

Charles University

Faculty of Science

Molecular and Cell Biology, Genetics and Virology



Mgr. Vladislava Hronová

Molecular principles of translation reinitiation in mammals

Molekulární princípy translační reiniciace v savčích buňkách

Summary of the PhD thesis / Autoreferát dizertační práce

Supervisor: Res. Prof. Leoš Shivaya Valášek, PhD

Laboratory of Regulation of Gene Expression

Institute of Microbiology of the ASCR, v. v. i.

Prague, 2017

Doktorské studijní programy v biomedicině

*Univerzita Karlova
a Akademie věd České republiky*

Program: Molekulární a buněčná biologie, genetik a virologie

Předseda oborové rady: Prof. RNDr. Stanislav Zadražil, DrSc.

Školící pracoviště: Laboratoř regulace genové exprese, Mikrobiologický ústav, AVČR, v. v. i.

Autor: Mgr. Vladislava Hronová

Školitel: Res. Prof. Leoš Shivaya Valášek, Ph.D.

S dizertací je možno se seznámit v příslušných knihovnách Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy.

Contents / Obsah

Abstract	3
Abstrakt	4
Introduction.....	5
Aims of the study	6
Material and methods	7
Results and discussion	7
Conclusions	10
Úvod	11
Cíle práce	12
Materiál a metody	13
Výsledky a diskuze	13
Závěry.....	16
References / Použitá literatura	17
Curriculum Vitae	18
List of publications	20

Abstract

Translation initiation is a multistep process resulting in the formation of the elongation-competent 80S ribosome at the AUG start codon of the mRNA to be translated into a polypeptide chain. This process is orchestrated by numerous proteins called eukaryotic initiation factors (eIFs), out of which the most multitasking one is the eukaryotic initiation factor 3 (eIF3). The main focus of our laboratory aims at the complex characterization of the multisubunit protein eIF3 and the mechanisms of its contribution to various steps of translation initiation. Besides this, we also study one of the gene-specific translational control mechanisms called reinitiation which was, at least in yeast, also shown to be promoted by eIF3.

Here I show that the N-terminal domain (NTD) of the largest subunit of yeast eIF3, a/Tif32, plays an important role not only in anchoring the eIF3 complex to the 40S small ribosomal subunit but it also critically contributes to mRNA recruitment to the 43S preinitiation complexes *in vivo*. The mRNA stabilization role of the a/Tif32-NTD at the mRNA exit channel of the 40S subunit was further confirmed in our following study by biophysical experiments. There, using *in vivo* approaches, we also demonstrated that mRNAs with longer 5'UTRs are more dependent on the stabilization role of the a/Tif32-NTD than those containing short 5'UTRs.

In other studies, where I turned my attention to the mechanism of reinitiation, we revealed novel *cis*-determinants contributing to the efficiency of reinitiation on the yeast model *GCN4* mRNA and, importantly, brought the first insights into this gene-specific regulatory mechanism in human cells on the model human *ATF4* mRNA. In detail, we discovered that similarly to the yeast *GCN4* mRNA, the reinitiation-permissive upstream ORF1 (uORF1) of *ATF4* is also surrounded by sequences that contribute to high reinitiation efficiency that this uORF allows. Moreover, we computationally predicted that the sequence immediately preceding uORF1 of *ATF4* probably folds into a specific secondary structure that seems to be conserved among mammals. Computationally designed mutations disrupting this structure obliterated the reinitiation potential of uORF1 suggesting that formation of this secondary structure critically contributes to the yet-to-be-described molecular mechanism underlying reinitiation in humans. Finally, we also demonstrated that in analogy with the reinitiation mechanism in yeasts, reinitiation in humans is also promoted by eIF3; only the contributing subunit is not eIF3a/Tif32, but eIF3h.

Thus, this PhD thesis contributed not only to our understanding of basic principles of general translation initiation in eukaryotes but also shed new light onto the molecular mechanism of reinitiation in human cells, revealing that many mechanistic aspects of this process are conserved both in higher and lower eukaryotes.

Abstrakt

Iniciace translace představuje mnohastupňový proces, který zajišťuje sestavení 80S ribosomu na AUG start kodonu molekuly mRNA, jež má být přeložena do polypeptidového řetězce. Správný průběh tohoto procesu je řízen mnoha eukaryotickými iniciačními faktory (eIFs), z nichž nejdůležitějším je eukaryotický iniciační faktor 3 (eIF3). Hlavním cílem naší laboratoře je co nejpodrobněji popsat proteinový komplex eIF3 a také způsoby, jakými tento faktor přispívá k jednotlivým krokům procesu iniciace translace. Kromě toho též zkoumáme jeden z genově specifických kontrolních mechanismů translace zvaný reiniciace, který je, alespoň u kvasinek, umožňován právě faktorem eIF3.

V této práci popisují, že N-terminální doména (NTD) jedné z největších podjednotek kvasinkového eIF3, označované jako *a/Tif32*, hraje důležitou úlohu nejen ve vazbě eIF3 k 40S ribozomální podjednotce, ale taktéž významně přispívá k nasedání mRNA na 43S preiniciační komplex *in vivo*. Stabilizační role N-terminální domény podjednotky *a/Tif32* byla ověřena též v naší následující studii, a to biofyzikálními experimenty. Pomocí dalších *in vivo* přístupů jsme v této práci též dokázali, že pro mRNA s delšími 5' nepřekládanými oblastmi je stabilizační role *a/Tif32*-NTD důležitější než pro mRNA s krátkými 5' nepřekládanými oblastmi.

V následujících studiích, kde se zaměřuji na popis mechanismu reiniciace, jsme odhalili dosud neznámé *cis*-elementy důležité pro správné fungování reiniciace na kvasinkové modelové mRNA *GCN4*. Naš výzkum též přinesl první důležité detaily o tomto kontrolním mechanismu v lidských buňkách, a to za použití lidské modelové mRNA *ATF4*. Zjistili jsme například, že uORF1 z *ATF4*, jenž je elementem umožňujícím reiniciaci, je obklopen sekvencemi, které jsou důležité pro vysokou efektivitu reiniciace na tomto uORF. Podobně je tomu i v případě uORF1 z *GCN4*, který též umožňuje reiniciaci na této mRNA. Z našich *in silico* analýz vyplynulo, že nukleotidová sekvence předcházející uORF1 z *ATF4* pravděpodobně tvoří konkrétní sekundární strukturu, jež se zdá být konzervována mezi savci. Na základě počítačových analýz jsme vytvořili mutace, které narušily tuto strukturu, a po jejich testování jsme zjistili, že skutečně snižují schopnost uORF1 z *ATF4* podporovat reiniciaci. To nasvědčuje tomu, že přítomnost této struktury je pro efektivitu reiniciace v savčích buňkách důležitá. Na závěr jsme prokázali, že stejně jako je tomu v případě kvasinek, i reiniciace v savcích je umožňována faktorem eIF3, avšak konkrétní zúčastněnou podjednotkou není v tomto případě eIF3a/Tif32, ale eIF3h.

