptide from the SRP to the translocon is coupled to the hydrolysis of GTP by SRP and SR and constitutes the central regulatory point in SRP-mediated targeting.

At the molecular level, the process involves a large scale rearrangement of the SRP-SR complex, during which the SRP RNA plays a pivotal role in both receptor recruitment and GTPase activation. The 3.9 Å structure of a SRP-SR complex presented in this thesis has been the first observation of this rearrangement and allowed to rationalize the role of the conserved distal part of the SRP RNA.

In a, also presented, follow-up study we determined the high resolution crystal structure of SRP-SRP receptor GTPase heterodimers bound to distinct regions of the SRP RNA, namely the tetraloop and the distal site.

The interactions at the tetraloop reveal the structural basis of receptor recruitment and extend and explain previously accumulated biochemical data.

Biochemical experiments and the structure of the GTPase domain dimer bound to the distal region of the SRP RNA demonstrate that a single unpaired base of the SRP RNA is responsible for GTPase activation. This provides an elegant mechanism to ensure that the GTPase domains of SRP and SR liberate the binding site of the translocon on the ribosomal surface before GTP hydrolysis is triggered, thereby minimizing futile targeting cycles.

The findings presented in this thesis, shed light onto the key steps of regulation in the SRP targeting cycle and improve our understanding of the elaborate interplay between the ribosome, SRP, SRP receptor and translocon. This interplay plays a fundamental role in the process of protein localization in the cell and is therefore of utmost significance for the survival of the cell.