

Structural and functional investigation of tRNA modifying enzymes: from simple methylation to complex wobble modification

M. Sc. Marcus Fislage

Promoter: Prof. Dr. Wim Versées

Transfer RNA (tRNA) is one of the key molecules in the translation of the 3-letter code used in DNA and mRNA into the 1-letter code used in proteins. For an efficient translation process tRNA needs to undergo various modifications of its nucleotides. These modifications influence (I) the correct structure of the tRNA, (II) the attachment of the correct amino acid onto the tRNA and (III) the correct recognition of the mRNA codon. These modifications exist throughout the whole tRNA molecule and range from simple methylations to complex multi-carbon modifications. The latter hypermodifications are especially prevalent at the so-called wobble position of the tRNA, which is directly interacting with the third codon nucleotide. Lack of these modifications is often related to human disease and therefore it is important to understand the proteins and protein complexes that are responsible for the formation of these modifications.

In this PhD thesis we focused on three different proteins/protein complexes, responsible for three different nucleotide modifications. In the first part we solved the structure of the m²G6-methyltransferase TrmN/Trm14 from two different kingdoms of life using X-ray crystallography. We revealed how the substrate guanosine is bound in the active site of the methyltransferase domain and showed for the first time how tRNA can be bound by the THUMP domain of these proteins. In future studies these structures might be invaluable tools to unravel the specificity determinants underlying correct tRNA recognition and modification. In the second part of the thesis we analyzed the GDP/GTP dependent complex formation of MnmE and MnmG using small angle X-ray scattering (SAXS). MnmE and MnmG are the enzymes responsible for the cmnm⁵ modification of wobble uridine (5-carboxymethylaminomethyl-uridine). We created snapshots of different complexes that help to understand the interplay between MnmE, MnmG and tRNA. In the third and last part of the thesis we focused on Elp3. This is one subunit of the six protein Elongator complex, which is not only involved in the mcm⁵ modification of wobble uridine (5-methoxycarbonylmethyl-uridine) but also acetylates histone H3, thereby influencing also transcription. We were the first able to purify Elp3 and showed that Elp3 is capable on its own to acetylate its known target histone H3 and a novel target called Bruchpilot (BRP).

Structureel en functioneel onderzoek van tRNA-modificerende eiwitten: van eenvoudige methylering tot complexe wobblemodificaties

M. Sc. Marcus Fislage

Promotor: Prof. Dr. Wim Versées

Transfer RNA (tRNA) is één van de belangrijkste moleculen voor de vertaling van de 3-letter code die gebruikt wordt in DNA en mRNA naar de 1-letter code gebruikt in proteïnen. Voor een efficiënt vertalingproces is het nodig dat tRNA verschillende modificaties van zijn nucleotiden ondergaat. Deze modificaties beïnvloeden (I) de correcte structuur van het tRNA, (II) het vasthechten van het correcte aminozuur op het tRNA en (III) de correcte herkenning van het mRNA-codon. Deze modificaties zijn verspreid over het hele tRNA-molecule en gaan van simpele methyleringen tot complexe modificaties van meerdere carbon atomen. Deze laatste hypermodificaties zijn voornamelijk aanwezig op de zogenoemde wobblepositie van het tRNA, welke direct interageert met het derde nucleotide van het codon. Een gebrek aan deze modificaties wordt vaak in verband gebracht met menselijke ziekten en het is daarom belangrijk om de eiwitten en de eiwit-complexen die verantwoordelijk zijn voor het aanbrengen van deze modificaties te begrijpen.

In dit doctoraatswerk focusten we ons op drie verschillende eiwit/eiwit complexen, welke verantwoordelijk zijn voor drie verschillende nucleotidemodificaties. In het eerste deel hebben we de structuur van het m²G6-methyltransferase TrmN/Trm14 afkomstig van twee verschillende domeinen van het leven bepaald met behulp van X-stralen kristallografie. We onthullen hoe het substraat guanosine gebonden is in de actieve site van het methyltransferasedomein en tonen voor het eerst hoe tRNA gebonden kan worden door het THUMP-domein van deze eiwitten. In toekomstige studies kunnen deze structuren mogelijk handige hulpmiddelen zijn om de specifieke determinanten te ontdekken die aan de basis liggen van correcte tRNA herkenning en modificatie. In het tweede deel van deze thesis hebben we de GDP/GTP afhankelijke complexvorming van MnmE en MnmG geanalyseerd met behulp van “small angle X-ray scattering” (SAXS). MnmE en MnmG zijn de eiwitten die verantwoordelijk zijn voor de cmnm⁵ modificatie van de wobble uridine (5-carboxymethylaminomethyl-uridine). We maakten snapshots van verschillende complexen die helpen om de wisselwerking tussen MnmE, MnmG en tRNA te begrijpen. In het derde en laatste deel van de thesis legden we de nadruk op Elp3. Dit is een subeenheid van de zes eiwitten van het Elongatorcomplex, wat niet alleen betrokken is bij de mcm⁵ modificatie van wobble uridine (5-methoxycarbonylmethyl-uridine), maar wat ook histon H3 acetyleert en hierdoor ook transcriptie beïnvloedt. We konden als eerste Elp3 zuiveren en toonden aan dat Elp3 op zichzelf in staat is zijn gekende target H3, en daarnaast ook een nieuw target, Bruchpilot (BRP) genaamd, te acetyleren.