Tato Ph.D. práce tedy přispívá nejen k obecnému porozumění základním procesům iniciace translace, ale osvětluje též molekulární mechanismus reiniciace v lidských buňkách a odhaluje tak, že mnoho aspektů tohoto procesu zůstalo konzervováno mezi nižšími a vyššími eukaryoty.

Introduction

Translation is a fundamental biological process ensuring the production of proteins indispensable for every single cell's life. It contributes to important cellular processes, such as development or memory formation. Importantly, translational control of already existing mRNAs allows more rapid changes in gene expression in comparison to e.g. transcription, and thus it governs not only more permanent changes in cell physiology, but also cell homeostasis, environmental response etc. Hence, it is not surprising that it has to be perfectly regulated and that any improper translational control may lead to various human diseases, such as diabetes, cancer or neurodegenerative diseases (Sonenberg and Hinnebusch 2009). Therefore, complex understanding of the processes of translation and its regulation helps us to understand not only the general mechanisms underlying these processes but also the mechanisms underlying various human disorders.

Translation of the mRNA-encoded information into a protein is a multistep process consisting of initiation, elongation, termination and ribosomal recycling. However, the most of its regulation occurs within its first phase – translation initiation. This step ensures a coordinated assembly of 80S ribosome, mRNA and initiator tRNA at an AUG start codon of a given mRNA molecule, which can be subsequently translated into a polypeptide chain. This delicate process is orchestrated by many effector proteins called eukaryotic initiation factors (eIFs) helping to ensure its errorless course.

The aim of my post-graduate study was to gain more insights into the process of translational initiation and its regulation. The major focus of my PhD thesis aimed at a special gene-specific translational control mechanism called reinitiation. This mechanism is known to exploit so-called short upstream open reading frames (uORFs) present in some mRNAs; however, its molecular mechanism has never been investigated in mammalian cells so far. My thesis also dealt with a general mechanism of the mRNA recruitment to the 43S PICs in eukaryotic cells, representing one of the least understood initiation steps of all. Interestingly, both the processes were shown to be promoted by the eukaryotic initiation factor 3 (eIF3).

Translation reinitiation is a gene-specific translational control mechanism exploiting the ability of some short upstream open reading frames (uORFs) to retain the post-termination 40S ribosomal subunit on the mRNA. The fact that uORFs widely occur in mammalian transcriptomes suggests that reinitiation after translation of a short uORF represents an important cis-regulatory tool in translational control of eukaryotic gene expression (Calvo et al. 2009). Pioneering work on the yeast GCN4 transcriptional activator revealed that reinitiation requires a presence of cis-acting sequences upstream and downstream of a reinitiation-permissive uORF that, at least in case of upstream sequences, functionally interact with the N-terminal domain (NTD) of the eIF3a/TIF32 subunit of eIF3 (Szamecz et al. 2008; Munzarová et al. 2011; Gunišová and Valášek 2014). Establishment of this contact post-termination is crucial for stabilization of the small ribosomal 40S

subunit on the mRNA and subsequent reinitiation.

In order to determine the extent of conservation of the reinitiation mechanism in lower and higher eukaryotes, we set out to perform a comprehensive analysis of the human *ATF4* mRNA representing the mammalian functional homologue of yeast *GCN4* (Vattem and Wek 2004). Particularly, we strived to reveal whether the REI-promoting *ATF4* uORF1 is, similarly to the REI-promoting *GCN4* uORF1, also flanked by *cis*-acting sequences promoting efficient REI (called RPEs), and whether reinitiation in mammals also requires the factor eIF3 (see also **Figure 1**).



Figure 1. Model of *ATF4* mRNA. Prospective REI-promoting elements (RPEs) surrounding uORF1 and their prospective interaction with eIF3 are indicated by question marks. Adapted from Gunišová et al. (submitted).

Aims of the study

The main aim of this thesis was to investigate the molecular mechanism of reinitiation in human cells using the model mRNA of human *ATF4*. My other aim was to further characterize the physiological importance of the N-terminal domain of the yeast eIF3a/Tif32 subunit, which was earlier implicated in promoting reinitiation on yeast *GCN4* mRNA. Here I list all particular tasks:

- to establish and utilize an *in vivo* mRNA recruitment assay in order to characterize the N-terminal domain of a/Tif32 subunit of yeast eIF3 with respect to its potential role in this critical initiation step leading to formation of the 48S PICs
- to further employ this assay in order to experimentally confirm the role of the N-terminal domain of a/Tif32 in stabilizing the mRNA binding specifically at the 40S mRNA exit channel using various model mRNAs
- to study translation reinitiation mechanism on yeast model *GCN4* mRNA, mainly with respect to a prospective role of its 3'UTR in the translational regulation of its expression
- to set up an *in vivo* human *ATF4*-based *Firefly* luciferase reporter system in various cell lines to be able to investigate basic principles of human reinitiation
- to mutagenize the *ATF4* mRNA in order to identify specific *cis*-acting elements flanking *ATF4* uORF1 that could be responsible for high efficiency of reinitiation (REI) that this uORF allows
- to knock-down specific subunits of human eIF3 to investigate the potential role of human eIF3 in translation reinitiation on *ATF4* mRNA

Material and methods

The experiments studying the mRNA recruitment to the 43S PICs were carried out on the model organism *Saccharomyces cerevisiae* (budding yeast); experiments focused on translation reinitiation in mammals were done on human cell lines HEK and HeLa.

