

Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta
Charles University in Prague, Faculty of Science

Katedra genetiky a mikrobiologie
Department of Genetics and Microbiology



Dipl.-Biol. Susan Wagner

Funkční a biochemická charakterizace eIF3 a eIF3j v
***Saccharomyces cerevisiae* a lidských buňkách**

Functional and biochemical characterization of eIF3 and
eIF3j in *Saccharomyces cerevisiae* and human cell lines

Autoreferát disertační práce
Summary of the PhD thesis

Školitel: Leoš Shivaya Valášek, Ph.D.
Supervisor: Leoš Shivaya Valášek, PhD

Akademie věd, Mikrobiologický ústav
Academy of Sciences of the Czech Republic, Institute of Microbiology

Praha, Prague 2014

Obsah - Content

česká verze

Abstrakt.....	3
Úvod.....	4
Cíle práce.....	5
Seznam metod.....	5
Výsledky a diskuse	6
Závěry.....	9

english version

Abstract.....	10
Introduction.....	11
Aims of the study.....	12
List of methods.....	12
Results and discussion.....	13
Conclusions.....	16

Seznam publikací I-V - List of publications I-V.....	17
--	----

Curriculum Vitae	18
------------------------	----

Seznam použité literatury - References.....	20
---	----

Abstrakt

Translace se dělí na iniciaci, elongaci, terminaci a recyklaci ribozómů. Eukaryotický iniciační faktor 3 (eIF3) je jeden z největších iniciačních faktorů (eIF) a hraje důležitou roli ve většině reakcí během iniciace translace. Byl taktéž spojován s fází recyklace ribozómů. Nyní jsme však objevili jeho další funkci, a to v terminaci translace v kvasinkách, kde komplex eIF3 a jeho nestechiometricky vázaná podjednotka eIF3j/HCR1 ovlivňují terminaci translace a působí na rozpoznání STOP kodónu antagonisticky.

Taktéž jsme charakterizovali funkci eIF3j v iniciaci translace. Strukturní analýza ukázala vazbu mezi evolučně konzervovaným tryptofanem v N-koncovém kyselém motivu (NTA) lidského eIF3j a hydrofóbní kapsou v RNA rozpoznávajícím motivu (RRM) lidského eIF3b. Tato vazba je konzervovaná rovněž v kvasinkách, kde zajišťuje dostatečnou vazbu eIF3 na 40S ribozomální podjednotku. Má vliv na přesnost rozpoznání počátečního kodónu AUG, přičemž se zdá, že j/HCR1 při tom spolupracuje s eIF1A. Zjistili jsme, že první polovina eIF3j/HCR1 je v kvasinkách dostačující pro zajištění všech funkcí celého proteinu, které jsou zapotřebí pro růst přirozeného kmenu. Druhá polovina pak obsahuje evolučně konzervovaný specifický motif KERR, který je taktéž obsažen v HCR1-like doméně podjednotky a/TIF32. Tato část j/HCR1 dokáže suprimovat defekty růstu, které jsou spojeny s mutacemi motivu KERR právě v podjednotce a/TIF32. Dále se díky naší detailní analýze ukázalo, že funkce eIF3j/HCR1 v terminaci translace je mnohem kritičtější pro optimální proliferaci buněk než jeho funkce v iniciaci translace.

Námi provedené mapování vazby eIF3j/HCR1 na povrch ribozómu ukázalo, že tato podjednotka specificky interaguje s ribozomálními proteiny malé ribozomální podjednotky RPS2 a RPS23, které jsou umístěny v blízkosti vstupního místa pro mRNA. Toto zjištění koresponduje s dřívější studií, která mapovala vazbu lidského eIF3j na ribozóm pomocí hydroxylových radikálů.

Nakonec, za použití RNAi, jsme snížili množství podjednotky eIF3j ve dvou lidských buněčných liniích a zjistili jsme, že překvapivě toto snížení nemá vliv na efektivitu translace ani na růst. To může znamenat, že eIF3j hraje v savčích buňkách méně důležitou roli než jeho homolog v kvasinkách. Naopak snížení eIF3c nebo eIF3a vedlo ke snížení dalších podjednotek komplexu eIF3, nikoliv jejich mRNA. Tím došlo k desintegraci celého komplexu, což mělo za následek snížení rychlosti translace a postižena byla i buněčná proliferace. Na základě toho předpokládáme, že podjednotky eIF3a a eIF3c ovlivňují množství a složení lidských komplexů eIF3. Na druhou stranu úplný rozpad komplexu eIF3 po snížení eIF3a nijak neovlivnil vazbu eIF3j na 40S *in vivo*. Na základě těchto a dalších poznatků si myslíme, že by zařazení proteinu eIF3j/HCR1 mezi podjednotky komplexu eIF3 mělo být přehodnoceno.

Úvod

Klasická dráha iniciace translace se skládá z několika na sebe navazujících kroků. Začíná postupným navázáním iniciátorové tRNA ($\text{Met-tRNA}_i^{\text{Met}}$) a mRNA na malou ribozomální podjednotku 40S, poté dochází ke skenování 5' nepřekládané oblasti mRNA od čepičky ve směru 5'-3', dokud nedojde k rozpoznání iniciačního kodónu AUG. Na závěr dochází k navázání podjednotky 60S (shrnutí v [1], [2]). Všechny tyto kroky probíhají za účasti řady proteinů zvaných eukaryotické iniciační faktory (eIFs). Největším z nich, s molekulovou hmotností 800 kDa, je eukaryotický iniciační komplex 3 (eIF3), který se účastní prakticky všech kroků iniciace translace. Zabraňuje předčasnému spojení ribozomálních podjednotek a hraje důležitou roli při procesu reiniciace. Před navázáním na ribozóm se eIF3 váže spolu s eIF1, eIF5 a ternárním komplexem ($\text{eIF2-GTP} + \text{Met-tRNA}_i^{\text{Met}}$), čímž vzniká takzvaný multifaktorový komplex (MFC), který pravděpodobně usnadňuje formaci a zlepšuje stabilitu preiniciačních komplexů (PICs) ([3]–[5]).

Ve srovnání s iniciační fází není terminační fáze translace ještě dostatečně popsána a v současnosti je známo pouze několik terminačních faktorů (shrnutí v [6], [7]). Eukaryotický release faktor (eRF) 1 je tvarově podobný tRNA a váže se do A místa ribozómu, kde s pomocí eRF3 a RLI1 stimuluje uvolnění peptidového řetězce ([8]–[11]). Poté musí být postterminační komplexy recyklovány na volné ribozomální podjednotky, které mohou vstoupit do dalšího cyklu translace. eIF3 se spolu s eIF1 a eIF1A účastní recyklace ribozomálních podjednotek, jak bylo ukázáno v savčích buňkách, a spojují tak první a poslední fázi translace ([12]).

