

Abstrakt

Iniciace translace představuje mnohastupňový proces, který zajišťuje sestavení 80S ribosomu na AUG start kodonu molekuly mRNA, jež má být přeložena do polypeptidového řetězce. Správný průběh tohoto procesu je řízen mnoha eukaryotickými iniciačními faktory (eIFs), z nichž nejdůležitějším je eukaryotický iniciační faktor 3 (eIF3). Hlavním cílem naší laboratoře je co nejpodrobněji popsat proteinový komplex eIF3 a také způsoby, jakými tento faktor přispívá k jednotlivým krokům procesu iniciace translace. Kromě toho též zkoumáme jeden z genově specifických kontrolních mechanismů translace zvaný reiniciace, který je, alespoň u kvasinek, umožňován právě faktorem eIF3.

V této práci popisují, že N-terminální doména (NTD) jedné z největších podjednotek kvasinkového eIF3, označované jako a/Tif32, hraje důležitou úlohu nejen ve vazbě eIF3 k 40S ribozomální podjednotce, ale taktéž významně přispívá k nasedání mRNA na 43S preiniciační komplex *in vivo*. Stabilizační role N-terminální domény podjednotky a/Tif32 byla ověřena též v naší následující studii, a to biofyzikálními experimenty. Pomocí dalších *in vivo* přístupů jsme v této práci též dokázali, že pro mRNA s delšími 5' nepřekládanými oblastmi je stabilizační role a/Tif32-NTD důležitější než pro mRNA s krátkými 5' nepřekládanými oblastmi.

V následujících studiích, kde se zaměřuji na popis mechanismu reiniciace, jsme odhalili dosud neznámé *cis*-elementy důležité pro správné fungování reiniciace na kvasinkové modelové mRNA *GCN4*. Naš výzkum též přinesl první důležité detaily o tomto kontrolním mechanismu v lidských buňkách, a to za použití lidské modelové mRNA *ATF4*. Zjistili jsme například, že uORF1 z *ATF4*, jenž je elementem umožňujícím reiniciaci, je obklopen sekvencemi, které jsou důležité pro vysokou efektivitu reiniciace na tomto uORF. Podobně je tomu i v případě uORF1 z *GCN4*, který též umožňuje reiniciaci na této mRNA. Z našich *in silico* analýz vyplynulo, že nukleotidová sekvence předcházející uORF1 z *ATF4* pravděpodobně tvoří konkrétní sekundární strukturu, jež se zdá být konzervována mezi savci. Na základě počítačových analýz jsme vytvořili mutace, které narušily tuto strukturu, a po jejich testování jsme zjistili, že skutečně snižují schopnost uORF1 z *ATF4* podporovat reiniciaci. To nasvědčuje tomu, že přítomnost této struktury je pro efektivitu reiniciace v savčích buňkách důležitá. Na závěr jsme prokázali, že stejně jako je tomu v případě kvasinek, i reiniciace v savcích je umožňována faktorem eIF3, avšak konkrétní zúčastněnou podjednotkou není v tomto případě eIF3a/Tif32, ale eIF3h.

Tato Ph.D. práce tedy přispívá nejen k obecnému porozumění základním procesům iniciace translace, ale osvětluje též molekulární mechanismus reiniciace v lidských buňkách a odhaluje tak, že mnoho aspektů tohoto procesu zůstalo konzervováno mezi nižšími a vyššími eukaryoty.