

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

BIOLOGIE



Krupicová Daniela

**Virové a buněčné
RNA dependentní RNA polymerázy**

(Viral and cellular RNA dependent RNA polymerases)

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Školitel: RNDr. Hana Španielová, Ph.D.

2011

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci na téma „Virové a buněčné RNA dependentní RNA polymerázy“ zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechnu použitou literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 6.5.2011

Podpis

Tímto bych chtěla poděkovat vedoucí mé bakalářské práce
RNDr. Haně Španielové, Ph.D. za připomínky a rady při zpracování této práce.

Obsah

Seznam použitých zkratek	4
Abstrakt	5
Úvod	6
1. Virové RdRp	7
1.1. Struktura	8
1.1.1. Palm subdoména.....	8
1.1.2. Thumb subdoména	10
1.1.3. Fingers subdoména.....	10
1.2. Interakce enzymu s jednotlivými komponenty reakce	11
1.2.1. Kationty kovu	11
1.2.2. NTP	11
1.2.3. RNA.....	11
1.3. Iniciační reakce	12
1.3.1. Primer-independentní iniciační.....	12
1.3.2. Primer-dependentní iniciační.....	13
1.4. Vlastní průběh enzymatické reakce.....	13
2. Buněčné RDR	16
2.1. Struktura	16
2.1.1. DPBB subdoména	17
2.1.2. Krystalická struktura QDE-1.....	18
2.2. RDR mnohobuněčných organismů	20
2.2.1. RDR rostlin.....	20
2.2.2. RDR hub.....	22
2.2.3. RDR živočichů	22
3. Fylogenetické vztahy	24
4. Závěr	25
5. Přílohy	26
6. Seznam použité literatury.....	29

Seznam použitých zkratk

(-)ssRNA viry	viry s genomem ve formě negativní jednovláknové RNA
(+)ssRNA viry	viry s genomem ve formě pozitivní jednovláknové RNA
Φ6	bakteriofág Φ6
AK	aminokyselina
BVDV	virus bovinní virové diarrhoea (Bovine viral diarrhoea virus)
CVB	Chrysanthemum virus B
ddNTP	dideoxynukleotidtrifosfát
dNTP	deoxynukleotidtrifosfát
dsRNA viry	viry s genomem ve formě dvouvláknové RNA
DdDp	DNA dependentní DNA polymerázy
DdRp	DNA dependentní RNA polymerázy
DPBB subdoména	double-psi-β-barrel subdoména
DV	Dengue virus
FMDV	virus slintavky a kulhavky (Foot-and-mouth- disease virus)
HCV	virus hepatitidy C
HRV	rhinovirus (Human Rhinovirus)
IBDV	virus infekční burzitidy drůbeže (Infectious bursal disease virus)
IPNV	virus nekrózy pankreatu (Infectious pancreatic necrosis virus)
mRNA	messenger RNA
MSUD	meiotické utišení nepárové DNA (meiotic silencing by unpaired DNA)
NTP	nukleotidtrifosfát
NTPi	iniciační nukleotidtrifosfát
NV	Norwalk virus
PP _i	pyrofosfát
PTGS	posttranskripčním umlčování genů (posttranscriptional gene silencing)
PV	poliovirus
RdDp	RNA dependentní DNA polymerázy
RDR	buněčné RNA dependentní RNA polymerázy
RdRp	virové RNA dependentní RNA polymerázy
RHDV	virus moru králíků (Rabbit haemorrhagic disease virus)
RT	reverzní transkriptázy
siRNA	malé interferující RNA (small interfering RNA)
SV	Sapporo virus
ta-siRNA	trans-acting small interfering RNA
T ₊₁ báze	templátový nukleotid
WNV	virus západonilské horečky (West Nile virus)
3D ^{pol}	RdRp polioviru

Abstrakt

RNA dependentní RNA polymerázy syntetizují RNA vlákno podle RNA předlohy. Lze je rozdělit na dvě velké vzájemně nepříbuzné skupiny - polymerázy virové (RdRp) a buněčné (RDR). Virové RdRp hrají zásadní roli v životním cyklu RNA virů, neboť zajišťují replikaci a transkripci jejich genomu. Strukturou, která připomíná „pravou ruku“, se podobají ostatním typům jednopodjednotkových polymeráz. Nejvíce poznatků je o RdRp RNA virů s pozitivním jednovláknovým RNA genomem. Tyto znalosti poté pomáhají při vývoji antivirotik, jejichž cílem jsou tyto RdRp. Druhou skupinu tvoří buněčné RDR. Tyto polymerázy se nacházejí pouze u eukaryot. Jejich aktivní místo je homologické s aktivním místem vícepodjednotkových DNA dependentních RNA polymeráz. RDR se uplatňují v drahách RNA silencingu.

Klíčová slova: RNA dependentní RNA polymerázy, RNA viry, RNA silencing

Abstract

RNA dependent RNA polymerases synthesize RNA strand from RNA template. They can be divided into two large groups - viral (RdRp) and cellular (RDR) polymerases. Viral RdRp play a key role in the life cycle of RNA viruses, ensuring replication and transcription of their genome. The structure, which resembles the „right hand“, is similar to other types single-subunit polymerases. Large amounts of knowledge are available about the RdRp of RNA viruses with positive single strand RNA genome. This information then helps in the development of antiviral drugs targeting the RdRp. The second group consists of cellular RDR. These polymerases are found only in eukaryotes. Their active site is homologous to the active site of multisubunits DNA dependent RNA polymerases. RDR is involved in RNA silencing pathways.

Key words: RNA dependent RNA polymerases, RNA viruses, RNA silencing

Úvod

RNA dependentní RNA polymerázy jsou enzymy syntetizující komplementární řetězec RNA k RNA vlákně předlohy. Tyto enzymy lze rozdělit na dvě velké nepříbuzné skupiny - virové a buněčné RNA dependentní RNA polymerázy. Wassenegger a Krczal (2006) navrhli pro jejich zřetelnější odlišení použití zkratk RdRp pro virové polymerázy a RDR pro buněčné polymerázy (namísto dřívějšího RdRP).

RdRp byly objeveny na počátku šedesátých let 20.století při studiu RNA virů (Baltimore et al., 1963). RdRp hrají klíčovou roli v jejich životním cyklu, neboť zajišťují replikaci a transkripci jejich genomu. Postupem času se ukázalo, že kopírování RNA podle RNA probíhá i u vyšších organismů. V průběhu sedmdesátých let 20.století se objevují první zprávy o existenci RNA dependentní RNA polymerázové aktivity u eukaryot - u čínského zelí a tabáku (Fraenkel-Conrat, 1983). Jak popisuje ve svém článku Fraenkel-Conrat (1983), vědecká obec považovala tyto objevy za důsledek kontaminace rostlin RNA virem. Teprve až data publikovaná po roce 1978 dokázala existenci RDR u rostlin. Byly provedeny srovnávací studie enzymů získaných ze zdravých rostlin a z rostlin infikovaných různými viry. Ty prokázaly, že jsou enzymy kódovány hostitelskou rostlinou, nikoliv virem. Definitivní důkaz přinesla izolace těchto enzymů z okurky a tabáku (Takanami a Fraenkel-Conrat, 1982). Na přelomu tohoto tisíciletí pak byly poprvé popsány homology rostlinných RDR u houby *Neurospora crassa* (Cogoni a Macino, 1999) a u nematoda *Caenorhabditis elegans* (Smardon et al., 2000). Bylo prokázáno, že RDR se uplatňují při RNA silencingu.

V roce 1981 byla pro enzymy katalyzující RNA templátem řízené prodlužování 3'-konce RNA vlákna vytvořena v rámci IUBMB nomenklatury enzymů podkategorie „RNA-directed RNA polymerases“ - EC 2.7.7.48 (Wassenegger a Krczal, 2006).

Ve své práci shrnuji poznatky na poli RNA dependentních RNA polymeráz.

1. Virové RdRp

RNA viry lze podle typu genomu dělit na tři skupiny - viry s genomem ve formě dvouvláknové RNA (dsRNA viry), pozitivní jednovláknové RNA ((+)ssRNA viry) nebo negativní jednovláknové RNA ((-)ssRNA viry). RNA viry (s výjimkou retrovirů) nevytváří během svého životního cyklu žádný DNA intermediát. RdRp proto hraje klíčovou roli v jejich životním cyklu, neboť zajišťují replikaci a transkripci jejich genomu (Ortín a Parra, 2006).

Po vstupu (+)ssRNA virů do buňky dochází k translaci jejich genomu enzymy hostitele a tím k syntéze mj. i RdRp. Oproti tomu (-)ssRNA a dsRNA viry si musí nést RdRp ve virové partikuli a jejich životní cyklus začíná transkripcí genomu pomocí RdRp (Ortín a Parra, 2006).