Proteinový komplex eIF3 se skládá z 12+1 různých podjednotek u savců (eIF3a-m a eIF3j podjednotka, která se váže k eIF3 komplexu pouze slabě) a 5+1 podjednotek u kvasinky *Sacharomyces cerevisiae* (a/TIF32, b/PRT1, c/NIP1, g/TIF35, i/TIF34 a slabě navázaná podjednotka j/HCR1) (shrnutí v [13]). Všechny kvasinkové podjednotky eIF3 mají ortology v savčím eIF3 a zdá se, že pět podjednotkový kvasinkový komplex reprezentuje minimální eIF3 komplex všech eukaryot a tím i jádro eIF3 ([14]). Analýza lidského eIF3 pomocí hmotnostní spektrometrie ukázala, že se skládá ze tří modulů. Modul (i) obsahuje, s výjimkou jedné, všechny podjednotky kvasinkového eIF3 (a, b, g, i); modul (ii) zahrnuje podjednotky eIF3c, d, e, k, l; modul (iii) tvoří podjednotky f, h a m. Tyto moduly jsou propojeny pomocí vazby eIF3c (kvasinkový c/NIP1) na eIF3b a eIF3h ([15]). Kryoelektronová mikroskopie purifikovaného lidského eIF3 ukázala antropomorfní strukturu s pěti výběžky, které byly popsány jako hlava, pravá a levá ruka a noha ([16]). Přestože je kvasinkový eIF3 výrazně menší než lidský eIF3, jeho struktura ani v nízkém rozlišení nebyla ještě publikována. Nicméně pomocí řady vazebných experimentů a mutační analýzy byl vytvořen provizorní model kvasinkového eIF3, kde b/PRT1 slouží jako základní strukturní podjednotka eIF3, která interaguje se všemi ostatními podjednotkami včetně j/HCR1 ([17], [18]).

Cíle práce

Cílem této práce bylo objasnit funkce podjednotky j/HCR1 při procesu translace, včetně jejích interakcí s ostatními podjednotkami eIF3, konkrétně s b/PRT1 a a/TIF32, a porovnat role této podjednotky eIF3 v kvasinkách a lidských buňkách. Dále jsme vytvořili několik nových experimentálních procedur, dovolujících nám zkoumat funkci jednotlivých podjednotek eIF3 při iniciaci translace *in vivo* v lidských buněčných kulturách.

Konkrétně naším cílem bylo popsat

- 1 funkce j/HCR1 při translaci v *Saccharomyces cerevisiae*
- 2 interakce mezi j/HCR1 a RNA rozpoznávajícím motivem (RRM) eIF3b
- 3 interakce mezi j/HCR1 a a/TIF32, která obsahuje HCR1-podobnou doménu (HLD)
- 4 funkci j/HCR1 při iniciaci translace v lidských buňkách, HeLa a HEK293, za použití snížení jeho exprese pomocí RNA interference
- 5 funkce 3a a 3c při iniciaci translace v lidských buňkách, HeLa a HEK293, za použití snížení jejich exprese pomocí RNA interference

Seznam metod

- organismy: lidské buňky HeLa a HEK293 a kvasinka *Saccharomyces cerevisiae*
- buněčná extrakce
- extrakce RNA
- analýza preiniciačních komplexů a mRNA vazebná analýza
- Analýza polyzomových profilů
- SDS-PAGE a Western blot analýza
- Analýza inkorporace -methioninu ³⁵S
- koimmunoprecipitace
- Pull-down* analýza
- beta-galaktozidázová a Dualní luciferázová analýza
- PCR a *real-time* kvantitativní PCR

Výsledky a diskuse

Funkce eIF3j v iniciaci translace

Podjednotka j/HCR1 je jediná podjednotka kvasinkového komplexu eIF3, jejíž delece není letální a působí pouze fenotyp zpomaleného růstu ([19]), u kterého se předpokládalo, že je způsoben defekty v integritě MFC ([17]) a vazbě eIF3 komplexu na ribozóm ([20]). Ukázali jsme, že ztráta j/HCR1 též vede k vážnému defektu v rozpoznání prvního kodónu AUG, neboť došlo k sedminásobnému zvýšení frekvence jeho vynechání. Tento defekt bylo možné částečně suprimovat nadprodukováním eIF1A (publikace I). Je zajímavé, že eIF1A spolu s eIF1 byly ukázány jako faktory, které společně řídí výběr správného místa pro započítání translace ([21],[22]). *In vitro* experimenty provedené ve Fraser et al. ([23]), kde použili vypurifikované lidské faktory eIF3j a eIF1, ukázaly, že oba tyto faktory se váží kooperativně do A místa ribozomální podjednotky 40S. Nicméně, přínos podjednotky eIF3j k tomuto procesu bude nejspíše pouze stimulační, neboť se jedná u kvasinek o neesenciální gen a v lidských buněčných liniích HeLa a HEK293 jeho snížení nemělo žádný měřitelný efekt na rozpoznání prvního kodónu AUG, nebo efektivitu translace vůbec (publikace V). Jinými slovy, zdá se, že kvasinkový j/HCR1 hraje důležitější roli v iniciaci translace než jeho savčí ortolog.

Další důležitá role lidské podjednotky 3j je stimulace vazby celého komplexu eIF3 na ribozomální podjednotku 40S, která byla odvozena z *in vitro* studií ([24]). My jsme ukázali, že snížení množství podjednotky 3j neovlivňuje ani integritu komplexu eIF3, ani vazbu komplexu eIF3 na podjednotku 40S *in vivo*. To naznačuje, že role této podjednotky na vazbu komplexu eIF3 na ribozóm je méně stimulačního rázu ve vyšších eukaryotech než v kvasinkách. Tedy pokud taková role zde vůbec existuje, není rozhodně důležitá. Nejnovější studie zaměřené na vazbu podjednotky 40S *in vitro* též nepotvrdily významný přínos podjednotky 3j na vazebnou afinitu celého komplexu eIF3 na ribozomální podjednotku 40S ([25]).

Vazba podjednotky eIF3j na ribozomální podjednotku 40S

Je známo, že eIF3j se váže na ribozomální podjednotku 40S nezávisle na zbytku komplexu eIF3 v nižších i ve vyšších eukaryotech ([24],[26]). Naše práce (publikace V) ukázala poprvé *in vivo*, že vazba podjednotky eIF3j na ribozóm 40S nebyla nikterak ovlivněna, poté co došlo k úplné dezintegraci komplexu eIF3 a též preiniciačního komplexu 43-48S. Vazebné místo eIF3j na podjednotce 40S se zdá být evolučně zachováno od kvasinek po lidské buňky. Zjistili jsme, že kvasinková podjednotka j/HCR1 se váže na ribozomální proteiny RPS2 a RPS23 přes motiv KERR na jejím C-konci (publikace I). Ribozomální proteiny RPS2 a RPS23 se přitom na ribozómu nachází proti sobě okolo vstupního místa pro mRNA. Tato vazebná pozice odpovídá předpokládané roli podjednotky j/HCR1 v rozpoznání prvního kodónu AUG i její funkci během terminace translace, jak bude podrobněji probráno v dalších částech textu.

