

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie



Kristýna Jakešová

Posttranskripční úpravy mRNA molekul u virů čeledi *Poxviridae*

Post-transcriptional modification of mRNA molecules in viruses of the *Poxviridae*
family

Bakalářská práce

Školitel: Mgr. Václav Vopálenský Ph.D.

Praha, 2023

Poděkování

Ráda bych poděkovala vedoucímu práce Mgr. Václavu Vopálenskému Ph.D. za poskytnuté rady. Dále děkuji rodině za podporu a trpělivost během celého studia.

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedl/a všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 3.5.2023

Podpis

Abstrakt

Posttranskripční modifikace mRNA molekul u virů čeledi *Poxviridae*, do které patří také virus vakcinie, mají klíčovou roli v regulaci genové exprese viru a ovlivňují také interakce viru s hostitelskou buňkou. Mezi tyto modifikace patří syntéza 7-methylguanosenové čepičky, 2'-O-methylace, polyadenylace 3' konce vlákna mRNA, hydrolýza 7-methylguanosenové čepičky a polyadenylace 5' konce mRNA vlákna. Studium posttranskripčních či kotranskripčních modifikací mRNA u virů čeledi *Poxviridae* může přispět k lepšímu porozumění virové patogenezi a vývoji nových strategií v léčbě infekcí způsobených virem z této čeledi. Cílem této bakalářské práce je shrnutí poznatků o kotranskripčních či posttranskripčních modifikacích mRNA molekul u virů čeledi *Poxviridae* se zvláštním zřetelem na virus vakcinie.

Klíčová slova: Poxviry, virus vakcinie, mRNA, posttranskripční modifikace

Abstract

Post-transcriptional modifications of mRNA molecules in viruses belonging to the *Poxviridae* family, including the vaccinia virus, play a key role in regulating viral gene expression and also influence virus-host cell interactions. These modifications include the synthesis of a 7-methylguanosine cap, 2'-O-methylation, 3' polyadenylation of the mRNA strand, hydrolysis of the 7-methylguanosine cap, and 5' polyadenylation of the mRNA strand. Studying post-transcriptional or co-transcriptional mRNA modifications in *Poxviridae* viruses can contribute to a better understanding of viral pathogenesis and the development of new strategies for treating infections caused by viruses in this family. The aim of this bachelor's thesis is to summarize current knowledge of co-transcriptional or post-transcriptional mRNA modifications in *Poxviridae* viruses, with a special focus on vaccinia virus.

Keywords: *Poxviridae*, vaccinia virus, mRNA, post-transcriptional modification

Obsah

1. Úvod	8
2. Velké nukleocytoplazmatické DNA viry	9
2.1. Viry čeledi <i>Poxviridae</i>	9
2.2. Virus vakcinie.....	10
3. Genová exprese poxvirů	12
3.1. RNA polymeráza viru vakcinie	13
3.2. Expresní časové třídy genů viru vakcinie.....	14
3.2.1. Transkripce genů rané třídy	15
3.2.2. Transkripce genů střední třídy	16
3.2.3. Transkripce genů pozdní třídy	17
4. Posttranskripční úpravy mRNA.....	19
4.1. Syntéza 7-methylguanositové čepičky na 5' konci mRNA	20
4.1.1. <i>Capping</i> enzym viru vakcinie	20
4.2. 2'-O-Methylace mRNA	22
4.3. Hydrolyza 7-methylguanositové čepičky	22
4.4. Polyadenylace 3' konce mRNA	24
4.4.1. Poly(A) polymeráza viru vakcinie	24
4.5. Polyadenylace 5' konce mRNA	25
5. Závěr	26
6. Použitá literatura.....	28

Seznam zkratek

AA	aminokyselina
AdoHcy	S-adenosyl-L-homocystein
AdoMet	S-adenosyl-L-methionin
ASFV	virus afrického moru prasat (<i>African swine fever virus</i>)
ATP	adenosintrifosfát
bp	bazický pár
<i>Cap 0</i>	čepička typu 0
<i>Cap 1</i>	čepička typu 1
CE	<i>capping</i> enzym
dsDNA	dvouvláknová DNA
dsRNA	dvouvláknová RNA
GMP	guanosinmonofosfát
GTáza	guanylyltransferáza
GTP	guanosinmonofosfát
HCC	hepatocelulární karcinom
kbp	tisíc bazických párů
kDa	kilodalton
MTáza	methyltransferáza
MVA	modifikovaný virus vakcinie Ankara
NTáza	nukleotidyltransferázová doména
NCDLV	velké nukleocytoplazmatické DNA viry
OB fold	oligonukleotid/oligosacharid vazebná doména
ORF	otevřený čtecí rámeček
POLADS	krátké netranslatující polyadenylované sekvence

TF	transkripční faktor
TPáza	RNA trifosfatáza
VACV	virus vakcinie
VARV	virus varioly
VETF	<i>vaccinia early transcription factor</i>
VITF-1	<i>vaccinia intermediate transcription factor 1</i>
VITF-2	<i>vaccinia intermediate transcription factor 2</i>
VITF-3	<i>vaccinia intermediate transcription factor 3</i>
vRNAP	virová RNA polymeráza
VTF	<i>vaccinia termination factor</i>
VACV	virus vakcinie
WR	western reverse
WT	<i>wild type</i>
YY1	transkripční faktor YinYang1

1. Úvod

Cílem této bakalářské práce je rešeršní shrnutí poznatků o kotranskripčních a posttranskripčních modifikacích mRNA molekul u cytoplazmatických dsDNA virů čeledi *Poxviridae* se zaměřením na virus vakcinie.

Poxviry jsou čeledí velkých nukleocytoplazmatických virů (NCDLV), jejich životní cyklus probíhá pouze v cytoplazmě hostitelské buňky. Tyto viry jsou schopné infikovat široké spektrum hostitelů, působí onemocnění u lidí, ale i u různých živočichů. Mezi viry této čeledi patří například virus variola, který je původcem pravých neštovic nebo virus vakcinie, který je považován za model transkripční regulace všech poxvirů. Právě z toho důvodu se tato práce zaměřuje na poznatky o posttranskripčních modifikacích u tohoto viru.

Posttranskripční modifikace mRNA molekul jsou důležitým mechanismem regulace genové exprese u všech organismů. Tyto modifikace ovlivňují stabilitu, transport a translaci mRNA, což má vliv na produkci proteinů, které jsou v buňkách syntetizovány. Posttranskripční modifikace jsou také ideálním místem, na které by mohla být mířena antitivirová terapie.

V úvodu této práce jsou představeny viry čeledi *Poxviridae* a průběh jejich transkripce. Dále jsou popsány jednotlivé posttranskripční modifikace jako syntéza 7-methylguanositinové čepičky (kapitola 4.1.), 2-O-methylace mRNA (4.2.), hydrolýza 7-methylguanositinové čepičky (4.3.), polyadenylace 3' konce mRNA (4.4.) a polyadenylace 5' konce (4.5.).

2. Velké nukleocytoplazmatické DNA viry

Velké nukleocytoplazmatické viry (NCDLV) jsou skupinou s největším počtem zástupců napadajících eukaryotické buňky. Do této skupiny se řadí čeledi *Asfarviridae*, *Ascoviridae*, *Marseilleviridae*, *Iridoviridae*, *Phycodnaviridae*, *Pithoviridae*, *Mimiviridae* a *Poxviridae*, také se sem řadí Molliviry, Pandoraviry a Faustoviry, které zatím ovšem nebyly zahrnuty do oficiálního taxonomického systému virů (Koonin & Yutin, 2019).

Viry této skupiny nejsou silně závislé na replikačním nebo transkripčním systému hostitelské buňky. Dokáží se replikovat v cytoplazmě hostitelské buňky nebo mají ve svém životním cyklu jak cytoplazmatickou, tak i jadernou fázi (Koonin & Yutin, 2010).

Po získání kompletní sekvence genomů několika velkých dsDNA virů eukaryot, byla provedena srovnávací genomická analýza, díky níž se prokázalo, že Poxviry, virus afrického moru prasat (ASFV) a viry čeledi *Iridoviridae*, *Ascoviridae* a *Phycornaviridae* sdílejí mnoho homologních genů (viz níže) a je pravděpodobné, že pocházejí z jednoho společného virálního předka (Iyer et al., 2001).

Během dalších experimentů bylo zjištěno, že všechny velké nukleocytoplazmatické DNA viry obsahují pět genů vykazujících významnou homologii, konkrétně se jedná o gen kódující hlavní kapsidový protein, ortolog proteinu D13L viru vakcinie, virový transkripční faktor (u VACV kódován genem A2L), komplex helikáza-primáza (VACV D5R), podjednotku DNA polymerázy rodiny B (VACV E9L) a ATPázu, která slouží k balení DNA do kapsidy (VACV A32L). Většina, ale již ne všechny viry ze skupiny NCLDV sdílí dalších přibližně 50 genů, které jsou přítomny v posledním společném předku celé skupiny NCLDV, což je důkazem toho, že všechny tyto viry mají společného předka (Yutin et al., 2009).

2.1. Viry čeledi *Poxviridae*

Viry jsou malé, nebuněčné organismy, replikující se pouze v hostitelských buňkách. Viry z čeledi *Poxviridae* jsou odpovědné za mnoho lidských, ale i různých živočišných onemocnění, mezi které patří neštovice (opičí, kraví, kozí) *molluscum contagiosum* nebo nodulární dermatitida skotu (Moss, 2013). Právě neštovice, které

jsou způsobované virem variola (VARV) byly jednou z nejsmrtelnějších nemocí v historii lidstva. V druhé polovině 20. století byly pravé neštovice vymýceny díky globální vakcinaci za pomoci dalšího viru z čeledi *Poxviridae*, viru vakcinie (VACV) (Strassburg, 1982).

Poxviry jsou využívány jako vakcinační vektory proti jiným virům, jako je virus vztekliny (Kieny et al., 1984), SARs-CoV (Chen et al., 2005). Využití modifikovaného viru vakcinie Ankara (MVA) jako vektoru pro vývoj vakcíny proti viru Zika se jeví jako slibný přístup (Pérez et al., 2018). Poxviry jsou navíc používány také jako prostředky onkolytické viroterapie v kombinaci s jinými terapiemi například u pacientů s hepatocelulárním karcinomem (HCC) (Guo et al., 2019).