List of methods:

Yeast and bacteria cells cultivation, transformation

HEK, HeLa and MEF (mouse embryonic fibroblasts) cell lines cultivation, transfection and siRNA treatment

Nucleic acids procedures, cloning

Western blot analysis

β -galactosidase reporter assay in yeast cells

Luciferase reporter assay in cell lines

Preparation of yeast whole-cell extracts (WCEs)

Fractionation of yeast WCEs by sucrose gradient for analysis of the native 48S PICs

RNA isolation, reverse transcription and qPCR

Results and discussion

The importance of eIF3 in mRNA recruitment was indicated by several previous reports. The first one showed that depletion of the entire eIF3 complex from cells impairs model *RPL41A* mRNA recruitment *in vivo* (Jivotovskaya et al. 2006). The other one demonstrated that yeast eIF3 plays a direct role in 43S PIC binding to capped, native mRNA *in vitro*, being even more critical than eIF4F and eIF4B (Mitchell et al. 2010). In our first publication (Khoshnevis et al. 2014) we tested a specific 10-Ala substitution (*Box37*) in the N-terminally-located PCI domain of the yeast *a/Tif32* and showed that it robustly reduces the recruitment of three model mRNAs to the 43S PICs *in vivo* as the only detectable defect. Moreover, based on the structure of the *a/Tif32*-PCI domain, which was solved by our collaborators along the way (Khoshnevis et al. 2014), we selected two basic residues located in the region of *Box37* and we investigated the effect of their mutations on the mRNA recruitment as well. In analogy with the *a/tif32-Box37*, the mutations of Arg363 and Lys364 to alanines also decreased the amounts of reporter *RPL41A* mRNA in the 43S-containing fractions to the same level (*a/tif32-R363A*) or even more (*a/tif32-K364A*) when compared with the *a/tif32-Box37* mutation. Thus, all these findings together strongly suggest that this region of the PCI domain of the *a/Tif32* significantly contributes to the formation and/or stability of 48S PICs and that both of these *Box37* residues play a very important role in this process.

A few years later, we confirmed the importance of the *a/Tif32*-NTD (containing also the *Box37*) in mRNA recruitment step by our following study employing a yeast *in vitro* reconstituted system (Aitken, 2016). Here we used the yeast strain containing the *a/tif32-Δ8* truncation

eliminating the first 200 amino acids of the α /Tif32 subunit. We demonstrated that the recruitment of a model mRNA with an AUG located near its 3' end, which produces the complex with an empty entry channel, was dramatically abolished by this mutant. In fact, the α /*tif32- Δ 8* mutation mimicked the complete absence of eIF3 – there was no recruitment of this mRNA in the presence of this mutation, despite the fact that this mutant eIF3 as well as ternary complex were fully bound to the PIC (Aitken et al. 2016). On the other hand, this mutation did not affect the recruitment of a model mRNA containing the 5' proximal AUG that produces the complex with an empty exit channel, which strongly implicated this region of α /Tif32 in stabilizing mRNA binding at the 40S exit channel of the 48S PIC. Interestingly, gradual increase in the length of mRNA in the entry channel progressively rescued the α /*tif32- Δ 8* defect indicating that filling the entry channel with mRNA is sufficient to restore the interactions there. This suggests that the eIF3 functions at both exit and entry channels are redundant. The ultimate proof for the mRNA stabilization role of the α /Tif32-NTD at the exit channel was provided by my *in vivo* experiments where I measured the amounts of 43S PICs-bound reporter mRNAs with an increasing 5'UTR length using the α /*tif32- Δ 8* versus WT cells (Aitken et al. 2016). Here we hypothesized that the recruitment of mRNAs with longer 5'UTRs would produce a greater defect for the mutant, as the majority of the scanning process occurs with the exit channel occupied, giving the WT PICs an advantage because they are able to make contacts with mRNA in this channel whereas α /*tif32- Δ 8* mutant cells are not. Consistent with our prediction, the α /*tif32- Δ 8* mutation reduced the amount of mRNA associated with native 43S PICs for all the mRNAs we tested, but had a greater defect relative to WT cells on mRNAs with longer 5'UTRs.

The following comprehensive study (Gunišová et al. 2016) helped to shed more light onto translation reinitiation (REI) mechanism on the yeast model *GCN4* mRNA. Here we subjected all four *GCN4* uORFs to a thorough analysis in order to identify all potential REI-promoting or inhibiting *cis*-determinants which might contribute to the overall efficiency of REI on *GCN4* mRNA. It turned out that uORFs 1-3 contain conserved AU-rich motif that promotes REI in position-specific, autonomous fashion similarly to the REI-promoting elements occurring in the 5' sequences of uORF1 and uORF2. uORFs 2 and 3 were additionally shown to be flanked by transferable REI-inhibiting elements immediately following their AU-rich motifs. Moreover, it also turned out that the stop codon context of *GCN4* uORFs is crucial for their ability to either terminate translation or promote resumption of scanning. Together, this publication provided a complex overview of all *cis*-determinants of REI with their effects set in the context of the overall *GCN4* translational control and thus it helped to outline the future possible directions of exploration of this process in humans.

Mammalian reinitiation was studied in the next study (Hronová et al., 2017) which brought the first insights into the molecular mechanism of reinitiation in human cells using the human *ATF4* mRNA, encoding a functional homolog of yeast *GCN4*. In this study, we mutagenized the sequences flanking the human *ATF4* uORF1, closely resembling the REI-permissive uORF1 of yeast *GCN4*, and analyzed their putative roles in human translation reinitiation on the model *ATF4*

mRNA. We discovered that in striking analogy to yeasts, *ATF4* uORF1 is also surrounded by REI-promoting sequences, and that these sequences act independently to boost the REI potential of this uORF. Moreover, we predicted that the 5' sequence of *ATF4* uORF1 folds into a specific, evolutionary conserved structure that is necessary for its REI-permissive potential. Furthermore, we discovered that similarly to yeast *GCN4* mRNA, reinitiation on human *ATF4* mRNA is also promoted by eIF3, just the contributing subunit is not eIF3a/Tif32 but eIF3h.

Interestingly, the same subunit was shown to promote reinitiation also in plants (Roy et al. 2010). This difference might be explained by the fact that mammalian as well as plant eIF3 contain nearly twice as much subunits than yeasts (Valášek et al. 2017) and therefore it is very likely that in higher eukaryotes some of the subunits evolved to have specialized role(s) such as promoting REI. Accordingly, in contrast to the yeast α /Tif32, eIF3h subunit is essential neither for humans nor plants (in plants, however, it seems to be important for proper fertility). In any case, it is interesting to note that based on the recent structural data, human eIF3h seems to adopt a similar position on the ribosome as the REI-promoting N-terminal domain of yeast eIF3a/Tif32; i.e. right next to the mRNA exit channel (des Georges et al. 2015). This provides it with an ideal location where it could interact with the *ATF4* mRNA right emerging from the ribosome exit channel post uORF1 translation to promote resumption of scanning and REI downstream. In contrast to yeasts, however, it is still not clear whether eIF3h indeed act in cooperation with the sequences surrounding uORF1 of *ATF4* or not.

Conclusions

My PhD thesis brought novel insights into the molecular mechanism of the gene-specific regulatory process called reinitiation (REI) in yeasts and humans, and revealed that many mechanistic aspects of this process are conserved in these two organisms. Moreover, it also significantly contributed to our understanding of basic principles of general translation initiation in eukaryotes.

Using several independent approaches we showed that the eIF3a/Tif32-NTD (including its PCI domain) has a critical role in stabilizing mRNA interactions at the 40S exit channel. Moreover, we also solved a crystal structure of the PCI domain of the α /Tif32. Thanks to this, we identified two residues of the eIF3a/Tif32 subunit, Arg363 and Lys364, specifically contributing to the step of mRNA recruitment to the 43S PICs.

