

**Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta**  
**Katedra genetiky a mikrobiologie**

Autoreferát disertační práce



**Charakterizace dvou nejmenších podjednotek iniciačního faktoru eIF3 a  
jejich role v translaci**

**Mgr. Lucie Cuchalová**

Školitel: Leoš ShivayaValášek, Ph.D.

Praha, 2013

## Obsah

Abstrakt.....	2
Úvod.....	3
Cíle mé práce .....	4
Materiál a metodika .....	4
Seznam metod.....	4
Výsledky a diskuse .....	5
Závěry .....	7
Seznam použité literatury .....	7
Curriculum Vitae .....	8
Seznam publikací .....	10
Abstract.....	12
Introduction.....	13
Aims of the study .....	14
Material and methods.....	14
List of methods .....	14
Results and discussion .....	15
Conclusions.....	17
References.....	17
Curriculum Vitae .....	18
Selected publications .....	20

## Abstrakt

Syntéza bílkovin, neboli translace mRNA, je komplexní a velmi konzervovaný proces. Translace probíhá v několika na sebe navazujících fázích: iniciaci, elongaci, terminaci a recyklaci ribozomu. Vzhledem k tomu, že většina regulačních procesů probíhá v iniciační fázi, již po několik desetiletí je právě k ní upírán vědecký zrak se snahou objasnit molekulární mechanismus všech jejích kontrolních bodů. Iniciační faktor eIF3, který se v kvasinkách skládá z pěti esenciálních podjednotek tvořících jeho jádro (eIF3a/TIF32, b/PRT1, c/NIP1, g/TIF35, a i/TIF34) a jedné přidružené neesenciální podjednotky (j/HCR1), patří neoddiskutovatelně ke klíčovým hráčům iniciace. Kromě této úlohy hraje rovněž důležitou roli v recyklaci ribozomu, reiniciaci, signálních drahách buněčné signalizace, kontrolních a regulačních mechanismech, jakým je kupříkladu degradace mRNA s předčasným stop kodonem (nonsense-mediated mRNA decay - NMD) atp.

Zaměřili jsme se na objasnění molekulárního mechanismu, kterým eIF3 spolu s ostatními iniciačními faktory vykonávající svou funkci nejen v iniciaci translace, ale i její terminaci a reiniciaci. To zahrnovalo mimo jiné i genetické mapování vazebných míst eIF3 na malou ribozomální podjednotku.

Ukázali jsme, že vazba mezi 200-400-tým aminokyselinovým zbytkem N-konce a/eIF3 a flexibilním chvostem C-konce RPS0A významně stimuluje navázání eIF3 a s ní asociovaných faktorů na malou ribozomální podjednotku *in vivo*, a tak a/TIF32-NTD, spolu s nedávno publikovanou PCI (proteasome component) doménou C-konce c/NIP1, tvoří důležitý mezimolekulární most mezi eIF3 a 40S. Dále jsme předvedli, že částečná delece domény vázající RPS0A v a/TIF32 blokuje znovu zahájení translace genu *GCN4*, který probíhá prostřednictvím reiniciaci. Genetická analýza odhalila funkční vazbu mezi 5' *cis*-působícími sekvencemi mRNA genu *GCN4* a N-koncem a/TIF32. Tato interakce se podílí na stabilizování post-terminačních 40S ribozomálních podjednotek na uORF1 (čtecím rámci v protisměru) mRNA genu *GCN4* a obnovení skenování.

Další část mé dizertační práce odhaluje funkční charakteristiku dvou esenciálních podjednotek eIF3: g/TIF5 and i/TIF34, u kterých bylo dříve *in vitro* prokázáno, že jsou postradatelné pro vytvoření 48S neiniciačních komplexů, jedné ze základních rolí eIF3. Ukázali jsme, že oba proteiny ovlivňují rychlost a procesivitu skeninku v živých buňkách. Dále jsme ukázali, že g/TIF35 se specificky váže na ribozomální proteiny RPS3 a RPS20, které se nalézají v blízkosti vstupního kanálu mRNA do ribozomu a její RRM (RNA recognition motif) doména hraje roli v reiniciaci již zmiňovaným stabilizování uORF1 post-terminačních 40S ribozomů na mRNA genu *GCN4*, ačkoliv jiným molekulárním mechanismem než a/TIF32-NTD. Mimo to jsme uveřejnili krystalovou strukturu, v rozlišení 2.2Å, i/TIF34 podjednotky v komplexu s malou částí C-konce b/PRT1 (654-700-tým zbytkem).

V poslední části mé dizertační práce jsme identifikovali a definovali roli eIF3 v procesu rozpoznání stop kodonu a odhalili její aktivní roli v terminaci translace.

## Úvod

Syntéza bílkovin neboli translace mRNA je celistvý a konzervovaný proces. Translace může být rozdělena do těchto fází: iniciace, elongace, terminace a recyklace ribozomu.

Na iniciační fázi syntézy bílkovin se podílí několik proteinů nebo proteinových komplexů, kterým říkáme iniciační faktory (initiation factors - eIFs). Začátek translačního cyklu zahrnuje několik kroků vedoucích k formování 80S iniciačního komplexu (initiation complex - IC) na AUG start kodonu: 1) navázání Met-tRNA<sup>Met</sup> na 40S podjednotku, vytvoření 43S preiniciační komplex (pre-initiation complex - PIC), 2) vazbu mRNA k 43S PIC, vytvoření 48S PIC, 3) skenování mRNA, hledání prvního start kodonu a po jeho nalezení 4) připojení 60S, formování 80S, který je zároveň iniciačním komplexem elongační fáze. Iniciační faktor translace eIF3, který se v kvasinkách skládá z pěti esenciálních podjednotek tvořících jeho jádro (eIF3a/TIF32, b/PRT1, c/NIP1, g/TIF35, a i/TIF34) a jedné přidružené neesenciální podjednotky (j/HCR1), se aktivně zapojuje v regulaci prvních tří kroků (Valášek, Mathew et al. 2003; Szamecz, Rutkai et al. 2008; Cuchalová, Kouba et al. 2010; ElAntak, Wagner et al. 2010; Herrmannová, Dajotyte et al. 2012; Valášek 2012). Tvorba preiniciačních komplexů je stimulována nejen samotnou eIF3, ale podporuje ji v tom, zatím neznámým mechanismem, její interakční partnerem, kterým je protein ABCE/RLI1 s ATP-vázající kazetou (Dong, Liu et al. 2004).