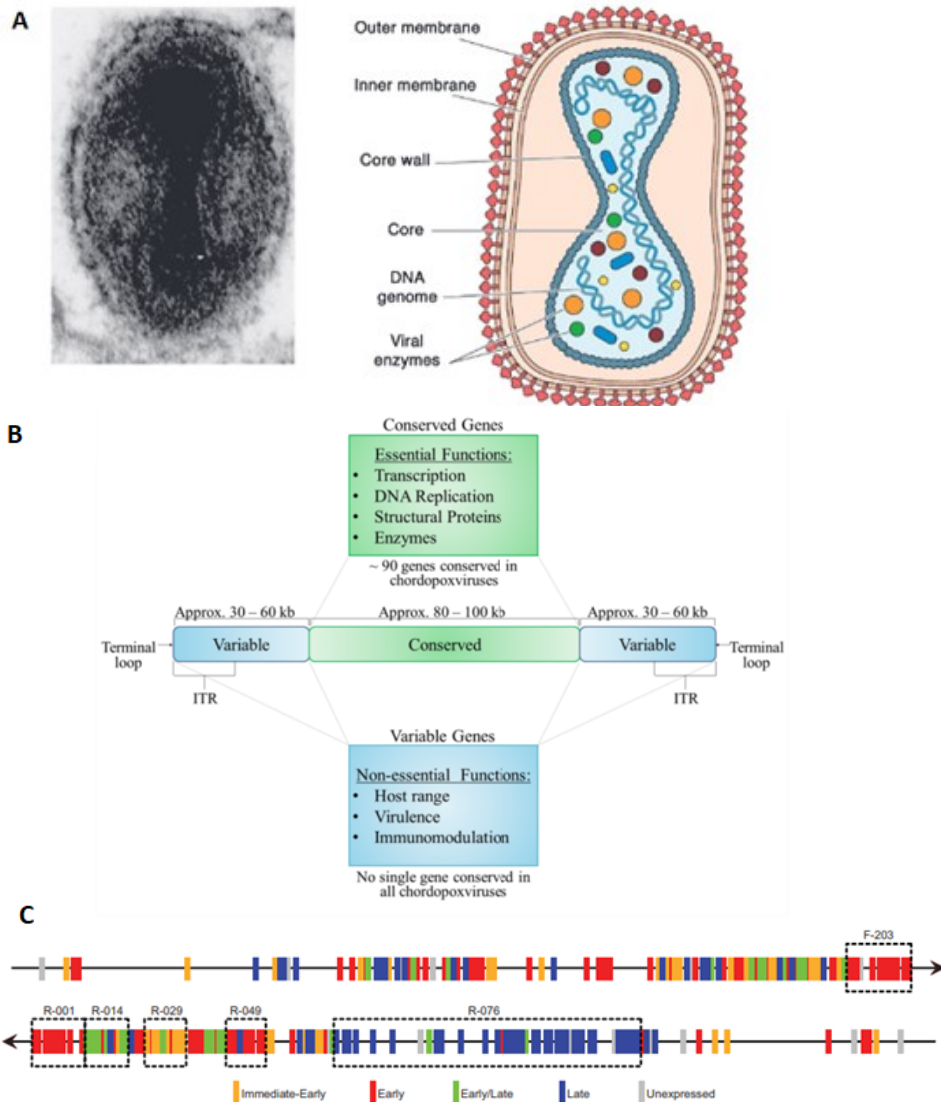
Viry čeledi *Poxviridae* jsou velké DNA viry o velikosti partikule 230 až 300 nm. Jejich genom je tvořen dsDNA molekulami s vlásenkou na obou koncích, jeho velikost se pohybuje od 130 kbp u parapoxvirů do přibližně 300 kbp u avipoxvirů (Broyles, 2003). Genom poxvirů je tvořen dvěma lineárními komplementárními vlákny DNA a kóduje přes 100 strukturních proteinů, některé z nich mimo strukturní funkce vykazují i enzymatickou aktivitu (Bednář et al., 1996). Poxviry mají vysokou úroveň nezávislosti na hostitelské buňce. Od jiných tříd NCDLV virů se poxviry odlišují tím, že celý proces jejich replikace a transkripce probíhá v cytoplazmě hostitelské buňky (Moss, 2013).

2.2. Virus vakcinie

Virus vakcinie (VACV) je jedním z nejintenzivněji studovaných členů čeledi *Poxviridae*. Tento virus se považuje za model transkripční regulace u všech poxvirů (Prideaux et al., 1990).

Genom viru Vakcinie jako u ostatních poxvirů je lineární, nesegmentovaný, dvouvláknový. Jeho délka je přibližně 190 kbp [velikost genomu prototypického kmene WR (Western Reverse) je 194711 bp] (Yang et al., 2011) a má na každém konci vlásenkovou smyčku (Obrázek 1) (Goebel et al., 1990). Genom tohoto viru kóduje více než 200 proteinů, které jsou potřebné pro jeho cytoplasmatickou replikaci, přenos mezi hostiteli nebo úniku před imunitním systémem hostitele. Genomem jsou také kódovány enzymy, které jsou zodpovědné za transkripci (podjednotky RNA polymerázy) a modifikaci mRNA, jako je syntéza 7-methylguanositinové čepičky, 2'-O-methylace mRNA, hydrolýza 7-methylguanositinové čepičky a polyadenylace mRNA na 3' konci (Moss, 2013).

Exprese genů viru vakcinie probíhá temporálně regulovaným kaskádovým způsobem, který je odlišný pro geny rané, střední a pozdní časové třídy. Geny rané třídy jsou kódovány 118 otevřenými čtecími rámci (ORF) a jsou exprimovány před replikací virové DNA. Na rozdíl od nich střední a pozdní geny jsou exprimované až po replikaci virové DNA (Vos & Stunnenberg, 1988).

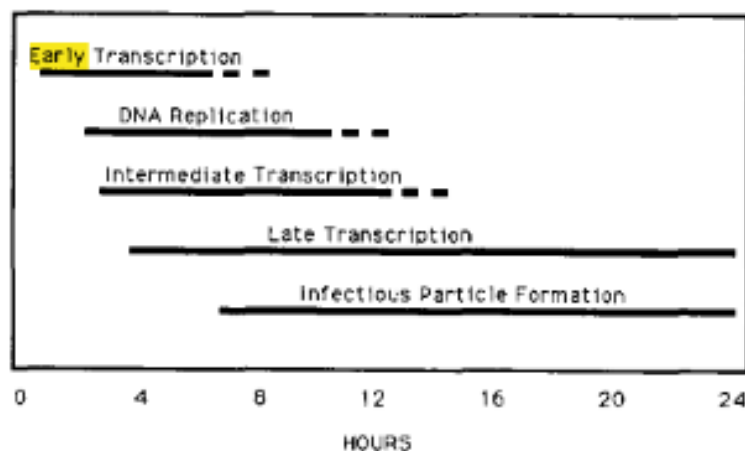


Obrázek 1 - Virus vakcinie jako reprezentativní poxvirus; A) snímek z transmisního elektronového mikroskopu virionu viru vakcinie s dvojí membránou (vlevo); struktura virionu viru vakcinie se znázorněnými komponenty virionu (vpravo) (Harrison et al., 2004); B) Organizace genomu VACV – lineární dsDNA genom VACV s vlásenkovou smyčkou na obou koncích. Geny umístěné v centrální části genomu jsou konzervované a jsou obvykle nezbytné pro virovou replikaci a morfogenezi, geny v koncových částech genomu nejsou konzervované a kódují faktory virulence (Smith & McFadden, 2002); C) Geny viru vakcinie jsou rozděleny do expresních časových tříd podle toho, kdy jsou exprimovány. Barevně jsou rozlišeny do skupin dle času své exprese (Assarsson et al., 2008).

3. Genová exprese poxvirů

Podobně jako u většiny ostatních tříd virů i poxviry koordinují procesy replikace genomu a sestavení virionů prostřednictvím regulace časování exprese jednotlivých genů (Obrázek 2). Tato regulace je klíčová pro správnou funkci viru a umožňuje mu replikovat se a šířit se v hostitelských buňkách. Poxviry jsou schopny načasovat exprese svých genů tak, aby byly v optimálním čase aktivovány geny zodpovědné za replikaci virálního genomu, transkripci a sestavení nových virionů. Tímto způsobem se poxviry přizpůsobují hostitelskému prostředí a maximalizují svou schopnost přežít a šířit se v hostitelském organismu (Lee-Chen et al., 1988). Proteiny, které se podílejí na replikaci virové DNA, syntéze nukleotidů a transkripci genů střední třídy jsou syntetizovány jako geny rané třídy. Geny, které se účastní virionové morfogeneze a sestavení virové částice patří mezi geny střední a pozdní třídy a jsou exprimovány až po replikaci virové DNA (Broyles, 2003).

Regulace genové exprese probíhá na úrovni iniciace transkripce prostřednictvím kaskádového mechanismu. Transkripční faktory (TF), které jsou potřebné pro expresi genů střední třídy jsou exprimovány jako proteiny rané třídy. Transkripční faktory, které jsou potřebné expresi genů pozdní třídy jsou exprimovány jako proteiny střední třídy. TF, které jsou potřebné pro expresi genů rané třídy jsou pozdní genové produkty, které jsou balené uvnitř virionů pro použití v dalším cyklu infekce cílové buňky (Garcés et al., 1993).



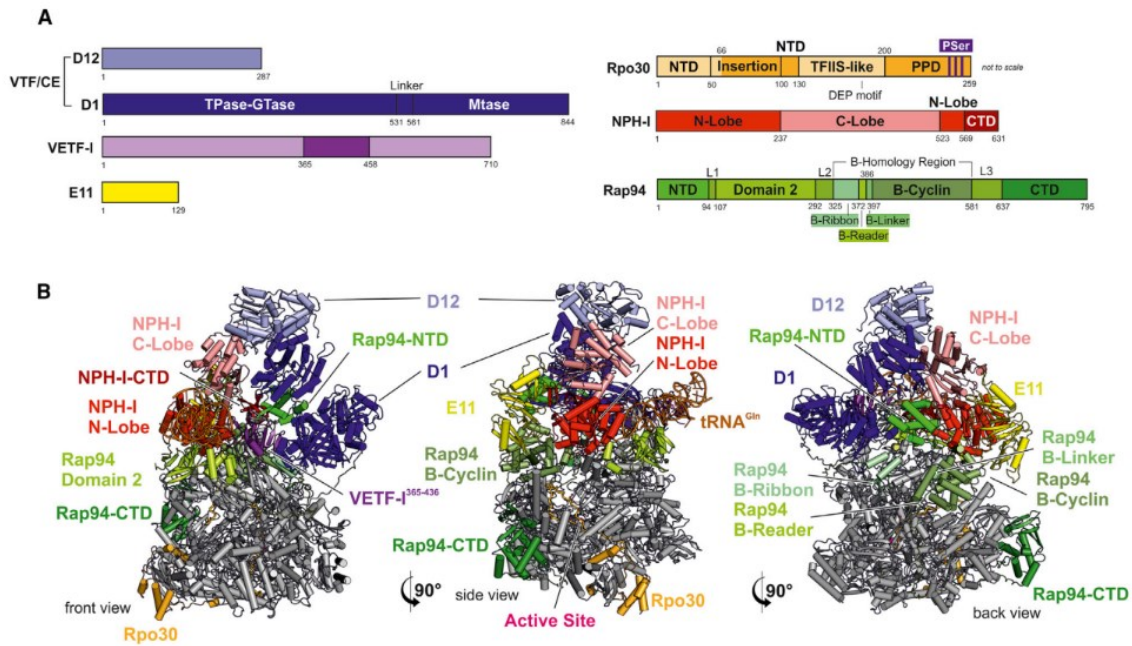
Obrázek 2 – Schématické znázornění průběhu jednotlivých částí genové exprese viru vakcinie v čase (Moss et al., 1991).

