



Doctoral Thesis

## **Initiation of mammalian protein biosynthesis purification and characterization of initiation factors**

**Author(s):**

Erni, Bernhard

**Publication Date:**

1976

**Permanent Link:**

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-000203457> →

**Rights / License:**

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#) →

This page was generated automatically upon download from the [ETH Zurich Research Collection](#). For more information please consult the [Terms of use](#).

Diss. ETH No 5862

INITIATION OF MAMMALIAN PROTEIN BIOSYNTHESIS

---

PURIFICATION AND CHARACTERIZATION

---

OF INITIATION FACTORS

---

A dissertation submitted to the  
SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY, ZUERICH

for the degree of  
Doctor of Natural Science

presented by

B E R N H A R D E R N I

Dipl. Chem. ETHZ

born November 24, 1946

citizen of Luzern (Canton Luzern)

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. R. Schwyzer

Prof. Dr. T. Staehelin

1976

Reprint from: Proc. of the 10th FEBS Meeting, Vol 39  
Paris, July 1975

Publishers: North-Holland / American Elsevier

## ABSTRACT

Initiation factors are necessary to support protein biosynthesis. Purification procedures for five initiation factors from rabbit reticulocytes have been modified and standardized. The techniques for isolation and purification of all other components needed in an in vitro reconstituted system of translation are described. The initiation factors have been purified to homogeneity. They are characterized by their function in the assembly of the 80S initiation complex. They are compared with initiation factors prepared in an other laboratory (W.C. Merrick, National Institutes of Health, Bethesda, USA). Initiation factors are physically and functionally distinct from the two major proteins of messenger ribonucleoproteins. There is evidence that the binding of mRNA to the small ribosomal subunit involves base-pairing between the mRNA and the 18S rRNA. The initiation complex is assembled in an ordered sequence of defined steps. These steps are reversible to various degrees, except for the binding of mRNA, which is virtually irreversible.

### ZUSAMMENFASSUNG

Im Mechanismus der Eiweissbiosynthese können drei Abschnitte unterschieden werden: Initiation, Elongation und Termination. Während der Initiation werden die ribosomalen Untereinheiten (40S und 60S), mRNA und Initiator-Transfer-RNAsäure (Met-tRNA<sub>f</sub>) zu einem Komplex zusammengesetzt. Dieser Komplex kann Aminosäuren in der durch die mRNA bestimmten Sequenz zu einem Polypeptid polymerisieren (Elongation). In der Termination wird das fertige Polypeptid vom Komplex abgespalten, und dieser selbst zerfällt in tRNA, mRNA und ribosomale Untereinheiten.

Initiationsfaktoren (IF-E) sind Proteine, die für die Initiation, nicht aber für die folgenden Abschnitte der Eiweissynthese, benötigt werden. Sieben Initiationsfaktoren sind aus Retikulozyten von Kaninchen isoliert worden. Ihre Reinigung umfasst Fraktionierung durch stufenweise Ammoniumsulfat-Fällung, Ionenaustauschchromatografie, Zonen-zentrifugation im Dichtegradienten und Gelfiltration. Die Reinigungsverfahren für fünf Faktoren wurden verbessert in Bezug auf Reproduzierbarkeit, Reinheit und Ausbeute. Methoden zur Isolierung und teilweisen Reinigung sämtlicher übriger Komponenten, die in einem in vitro System zur Proteinsynthese benötigt werden, sind beschrieben.

Initiationsfaktoren haben Molekulargewichte von 15000 - 500000 Daltons. IF-E1, IF-E4, IF-E5, IF-E6 und IF-E7 bestehen

aus je einer Polypeptidkette. IF-E2 ist aus drei verschiedenen, IF-E3 aus mindestens neun verschiedenen Polypeptidketten zusammengesetzt.

Ein Initiationskomplex wird in einer geordneten Reihe von Reaktionsschritten aufgebaut. Von den drei beobachtbaren Schritten wird jeder durch einen oder mehrere Initiationsfaktoren katalysiert. Im ersten Schritt wird ein Komplex aus IF-E2, Met-tRNS<sub>f</sub> und GTP (ternärer Komplex) an die kleine ribosomale Untereinheit (40S) gebunden. IF-E3 und IF-E7 stimulieren diesen Schritt. Erst dann kann in Gegenwart von IF-E3, IF-E4, IF-E6 und ATP mRNA gebunden werden. In Anwesenheit von IF-E5 verbindet sich der 40S Initiationskomplex mit der grossen ribosomalen Untereinheit (60S) zum 80S Initiationskomplex.

In den Zellen von Eukaryonten bildet die mRNA einen stabilen Komplex (mRNP = messenger ribonucleoprotein) mit bestimmten Proteinen. Die Funktion dieser Proteine ist noch unbekannt. Initiationsfaktoren sind physikalisch und funktionell von mRNP Proteinen verschieden.

Nicht kovalente Bindungen zwischen Proteinen und Nukleinsäuren halten die Komponenten im Initiationskomplex zusammen. Die mRNA scheint während der Initiation durch Basenpaarung mit der ribosomalen Nukleinsäure an die 40S Untereinheit gebunden zu werden. Ein stabiler Komplex zwischen dieser Nukleinsäure kann auch nach Entfernung aller ribosomalen Proteine (Natrium Dodecylsulfat) isoliert werden.

Die am Aufbau des Initiationskomplexes beteiligten Reaktionen haben unterschiedliche Reversibilität. Die Austauschgeschwindigkeit markierter Met-tRNS<sub>f</sub> zwischen Komplex und Lösung ist ein Mass für die Reversibilität einer Reaktion. Im ternären Komplex wird Met-tRNS<sub>f</sub> sehr rasch ausgetauscht. Der ternäre Komplex tauscht an der 40S Untereinheit rasch aus. Der Austausch ist verlangsamt in Anwesenheit von IF-E3, und er wird blockiert, sobald mRNA gebunden wird. Dieser letzte Schritt ist irreversibel, wahrscheinlich als Folge der mit der Bindung der mRNA gekoppelten Hydrolyse von ATP. Die ribosomalen Untereinheiten im 80S Initiationskomplex sind nur schwach assoziiert und tauschen rasch aus. Die Hydrolyse von GTP ist zwar Voraussetzung für die Bildung des 80S Komplexes, scheint aber nicht direkt mit der Assoziation der Untereinheiten gekoppelt zu sein. Letztere wird wahrscheinlich erst während eines ersten Schrittes der nun folgenden Elongation irreversibel.