Vazba motivu NTA v eIF3j na doménu RRM v eIF3b

Zjistili jsme, že N-koncová polovina kvasinkového j/HCR1, která váže RNA rozpoznávající motiv (RRM) podjednotky eIF3b jak v kvasinkách, tak v savčích buňkách ([27],[17]), je dostatečná pro růst přirozeného kmene a správné rozpoznání prvního kodónu AUG (publikace I). Získali jsme pomocí NMR strukturu vazby mezi lidským eIF3-RRM a minimálním N-koncovým peptidem podjednotky eIF3j. Evolučně konzervovaný tryptofanový zbytek (Trp52) zapadá do hydrofobní kapsy domény RRM podjednotky eIF3b, která je tvořena helixem $\alpha 1$ a obrátkou L5. Mutováním klíčových aminokyselinových zbytků pro tuto interakci v kvasinkovém b/PRT1 a j/HCR1 se zcela narušila vazba. To naznačuje, že způsob vazby těchto faktorů je evolučně konzervován od kvasinek až po savce (publikace I). Efekt těchto mutací *in vivo* mimikoval výsledek delece *hcr1*, protože ony mutace způsobovaly zpomalení růstu a špatné rozpoznání prvního kodónu AUG (publikace I). To prokázalo důležitost této vazby pro správné fungování j/HCR1 v iniciaci translace. Později skupina Ralfa Ficnera ([28]) získala krystalickou strukturu kvasinkového b/PRT1-RRM a předpokládala, že způsob vazby b/PRT1-RRM a j/HCR1-NTA je stejný jako u lidských buněk.

Vazba j/HCR1-CTD a a/TIF32-CTD

Polovina proteinu j/HCR1 na C-konci se přímo váže na NTD a CTD podjednotky a/TIF32. Zamezení tomuto kontaktu, buď mutacemi v motivu KERR u j/HCR1, nebo výměnou specifické části Box6, vedlo ke ztrátě celého j/HCR1 z MFC. To ale nijak neinterferuje s efektivitou iniciace translace (publikace II). Z tohoto zjištění vyplývá, že j/HCR1 v MFC není potřeba pro správné fungování v buňce.

Ve vazebném trojúhelníku b/PRT1-RRM-j/HCR1-a/TIF32 se zdá, že kontakt j/HCR1-NTA s RRM podjednotky eIF3b je důležitější než kontakt j/HCR1 a a/TIF32. Druhý z těchto kontaktů se stane rozhodující, když doména HLD podjednotky a/TIF32, zvláště pak motiv KERR, nebo Box6, je nefunkční. V tomto případě se zdá, že motiv KERR, či Box6 v podjednotce j/HCR1 může buď převzít funkce domény HLD v a/TIF32, nebo stabilizovat a/TIF32 v celém komplexu eIF3.

Funkce eIF3j v terminaci translace.

Lidský komplex eIF3 byl nedávno zmíněn ve vztahu k fázi recyklace postterminačních ribozómů, během které dochází k uvolnění ribozomálních podjednotek pro jejich použití v další iniciaci translace ([12]). My jsme zjistili, že eIF3 a j/HCR1 v kvasinkách ovlivňují terminaci translace opačným způsobem. Delece j/HCR1 zvyšuje frekvenci pročitání na stop kodónu, zatímco mutace ve zbylých podjednotkách komplexu eIF3 tuto frekvenci snižují (publication IV). Nadprodukce proteinu RLI1, vazebného partnera j/HCR1, plně obnovila růstový fenotyp a zvýšené pročitání stop kodónu v delečním kmeni *hcr1*. Na druhou stranu nijak neovlivnila špatné rozpoznání prvního kodónu AUG a defekty spojené se snížením vazby komplexu eIF3 na 40S ribozomální podjednotku. To nás přivádí k několika závěrům. 1)

RLI1 a j/HCR1 hrají roly během terminace. 2) j/HCR1 je důležitější pro buňku během terminace než během iniciace. 3) Mechanismy, se kterými j/HCR1 reguluje rozpoznání prvního kodónu AUG a stop kodónu, se od sebe liší. Poslední z těchto bodů je dále podpořen zjištěním, že nadprodukce faktoru eIF1A částečně suprimuje zhoršení rozpoznání prvního kodónu AUG, ale nijak neovlivňuje defekt v terminaci (publikace IV). Ve světle nových zjištění jsme tedy postulovali nový model terminace translace, kde se eRF1 a 3 společně s eIF3 a j/HCR1 váží na pTC, buď společně, nebo odděleně. Vzhledem k nalezení vazby g/TIF35 a i/TIF34 s eRF1 je možné, že eIF3 reguluje rozpoznání stop kodónu přímo (publikace IV). Po rozpoznání stop kodónu, které se spojuje s hydrolýzou GTP na eRF3, může j/HCR1 pomáhat odpoutání eRF3 z komplexu, neboť jsme detekovali akumulaci eRF3 ve vyšších polysomálních frakcích v delečním kmeni *hcr1*. Takovéto odpoutání eRF3 z komplexu vytvoří prostor pro vazbu RLI1, který pak stimuluje faktor eRF1 při odštěpování vzniklého peptidu. j/HCR1 možná stimuluje i tento krok, vzhledem k tomu, že se přímo váže na RLI1.

Podjednotky 3a a 3c kontrolují expresi ostatních podjednotek lidského eIF3

Pomocí siRNA byla v lidských buněčných liniích HeLa a HEK293 snížena exprese eIF3c, což vedlo nejen k dramatickému poklesu hladiny proteinu eIF3c, ale také k poklesu hladin dalších podjednotek eIF3 z modulu (ii) (d, e, k, l) a k výraznému bloku buněčné proliferace. Jelikož hladiny mRNA těchto podjednotek zůstaly nezměněny, zdá se, že eIF3c reguluje expresi těchto podjednotek na translační nebo posttranslační úrovni. Tento efekt také vede k separaci zbývajících dvou modulů. Samostatný modul (i) (a, b, g, i), který připomíná jádro kvasinkového eIF3, si zachoval značnou vazebnou afinitu k podjednotce 40S a umožnil vazbu mRNA, zatímco efektivita vazby modulu (iii) (f, h, m) na podjednotku 40S byla výrazně snížena. Tyto výsledky naznačují, že role podjednotek jádra eIF3 zůstala evolučně konzervovaná.

Snížení exprese eIF3a mělo podobný efekt jako snížení exprese eIF3c, ale navíc byly sníženy také hladiny podjednotek modulu iii, a modul i se rozpadl na b-g dimer a samostatný eIF3i (publikace V). Následkem toho byla téměř kompletně eliminována vazba eIF3 a mRNA na ribozomální podjednotku 40S a buňky opůsobené siRNA proti eIF3a přestaly proliferovat. Rozpad trimerního komplexu b-g-i byl spíše překvapivý, jelikož kvasinkové podjednotky g/TIF35 a i/TIF34 interagují nejen se sebou navzájem, ale také s C-terminální doménou b/PRT1 (publikace III). Nicméně nedávná studie Zhangovy laboratoře ([29]) ukázala, že lidský eIF3b a eIF3i se váží na spektrinovou doménu eIF3a, zatímco eIF3g se váže pouze na C-terminální doménu eIF3b, což výrazně podpořilo správnost našich výsledků. Tyto překvapivé výsledky budou pravděpodobně potřebovat další potvrzení, jelikož indikují významnou reorganizaci jádra eIF3 během evolučního vývoje.

Závěry

Popsali jsme pomocí NMR strukturu vazby RRM domény lidského eIF3b s minimálním N-terminálním peptidem lidského eIF3j a pomocí mutační analýzy jsme ukázali, že tato interakce je evolučně konzervovaná.