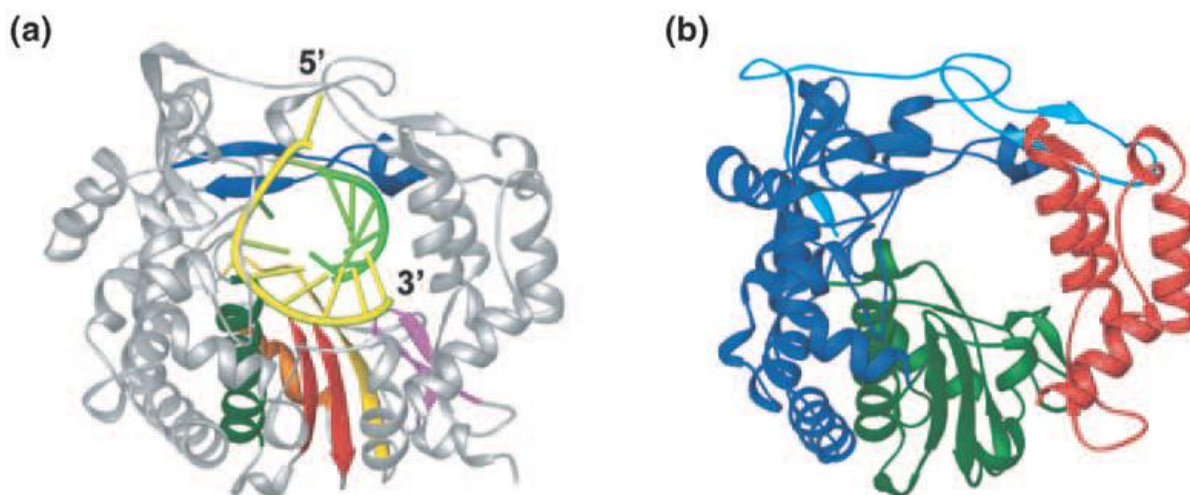
RdRp (+)ssRNA a dsRNA virů jsou schopné polymerázové aktivity *in vitro*. *In vivo* fungují v rámci větších proteinových komplexů, virové nebo buněčné složky těchto komplexů regulují činnost RdRp nebo umístění komplexu v infikované buňce. Pro činnost RdRp (-)ssRNA jsou virové a buněčné faktory nezbytné. RdRp (-)ssRNA virů jsou oproti RdRp zbylých dvou skupin RNA virů větší a skládají se ze tří podjednotek. Jako templát jim slouží ribonukleoproteiny složené z negativního vlákna RNA a nukleoproteinu (Area et al., 2004).

Rozdílná komplexita RdRp se promítá i v množství dostupných informací o strukturách RdRp jednotlivých skupin RNA virů. Nejvíce poznatků je známo o RdRp (+)ssRNA virů. K dispozici jsou krystalové struktury RdRp virů např. z rodiny *Picornaviridae* (poliovirus - PV, virus slintavky a kulhavky - FMDV), *Caliciviridae* (virus moru králíků - RHDV, Norwalk virus - NV, Sapporo virus - SV) a *Flaviviridae* (virus hepatitidy C - HCV, virus bovinní virové diarrhoea - BVDV). Krystalových struktur RdRp ze skupiny dsRNA virů je méně - dostupné struktury RdRp jsou z rodiny *Cystoviridae* (bakteriofág $\Phi 6$), *Reoviridae* (reovirus, rotavirus) a *Birnaviridae* (virus infekční burzitidy drůbeže - IBDV). V rámci (-)ssRNA virů jsou k dispozici části některých podjednotek - např. u viru chřipky z rodiny *Orthomyxoviridae*. Přehled dostupných struktur je uveden v příloze.

1.1. Struktura

První krystalovou strukturu virové RdRp získali Hansen et al. (1997) z polioviru. To umožnilo srovnání s dříve známými strukturami ostatních polymeráz - DNA dependentními RNA polymerázami (DdRp), DNA dependentními DNA polymerázami (DdDp) a RNA dependentní DNA polymerázou (RdDp, tj. reverzní transkriptázou - RT). Stejně jako ostatní skupiny jednopodjednotkových polymeráz, připomínají RdRp (+)ssRNA a dsRNA virů svým tvarem „pravou ruku“ („right hand“). U RdRp je však tato konformace uzavřenější - tzv. „closed right hand“ než u zbylých polymeráz (Ferrer-Orta et al., 2006a).

Polymerázy s „right hand“ strukturou se skládají ze tří subdomén - „palm“ (dlaň), „thumb“ (palec) a „fingers“ (prsty) (viz Obr. 1).



Obrázek 1. Struktura RdRp - (a) FMDV - jednotlivé konzervované motivy jsou zbarveny následovně: A žlutě, B tmavě zeleně, C červeně, D oranžově, E purpurově, F tmavě modře; žlutě je znázorněno templátové vlákno RNA, zeleně primer RNA. (b) PV - jednotlivé subdomény jsou zbarveny následovně: „fingers“ modře, „palm“ zeleně a „thumb“ červeně; N-konec a „fingertips“ azurově [převzato z Ferrer-Orta et al., 2006a]

1.1.1. Palm subdoména

„Palm“ subdoména je vysoce konzervovaná napříč polymerázami (Hansen et al., 1997). V této subdoméně se nachází katalytické místo enzymu. Jádro subdomény se skládá ze čtyřvláknového antiparalelního β -listu a dvou α -helixů. V této doméně byly nalezeny čtyři sekvenční motivy (A - D) společné všem typům polymeráz a jeden motiv (E) unikátní pro RNA-dependentní polymerázy (RdRp a RT) (viz Obr. 1). Jednotlivá vlákna β -listu tvoří aminokyselinové zbytky motivů A, C a částečně D. Zbylá část motivu D a motiv B vytváří α -helixy (viz Obr. 2).

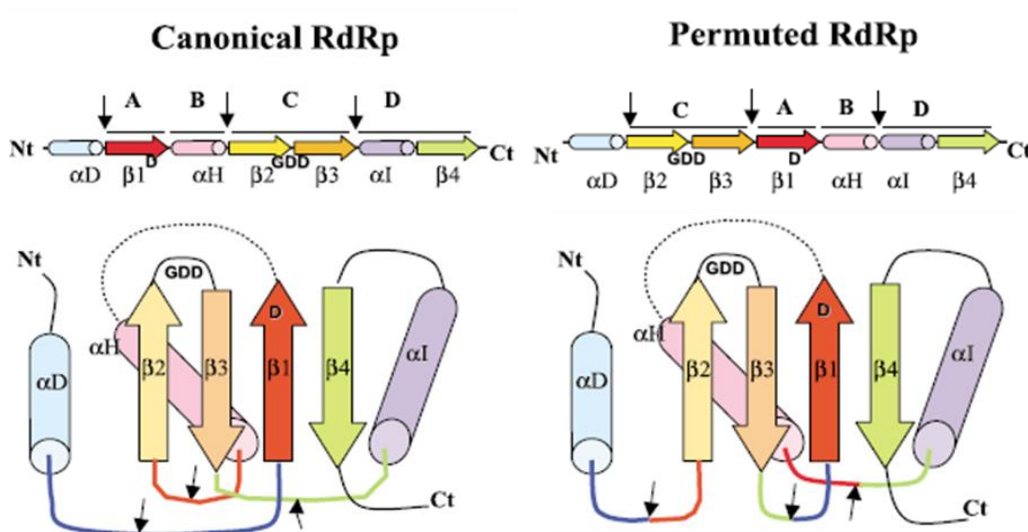
Motiv A obsahuje u všech RdRp aminokyselinovou sekvenci DX₄₋₅D (X je jakákoliv aminokyselina (AK)). V pořadí první kyselina asparagová je konzervována u všech typů polymeráz a podílí se na koordinaci iontů kovů při vlastní polymerázové reakci. Druhá kyselina asparagová hraje roli při selekci cukerného zbytku nukleotidtrifosfátu (NTP) (Hansen et al., 1997).

V rámci motivu B (GX₂₋₃TX₃N) existují tři vysoce konzervované AK. Asparagin se podílí na selekci cukerného zbytku NTP, glycin a threonin hrají roli při přeuspořádání aktivního místa během reakce (Gong a Peersen, 2010).

Motiv C obsahuje v rámci RdRp vysoce konzervovanou sekvenci GDD. První kyselina asparagová je konzervována napříč všemi typy polymeráz a při reakci je zapojena do koordinace druhého hořečnatého kationtu a pro samotnou katalýzu je nepostradatelná (Hansen et al., 1997).

Motiv D tvoří jádro „palm“ subdomény. Obsahuje konzervovaný lysin, který poskytuje během katalytické reakce proton odcházejícímu pyrofosfátu (Castro et al., 2009).

Motiv E je umístěn mezi „palm“ a „thumb“ subdoménou, s kterými interaguje vodíkovými můstky. Zdá se být důležitý pro správné umístění substrátu při katalýze (O'Reilly a Kao, 1998).



Obrázek 2. Struktura „palm“ subdomény - (vlevo) převažující uspořádání motivů v „palm“ subdoméně, (vpravo) permutace v „palm“ doméně - motivy v pořadí C-A-B. Barevné šipky značí β-listy, válečky α-helixy. Černé šipky značí místa, kde došlo při permutaci k tvorbě nových spojení. [převzato z Gorbalenya et al., 2002]

Dosud jedinou permutaci v rámci „palm“ subdomény poprvé popsali Gorbalenya et al. (2002). U dvou (+)ssRNA virů (Thosa asigna virus, Euprosterona elaeasa virus) a dvou dsRNA virů z rodiny *Birnaviridae* (virus nekrózy pankreatu - IPNV; IBDV) ukázali, že motivy v „palm“ subdoméně nejsou v obvyklém pořadí A-B-C, ale v pozmeněném C-A-B. Architektura subdomény zůstala zachována, pouze vznikla jiná propojení mezi jednotlivými β-vláknými a α-

helixy (viz Obr. 2). Stejnou permutaci objevili Sabanadzovic et al. (2009) také u viru Grapevine virus Q z rodiny *Tymoviridae*. Na základě analýz předpokládají, že tyto permutace vznikly nezávisle na sobě a tedy dvakrát.

1.1.2. Thumb subdoména

„Thumb“ subdoména je tvořena převážně α -helixy, s výjimkou β -vlákna na N-konci. Toto β -vlákno interaguje s β -vláknou motivu E v „palm“ subdoméně a vytváří tak krátké antiparalelní trojvlákno (Hansen et al., 1997). Mutační analýzy prokázaly, že „thumb“ subdoména je nepostradatelná pro RNA syntézu (O'Reilly a Kao, 1998). Zároveň je „thumb“ subdoména nejvíce variabilní oblastí mezi jednotlivými virovými RdRp.