Po iniciaci následuje elongace, kdy dochází k připojování aminokyselin ke vznikajícímu polypeptidovému řetězci.

Terminace nastává, když ribozom dosáhne konce kódující oblasti a v ribozomálním A- místě se objeví stop kodon (UAA, UAG a UGA). Terminační proces se skládá z rozpoznání stop-kodonu a hydrolýze esterové vazby peptid-tRNA v ribozomálním P-místě, která uvolňuje vznikající polypeptid (Jackson, Hellen et al. 2012).

Po proběhlé terminaci jsou přítomny post-terminační komplexy (post-termination complexes - post-TCs), které je nutno recyklovat, a které se skládají z 80S stále vázané k mRNA, tRNA v P-místě a eukaryotických faktorů 1 a 3 (tedy minimálně eRF1). V eukaryotách bylo ukázáno, že kromě již zmíněných eRF1 a eRF3 hraje esenciální roli v recyklaci ribozomu ABCE1/RLI1 (Pisarev, Hellen et al. 2007; Pisarev, Skabkin et al. 2010). Je třeba poznamenat, že molekulární mechanismus, jakým jsou eRF1 a eRF3 uvolněny z postterminačních komplexů je stále neznámý.

Vedle klasické cesty iniciaci translace existuje řada alternativních mechanismů iniciace, které jsou používány zejména viry nebo jsou využity v kontrole translace některých genů. Zakládají se na 5' cis-působících sekvencích mRNA a vyžadují různé faktory. Jedním z takových mechanismů je reiniciace (reinitiation - REI), která pomáhá, na základě stimulů z okolí, regulovat zvýšení či snížení exprese/translace regulačních proteinů jakými jsou transkripční faktory a protoonkogen. (Kozak 2005). Je to specifický mechanismus kontroly, který je charakterizován schopností post-terminačních 40S zůstat na mRNA u některých uORF (Hinnebusch 2005).

## Cíle mé práce

Cílem této práce bylo pochopit a popsat molekulární mechanismus, kterým hraje iniciační factor eIF3 a s ním sdružené factory svou úlohu nejen v iniciaci translace, ale i terminaci a recyklaci ribozomu:

1. Snažili jsme se najít odpověď na dlouho položenou otázku a to jakým mechanismem je zajištěna vysoce efektivní reiniciace po přečtení regulačního čtecího rámce uORF1 na mRNA genu *GCN4*.
2. Zaměřili jsme se na charakterizaci dvou nejmenších podjednotek eIF3, kterými jsou g/TIF35 a i/TIF34, se snahou objasnit jejich funkci, která byla doposud neznámá, přestože jsou obě tyto podjednotky esenciální.
3. Dalším naším cílem bylo pochopit a popsat úlohu, kterou hraje eIF3 v terminaci.

## Materiál a metodika

Experimenty byly provedeny na modelu pučičích kvasinek *Saccharomyces cerevisiae*.

## Seznam metod

Analýza polyzomového profilu

1% nebo 2% HCHO-fixace, příprava buněčného extraktu a jeho následná frakcionace pro analýzu preiniciačních komplexů

$\beta$ -galactozidázová analýza

Glutathion S-transferáza (GST) vazebná analýza

Western blot analýza

mRNA vazebná analýza

Ni<sup>2+</sup> chelatační chromatografie

NMR spektroskopie

40S-vazebná analýza

Příprava protilátek

Read-through analýza

Analýza polyzomových gradientů

Koimunoprecipitace a tag-vazebná analýza

## Výsledky a diskuse

### Mapování vazebných míst eIF3 na 40S ribozomu

Systematické úsilí bylo věnováno mapování vazebných míst eIF3 na 40S ribozomu. Již dříve jsme ukázali, že několik důležitých domén podjednotek eIF3 spolu s eIF5 zprostředkovávají interakci multifaktorového komplexu (multifactor complex - MFC) s 40S a toto zjištění nám dovolilo předpovědět některé aspekty v organizaci 43S PIC (Valášek, Mathew et al. 2003). V článcích této dizertační práce jsme ukázali, že (i) částečná delece v eIF3a doméně vázající RPS0A-binding zhoršuje iniciaci translace a redukuje vazbu eIF3 a s ní asociovaných faktorů na nativní preiniciační komplex *in vivo* (Szamecz, Rutkai et al. 2008) (ii) g/TIF35 interaguje s 40S „beak“ proteinem RPS20 a především RPS3 (Cuchalová, Kouba et al. 2010), jenž je hlavní komponentou při změně nastávající na konci skenování, která je charakterizována rozvolněním vazby mezi RPS3 a helixem 16 - 18S rRNA a následným přeskupením spojení helix18–helix34-RPS3, které se nazývá petlicí mRNA vstupního kanálu (Passmore, Schmeing et al. 2007) (iii) delece extrémní C-koncové domény (C-terminal tail - CTT) proteinu RPS0A znemožnila ukotvení MFC k malé ribozomální podjednotce, jak bylo předpovězeno (Kouba, Danyi et al. 2012). Na základě všech známých zjištění jsme označili N-koncovou doménu proteinu a/TIF32 a PCI doménu v C-koncové doméně proteinu c/NIP1 (Kouba, Rutkai et al. 2012) jako hlavní komponenty intramolekulárního mostu, který tvoří skrze interakce se svými partnery na 40S podjednotce a to RPS0A a ASC1 a modifikovali jsme náš originální model proteinu eIF3 na 40S.

### Charakterizace dvou nejmenších podjednotek eIF3 a jejich role v translaci

V další sérii článku jsme se zaměřili na funkční charakterizaci dvou malých podjednotek eIF3, kterými jsou g/TIF35 a i/TIF34. Jejich role v živých buňkách zůstávala neobjasněna, přestože jsou obě esenciální (Naranda, Kainuma et al. 1997; Humphrey and Enoch 1998; Hanachi, Hershey et al. 1999). Testovali jsme, zda jejich mutanty prokazují fenotypy, které by ukazovali jejich úlohu v kontrole translace genu *GCN4* (Hinnebusch 2005). Zjistili jsme, že obě podjednotky stimulují lineární skenování a geneticky interagují s několika iniciačními faktory, které skenování podporují. Dále jsme ukázali, že RRM doména (RNA recognition motif domain) eIF3 podjednotky - g/TIF35 hraje roli ve stabilizování postterminačních 40S na mRNA genu *GCN4* (Cuchalová, Kouba et al. 2010). Kromě výše zmíněných skutečností, že g/TIF35 specificky interaguje s ribozomálními proteiny RPS3 a RPS20, které se nalézají blízko vstupního mRNA kanálu, jsme získali interakci mezi těmito malými podjednotkami eIF3 a N a N-M doménou RF1 (Cuchalova and Beznoskova et al. under the review).