Identifikovali a popsali jsme funkci j/HCR1 při rozpoznání iniciačního kodónu AUG u kvasinek, kterou provádí ve spolupráci s eIF1A a b/PRT1-RRM.

Identifikovali jsme přímý kontakt mezi j/HCR1-CTD a RPS2 a RPS23, který naznačuje umístění j/HCR1 v blízkosti vstupního kanálu pro mRNA na ribozomální podjednotce 40S, což je v souladu s místem vazby lidského eIF3j na podjednotce 40S navrženým dříve.

Ukázali jsme, že N-terminální polovina j/HCR1 je dostatečná pro zajištění růstu a všech funkcí v translaci; postradatelná C-terminální polovina HCR1 se stává kritickou pouze za situace, kdy je homologní HLD doména v a/TIF32 funkčně vyřazena.

Objevili jsme, že j/HCR1 společně s eIF3 a RLI1 hrají důležitou roli během terminace translace a rozpoznání stop kodónu. Tato role j/HCR1 je důležitější pro běžnou buněčnou proliferaci než jeho role v iniciaci translace. Regulační mechanismy jeho funkcí v iniciaci a terminaci translace jsou zcela odlišné.

Kvasinkový j/HCR1 se zdá mít důležitější roli, než jeho lidský ortolog, protože i silné snížení eIF3j ve dvou lidských buněčných liniích nemělo žádný zřetelný efekt na rychlost translace a buněčnou proliferaci.

Vzhledem k našim zjištěním, že lidský eIF3j zůstává navázán na 40S ribozomální podjednotku i po úplném rozložení komplexu eIF3 a že se jedná o nestechiometrickou podjednotku komplexu eIF3 a z komplexu jednoduše disociuje během rozličných izolací komplexu, jsme navrhli, aby bylo přehodnoceno zařazení proteinu eIF3j jako podjednotky komplexu eIF3.

Podjednotky 3a a 3c lidského eIF3 regulují expresi a sestavení celého komplexu eIF3.

Modul (i) lidského eIF3, který odpovídá jádru komplexu kvasinkového eIF3, má i po rozpadu komplexu stále schopnost vázat ribozomální podjednotku 40S a podpořit navázání mRNA na preiniciační komplex 43S, zatímco schopnost správně rozpoznat první kodón AUG byla ztracena.

Abstract

Translation is divided into initiation, elongation, termination and ribosome recycling. One of the largest eukaryotic initiation factors (eIF), eIF3, plays a role in nearly all steps of initiation and was recently also implicated in ribosomal recycling. Here we uncovered novel roles for eIF3 in translation termination in yeast, where the five core eIF3 subunits and their loosely associated eIF3j/HCR1 accessory factor control stop codon read-through in the opposite manner.

In addition, we further characterized the function of eIF3j in initiation. Structural analysis revealed that the conserved tryptophan residue in the human eIF3j N-terminal acidic motif (NTA) is held in the hydrophobic pocket of the human eIF3b RNA recognition motif (RRM). This binding mode was shown to be conserved in yeast ensuring efficient 40S-binding by eIF3 and stringency of AUG recognition, where j/HCR1 seems to co-operate with eIF1A. We found that the N-terminal half of eIF3j/HCR1 in yeast is sufficient for fulfilling all functions of the full-length protein necessary for wild-type growth. Despite the logical dispensability of the eIF3j/HCR1 C-terminal half, it was shown that it bears a specific KERR motif that is evolutionary conserved and contained also within the HCR1-like domain of α /TIF32, through which it physically and functionally interacts with α /TIF32 and is able to suppress growth defects associated with mutations in the KERR motif of α /TIF32. Strikingly, our detailed analysis demonstrated that the termination function of yeast eIF3j/HCR1 is more critical for optimal proliferation than its function in translation initiation.

Our efforts to map the binding site of eIF3j/HCR1 on the ribosomal surface then revealed that it specifically interacts with small ribosomal proteins RPS2 and RPS23 located in the vicinity of the mRNA entry channel, which is consistent with an earlier study mapping the ribosomal binding site for human eIF3j by hydroxyl radical probing.

Finally, using the fashionable RNAi approach we down-regulated eIF3j in two human cell lines and discovered that it surprisingly had barely any consequences on translational rates as well as growth, suggesting that eIF3j in mammals has minor importance than its yeast counterpart. In contrast, down-regulation of eIF3c or eIF3a reduced protein but not mRNA levels of many other eIF3 subunits besides eIF3c and eIF3a and thus disintegrated the whole eIF3 complex, leading to severe reduction in translational rates and retarded cell proliferation. Hence, we propose that eIF3a and eIF3c control abundance and assembly of the entire human 12-subunit eIF3 complex. Complete disassembly of eIF3 upon eIF3a down-regulation did not influence the binding of eIF3j to the 40S *in vivo*. Based on these and other observations we suggest that the assignment of eIF3j/HCR1 as a *bona fide* eIF3 subunit should be reconsidered.

Introduction

The canonical pathway of translation initiation involves sequential binding of the initiator tRNA (Met-tRNA_i^{Met}) and mRNA to the 40S small ribosomal subunit, scanning along the 5' untranslated region from mRNA's 5' cap in the 5'→3' direction until the AUG start codon has been recognized and finally joining of the 60S subunit (reviewed in [1], [2]). All these steps are facilitated by numerous eukaryotic initiation factors (eIFs). Among them, eIF3 is with its 800 kDa molecular mass the largest one, implicated in practically all steps of translation initiation including prevention of pre-mature subunit joining and reinitiation. eIF3 assembles together with eIF1, eIF5 and the ternary complex (eIF2-GTP + Met-tRNA_i^{Met}) into the so called multi factor complex (MFC) before coming to the 40S ribosome, most likely to enhance the formation and stability of the pre-initiation complexes (PICs) ([3]–[5]).

Compared to the initiation phase the termination of translation is only poorly described and not many factors involved are known yet (reviewed in [6], [7]). The eukaryotic release factor (eRF) 1 mimics tRNA and binds to the ribosomal A site and leads with the help of eRF3 and RLI1 to peptide release ([8]–[11]). Following, the post-termination complexes (pTCs) need to be disassembled/recycled in order to release free ribosomal subunits for a new round of initiation. eIF3, together with eIF1 and eIF1A, were shown to facilitate these recycling steps, at least in mammals, linking the last and first phase of translation ([12]).

eIF3 comprises 12+1 non-identical subunits in mammals (eIF3a-m with eIF3j only loosely associated) and 5+1 subunits in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* (a/TIF32, b/PRT1, c/NIP1, g/TIF35, i/TIF34 and loosely associated j/HCR1) (reviewed in [13]). All yeast subunits have orthologous in the mammalian eIF3 and it seems that the 5 subunit complex of yeast resembles the minimal eIF3 complex in all eukaryotes and therefore the eIF3 core ([14]). Mass spectrometric analysis of human eIF3 revealed that it comprises three modules. Module i contains all but one yeast eIF3 core subunits (a, b, g, i), module ii comprises eIF3c, d, e, k and l, and module iii is made of eIF3f, h and m. These modules are linked through eIF3c (yeast c/NIP1) by its interaction with b and h subunits ([15]). A low resolution cryo-electron microscopy reconstruction of purified human eIF3 revealed a 5-lobbed particle with a head and left and right arms and legs ([16]). Even though the yeast eIF3 is much smaller than its human counterpart, there is not even a low resolution structure of this factor as whole available. Nevertheless, a variety of binding assays together with mutational analysis provided a provisional model of the yeast eIF3 wherein b/PRT1 is regarded as the scaffold, which makes contacts with all other eIF3 subunits including j/HCR1 ([17], [18]).