Next, we identified novel REI-promoting and inhibiting *cis*-determinants which govern translational control on the *GCN4* mRNA *via* reinitiation and thus expanded the already complex view of how expression of this gene is regulated in response to stress.

Finally, we successfully set up the human *ATF4*-based *Firefly* luciferase reporter system in HEK and HeLa cell lines and identified specific REI-promoting *cis*-acting sequences flanking the *ATF4* uORF1. We revealed that both of these sequences (5' and 3' sequences) contribute to efficiency of reinitiation on this mRNA independently. Furthermore, we computationally predicted that similarly to yeast *GCN4*, the 5' sequence of uORF1 seems to fold into a specific structure upon uORF1 translation, and that this structure is evolutionarily conserved. We also discovered that reinitiation on human *ATF4* mRNA is promoted by one of the eIF3 subunits, eIF3h.

Úvod

Translace je základním buněčným procesem, jenž zajišťuje výrobu proteinů nezbytných pro život každé buňky. Přispívá k řadě důležitých procesů, jako je vývoj či vznik paměti. Kontrola exprese již existujících mRNA umožňuje buňce rychlejší změny v genové expresi v porovnání např. s transkripcí, což jí poskytuje možnost řídit nejen trvalejší změny ve fyziologii buňky, ale též homeostázi, odpověď na vnější podmínky atd. Není proto s podivem, že translace musí být dokonale regulována a že jakákoliv její nepřesnost může vést ke vzniku nejrůznějších lidských onemocnění jako je cukrovka, rakovina či neurodegenerativní změny (Sonenberg a Hinnebusch 2009). Dokonalé porozumění procesům translace a jejich regulací tedy přispívá nejen k obecnému chápání základních procesů v buňce, ale též k pochopení vzniku těchto lidských onemocnění.

Translace informace zakódované v mRNA do proteinu je několikastupňový proces složený z iniciace, elongace, terminace a recyklace ribosomálních podjednotek. Nejvíce regulován je však hned první krok této dráhy – iniciace translace. Tento krok zajišťuje správné sestavení 80S ribosomu, mRNA a iniciátorové tRNA na AUG start kodonu dané molekuly mRNA, jež může být poté přeložena do polypeptidového řetězce. Tento komplikovaný proces je řízen mnoha proteiny zvanými eukaryotické iniciační faktory (eIFs).

Hlavním cílem mého Ph.D. studia bylo získat nové poznatky o procesu iniciace translace v eukaryotických buňkách a o způsobech, jakými je tento krok regulován. Hlavním předmětem zájmu mé PhD práce byl genově specifický translační regulační mechanismus zvaný reiniciace. Tento mechanismus je známý využíváním tzv. krátkých otevřených čtecích rámců lokalizovaných "upstream" od hlavního čtecího rámce (tzv. uORFs) přítomných v některých eukaryotických mRNA, avšak přesný molekulární mechanismus tohoto procesu nebyl nikdy u vyšších eukaryot zkoumán. Má Ph.D. práce se též zaměřila na mechanismus nasedání mRNA na tzv. 43S preiniciační komplexy (PICs), což je jeden z nejméně prozkoumaných kroků iniciace translace vůbec. Ukázalo se, že oba tyto procesy jsou umožňovány jedním z největších iniciačních faktorů, faktorem eIF3.

Translační reiniciace využívá schopnosti některých uORF zadržet malou ribosomální podjednotku na téže molekule mRNA i po terminaci na tomto uORF. Fakt, že tyto uORFs se vyskytují v eukaryotických mRNA velmi často, naznačuje, že tyto elementy významně přispívají k regulaci exprese eukaryotických mRNA (Calvo et al. 2009). Pomocí modelové mRNA kvasinkového genu *GCN4* bylo odhaleno, že reiniciace vyžaduje přítomnost specifických *cis*-sekvencí obklopujících uORF, který tuto reiniciaci podporuje. Dále bylo prokázáno, že tyto *cis*-sekvence obklopující reiniciační uORF interagují s N-terminální doménou (NTD) jedné z podjednotek kvasinkového eIF3, a to podjednotkou *a/Tif32* (Szamecz et al. 2008; Munzarová et al. 2011; Gunišová a Valášek 2014). Vznik této interakce po terminaci na reiniciačním uORF je klíčkový pro stabilizaci male ribosomální podjednotky na molekule mRNA a následnou reiniciaci.

Abychom odhalili míru konzervovanosti reiniciace mezi nižšími a vyššími eukaryoty, provedli jsme analýzu lidské *ATF4* mRNA, kódující funkční homolog kvasinkového proteinu *GCN4* (Vattem and Wek 2004). Naším hlavním cílem bylo zjistit, zda je reiniciační uORF1 z *ATF4* mRNA též

obklopen specifickými *cis*-sekvencemi, které napomáhají reiniciaci a které jsou v případě uORF1 z *GCN4* mRNA označovány jako RPEs (reinitiation-promoting elements). Dále nás zajímalo, zda je k reiniciaci v savčích buňkách potřebný též faktor eIF3, jako je tomu u kvasinek (viz **Obrázek 1**).



Obrázek 1. Model *ATF4* mRNA. Předpokládané *cis*-sekvence podporující reiniciaci (RPEs) obklopující *ATF4* uORF1 a jejich potenciální interakce s eIF3 jsou naznačeny otazníky. Převzato z Gunišová et al. (podáno).

Cíle práce

Hlavním cílem této práce byl výzkum molekulárního mechanismu reiniciace v lidských buňkách za pomoci studia lidské modelové *ATF4* mRNA. Dalším cílem bylo charakterizovat úlohu N-terminální domény (NTD) kvasinkové podjednotky eIF3a/Tif32, jež podporuje reiniciaci na kvasinkové *GCN4* mRNA. Konkrétními úkoly bylo:

- zavést a použít *in vivo* metodu analyzující krok nasedání mRNA na 43S preiniciační komplexy a s její pomocí charakterizovat potenciální úlohu N-terminální domény eIF3a/Tif32 podjednotky v tomto specifickém kroku iniciace translace
- dále využít tuto metodu k potvrzení úlohy N-terminální domény eIF3a/Tif32 podjednotky ve stabilizaci mRNA na 43S preiniciačních komplexech, a to specificky v blízkosti výstupního mRNA kanálu v ribosomu (“mRNA exit channel”)
- podrobněji zkoumat mechanismus translační reiniciace na kvasinkové modelové *GCN4* mRNA, zejména roli 3’nepřekládané oblasti v *GCN4* mRNA na její celkovou translační regulaci
- zavést *in vivo* reportérový systém založený na měření aktivity *Firefly* luciferázy fúzované s lidskou *ATF4* mRNA a použít ho pro objasnění základních principů reiniciace v lidských buňkách
- zmutovat *ATF4* mRNA za účelem nalezení specifických *cis*-elementů obklopujících *ATF4* uORF1 zodpovědných za vysoký reiniciační potenciál tohoto uORF
- “knock-down” specifických podjednotek eIF3 v lidských buňkách za účelem odhalení role eIF3 v reiniciaci u vyšších eukaryot na lidské modelové *ATF4* mRNA

Materiál a metody

Experimenty týkající se studia nasedání mRNA na 43S preiniciační komplexy byly prováděny na kvasinkovém modelovém organismu *Saccharomyces cerevisiae*; experimenty zaměřené na studium reiniciace v savčích buňkách byly prováděny na buněčných liniích HEK a HeLa.