3.1. RNA polymeráza viru vakcinie

Poxviry kódují vícepodjednotkovou DNA-dependentní RNA polymerázu (vRNAP), která se skládá z osmi podjednotek kódovaných ranými virovými geny. Celková hmotnost této polymerázy je zhruba 500 kDa. Podjednotky jsou označeny podle jejich zdánlivých molekulových hmotností Rpo147 (kódovaná genem J6R viru vakcinie), Rpo132 (A24R), Rpo35 (A29L), Rpo30 (E4L), Rpo22 (J4R), Rpo19 (A5R), Rpo18 (D7R) a Rpo7 (G5R) (Broyles, 2003; Grimm et al., 2019). Aminokyselinové sekvence dvou největších podjednotek virové RNA polymerázy, tedy podjednotky Rpo147 a Rpo132, vykazují zhruba 20% shodu s podjednotkami RPB1 a RPB2 eukaryotické RNA polymerázy II. Tato virová RNA polymeráza transkribuje všechny tři časové třídy genů (Knutson & Broyles, 2008).

Holoenzym virové RNA polymerázy (Obrázek 3) obsahuje krom samotné osmi podjednotkové RNA polymerázy také transkripční faktory Rap94, VETF-I, VETF-s (kódovány geny A7L a D6R) VTF/CE (*vaccinia terminator factor/capping enzyme*) (produkt genů D1R a D12L), NPH-I (*nukleoside phosphohydrolase I*) (kódován genem D11L), strukturální protein E11L a hostitelskou tRNAGln. Tento komplex je schopen iniciace transkripce genů rané třídy, elongace a následné terminace transkripce. Tento holoenzym má váhu zhruba 900 kDa (Grimm et al., 2019).

Transkripce raných genů, která byla zkoumána nejpodrobněji, vyžaduje heterodimerický *Vaccinia Early Transcription Factor* (VETF), který interaguje s oblastmi časných promotorů lokalizovanými na pozicích -12 až -29 nukleotidů *upstream* a +7 až +10 nukleotidů *downstream* od počátku transkripce (Barnes et al., 2015; Broyles et al., 1991). VETF zprostředkovává společně s Rap94 nasednutí vRNAP na promotor a přechod z iniciační do elongační fáze transkripce. Další virem kódované proteiny účastníci se virové transkripce genů rané třídy jsou VTF/CE, který se účastní syntézy 5' koncové 7-methylguanosinové čepičky a terminační faktor NPH-I, který společně s poly(A) polymerázou syntetizuje polyadenylované sekvence na 3' koncích mRNA (Grimm et al., 2019).



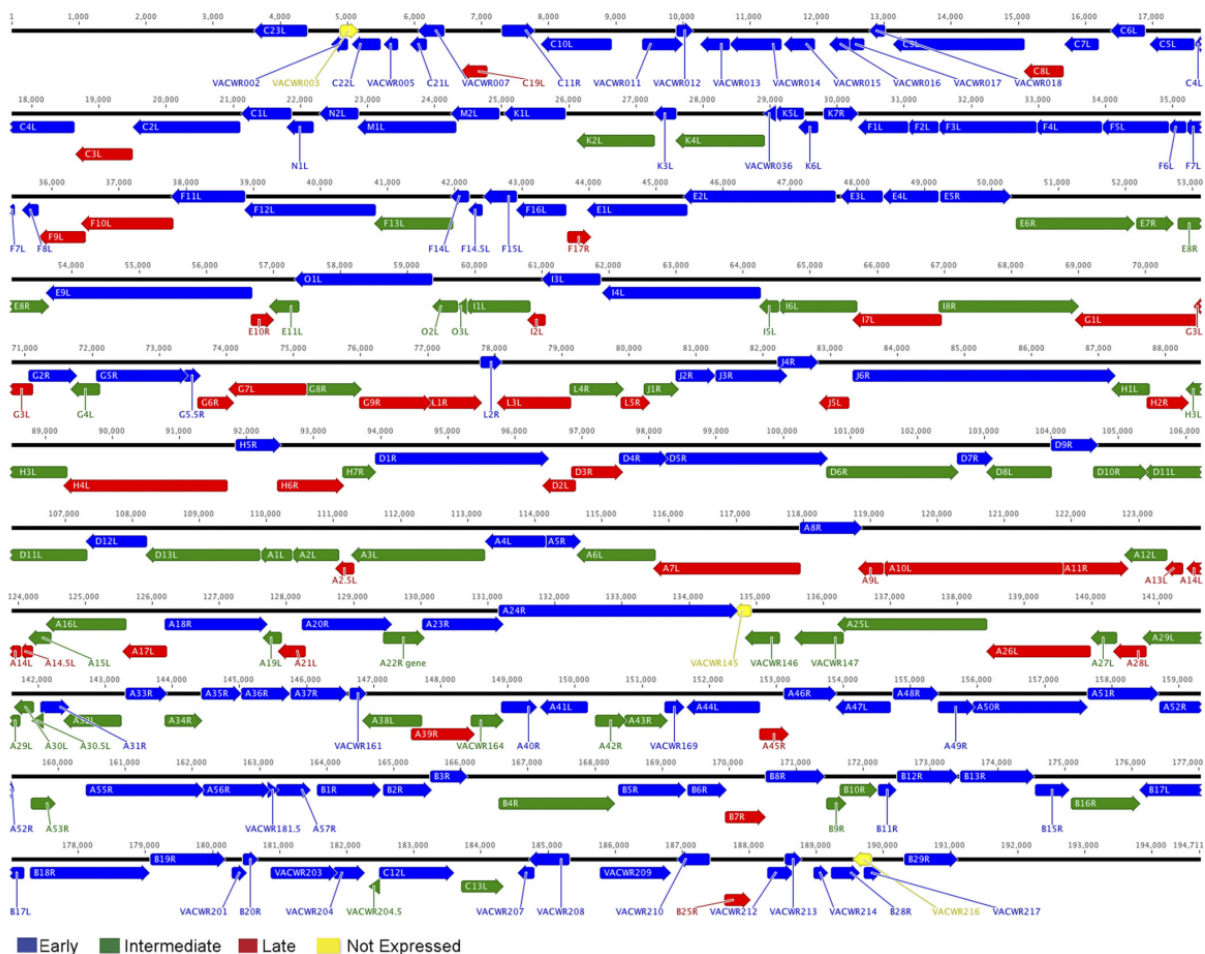
Obrázek 3 - Schéma holoenzymu virové RNA polymerázy viru vakcinie; A) schématické znázornění dalších transkripčních faktorů transkripce viru vakcinie, VTF/CE (*vaccinia terminator factor/capping enzyme*), VETF-I, E a NPH-I, které jsou obsaženy v holoenzymu vRNAP. Je zde také znázorněna podjednotka Rpo30 a transkripční faktor Rap94; B) Model kompletního vRNAP komplexu, získáno metodou CryoEM, barevné zobrazení v B je shodné s barevným zobrazením A samotný komplex vRNAP je barvený šedě (Grimm et al., 2019).

3.2. Expresní časové třídy genů viru vakcinie

Geny viru vakcinie se rozdělují do tří základních časových tříd (viz Kapitola 3 - Genová exprese poxvirů) (Obrázek 4). Brzy po infekci hostitelské buňky se aktivují geny rané třídy, ty kódují proteiny nezbytné pro expresi a replikaci virového genomu. Poxviry mají specifické transkripční faktory, které umožňují transkripci genů rané třídy, začátek této transkripce je zprostředkován transkripčním faktorem VETF (Broyles et al., 1991). Enzymy, které jsou potřebné pro transkripci genů rané třídy jsou součástí infekční partikule viru (Baldick et al., 1992b). Genů exprimujících se před replikací virové DNA bylo identifikováno 118. Genů, které se exprimují až po replikaci virové DNA bylo identifikováno 93, jedná se o geny střední a pozdní třídy (Yang et al., 2010).

Genů střední třídy se v genomu viru vakcinie nachází 53 a podílejí na interakci s nově syntetizovaným virovým genomem. Genů pozdní třídy má virus vakcinie 38,

kódují proteiny, které jsou klíčové pro tvorbu a zrání virionů, včetně těch, které umožňují vstup viru do hostitelských buněk (Yang et al., 2011).



Obrázek 4 – Mapa transkriptomu VACV. Otevřené čtecí rámce VACV WR jsou zobrazeny jako barevné šipky ukazující směr transkripce. Čísla od 1 do 194711 označují pozice nukleotidů v genomu VACV. Geny rané třídy jsou vyznačeny modrou barvou, geny střední třídy jsou vyznačeny barvou zelenou, geny pozdní třídy mají barvu červenou, žluté jsou vyznačeny neexprimované geny (Yang et al., 2011).

3.2.1. Transkripce genů rané třídy

Mezi geny rané třídy se řadí přibližně polovina genů VACV (Oda & Joklik, 1967) konkrétně jde o 118 genů. Enzymy a další proteiny, které jsou potřebné pro syntézu mRNA si virus přináší do hostitelské buňky společně s molekulami genomové DNA ve svém virionu. Mezi nimi jsou také enzymy nezbytné pro modifikaci mRNA molekul jako

je mRNA *capping* enzym (kódovaný geny D1R a D12L), poly(A) polymeráza (E1L, J3R) nebo 2'-O-methyltransferáza (J3R) (Broyles, 2003).

Iniciace syntézy genů rané třídy vyžaduje virovou RNA polymerázu a transkripční faktor VETF. Tento transkripční faktor je heterodimer virových proteinů kódovaných geny D6R a A8L, je to jediný známý poxvirový protein, který se váže na virové promotory genů rané třídy (Broyles et al., 1991; Gershon & Moss, 1990). Navázání VETF na promotor umožňuje nasednutí RNA polymerázy a zahájení transkripce. Pro iniciaci transkripce je potřeba energie ve formě ATP, jehož hydrolyza způsobuje disociaci VETF z promotoru. Po uvolnění VETF může RNA polymeráza začít transkribovat (Broyles, 1991).

K ukončení transkripce genů rané třídy je potřeba signální sekvence 5'-TTTTTNT-3' (N představuje libovolný nukleotid). Transkripce je ukončena přibližně 30-50 nukleotidů za touto signální sekvencí (Yuen & Moss, 1987). K ukončení transkripce jsou potřeba nejméně dva proteiny, těmi jsou *capping* enzym a NPH I. *Capping* enzym a NPH I jsou součástí holoenzymu RNA polymerázy. Po přepisu výše uvedené signální sekvence do mRNA dochází ke kontaktu této sekvence s *capping* enzymem a následné aktivaci NPH I a uvolnění transkriptu za spotřeby energie (Christen et al., 1998; Deng & Shuman, 1997).

3.2.2. Transkripce genů střední třídy

Typické promotory genů střední třídy obsahují dvě části, iniciátorovou sekvenci v místě startu transkripce a A-T bohatou *upstream* sekvenci (Baldick et al., 1992a). Geny střední třídy viru vakcinie můžeme rozdělit do dvou podskupin podle struktury jejich promotoru (Obrázek 5B/C). První podskupina obsahuje 21 genů střední třídy, jejich promotory obsahují sekvence typické pouze pro geny této třídy. Druhá podskupina obsahuje 31 genů střední třídy, jejich promotory obsahují elementy promotorů střední třídy, ale i elementy typické pro promotory genů třídy pozdní (Yang et al., 2011).