Dále jsme uveřejnili krystalickou strukturu komplexu i/TIF34 a minimální části C- koncové domény proteinu b/PRT1 (654–700), definované NMR spektroskopii. Mimo to jsme předpověděli, že stabilita vazby mini-modulu i/TIF34–g/TIF35 ke zbytku eIF3 přes b/PRT1 signifikantně kotví eIF3 a eIF5 k vznikajícímu pre-iniciačnímu komplexu *in vivo* a zajišťuje přesnost skenování (Herrmannová, Daujotyte et al. 2012).

### **eIF3 je rozhodující hráč pro obnovení skenování postterminačních ribozomů**

Odhálili jsme, že eIF3 je kriticky vyžadováno pro obnovení skenování postterminačních ribozomů, což je životně důležitá podmínka úspěšné reiniciace. Detekovali jsme genetickou interakci mezi N-koncovou doménou a/TIF32 ( $\Delta 8$ ) s částečnou delecí v RPS0A vazebné části a mutací v sekvenci 5' konce otevřeného čtecího rámce - uORF1, kdy deleční efekt v a/TIF32- $\Delta 8$  na reiniciaci byl umlčen nebo alespoň eliminován těmito mutacemi v 5' nepřekládané oblasti. Genetická epistáze mezi mutacemi v identifikované stimulační nepřekládané oblasti před uORF1 a a/TIF32- $\Delta 8$  přesvědčivě ukazuje, že eIF3a se váže na reiniciaci zajišťující sekvence, kterým říkáme "reakční místa" a/TIF32-NTD (a/TIF32-NTD-responsive site, eIF3a-RS). Předpověděli jsme, že vytvoření interakce mezi a/TIF32-NTD a specifickými místy - eIF3a-RS na 5' uORF1 blízko výstupního kanálu mRNA z ribozomální podjednotky stabilizuje asociaci postterminačních 40S s mRNA a tak zajišťuje následné obnovení skenování mRNA a úspěšnou reiniciaci (Szamecz, Rutkai et al. 2008).

Kromě toho jsme ukázali, že substituce konzervovaných reziduí v RRM doméně g/TIF35 způsobuje silný Gcn<sup>-</sup> fenotyp také díky neschopnosti postterminačních 40S podjednotek obnovit skenování a reiniciovat po přečtení uORF1 genu *GCN4*. Podrobná genetická analýza však odhalila, že g/TIF35-RRM a a/TIF32-NTD zajišťují efektivitu výše popsaných fenoménů, jakými je reiniciace, odlišnými molekulárními mechanismy (Cuchalová, Kouba et al. 2010).

### **eIF3 je důležitým spojujícím článkem mezi iniciací a terminací translace**

Vzhledem k tomu, že predikce role eIF3 v procesu recyklace ribozomu byla založena pouze na experimentech s 11 kodónovou mRNA v rekonstruovaném savčím *in vitro* modelu, jsme se rozhodli vyšetřit, zda eIF3 hraje úlohu v terminaci translace a/nebo recyklaci ribozomu v živých buňkách. Ukázali jsme, že se eIF3 objevuje *in vivo* společně v komplexu s uvolňujícími faktory eRF1, eRF3 a RLI1, faktorem recyklujícím ribozomy, nezávisle na ribozomech a RNA. Různé mutanty eIF3 jaderných podjednotek, ale nikoli jiných iniciačních faktorů, způsobily sníženou schopnost „pročtení“ - read-through stop kodonu v živých buňkách a ukázali syntetický fenotyp s mutantami v RF1 a RF3. Nutno poznamenat, že fenotyp snížené schopnosti pročtení stop kodonu nebyl nikdy před tím pozorován. Naproti tomu delece neesenciální podjednotky j/HCR1 zvýšila schopnost pročtení stop kodonu, což vedlo k nahromadění eRF3 v těžkých polyzomech. Zvýšená dávka RLI1 v buňkách plně suprimovala růstový a „pročítací“ fenotyp způsobený delecí j/HCR1, ale nesuprimovala fenotyp v iniciaci translace. Vzhledem k tomu, že jsme ukázali, že tak substituovala roli j/HCR1 v terminaci, ale nikoli v iniciaci, můžeme tato zjištění uzavřít tvrzením, že funkce j/HCR1 v terminaci je důležitější pro proliferaci buněk než její role v iniciaci. Fakt, že jsme detekovali komplex mezi eIF3, RLI1 a oběma eRF1 a eRF3 nezávisle na RNA a ribozomech, a že obě malé podjednotky eIF3: i/TIF34 a g/TIF35 se přímo váží na N a N-M domény eRF1, nám dovoluje predikovat, že alespoň eIF3 a uvolňovací faktory eRF1 a eRF3 přicházejí do pre-terminačního komplexu v spolu (Cuchalova and Beznoskova et al. 2013).

## Závěry

Provedli jsme genetické a biochemické mapování vazebných míst kvasinkové eIF3 na malé ribozomální podjednotce, které nám umožnilo přemodelování eIF3-40S komplexu.

Zaměřili jsme se na funkční charakterizaci dvou esenciálních podjednotek eIF3: g/TIF35 a i/TIF34, a ukázali první vhléd do jejich role v iniciaci translace, stejně jako kontrole translace/exprese genu *GCN4*. Kromě toho jsme publikovali krystalickou strukturu podjednotky i/TIF34 v komplexu s minimální částí CTD domény podjednotky b/PRT1.

Odhalili jsme, že a/TIF32-NTD a g/TIF35-RRM, jsou velmi kriticky vyžadováni pro obnovení skenování postterminačních ribozomů, což je nutná podmínka efektivní reiniciace

Nakonec jsme identifikovali a definovali roli eIF3 v terminaci a na základě našich zjištění predikujeme, že změny v každé fázi jsou okamžitě reflektovány změnami v jiné fázi, aby byla zachována homeostáze a nepřerušen proces.