1.1.3. Fingers subdoména

„Fingers“ subdoména má dva segmenty - na N-konci „palm“ subdomény vytváří α -helix s krátkým úsekem β -vlákna a mezi motivy A a B v „palm“ subdoméně α -helix. Strukturou se odlišuje od „fingers“ subdomény RT, což může být důvodem odlišné preference templátu (O'Reilly a Kao, 1998). Z „fingers“ subdomény vyčnívají smyčky, tzv. „fingertips“ („konečky prstů“), které spolu s N-koncovou doménou enzymu spojují „fingers“ a „thumb“ subdoménu. Aktivní místo enzymu je tím kompletně obklopeno a enzym získává výše zmiňovanou „closed right hand“ konformaci (Ferrer-Orta et al., 2006a). U *Flaviviridae*, *Cystoviridae* a *Reoviridae* obklopuje aktivní místo enzymu navíc ještě C-koncová doména (Ng et al., 2008).

V rámci „fingers“ subdomény byl objeven motiv F ($RX_{1-2}I/L$). Pozitivně nabitý AK tohoto motivu vytváří tunel, který zprostředkovává interakci s přicházejícími NTP (Lesburg et al., 1999; Bruenn, 2003). Další konzervovanou sekvenci představuje motiv G ($(T/S)X_{1-2}G$), který se podílí na správném rozeznání a vazbě primeru a templátu (Gorbalenya et al., 2002; Nikonov et al., 2008).

1.2. Interakce enzymu s jednotlivými komponenty reakce

1.2.1. Kationty kovu

RdRp, stejně jako ostatní skupiny polymeráz, vyžadují při katalytické reakci přítomnost dvou kationtů kovů, především Mg^{2+} . Do aktivního místa spolu s NTP vstupuje první kationt Mg^{2+} . Tento kationt, označovaný jako B, je koordinován β - a γ -fosfátem NTP a první kyselinou asparagovou z motivu A a oběma kyselinami asparagovými z motivu C. Tento kationt B orientuje β - a γ -fosfát NTP do správné polohy a v průběhu reakce stabilizuje přechodný pentavalentní stav. Po navázání NTP a kationtu B se váže druhý kationt Mg^{2+} (označovaný jako A), který je koordinován 3'-OH skupinou primeru, α -fosfátem NTP a prvními dvěma kyselinami asparagovými z motivu A a první kyselinou asparagovou z motivu C. Kationt A snižuje pK_a 3'-OH skupiny primeru a tím při reakci umožňuje nukleofilní atak α -fosfátu NTP. Mutace asparagových kyselin z motivů A a C inaktivuje nebo mění polymerázovou aktivitu enzymu (Ng et al., 2008).

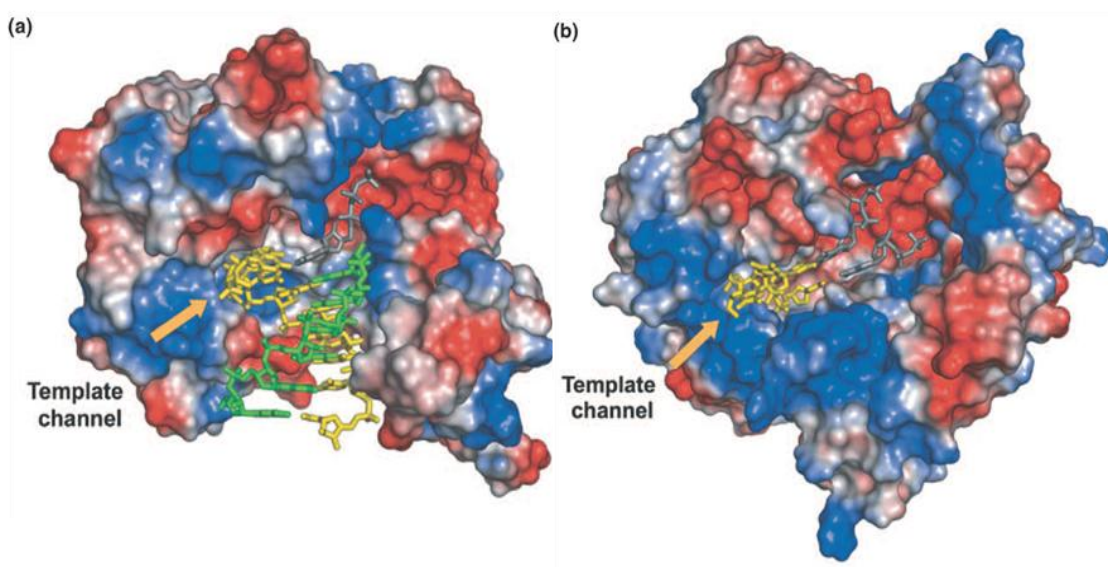
1.2.2. NTP

NTP se k aktivnímu místu enzymu dostává tunelem, který se rozkládá na zadní straně enzymu. Ten je lemován pozitivně nabitými aminokyselinami, které interagují s procházejícím NTP (Ferrer-Orta et al., 2006a). Tunel má tvar trychtýře a ústí do místa vazby templátu a motivu C (O'Farrell et al., 2003). Správnou orientaci NTP v aktivním místě zajišťuje druhá kyselina asparagová z motivu A, která interaguje s 3'-OH skupinou NTP, a asparagin z motivu B, který interaguje s 2'-OH skupinou NTP. Tyto aminokyselinové zbytky jsou nezbytné pro správnou inkorporaci NTP, namísto deoxynukleotidtrifosfátu (dNTP) (Gohara et al., 2004). Fosfátová složka NTP interaguje s oběma kationty kovů a také s pozitivně nabitými postranými zbytky argininu a lysinu v motivu F (Ng et al., 2008).

1.2.3. RNA

Centrální žlábek u některých RdRp je schopen pojmout RNA ve formě duplexu, u jiných pouze ve formě ssRNA (viz Obr. 3). Tato odlišnost úzce souvisí se způsobem iniciace jednotlivých RdRp. U RdRp *Picornaviridae* a *Caliciviridae* (primer-dependentní iniciace) je centrální žlábek dostatečně široký a pojme RNA duplex templát-primer. Oproti tomu u RdRp *Flaviviridae* a *Cystoviridae* (iniciace *de novo*) zasahuje do centrálního žlábků C-terminální doména. Tím je žlábek zúžen a je schopen pojmout pouze ssRNA - templát. Zároveň část této domény (tzv. „priming platform“) stabilizuje iniciační komplex interakcí s iniciačním

nukleotidem. Po syntéze RNA produktu o délce 2-3nt musí dojít ke konformačním změnám, aby tato C-terminální doména neblokovala výstup delšího RNA produktu (Ng et al., 2008; Ferrer-Orta et al., 2006a; van Dijk et al., 2004).



Obrázek 3. Rozdíl ve strukturách RdRp dle způsobu iniciace - (a) FMDV - primer-dependentní iniciace - polymeráza má široký centrální žlábek, který pojme RNA duplex templát-primer, (b) Φ6 - iniciace *de novo* - C-terminální doména zasahuje k aktivnímu místu (na obrázku není znázorněna thumb doména a část N-koncové domény; templátové vlákno je znázorněno žlutě, primer zeleně, NTP substrát šedě; pozitivní zbytky AK povrch molekuly jsou zbarveny modře, negativní červeně) [převzato z Ferrer-Orta et al., 2006a]

1.3. Iniciace reakce

RdRp využívají dva základní mechanismy iniciace RNA syntézy - primer dependentní a primer independentní (*de novo*). Syntéza *de novo* je mezi RNA viry běžná, výjimkou je rodina *Picornaviridae*, jejíž zástupci vždy vyžadují primer. Některé viry mohou využívat i více způsobů iniciace. Segmentované (-)ssRNA viry využívají pro replikaci genomu iniciaci *de novo*, při syntéze mRNA používají tzv. cap-snatching mechanismus (Kao et al., 2001).

1.3.1. Primer-independentní iniciace

Při *de novo* iniciaci musí být vytvořena fosfodiesterová vazba mezi dvěma NTP. Jako iniciační nukleotidy (NTP_i) fungují nejčastěji puriny, zejména guanosintrifosfát. Jako templátový nukleotid při iniciaci syntézy je obvykle použit poslední nebo předposlední nukleotid (obvykle pyrimidin) na 3'-konci genomu (T₊₁ báze). Pro specifitu iniciace je důležitá vodíková vazba mezi NTP_i a T₊₁ bází. Svůj vliv na zahájení iniciace *de novo* mají i dva následující nukleotidy po T₊₁ bázi, při jejich mutaci se může stát tento úsek neschopným sloužit jako templát (Kao et al., 2001).

Vzniklé oligonukleotidové produkty nemusí být dostatečně stabilní a dochází k tzv. abortivní iniciaci, kdy jsou syntetizovány pouze krátké 2-5nt oligonukleotidy (van Dijk et al., 2004). Tato abortivní iniciace byla popsána např. u reoviru (Yamakawa et al., 1981) a rotaviru (Chen a Patton, 2000).

Stabilní elongační komplex vzniká až po vytvoření dostatečně dlouhého RNA produktu (obvykle 8-10nt), který vytvoří stabilní duplex s templátem (Kao et al., 2001; Ng et al., 2008).

1.3.2. Primer-dependentní iniciace

Při primer dependentní iniciaci mohou RdRp jako primery využívat proteiny nebo oligonukleotidy (van Dijk et al., 2004). RdRp *Picornaviridae* využívají pro iniciaci protein VPg (viral protein genome-linked), který mají kovalentně připojen na 5'-konci genomu. RdRp využívá místo iniciačního nukleotidu tyrosin tohoto proteinu, k jehož -OH skupině připojuje uridinmonofosfát (Ferrer-Orta et al., 2006b).

RdRp mnoha (-)ssRNA virů se segmentovaným genomem (jako např. virus chřipky) používají tzv. cap snatching mechanismus. Jedna z podjednotek polymerázového komplexu štěpí buněčné mRNA s čepičkou („cap“), odštěpená čepička (10-15nt) je použita jako primer.