Promotory první podskupiny obsahují vždy sekvenci TAAA, některé promotory pak obsahují sekvenci TAAAT a pouze několik promotorů této podskupiny obsahuje sekvenci TAAATG. Promotory této podskupiny neobsahují konzervované thymidinové zbytky lokalizovány 10 nukleotidů před TAAAT sekvencí (pozice -10), ale obsahují AT

bohatou oblast na pozicích -15 až -19 od této sekvence (Obrázek 5B) (Yang et al., 2011).

Promotory druhé podskupiny obsahují prvky typické jak pro promotory střední třídy, tak prvky, které se objevují pouze u promotorů pozdní časové třídy. U promotorů této podskupiny se častěji objevuje thymidinový zbytek za sekvencí TAAA, také se zde objevuje thymidinový zbytek na pozici -10 od TAAAT sekvence (Obrázek 5C). Některé promotory genů střední třídy obsahují dinukleotid GG hned za TAAAT motivem. Například promotor genu střední třídy I1L se řadí do této druhé podskupiny. Tento promotor obsahuje znaky promotorů pozdní třídy, tedy sekvenci TAAATGG a thymidinový zbytek na -9 nebo -10 nukleotidu od TAAAT. Obsahuje ale také A-T bohatou oblast typickou pro promotory střední třídy. Sekvence TAAATGG představuje vazebné místo pro jaderný transkripční faktor YinYang1 (YY1), který je důležitý pro správnou iniciaci transkripce tohoto genu (Broyles et al., 1999; Yang et al., 2011).

Pro transkripci genů střední třídy je vždy vyžadována *de novo* syntéza virové RNA polymerázy. Geny všech podjednotek RNA polymerázy jsou pod kontrolou promotorů rané časové třídy (Wright & Corneios, 1995). Dalšími transkripčními faktory, které jsou potřebné pro transkripci genů střední třídy jsou VITF-1 (30 kDa podjednotka virové RNA polymerázy) (Rosales, Harris, et al., 1994), VITF-2 (který není kódován virovou DNA) (Rosales, Sutter, et al., 1994), VITF-3 (heterodimer virových genových produktů A8L a A23R) (Sanz & Moss, 1999), a opět také *capping* enzym (Broyles & Moss, 1987).

3.2.3. Transkripce genů pozdní třídy

Promotory genů pozdní časové třídy se skládají, stejně jako promotory genů střední třídy, ze dvou oblastí, iniciátorové a *upstream* A-T bohaté oblasti (Davison & Moss, 1989). V iniciátorové oblasti je sekvence TAAAT, která bývá následována guanosinovým zbytkem. Pro promotory pozdních genů je typický výskyt thymidinového zbytku na -10 pozici od TAAAT sekvence (Obrázek 5A) (Yang et al., 2011). Pro transkripci genů pozdní třídy je opět využívána nově syntetizovaná virová RNA polymeráza. Pro úplnou aktivitu promotorů pozdních genů jsou zapotřebí minimálně tři

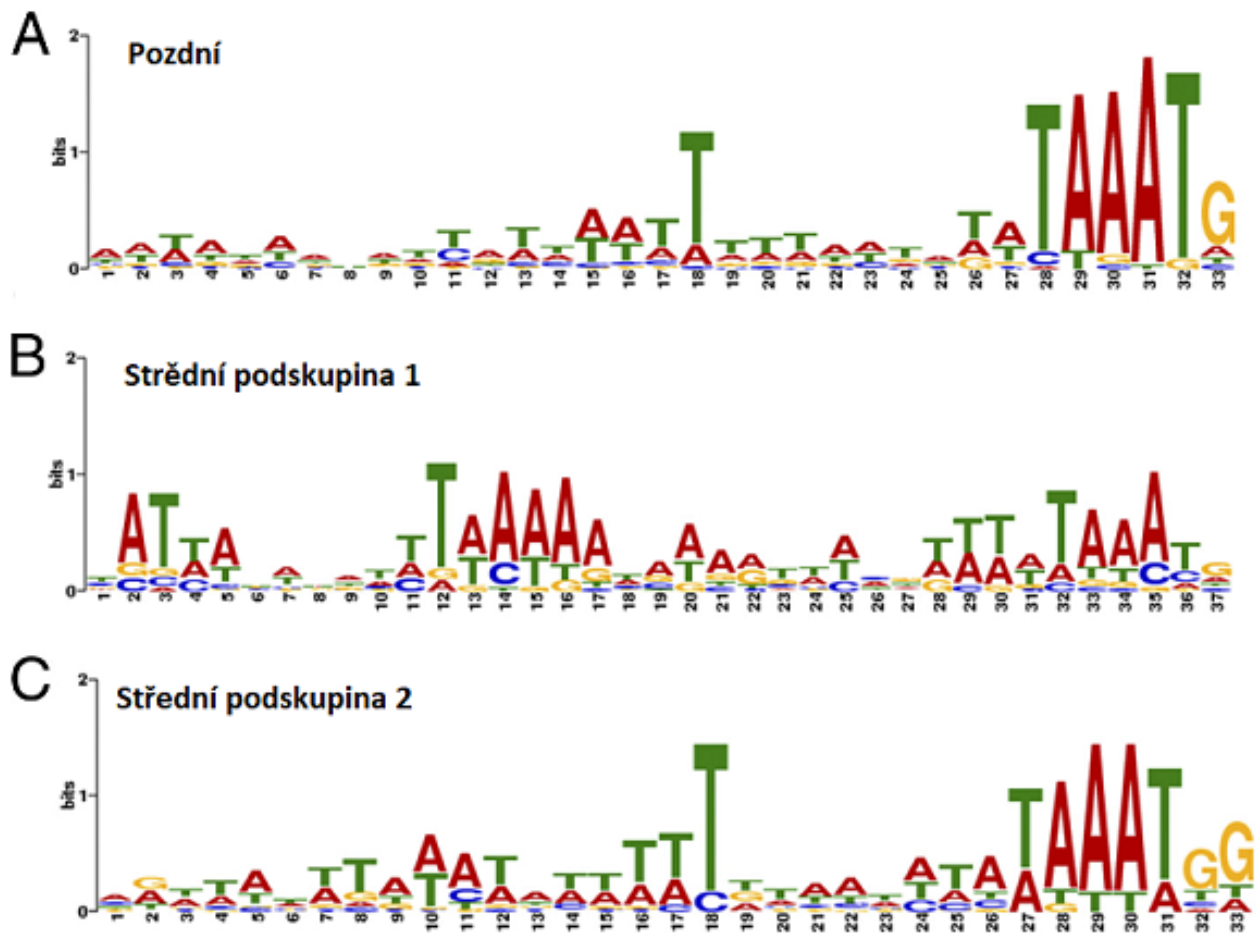
transkripční faktory kódované geny G8R, A1L a A2L. Všechny tyto transkripční faktory patří mezi geny střední časové třídy (McCraith et al., 2000).

Terminace transkripce genů střední a pozdní časové třídy není podrobněji popsána. Během této terminace virová RNA polymeráza nereaguje na specifické signály pro ukončení transkripce. Je známo, že jsou s terminací transkripce genů těchto časových tříd spojovány tři virové proteiny, tyto proteiny jsou kódovány geny A18R, G2R a J3R.

Gen A18R interaguje s RNA polymerázou a blokuje elongaci transkripce virové mRNA. Při mutaci genu A18R jsou transkripty genů střední časové třídy značně delší než transkripty genů střední třídy viru neobsahujícího mutaci v tomto genu. Toto zjištění nasvědčuje tomu, že protein kódovaný genem A18R podporuje uvolňování transkriptu od templátu (Xiang et al., 1998).

Protein kódovaný genem G2R funguje jako transkripční elongační faktor. Při mutaci v tomto genu jsou 3' poly(A) konce transkriptů střední a pozdní třídy jsou kratší než u WT (*wild type*) viru (Penelope & Condit, 1996). Bylo také zjištěno, že geny A18R a G2R jsou minimálně částečně zastupitelné, jelikož mutace genu G2R může působit jako extragenový supresor mutací v genu A18R (Condit et al., 1996).

Třetí protein ovlivňující terminaci transkripce je kódovaný genem J3R. Protein kódovaný genem J3R se váže na volný poly(A) konec pre-mRNA a tím podporuje syntézu dlouhých poly(A) řetězců. J3R působí také jako elongační faktor během transkripce genů střední a pozdní třídy. Při mutaci v genu J3R dochází k snížení hladiny syntézy velkých proteinů pozdní genové třídy, stejně tak jako ke zkracování 3' poly(A) konců genů střední a pozdní třídy. Mimo jeho působení během terminace transkripce středních a pozdních genů viru vakcinie působí produkt genu J3R také jako virová mRNA 2'-O-methyltransferáza, přenášející metylovou skupinu z S-adenosyl-L-methioninu na 2' uhlík ribózového zbytku v RNA molekule za vzniku struktury čepičky typu 1 (*cap 1*) (Gershon et al., 1991; Schnierle et al., 1992; Xiang et al., 2000).



Obrázek 5 - Motivy promotorů VACV. Tyto motivy byly vygenerovány programem MEME s použitím sekvencí o délce 50 nukleotidů *upstream* a 4 nukleotidy *downstream* od prvního kodonu (ATG); A) reprezentuje promotory pozdní třídy; B) reprezentuje střední promotory první podskupiny; C) reprezentuje střední promotory druhé podskupiny upraveno dle (Yang et al., 2011)

4. Posttranskripční úpravy mRNA

Bezprostředně po transkripci, či dokonce již v jejím průběhu dochází k posttranskripčním, či kotranskripčním úpravám mRNA.

mRNA je syntetizována jako pre-mRNA molekula, která následně prochází procesními kroky, což vede k vytvoření funkční mRNA. Virus vakcinie kóduje proteiny, které zajišťují tyto úpravy jako syntézu 7-methylguanosinové čepičky (*capping*), 2'-O-methylaci mRNA, hydrolýzu 7-methylguanosinové čepičky, polyadenylaci 3' konce mRNA a polyadenylaci 5' konce mRNA.