Seznam metod:

Kultivace kvasinek *S. cerevisiae* a bakterií *E.coli*, jejich transformace

Kultivace buněčných linií HEK, HeLa and MEF (mouse embryonic fibroblasts), jejich transfekce a siRNA aplikace

Manipulace s nukleovými kyselinami, klonování

Western blot

β -galaktozidázová reportérová esej v kvasinkách

Luciferázová reportérová esej v buněčných liniích

Příprava kvasinkových buněčných extraktů a jejich frakcionace v sacharózovém gradientu

Izolace RNA, reverzní transkripce a qPCR

Výsledky a diskuze

Důležitost eIF3 v kroku nasedání mRNA na 43S preiniciační komplexy (PICs) byla naznačena již v několika předchozích studiích. První u nich ukázala, že odebrání eIF3 komplexu z buněk narušuje nasedání modelové *RPL41A* mRNA na 43S PICs *in vivo* (Jivotovskaya et al. 2006). Druhá studie též naznačila, že kvasinkový komplex eIF3 hraje významnou roli v nasedání mRNA na 43S PICs *in vitro* a že je dokonce důležitější než faktory eIF4F a eIF4B (Mitchell et al. 2010). V naší první publikaci (Khoshnevis et al. 2014) jsme testovali specifickou 10-Ala substituci (*Box37*) v N-terminálně lokalizované PCI doméně kvasinkové podjednotky α /Tif32 a ukázali, že tato mutace dramaticky zhoršuje nasedání tří modelových mRNA na 43S PICs jakožto její jediný detekovatelný efekt. Navíc jsme v této publikaci odhalili i krystalovou strukturu této PCI domény, pomocí níž jsme vybrali dva bazické aminokyselinové zbytky a též zkoumali efekt jejich mutací na krok nasedání mRNA. Stejně jako v případě *a/tif32-Box37*, i mutace Arg363 and Lys364 na alaniny snížila množství reportérové *RPL41A* mRNA ve frakcích obsahujících 43S PICs, a to stejně (*a/tif32-R363A*) nebo dokonce více (*a/tif32-K364A*) ve srovnání s *a/tif32-Box37* mutací. Všechny tyto výsledky tedy společně naznačují, že tato oblast PCI domény podjednotky α /Tif32 významně přispívá k vytvoření nebo stabilitě 48S PICs a že oba tyto aminokyselinové zbytky hrají v tomto procesu důležitou roli.

O několik let později jsme potvrdili významnost N-terminální domény podjednotky α /Tif32 (obsahující též *Box37*) v kroku nasedání mRNA naší následující studií využívající kvasinkový *in vitro* rekonstituovaný systém (Aitken, 2016). V této studii jsme použili kvasinkový kmen nesoucí mutaci *a/tif32- Δ 8*, jež je charakterizována zkrácením α /Tif32 podjednotky o prvních 200

aminokyselin. Ukázali jsme, že nasedání modelové mRNA s AUG start kodonem lokalizovaným blízko 3' konce této mRNA, jenž dává vznik komplexu s prázdným vstupním kanálem pro mRNA, je dramaticky zhoršeno touto mutací. Ve skutečnosti měla tato *a/tif32-Δ8* mutace stejný efekt jako absence kompletního eIF3 - v její přítomnosti nedocházelo k žádnému nasedání mRNA na 43S PICs, a to i přesto, že tento eIF3 mutant i ternární komplex byly plně navázány na PIC (Aitken et al. 2016). Na druhou stranu, tato mutace neovlivnila nasedání mRNA obsahující 5' proximální AUG start kodon, jenž tvoří komplex s prázdným výstupním kanálem pro mRNA. To naznačuje, že tento N-terminální úsek a/Tif32 podjednotky je důležitý pro stabilizaci mRNA specificky v místě, kde mRNA ribosom opouští (tzv. mRNA exit channel; výstupní mRNA kanál). Zajímavé je, že s rostoucí délkou mRNA ve vstupním mRNA kanálu se negativní efekt *a/tif32-Δ8* mutace ztrácel. To naznačuje, že úlohy eIF3 na obou z mRNA kanálů (vstupním a výstupním) jsou redundantní. Konečný důkaz pro stabilizační roli N-terminální podjednotky a/Tif32 u výstupního mRNA kanálu přinesly *in vivo* experimenty, kde byla měřena množství různých reportérových mRNA, lišících se délkou svých 5' nepřekládaných oblastí, navázaných na 43S PICs v *a/tif32-Δ8* versus WT buňkách (Aitken et al. 2016). Naší hypotézou bylo, že v případě mutantního eIF3 bude nasedání mRNA molekul s delšími 5' nepřekládanými oblastmi zhoršeno více než u WT eIF3, který je schopen tvořit kontakt s mRNA u výstupního kanálu, zatímco *a/tif32-Δ8* nikoliv. Shodně s naším očekáváním se ukázalo, že *a/tif32-Δ8* mutace snížila množství mRNA molekul asociovaných s 43S PICs v případě všech testovaných modelových mRNA, avšak v případě mRNA molekul s dlouhými 5' nepřekládanými oblastmi měla měla horší efekt v porovnání s WT eIF3.

Následující podrobná studie (Gunišová et al. 2016) poskytla hlubší porozumění procesu translační reiniciace (REI) na kvasinkové modelové mRNA *GCN4*. Zde byly všechny čtyři uORFs z *GCN4* mRNA podrobeny důkladné analýze za účelem najít všechny potenciální *cis*-determinanty, které by pozitivně nebo negativně ovlivňovaly REI na této mRNA. Ukázalo se, že uORFs 1, 2 a 3 obsahují ve své blízkosti konzervovaný motiv bohatý na AU sekvence, jenž podporuje REI pozičně specifickým a nezávislým způsobem, podobně jako elementy podporující REI nacházející se v sekvenci předcházející uORF1 a uORF2. Též se ukázalo, že uORF 2 a 3 jsou obklopeny elementy inhibujícími REI, které jsou lokalizovány "downstream" od jejich AU motivů. Taktéž vyšlo najevo, že pro uORFs v *GCN4* mRNA je klíčový kontext okolo stop kodonů, který určuje, zda daný uORF bude podporovat terminaci translace či znovuzahájení skenování. Celkově vzato poskytla tato publikace komplexní přehled všech *cis*-determinantů ovlivňujících REI na kvasinkové modelové mRNA *GCN4* a pomohla tak nastínit další případné směry výzkumu lidské *ATF4* mRNA.

