



Doctoral Thesis

Assembly of the eukaryotic small ribosomal subunit: from static structure to dynamic function

Author(s):

Peña, Cohue

Publication Date:

2018

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-b-000296171> →

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. 25200

**Assembly of the eukaryotic small ribosomal subunit:
from static structure to dynamic function**

A thesis submitted to attain the degree of
DOCTOR OF SCIENCES of ETH ZURICH
(Dr. sc. ETH Zurich)

presented by
COHUE PEÑA CHOU
MSc Biology, University of Göttingen

born on April 18th, 1987
citizen of
Germany

accepted on the recommendation of
Prof. Dr. Martin Pilhofer (examiner)
Dr. Vikram Panse (co-examiner)

2018

SUMMARY

Ribosomes are the universal molecular machines responsible for translating messenger RNA into proteins. Although the structure and function of translating ribosomes is well understood, our knowledge regarding the assembly of this central ribonucleoprotein (RNP) complex is only emerging in recent years. In eukaryotes, the synthesis of ribosomes requires >200 trans-acting assembly factors which perform the task of generating and bringing together four ribosomal RNAs (rRNAs) and 79 ribosomal proteins (r-proteins) to form a highly complex RNP macromolecule that consists of two subunits: the small 40S and the large 60S subunit.

How r-proteins specifically reach their destination on the rRNA and how trans-acting assembly factors ensure ribosomes are correctly folded before entering translation poses one of the fundamental questions of eukaryotic ribosome assembly. In this study, we characterized key essential events during assembly of the eukaryotic small 40S subunit in the model organism budding yeast. For this purpose, we employed an integrated structural biology approach that combines classical yeast genetics and biochemistry with state-of-the-art cryo-electron microscopy and cross-linking mass spectrometry (XL-MS).

In the first part of this work, we characterized how the assembly factor Fap7 catalyzes the stable incorporation of the neighboring r-proteins uS11 and eS26 into the 90S pre-ribosome, an early nucleolar assembly stage of the 40S small subunit. Intriguingly, a failure in recruiting these two r-proteins in the nucleolus results in a late cytoplasmic assembly defect that prevents final cleavage of 20S pre-rRNA by the endonuclease Nob1. How these chronologically distant events are functionally and structurally coupled was unclear.

For the second part, we therefore determined cryo-EM structures of a cytoplasmic 40S pre-ribosome at two intermediate stages. The first stage reveals that uS11 and eS26 have not yet reached their mature conformation at the 3' end of 18S rRNA. Instead, the pre-rRNA adopts a highly distorted conformation of its 3' end domain forming the head region of the small subunit. This conformation is stabilized by the binding of several assembly factors clustering at three distinct and separated regions. Hrr25-Enp1-Ltv1 form the first cluster at the solvent-exposed side of the 40S head where they keep the r-protein uS3 in an immature

conformation. Rio2-Tsr1 and Pno1-Nob1 form the second and third cluster at the subunit interface and 3' end region, respectively. The second stage of the pre-40S structure reveals the absence of all assembly factors except Nob1. In this intermediate stage the r-proteins uS3, uS11, eS26 and the pre-rRNA have achieved their mature conformation, however, the 20S pre-rRNA is still uncleaved.

These results provided us with a structural framework to characterize the dynamic mechanisms occurring during the transition from the nucleolar 90S to the cytoplasmic pre-40S and, finally, mature 40S stage. Our preliminary structure-guided functional studies in the third part of this work suggest that upon reaching the cytoplasm, all three assembly factor clusters are released in a sequential and tightly regulated manner which is orchestrated by a global movement of the 40S head region. Release of the first Hrr25-Enp1-Ltv1 cluster relaxes the distorted head conformation which in turn triggers the release of the second Rio2-Tsr1 cluster and permits stable incorporation of the r-protein uS3. Release of Rio2 allows the recruitment of Rio1, a late-acting assembly factor that triggers the release of Pno1. XL-MS studies revealed that uS11 and eS26 are separated by Pno1, an assembly factor which clamps the very 3' end of 18S rRNA in a conformation that inhibits its cleavage by the endonuclease Nob1. Thus, only the final release of Pno1 allows uS11 and eS26 to adopt their mature conformation which likely primes the 3' end of 18S rRNA for final cleavage by Nob1. The cytoplasmic release of the three pre-40S clusters together with the final processing of the 20S pre-rRNA therefore represent quality control mechanisms that ensure only correctly assembled 40S ribosomes containing the full set of r-proteins are fed into the translation cycle.

ZUSAMMENFASSUNG

Ribosomen sind die universellen molekularen Maschinen, die sich für die Translation von Boten-RNA in Proteine verantwortlich zeichnen. Obwohl die Struktur und Funktion von funktionellen Ribosomen ausgiebig beschrieben ist, steht unser Wissen über die Biosynthese dieses zentralen Ribonukleoproteins (RNP) erst in den Anfängen. In Eukaryoten beteiligen sich >200 trans-agierende Assemblierungsfaktoren an der Ribosomsynthese, mit der Aufgabe, vier ribosomale RNAs (rRNAs) und 79 ribosomale Protein (r-Proteine) zu erzeugen und zu einem hochkomplexen RNP-Makromolekül zusammenzufügen, welches aus zwei Untereinheiten besteht: der kleinen 40S und der großen 60S Untereinheit.