4.1. Syntéza 7-methylguanositinové čepičky na 5' konci mRNA

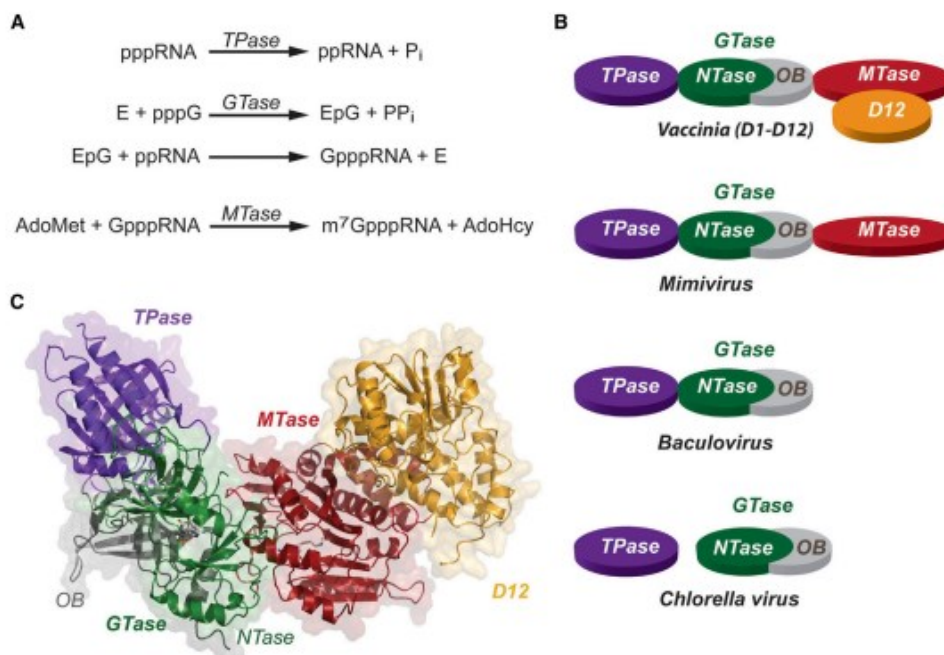
Syntéza 7-methylguanositinové čepičky je první kotranskripční modifikace 5' konce mRNA (Martin et al., 1975). Čepička na 5' konci je charakteristickým znakem pro eukaryotické a virové mRNA, v archeálních a bakteriálních transkriptech není tato čepička přítomna (Shuman, 2000). Koncový 7-methylguanositin a první ribonukleotid mRNA vlákna jsou spojeny svými 5' hydroxylovými skupinami pomocí trifosfátového můstku unikátní 5'-5' vazbou (Shatkin, 1976). Čepička je potřebná pro stabilitu vlákna mRNA a efektivní translaci. K její syntéze dochází kotranskripčně, jakmile vznikající vlákno mRNA dosáhne délky 27-31 nukleotidů (Hagler & Shuman, 1992). Syntéza 7-methylguanositinové čepičky na mRNA viru vakcinie probíhá za pomoci virových enzymů ve třech krocích (Obrázek 6A). Během první reakce je 5' trifosforylovaná pre-mRNA hydrolyzována na difosforylovanou pre-mRNA pomocí enzymatické aktivity RNA trifosfatázy (TPáza). Poté je k difosforylovanému konci pomocí enzymatické aktivity guanylyltransferázy (GTáza) připojen guanositinmonofosfát (GMP). K tomuto procesu dochází ve dvou krocích, v prvním kroku guanylyltransferáza reaguje s GTP a dochází k tvorbě meziprojektu GTáza-GMP a anorganického pyrofosfátu (PPi). V druhém kroku se vzniklý GMP přenáší z guanylyltransferázy na 5' difosforylovaný konec mRNA, čímž vzniká GpppRNA struktura na 5' konci mRNA. Třetí reakcí je GpppRNA přeměněn na 7-methylguanositin RNA (m⁷GpppRNA) za vzniku struktury čepičky typu 0 (*cap 0*) enzymem RNA (guanin-N7)-methyltransferáza (MTáza) (Martin & Moss, 1975; Shuman & Hurwitz, 1981). Donorem methylu pro třetí reakci je S-adenosyl-L-methionin (AdoMet) (Shuman & Moss, 1989). Odštěpením methylové skupiny z S-adenosyl-L-methioninu vzniká S-adenosyl-L-homocystein (AdoHcy).

4.1.1. Capping enzym viru vakcinie

Capping enzym VACV je heterodimer tvořen produktů genů D1R (o velikosti 844 AA) a D12L (287 AA). Tento enzym provádí všechny tři kroky syntézy 7-methylguanositinové čepičky (Obrázek 6A). Autonomní monomerní doména TPáza-GTáza se skládá z aminokyselin 1-545 polypeptidu D1R (Yu & Shuman, 1996). Podjednotka D12L se vyskytuje pouze u virů z čeledi *Poxviridae*, její homolog nebyl pozorován v žádném eukaryotickém organismu ani u žádného viru z jiné čeledi

(Schwer et al., 2006). GTázová doména se skládá ze dvou domén, N-koncové nukleotidyltransferázové domény (NTáza) a C-koncové oligonukleotid/oligosacharid vazebné domény (*OB fold*) (Shuman & Lima, 2004) (Obrázek 6B/C). MTázová doména je lokalizována na pozicích od 548 do 844 polypeptidu D1R a tvoří heterodimer s podjednotkou D12L, která stimuluje MTázovou aktivitu (Cong & Shuman, 1992; De La Pêa et al., 2007).

Capping enzym neslouží pouze k syntéze 7-methylguanosinové čepičky, také se účastní terminace transkripce genů rané třídy, proto bývá v literatuře označován také jako VTF/CE (*vaccinia termination factor/capping enzym*) (Luo et al., 1995). Obě podjednotky (D1R a D12L) tohoto enzymu interagují s virovou RNA polymerázou, převážně s podjednotkami Rpo147, Rpo132, Rpo35 a Rpo18 (Hillen et al., 2019).



Obrázek 6 – Struktura *capping* enzymu viru vakcinie; A – tři reakce vzniku struktury čepičky typu 0, katalyzované TPázou, GTázou a MTázou, P_i (fosfát), PP_i (pyrofosfát), AdoMet poskytuje methylovou skupinu za vzniku AdoHcy; B – schématický diagram ukazující uspořádání virových *capping* enzymů virů vakcinie, mimiviru, bakuloviru a chlorela viru. TPázová doména je vyznačena fialovou barvou, NTázová doména je vyznačena zeleně, OB doména má šedou barvu, MTázová doména je vyznačena červeně a podjednotka D12 je značena žlutou barvou; C – stužkový model *capping* enzymu viru vakcinie ukazující jednotlivé domény, jednotlivé domény jsou barevně značeny stejně jako na obrázku B (Kyrieleis et al., 2014).

4.2. 2'-O-Methylace mRNA

Virus vakcinie kóduje protein VP39 (J3R), který přenáší methylovou skupinu z S-adenosyl-L-methioninu na 2'-O pozici prvního nukleotidu za vzniku čepičky typu 1 m^7GpppN^m (*cap1*) (Schnierle et al., 1992). K 2'-O-methylaci dochází obvykle zejména u mRNA vyšších eukaryot, nicméně byla popsána také u poxvirů, coronavirů, flavivirů a viru HIV-1. U coronavirů je tato modifikace zprostředkována proteinem NSP16, u viru HIV-1 hostitelským proteinem FTSJ3 a u flavivirů proteinem NS5 (Decroly et al., 2008; Ray et al., 2006; Ringear et al., 2019).

Díky methylaci na 2'-O pozici se může virus vakcinie vyhnout imunitní odpovědi hostitele. Hostitelská buňka obsahuje proteiny IFIT (*interferon induced protein with tetratricopeptide repeats*), které rozpoznávají virové RNA molekuly a snižují míru jejich translace, čímž brání pomnožení viru v hostitelské buňce. Pokud virová mRNA má čepičku typu 1, tak je méně efektivně rozeznávána imunitním systémem hostitele (Daffis et al., 2010).

Protein VP39 (kódovaný genem J3R) je také součástí heterodimeru VP39/VP55, který slouží k polyadenylaci 3' konce mRNA vlákna (viz Kapitola 4.4.) (Schnierle et al., 1992).

4.3. Hydrolýza 7-methylguanositové čepičky

Hydrolýza 7-methylguanositové čepičky je klíčovým krokem patogeneze poxvirů. Umožňuje snižovat syntézu proteinů hostitelské buňky a omezovat hromadění virové dsRNA, která je spouštěčem antivirové odpovědi (Liu et al., 2015).

Poxviry využívají několik mechanismů ke snížení konkurence s hostitelskými mRNA a zároveň snižují syntézu faktorů pro imunitní odpověď hostitele. Jedním z těchto mechanismů je rychlý pokles syntézy proteinů hostitele, kterého je dosaženo degradací hostitelských mRNA. Podobně jako eukaryotické mRNA, obsahují i mRNA poxvirů 7-methylguanositovou čepičku na 5' konci a poly(A) sekvenci na 3' konci. Nicméně, transkripty poxvirů jsou modifikovány virovými enzymy v cytoplazmě hostitelské buňky, na rozdíl od hostitelských mRNA, u nichž syntéza 7-methylguanositové čepičky probíhá v jádře (Broyles & Moss, 1987).

Odstraněním 5' čepičky poskytnou D9R a D10R mRNA k degradaci 5'-3' exonukleáze Xrn1, která degraduje mRNA ve směru 5'-3' (Burgess & Mohr, 2015).

VACV kóduje dva enzymy pro hydrolýzu 7-methylguanositové čepičky, konkrétně se jedná o proteiny kódované geny D9R a D10R. Tyto enzymy (respektive jejich homology) jsou přítomny i u jiných virů podčeledi chordopoxvirů, přičemž homolog enzymu D10R je přítomen u všech zástupců této podčeledi. Bylo prokázáno, že enzymy D9R a D10R mají schopnost odstraňovat 7-methylguanositovou čepičku z 5' konce virových i hostitelských mRNA. D10Rp vykazuje vyšší afinitu k m⁷GpppG čepičkové struktuře, která se objevuje u hostitelských mRNA a mRNA genů rané třídy, než ke struktuře m⁷GpppA, kterou obsahují mRNA genů střední a pozdní třídy (Parrish et al., 2007; Parrish & Moss, 2006, 2007).

Bylo také ukázáno, že opakovaným pasážováním viru MVA (*modified vaccinia virus Ankara*) divokého typu (WT) či MVA s mutovaným genem D10R došlo k několika spontánním mutacím, ve výsledku vedoucím k mírnému nárůstu celkové virové mRNA u WT MVA viru. Mutace tohoto genu tedy pravděpodobně snižuje hydrolýzu 7-methylguanositové čepičky a tím zvyšuje stabilitu mRNA (Erez et al., 2021).

Enzymy, které hydrolyzují 7-methylguanositovou čepičku obsahují NUDIX hydrolázový motiv, který je klíčový pro rozštěpení fosfodiesterové vazby mezi 7-methylguanositem a mRNA řetězcem, což vede k uvolnění 5' monofosforylované RNA a 7-methylguanosit difosfátu (Bessman et al., 1996).

Enzym D9R účastní se odstraňování 7-methylguanositové čepičky se exprimuje brzy po vstupu viru do hostitelské buňky, zatímco D10R se exprimuje až po replikaci virové DNA (Yang et al., 2011). Pokud dojde k inaktivaci enzymu D9R, zvýší se efektivita translace mRNA molekul s poly(A) řetězcem na 5' konci mRNA (viz Kapitola 4.5 Polyadenylace 5' konce mRNA), zatímco pokud dojde k inaktivaci enzymu D10R, tak se aktivita translace sníží pro oba typy mRNA, jak ty s poly(A) řetězcem na 5' konci, tak ty bez poly(A) řetězce. Kombinace faktorů D9R a D10R dává translační výhodu molekulám mRNA s 5' koncovým poly(A) řetězcem, tím značně přispívá k translaci virových post-replikačních mRNA a tedy syntéze virových proteinů před buněčnými proteiny (Cantu et al., 2020).