Jako další primer mohou být použity krátké oligonukleotidové sekvence, které jsou syntetizované během abortivních cyklů RdRp.

Jiným způsobem iniciace je tzv. template-primed mechanismus. Templátová RNA vytváří na svém 3'konci smyčku, která tak slouží zároveň jako primer. Tento mechanismus však může být pouze artefaktem *in vitro* syntézy (van Dijk et al., 2004).

1.4. Vlastní průběh enzymatické reakce

Nejprostudovanější RdRp z hlediska průběhu enzymatické reakce je PV RdRp (3D^{pol}). Arnold a Gohara (2004) na základě experimentů ukázali, že kinetický mechanismus inkorporace jednoho nukleotidu RdRp se skládá minimálně z 5 kroků (viz schéma 1). Krystalické struktury jednotlivých fází, s jednou výjimkou, získali Gong a Peersen (2010) (viz schéma 2). Ti předpokládají, že jimi popsaný průběh katalýzy by mohl být společný všem RdRp z (+)ssRNA virů.

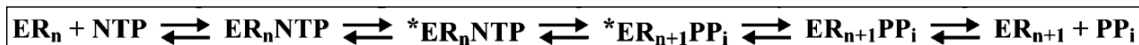


Schéma 1. Kinetický mechanismus inkorporace nukleotidu u 3D^{pol} - Komplex ER_n představuje 3D^{pol} s navázaným duplexem templát-primer. Po navázání NTP (ER_nNTP) dojde k přechodu do katalytické aktivní konformace (*ER_nNTP). Poté proběhne polymerázové reakce (*ER_{n+1}PP_i), aktivní místo se vrací do otevřené konformace (ER_{n+1}PP_i). Nakonec dochází k uvolnění vzniklého pyrofosfátu (ER_{n+1} + PP_i) [převzato z Gohara et al., 2004]

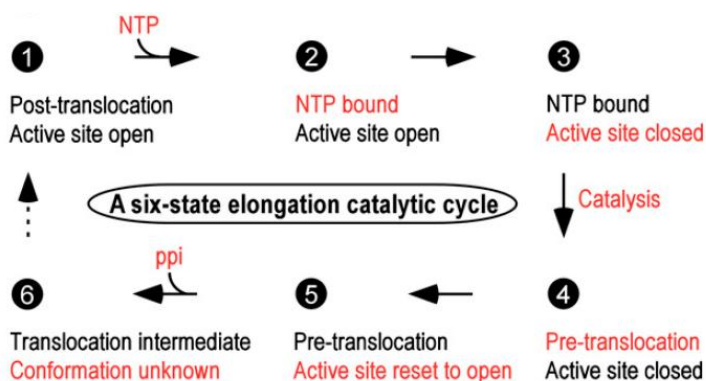
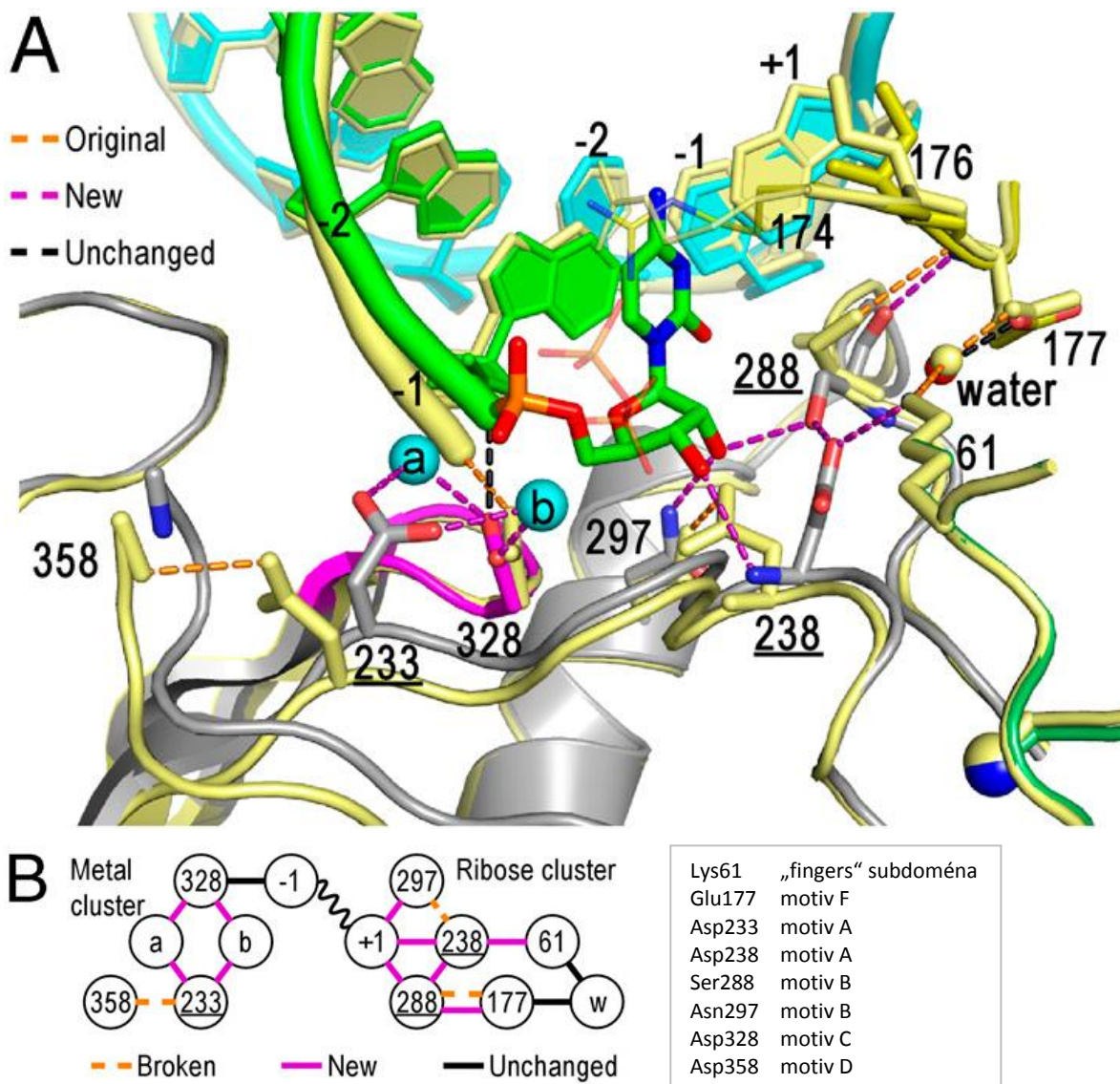


Schéma 2. Průběh katalytického cyklu $3D^{pol}$ - Po navázání NTP (2) dochází k uzavření aktivního místa (3) a probíhá katalýza. Po katalýze dochází k otevření aktivního místa (4,5), toto resetování aktivního místa zpět do otevřené konformace není doprovázené translokací RNA produktu. Proto je navržen stav (6) zatím neznámé konformace, který umožní translokaci produktu, aby RdRp mohla zahájit další cyklus přidání NTP [převzato z Gong a Peersen, 2010]

Na počátku katalytického cyklu je $3D^{pol}$ s navázaným duplexem templát-primer (komplex ER_n). Prvním krokem katalytického cyklu je navázání NTP (ER_nNTP). Poté musí proběhnout konformační změny - „uzavření“ aktivního místa, aby se komplex dostal do katalyticky aktivní konformace ($*ER_nNTP$) (Gohara et al., 2004). Základem těchto změn je pohyb T_{+1} báze a NTP směrem k aktivnímu místu daný interakcemi AK s 2'-OH a 3'-OH skupinami NTP. Pohyb ribózy způsobí změnu polohy $Asp238^A$ (horní index značí motiv, ve kterém se AK nachází), který se váže s 3'-OH skupinou této ribózy, a dojde k vytvoření nových interakcí mezi tímto $Asp238^A$ a $Ser288^B$ a $Lys61$. To má za následek vznik interakce mezi $Ser288^B$ a 2'-OH skupinou NTP, ke které se váže také $Asn297^B$. Výsledkem těchto nových interakcí je i pohyb $Asp233^A$ a jeho interakce s ionty Mg^{2+} (viz Obr. 4). $3D^{pol}$ se těmito změnami v „palm“ subdoméně liší od ostatních typů polymeráz, které dosahují potřebné konformace změnami ve „fingers“ subdoméně (Gong a Peersen, 2010).

Po zformování aktivního místa proběhne vlastní polymerázová reakce ($*ER_{n+1}PP_i$). Poté následují opět konformační změny a aktivní místo se „otevírá“ ($ER_{n+1}PP_i$). Oproti ostatním typům polymeráz u $3D^{pol}$ nedochází zároveň s těmito změnami k translokaci RNA produktu. Proto Gong a Peersen (2010) předpokládají existenci zatím necharakterizovaného stavu, během kterého by došlo k translokaci, aby se mohl celý katalytický cyklus opakovat (viz schéma 2). Pro dokončení celého cyklu musí být ještě uvolněn vzniklý pyrofosfát (PP_i), čemuž napomáhá lysin z motivu D (Castro et al., 2009).



Obrázek 4. Molekulární interakce při změně konformace aktivního místa 3D^{pol} (A) a jejich schematické znázornění (B). Nově vytvořené interakce při „uzavření“ aktivního místa jsou znázorněny růžově, původní oranžově. Na obrázku (A) je „otevřená“ konformace znázorněna žlutě, „uzavřená“ konformace aktivního místa je znázorněna barevně. Modré kuličky označené a/b představují kationty kovu. Čísla jednotlivých AK a motivy, ve kterých se nachází, jsou uvedeny vpravo. [převzato z Gong a Peersen, 2010]

Chybovost RdRp je srovnatelná s chybovostí DNA polymeráz postrádajících opravnou aktivitu. Frekvence transice je 10^{-4} - 10^{-5} , frekvence transverze 10^{-6} - 10^{-7} (Arnold et al., 2004). Pro rozeznání a následnou inkorporaci NTP namísto dNTP jsou klíčové konformační změny v „palm“ subdoméně. Gong a Peersen (2010) zjistili, že při vazbě 2'-dNTP, 3'-dNTP nebo 2',3'-ddNTP nedojde k dostatečnému „uzavření“ aktivního místa, které mj. závisí právě na interakcích s -OH skupinami NTP. Již dříve Gohara et al. (2004) zjistili, že RdRp mohou inkorporovat 2'- a 3'-dNTP, ale že efektivita této inkorporace je výrazně nižší než inkorporace správného NTP.