## Seznam použité literatury

Cuchalová, L., T. Kouba, et al. (2010). "The RNA Recognition Motif of Eukaryotic Translation Initiation Factor 3g (eIF3g) Is Required for Resumption of Scanning of Posttermination Ribosomes for Reinitiation on GCN4 and Together with eIF3i Stimulates Linear Scanning." *Mol Cell Biol* 30(19): 4671-4686.

Dong, Z., L. H. Liu, et al. (2004). "Role of eIF3 p170 in controlling synthesis of ribonucleotide reductase M2 and cell growth." *Oncogene* 23(21): 3790-3801.

ElAntak, L., S. Wagner, et al. (2010). "The indispensable N-terminal half of eIF3j co-operates with its structurally conserved binding partner eIF3b-RRM and eIF1A in stringent AUG selection." *J Mol Biol.* 396: 1097-1116.

Hanachi, P., J. W. B. Hershey, et al. (1999). "Characterization of the p33 subunit of eukaryotic translation initiation factor-3 from *Saccharomyces cerevisiae*." *J Biol Chem* 274: 8546-8553.

Herrmannová, A., D. Dajotyte, et al. (2012). "Structural analysis of an eIF3 subcomplex reveals conserved interactions required for a stable and proper translation pre-Initiation complex assembly." *Nucleic Acids Res.* 40(5): 2294-311.

Hinnebusch, A. G. (2005). "Translational regulation of GCN4 and the general amino acid control of yeast." *Annu Rev Microbiol.* 59: 407-50.

Humphrey, T. and T. Enoch (1998). "Sum1, a highly conserved WD-repeat protein, suppresses S-M checkpoint mutants and inhibits the osmotic stress cell cycle response in fission yeast." *Genetics* 148: 1731-1742.



Jackson, R. J., C. U. Hellen, et al. (2012). "Termination and post-termination events in eukaryotic translation." *Adv Protein Chem Struct Biol* 86: 45-93.

Kouba, T., I. Danyi, et al. (2012). "Small Ribosomal Protein RPS0 Stimulates Translation Initiation by Mediating 40S-binding of eIF3 via its Direct Contact with the eIF3a/TIF32 Subunit." *PLoS One*: in press.

Kouba, T., E. Rutkai, et al. (2012). "The eIF3c/NIP1 PCI domain interacts with RNA and RACK1/ASC1 and promotes assembly of the pre-initiation complexes." *Nucleic Acids Research* 40(6): 2683-99.

Kozak, M. (2005). "Regulation of translation via mRNA structure in prokaryotes and eukaryotes." *Gene* 361: 13-37.

Naranda, T., M. Kainuma, et al. (1997). "The 39-kilodalton subunit of eukaryotic translation initiation factor 3 is essential for the complex's integrity and for cell viability in *Saccharomyces cerevisiae*." *Mol Cell Biol* 17: 145-153.

Passmore, L. A., T. M. Schmeing, et al. (2007). "The eukaryotic translation initiation factors eIF1 and eIF1A induce an open conformation of the 40S ribosome." *Mol Cell* 26: 41-50.

Pisarev, A. V., C. U. T. Hellen, et al. (2007). "Recycling of Eukaryotic Posttermination Ribosomal Complexes." *Cell* 131: 286–299.

Pisarev, A. V., M. A. Skabkin, et al. (2010). "The Role of ABCE1 in Eukaryotic Posttermination Ribosomal Recycling." *Mol Cell* 37(2): 196-210.

Szamecz, B., E. Rutkai, et al. (2008). "eIF3a cooperates with sequences 5' of uORF1 to promote resumption of scanning by post-termination ribosomes for reinitiation on GCN4 mRNA." *Genes Dev* 22(17): 2414-2425.

Valášek, L., A. Mathew, et al. (2003). "The Yeast eIF3 Subunits TIF32/a and NIP1/c and eIF5 Make Critical Connections with the 40S Ribosome in vivo." *Genes Dev* 17: 786-799.

Valášek, L. S. (2012). "Ribozomin' – Translation Initiation from the Perspective of the Ribosome-bound Eukaryotic Initiation Factors (eIFs)." *Curr Protein Pept Sci.*: in press.

## Curriculum Vitae

### KONTAKTNÍ ÚDAJE

Jméno	Lucie Cuchalová
Adresa	Ústav makromolekulární chemie AV ČR, v. v. i. Heyrovského nám.2 Praha 6 – Břevnov 162 06
Telefon	+420 296 809 517
Mobil	+420 774 231 350
Email	<a href="mailto:cuchalova@imc.cas.cz">cuchalova@imc.cas.cz</a>

## OSOBNÍ ÚDAJE

Datum narození 27.ledna 1977  
Místo narození Čáslav  
Občanství České

### Vzdělání

#### Mgr.

1996-1999 Vysoká Škola Chemicko-Technologická, Praha  
Fakulta potravinářská  
Obor biochemie  
2000-2003 Karlova Univerzita, Praha  
Přírodovědecká fakulta  
Katedra Biochemie  
Diplomová práce: Hledání fyziologického ligandu CD69

#### Ph.D.

10/2009- Karlova univerzita, Praha  
Přírodovědecká fakulta  
Katedra genetiky a mikrobiologie  
Téma disertační práce: Characterization of the two smallest core subunits of eIF3 and their role in translation  
10/2010 Státní doktorská zkouška

### Zaměstnání

2000 – 2003

**Laboratoř přirozené imunity, Mikrobiologický ústav AVČR, Praha**

01/2004-12/2004 a 01/2005-03/2007

**Ústav hematologie a krevní transfuze: Národní referenční laboratoř pro DNA diagnostiku**

Profese: VŠ odborný pracovník

04/2007 – 08/2012

**Laboratoř regulace genové exprese, Mikrobiologický ústav AVČR, v.v.i., Praha**

Profese: Výzkumný pracovník a od 10/2009 také Ph.D. student

08/2012-12/2012

**GHC GENETICS, s.r.o.**

Profese: VŠ odborný pracovník

Od 02/2013

**Centrum biomedicinských polymerů, Ústav makromolekulární chemie AV ČR, v.v.i., Praha**

Profese: výzkumný a vývojový pracovník

### Kvalifikace a stáž

11/2006 Atestace: Vyšetřovací metody v lékařské genetice – molekulární genetika

Kurz práce s radioaktivitou

červenec - srpen 2010, University of Kent, Canterbury, UK. Stáž

## Seznam publikací

**eIF3a cooperates with sequences 5' of uORF1 to promote resumption of scanning by post-termination ribosomes for reinitiation on GCN4 mRNA.**

Szamecz B, Rutkai E, Cuchalová L, Munzarová V, Herrmannová A, Nielsen KH, Burela L, Hinnebusch AG, Valásek L.