4.4. Polyadenylace 3' konce mRNA

Polyadenylace je proces, během kterého je syntetizován poly(A) řetězec skládající se z adenosinových zbytků na 3' konci mRNA. Polyadenylace chrání mRNA před 3'-5' exoribonukleasami, napomáhá také k optimální translaci mRNA (Proudfoot, 2011). VACV kóduje heterodimerický poly(A) polymerázový komplex proteinů VP55/VP39. Protein VP55 (o velikosti 55 kDa) je kódován genem E1L, v buňce se vždy vyskytuje jako heterodimer společně s proteinem VP39. Protein VP39 (39 kDa) je kódován genem J3R a v buňce se vyskytuje jako součást heterodimeru VP55/VP39, ale také je v buňce přítomný i v monomerní formě (Gershon et al., 1991). Protein VP39 se také účastní syntézy čepičky typu 1, kdy přenáší methylovou skupinu z S-adenosyl-L-methioninu na 2'-O pozici prvního nukleotidu vlákna mRNA na 5' konci (viz kapitola 4.2.) (Schnierle et al., 1992). Protein VP55 je také schopen polyadenylovat hostitelské miRNA, což vede k jejich degradaci (Backes et al., 2012).

Během infekce VACV virová poly(A) polymeráza polyadenyluje také hostitelské molekuly RNA jako snRNA, tRNA, mRNA a také virové *small* mRNA, které jsou kódované v genomu VACV. Jejich účelem je vytvoření krátkých netranslatovaných polyadenylovaných sekvencí (POLADS) (Lu & Bablanian, 1996). Průměrná délka poly(A) u POLADS je více než 100 adenosinových zbytků, což je podobná délka jako délka 3' poly(A) u genů viru vakcinie. POLADS působí jako selektivní inhibitory translace hostitelské mRNA, translaci virové mRNA ovlivňují minimálně. POLADS mají v rané fázi infekce schopnost vázat protein PABP [*poly(A) binding protein*] a eIF-4A a tím způsobit jejich nedostatek. Jejich nedostatek vede k omezení translace hostitelských mRNA molekul (Su & Bablanian, 1990).

4.4.1. Poly(A) polymeráza viru vakcinie

Jak již bylo zmíněno Poly(A) polymeráza VACV je heterodimerický komplex proteinů VP55 a VP39. Tento heterodimer dokáže katalyzovat připojení několika stovek adenylátů na 3' konec vlákna virové mRNA. Bylo prokázáno, že po oddělení podjednotky VP55 od podjednotky VP39 zůstává polyadenylační aktivita zachována, nicméně délka poly(A) řetězce je značně kratší. Po opětovném přidání podjednotky

VP39 byla obnovena schopnost syntézy poly(A) řetězce běžné délky. Monomer VP55 virem kódované poly(A) polymerázy dokázal během experimentu přidat na 3' konec RNA primeru nanejvýš 35 adenylátů velmi rychlým způsobem, poté ale došlo k prudkému zpomalení a polyadenylace se stala neprocesivní. Naproti tomu heterodimer VP55/VP39 katalyzuje tvorbu poly(A) řetězce několik stovek nukleotidů dlouhého, VP39 tedy působí jako efektor polyadenylace, zvyšuje procesivitu polyadenylace tím, že pomalou, neprocesivní polyadenylaci, která probíhá po rychlém startu v přítomnosti monomeru VP55, přeměňuje na polyadenylaci rychlou (Gershon & Moss, 1993).

4.5. Polyadenylace 5' konce mRNA

Poly(A) řetězec na 5' konci mRNA je pozoruhodným rysem všech post-replikativních poxvirových mRNA, přičemž poskytuje těmto virovým mRNA translační výhodu oproti mRNA hostitelské buňky (Dhungel et al., 2017).

Během transkripce post-replikativních mRNA viru vakcinie může docházet ke klouzání virové RNA polymerázy. Polymeráza může sklouznout zpět o jeden nebo více nukleotidů na templátovém řetězci na sekvenci TAAAT (INR) (*Initiator Nucleotide Sequence*) (Obrázek 5), což má za následek přidání adenosinových zbytků na 5' konec vznikajícího vlákna mRNA (Deng & Shuman, 1997; Schwer & Stunnenberg, 1988).

Transkripty genů rané třídy nemají 5' poly(A) řetězec, zatímco všechny mRNA genů střední a pozdní třídy tuto sekvenci mají. U genů střední třídy je nejčastěji uváděna délka 8-9 adenosinových zbytků u genů pozdní třídy je to 11-12 adenosinových zbytků (Yang et al., 2012). Největší translační výhodu v buňkách infikovaných VACV mají transkripty s 5' poly(A) řetězcem, který má 12 adenosinových zbytků (Dhungel et al., 2017). Zdá se, že enzymy odstraňující 7-methylguanosinovou čepičku jsou důležité pro translaci virové mRNA během infekce viru vakcinie. Pokud jsou tyto enzymy aktivní, tak poly(A) řetězec na 5' konci mRNA umožňuje zvýšenou translaci. Zatímco mRNA s jinými sekvencemi na 5' konci nejsou jejich aktivitou výrazněji ovlivněny (Cantu et al., 2020).

5. Závěr

Viry z čeledi *Poxviridae* patří do skupiny velkých nukleocytoplazmatických virů, jsou odpovědné za mnoho lidských i živočišných onemocnění. Virus vakcinie je jedním z nejintenzivněji studovaných virů této čeledi a je považován za vzor transkripční regulace u všech poxvirů, právě proto jsem se v této práci zaměřila na transkripci a posttranskripční modifikace mRNA molekul tohoto viru.

Geny viru vakcinie jsou transkribovány pomocí kaskádového mechanismu, krátce po infekci buňky, ještě před replikací virové DNA, dochází k transkripci virových genů rané třídy. Proteiny kódované geny rané třídy se účastní dalších kroků kaskádového mechanismu transkripce. Po replikaci virové DNA dochází k transkripci genů střední a pozdní třídy, ty jsou nezbytné pro tvorbu nových virových částic.

Hlavním cílem této práce bylo rešeršní shrnutí poznatků o typech a mechanismech posttranskripčních modifikací mRNA molekul u virů čeledi *Poxviridae* se zaměřením na virus vakcinie. Mezi tyto postranskripční, respektive i kotranskripční, modifikace patří syntéza 7-methylguanosenové čepičky. 7-methylguanosenová čepička typu 0 je nezbytná pro stabilitu a efektivní translaci virových mRNA. Čepička je syntetizována heterodimerním *capping* enzymem, který interaguje s virovou RNA polymerázou. Podjednotka *capping* enzymu kódovaná genem D12L je unikátní pro viry čeledi *Poxviridae*, homolog této podjednotky nebyl nalezen v žádném eukaryotickém organismu nebo u jiné virové čeledi. Právě z tohoto důvodu by na podjednotku D12L virového *capping* enzymu mohl být směřován další výzkum antivirových účinkujících v léčbě virových infekcí způsobených viry z čeledi *Poxviridae*.

Čepička typu 0 může být dále modifikována na čepičku typu 1, kdy je methylová skupina z S-adenosyl-L-methioninu je za pomoci proteinu VP39 přenášena na 2'-O pozici prvního nukleotidu. Tato modifikace umožňuje virovým mRNA molekulám uniknout imunitnímu systému hostitele.

Polyadenylace na 3' konci chrání mRNA molekuly před 3'-5' exoribonukleázami, a napomáhá k optimálnímu překladu mRNA. Virus vakcinie kóduje komplex proteinů VP55 a VP39. Virová poly(A) polymeráza také polyadenyluje virové small mRNA za vzniku krátkých netranslatovaných polyadenylovaných sekvencí POLADS působících jako selektivní inhibitory translace hostitelské mRNA, translaci virové mRNA ale

ovlivňují pouze minimálně. Toto je další mechanismus, díky kterému dochází k úniku viru před imunitním systémem hostitelské buňky.

Díky hydrolýze 7-methylguanosenové čepičky dochází k úniku před imunitním systémem hostitele. Enzymy D9R a D10R viru vakcinie odstraňují 7-methylguanosenovou čepičku z vlákna mRNA. Brání hromadění virové dsRNA a tímto způsobem inhibují antivirovou odpověď buňky.

Poslední popsanou posttranskripční modifikací v této práci je polyadenylace 5' konce mRNA vlákna. Tato modifikace se objevuje na vláknech post-replikativních mRNA a poskytuje těmto vláknům překladovou výhodu oproti hostitelským mRNA vláknům.

6. Použitá literatura

*přehledový článek

- Assarsson, E., Greenbaum, J. A., Sundström, M., Schaffer, L., Hammond, J. A., Pasquetto, V., Oseroff, C., Hendrickson, R. C., Lefkowitz, E. J., Tschärke, D. C., Sidney, J., Grey, H. M., Head, S. R., Peters, B., & Sette, A. (2008). Kinetic analysis of a complete poxvirus transcriptome reveals an immediate-early class of genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *105*(6). <https://doi.org/10.1073/pnas.0711573105>
- Backes, S., Shapiro, J. S., Sabin, L. R., Pham, A. M., Reyes, I., Moss, B., Cherry, S., & Tenover, B. R. (2012). Degradation of host MicroRNAs by poxvirus poly(A) polymerase reveals terminal RNA methylation as a protective antiviral mechanism. *Cell Host and Microbe*, *12*(2). <https://doi.org/10.1016/j.chom.2012.05.019>
- Baldick, C. J., Keck, J. G., & Moss, B. (1992a). Mutational analysis of the core, spacer, and initiator regions of vaccinia virus intermediate-class promoters. *Journal of Virology*, *66*(8). <https://doi.org/10.1128/jvi.66.8.4710-4719.1992>
- Baldick, C. J., Keck, J. G., & Moss, B. (1992b). Mutational analysis of the core, spacer, and initiator regions of vaccinia virus intermediate-class promoters. *Journal of Virology*, *66*(8), 4710–4719. <https://doi.org/10.1128/jvi.66.8.4710-4719.1992>
- Barnes, C. O., Calero, M., Malik, I., Graham, B. W., Spahr, H., Lin, G., Cohen, A. E., Brown, I. S., Zhang, Q., Pullara, F., Trakselis, M. A., Kaplan, C. D., & Calero, G. (2015). Crystal Structure of a Transcribing RNA Polymerase II Complex Reveals a Complete Transcription Bubble. *Molecular Cell*, *59*(2). <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.06.034>
- Bednář, Marek et al. 1996. Lékařská mikrobiologie: bakteriologie, virologie, parazitologie. Praha: Marvil. ISBN 80-238-0297-6.
- Bessman, M. J., Frick, D. N., & O’Handley, S. F. (1996). The MutT proteins or “Nudix” hydrolases, a family of versatile, widely distributed, “housecleaning” enzymes. In

Journal of Biological Chemistry (Vol. 271, Issue 41).
<https://doi.org/10.1074/jbc.271.41.25059>

Broyles, S. S. (1991). A role for ATP hydrolysis in vaccinia virus early gene transcription. Dissociation of the early transcription factor-promoter complex. *Journal of Biological Chemistry*, 266(23). [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(18\)98651-5](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)98651-5)

