



Doctoral Thesis

Novel modes of protein-RNA recognition in post-transcriptional gene regulation studied by NMR spectroscopy

Author(s):

Oberstrass, Florian C.

Publication Date:

2007

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-005551205> →

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 Nr. 17441

**NOVEL MODES OF PROTEIN-RNA RECOGNITION
IN POST-TRANSCRIPTIONAL GENE REGULATION
STUDIED BY NMR SPECTROSCOPY**

A dissertation submitted to the
SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY ZURICH

for the degree of
Doctor of Sciences

presented by
FLORIAN C. OBERSTRASS

Dipl. Natw. ETH
born 17. October 1979
citizen of Switzerland

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Frédéric Allain, examiner
Prof. Dr. Nenad Ban, co-examiner
Prof. Dr. Bernhard Dichtl, co-examiner
Prof. Dr. Peter Wright, co-examiner

2007

SUMMARY

All information required for cellular life is encrypted by the genome. However the fate of each cell is determined by the expression of each single gene. Complex networks have evolved to ensure proper regulation of gene expression. Post-transcriptional gene regulation is guided by a large number of RNA binding proteins. Understanding molecular recognition is indispensable to properly interpret biological data, facilitates novel mechanistic models of molecular action and helps to design new experiments. Here we have investigated three recognition events by solving the solution structure of protein-RNA complexes by NMR spectroscopy. The Polypyrimidine Tract Binding protein (PTB) is a repressor of alternative splicing. Structure determination of its RNA Binding Domains (RBDs) bound to short pyrimidine tracts revealed the specificity of binding and an unusual contact between domains 3 and 4. This led to a new mechanistic model on how PTB is able to mediate splicing repression. In contrast to RBDs, protein-RNA binding of Sterile Alpha-Motif (SAM) domains is not at all structurally characterized. The structure of SAM-vts1p bound to the SRE RNA stem-loop for the first time sheds light into this novel recognition mode at the molecular level. The complex allowed refining the sequence consensus for recognition, which helps to identify new potential RNA transcripts regulated by vts1p. Binding occurs in a mainly shape-specific manner as only one nucleotide in the loop is base-specifically recognized. Shape specificity also dominates the interaction of the double stranded RNA Binding Motif 2 (dsRBM2) of the Adenosine Deaminase Acting on RNA 2 (ADAR2) and its RNA target. ADAR2 is able to site-specifically catalyze adenosine to inosine deamination in the R/G RNA stem-loop of the GluRB transcript and therefore changes the channel properties. The structure of the complex shows that dsRBM2 recognizes one of the A-C mismatches in the RNA stem-loop. Although binding of RNA-loops and perfect double stranded RNA (dsRNA) by dsRBMs have been investigated by structural methods, the recognition of irregularities in dsRNAs has never been characterized. Hence, our study serves as model for other dsRBM containing proteins binding irregular dsRNA. The three structural studies describe novel features for specific RNA recognition and reveal how large the variety of protein-RNA interactions is.

ZUSAMMENFASSUNG

Im Genom sind alle essentiellen Informationen des zellulären Lebens kodiert. Das Schicksal einer Zelle ist jedoch durch die Expression einzelner Gene bestimmt. Im Laufe der Evolution entwickelten sich komplexe Kontroll-Netzwerke, die die korrekte Regulierung der Gen-Expression gewährleisten. Post-transkriptionelle Gen-Regulierung wird von einer großen Anzahl RNA bindender Proteine gesteuert. Das Verstehen der zugrunde liegenden molekularen Erkennungsmechanismen ist unumgänglich für die richtige Interpretation biologischer Daten und hilft, neue Experimente zu entwickeln. In dieser Arbeit wurden die Erkennungsvorgänge von drei verschiedenen RNA-bindenden Proteinen untersucht und die Strukturen der entsprechenden Protein-RNA Komplexe mittels flüssig-NMR gelöst. Das Polypyrimidin-Tract bindende Protein (PTB) unterdrückt das Spleissen alternativer Exons. Die Struktur seiner RNA bindenden Domänen (RBDs) im Komplex mit kurzen Pyrimidin-Tracts zeigt die Spezifität der Interaktion. Ebenfalls konnte ein ungewöhnlicher Kontakt zwischen den Domänen 3 und 4 beobachtet werden. Basierend auf diesen Daten konnten wir ein neues Modell herleiten, wie PTB Spleissen unterdrückt. Im Gegensatz zu den RBDs ist die Protein-RNA Binding von Sterile α -Motif (SAM) Domänen strukturell nicht charakterisiert. Die Struktur von SAM-vts1p gebunden mit dem SRE RNA Stem-Loop bringt erstmals Licht in diesen neuen Erkennungsmechanismus auf molekularer Ebene. Der Komplex erlaubt eine Präzisierung der Konsensus-Sequenz für die RNA Erkennung und erlaubt die Identifikation von Transkripten, die möglicherweise durch vts1p reguliert werden. Der Bindungs-Mechanismus ist überwiegend Form-spezifisch, nur ein Nukleotid im Loop wird Basenspezifisch erkannt. Form-Spezifität dominiert auch die Interaktion des Doppel-Strang RNA bindenden Motivs 2 (dsRBM2) von ADAR2 (Adenosine Deaminase Acting on RNA) und seiner Ziel-RNA. ADAR2 katalysiert Ort-spezifisch die Desaminierung von Adenosin zu Inosin im R/G stem-loop des GluRB Transkriptes. Damit werden die Eigenschaften des Kanals geändert. Die Struktur des Komplexes zeigt, wie dsRBM2 eine A-C Fehlpaarung im RNA Stem-Loop erkennt. Obwohl RNA-Loops- und perfekte Doppel-Strang RNA (dsRNA) - dsRBM Bindungen bereits mittels struktureller Methoden

untersucht worden sind, ist die Erkennung von Unregelmäßigkeiten in dsRNAs noch nicht charakterisiert. Demzufolge kann unsere Studie als Modell, für andere dsRBMs besitzende Proteine herangezogen werden, die irreguläre dsRNAs binden. Diese Arbeit beschreibt neue Eigenschaften der Protein-RNA Erkennung und die grosse Bandbreite der möglichen Interaktionen.