Genes Dev. 2008 Sep 1;22(17):2414-25. doi: 10.1101/gad.480508.

**The RNA recognition motif of eukaryotic translation initiation factor 3g (eIF3g) is required for resumption of scanning of posttermination ribosomes for reinitiation on GCN4 and together with eIF3i stimulates linear scanning.**

Cuchalová L, Kouba T, Herrmannová A, Dányi I, Chiu WL, Valásek L.

Mol Cell Biol. 2010 Oct;30(19):4671-86. doi: 10.1128/MCB.00430-10. Epub 2010 Aug 2.

**Structural analysis of an eIF3 subcomplex reveals conserved interactions required for a stable and proper translation pre-initiation complex assembly.**

Herrmannová A, Daujotyte D, Yang JC, Cuchalová L, Gorrec F, Wagner S, Dányi I, Lukavsky PJ, Valásek LS.

Nucleic Acids Res. 2012 Mar;40(5):2294-311. doi: 10.1093/nar/gkr765. Epub 2011 Nov 15.

**Small ribosomal protein RPS0 stimulates translation initiation by mediating 40S-binding of eIF3 via its direct contact with the eIF3a/TIF32 subunit.**

Kouba T, Dányi I, Gunišová S, Munzarová V, Vlčková V, Cuchalová L, Neueder A, Milkereit P, Valásek LS.

PLoS One. 2012;7(7):e40464. doi: 10.1371/journal.pone.0040464. Epub 2012 Jul 5.

**Translation in Yeast Cells Begins and Ends with Translation Initiation Factor 3 (eIF3)**

Lucie Cuchalová and Petra Beznosková, Christopher J. Shoemaker, Stanislava Gunišová, Tobias von der Haar, and Leoš Shivaya Valásek

Under the review in PLoS Biol.

**Charles University in Prague, Faculty of Science**  
**Department of Genetics and Microbiology**



**Characterization of the two smallest core subunits of eIF3 and their roles in translation**

**Mgr. Lucie Cuchalová**

Supervisor: Leoš Shivaya Valášek, Ph.D.

Prague, 2013

## Abstract

Protein synthesis or mRNA translation is a complex and highly conserved process. Translation consists of initiation, elongation, termination, and ribosome recycling stages. Since most regulation occurs during initiation, its mechanism is being studied intensively to elucidate the molecular basis of every potential control point. The initiation factor eIF3, which in yeast consists of five essential core subunits (eIF3a/TIF32, b/PRT1, c/NIP1, g/TIF35, and i/TIF34) and one transiently associated, non-essential subunit (j/HCR1), is undisputedly one of the key promoters of initiation. In addition, it has also been implicated in playing a critical role during ribosomal recycling, reinitiation, signal transduction, NMD etc.

We have focused on determining the molecular mechanism of the roles of eIF3 and its associated eIFs not only in translation initiation but also in termination and in reinitiation. This included the biochemical and genetic mapping of yeast eIF3 binding site on the small ribosomal subunit, among others.

We showed that the interaction between the residues 200–400 of a/TIF32-NTD and flexible C-terminal tail RPS0A significantly stimulates attachment of eIF3 and its associated eIFs to small ribosomal subunits *in vivo*, thus a/TIF32-NTD together with the recently published PCI (proteasome component) domain in c/NIP1-CTD form important intermolecular bridges between eIF3 and the 40S. Moreover, we demonstrated that the partial deletion of the RPS0A-binding domain of a/TIF32 also severely blocks the induction of *GCN4* translation that occurs via reinitiation. Genetic analysis reveals a functional interaction between 5' *cis*-acting sequences of the *GCN4* mRNA and a/TIF32-NTD. This interaction facilitates stabilizing post-termination 40S subunits on upstream ORF1 of the *GCN4* mRNA and resuming of scanning downstream.

Furthermore, another part of my Ph.D. thesis reveals functional characterization of two essential eIF3 subunits, g/TIF35 and i/TIF34, previously suggested to be dispensable for formation of the 48S preinitiation complexes (PICs) *in vitro*, hallmark function of eIF3. We showed that both subunits are involved in promoting the rate and processivity of scanning in living cells. Moreover, we demonstrated that g/TIF35 specifically interacts with ribosomal proteins RPS3 and RPS20 located near the ribosomal mRNA entry channel and its RRM domain plays role in reinitiation by stabilizing uORF1 post-termination 40S ribosomes on *GCN4*, although by different molecular mechanism than a/TIF32-NTD. Besides, we reported the 2.2Å° resolution crystal structure of i/TIF34 subunit in complex with the minimal CTD of b/PRT1 (654–700), the boundaries of which were defined by solution NMR spectroscopy

In my last part of this thesis we identified and defined a role for eIF3 in the stop codon selection process *in vivo* and uncovered its active roles in translation termination, defining a communication bridge between initiation and termination/recycling phases of protein synthesis.

## Introduction

Protein synthesis or mRNA translation is a complex and highly conserved process. The process of translation can be divided into initiation, elongation, termination and ribosome recycling phases.