*Broyles, S. S. (2003). Vaccinia virus transcription. *Journal of General Virology*, 84(9), 2293–2303. <https://doi.org/10.1099/vir.0.18942-0>

Broyles, S. S., Li, J., & Moss, B. (1991). Promoter DNA contacts made by the vaccinia virus early transcription factor. *Journal of Biological Chemistry*, 266(23). [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(18\)98650-3](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)98650-3)

Broyles, S. S., Liu, X., Zhu, M., & Kremer, M. (1999). Transcription factor YY1 is a vaccinia virus late promoter activator. *Journal of Biological Chemistry*, 274(50). <https://doi.org/10.1074/jbc.274.50.35662>

Broyles, S. S., & Moss, B. (1987). Sedimentation of an RNA polymerase complex from vaccinia virus that specifically initiates and terminates transcription. *Molecular and Cellular Biology*, 7(1). <https://doi.org/10.1128/mcb.7.1.7-14.1987>

Burgess, H. M., & Mohr, I. (2015). Cellular 5'-3' mRNA exonuclease Xrn1 controls double-stranded RNA accumulation and anti-viral responses. *Cell Host and Microbe*, 17(3). <https://doi.org/10.1016/j.chom.2015.02.003>

Cantu, F., Cao, S., Hernandez, C., Dhungel, P., Spradlin, J., & Yang, Z. (2020). Poxvirus-encoded decapping enzymes promote selective translation of viral mRNAs. *PLoS Pathogens*, 16(10). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008926>

Chen, Z., Zhang, L., Qin, C., Ba, L., Yi, C. E., Zhang, F., Wei, Q., He, T., Yu, W., Yu, J., Gao, H., Tu, X., Gettie, A., Farzan, M., Yuen, K., & Ho, D. D. (2005). Recombinant Modified Vaccinia Virus Ankara Expressing the Spike Glycoprotein of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Induces Protective Neutralizing Antibodies Primarily Targeting the Receptor Binding Region. *Journal of Virology*, 79(5). <https://doi.org/10.1128/jvi.79.5.2678-2688.2005>

- Christen, L. M., Sanders, M., Wiler, C., & Niles, E. G. (1998). Vaccinia virus nucleoside triphosphate phosphohydrolase I is an essential viral early gene transcription termination factor. *Virology*, *245*(2). <https://doi.org/10.1006/viro.1998.9177>
- Condit, R. C., Xiang, Y., & Lewis, J. I. (1996). Mutation of vaccinia virus gene G2R causes suppression of gene A18R ts mutants: Implications for control of transcription. *Virology*, *220*(1). <https://doi.org/10.1006/viro.1996.0280>
- Cong, P., & Shuman, S. (1992). Methyltransferase and subunit association domains of vaccinia virus mRNA capping enzyme. *Journal of Biological Chemistry*, *267*(23). [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(18\)42020-0](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)42020-0)
- Daffis, S., Szretter, K. J., Schriewer, J., Li, J., Youn, S., Errett, J., Lin, T. Y., Schnell, S., Zust, R., Dong, H., Thiel, V., Sen, G. C., Fensterl, V., Klimstra, W. B., Pierson, T. C., Buller, R. M., Gale Jr, M., Shi, P. Y., & Diamond, M. S. (2010). 2'-O methylation of the viral mRNA cap evades host restriction by IFIT family members. *Nature*, *468*(7322). <https://doi.org/10.1038/nature09489>
- Davison, A. J., & Moss, B. (1989). Structure of vaccinia virus late promoters. *Journal of Molecular Biology*, *210*(4). [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(89\)90108-3](https://doi.org/10.1016/0022-2836(89)90108-3)
- De La P ea, M., Kyrieleis, O. J. P., & Cusack, S. (2007). Structural insights into the mechanism and evolution of the vaccinia virus mRNA cap N7 methyl-transferase. *EMBO Journal*, *26*(23). <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601912>
- Decroly, E., Imbert, I., Coutard, B., Bouvet, M., Selisko, B., Alvarez, K., Gorbalenya, A. E., Snijder, E. J., & Canard, B. (2008). Coronavirus Nonstructural Protein 16 Is a Cap-0 Binding Enzyme Possessing (Nucleoside-2' O)-Methyltransferase Activity . *Journal of Virology*, *82*(16). <https://doi.org/10.1128/jvi.00407-08>
- Deng, L., & Shuman, S. (1997). Elongation properties of vaccinia virus RNA polymerase: Pausing, slippage, 3' end addition, and termination site choice. *Biochemistry*, *36*(50), 15892–15899. <https://doi.org/10.1021/bi972037a>
- Dhungel, P., Cao, S., & Yang, Z. (2017). The 5'-poly(A) leader of poxvirus mRNA confers a translational advantage that can be achieved in cells with impaired cap-dependent translation. *PLoS Pathogens*, *13*(8). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006602>

- Erez, N., Wyatt, L. S., Americo, J. L., Xiao, W., & Moss, B. (2021). Spontaneous and Targeted Mutations in the Decapping Enzyme Enhance Replication of Modified Vaccinia Virus Ankara (MVA) in Monkey Cells. *Journal of Virology*, 95(19). <https://doi.org/10.1128/jvi.01104-21>
- Garcés, J., Masternak, K., Kunz, B., & Wittek, R. (1993). Reactivation of transcription from a vaccinia virus early promoter late in infection. *Journal of Virology*, 67(9). <https://doi.org/10.1128/jvi.67.9.5394-5401.1993>
- Gershon, P. D., Ahn, B.-Y., Garfield, M., & Moss, B. (1991). Poly(A) Polymerase and a Dissociable Polyadenylation Stimulatory Factor Encoded by Vaccinia Virus. In *Cell* (Vol. 66).
- Gershon, P. D., & Moss, B. (1990). Early transcription factor subunits are encoded by vaccinia virus late genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87(11). <https://doi.org/10.1073/pnas.87.11.4401>
- Gershon, P. D., & Moss, B. (1993). Stimulation of poly(A) tail elongation by the VP39 subunit of the vaccinia virus-encoded poly(A) polymerase. *Journal of Biological Chemistry*, 268(3). [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(18\)53982-x](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)53982-x)
- Goebel, S. J., Johnson, G. P., Perkus, M. E., Davis, S. W., Winslow, J. P., & Paoletti, E. (1990). The complete DNA sequence of vaccinia virus. *Virology*, 179(1), 247–266. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(90\)90294-2](https://doi.org/10.1016/0042-6822(90)90294-2)
- Grimm, C., Hillen, H. S., Bedenk, K., Bartuli, J., Neyer, S., Zhang, Q., Hüttenhofer, A., Erlacher, M., Dienemann, C., Schlosser, A., Urlaub, H., Böttcher, B., Szalay, A. A., Cramer, P., & Fischer, U. (2019). Structural Basis of Poxvirus Transcription: Vaccinia RNA Polymerase Complexes. *Cell*, 179(7), 1537-1550.e19. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.11.024>
- *Guo, Z. S., Lu, B., Guo, Z., Giehl, E., Feist, M., Dai, E., Liu, W., Storkus, W. J., He, Y., Liu, Z., & Bartlett, D. L. (2019). Vaccinia virus-mediated cancer immunotherapy: Cancer vaccines and oncolytics. In *Journal for ImmunoTherapy of Cancer* (Vol. 7, Issue 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s40425-018-0495-7>

- Hagler, J., & Shuman, S. (1992). A freeze-frame view of eukaryotic transcription during elongation and capping of nascent mRNA. *Science*, 255(5047). <https://doi.org/10.1126/science.1546295>
- Harrison, S. C., Alberts, B., Ehrenfeld, E., Enquist, L., Fineberg, H., McKnight, S. L., Moss, B., O'Donnell, M., Ploegh, H., Schmid, S. L., Walter, K. P., & Theriot, J. (2004). Discovery of antivirals against smallpox. In *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (Vol. 101, Issue 31). <https://doi.org/10.1073/pnas.0403600101>
- Hillen, H. S., Bartuli, J., Grimm, C., Dienemann, C., Bedenk, K., Szalay, A. A., Fischer, U., & Cramer, P. (2019). Structural Basis of Poxvirus Transcription: Transcribing and Capping Vaccinia Complexes. *Cell*, 179(7). <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.11.023>
- Iyer, L. M., Aravind, L., & Koonin, E. V. (2001). Common Origin of Four Diverse Families of Large Eukaryotic DNA Viruses. *Journal of Virology*, 75(23). <https://doi.org/10.1128/jvi.75.23.11720-11734.2001>
- Kieny, M. P., Lathe, R., Drillien, R., Spehner, D., Skory, S., Schmitt, D., Wiktor, T., Koprowski, H., & Lecocq, J. P. (1984). Expression of rabies virus glycoprotein from a recombinant vaccinia virus. *Nature*, 312(5990). <https://doi.org/10.1038/312163a0>
- Knutson, B. A., & Broyles, S. S. (2008). Expansion of poxvirus RNA polymerase subunits sharing homology with corresponding subunits of RNA polymerase II. *Virus Genes*, 36(2). <https://doi.org/10.1007/s11262-008-0207-3>
- Koonin, E. V., & Yutin, N. (2010). Origin and evolution of eukaryotic large nucleocytoplasmic DNA viruses. In *Intervirology* (Vol. 53, Issue 5). <https://doi.org/10.1159/000312913>
- Koonin, E. V., & Yutin, N. (2019). Evolution of the Large Nucleocytoplasmic DNA Viruses of Eukaryotes and Convergent Origins of Viral Gigantism. In *Advances in Virus Research* (Vol. 103, pp. 167–202). Academic Press Inc. <https://doi.org/10.1016/bs.aivir.2018.09.002>

- Kyrieleis, O. J. P., Chang, J., De La Peña, M., Shuman, S., & Cusack, S. (2014). Crystal structure of vaccinia virus mRNA capping enzyme provides insights into the mechanism and evolution of the capping apparatus. *Structure*, 22(3), 452–465. <https://doi.org/10.1016/j.str.2013.12.014>
- Lee-Chen, G. J., Bourgeois, N., Davidson, K., Condit, R. C., & Niles, E. G. (1988). Structure of the transcription initiation and termination sequences of seven early genes in the vaccinia virus HindIII D fragment. *Virology*, 163(1), 64–79. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(88\)90234-6](https://doi.org/10.1016/0042-6822(88)90234-6)
- Liu, S. W., Katsafanas, G. C., Liu, R., Wyatt, L. S., & Moss, B. (2015). Poxvirus decapping enzymes enhance virulence by preventing the accumulation of dsRNA and the induction of innate antiviral responses. *Cell Host and Microbe*, 17(3). <https://doi.org/10.1016/j.chom.2015.02.002>
- Lu, C., & Bablanian, R. (1996). Characterization of small nontranslated polyadenylated RNAs in vaccinia virus-infected cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(5). <https://doi.org/10.1073/pnas.93.5.2037>
- Luo, Y., Mao, X., Deng, L., Cong, P., & Shuman, S. (1995). The D1 and D12 subunits are both essential for the transcription termination factor activity of vaccinia virus capping enzyme. *Journal of Virology*, 69(6). <https://doi.org/10.1128/jvi.69.6.3852-3856.1995>
- Martin, S. A., & Moss, B. (1975). Modification of RNA by mRNA guanylyltransferase and mRNA (guanine 7) methyltransferase from vaccinia virions. *Journal of Biological Chemistry*, 250(24). [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(19\)40647-9](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(19)40647-9)
- Martin, S. A., Paoletti, E., & Moss, B. (1975). Purification of mRNA guanylyltransferase and mRNA(guanine 7) methyltransferase from vaccinia virions. *Journal of Biological Chemistry*, 250(24). [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(19\)40646-7](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(19)40646-7)
- McCraith, S., Holtzman, T., Moss, B., & Fields, S. (2000). Genome-wide analysis of vaccinia virus protein-protein interactions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(9). <https://doi.org/10.1073/pnas.080078197>