Wie r-Proteine spezifisch ihr Ziel auf der rRNA erreichen und wie trans-agierende Assemblierungsfaktoren sicherstellen, dass Ribosomen vor dem Eintritt in die Translation korrekt gefaltet sind, bildet eine der fundamentalen Fragen der eukaryotischen Ribosomsynthese. In dieser Studie charakterisierten wir wichtige essenzielle Ereignisse während des Aufbaus der eukaryotischen kleinen 40S Untereinheit im Modellorganismus Sprosshefe. Zu diesem Zweck verwendeten wir einen integrierten strukturellen Ansatz, der klassische Hefe-Genetik und Biochemie mit modernster Kryo-Elektronenmikroskopie und vernetzender Massenspektrometrie (XL-MS) kombiniert.

Im ersten Teil dieser Arbeit haben wir charakterisiert, wie der Assemblierungsfaktor Fap7 den stabilen Einbau der benachbarten r-Proteine uS11 und eS26 in das 90S Prä-Ribosom katalysiert, einem frühen und nukleolaren Zwischenstadium der 40S Untereinheit. Interessanterweise führt ein Fehler bei der Rekrutierung dieser zwei r-Proteine im Nukleolus zu einem späten zytoplasmatischen Synthesedefekt, der die finale Spaltung der 20S-prä-rRNA durch die Endonuklease Nob1 verhindert. Wie diese chronologisch entfernten Ereignisse funktionell gekoppelt sind, war unklar.

Für den zweiten Teil dieser Studie haben wir daher Kryo-EM-Strukturen eines zytoplasmatischen 40S Prä-Ribosoms in zwei Zwischenstadien bestimmt. Das erste Stadium zeigt, dass uS11 und eS26 in der Prä-40S-Phase noch nicht ihre endgültige Konformation am 3' Ende der 18S rRNA erreicht haben. Stattdessen nimmt die prä-rRNA eine stark verzerrte Faltung ihrer 3'-Enddomäne an, welche die Kopfregion der kleinen Untereinheit bildet. Diese Konformation wird

stabilisiert durch die Bindung von mehreren Assemblierungsfaktoren, die sich an drei verschiedenen und getrennten Regionen zu Clustern gruppieren. Hrr25-Enp1-Ltv1 bilden den ersten Cluster auf der offenliegenden Seite des 40S-Kopfes, wo sie das r-Protein uS3 von seiner endgültigen Inkorporation abhalten. Rio2-Tsr1 und Pno1-Nob1 bilden den zweiten und dritten Cluster an der Untereinheitsschnittstelle bzw. der 3'-Endregion. Die zweite Stufe der Prä-40S-Struktur offenbart die Abwesenheit aller Assemblierungsfaktoren mit Ausnahme von Nob1. In diesem Zwischenstadium haben die r-Proteine uS3, uS11, eS26 und die prä-rRNA ihre endgültige Konformation erreicht, jedoch ist die 20S-prä-rRNA noch nicht gespalten.

Diese Ergebnisse bildeten einen strukturellen Kontext, der es uns erlaubte, die dynamischen Mechanismen zu charakterisieren, die sich während des Übergangs vom nukleolären 90S zum cytoplasmatischen prä-40S und schließlich zum reifen 40S-Stadium abspielen. Unsere vorläufigen strukturbasierten Funktionsstudien im dritten Teil dieser Arbeit suggerieren, dass bei Erreichen des Zytoplasmas alle drei Cluster in einer sequentiellen und streng regulierten Weise freigesetzt werden, welche durch eine globale Bewegung der 40S-Kopfregeion koordiniert wird. Die Freisetzung des ersten Hrr25-Enp1-Ltv1-Clusters lockert die verzerrte Kopfkongformation, die wiederum die Freisetzung des zweiten Rio2-Tsr1-Clusters auslöst und einen stabilen Einbau des r-Proteins uS3 ermöglicht. Die Freisetzung von Rio2 ermöglicht die Rekrutierung von Rio1, einem spät agierenden Assemblierungsfaktor, der die Freisetzung von Pno1 auslöst. XL-MS-Studien zeigten, dass uS11 und eS26 durch Pno1 getrennt sind, welches das 3'-Ende der 18S rRNA in einer Kongformation festklemmt, die seine Spaltung durch die Endonuklease Nob1 inhibiert. Somit erlaubt nur die endgültige Freisetzung von Pno1, dass uS11 und eS26 ihre reife Kongformation einnehmen, was offenbar eine Notwendigkeit für die endgültige Spaltung des 3' Endes der 18S rRNA durch Nob1 darstellt. Die cytoplasmatische Freisetzung der drei Prä-40S-Cluster zusammen mit der finalen Spaltung der 20S Prä-rRNA stellen daher Qualitätskontrollmechanismen dar, die sicherstellen, dass nur korrekt gefaltete 40S Ribosomen, die den vollständigen Satz von r-Proteinen enthalten, in den Translationszyklus freigegeben werden.