The initiation phase of protein synthesis is promoted by numerous proteins or protein complexes called eukaryotic initiation factors (eIFs). The beginning of a translational cycle involves a series of steps that culminate in the assembly of the 80S initiation complex (IC) on the AUG start codon. These steps include 1) Met-tRNA<sub>i</sub><sup>Met</sup> recruitment to the 40S subunit to form the 43S pre-initiation complex (PIC), 2) mRNA recruitment to the 43S PIC to form the 48S PIC, 3) scanning of the 48S PIC to the first recognized start codon, and 4) joining of the 60 subunit to commit thus formed 80S IC for the elongation phase. The translation initiation factor eIF3, which in yeast consists of five essential core subunits (eIF3a/TIF32, b/PRT1, c/NIP1, g/TIF35, and i/TIF34) and one transiently associated, non-essential subunit (j/HCR1), is actively involved in regulation of the first three of these steps (Valášek, Mathew et al. 2003; Szamecz, Rutkai et al. 2008; Cuchalová, Kouba et al. 2010; ElAntak, Wagner et al. 2010; Herrmannová, Daujotyte et al. 2012; Valášek 2012). In the PIC assembly steps, the action of eIF3 is further stimulated by one of its interacting partners, the highly conserved and essential ATP-binding cassette protein RLI1 (ABCE1 in mammals), by an unknown mechanism (Dong, Liu et al. 2004).

Initiation is followed by elongation when amino acids are added to the nascent polypeptide chain.

Termination occurs when the ribosome reaches the end of the coding region and a stop codon enters the ribosomal A-site (UAA, UAG, and UGA). The termination process consists of stop-codon recognition and hydrolysis of the ester bond of the peptidyl-tRNA located in the ribosomal P-site, which releases the nascent polypeptide (Jackson, Hellen et al. 2012).

After termination has occurred, the post-termination complexes (post-TCs) consisting of an 80S couple still bound to mRNA, P-site deacylated tRNA and eukaryotic release factors 1 and 3 (or at least eRF1) need to be recycled. In eukaryotes, besides the known termination factors, ABCE1/RLI1 eIF1, eIF1A and eIF3 has recently been shown to play an essential role in ribosome recycling (Pisarev, Hellen et al. 2007; Pisarev, Skabkin et al. 2010). It should be noted that the molecular mechanism by which eRFs 1 and 3 are ejected from post-TCs is still unclear.

Various alternative mechanisms to the canonical translation initiation pathway exist that are mostly utilized by viruses or function in gene-specific translational control. They rely on *cis*-acting mRNA features and exhibit distinct factor requirements. Reinitiation (REI) is one such mechanism utilized to down- or up-regulate translation of regulatory proteins such as transcription factors and proto-oncogenes in response to various environmental stimuli (Kozak 2005). It is a gene-specific translational control mechanism characterized by the ability of some short upstream uORFs to retain post-termination 40S subunits on mRNA (Hinnebusch 2005).

## Aims of the study

The aim of the study was to understand and describe the molecular mechanism of the roles of eIF3 and its associated eIFs not only in translation initiation but also in termination and in reinitiation.

4. We addressed the longstanding question of what endows uORF1 from the *GCN4* mRNA leader with its unique ability to allow highly efficient REI.
5. We focused on functional characterization of two small subunits of eIF3, g/TIF35 and i/TIF34, the cellular roles of which have remained highly elusive even though these subunits are essential for the viability of yeast cells
6. We have concerted our effort to the role of eIF3 in translation termination

## Material and methods

Experiments were carried out with the model system of budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*.

## List of methods

Polysome profile analysis

1% or 2% HCHO-cross-linking, WCE preparation, and fractionation of extracts for analysis of preinitiation complexes

$\beta$ -galactosidase assays

Glutathione S-transferase (GST) pulldown experiments

Western blot analysis

mRNA binding assay

Ni<sup>2+</sup> chelation chromatography

NMR spectroscopy

40S-binding assay

Preparation of antibodies

Read-through assay

Polysomal gradient analysis

Coimmunoprecipitations and affinity tag pull downs

## Results and discussion

### Mapping the eIF3 binding site on the 40S ribosome

Systematic effort was devoted to mapping the binding site of eIF3 on the 40S. We earlier identified several important domains of eIF3 subunits and eIF5 mediating interaction of the multifactor complex (MFC) with the 40S that allowed us to predict certain aspects of the organization of the 43S PIC (Valášek, Mathew et al. 2003). In articles of this thesis we showed that (i) the partial deletion of the RPS0A-binding domain of eIF3a impairs translation initiation and reduces binding of eIF3 and associated eIFs to native preinitiation complexes *in vivo* (Szamecz, Rutkai et al. 2008) (ii) g/TIF35 interacts with the 40S beak proteins RPS20 and mainly with RPS3 (Cuchalová, Kouba et al. 2010), which is one of the main components of the conformational change upon scanning arrest is characterized by dissolution of the contact between RPS3 and helix 16 of 18S rRNA and reformation of the helix18–helix34-RPS3 connection designated as the latch at the mRNA entry channel (Passmore, Schmeing et al. 2007) (iii) deletion of the C-terminal tail (CTT) of RPS0A fails to anchor the MFC to the small ribosomal subunit, as would be predicted (Kouba, Danyi et al. 2012). Based on all known interactions we concluded that at least the NTD of a/TIF32 and the PCI domain in the c/NIP1-CTD (Kouba, Rutkai et al. 2012) form important intermolecular bridges between eIF3 and the 40S via its RPS0A and ASC1 protein constituents.

### Characterization of the two smallest core subunits of eIF3 and their roles in translation

In other series of articles, we focused on functional characterization of two small subunits of eIF3, g/TIF35 and i/TIF34, the cellular roles of which have remained highly elusive even though these subunits are essential for the viability of yeast cells (Naranda, Kainuma et al. 1997; Humphrey and Enoch 1998; Hanachi, Hershey et al. 1999). We tested the g/TIF35 and i/TIF34 mutants for specific phenotypes indicating impairment of translational control of *GCN4* expression (Hinnebusch 2005). We found that both subunits stimulate linear scanning and genetically interact with several scanning-promoting initiation factors. Moreover, we demonstrated that RRM domain of g/TIF35 plays role in reinitiation by stabilizing uORF1 post-termination 40S ribosomes on *GCN4* mRNA (Cuchalová, Kouba et al. 2010). Besides the aforementioned fact that g/TIF35 specifically interacts with RPS3 and RPS20 located near the ribosomal mRNA entry channel, we have observed an interaction between these two small eIF3 subunits with the N and N-M domains of release factor eRF1 (Cuchalova and Beznoskova et al. under the review).

We also reported the 2.2 Å resolution crystal structure of the i/TIF34 subunit in complex with the minimal CTD of b/PRT1 (654–700), the boundaries of which we defined by solution NMR spectroscopy). Furthermore, we proposed that stable association of the i/TIF34–g/TIF35 mini-module with the rest of eIF3 via b/PRT1 significantly stabilizes binding of eIF3 and eIF5 to the nascent pre-initiation complexes *in vivo* and ensure fidelity of scanning (Herrmannová, Daujotyte et al. 2012).



