



Posudek oponenta na disertační práci Ing. Kristýny Poncové „*Úloha eIF3 s Rps3 v pročitání stop kodonu*“.

Tato disertační práce se hlavně zabývá modelovým kvasinkovým translačním systémem. Zaměřuje se na eukaryotický iniciační faktor 3 (eIF3). Navzdory jeho názvu, je studována jeho role v terminaci translace a pročitání translačního STOP signálu. Tato jeho funkce je studována v kontextu ribozomálního proteinu Rps3. Tento protein je fascinující už sám o sobě, kdy kromě své ribozomální funkce se může podílet i na opravách DNA, kterou dokáže hydrolyzovat! Disertační práce pak prezentuje nové výsledky, které pomáhají vytvořit přesnější model mechanismů, které se podílejí na správném ukončení translace proteinů.

Předložená disertační práce je psána v anglickém jazyce a je klasicky členěna na Abstrakt, Úvod, Materiály a Metody, Cíle, Výsledky a Diskusi. Práce má celkový rozsah 150 stran. Úvod poskytuje dostatečné informace pro četbu následujících kapitol, ocenil jsem zejména popisy, jak byly některé objevy učiněny historicky. Nadšení a zanícení autorky pro věc jsou zřejmé mj. z věty „*Reinitiation (REI) is a spectacular mechanism of specific translational regulation*“ (str. 38). Práce je napsána přehledně a srozumitelně.

Výsledková část sestává ze tří publikací. Všechny publikace jsou ve vysoce kvalitních oponovaných časopisech. Ing. Poncová je pak první autorkou jedné práce a tato byla publikována v *Nucleic Acids Research*. Tato práce je i hlavním těžištěm celé dizertace, což se odráží i v Cílech, kdy pět ze šesti je zaměřeno na tuto prvoautorskou práci. Na tuto práci budou zaměřeny i následující dotazy a komentáře.

Práce: *uS3/Rps3 controls fidelity of translation termination and programmed stop codon readthrough in co-operation with eIF3*.

V této práci jsou popsány dvě mutace v ribozomálním proteinu Rps3: K108E a R116D, a mutace 10 aminokyselin v C-koncové oblasti proteinu aTif32, který je součástí eIF3. K108E snižuje míru pročitání stop kodonu podobně jako zmiňované mutace v aTif32, R116D má vliv opačný. Dále je popsán vliv mutací na interakci mezi Rps3 a aTif32 a vliv na pročitání různých stop kodonů v kontextu pozice bezprostředně za stop kodonem (+4). Shrnuto, práce přináší zásadně nové informace o translační terminaci a načrtává mechanistickou roli proteinu Rps3 v tomto procesu.

Komentáře/Otázky:

1. Protein Rps3 obsahuje RNA vazebný motiv: VIGXXGXXI (str. 46). Tento motiv neobsahuje ani jednu kladně nabitou aminokyselinu. Jak tento motiv funguje (z hlediska interakce s RNA)?

2. aTif32

2.1. Obr. 3C ukazuje zhoršený růst buněk s alelou aTif32-box33 pomocí ředící „spot assay“ na pevném médiu. V obrázku je růstový fenotyp na hranici detekce. Prováděla jste růsty také v tekutém médiu, kde by růstový rozdíl byl lépe definovatelný?

2.2. aTif32-box33 má zmutováno 10 ak na alaniny. Z těchto 10 ak - lze vytipovat ty, jejichž role je pro studované efekty klíčová?

3. Obr. 9 ukazuje, že mutace R116D způsobila zvýšené množství terminačních faktorů eRF1 a eRF3 v polyzómech. Tato mutace zvyšuje pročitání stop kodónu, tedy působí anti-terminačně. Toto pozorování vysvětlujete pomalejší rychlostí terminace.

3.1 Jak si představujete, že pomalejší rychlost terminace způsobí zvýšení množství terminačních faktorů na ribozómu?

3.2. Kontrolovala jste, že hladiny eRF1 a eRF3 jsou v buňce nezměněny a že se tedy naopak nejedná o snahu buňky kompenzovat nedostatečnou terminaci zvýšením množství terminačních faktorů?

3.3. Co by se stalo, kdybyste v divokém typu či na pozadí mutací Rps3 nadprodukovala eRF1 a eRF3?

4. Přítomnost předčasného nonsense kodonu v genu je zodpovědná za 15 % lidských genetických onemocnění. Pročitání takových kodónů je pak jediným zdrojem funkčního proteinu. V případě nemutovaného genomu – jak velkou roli hraje pročitání stop kodonu pro např. proteinovou diverzitu organismu a jeho schopnost reagovat na stres? Má to nějakou roli nebo je to jen nepřesnost systému, která je tolerována?

5/ Jaké další směry výzkumu byste v dané oblasti navrhla?

Závěrem konstatuji, že disertační práce působí uceleným dojmem, splňuje požadavky kladené na disertační práci v oboru, a prezentované výsledky splňují kritéria originální tvůrčí vědecké práce. Disertační práci doporučuji k obhajobě a přeji uchazečce mnoho úspěchů v další práci.

Praha 27. 5. 2020

Mgr. Libor Krásný, PhD

Mikrobiologický ústav AV ČR, v. v. i.
Vídeňská 1083
142 20 Praha 4
Tel. 241 063 208
e-mail krasny@biomed.cas.cz