Aims of the study

The major aim of this study was to elucidate the function of j/HCR1 in the entire process of translation, including its interactions with other eIF3 subunits, especially with b/PRT1 and a/TIF32. We also wished to compare its role in yeast and human, since this non-essential gene in yeast was proposed to play fundamental roles in higher eukaryotes. Furthermore, we wanted to set up several *in vivo* approaches in human cell lines as well as *in vitro* assays to be carried out with their whole cell extracts to examine the functions of individual eIF3 subunits in translation initiation beginning with the 3a, 3c and 3j subunits.

In detail, we aimed at examining:

- 1 the function of j/HCR1 in translation initiation and termination in *Saccharomyces cerevisiae*
- 2 the interaction of j/HCR1 with the RNA recognition motif of b/PRT1 in yeast and human
- 3 the interaction of j/HCR1 with the HCR1-like domain of a/TIF32 in yeast
- 4 the importance of 3j and its function in mammalian translation initiation by down-regulation of its protein level via RNA interference in two human cell lines (HeLa and HEK293)
- 5 the function of the core 3a and 3c subunits in mammalian translation initiation by down-regulation of their protein levels via RNA interference in two human cell lines (HeLa and HEK293)

List of methods

- organisms: human cell lines HeLa & HEK293 and yeast *Saccharomyces cerevisiae*
- Whole Cell Extracts and RNA extraction
- mRNA binding and 40S-binding assay
- Polysome profile analysis
- SDS-PAGE + Western Blotting
- ³⁵S-Methionine incorporation assay
- Co-Immunoprecipitation and pulldown experiments
- β-Galactosidase and Dual-luciferase assay
- PCR + Real time quantitative PCR

Results and discussion

The function of eIF3j in translation initiation

The j/HCR1 subunit is the only subunit of the yeast eIF3 complex the deletion of which is not lethal and causes “only” a slow growth phenotype ([19]) that was proposed to result from a defect in integrity of the MFC ([17]) as well as a defect in 40S binding by eIF3 ([20]). We showed here that the lack of j/HCR1 in addition leads to a severe defect in AUG recognition, as it increases the leaky scanning by around 7-fold in a manner partially suppressible by overexpressing eIF1A (publication I). Interestingly, eIF1A together with eIF1 were shown to orchestrate proper start site selection ([21], [22]) and earlier *in vitro* experiments by Fraser et al. ([23]) with purified human eIF3j and eIF1A showed that they both bind in a negatively cooperating manner to the A site of the 40S. However, the overall contribution of eIF3j will most likely be only stimulatory, because it is a non-essential gene in yeast, and in humans its down-regulation had no measurable effect on start codon selection as well as on the overall fitness and translational efficiency in HeLa and HEK293 knock-down cells (publication V). In other words it seems that yeast j/HCR1 plays a more important role in translation initiation than its mammalian orthologue.

Another crucial role of human 3j in stimulating 40S-binding by eIF3 was suggested from *in vitro* studies ([24]). We showed that down-regulation of 3j affected neither the integrity of eIF3 nor its *in vivo* binding affinity for the 40S ribosomes, indicating that its role in promoting eIF3 binding to 40S ribosomes in higher eukaryotes is even less stimulatory than in yeast, if any, but definitely not critical. Also, a recent *in vitro* 40S-binding study did not confirm a significant contribution of 3j to the eIF3 binding affinity for the 40S ribosome ([25]).

The binding of eIF3j to the 40S

It is known that eIF3j is able to bind to the 40S on its own, independently of the rest of eIF3 in both lower and higher eukaryotes ([24], [26]). Our work (publication V) showed for the first time *in vivo* that 40S-binding of eIF3j was unaffected by complete disintegration of the eIF3 complex and also the 43-48S PICs. The actual binding site of eIF3j/HCR1 on the 40S ribosome seems to be conserved between yeast and human as well. Confirming earlier results from purified human factors ([23]), we found that yeast j/HCR1 directly binds via its KERR motif situated in its C-terminal half to the ribosomal proteins RPS2 and RPS23 (publication I), residing at the opposite sides of the mRNA entry channel. This binding site works well with the proposed role of j/HCR1 in AUG start codon and stop codon recognition during termination, as discussed below.

The interaction of the NTA motif of eIF3j with the RRM of eIF3b

We found that in yeast the N-terminal half of j/HCR1, through which it binds to the RNA recognition motif (RRM) of eIF3b in both yeast and human ([27], [17]) is sufficient for wild-type growth and proper recognition of the AUG start codon (publication I). We solved the NMR structure of the interaction between human eIF3b-RRM and the minimal N-terminal peptide of human eIF3j (publication I). A conserved Tryptophan residue (Trp52) of eIF3j is held in a hydrophobic pocket of the RRM of 3b, formed by helix α 1 and loop L5. Mutating the conserved key residues of this contact in yeast b/PRT1 and j/HCR1 disrupted this interaction strongly suggesting that their binding mode is conserved between yeast and human (publication I). The effect of these mutations *in vivo* mimicked to a certain degree the effect of the *hcr1* deletion as it produced slow growth phenotypes and increased leaky scanning (publication I), clearly demonstrating that it is an important interaction for the j/HCR1 initiation role. Later, the group of Ralf Ficner ([28]) solved the crystal structure of the yeast b/PRT1-RRM and suggested that the binding mode of b/PRT1-RRM and j/HCR1-NTA is indeed the same as in human.

The interaction of the j/HCR1-CTD with a/TIF32-CTD

The C-terminal half of j/HCR1 directly interacts with the NTD and CTD of a/TIF32. Breaking this contact by mutations in the j/HCR1 KERR motif or a specific segment called Box6 led to the loss of j/HCR1 from the MFC, yet it did not interfere with the efficiency of translation initiation (publication II). This suggested to us that association of j/HCR1 in the MFC is not necessary for its wild-type functioning in the cell.

Within the b/PRT1-RRM – j/HCR1 – a/TIF32 triangle, the contact of j/HCR1-NTA to the RRM of b/PRT1 seems to be of higher importance than the contact of j/HCR1 to a/TIF32. The latter contact becomes only critical when the HLD domain of a/TIF32, especially the KERR motif and/or BOX6, is functionally impaired. In that case it seems that the KERR motif and/or BOX6 of j/HCR1 can either take over certain functions of the HLD of a/TIF32 or stabilize a/TIF32 within the entire eIF3 complex.