### **eIF3 is critical for resumption of scanning by post-termination ribosomes**

We revealed that eIF3 is indeed critical for resumption of scanning by post-termination ribosome, which is a vital prerequisite for efficient REI. In detail, we detected a genetic interaction between the partial deletion of the RPS0A-binding site in the *a*/TIF32-NTD ( $\Delta 8$ ) and mutations in sequences 5' of uORF1, wherein the deleterious effect of *a*/TIF32- $\Delta 8$  on REI is blunted or even eliminated by these 5' UTR mutations. Genetic epistasis interactions between mutations in the identified stimulatory sequences upstream of uORF1 and *a*/TIF32- $\Delta 8$  strongly indicated that eIF3a interacts with these REI-enhancing sequences that we named *a*/TIF32-NTD-responsive site (eIF3a-RS). We proposed that establishment of the interaction between *a*/TIF32-NTD and the specific eIF3a-RS 5' of uORF1 at or near the mRNA exit channel of the post-termination 40S subunit stabilizes its association with mRNA and promotes the resumption of scanning for efficient REI at the downstream ORF (Szamecz, Rutkai et al. 2008).

Furthermore, substitutions of conserved residues of the RRM domain of *g*/TIF35 were shown to provoke a strong *Gcn<sup>-</sup>* phenotype owing to the inability of post-termination 40S subunits at the *GCN4*'s uORF1 to resume scanning for reinitiation downstream. Detailed genetic analysis revealed, however, that the *g*/TIF35-RRM and the *a*/TIF32-NTD ensure efficient resumption of scanning by different molecular mechanisms (Cuchalová, Kouba et al. 2010).

### **eIF3 critically connects initiation of translation with its termination**

Since the implication of eIF3 in the recycling process was, however, deduced only from experiments carried out with 11-codon long model mRNA in mammalian *in vitro* reconstituted systems, we decided to investigate whether or not eIF3 also plays a direct role in translation termination and/or ribosomal recycling in the living cell. We demonstrated that eIF3 occurs together with eRFs 1 and 3 and the ribosomal recycling factor RLI1 in a ribosome- and RNA-free complex *in vivo*. Various mutants of core eIF3 subunits, but not of other initiation factors, decreased stop codon read-through in living cells (actually, decreased stop codon read-through is a novel phenotype, never ever observed before) and showed synthetic phenotypes with mutant release factors eRF1 and 3. Conversely, deletion of the non-essential *j*/HCR1 subunit of eIF3 increased stop codon read-through and resulted in accumulation of eRF3 in heavy polysomes. Finally, increased dosage of RLI1 was shown to substitute for the *j*/HCR1 roles in termination (but not in initiation) and in enabling efficient cell growth, as it fully suppressed both the read-through as well as slow growth phenotypes of the *hcr1 $\Delta$*  strain, implying that the *j*/HCR1 function in termination is more critical for optimal cell proliferation than its function in translation initiation. The fact that we could detect a complex between eIF3, RLI1 and both eRFs free of RNA and ribosomes, and that two small eIF3 subunits *i*/TIF34 and *g*/TIF35 directly interacted with the N and N-M domains of eRF1 as mentioned above, suggests that at least eIF3 and eRFs come to the pre-TC in a pre-formed complex (Cuchalova and Beznoskova et al. 2013).

## Conclusions

We demonstrated biochemical and genetic mapping of yeast eIF3 binding site on the small ribosomal subunit that enabled us to model the organization of the eIF3-40S complex.

We focused on functional characterization of two small essential subunits of eIF3, g/TIF35 and i/TIF34, and provide the first insights into their functional contributions to general translation initiation as well as to translational control of GCN4 expression. Furthermore, we reported crystal structure of i/TIF34 subunit in complex with the minimal CTD of b/PRT1.

We revealed that a/TIF32-NTD and g/TIF35-RRM, are needed critical for resumption of scanning by post-termination ribosome, which is a vital prerequisite for efficient reinitiation. Finally, we identified and define the role of eIF3 in termination and our findings suggest that changes in one phase of translation are promptly communicated to and coordinated with changes in the other phases to maintain cellular homeostasis of all ongoing processes.

## References

Cuchalová, L., T. Kouba, et al. (2010). "The RNA Recognition Motif of Eukaryotic Translation Initiation Factor 3g (eIF3g) Is Required for Resumption of Scanning of Posttermination Ribosomes for Reinitiation on GCN4 and Together with eIF3i Stimulates Linear Scanning." *Mol Cell Biol* 30(19): 4671-4686.

Dong, Z., L. H. Liu, et al. (2004). "Role of eIF3 p170 in controlling synthesis of ribonucleotide reductase M2 and cell growth." *Oncogene* 23(21): 3790-3801.

ElAntak, L., S. Wagner, et al. (2010). "The indispensable N-terminal half of eIF3j co-operates with its structurally conserved binding partner eIF3b-RRM and eIF1A in stringent AUG selection." *J Mol Biol.* 396: 1097-1116.

Hanachi, P., J. W. B. Hershey, et al. (1999). "Characterization of the p33 subunit of eukaryotic translation initiation factor-3 from *Saccharomyces cerevisiae*." *J Biol Chem* 274: 8546-8553.

Herrmannová, A., D. Daujotyte, et al. (2012). "Structural analysis of an eIF3 subcomplex reveals conserved interactions required for a stable and proper translation pre-Initiation complex assembly." *Nucleic Acids Res.* 40(5): 2294-311.

Hinnebusch, A. G. (2005). "Translational regulation of GCN4 and the general amino acid control of yeast." *Annu Rev Microbiol.* 59: 407-50.

Humphrey, T. and T. Enoch (1998). "Sum1, a highly conserved WD-repeat protein, suppresses S-M checkpoint mutants and inhibits the osmotic stress cell cycle response in fission yeast." *Genetics* 148: 1731-1742.

Jackson, R. J., C. U. Hellen, et al. (2012). "Termination and post-termination events in eukaryotic translation." *Adv Protein Chem Struct Biol* 86: 45-93.

