

Charakterizace RPG1, velké podjednotky kvasinek
***S. cerevisiae* iniciačního translačního faktoru 3 (eIF3).**

Disertační práce
pro získání akademického titulu

Doktor přírodních věd

na

Fakulta formálních a přírodních věd Vídeňské univerzity

předložil

Mag. Leoš Valášek

Vídeň, září 1998

ABSTRAKT

Eukaryotický iniciační faktor 3 (eIF3) se skládá z nejméně osmi podjednotek a hraje klíčovou roli při tvorbě preiniciačního komplexu 43S tím, že disociuje ribozomální podjednotky 40S a 60S, stabilizuje ternární komplex a podporuje vazbu mRNA na ribozomální podjednotky 40S. Bylo popsáno, že produkt genu *RPG1* *S. cerevisiae* kóduje protein potřebný pro průchod fází G1 buněčného cyklu a vykazuje významnou sekvenční podobnost s největší podjednotkou lidského eIF3. Zde ukazují, že za nedenaturačních podmínek Rpg1p ko-purifikuje se známou kvasinkovou podjednotkou eIF3, Prt1p. Protilátka proti Rpg1p ko-imunoprecipituje Prt1p a protilátka namířená proti Myc-značce označené verze Prt1p ko-imunoprecipituje Rpg1p, což dokazuje, že oba proteiny jsou přítomny ve stejném komplexu. Integrita tohoto komplexu není ovlivněna zvýšenou teplotou na pozadí teplotně citlivého mutantního kmene *rpg1-1*. Bezbuňkový translační systém odvozený z tohoto teplotně citlivého mutantního kmene *rpg1-1* se inkubací při 37 °C inaktivuje a jeho aktivitu lze obnovit přidáním proteinového komplexu obsahujícího Rpg1. Mutantní kmen *rpg1-1* vykazuje dramatické snížení poměru polysomů k monosomům při posunu na restriktivní teplotu. Tato data ukazují, že Rpg1p je autentickou podjednotkou eIF3 a hraje důležitou roli v iniciačním kroku translace. Je zajímavé, že ani lidský p180, ani kukuřičný Zmef3A homolog nejsou schopny nahradit Rpg1p v kvasinkách, což naznačuje, že navzdory značné evoluční konzervaci jsou všechny tři homology funkčně odlišné.

Při screeningu na multikopiové supresory teplotně citlivého mutantu *rpg1-1* v *S. cerevisiae* byl identifikován neznámý neesenciální gen odpovídající otevřenému čtecímu rámci YLR192C. Při nadměrné expresi je produkt genu o velikosti 30 kDa, pojmenovaný Msr1p (pro multikopiový supresor *rpg1-1*), schopen za restriktivních podmínek podporovat růst *rpg1-1* ts mutantu, ale ne mutantu s deplecí Rpg1p. Nebyl pozorován žádný fenotyp *msr1* null mutantu, kromě mírného prodloužení doby zdvojení. Existenci interakce mezi proteiny Msr1 a Rpg1 naznačila ko-imunoprecipitační analýza. Tetradová analýza dvojitého mutantu *msr1 rpg1-1* neodhalila žádnou syntetickou interakci mezi těmito dvěma proteiny. Bylo prokázáno, že Msr1p se nachází rovnoměrně v celé buňce. Při počítačovém vyhledávání v různých databázích genomů byla nalezena pouze slabá homologie s genem *DRS1* pro *S. cerevisiae* kódujícím RNA helikázu.