The function of eIF3j in translation termination

Human eIF3 was recently implicated in recycling the post-termination ribosomes to provide free ribosomal subunits for a new round of initiation ([12]). Strikingly, we found herein that the eIF3 core and j/HCR1 in yeast also promote termination, in an opposed manner. Deletion of j/HCR1 increased the stop codon read-through whereas several mutations in any core eIF3 subunit decreased it (publication IV). Overexpression of RLI1, an interacting partner of j/HCR1, fully rescued the growth phenotype as well as the increased read-through of the *hcr1* deletion strain, but failed to suppress the leaky scanning and the reduced 40S-binding

by eIF3 defects. These findings imply that: 1) RLI1 and j/HCR1 have a role in common in termination, 2) j/HCR1 is a more important player in termination than in initiation, and 3) the mechanisms by which j/HCR1 regulates the recognition of the start codon versus the stop codon are distinct from each other. The last point is further supported by our finding that overexpression of eIF1A partially suppressed the increase in leaky scanning but not in stop codon read-through (publication IV). In the light of our findings we propose a new model of translation termination where eRF1 and 3 together with eIF3 and j/HCR1 bind to the pTCs, either as preformed unit or alone. eIF3 could directly regulate the stop codon recognition through its g/TIF35 and i/TIF34 subunits that we found to interact with eRF1 (publication IV). Upon stop codon recognition captured by GTP hydrolysis on eRF3, j/HCR1 could promote ejection of eRF3 as increased amounts of eRF3 were found accumulating in heavy polysomal fractions in the *hcr1* deletion strain. This would allow RLI1 to bind in the place of eRF3 to stimulate the eRF1 action in promoting peptide release. j/HCR1 might also stimulate this step as it directly interacts with RLI1.

3a and 3c control the expression of other human eIF3 subunits

Upon siRNA-mediated protein down-regulation of the eIF3c subunit in HeLa and HEK293 cells, not only the 3c protein level dropped down dramatically, but also the protein levels of all eIF3 module ii subunits (d, e, k, l) markedly decreased – indeed, a severe block in cell proliferation was generated due to that. Since their mRNA levels remained unchanged, it seems that eIF3c somehow regulates their expression either on translational or post-translational level. This effect resulted in separation of both remaining modules from each other. Whereas solitary module i (a, b, g, i) resembling the yeast core eIF3 still preserved substantial binding affinity for the 40S ribosomes and allowed nearly wild-type mRNA recruitment, the binding efficiency of module iii (f, h, m) to the 40S was strongly decreased. These findings may suggest that the roles of core eIF3 subunits have remained conserved throughout the evolution.

Down-regulation of 3a had a similar effect to the 3c siRNA but in addition it also reduced protein levels of all module iii subunits and disintegrated module i into the b-g dimer and free eIF3i (publication V). As a result, eIF3 as well as mRNA binding to 40S ribosomes was completely compromised and siRNA-treated cells stopped proliferating. Interestingly, the observed disassembly of the trimeric b-g-i complex was rather surprising because yeast g/TIF35 and i/TIF34 are known to interact not only with each other but also with the CTD of b/PRT1 (publication III). Nevertheless, a recent study by Dong et al. ([29]) provided a strong support to this result of ours by showing that human 3b and 3i bind both to the spectrin domain of 3a, whereas 3g binds only to the CTD of 3b. These surprising findings will probably need further corroboration since they indicate that the eIF3 core was substantially reorganized on its evolutionary way from yeast to human.

Conclusions

We solved the structure of the RRM of human 3b in contact with the minimal N-terminal peptide of human 3j by NMR and by mutational analysis demonstrated that the mode of binding is conserved between yeast and human.

We identified and characterized the function of j/HCR1 in AUG recognition in yeast, which it fulfills in co-operation with eIF1A and the b/PRT1-RRM.

The direct contact of the j/HCR1-CTD with RPS2 and 23, which we identified, placed yeast j/HCR1 in the vicinity of the mRNA entry channel on the 40S ribosome in agreement with the earlier suggested 40S-binding site of human eIF3j.

We showed that the N-terminal half of j/HCR1 is sufficient for wild-type growth and all of its functions in translation; the dispensable C-terminal half becomes critical only when the homologous HLD domain in a/TIF32 is functionally impaired.

We made a striking observation that j/HCR1 together with eIF3 and RLI1 plays an important role in translation termination and stop codon read through, which is of higher importance for the normal progress of cell proliferation than its role in initiation. Indeed, the regulatory mechanisms of its functions in AUG versus stop codon recognition are clearly distinct.

Yeast j/HCR1 seems to play a more important role in the cell than its human orthologue because strong down-regulation of eIF3j in two human cell lines had barely any effect on translational rates and cell proliferation.

Given our findings that human eIF3j stays 40S-bound even after complete disassembly of eIF3 plus earlier observations that it is sub-stoichiometric to eIF3 and easily dissociates during various purifications, we suggest reconsidering the assignment of eIF3j as a *bona fide* eIF3 subunit.

The 3a and 3c subunits of human eIF3 are two master regulators of the overall expression and assembly of eIF3.

Human eIF3 module i, which resembles the yeast core eIF3, retains significant 40S-binding affinity as well as an ability to promote mRNA recruitment but fails to properly recognize the AUG start codon.

Seznam publikací I-V - List of publications I-V

I) The Indispensable N-Terminal Half of eIF3j/HCR1 Cooperates with its Structurally Conserved Binding Partner eIF3b/PRT1-RRM and with eIF1A in Stringent AUG Selection.

Latifa ElAntak*, Susan Wagner*, Anna Herrmannová*, Martina Karásková, Edit Rutkai, Peter J. Lukavsky and Leoš Valášek

J. Mol. Biol. (2010) 396, 1097–1116 * These authors contributed equally to this work.

II) The C-Terminal Region of Eukaryotic Translation Initiation Factor 3a (eIF3a) Promotes mRNA Recruitment, Scanning, and, Together with eIF3j and the eIF3b RNA Recognition Motif, Selection of AUG Start Codons.

Wen-Ling Chiu, Susan Wagner, Anna Herrmannová, Laxminarayana Burela, Fan Zhang, Adesh K. Saini, Leoš Valášek, and Alan G. Hinnebusch

Mol Cell Biol. (2010) 30, 4415-4434

III) Structural Analysis of an eIF3 Subcomplex Reveals Conserved Interactions Required for a Stable and Proper Translation Pre-Initiation Complex Assembly.

Anna Herrmannová*, Dalia Daujotyte*, Ji-Chun Yang, Lucie Cuchalová, Fabrice Gorrec, Susan Wagner, István Dányi, Peter J. Lukavsky and Leoš Shivaya Valášek

Nucleic Acids Res. (2012) 40, 2294-2311 * These authors contributed equally to this work.

IV) Translation Initiation Factors eIF3 and HCR1 Control Translation Termination and Stop Codon Read-Through in Yeast Cells.

Petra Beznosková*, Lucie Cuchalová*, Susan Wagner, Christopher J. Shoemaker, Stanislava Gunišová, Tobias von der Haar, Leoš Shivaya Valášek

PLoS Genet. (2013) 9, e1003962 * These authors contributed equally to this work.

V) Functional and biochemical characterization of human eIF3 in living cells.

Susan Wagner, Anna Herrmannová, Radek Malík, Lucie Peclinovská, Leoš Shivaya Valášek

under review in Mol Cell Biol.

