

Регуляция терминации трансляции эукариот факторами инициаторного комплекса

Алкалаева Е.З.*, Шувалова Е.Ю., Шувалов А.В., Бизяев Н.С., Аль Шейх В.

Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва, Россия

* alkalaeva@eimb.ru

Ключевые слова: терминация трансляции; инициация трансляции; рибосома

Мотивация и цель: Эукариотический терминационный комплекс помимо основных двух факторов терминации eRF1 и eRF3 может включать в себя гораздо больше белков. Так, у дрожжей и млекопитающих была показана регуляция терминации трансляции белками PABP, eIF3j, DDX19, Gle1, eIF5A, ABCE1, PDCD4, PAIP1 и PAIP2. Кроме того, очевидно, что в ряде процессов, протекающих во время трансляции, таких как образование замкнутой closed-loop структуры мРНК и трансляция на коротких uORFs с последующей реинициацией трансляции, инициаторные и терминационные рибосомные комплексы сближаются. Таким образом, факторы инициации потенциально могут влиять на активность факторов терминации трансляции. Целью данной работы было комплексное исследование роли факторов инициации в терминации трансляции эукариот.

Методы и алгоритмы: Для решения поставленной задачи нами была использована модельные *in vitro* системы: реконструированная из отдельных компонентов система трансляции млекопитающих и очищенные из лизата ретикулоцитов кролика претерминационные комплексы. С помощью данных методов было исследовано влияние факторов инициации трансляции на разные стадии терминации трансляции.

Результаты: Нами обнаружено, что фактор инициации eIF4F, связывающийся с PABP, а точнее две его субъединицы eIF4G и eIF4A, значительно стимулирует терминацию трансляции. Мы показали, что эти субъединицы участвуют в разных стадиях терминации трансляции. eIF4A способствует загрузке eRF1 в А сайт рибосомы, а eIF4G стимулирует активность фактора терминации eRF3. Кроме того, обнаружено, что eIF4A связывается с преТК в АТФ форме и диссоциирует после гидролиза АТФ. Активность eIF4F в терминации трансляции растет в присутствии поли(А) хвоста мРНК и связанного с ним белка PABP. Более того, мы выявили участие в терминации трансляции фактора инициации eIF4B, который связывается с eIF4F в ходе инициации.

Помимо этого, нами обнаружено, что другой фактор инициации, eIF3, также значительно стимулирует терминацию трансляции. eIF3 не только стимулирует распознавание стоп-кодона фактором терминации eRF1, но и активирует следующую стадию терминации – гидролиз ГТФ фактором eRF3 и последующую аккомодацию eRF1 в пептидилтрансферазном центре рибосомы. Показано, что для работы eIF3 в терминации трансляции не требуется eIF4F, и при совместном добавлении этих факторов инициации в реакцию гидролиза пептидил-тРНК их эффекты суммируются. Обнаружено также, что eIF3 связывается с терминационными комплексами, однако не влияет на связывание с ними факторов

терминации. Помимо этого, нами подтверждено участие eIF3 в сквозном чтении преждевременных стоп-кодонов, которое ранее было показано на клетках дрожжей.

Выводы: В ходе исследования было продемонстрировано участие двух больших инициаторных комплексов в регуляции терминации трансляции – комплекса eIF4F, связывающегося с кэпом на мРНК, и комплекса eIF3, связывающегося с 40S субъединицей рибосомы. Белки, входящие в эти комплексы, либо участвуют в образовании closed-loop структуры мРНК, либо могут быть вовлечены в трансляцию коротких uORF, в результате чего они сближаются с терминирующим комплексом. Таким образом, обнаруженное стимулирующее влияние инициаторных факторов на терминацию трансляции происходит, вероятно, при трансляции этих структур.

Финансирование: Исследование поддержано грантом РНФ (№ 22-14-00279).

Regulation of eukaryotic translation termination by initiation complex

Alkalaeva E.Z.*, Shuvalova E.Y., Shuvalov A.V., Bizayev N.S., Al Sheikh W.

Engelhardt Institute of Molecular Biology, RAS, Moscow, Russia

* alkalaeva@eimb.ru

Key words: translation termination; translation initiation; ribosome

Motivation and Aim: In addition to the two main release factors eRF1 and eRF3, the eukaryotic termination complex may include many more proteins. Thus, in yeast and mammals, the regulation of translation termination by PABP, eIF3j, DDX19, Gle1, eIF5A, ABCE1, PDCD4, PAIP1 and PAIP2 has been shown. In addition, it is obvious that in a number of processes occurring during translation, such as the formation of a mRNA closed-loop structure and translation at short uORFs with subsequent reinitiation of translation, the initiation and termination ribosomal complexes come closer together. Thus, initiation factors can potentially influence the activity of release factors. The goal of this work was a comprehensive study of the role of initiation factors in eukaryotic translation termination.

Methods and Algorithms: To solve this problem, we used *in vitro* model systems: the mammalian reconstituted translation system from individual components, and pretermination complexes purified from rabbit reticulocyte lysate. Using these methods, the influence of translation initiation factors on different stages of translation termination was studied.

Results: We found that the initiation factor eIF4F, which binds to PABP, or more precisely its two subunits eIF4G and eIF4A, significantly stimulates translation termination. We have shown that these subunits are involved in different stages of translation termination. eIF4A promotes the loading of eRF1 into the A site of the ribosome, and eIF4G stimulates the activity of the release factor eRF3. In addition, eIF4A was found to bind to preTC in the ATP form and dissociate after ATP hydrolysis. The translation termination activity of eIF4F increases in the presence of the poly(A) tail of the mRNA and PABP. Moreover, we identified the involvement of the initiation factor eIF4B in translation termination, which binds to eIF4F during initiation.

We found also that another initiation factor, eIF3, significantly stimulates translation termination. eIF3 not only stimulates the recognition of the stop codon by eRF1, but also activates the next stage of termination – GTP hydrolysis by eRF3 and subsequent accommodation of eRF1 in the peptidyl transferase center of the ribosome. It has been shown that eIF3 does not require eIF4F to function in translation termination, and when these initiation factors are added together to the peptidyl-tRNA hydrolysis, their effects are additive. It was also found that eIF3 binds to termination complexes, but it does not affect the binding of release factors to them. In addition, we confirmed the participation of eIF3 in the readthrough of premature stop codons, which was previously shown in yeast cells.

Conclusion: The study demonstrated the involvement of two large initiation complexes in the regulation of translation termination: the eIF4F complex, which binds to capped mRNA, and the eIF3 complex, which binds to the 40S ribosomal subunit. Proteins included in these complexes either participate in the formation of the closed-loop structure of mRNA or can be involved in the translation of short uORFs, as a result of which they come closer to the termination complex. Thus, the detected stimulating effect of initiation factors on translation termination probably occurs during translation of these structures.

Funding: The study is supported by RSF (No. 22-14-00279).