Lidská reiniciace byla studována v další práci (Hronová et al., 2017). Tato publikace přinesla jedny z prvních vhledů do molekulárního mechanismu reiniciace v lidských buňkách, a to s pomocí lidské modelové mRNA *ATF4* kódující funkční homolog kvasinkového proteinu *GCN4*. V této práci jsme zmužovali sekvence obklopující uORF1 lidské *ATF4* mRNA, jenž velmi připomíná reiniciační uORF1 *GCN4* mRNA, abychom zjistili, zda tyto sekvence taktéž přispívají k efektivitě REI na této mRNA. Odhalili jsme, že, stejně jako u kvasinek, *ATF4* uORF1 je též obklopen sekvencemi

podporujícími reiniciací, a že tyto sekvence přispívají k efektivitě reiniciace na tomto uORF1 nezávisle na sobě. Také jsme predikovali, že sekvence předcházející *ATF4* uORF1 se skládá do specifické, evolučně konzervované, sekundární struktury potřebné pro její reiniciační potenciál. Též jsme zjistili, že, podobně jako je tomu u kvasinkové *GCN4* mRNA, i REI na lidské *ATF4* mRNA je umožňována faktorem eIF3, pouze specifickou přispívající podjednotkou není eIF3a/Tif32, ale eIF3h.

Zajímavostí je, že stejná podjednotka podporuje REI též u rostlin (Roy et al. 2010). Tento rozdíl mezi kvasinkami a savci/roślinami lze vysvětlit tím, že savčí, stejně jako rostlinný, eIF3 obsahuje téměř dvakrát více podjednotek než kvasinkový eIF3 (Valášek et al. 2017). Proto je velmi pravděpodobné, že u vyšších eukaryot některé podjednotky získaly specifické role, jako je například umožnění reiniciace. Tomu také odpovídá fakt, že na rozdíl od kvasinkové reiniciační podjednotky a/Tif32, eIF3h podjednotka není esenciální ani pro člověka, ani pro rostliny. V každém případě je však zajímavé, že na základě posledních strukturních dat zaujímá lidská eIF3h podjednotka pozici na ribosomu velmi podobnou té, kterou zaujímá v kvasinkách reiniciační eIF3a/Tif32 – tedy v blízkosti mRNA výstupního kanálu ribosomu (des Georges et al. 2015). Tato pozice je ideální pro její potenciální interakci s *ATF4* mRNA právě vystupující z ribosomálního výstupního mRNA kanálu po translaci uORF1, což následně umožní znovuzahájení skenování a REI na dalším AUG start kodonu. Na rozdíl od kvasinek však stále ještě není zcela jasné, zda eIF3h opravdu interaguje se sekvencemi obklopujícími *ATF4* uORF1, či nikoliv.

Závěry

Tato Ph.D. práce přinesla nové poznatky týkající se molekulárního mechanismu genově specifického regulačního procesu translace zvaného reiniciace (REI) v kvasinkách a lidských buňkách. Odhalila tak, že mnoho aspektů tohoto procesu zůstalo konzervováno mezi těmito dvěma organismy. Tato PhD práce taktéž přispěla k našemu hlubšímu porozumění principům kanonické iniciace translace v eukaryotických buňkách.

Pomocí několika nezávislých přístupů jsme prokázali, že N-terminální doména kvasinkové podjednotky eIF3a/Tif32 (obsahující též tzv. PCI doménu) hraje klíčovou úlohu při nasedání a stabilizaci mRNA na 43S preiniciačních komplexech, a to specificky v blízkosti výstupního mRNA kanálu ribosomu. Taktéž jsme poskytli krystalovou strukturu této PCI domény eIF3a/Tif32 podjednotky. Díky tomu jsme identifikovali dva konkrétní aminokyselinové zbytky této domény, Arg363 a Lys364, které specificky přispívají ke kroku nasedání mRNA na 43S preiniciační komplexy.

Dále jsme identifikovali nové *cis*-determinanty pozitivně i negativně regulující reiniciaci na kvasinkové modelové *GCN4* mRNA a rozšířili tak již velmi komplexní systém regulace této mRNA ve stresu.

Též jsme úspěšně zavedli a použili reportérový systém v HEK a HeLa buňkách využívající lidskou *ATF4* mRNA zfúzovanou s *Firefly* luciferázou, který nám umožnil identifikovat specifické sekvence obklopující *ATF4* uORF1, které zajišťují vysoký reiniciační potenciál tohoto uORF. Ukázali jsme, že obě tyto sekvence (5' a 3' sekvence) přispívají k efektivitě reiniciace nezávisle na sobě. Dále jsme predikovali *in silico*, že, podobně jako u kvasinek, sekvence předcházející *ATF4* uORF1 (5' sekvence) se skládá do specifické sekundární struktury po translaci tohoto uORF1, a že je tato sekundární struktura evolučně konzervována. Také jsme odhalili, že reiniciace na lidské *ATF4* mRNA je umožňována jednou z podjednotek faktoru eIF3, podjednotkou eIF3h.

