

Crystal structure of the eukaryotic 40S ribosomal subunit in complex with initiation factor 1

A dissertation submitted to

ETH Zürich

for the degree of

Doctor of Sciences

presented by

JULIUS RABL

Dipl.-Biochem. (FU Berlin)

born 4. September 1980

Germany

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Nenad Ban, examiner

Prof. Dr. Rudolf Glockshuber, co-examiner

Prof. Dr. Vikram Panse, co-examiner

2011

Summary

Proteins are synthesized by large molecular machines, the ribosomes. Ribosomes consist of two subunits of unequal size, the small subunit and the large subunit. The small subunit contains the decoding site, where the sequence information contained in the messenger RNA (mRNA) is translated into protein sequence, while the large subunit contains the peptidyl transferase center, which catalyzes the peptide bond formation between amino acids of the nascent protein. Translation initiation in eukaryotes requires twelve initiation factors in addition to the ribosome.

The aim of this thesis was to determine the crystal structure of an initiation complex of the eukaryotic ribosome in order to make high-resolution structural information on eukaryotic ribosomes and their initiation complexes available. The complex of the *Tetrahymena thermophila* 40S ribosomal subunit with eukaryotic initiation factor 1 (eIF1) was crystallized in three space groups. Phasing of the dataset with tantalum bromide clusters and subsequent non-crystallographic symmetry multicrystal averaging resulted in electron density maps at 3.9Å that were of sufficient quality to build the entire structure. The resulting model comprises the entire 18S rRNA, 33 ribosomal proteins and initiation factor eIF1.

The structure gives insights into the evolution of the eukaryotic ribosome, into signaling at the eukaryotic ribosome and into the function of eIF1 during initiation. The eukaryotic 40S ribosomal subunit contains more proteins than the bacterial 30S subunit, which are engaged in stronger protein-protein interactions and have replaced a bacterial rRNA feature at the beak. Expansion segments of the rRNA are clustered at the back of the 40S subunit. The signaling hub protein RACK1 is an integral part of the ribosome that contacts three ribosomal proteins (rpS3e, rpS16e and rpS17e). The phosphorylation site of ribosomal protein rpS6e, which is a downstream target of the mTOR pathway, is located at the end of a long C-terminal helix, which stretches from the bottom to the back of the 40S subunit. In *Tetrahymena*, rpS4e, which is directly adjacent to rpS6e, is phosphorylated instead.

The study yielded insights into the structural basis of the ability of eIF1 to sense the start codon recognition during translation initiation. Initiation factor eIF1 was found bound to the 40S on top of helix 44, directly below the P site. In the structure eIF1 extends a basic loop into the mRNA channel and is therefore in principle able to sense the conformation of mRNA and tRNA by interaction with their phosphate backbone. The structure presented in this thesis is the first structure of an entire eukaryotic ribosomal subunit and will form the foundation for structure-guided studies of eukaryotic translation.

Zusammenfassung

Proteine werden von den Ribosomen synthetisiert. Ribosomen sind grosse molekulare Maschinen, die aus zwei Untereinheiten unterschiedlicher Grösse bestehen, die als die kleine Untereinheit und die grosse Untereinheit bezeichnet werden. Die kleine Untereinheit übersetzt die Nukleinsäure-Sequenz der Boten-Ribonukleinsäure (mRNA) in die Proteinsequenz des entstehenden Proteins, während die grosse Untereinheit des Ribosoms die Verbindung der Aminosäuren zum Polypeptid mittels Peptidbindungen katalysiert. Die Initiation der Proteintranslation in Eukaryoten benötigt zusätzlich zu den Ribosomen zwölf Initiationsfaktoren. Das Ziel dieser Doktorarbeit war die Bestimmung der Kristallstruktur eines eukaryotischen Initiationskomplexes um hochauflösende strukturelle Information des eukaryotischen Ribosoms und der eukaryotischen Initiation zu gewinnen.

Der Komplex aus der kleinen ribosomalen Untereinheit von *Tetrahymena thermophila* und dem eukaryotischen Initiationsfaktor 1 (eIF1) wurde in drei verschiedenen Raumgruppen kristallisiert. Die Phasierung mit Tantal-Clustern und durch Mittelung über die vorhandenen Raumgruppen ergab Elektronendichtekarten bei 3.9Å Auflösung, deren Qualität erlaubte, ein Modell der gesamten Struktur zu bauen. Das Modell des 40S:eIF1-Komplexes enthält die gesamte ribosomale Ribonukleinsäure (rRNA) der kleinen Untereinheit, 33 ribosomale Proteine und den Initiationsfaktor eIF1. Die Struktur erlaubte Einblicke in die Evolution des eukaryotischen Ribosoms, in die Signaltransduktion durch ribosomale Proteine und in die Funktionsweise des Initiationsfaktors eIF1. Die eukaryotische ribosomale 40S Untereinheit enthält mehr Proteine als ihr bakterielles Gegenstück, die zudem prominentere Protein-Protein-Interaktionen eingehen. Die rRNA-Struktur des 'beak' der bakteriellen 30S Untereinheit ist in Eukaryoten durch Proteine ersetzt. Die grössten der zusätzlichen rRNA-Elemente der kleinen Untereinheit des eukaryotischen Ribosoms befinden sich an der Rückseite der Untereinheit. Das ribosomale Protein RACK1 ist ein integraler Bestandteil des Ribosoms und kontaktiert drei andere ribosomale Proteine, rpS3e, rpS16e und rpS17e. Die mTOR-abhängige Phosphorylierungsstelle des ribosomalen Proteins rpS6e befindet sich auf der carboxyterminalen Helix des Proteins, die sich von der Unterseite der 40S Untereinheit in rückwärtiger Richtung erstreckt. In *Tetrahymena* wird statt des Proteins rpS6e das benachbarte Protein rpS4e phosphoryliert.

Diese Studie lieferte die ersten strukturellen Einblicke in den Mechanismus der Erkennung des Start-Codons durch eIF1. Der Initiationsfaktor eIF1 bindet an die Helix 44 der kleinen ribosomalen Untereinheit direkt unterhalb der Peptidyltransferase-Stelle. In der

Struktur ist erkennbar dass sich ein basischer Teil des Initiationsfaktors eIF1 in den mRNA-Kanal erstreckt und dort prinzipiell durch Interaktion mit dem Phosphatrückgrat der mRNA und der Transfer-Ribonukleinsäure (tRNA) die Erkennung des Start-Codons registrieren kann. Die in dieser Doktorarbeit bestimmte Struktur stellt die erste Struktur einer eukaryotischen ribosomalen Untereinheit dar und wird die Grundlage für eine strukturorientierte Erforschung der eukaryotischen Translation bilden.