

DISS: ETH Nr. 18127

Global Analysis of Translational Regulation in Yeast

A dissertation submitted to the
Swiss Federal Institute of Technology Zurich
for the degree of
Doctor of Sciences ETH Zürich

presented by

Regula Erna Halbeisen

Dipl. Biol. University of Basel, Basel

born January 4, 1980

Citizen of Dittingen, BL

accepted on the recommendation of
Prof. Dr. Michael Detmar, examiner
Prof. Dr. Cornelia Halin Winter, co-examiner
Dr. André P. Gerber, co-examiner

2008

1. Summary

1.1. Summary

Cells rapidly alter gene expression in response to environmental stimuli such as nutrients, hormones and drugs. During the imposed 'remodeling' of gene expression, changes in the levels of particular mRNAs do not necessarily correlate with those of the encoded proteins, which could in part rely on differential recruitment of mRNAs to translating ribosomes. To systematically address this issue, I have established a novel approach to rapidly access the translational status of each mRNA in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Endogenously formed ribosomes were purified via a tagged protein of the large ribosomal subunit, and associated RNAs were analyzed with DNA microarrays. Compared to classical polysomal profiling, this method allows fast, reliable and efficient accession of ribosome associated RNAs.

Using this approach, I compared changes in total mRNA expression (transcriptome) with mRNA ribosome association (translatome) after the application of different conditions of cellular stress. Severe stress, induced by amino acid depletion or osmotic shock, provoked highly correlated responses affecting about 15% of both transcriptome and translatome. Many of the regulated messages code for functionally related proteins and reflect logical responses to the particular stress. In contrast, mild stress provoked by addition of Calcofluor-white or menadione altered the translatome of approximately 1% of messages with only marginal effects on total mRNA levels, implying largely uncorrelated responses of transcriptome and translatome. Among these putative translationally regulated messages were most components of the mitochondrial ATPase. Increased polysome associations of corresponding messages and higher mitochondrial ATPase activities upon treatment confirmed the relevance for regulation of this macromolecular complex.

My results suggest the presence of highly sensitive translational regulatory networks that coordinate functionally related messages. These networks are preferentially activated for rapid adaptation of cells to minor environmental perturbations.

Finally, this method enabled me to study distinct ribosomes consisting of paralogous ribosomal proteins. In the yeast *Saccharomyces Cerevisiae*, 59 of the 79 cytoplasmic ribosomal proteins are encoded by two genes. It was believed that these duplicated ribosomal proteins are necessary to compensate the yeast's extraordinary need for ribosomal proteins, but are otherwise redundant. Only very recently it has become evident that these paralogous genes are not always functionally equivalent, suggesting the possible existence of a 'ribosome code'. I investigated differences between ribosomes consisting of Rpl16a or Rpl16b and found a good correlation between RNAs associated with either of the two proteins. However, 1.4% of all analyzed features were more than two-fold differentially associated. The data suggest that there is no large difference between Rpl16a and Rpl16b associated RNAs, pointing to equal functions of those two proteins in ribosomes and translation.

1.2. Zusammenfassung

Zellen passen sich ihrer Umwelt an, sie reagieren auf Nährstoffe, Hormone oder Medikamente indem sie ihre Genexpression verändern. Die Menge der Boten-RNS entspricht dabei nicht immer der Menge der entsprechenden Proteine, was sich teilweise mit unterschiedlicher Rekrutierung der RNS zu Ribosomen erklären lässt. Um dies systematisch zu untersuchen habe ich in der Hefe *Saccharomyces Cerevisiae* eine Methode entwickelt, die es ermöglicht, Ribosomen-assoziierte RNS Moleküle zu identifizieren. Dazu wurden die Ribosomen mittels Affinitäts-Chromatographie gereinigt, die gebundene RNS isoliert und mittels einen DNS Microarrays identifiziert. Verglichen mit klassischer polysomaler Fraktionierung gestattet diese Methode einen schnellen, zuverlässigen und effizienten Zugang zu RNS Molekülen, die an Ribosomen gebunden sind.

Ich habe diese Technik angewandt, um Änderungen in der RNS Expression (Transkriptom) mit entsprechend veränderten Ribosomen Assoziierungen (Translatom) zu vergleichen. Dazu habe ich Zellen unterschiedlichen Belastungen ausgesetzt. Heftige Belastungen wie zum Beispiel das Entfernen von Aminosäuren aus dem Wachstumsmedium oder die Induzierung eines osmotischen Schocks, hatten hoch korrelierte Reaktionen von Transkriptom und Translatom zur Folge, die ungefähr 15% aller Gene auf beiden Ebenen betrafen. Viele dieser regulierten Boten-RNS kodieren Proteine mit verwandten Funktionen, die eine logische Antwort auf die jeweiligen veränderten Bedingungen darstellen. Im Gegensatz dazu veränderte milder Stress, der mit den Wirkstoffen Calcofluor-White oder Menadione induziert wurde, das Translatom von etwa 1% der RNS Moleküle mit nur kleinen Auswirkungen auf deren Expression, was demnach eine grösstenteils unkorrelierte Reaktion bedeutete. Unter diesen vermutlich translationell regulierten Transkripten befand sich ein Grossteil der Bestandteile der mitochondriellen ATPase. Nach der Stress-Induktion zeigten die entsprechenden Boten-RNS eine erhöhte Polysomen-Assoziierung und die mitochondrielle ATPase eine erhöhte Aktivität, was die translationelle Regulierung dieses makromolekularen Komplexes bestätigte.

Meine Ergebnisse lassen darauf schliessen, dass hoch sensitive, translationelle Regulationsprogramme existieren, die die Proteinsynthese von funktionell verwandten

Transkripten koordinieren. Diese Programme werden als Antwort auf geringfügig veränderte Umweltbedingungen für eine schnelle Anpassung aktiviert.

Zusätzlich ermöglichte mir diese Methode verschiedenen Ribosomen zu untersuchen, die aus paralogen, ribosomalen Proteinen bestehen. In der Hefe *Saccharomyces Cerevisiae* werden 59 der 79 cytoplasmatischen ribosomalen Proteine durch zwei Gene kodiert. Bisher wurde davon ausgegangen, dass diese Protein-Kopien nötig sind um das aussergewöhnliche Bedürfnis der Hefe nach ribosomalen Proteinen zu stillen, ansonsten aber überflüssig sind. Neue Erkenntnisse weisen nun darauf hin, dass diese paraloge Gene nicht immer funktionell identisch sind, was auf die mögliche Existenz eines ‚Ribosomalen Kodex‘ hinweist. Ich habe Unterschiede zwischen Ribosomen, die entweder Rpl16a oder Rpl16b beinhalten, untersucht und eine gute Korrelation zwischen assoziierten RNS Molekülen gefunden. Nur 1.4 % aller analysierten Transkripte waren mehr als zweifach unterschiedlich assoziiert. Diese Daten legen nahe, dass kein grosser Unterschied zwischen Rpl16a- und Rpl16b-assoziierten RNS Molekülen besteht, was auf eine gleiche Funktion dieser paraloge Proteine in Ribosomen hindeutet.