References / Použitá literatura

- Aitken, Colin Echeverría, Petra Beznosková, Vladislav Vlčková, Wen-Ling Chiu, Fujun Zhou, Leoš Shivaya Valášek, Alan G. Hinnebusch, and Jon R. Lorsch. 2016. "eIF3 Plays Distinct Roles at the mRNA Entry and Exit Channels of the Ribosomal Preinitiation Complex." *eLife* doi:10.1101/072702.
- Calvo, Sarah E., David J. Pagliarini, and Vamsi K. Mootha. 2009. "Upstream Open Reading Frames Cause Widespread Reduction of Protein Expression and Are Polymorphic among Humans." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106 (18): 7507–12.
- Georges, Amedee des, Vidya Dhote, Lauriane Kuhn, Christopher U. T. Hellen, Tatyana V. Pestova, Joachim Frank, and Yaser Hashem. 2015. "Structure of Mammalian eIF3 in the Context of the 43S Preinitiation Complex." *Nature* 525 (7570): 491–95.
- Gunišová, Stanislava, Petra Beznosková, Mahabub Pasha Mohammad, Vladislava Vlčková, and Leoš Shivaya Valášek. 2016. "In-Depth Analysis of Cis-Determinants That Either Promote or Inhibit Reinitiation on GCN4 mRNA after Translation of Its Four Short uORFs." *RNA* 22 (4): 542–58.
- Gunišová, Stanislava, and Leoš Shivaya Valášek. 2014. "Fail-Safe Mechanism of GCN4 Translational Control--uORF2 Promotes Reinitiation by Analogous Mechanism to uORF1 and Thus Secures Its Key Role in GCN4 Expression." *Nucleic Acids Research* 42 (9): 5880–93.
- Hronová, Vladislava, Mahabub Pasha Mohammad, Susan Wagner, Josef Pánek, Stanislava Gunišová, Jakub Zeman, Kristýna Poncová, and Leoš Shivaya Valášek. 2017. "Does eIF3 Promote Reinitiation after Translation of Short Upstream ORFs Also in Mammalian Cells?" *RNA Biology*, July, 1–8.
- Jivotovskaya, Antonina V., Leoš Valášek, Alan G. Hinnebusch, and Klaus H. Nielsen. 2006. "Eukaryotic Translation Initiation Factor 3 (eIF3) and eIF2 Can Promote mRNA Binding to 40S Subunits Independently of eIF4G in Yeast." *Molecular and Cellular Biology* 26 (4): 1355–72.
- Khoshnevis, Sohail, Stanislava Gunišová, Vladislava Vlčková, Tomáš Kouba, Piotr Neumann, Petra Beznosková, Ralf Ficner, and Leoš Shivaya Valášek. 2014. "Structural Integrity of the PCI Domain of eIF3a/TIF32 Is Required for mRNA Recruitment to the 43S Pre-Initiation Complexes." *Nucleic Acids Research* 42 (6): 4123–39.
- Mitchell, Sarah F., Sarah E. Walker, Mikkel A. Algire, Eun-Hee Park, Alan G. Hinnebusch, and Jon R. Lorsch. 2010. "The 5'-7-Methylguanosine Cap on Eukaryotic mRNAs Serves Both to Stimulate Canonical Translation Initiation and to Block an Alternative Pathway." *Molecular Cell* 39 (6): 950–62.
- Munzarová, Vanda, Josef Pánek, Stanislava Gunišová, István Dányi, Béla Szamecz, and Leoš Shivaya Valášek. 2011. "Translation Reinitiation Relies on the Interaction between eIF3a/TIF32 and Progressively Folded Cis-Acting mRNA Elements Preceding Short uORFs." *PLoS Genetics* 7 (7): e1002137.
- Roy, Bijoyita, Justin N. Vaughn, Byung-Hoon Kim, Fujun Zhou, Michael A. Gilchrist, and Albrecht G. Von Arnim. 2010. "The H Subunit of eIF3 Promotes Reinitiation Competence during Translation of mRNAs Harboring Upstream Open Reading Frames." *RNA* 16 (4): 748–61.
- Sonenberg, Nahum, and Alan G. Hinnebusch. 2009. "Regulation of Translation Initiation in Eukaryotes: Mechanisms and Biological Targets." *Cell* 136 (4): 731–45.
- Szamecz, Béla, Edit Rutkai, Lucie Cuchalová, Vanda Munzarová, Anna Herrmannová, Klaus H. Nielsen, Laxminarayana Burela, Alan G. Hinnebusch, and Leoš Valášek. 2008. "eIF3a Cooperates with Sequences 5' of uORF1 to Promote Resumption of Scanning by Post-Termination Ribosomes for Reinitiation on GCN4 mRNA." *Genes & Development* 22 (17): 2414–25.
- Valášek, Leoš Shivaya, Jakub Zeman, Susan Wagner, Petra Beznosková, Zuzana Pavlíková, Mahabub Pasha Mohammad, Vladislava Hronová, Anna Herrmannová, Yaser Hashem, and Stanislava Gunišová. 2017. "Embraced by eIF3: Structural and Functional Insights into the Roles of eIF3 across the Translation Cycle." *Nucleic Acids Research* 45 (19): 10948–68.
- Vattem, Krishna M., and Ronald C. Wek. 2004. "Reinitiation Involving Upstream ORFs Regulates ATF4 mRNA Translation in Mammalian Cells." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 (31): 11269–74.

Curriculum Vitae

Vladislava Hronová (nee Vladislava Vlčková)

Home address: Ve Stromkách 377, 252 42 Vestec, the Czech Republic

Birth: 12th April 1989 in České Budějovice, the Czech Republic

E-mail: vladkavlckova@seznam.cz, vladislava.vlckova@natur.cuni.cz

Cell Phone: +420 734 858 906

Work address: Institute of Microbiology, AS CR, v.v.i., Vídeňská 1083, Prague 4, 142 20, the Czech Republic

Education

2013 - present **Institution:** Faculty of Science, Charles University in Prague, Czech Rep.

Field of Study: Molecular and Cell Biology, Genetics and Virology

Title of PhD Thesis: Molecular principles of translation reinitiation in mammals

Degree: PhD to be obtained

Tutor: Leoš Valášek, PhD

2011 - 2013 **Institution:** Faculty of Science, Charles University in Prague, Czech Rep.

Field of Study: Genetics, Molecular Biology and Virology

Title of Master Thesis: The role of the N-terminal domain of the α /TIF32 subunit of eIF3 in mRNA recruitment to the 43S pre-initiation complexes

Degree: Master

Tutor: Leoš Valášek, PhD

2008 - 2011 **Institution:** Faculty of Science, Charles University in Prague, Czech Rep.

Field of Study: Molecular Biology and Biochemistry of Organisms

Title of Bachelor Thesis: Translation reinitiation mechanism on mRNA of transcriptional activator *GCN4*

Degree: Bachelor

Tutor: Leoš Valášek, PhD

Internships

2013 **Institution:** Laboratory of Signaling and Gene Expression in Inflammation, Max F. Perutz Laboratories, Vienna Biocenter, Vienna, Austria

Description: Semester internship during Erasmus program. Preparation of cell lines expressing various TLRs and testing their abilities to recognize various products of *Streptococcus pyogenes* bacterium

2012 **Institution:** Laboratory of Function and Biology of DNA Topoisomerases, Department of Biochemistry, Vanderbilt University School of Medicine, Nashville, Tennessee, USA

Description: Two-month internship "Summer Research Academy" organized by Vanderbilt University for selected students. Work on project „Drug resistance and *Escherichia coli* Topoisomerase IV“ using various biochemical methods

Language Skills

English – advanced (fluent speaker) C1

German – pre-intermediate B1

Grants, awards and honors

2015 to 2017 - A three-year student grant awarded by Grant Agency of Charles University (GA UK)

2013 - Award for a supreme defence of Diploma thesis at the Department of Microbiology and Genetics, Faculty of Science, Charles University

2013 - Award for the best Diploma thesis carried out at the Institute of Microbiology, Academy of Science in Prague

2013 - Master degree with distinction

2011 - Bachelor degree with distinction

All publications of the author

2017 - GUNIŠOVÁ, S., HRONOVÁ, V., MOHAMMAD, M., HINNEBUSCH, A.G. *, VALÁŠEK, L. **Please do not recycle! Translation reinitiation in microbes and higher eukaryotes.** *FEMS Microbiol Reviews*, submitted.