- *Moss, B. (2013). Poxvirus DNA replication. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 5(9). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a010199>
- *Moss, B., Ahn, B. Y., Amegadzie, B., Gershon, P. D., & Keck, J. G. (1991). Cytoplasmic transcription system encoded by vaccinia virus. In *Journal of Biological Chemistry* (Vol. 266, Issue 3). [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(18\)52298-5](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)52298-5)
- Oda, K. I., & Joklik, W. K. (1967). Hybridization and sedimentation studies on “early” and “late” vaccinia messenger RNA. *Journal of Molecular Biology*, 27(3). [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(67\)90047-2](https://doi.org/10.1016/0022-2836(67)90047-2)
- Parrish, S., & Moss, B. (2006). Characterization of a Vaccinia Virus Mutant with a Deletion of the D10R Gene Encoding a Putative Negative Regulator of Gene Expression. *Journal of Virology*, 80(2). <https://doi.org/10.1128/jvi.80.2.553-561.2006>
- Parrish, S., & Moss, B. (2007). Characterization of a Second Vaccinia Virus mRNA-Decapping Enzyme Conserved in Poxviruses. *Journal of Virology*, 81(23). <https://doi.org/10.1128/jvi.01668-07>
- Parrish, S., Resch, W., & Moss, B. (2007). Vaccinia virus D10 protein has mRNA decapping activity, providing a mechanism for control of host and viral gene expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(7). <https://doi.org/10.1073/pnas.0611685104>
- Penelope, E., & Condit, R. C. (1996). Phenotypic Characterization of Mutants in Vaccinia Virus Gene G2R, a Putative Transcription Elongation Factor. In *JOURNAL OF VIROLOGY* (Vol. 70, Issue 1). <https://journals.asm.org/journal/jvi>
- Pérez, P., Q. Marín, M., Lázaro-Frías, A., Jiménez de Oya, N., Blázquez, A. B., Escribano-Romero, E., Carlos, C. Ó., Ortego, J., Saiz, J. C., Esteban, M., Martín-Acebes, M. A., & García-Arriaza, J. (2018). A Vaccine Based on a Modified Vaccinia Virus Ankara Vector Expressing Zika Virus Structural Proteins Controls Zika Virus Replication in Mice. *Scientific Reports*, 8(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-35724-6>

- Prideaux, C. T., Kumar, S., & Boyle, D. B. (1990). Comparative analysis of vaccinia virus promoter activity in fowlpox and vaccinia virus recombinants. *Virus Research*, 16(1). [https://doi.org/10.1016/0168-1702\(90\)90042-A](https://doi.org/10.1016/0168-1702(90)90042-A)
- Proudfoot, N. J. (2011). Ending the message: Poly(A) signals then and now. In *Genes and Development* (Vol. 25, Issue 17). <https://doi.org/10.1101/gad.17268411>
- Ray, D., Shah, A., Tilgner, M., Guo, Y., Zhao, Y., Dong, H., Deas, T. S., Zhou, Y., Li, H., & Shi, P.-Y. (2006). West Nile Virus 5'-Cap Structure Is Formed by Sequential Guanine N-7 and Ribose 2'-O Methylations by Nonstructural Protein 5. *Journal of Virology*, 80(17). <https://doi.org/10.1128/jvi.00814-06>
- Ringiard, M., Marchand, V., Decroly, E., Motorin, Y., & Bennasser, Y. (2019). FTSJ3 is an RNA 2'-O-methyltransferase recruited by HIV to avoid innate immune sensing. *Nature*, 565(7740). <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0841-4>
- Rosales, R., Harris, N., Ahn, B. Y., & Moss, B. (1994). Purification and identification of a vaccinia virus-encoded intermediate stage promoter-specific transcription factor that has homology to eukaryotic transcription factor SII (TFIIS) and an additional role as a viral RNA polymerase subunit. *Journal of Biological Chemistry*, 269(19). [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(17\)36783-2](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(17)36783-2)
- Rosales, R., Sutter, G., & Moss, B. (1994). A cellular factor is required for transcription of vaccinia viral intermediate-stage genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(9). <https://doi.org/10.1073/pnas.91.9.3794>
- Sanz, P., & Moss, B. (1999). Identification of a transcription factor, encoded by two vaccinia virus early genes, that regulates the intermediate stage of viral gene expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(6). <https://doi.org/10.1073/pnas.96.6.2692>
- Schnierle, B. S., Gershon, P. D., & Moss, B. (1992). *Cap-specific mRNA (nucleoside-02-)-methyltransferase and poly(A) polymerase stimulatory activities of vaccinia virus are mediated by a single protein (mRNA processing/methylation/polyadenylation/poxvirus)* (Vol. 89). <https://www.pnas.org>

- Schwer, B., Hausmann, S., Schneider, S., & Shuman, S. (2006). Poxvirus mRNA cap methyltransferase: Bypass of the requirement for the stimulatory subunit by mutations in the catalytic subunit and evidence for intersubunit allostery. *Journal of Biological Chemistry*, 281(28). <https://doi.org/10.1074/jbc.M602867200>
- Schwer, B., & Stunnenberg, H. G. (1988). Vaccinia virus late transcripts generated in vitro have a poly(A) head. *The EMBO Journal*, 7(4). <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1988.tb02929.x>
- *Shatkin, A. J. (1976). Capping of eucaryotic mRNAs. In *Cell* (Vol. 9, Issue 4 PART 2, pp. 645–653). [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(76\)90128-8](https://doi.org/10.1016/0092-8674(76)90128-8)
- Shuman, S. (2000). Structure, mechanism, and evolution of the mRNA capping apparatus. In *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology* (Vol. 66, pp. 1–40). Academic Press Inc. [https://doi.org/10.1016/s0079-6603\(00\)66025-7](https://doi.org/10.1016/s0079-6603(00)66025-7)
- Shuman, S., & Hurwitz, J. (1981). Mechanism of mRNA capping by vaccinia virus guanylyltransferase: Characterization of an enzyme-guanylate intermediate. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 78(1 II). <https://doi.org/10.1073/pnas.78.1.187>
- *Shuman, S., & Lima, C. D. (2004). The polynucleotide ligase and RNA capping enzyme superfamily of covalent nucleotidyltransferases. In *Current Opinion in Structural Biology* (Vol. 14, Issue 6, pp. 757–764). <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2004.10.006>
- Shuman, S., & Moss, B. (1989). Bromouridine triphosphate inhibits transcription termination and mRNA release by vaccinia virions. *Journal of Biological Chemistry*, 264(35). [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(19\)30087-0](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(19)30087-0)
- *Smith, G. L., & McFadden, G. (2002). Smallpox: Anything to declare? In *Nature Reviews Immunology* (Vol. 2, Issue 7). <https://doi.org/10.1038/nri845>
- Strassburg, M. A. (1982). The global eradication of smallpox. *AJIC: American Journal of Infection Control*, 10(2). [https://doi.org/10.1016/0196-6553\(82\)90003-7](https://doi.org/10.1016/0196-6553(82)90003-7)
- Su, M. J., & Bablanian, R. (1990). Polyadenylated RNA sequences from vaccinia virus-infected cells selectively inhibit translation in a cell-free system: Structural

- properties and mechanism of inhibition. *Virology*, 179(2).
[https://doi.org/10.1016/0042-6822\(90\)90135-E](https://doi.org/10.1016/0042-6822(90)90135-E)
- Upton, C., Slack, S., Hunter, A. L., Ehlers, A., & Roper, R. L. (2003). Poxvirus Orthologous Clusters: toward Defining the Minimum Essential Poxvirus Genome. *Journal of Virology*, 77(13). <https://doi.org/10.1128/jvi.77.13.7590-7600.2003>
- Vos, J. C., & Stunnenberg, H. G. (1988). Derepression of a novel class of vaccinia virus genes upon DNA replication. *The EMBO Journal*, 7(11).
<https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1988.tb03224.x>
- Wright, C. F., & Corneios, A. M. (1995). The H4 subunit of vaccinia virus RNA polymerase is not required for transcription initiation at a viral late promoter. *Journal of Virology*, 69(4), 2602–2604. <https://doi.org/10.1128/jvi.69.4.2602-2604.1995>
- Xiang, Y., Latner, D. R., Niles, E. G., & Condit, R. C. (2000). Transcription elongation activity of the vaccinia virus J3 protein in vivo is independent of poly(A) polymerase stimulation. *Virology*, 269(2). <https://doi.org/10.1006/viro.2000.0242>
- Xiang, Y., Simpson, D. A., Spiegel, J., Zhou, A., Silverman, R. H., & Condit, R. C. (1998). The Vaccinia Virus A18R DNA Helicase Is a Postreplicative Negative Transcription Elongation Factor. *Journal of Virology*, 72(9).
<https://doi.org/10.1128/jvi.72.9.7012-7023.1998>
- Yang, Z., Bruno, D. P., Martens, C. A., Porcella, S. F., & Moss, B. (2010). Simultaneous high-resolution analysis of vaccinia virus and host cell transcriptomes by deep RNA sequencing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(25). <https://doi.org/10.1073/pnas.1006594107>
- Yang, Z., Martens, C. A., Bruno, D. P., Porcella, S. F., & Moss, B. (2012). Pervasive initiation and 3'-end formation of poxvirus postreplicative RNAs. *Journal of Biological Chemistry*, 287(37). <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.390054>
- Yang, Z., Reynolds, S. E., Martens, C. A., Bruno, D. P., Porcella, S. F., & Moss, B. (2011). Expression Profiling of the Intermediate and Late Stages of Poxvirus Replication. *Journal of Virology*, 85(19). <https://doi.org/10.1128/jvi.05446-11>

- Yu, L., & Shuman, S. (1996). Mutational analysis of the RNA triphosphatase component of vaccinia virus mRNA capping enzyme. *Journal of Virology*, 70(9). <https://doi.org/10.1128/jvi.70.9.6162-6168.1996>
- Yuen, L., & Moss, B. (1987). Oligonucleotide sequence signaling transcriptional termination of vaccinia virus early genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 84(18). <https://doi.org/10.1073/pnas.84.18.6417>
- Yutin, N., Wolf, Y. I., Raoult, D., & Koonin, E. V. (2009). Eukaryotic large nucleocytoplasmic DNA viruses: Clusters of orthologous genes and reconstruction of viral genome evolution. *Virology Journal*, 6. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-6-223>