Kouba, T., I. Danyi, et al. (2012). "Small Ribosomal Protein RPS0 Stimulates Translation Initiation by Mediating 40S-binding of eIF3 via its Direct Contact with the eIF3a/TIF32 Subunit." *PLoS One*: in press.

Kouba, T., E. Rutkai, et al. (2012). "The eIF3c/NIP1 PCI domain interacts with RNA and RACK1/ASC1 and promotes assembly of the pre-initiation complexes." *Nucleic Acids Research* 40(6): 2683-99.

Kozak, M. (2005). "Regulation of translation via mRNA structure in prokaryotes and eukaryotes." *Gene* 361: 13-37.

Naranda, T., M. Kainuma, et al. (1997). "The 39-kilodalton subunit of eukaryotic translation initiation factor 3 is essential for the complex's integrity and for cell viability in *Saccharomyces cerevisiae*." *Mol Cell Biol* 17: 145-153.

Passmore, L. A., T. M. Schmeing, et al. (2007). "The eukaryotic translation initiation factors eIF1 and eIF1A induce an open conformation of the 40S ribosome." *Mol Cell* 26: 41-50.

Pisarev, A. V., C. U. T. Hellen, et al. (2007). "Recycling of Eukaryotic Posttermination Ribosomal Complexes." *Cell* 131: 286–299.

Pisarev, A. V., M. A. Skabkin, et al. (2010). "The Role of ABCE1 in Eukaryotic Posttermination Ribosomal Recycling." *Mol Cell* 37(2): 196-210.

Szamecz, B., E. Rutkai, et al. (2008). "eIF3a cooperates with sequences 5' of uORF1 to promote resumption of scanning by post-termination ribosomes for reinitiation on GCN4 mRNA." *Genes Dev* 22(17): 2414-2425.

Valášek, L., A. Mathew, et al. (2003). "The Yeast eIF3 Subunits TIF32/a and NIP1/c and eIF5 Make Critical Connections with the 40S Ribosome in vivo." *Genes Dev* 17: 786-799.

Valášek, L. S. (2012). "Ribozomin' – Translation Initiation from the Perspective of the Ribosome-bound Eukaryotic Initiation Factors (eIFs)." *Curr Protein Pept Sci.*: in press.

## Curriculum Vitae

### CONTACT INFORMATION

Name	Lucie Cuchalová
Address	Institute of Macromolecular Chemistry AS CR, v. v. i. Heyrovského nám.2 Prague 6 – Břevnov 162 06 Czech Republic
Telephone	+420 296 809 517
Cell Phone	+420 774 231 350
Email	<a href="mailto:cuchalova@imc.cas.cz">cuchalova@imc.cas.cz</a>

## PERSONAL INFORMATION

Date of Birth January 27, 1977  
Place of Birth Čáslav, The Czech Republic  
Citizenship Czech

## EDUCATION

### M.S.

1996-1999 the Institute of Chemical Technology  
Faculty of Food and Biochemical Technology  
Prague, the Czech Republic  
2000-2003 Charles University  
Department of Biochemistry  
Prague, the Czech Republic  
Thesis title: The search of a physiological ligand of the receptor CD69

### Ph.D.

10/2009- Charles University  
Department of Molecular Biology and Genetics  
Prague, the Czech Republic  
Thesis title: Characterization of the two smallest core subunits of eIF3 and their role in translation  
10/2010 The doctoral examination

## EMPLOYMENT

2000 – 2003  
**Laboratory of Immunology, Institute of Macromolecular Chemistry AS CR, v. v. i., Prague**  
– diploma thesis

01/2004-12/2004 and 01/2005-03/2007  
**The Institute of Hematology and Blood Transfusion: National Reference Laboratories for DNA Diagnostics**  
Profession: researcher

04/2007-08/2012  
**Laboratory of Regulation of Gene Expression, Institute of Microbiology AS CR, v.v.i., Prague**  
Profession: researcher and since 10/2009 PhD. student as well

08/2012/ - 12/2012  
**GHC GENETICS, s.r.o.**  
Profession: researcher

Since 02/2013  
**The Center of Bio-Medicine Polymers, Institute of Macromolecular Chemistry AS CR, v.v.i., Prague**  
Profession: researcher and developer

## PROFESSIONAL QUALIFICATIONS AND INTERSHIP

11/2006 The attestation examination: The investigative methods in the medical genetics – The molecular genetics

Course: Working with radioactivity  
July - the August 2010, University of Kent, Canterbury, UK. Study intership

## **Selected publications**

**eIF3a cooperates with sequences 5' of uORF1 to promote resumption of scanning by post-termination ribosomes for reinitiation on GCN4 mRNA.**

Szamecz B, Rutkai E, Cuchalová L, Munzarová V, Herrmannová A, Nielsen KH, Burela L, Hinnebusch AG, Valásek L.

Genes Dev. 2008 Sep 1;22(17):2414-25. doi: 10.1101/gad.480508.

**The RNA recognition motif of eukaryotic translation initiation factor 3g (eIF3g) is required for resumption of scanning of posttermination ribosomes for reinitiation on GCN4 and together with eIF3i stimulates linear scanning.**

Cuchalová L, Kouba T, Herrmannová A, Dányi I, Chiu WL, Valásek L.

Mol Cell Biol. 2010 Oct;30(19):4671-86. doi: 10.1128/MCB.00430-10. Epub 2010 Aug 2.

**Structural analysis of an eIF3 subcomplex reveals conserved interactions required for a stable and proper translation pre-initiation complex assembly.**

Herrmannová A, Daujotyte D, Yang JC, Cuchalová L, Gorrec F, Wagner S, Dányi I, Lukavsky PJ, Valásek LS.

Nucleic Acids Res. 2012 Mar;40(5):2294-311. doi: 10.1093/nar/gkr765. Epub 2011 Nov 15.

**Small ribosomal protein RPS0 stimulates translation initiation by mediating 40S-binding of eIF3 via its direct contact with the eIF3a/TIF32 subunit.**

Kouba T, Dányi I, Gunišová S, Munzarová V, Vlčková V, Cuchalová L, Neueder A, Milkereit P, Valásek LS.

PLoS One. 2012;7(7):e40464. doi: 10.1371/journal.pone.0040464. Epub 2012 Jul 5.

**Translation in Yeast Cells Begins and Ends with Translation Initiation Factor 3 (eIF3)**

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

Under the review in PLoS Biol.