2. Buněčné RDR

RDR jsou součástí fenoménu RNA silencingu (umlcování), který ovlivňuje organismy v mnoha oblastech. Spouštěčem RNA silencingu je dsRNA, která může vznikat z ssRNA endogenního nebo cizorodého původu. Při této syntéze se uplatňují právě RDR. Tato dsRNA je posléze štěpena enzymem Dicer (RNase III) a vznikají obvykle 21-25nt siRNA (small interfering RNA). Tyto siRNA jsou zakomponovány do komplexu RISC (RNA-induced silencing komplex). Poté slouží buď k rozeznávání homologních mRNA, které jsou následně degradovány, anebo se stanou součástí komplexu RITS (RNA-induced transcriptional silencing komplex), který řídí silencing chromatinu metylací DNA nebo histonů (Xie a Guo, 2006).

Zong et al. (2009) identifikovali z dostupných databází 161 genů pro RDR z 56 různých druhů organismů - od protist po mnohobuněčné organismy. Tyto geny našli u protist z říše Amoebozoa (např. *Dictyostelium discoideum*, *Entamoeba histolytica*), Excavata (např. *Giardia lamblia*) a Chromalveolata (např. *Paramecium tetraurelia*, *Toxoplasma gondii*). RDR geny nenalezli u protist z říše Rhizaria. RDR geny identifikovali také mezi rostlinami, houbami a živočichy (výjimkou je hmyz a obratlovci).

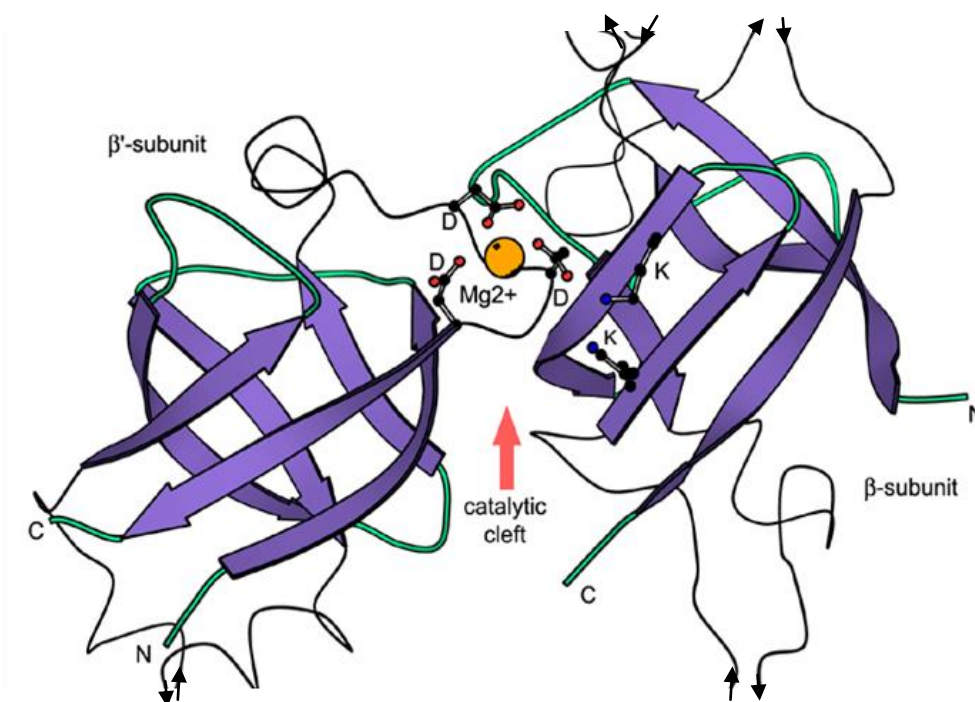
Wassenegger a Krczal (2006) navrhli nomenklaturu RDR. Dvoupísmenná předpona odkazuje na druh, u kterého se RDR vyskytuje - první písmeno je počáteční písmeno rodového jména a druhé písmeno počátečním písmenem druhového jména. Číselné přípony označují jednotlivé homology. U některých RDR je však více zažito původní pojmenování - např. QDE-1 u *Neurospora crassa* (NcRDR6).

2.1. Struktura

Buněčné RDR a virové RdRp se od sebe liší celkovou strukturou a stejně tak uspořádáním katalytického centra. Katalytické centrum buněčných RDR je homologické s katalytickým centrem vícepodjednotkových DdRp. DdRp patří k nejkonzervovanějším enzymům, vyskytují se u všech buněčných organismů, ve kterých zajišťují transkripci. Všechny tyto DdRp sdílejí čtyři podjednotky (odpovídají podjednotkám α , β , β' a ω bakteriálních DdRp). Podjednotky β a β' obsahují double-psi- β -barrel (DPBB) subdoménu. Tyto subdomény se podílí na tvorbě katalytického centra, v podjednotce β' se nachází pro katalýzu klíčové tři invariantní kyseliny asparagové. RDR obsahují DPBB subdoménu homologickou k DPBB subdoméně β' podjednotky, zároveň je to jediná homologie mezi RDR a DdRp (Iyer et al., 2003).

2.1.1. DPBB subdoména

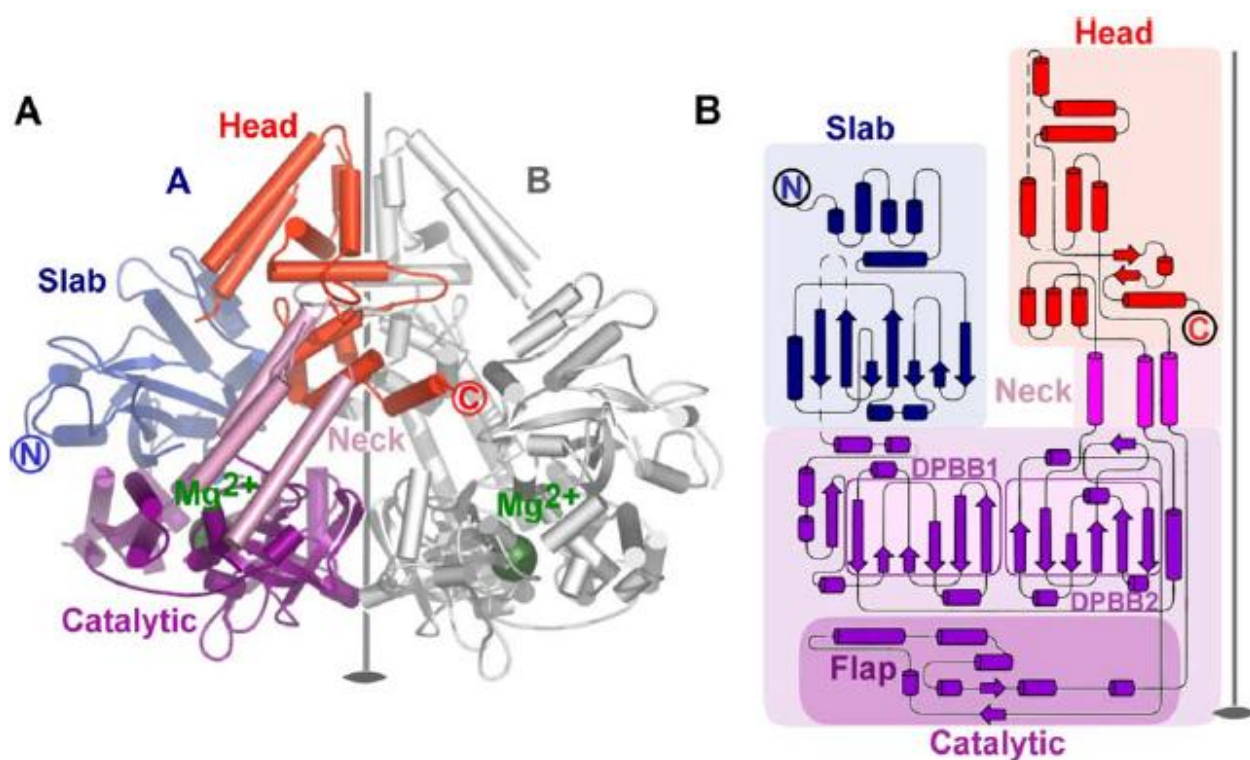
DPBB subdomény tvoří šest β -vláken vytvářející strukturu barelu. První z Ψ -struktur, charakteristické pro DPBB, spolu tvoří vlákna 1 a 2 (spojené Ψ -smyčkou) a mezi nimi nacházející se vlákno 5, druhá je obdobně tvořena vlákny 4-5 a vláknem 2 (Castillo et al., 1999). DPBB subdomény mají ještě dva variabilní úseky mezi vlákny 2-3 a 5-6. V úseku mezi vlákny 5-6 je u DPBB RDR a DPBB β' podjednotky DdRp konzervovaná sekvence DbDGD (b je AK s velkým postranním řetězcem) (viz Obr. 5). Tyto tři konzervované kyseliny asparagové koordinují Mg^{2+} ionty při katalýze (Iyer et al., 2003). V pořadí třetí kyselina asparagová z tohoto motivu pravděpodobně odpovídá funkci kyselině asparagové v motivu C virových RdRp (Makayev a Bamford, 2002). Kromě této sekvence našli Iyer et al. (2003) ještě několik dalších konzervovaných aminokyselinových zbytků mezi DPBB RDR a DdRp. V DdRp má každá podjednotka DPBB subdoménu, v RDR se DPBB domény nachází v rámci jednoho polypeptidového řetězce (Salgado et al., 2006).



