

Diss. ETH No. 17091

**Development of a split-ubiquitin based,
cytosolic yeast two-hybrid system and its application
to the structure-function analysis of scUri1p**

A dissertation submitted to the
ETH ZURICH
for the degree of
Doctor of Sciences

presented by

Natalie Möckli

Dipl. Natw. ETH, Zurich
born 26.3.1967
citizen of Schlatt, Thurgau

accepted on the recommendation of

Prof. Matthias Peter, examiner
Prof. Igor Stagljar, co-examiner
Dr. Daniel Auerbach, co-examiner
Prof. Monica Gotta, co-examiner

Zusammenfassung

Die Untersuchung und die Entdeckung von neuen Wechselwirkungen zwischen Proteinen in der lebenden Zelle ist ein zentrales Thema in der heutigen biologischen Forschung. Daher sind in den vergangenen Jahren eine grosse Anzahl von Methoden zur Untersuchung von Proteininteraktionen entwickelt worden.

Eine sehr bewährte *in vivo* Analyseverfahren für Proteininteraktionen ist das Hefe-Zwei-Hybrid System (Fields and Song, 1989). Da diese Technologie jedoch nicht für alle Proteinklassen geeignet ist, haben wir eine neue genetische Selektionsmethode entwickelt, das zytoplasmatische Hefe Zwei-Hybrid (CytoY2H) System, welches auf der Split-Ubiquitin Technik basiert (Johnsson and Varshavsky, 1994) und Wechselwirkungen zwischen Proteinen im Zytoplasma detektiert. Die neue Methode wurde an einer breiten Palette binärer Interaktionen transkriptionell aktiver Proteinen erprobt, einschliesslich des Tumorsuppressors p53 und Untereinheiten des NF- κ B Komplex, welche schlecht als Bait-Proteine im klassischen Hefe-Zwei-Hybrid System untersucht werden können. Zudem, haben wir das CytoY2H System verwendet, um für verschiedene Proteine Interaktionspartner aus einer cDNA Bibliothek zu selektionieren. Dabei wurden ein bereits gut charakterisierter Bindungspartner des *Simian Virus 40* large T Antigens und neue Interaktoren des *S. cerevisiae* Proteins Uri1p detektiert. Das CytoY2H System erweitert die vorhandenen Proteom- Analysemethoden dadurch, dass es eine geeignete Lösung anbietet für die Identifizierung und Charakterisierung vielfältiger, transkriptionell aktiver Proteine und sehr vielseitig anwendbar ist.

Im Weiteren haben wir uns auf die molekulare Funktion von Uri1p konzentriert, da eine wichtige biologische Rolle für dieses weitgehend uncharakterisierte Protein postuliert wurde. Uri1p ist ein atypisches Prefoldin Chaperon, welches mit der Nährstoff Signalübertragung in Verbindung gebracht wurde (Gstaiger et al., 2003). Die Mehrheit der in der CytoY2H Selektion identifizierten Uri1p-Interaktoren verstärkte den Verdacht, dass Uri1p eine Funktion in mRNA-Translation und im Proteinfaltungsprozess einnimmt. Mittels CytoY2H Technik wurde eine Interaktionskarte zwischen Uri1p und dessen Bindungspartner erstellt, welche eine enge Verbindung zwischen Translation und Proteinfaltung via Elongationsfaktor 1A enthüllte. Struktur-Funktionsanalysen zeigten, dass die mittlere saure Region der Uri1p Proteinsequenz dessen funktionelle Einheit ist und als Bindungsort für die meisten Uri1p Interaktoren dient. Mit Hilfe verschiedener Algorithmen wurde berechnet, dass

Uri1p ein intrinsisch unstrukturiertes Protein ist. Dies erklärt, weshalb es Uri1p möglich ist nicht nur über die mittlere saure Region, sondern über einen ausgedehnten Teil seiner Proteinsequenz Kontakte mit verschiedenen Bindungspartnern einzugehen. Biochemische und genetische Studien wiesen auf eine molekulare Rolle von Uri1p in der Initiation der Translation hin, durch die Rekrutierung des eIF2-GTP-tRNA_i^{Met} Dreifachkomplex zum 43S ribosomalen Preinitiations-Komplex (A. Deplazes, Manuskript in Vorbereitung). Die Evaluation der *uri1Δ* Phänotypen im Zusammenhang mit Resultaten zusätzlicher genetischer Studien und der mRNA Profile in *URI1*-deletierten Hefezellen unter verschiedenen zellulären Stressbedingungen (Gasch et al., 2000) lassen vermuten, dass Uri1p in die allgemeine zelluläre Stressantwort involviert ist.

Summary

Since interactions between proteins provide a close insight into the function of proteins, they represent a major topic in life science and numerous technologies have evolved to tackle protein interactions.

The yeast two-hybrid system (Fields and Song, 1989) provides a well-established tool for the analysis of protein interactions *in vivo*. However, since not all protein classes are amenable to this method, a novel genetic screening assay, the cytosolic yeast two-hybrid system (cytoY2H) has been developed in this work, which is based on the split-ubiquitin technique (Johnsson and Varshavsky, 1994) and which detects protein-protein interactions in the cytoplasm. The assay was used to probe defined protein interactions between a wide range of transcriptionally active proteins, including the tumor suppressor p53 and members of the NF- κ B complex. This kind of proteins can hardly be applied as bait proteins in the classical yeast two-hybrid system. Moreover, we utilized the cytoY2H system to cDNA library screening of different proteins and identified a well characterized interactor of the *Simian Virus 40* large T antigen and new interaction partners of the *S. cerevisiae* protein Uri1p. The cytoY2H system is a very versatile technology which extends existing proteomic methods by providing a convenient solution for the identification and characterization of protein interactions of a wide range of transcriptionally active proteins.

We then focused on the molecular function of Uri1p, since an important biological role for this rather uncharacterized protein has been proposed. Uri1p is an atypical prefoldin chaperone and may be implicated in nutrient signaling (Gstaiger et al., 2003). The majority of the Uri1p interactors identified in the cytoY2H screen support a role for Uri1p in mRNA translation and related Uri1p to the protein folding process. Using the cytoY2H system, a protein interaction map between Uri1p and its binding partners was established, revealing the tight interconnection of translation and protein folding through translation elongation factor 1A. Structure-function analyses identified the large central acidic region as the functional portion of Uri1p and as a binding site for most Uri1p interactors. Applying different algorithms, the structure of Uri1p was predicted to be intrinsically disordered, which explains why Uri1p is able to contact multiple binding partners not only by the acidic region, but over a large part of its entire sequence. Biochemical and genetic studies indicate a molecular role for Uri1p in translation initiation by recruitment of the eIF2-GTP-tRNA_i^{Met} ternary complex to the 43S ribosomal pre-initiation complex (A. Deplazes, manuscript in preparation). Integrating *uri1Δ* phenotypes, additional results from genetic studies and *uri1Δ* mRNA profiles under environmental stress (Gasch et al., 2000), we hypothesize that Uri1p might be involved in the general cellular stress response.