



Posudek oponenta na disertační práci Mgr. Lucie Cuchalové „*Characterization of the two smallest core subunits of eIF3 and their roles in translation*“.

Tato disertační práce se zabývá dvěma esenciálními podjednotkami eukaryotického iniciačního faktoru 3 (eIF3) v kvasinkovém modelovém systému. Navzdory důležitosti těchto bílkovin pro buňku byly znalosti o jejich funkci mizivé, a předložená práce prezentuje nové výsledky, které ukazují jejich roli v iniciaci, ale, překvapivě, i terminaci transkripce.

Předložená disertační práce je psána v anglickém jazyce a klasicky členěna na Abstrakt, Úvod, Výsledky a Diskusi. Úvod je psán ve zkrácené podobě. Přiloženy jsou pak konkrétní publikace a rukopisy. V práci se místy vyskytují překlepy či drobné chyby, a občas se vyskytne stylistická neobratnost (např. v definování Cíle 3 na str. 17, kde místo poněkud rozvláčeného „*We have concerted our effort to the role...*“ by stačilo např. „*We studied the role...*“. Nicméně, jako celek je práce napsána přehledně a srozumitelně.

Těžištěm výsledkové části jsou čtyři publikace a jeden rukopis, v současnosti v oponentuře. Všechny publikace jsou ve vysoce kvalitních oponovaných časopisech. Mgr. Cuchalová je pak první autorkou dvou prací. Zde se nachází těžiště jejího výzkumu a na ně budou zaměřeny i následující dotazy a komentáře.

Práce: *The RNA Recognition Motif of Eukaryotic Translation Initiation Factor 3g (eIF3g) Is Required for Resumption of Scanning of Posttermination Ribosomes for Reinitiation on GCN4 and Together with eIF3i Stimulates Linear Scanning.*

V této práci byly studovány role dvou podjednotek eIF3, a to Tif35 a Tif34. Pomocí specifických mutací byla identifikována role těchto podjednotek pro procesivitu a rychlost skenování.

1/ Byl testován vliv jiných kombinací mutací ostatních konzervovaných aminokyselin (ak) motivu RMM mimo trojkombinaci KLF použitou v práci? Pokud ano, byly výsledky podobné?

2/ Je ukázáno, že Tif35 i mutant Tif35-KLF interagují s RNA (konkrétně β -globin mRNA). Mutace tedy nemá na tuto interakci vliv. Dále je pak ukázáno, že Tif35-KLF oproti Tif35 snižuje schopnost skenování skrz stabilní vlásenkové struktury. Mohl by Tif35 přednostně interagovat s takovými strukturami a interakce s RNA tak být (z hlediska RNA) strukturně-specifická?

3/ Skenování je ovlivněno sekundárními strukturami v RNA. Role studovaných proteinů byla examinována vložení různě stabilních vlásenkových struktur. Byl tento aspekt studován i pomocí přirozených RNA? (např. dvou různých mRNA lišících se obsahem sekundárních struktur). Existuje určitý limit, kdy vzniklá sekundární struktura znemožní skenování?

Práce: *Translation in Yeast Cells Begins and Ends with Translation Initiation Factor 3 (eIF3)*.

Tato práce naznačuje možnost aktivní role eIF3 i při terminaci transkripce. Výchozí experimentální metodou byl luciferázový reportérový systém, kdy mezi oběma geny se nacházel stop kodón a bylo možné měřit vliv různých faktorů na míru pročtení tohoto kodónu. Překvapivě, mutace v základních podjednotkách eIF3 vedly ke snížení pročitání, tedy zvýšení účinnosti terminace. Naproti tomu odstranění podjednotky Hcr1 (asociuje s eIF3 jen volně) rezultovalo ve výrazném zhoršení terminace translace.

4/ Byl studován jeden konkrétní stop kodon, UGA. Liší se účinnost terminace s jinými stop kodóny (např. UAA by mohl být tak účinný, že by nebylo možné měřit pročitání)? Byl studován vliv mutací na terminaci na kodónech, které se STOP kodónu jen podobaly (např. záměna na 3. pozici)?

5/ Má na pročitání vliv kontext stop kodonu?

6/ Mutace ve faktorech Tif32, Prt1, Nip1, Tif34, Tif35 zvýšily účinnost terminace. Bylo by možné, že eIF3 pomáhá při elongaci (brání terminaci), a pak poškození eIF3 vede ke zlepšené terminaci?

7/ Byl ukázán vliv iniciačních faktorů na terminaci translace. Byl někdy ukázán efekt opačný, tj. vliv terminačních faktorů na iniciaci?

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 21. 3. 2013

Mgr. Libor Krásný, PhD

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