Obrázek 5. Struktura katalytického centra DdRp, tvořeného dvěma DPBB doménami. Úsek mezi 5 a 6 β -vlákem DPBB domény β' -podjednotky obsahuje konzervovanou sekvenci DbDGD. DPBB domény RDR jsou homologické k DPBB doménám β' -podjednotky DdRp. [převzato a upraveno z Iyer et al., 2003]

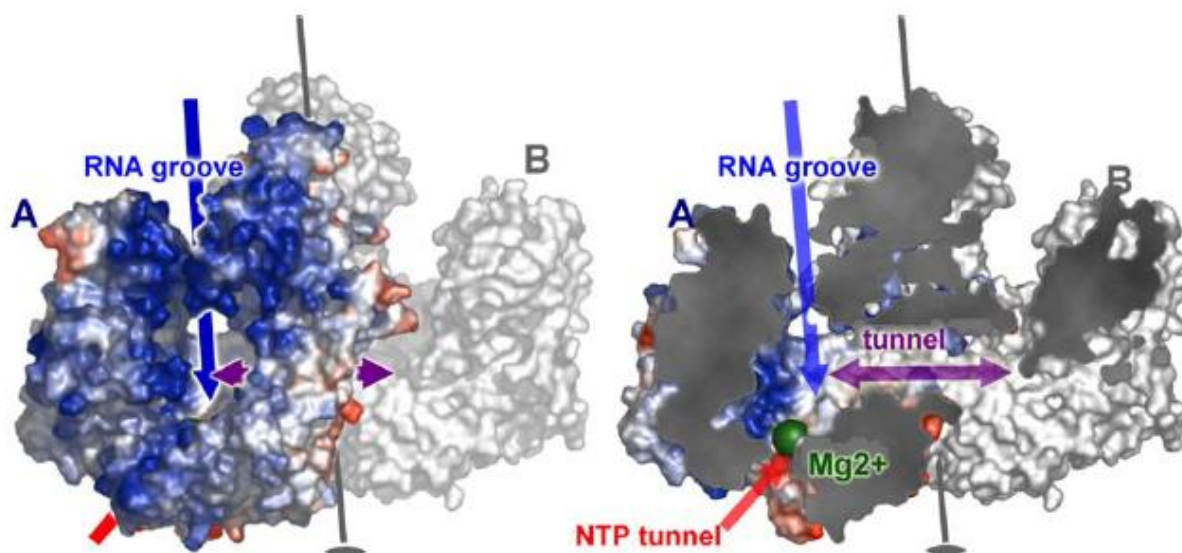
2.1.2. Krystalická struktura QDE-1

Zatím jedinou krystalickou strukturu RDR publikovali Salgado et al. (2006) a jedná se o RDR houby *Neurospora crassa* (QDE-1). Dle získané struktury předpokládají, že QDE-1 tvoří funkční dimer ve tvaru pyramidy. Obě jeho podjednotky se skládají ze čtyř domén. Na N-konci se nachází „slab“ („deska“) doména tvořené α -helixy i β -vlákny. Následuje „katalytická“ doména, která se skládá ze tří subdomén - DPBB1, DPBB2 a převážně helikální „flap“ („klopa“) subdomény, které dohromady vytváří katalytické místo. Třetí doménou je „neck“ („krk“) doména s třemi dlouhými α -helixy. Na C-konci proteinu se nachází helikální „head“ („hlava“) doména (viz Obr. 6).



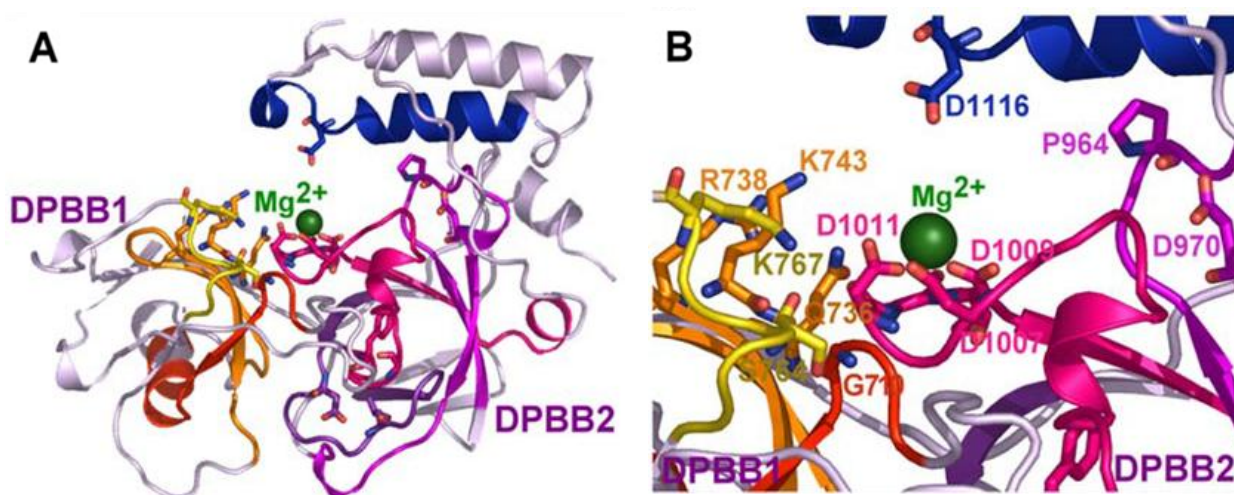
Obrázek 6. Struktura QDE-1 - (A) Struktura dimeru QDE-1 - V podjednotce A jsou barevně odlišeny jednotlivé domény - „slab“ doména modře, katalytická doména fialově, „neck“ doména růžově, „head“ doména oranžově; podjednotka B je znázorněna šedě. Zelené kuličky představují kationty Mg²⁺. (B) Topologie podjednotky A - Barevné znázornění domén odpovídá zbarvení v části (A). V katalytické doméně jsou zvýrazněny subdomény DPBB1, DPBB2 a „flap“ subdoména. Šipky představují β -lisy, válečky α -helixy [převzato ze Salgado et al., 2006]

Mezi „slab“ a „head“ doménou každé podjednotky vede tunel s pozitivně nabitými AK k aktivnímu místu. Dle autorů by mohl sloužit jako tunel pro dsRNA produkt. Druhý menší tunel se nachází na vrcholu každé podjednotky, pravděpodobně zajišťuje přístup NTP k aktivnímu místu. Mezi „neck“ a „katalytickými“ doménami podjednotek se nachází tunel spojující aktivní místa podjednotek, jeho funkce není známa (viz Obr. 7)



Obrázek 7. Struktura QDE-1 - (Vlevo) Jednotlivé tunely podjednotky A, podjednotka B znázorněna šedě. Modrá šipka znázorňuje tunel pro RNA produkt, červená šipka tunel pro NTP, fialová šipka tunel spojující aktivní místa podjednotek A a B. (Vpravo) Totéž jako v levé části obrázku, znázorněno na průřezu. Zelená kulička představuje kationt Mg^{2+} [převzato ze Salgado et al., 2006]

Srovnáním s aminokyselinovými sekvencemi dalších 30 RDR Salgado et al. (2006) určili 7 motivů s konzervovanými AK (viz Obr. 8). Motivy 1-3 se nacházejí v DPBB1, motivy 4-6 v DPBB2 a motiv 7 ve „flap“ subdoméně. Motiv 6 obsahuje sekvenci DbDGD. V motivech 2 a 3 jsou tři invariantní pozitivně nabitě AK, které v aktivním místě vytváří vodíkové vazby spojující DPBB domény. Protože se nepodařilo získat krystalické struktury QDE-1 s RNA či NTP, konkrétnější úloha jednotlivých aminokyselin v průběhu polymerázové reakce není jasná.



Obrázek 8. Aktivní místo QDE-1 tvořené subdoménami DPBB1 a DPBB2 - (A) Jednotlivé konzervované motivy jsou znázorněny takto: motiv 1 červeně, 2 oranžově, 3 tmavě žlutě, 4 fialově, 5 tmavě růžově, 6 světle růžově a 7 modře. (B) Detailní pohled na aktivní místo s vyznačením konzervovaných AK; zbarvení odpovídá části (A) [převzato ze Salgado et al., 2006]

Salgado et al. (2006) předpokládají, že QDE-1 pracuje jako „dvouválcový motor“ - v danou chvíli je katalyticky aktivní jen jedna z podjednotek. Již dříve dokázali Makayev a Bamford (2002), že QDE-1 může *in vitro* používat iniciaci *de novo* i primer-dependentní a zároveň, že QDE-1 buď kopíruje templát v plné délce nebo vytváří oligonukleotidy o délce 9-21 bází.

2.2. RDR mnohobuněčných organismů

Zong et al. (2009) provedli analýzu dostupných RDR genů a určili jejich fylogenetickou příbuznost. Získali fylogenetický strom, na kterém jsou RDR geny rozděleny na 3 klády - RDR α , RDR β a RDR γ .

Z toho vyvozují, že předek eukaryot měl 3 geny pro RDR, které se následně v rámci jednotlivých skupin organismů duplikovaly nebo byly ztraceny. RDR α zůstal zachován v rámci hub, rostlin i živočichů. V předku rostlin z RDR α vznikly duplikací RDR1, RDR2 a RDR6, v rámci hub RDR1 a RDR2 a v rámci živočichů RDR1, RDR2 a RDR6. RDR γ zůstal zachován v houbách jako RDR6, v rostlinách jako RDR3, předci živočichů ho ztratili. RDR β zůstal zachován u hub a živočichů jako RDR3, u předku rostlin byl ztracen. Po rozdělení hlavních skupin organismů docházelo k dalším duplikacím a organismy tak mohou mít více kopií jednotlivých RDR genů. Stejně tak je pravděpodobné, že později došlo ke ztrátám těchto genů - u předků hmyzu a obratlovců. Pozdější duplikace umožnily funkční rozrůznění RDR genů, nejlépe je to patrné u rostlinných RDR.

