

Abstrakt

Syntéza bílkovin, neboli translace mRNA, je komplexní a velmi konzervovaný proces. Translace probíhá v několika na sebe navazujících fázích: iniciaci, elongaci, terminaci a recyklaci ribozomu. Vzhledem k tomu, že většina regulačních procesů probíhá v iniciační fázi, již po několik desetiletí je právě k ní upírán vědecký zrak se snahou objasnit molekulární mechanismus všech jejich kontrolních bodů. Iniciační faktor eIF3, který se v kvasinkách skládá z pěti esenciálních podjednotek tvořících jeho jádro (eIF3a/TIF32, b/PRT1, c/NIP1, g/TIF35, a i/TIF34) a jedné přidružené neesenciální podjednotky (j/HCR1), patří neoddiskutovatelně ke klíčovým hráčům iniciace. Kromě této úlohy hraje rovněž důležitou roli v recyklaci ribozomu, reiniciaci, signálních drahách buněčné signalizace, kontrolních a regulačních mechanismech, jakým je kupříkladu degradace mRNA s předčasným stop kodonem (nonsense-mediated mRNA decay - NMD) atp.

Zaměřili jsme se na objasnění molekulárního mechanismu, kterým eIF3 spolu s ostatními iniciačními faktory vykonávají svou funkci nejen v iniciaci translace, ale i její terminaci a reiniciaci. To zahrnovalo mimo jiné i genetické mapování vazebných míst eIF3 na malou ribozomální podjednotku.

Ukázali jsme, že vazba mezi 200-400-tým aminokyselinovým zbytkem N-konce a/eIF3 a flexibilním chvostem C-konce RPS0A významně stimuluje navázání eIF3 a s ní asociovaných faktorů na malou ribozomální podjednotku *in vivo*, a tak a/TIF32-NTD, spolu s nedávno publikovanou PCI (proteasome component) doménou C-konce c/NIP1, tvoří důležitý mezimolekulární most mezi eIF3 a 40S. Dále jsme předvedli, že částečná delece domény vázající RPS0A v a/TIF32 blokuje znovu zahájení translace genu *GCN4*, který probíhá prostřednictvím reiniciaci. Genetická analýza odhalila funkční vazbu mezi 5' *cis*-působících sekvencí mRNA genu *GCN4* a N-koncem a/TIF32. Tato interakce se podílí na stabilizování post-terminačních 40S ribozomálních podjednotek na uORF1 (čtecím rámci v protisměru) mRNA genu *GCN4* a obnovení skenování.

Další část mé dizertační práce odhaluje funkční charakteristiku dvou esenciálních podjednotek eIF3: g/TIF5 a i/TIF34, u kterých bylo dříve *in vitro* prokázáno, že jsou postradatelné pro vytvoření 48S neiniciačních komplexů, jedné ze základních rolí eIF3. Ukázali jsme, že oba proteiny ovlivňují rychlost a procesivitu skeninku v živých buňkách. Dále jsme ukázali, že g/TIF35 se specificky váže na ribozomální proteiny RPS3 a RPS20, které se nalézají v blízkosti vstupního kanálu mRNA do ribozomu a její RRM (RNA

recognition motif) doména hraje roli v reiniciaci již zmiňovaným stabilizování uORF1 post-terminačních 40S ribozomů na mRNA genu *GCN4*, ačkoliv jiným molekulárním mechanismem než α /TIF32-NTD. Mimo to jsme uveřejnili krystalovou strukturu, v rozlišení 2.2Å, β /TIF34 podjednotky v komplexu s malou částí C-konce β /PRT1 (654-700-tým zbytkem).

V poslední části mé dizertační práce jsme identifikovali a definovali roli eIF3 v procesu rozpoznání stop kodonu a odhalili její aktivní roli v terminaci translace.