Curriculum Vitae

Name: Susan Wagner
Address: Institute of microbiology, Academy of Sciences of the Czech Republic
Videnska 1083, Prague 4, 142 20
Phone: 00420 241 062 483
E-mail: wagner@biomed.cas.cz

Citizenship: German
Date and Place of Birth: April 24, 1980 Bautzen (Germany)

PROFESSIONAL EXPERIENCE

Associate Investigator 05/2007 – present
PhD student Laboratory of regulation of gene expression,
Institute of microbiology, Academy of Sciences of the Czech Republic

Research Associate 07/2003 – 08/2003
Robert Koch Institute in Berlin, Department of Biological Security

Research Associate 09/2002 – 03/2003
Max Planck Institute for Molecular Genetic in Berlin

EDUCATION

PhD 2009-2014
Charles University of Prague
Department of Molecular Biology and Genetics
Thesis title: Functional and biochemical characterization of eIF3 and eIF3j in *Saccharomyces cerevisiae* and human cell lines
Research Advisor: Leos Shivaya Valasek, PhD

MS 2000 – 2005
(Diplom-Biologin) Free University of Berlin
Department of Applied Genetics
Thesis title: Characterisation of the *Arabidopsis thaliana* *rsr4-1* mutant
Research Advisor: Hanjo Hellmann, PhD, Assistant professor

FURTHER SKILLS

English (fluent, written and spoken)
Czech (working knowledge)

Microsoft-Office
Adobe Photoshop and Illustrator
Java, Haskell

Driving licence category B

Curriculum Vitae

PUBLICATIONS

S. Wagner, A. Herrmannová, R. Malík, L. Peclinovská, and L. S. Valášek, “Functional and biochemical characterization of human eIF3 in living cells.,” under review in *Mol. Cell. Biol.*

J. Nejepinska, R. Malik, S. Wagner, and P. Svoboda, “Reporters transiently transfected into mammalian cells are highly sensitive to translational repression induced by dsRNA expression.,” *PLoS One*, vol. 9, no. 1, p. e87517, Jan. 2014.

P. Beznosková, L. Cuchalová, S. Wagner, C. J. Shoemaker, S. Gunišová, T. von der Haar, and L. S. Valášek, “Translation initiation factors eIF3 and HCR1 control translation termination and stop codon read-through in yeast cells.,” *PLoS Genet.*, vol. 9, no. 11, p. e1003962, Nov. 2013.

M. Karásková, S. Gunišová, A. Herrmannová, S. Wagner, V. Munzarová, and L. S. Valášek, “Functional characterization of the role of the N-terminal domain of the c/Nip1 subunit of eukaryotic initiation factor 3 (eIF3) in AUG recognition.,” *J. Biol. Chem.*, vol. 287, no. 34, pp. 28420–34, Aug. 2012.

A. Herrmannová, D. Daujotyte, J.-C. Yang, L. Cuchalová, F. Gorrec, S. Wagner, I. Dányi, P. J. Lukavsky, and L. S. Valášek, “Structural analysis of an eIF3 subcomplex reveals conserved interactions required for a stable and proper translation pre-initiation complex assembly.,” *Nucleic Acids Res.*, vol. 40, no. 5, pp. 2294–311, Mar. 2012.

W.-L. Chiu, S. Wagner, A. Herrmannová, L. Burela, F. Zhang, A. K. Saini, L. Valášek, and A. G. Hinnebusch, “The C-terminal region of eukaryotic translation initiation factor 3a (eIF3a) promotes mRNA recruitment, scanning, and, together with eIF3j and the eIF3b RNA recognition motif, selection of AUG start codons.,” *Mol. Cell. Biol.*, vol. 30, no. 18, pp. 4415–34, Sep. 2010.

L. Elantak, S. Wagner, A. Herrmannová, M. Karásková, E. Rutkai, P. J. Lukavsky, and L. Valášek, “The indispensable N-terminal half of eIF3j/HCR1 cooperates with its structurally conserved binding partner eIF3b/PRT1-RRM and with eIF1A in stringent AUG selection.,” *J. Mol. Biol.*, vol. 396, no. 4, pp. 1097–116, Mar. 2010.

S. Wagner, A. Bernhardt, J. E. Leuendorf, C. Drewke, A. Lytovchenko, N. Mujahed, C. Gurgui, W. B. Frommer, E. Leistner, A. R. Fernie, and H. Hellmann, “Analysis of the Arabidopsis *rsr4-1/pdx1-3* mutant reveals the critical function of the PDX1 protein family in metabolism, development, and vitamin B6 biosynthesis.,” *Plant Cell*, vol. 18, no. 7, pp. 1722–35, Jul. 2006.

PRESENTATIONS

“The N-terminal half of eIF3j promotes 40S-binding of eIF3 via its evolutionary conserved interaction with the eIF3b-RRM with which it co-operates in scanning and AUG selection.”

Translational Control 2008, Cold Spring Harbor, NY, USA

“The role of eIF3j and c in Translation initiation in human”

Mini RNA meeting 2012, Czech Republic

Seznam použité literatury - References

- [1] L. S. Valásek, “‘Ribozomin’--translation initiation from the perspective of the ribosome-bound eukaryotic initiation factors (eIFs).,” *Curr. Protein Pept. Sci.*, vol. 13, no. 4, pp. 305–30, Jun. 2012.
- [2] A. G. Hinnebusch and J. R. Lorsch, “The mechanism of eukaryotic translation initiation: new insights and challenges.,” *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, vol. 4, no. 10, pp. 1–25, Jan. 2012.
- [3] K. Asano, J. Clayton, A. Shalev, and A. G. Hinnebusch, “A multifactor complex of eukaryotic initiation factors, eIF1, eIF2, eIF3, eIF5, and initiator tRNA(Met) is an important translation initiation intermediate in vivo.,” *Genes Dev.*, vol. 14, no. 19, pp. 2534–46, Oct. 2000.
- [4] M. D. Dennis, M. D. Person, and K. S. Browning, “Phosphorylation of plant translation initiation factors by CK2 enhances the in vitro interaction of multifactor complex components.,” *J. Biol. Chem.*, vol. 284, no. 31, pp. 20615–28, Jul. 2009.
- [5] M. Sokabe, C. S. Fraser, and J. W. B. Hershey, “The human translation initiation multifactor complex promotes methionyl-tRNA_i binding to the 40S ribosomal subunit.,” *Nucleic Acids Res.*, vol. 40, no. 2, pp. 905–13, Jan. 2012.
- [6] C. Baierlein and H. Krebber, “Translation termination: new factors and insights.,” *RNA Biol.*, vol. 7, no. 5, pp. 548–50, 2010.
- [7] R. J. Jackson, C. U. T. Hellen, and T. V Pestova, “Termination and post-termination events in eukaryotic translation.,” *Adv. Protein Chem. Struct. Biol.*, vol. 86, pp. 45–93, Jan. 2012.
- [8] M. Laurberg, H. Asahara, A. Korostelev, J. Zhu, S. Trakhanov, and H. F. Noller, “Structural basis for translation termination on the 70S ribosome.,” *Nature*, vol. 454, no. 7206, pp. 852–7, Aug. 2008.
- [9] S. Khoshnevis, T. Gross, C. Rotte, C. Baierlein, R. Ficner, and H. Krebber, “The iron-sulphur protein RNase L inhibitor functions in translation termination.,” *EMBO Rep.*, vol. 11, no. 3, pp. 214–9, Mar. 2010.
- [10] C. J. Shoemaker and R. Green, “Kinetic analysis reveals the ordered coupling of translation termination and ribosome recycling in yeast.,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 108, no. 51, pp. E1392–8, Dec. 2011.
- [11] T. Becker, S. Franckenberg, S. Wickles, C. J. Shoemaker, A. M. Anger, J.-P. Armache, H. Sieber, C. Ungewickell, O. Berninghausen, I. Daberkow, A. Karcher, M. Thomm, K.-P. Hopfner, R. Green, and R. Beckmann, “Structural basis of highly conserved ribosome recycling in eukaryotes and archaea.,” *Nature*, vol. 482, no. 7386, pp. 501–6, Feb. 2012.