Wassenegger a Krczal (2006) provedli vlastní srovnávací analýzu a zjistili, že všechny studované RDR obsahovaly kromě katalytického motivu DbDGD ještě čtyři další konzervované motivy. Proto navrhli, aby za RDR byly považovány všechny proteiny, které mají těchto pět konzervovaných motivů.

2.2.1. RDR rostlin

Rostliny obsahují čtyři skupiny RDR genů. Wassenegger a Krczal (2006) určili pro každou skupinu charakteristické aminokyselinové sekvence v rámci konzervovaných motivů u všech RDR. V rámci katalytické domény mají všechny geny RDR1 sekvenci CSGSDLGD, RDR2 CSGGDLGD, RDR3 xAxxDFDGD a RDR6 ASGSDLGD.

RDR1 se podílí především na antivirové obraně rostlin. Zvýšená aktivita RDR1 při virové infekci byla prokázána např. u *Lycopersicon esculentum* (Schiebel et al., 1993), *Nicotiana tabacum* (Xie et al., 2004) a *Arabidopsis thaliana* (Yu, 2003). U rostlin s defektním RDR1 genem dochází při virové infekci k většímu hromadění virové RNA a infekce zanechává horší následky než u wild-type rostlin (Xie et al., 2001). RDR1 hraje roli i v obraně proti herbivorům, jak dokázal Pandey a Baldwin (2007) u *Nicotiana attenuata*. Rostliny s umlčeným genem pro RDR1 byly i v přirozeném prostředí citlivější na napadení larvami *Manduca sexta*. Autoři předpokládají, že NaRDR1 zesiluje tvorbu siRNA, jejichž cílem je represor syntézy alkaloidů, a proto u rostlin s umlčeným RDR1 nedochází k dostatečné syntéze nikotinu jako obranné látky.

RDR2 je jednou z komponent systému vytvářející endogenní siRNA a je zapojen v transkripčním umlčování genů (Xie et al., 2004). RDR2 se proto uplatňuje v procesu RNA-dependentní DNA metylace (RdDM), který hraje důležitou roli při vývoji a růstu rostlin a jejich odpovědi na biotické a abiotické stresové faktory. RDR2 syntetizuje dsRNA z transkriptů produkovaných RNA polymerázou IV. Tyto dsRNA jsou štěpeny enzymem Dicer-like 3 (DCL3) a vznikají 24nt siRNA, které se následně v komplexu s dalšími proteiny podílí na řízení samotné metylace DNA (Mahfouz, 2010). Alleman et al. (2006) ukázali, že u kukuřice hraje RDR2 roli při zachování paramutací díky udržování potřebné hladiny siRNA. Paramutace je epigenetický jev, při kterém dochází k dědičnému umlčení jedné alely alelou druhou (Chandler a Stam, 2004).

Funkce rostlinných RDR3 zatím nebyla detailněji prozkoumána.

RDR6 byly zatím prozkoumány nejvíce. U *Arabidopsis thaliana* hraje RDR6 hlavní roli v posttranskripčním umlčování genů (posttranscriptional gene silencing - PTGS). RDR6 rozeznává aberentní RNA (většinou nemají čepičku nebo poly(A) konec), které dosyntetizovává do formy dsRNA a ty jsou následně štěpeny a vznikají siRNA. Zesílení efektivity silencingu napomáhá RDR6 amplifikací siRNA (Wassenegger a Krczal, 2006).

RDR6 u *Arabidopsis thaliana* se podílí také na produkci endogenních siRNA - tzv. trans-acting RNA (ta-siRNA). RDR6 dosyntetizovává komplementární řetězec k transkriptům určitých lokusů, tato dsRNA je posléze enzymem Dicer-like 4 (DCL4) štěpena na 21nt siRNA (Yoshikawa et al., 2005). Cílem ta-siRNA jsou geny podílející se na přechodu rostliny z juvenilní do adultní fáze, rostliny s mutovaným genem pro RDR6 či další komponenty této dráhy mají oproti wild-type rostlinám přechod urychlen (Peragine et al., 2004).

RDR6 jsou rovněž zapojeny do obrany před viry. Zvýšená citlivost k virové infekci byla pozorována u RDR6-deficientních jedinců *Arabidopsis thaliana* (Mourrain et al., 2000) i *Nicotiana benthamiana* (Schwach et al., 2005).

2.2.2. RDR hub

Houby mají stejně jako rostliny čtyři skupiny RDR. Funkce RDR1 a RDR3 zatím nebyla charakterizována.

Shiu et al. (2001) zjistili, že RDR2 je u *Neurospora crassa* nutná pro tzv. meiotické utišení nepárové DNA (meiotic silencing by unpaired DNA - MSUD). MSUD se v životním cyklu *Neurospora crassa* uplatňuje po karyogamii, kdy dojde k umlčení všech genových úseků, které se po splynutí jader vyskytují v lichém počtu kopií nebo jsou na jiných místech genomu, a tedy nedojde k párování DNA. U *Schizosaccharomyces pombe* se RDR2 podílí na ustanovení heterochromatinu. SpRDR2 je součástí RNA-řízeného RNA polymerázového komplexu (RDRC), který spolu s dalšími komplexy asociuje s cílovou sekvencí (Martienssen et al., 2005)

Jednou z nejprostudovanějších RDR je RDR6 *Neurospora crassa*, pojmenovaná jako QDE-1. Podílí se na PTGS, který byl u *Neurospora crassa* pojmenován jako „quelling“ (potlačení) (Cogoni a Macino, 1999). QDE-1 přepisuje transkripty transgenů do dsRNA, ty jsou štěpeny enzymem Dicer na 25nt siRNA, které posléze slouží k určení homologních sekvencí a jejich rozštěpení. Quelling pomáhá chránit před viry a transgeny (Fulci a Macino, 2007).

2.2.3. RDR živočichů

Působení živočišných RDR je nejvíce prozkoumáno u nematoda *Caenorhabditis elegans*. EGO-1 (CeRDR2) je nezbytná pro správný vývoj buněk zárodečné linie. Jí vytvořené siRNA ovlivňují stovky genů, potřebné například pro sestavení kinetochoru a heterochromatinu (Maniar a Fire, 2011). U jedinců s mutantním genem pro EGO-1 se projeví defekty v gametogenezi, takový jedinec je poté sterilní (Smardon et al., 2000). Podobně se projevuje také mutace v genu pro další RDR - RRF-3 (CeRDR1), dochází k defektům při spermatogenezi (Gent et al., 2009).

V rámci živočichů však nebyly nalezeny žádné RDR geny mezi obratlovci a hmyzem, ačkoliv je u těchto organismů RNA interference známa (Schwarz et al., 2002). V posledních letech však byly v těchto organismech objeveny jiné enzymy, které pravděpodobně zastávají roli RDR. Maida et al. (2009) ukázali, že katalytická podjednotka lidské telomerázy (hTERT) v komplexu s RNA komponentou mitochondriální RNA endonukleázy (RMRP) produkuje dsRNA sloužící jako substrát pro tvorbu siRNA. TERT má strukturu „closed right hand“, což ukazuje na její evoluční příbuznost s virovými RdRp a RT (Gillis et al., 2008)

Lipardi a Paterson (2009) dokázali u *Drosophily*, že schopnost RdRp aktivity má největší podjednotka elongačního komplexu RNA polymerázy II, zvaná D-elp1. Na rozdíl od kanonických RDR postrádá typický motiv DxGDG. Protože tuto podjednotku elongátorového komplexu lze najít u všech eukaryot, je tato RdRp aktivita konzervována u homologů elp1 od *S. pombe* po člověka. Vzhledem k tomu, že mnoho z nižších organismů má RDR, lze uvažovat o určité úrovni redundance nebo segregaci funkcí mezi RDR a homology elp1.

3. Fylogenetické vztahy

Katalytické centrum RdRp, stejně jako ostatních polymeráz s „right hand“ strukturou, připomíná RNA-rozeznávající motiv (RNA-recognition motiv - RRM), který je součástí starobylých domén vázající nukleové kyseliny (např. u ribosomálního proteinu S6 nebo pseudouridin syntetázy). Aravind et al. (2002) předpokládají, že první polymerázy se mohly vyvinout z těchto domén, které zřejmě fungovaly jako doplněk samoreplikujících se nukleových kyselin. Posléze se v rámci „palm“ domény mohlo vyvinout aktivní místo vázající ionty kovu a enzym získal schopnost katalýzy.

Katalytické místo RDR a vícepodjednotkových DdRp obsahuje DPBB doménu. DPBB domény zřejmě původně neměly žádnou katalytickou aktivitu, pouze vázaly RNA. Mohly fungovat jako proteinové kofaktory ribozymů (Iyer et al., 2003). Protože RDR jsou, narozdíl od DdRp, přítomné pouze v eukaryotech a kromě katalytického centra není mezi RDR a DdRp více podobností, mohlo dojít podle Iyer et al (2003) ke vzniku RDR na počátku evoluce eukaryot díky rozsáhlým sekvenčním změnám, které u nich následovaly po duplikaci β podjednotek předchůdců DdRp. Jinou alternativu navrhuje Salgado et al. (2006). Původní enzym měl mít jednu DPBB doménu, díky genové duplikaci vznikla molekula se dvěma DPBB doménami na jednom řetězci (stejně jako QDE-1), která měla schopnost RNA polymerizace. Po objevení se DNA mohly tyto molekuly získat schopnost využívat ji jako templát, což mohlo následně pomoci k přechodu na DNA jako nositelku genetické informace. Zároveň došlo k segregaci DPBB domén na dva řetězce, což byl základ pro vznik současných vícepodjednotkových DdRp.