2017 - VALÁŠEK, L., ZEMAN, J., WAGNER, S., BEZNOSKOVÁ, P., PAVLÍKOVÁ, Z., MOHAMMAD, M., HRONOVÁ, V., HERRMANNOVÁ, A., HASHEM, Y., GUNIŠOVÁ, S. **Embraced by eIF3: structural and functional insights into the roles of eIF3 across the translation cycle.** *Nucleic Acids Research*, 2017, doi: 10.1093/nar/gkx805

2017 - HRONOVÁ V., MOHAMMAD M., WAGNER S., PÁNEK J., GUNIŠOVÁ S., ZEMAN J., PONCOVÁ K., VALÁŠEK L. **Does eIF3 promote reinitiation after translation of short upstream ORFs also in mammalian cells?** *RNA Biology*, 2017, doi: 10.1080/15476286.2017

2017 - HRONOVÁ V., VALÁŠEK L. **Translational control: An emergency brake for protein synthesis.** *eLife*, 2017, vol. 6, s. 1-3. ISSN 2050-084X

2016 - AITKEN C., BEZNOSKOVÁ P., VLČKOVÁ V., CHIU W., ZHOU F., VALÁŠEK L., HINNEBUSCH A., LORSCH J. **Eukaryotic translation initiation factor 3 plays distinct roles at the mRNA entry and exit channels of the ribosomal preinitiation complex.** *eLife*, 2016, vol. 5. ISSN 2050-084X

2016 - GUNIŠOVÁ S., BEZNOSKOVÁ P., MOHAMMAD M., VLČKOVÁ V., VALÁŠEK L. **In-depth analysis of cis-determinants that either promote or inhibit reinitiation on GCN4 mRNA after translation of its four short uORFs.** *RNA*, 2016, vol. 22, s. 542-558. ISSN 1355-8382

2014 - ALDRED K., BRELAND E., VLČKOVÁ V., STRUB M., NEUMAN K., KERNS R., OSHEROFF N. **Role of the Water-Metal Ion Bridge in Mediating Interactions between Quinolones and Escherichia coli Topoisomerase IV.** *Biochemistry*, 2014, vol. 53, s. 5558-5567. ISSN 0006-2960

2014 - KHOSHNEVIS S. *, GUNIŠOVÁ S. *, VLČKOVÁ V. *, KOUBA T., NEUMANN P., BEZNOSKOVÁ P., FICNER R., VALÁŠEK L. **Structural integrity of the PCI domain of eIF3a/TIF32 is required for mRNA recruitment to the 43S pre-initiation complexes.** *Nucleic Acids Research*, 2014, vol. 42, s. 4123-4139. ISSN 0305-1048

**These authors contributed equally to the paper as first authors*

2012 - KOUBA T., DANYI I., GUNIŠOVÁ S., MUNZAROVÁ V., VLČKOVÁ V., CUCHALOVÁ L., NEUEDER A., MILKEREIT P., VALÁŠEK L. **Small Ribosomal Protein RPS0 Stimulates Translation Initiation by Mediating 40S-Binding of eIF3 via Its Direct Contact with the eIF3a/TIF32 Subunit.** *PLoS ONE*, 2012, vol. 7. ISSN 1932-6203

List of publications

Structural integrity of the PCI domain of eIF3a/TIF32 is required for mRNA recruitment to the 43S pre-initiation complexes

Sohail Khoshnevis*, Stanislava Gunišová*, Vladislava Vlčková*, Tomáš Kouba, Piotr Neumann, Petra Beznosková, Ralf Ficner, and Leoš Shivaya Valášek

*These authors contributed equally to the paper as first authors.

Nucleic Acids Research. 2014 Apr 42(6): 4123–4139; PMID: 24423867; IF₂₀₁₄ 9.112

Eukaryotic translation initiation factor 3 plays distinct roles at the mRNA entry and exit channels of the ribosomal preinitiation complex

Colin Echeverría Aitken, Petra Beznosková, Vladislava Vlčková, Wen-Ling Chiu, Fujun Zhou, Leoš Shivaya Valášek, Alan G. Hinnebusch, Jon R. Lorsch

eLife. 2016 Oct 26;5. pii: e20934; PMID: 27782884; IF₂₀₁₆ 7.725

In-depth analysis of cis-determinants that either promote or inhibit reinitiation on GCN4 after translation of its four short uORFs

Stanislava Gunišová, Petra Beznosková, Mahabub Pasha Mohammad, Vladislava Vlčková, and Leoš Shivaya Valášek

RNA. 2016 Apr 22(4):542-58; PMID: 26822200; IF₂₀₁₆ 4.605

Does eIF3 promote reinitiation after translation of short upstream ORFs also in mammalian cells?

Vladislava Hronová, Mahabub Pasha Mohammad, Susan Wagner, Josef Pánek, Stanislava Gunišová, Jakub Zeman, Kristýna Poncová, and Leoš Shivaya Valášek

RNA Biology. 2017 Jul 26 doi: 10.1080/15476286.2017; PMID: 28745933; IF₂₀₁₆ 3.900

An emergency brake for protein synthesis

Vladislava Hronová and Leoš Shivaya Valášek

eLife. 2017 Apr 25;6. pii: e27085; PMID: 28440747; IF₂₀₁₆ 7.725

Embraced by eIF3: structural and functional insights into the roles of eIF3 across the translation cycle

Leoš Shivaya Valášek, Jakub Zeman, Susan Wagner, Petra Beznosková, Zuzana Pavlíková, Mahabub Pasha Mohammad, Vladislava Hronová, Anna Herrmannová, Yaser Hashem, and Stanislava Gunišová

Nucleic Acids Research. 2017 Nov 2;45(19):10948-10968; PMID: 28981723; IF₂₀₁₆ 10.162

Please do not recycle! Translation reinitiation in microbes and higher eukaryotes

Stanislava Gunišová, Vladislava Hronová, Mahabub Pasha Mohammad, Alan G. Hinnebusch, and Leoš Shivaya Valášek

FEMS Microbiology Reviews – submitted; IF₂₀₁₆ 12.198