- [12] A. V Pisarev, C. U. T. Hellen, and T. V Pestova, "Recycling of eukaryotic posttermination ribosomal complexes.," *Cell*, vol. 131, no. 2, pp. 286–99, Oct. 2007.
- [13] A. G. Hinnebusch, "eIF3: a versatile scaffold for translation initiation complexes.," *Trends Biochem. Sci.*, vol. 31, no. 10, pp. 553–62, Oct. 2006.
- [14] M. D. Smith, Y. Gu, J. Querol-Audí, J. M. Vogan, A. Nitido, and J. H. D. Cate, "Human-like eukaryotic translation initiation factor 3 from *Neurospora crassa*.," *PLoS One*, vol. 8, no. 11, p. e78715, Jan. 2013.
- [15] M. Zhou, A. M. Sandercock, C. S. Fraser, G. Ridlova, E. Stephens, M. R. Schenauer, T. Yokoi-Fong, D. Barsky, J. a Leary, J. W. Hershey, J. a Doudna, and C. V Robinson, "Mass spectrometry reveals modularity and a complete subunit interaction map of the eukaryotic translation factor eIF3.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 105, no. 47, pp. 18139–44, Nov. 2008.
- [16] B. Siridechadilok, C. S. Fraser, R. J. Hall, J. a Doudna, and E. Nogales, "Structural roles for human translation factor eIF3 in initiation of protein synthesis.," *Science*, vol. 310, no. 5753, pp. 1513–5, Dec. 2005.
- [17] L. Valásek, L. Phan, L. W. Schoenfeld, V. Valásková, and a G. Hinnebusch, "Related eIF3 subunits TIF32 and HCR1 interact with an RNA recognition motif in PRT1 required for eIF3 integrity and ribosome binding.," *EMBO J.*, vol. 20, no. 4, pp. 891–904, Feb. 2001.
- [18] K. Asano, L. Phan, J. Anderson, and A. G. Hinnebusch, "Complex formation by all five homologues of mammalian translation initiation factor 3 subunits from yeast *Saccharomyces cerevisiae*.," *J. Biol. Chem.*, vol. 273, no. 29, pp. 18573–85, Jul. 1998.
- [19] L. Valásek, J. Hasek, H. Trachsel, E. M. Imre, and H. Ruis, "The *Saccharomyces cerevisiae* HCR1 gene encoding a homologue of the p35 subunit of human translation initiation factor 3 (eIF3) is a high copy suppressor of a temperature-sensitive mutation in the Rpg1p subunit of yeast eIF3.," *J. Biol. Chem.*, vol. 274, no. 39, pp. 27567–72, Sep. 1999.
- [20] K. H. Nielsen, L. Valásek, C. Sykes, A. Jivotovskaya, and A. G. Hinnebusch, "Interaction of the RNP1 motif in PRT1 with HCR1 promotes 40S binding of eukaryotic initiation factor 3 in yeast.," *Mol. Cell. Biol.*, vol. 26, no. 8, pp. 2984–98, Apr. 2006.
- [21] C. a Fekete, S. F. Mitchell, V. a Cherkasova, D. Applefield, M. a Algire, D. Maag, A. K. Saini, J. R. Lorsch, and A. G. Hinnebusch, "N- and C-terminal residues of eIF1A have opposing effects on the fidelity of start codon selection.," *EMBO J.*, vol. 26, no. 6, pp. 1602–14, Mar. 2007.
- [22] J. S. Nanda, A. K. Saini, A. M. Muñoz, A. G. Hinnebusch, and J. R. Lorsch, "Coordinated movements of eukaryotic translation initiation factors eIF1, eIF1A, and eIF5 trigger phosphate release from eIF2 in response to start codon recognition by the ribosomal preinitiation complex.," *J. Biol. Chem.*, vol. 288, no. 8, pp. 5316–29, Feb. 2013.

- [23] C. S. Fraser, K. E. Berry, J. W. B. Hershey, and J. a Doudna, "eIF3j is located in the decoding center of the human 40S ribosomal subunit.," *Mol. Cell*, vol. 26, no. 6, pp. 811–9, Jun. 2007.
- [24] C. S. Fraser, J. Y. Lee, G. L. Mayeur, M. Bushell, J. a Doudna, and J. W. B. Hershey, "The j-subunit of human translation initiation factor eIF3 is required for the stable binding of eIF3 and its subcomplexes to 40 S ribosomal subunits in vitro.," *J. Biol. Chem.*, vol. 279, no. 10, pp. 8946–56, Mar. 2004.
- [25] C. Sun, A. Todorovic, J. Querol-Audí, Y. Bai, N. Villa, M. Snyder, J. Ashchyan, C. S. Lewis, A. Hartland, S. Gradia, C. S. Fraser, J. a Doudna, E. Nogales, and J. H. D. Cate, "Functional reconstitution of human eukaryotic translation initiation factor 3 (eIF3).," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 108, no. 51, pp. 20473–8, Dec. 2011.
- [26] L. Phan, L. W. Schoenfeld, L. Valásek, K. H. Nielsen, and A. G. Hinnebusch, "A subcomplex of three eIF3 subunits binds eIF1 and eIF5 and stimulates ribosome binding of mRNA and tRNA(i)Met.," *EMBO J.*, vol. 20, no. 11, pp. 2954–65, Jun. 2001.
- [27] L. ElAntak, A. G. Tzakos, N. Locker, and P. J. Lukavsky, "Structure of eIF3b RNA recognition motif and its interaction with eIF3j: structural insights into the recruitment of eIF3b to the 40 S ribosomal subunit.," *J. Biol. Chem.*, vol. 282, no. 11, pp. 8165–74, Mar. 2007.
- [28] S. Khoshnevis, P. Neumann, and R. Ficner, "Crystal structure of the RNA recognition motif of yeast translation initiation factor eIF3b reveals differences to human eIF3b.," *PLoS One*, vol. 5, no. 9, Jan. 2010.
- [29] Z. Dong, J. Qi, H. Peng, J. Liu, and J.-T. Zhang, "Spectrin domain of eukaryotic initiation factor 3a is the docking site for formation of the a:b:i:g subcomplex.," *J. Biol. Chem.*, vol. 288, no. 39, pp. 27951–9, Sep. 2013.