4. Závěr

RNA dependentní RNA polymerázy hrají zásadní roli v „životě“ svých hostitelů. Pro RNA viry jsou nepostradatelné, neboť umožňují replikaci jejich genomu a tím i možnost existence. Buněčné RDR se zásadním způsobem podílejí na RNA silencingu a ovlivňují tím daný organismus v mnoha směrech - při vývoji a růstu, při odpovědi na podněty z okolí, při obraně proti virům atd.

Virové a buněčné polymerázy se liší množstvím a typem poznatků, které o nich víme. Protože RNA viry způsobují mnoho různě závažných onemocnění, výzkumy RdRp se zaměřují především na detailní poznání struktur polymeráz a průběhu samotné polymerázové reakce. To vše za účelem použití RdRp jako cíle pro antivirotika. Velká pozornost je věnována např. viru hepatitidy C.

Studium RDR se zaměřuje spíše než na samotné polymerázy na dráhy, ve kterých tyto polymerázy fungují. Navíc se zdá, že v posledních letech byl vysvětlen rozpor mezi přítomností RNA interference u obratlovců a hmyzu a nepřítomností klasických RDR v jejich genomu.

Jednou z oblastí, na které by se mohlo zaměřit studium RdRp, jsou komplexy, v rámci kterých RdRp fungují, což by mohlo opět přinést poznatky pro vývoj antivirotik (Ferrer-Orta et al., 2009).

V rámci RDR chybí krystalové struktury, které by umožnily detailněji popsat průběh polymerázové reakce a porovnat je s ostatními polymerázami. Protože RDR byly objeveny relativně nedávno, stále zůstává neobjasněna funkce mnoha typů RDR a jejich rozdělení úloh v jednom organismu. S objevem enzymů, které u obratlovců a hmyzu zřejmě zastupují roli RDR, se otevírá nová oblast pro studium. Zároveň vyvstává otázka, proč tomu tak je, proč u těchto skupiny byly „klasické“ RDR potlačeny, anebo naopak, proč u rostlin, hub a nižších organismů zůstaly tyto „klasické“ RDR zachovány.

Studium RNA dependentních RNA polymeráz tak jednak přispívá k vývoji nových léků, a jednak je součástí studia fenoménu RNA silencingu.

5. Přílohy

Seznam dostupných krystalických struktur RdRp

Virus	RNA	PDB	Res (Å)	Popis	Rok
A. Apoenzymy a struktury vázající ionty					
PV typ 1	(+)ss	1RDR	2.4	Partial structure, non-native N-terminus	1997
		1RA6	2.0	Full length, complex with Acetate	2004
		1RAJ	2.5	Δ68-N-terminal truncation	2004
		1TQL	2.3	G1-mutant, complex with Acetate	2004
		2IJD	3.4	3CD precursor, complex with Zn ²⁺ , SO ₄ ²⁻	2007
		2IJF	3.0	G64S mutant	2007
CVB3	(+)ss	3DDK	2.3	Full length, complex with Na ⁺ , SO ₄ ²⁻	2008
HRV-1B	(+)ss	1XR6	2.5	Full length, complex with K ⁺	2004
HRV-14	(+)ss	1XR5	2.8	Full length, complex with Sm ³⁺	2004
HRV-16	(+)ss	1XR7	2.3	Full length native	2004
		1TP7	2.4	Full length, complex with DMX, SO ₄ ²⁻ - MSE	2005
FMDV	(+)ss	1U09	1.9	Full length	2004
NV	(+)ss	1SH0	2.2	Full length native	2004
		1SH2	2.3	Full length, metal-free	2004
		1SH3	3.0	Full length, complex with Mg ²⁺	2004
		2B43	2.3	Full length	2005
SV	(+)ss	2CKW	2.3	Residues 1-496	2007
		2UUT	2.4	D346G mutant	2007
		2U UW	2.8	D347G/D348 mutant	2007
RHDV	(+)ss	1KHV	2.5	Full length, complex with Lu ³⁺	2002
		1KHW	2.7	Full length, complex with Mn ²⁺	2002
HCV typ 1b	(+)ss	1C2P	1.9	Δ21-C-terminal truncation - MSE	1999
		1CSJ	2.8	Δ55-C-terminal truncation - MSE	1999
		1QUV	2.5	Δ21-C-terminal truncation – CHis-tag	1999
		1NB4	2.0	Δ21-C-terminal truncation – CHis-tag	2003
HCV typ 2a	(+)ss	1YUY	1.9	Residues 1-563 – closed form	2005
		1YV2	2.5	Residues 1-548 – open form	2005
BVDV	(+)ss	1S48	3.0	Residues 92-674 – domain swapped	2004
		1S4F	3.0	Residues 92-679 – domain swapped	2004
		2CJQ	2.6	Residues 92-672	2006
WNV	(+)ss	2HCS	2.5	Δ44-N-terminal truncation, complex with Zn ²⁺	2007
		2HCN	2.5	Δ44-N-terminal truncation, complex with Zn ²⁺ , Ca ²⁺	2007
DV	(+)ss	2HFZ	3.0	Full length, complex with Zn ²⁺ , Mg ²⁺	2007
		2J7U	1.9	Residues 273-900, complex with Mg ²⁺ , Zn ²⁺ , Cl ⁻ , PGE	2007
Influenza A	(-)ss	2GMO	NMR	PB2 C-terminal fragment (678-759)	2007
		2VY6	2.0	PB2 C-terminal fragment (538-753)	2008
		2VY8	1.2	PB2 C-terminal fragment (538-693) K627E mutant	2008
		3CW4	2.7	PB2 C-terminal fragment (535-759)	2009
		2W69	2.1	PA N-terminal (1-195), complex with Mn ²⁺ , SO ₄ ²⁻	2009
		3EBJ	2.2	PA N-terminal (1-195), complex with Mg ²⁺	2009
Reovirus	ds	1MUK	2.5	Full length	2002
Phage φ6	ds	1HHS	2.0	Full length, complex with Mn ²⁺	2001
		1HI8	2.5	Full length, complex with Mg ²⁺ - MSE	2001
		1WAC	3.0	Initiation platform mutant	2005

(pokračování)

Virus	RNA	PDB	Res (Å)	Popis	Rok
IBDV	ds	2JL9	3.2	E491Q mutant	2008
		2JLF	3.2	E491Q mutant, Mn ²⁺	2008
		2PGG	2.5	Residues 31-804	2007
		2PUS	2.4	Residues 27-804	2007
		2R72	3.2	Residues 27-804, complex with Mg ²⁺	2007
Rotavirus	ds	2R7O	3.4	Residues 2-1086, NHis-tagged	2008
		2R7Q	2.9	Residues 2-1087, CHis-tagged	2008
B. RdRp komplex s NTP, RNA a proteiny					
PV typ 1	(+)ss	1RA7	2.3	Complex with GTP	2004
		2ILY	2.6	Complex with ATP and Mg ²⁺	2006
		2ILZ	2.5	Complex with GTP and Mn ²⁺	2006
		2IM0	2.3	Complex with CTP and Mg ²⁺	2006
		2IM1	2.5	Complex with CTP and Mn ²⁺	2006
		2IM2	2.4	Complex with UTP and Mg	2006
		2IM3	2.6	Complex with UTP and Mn ²⁺	2006
CVB3		3CDU	2.1	Complex with PP	2008
		3CDW	2.5	Complex with VPg, PP	2008
FMDV	(+)ss	1WNE	3.0	Complex with primer-template	2004
		2D7S	3.0	Complex with VPg	2006
		2F8E	2.9	Complex with VPg-UMP, Mg ²⁺ , Mn ²⁺	2006
		2E9R	2.8	Complex with primer-template, RTP, Mg ²⁺	2007
		2E9T	2.6	Complex with primer-template, 5F-UTP, Mg ²⁺	2007
		2E9Z	3.0	Complex with primer-template, ATP, UTP, Mg ²⁺	2007
NV	(+)ss	2EC0	2.8	Complex with primer-template, ATP, Mg ²⁺	2007
		3BSO	1.7	Complex with primer-template, CTP, Mn ²⁺	2008
		3BSN	1.8	Complex with primer-template, 5-nitro CTP	2008
HCV typ 1b	(+)ss	1GX5	1.7	Complex with GTP, Mn ²⁺ - MSE	2002
		1GX6	1.9	Complex with UTP, Mn ²⁺ - MSE	2002
		1NB6	2.6	Complex with UTP, Mn ²⁺	2003
		1NB7	2.9	Complex with U ₄ , Mn ²⁺	2003
BVDV	(+)ss	1S49	3.0	Complex with GTP – MSE	2004
DV	(+)ss	2J7W	2.6	Complex with 3`-dGTP	2007
Influenza A	(-)ss	2JDQ	2.2	PB2 C-terminal fragment (678-759) with h-Importin α5	2007
		2ZNL	2.3	PA (257-716) complex with PB1 (1-15)	2008
		3CM8	2.9	PA (257-716) complex with PB1 (1-15)	2008
		2VQZ	2.3	PB2 complex with N7-methyl GTP	2008
		1MWH	2.5	Cap complex	2002
		1N1H	2.8	Initiation complex with GTP + template RNA, Mn ²⁺	2002
		1N38	2.8	Short elongation complex	2002
		1N35	2.5	Long elongation complex	2002
		1HHT	2.9	Complex with template RNA	2001
		1HI0	3.0	Complex with GTP + template RNA	2001
Phage φ6	ds	1HI1	3.0	Complex with ATP	2001
		1UVI	2.1	Complex with 6nt RNA	2004
		1UVJ	1.9	Complex with 7nt RNA	2004

(pokračování)

Virus	RNA	PDB	Res (Å)	Popis	Rok
		1UVK	2.4	Dead-end complex	2004
		1UVL	2.0	Complex with 5nt RNA, conformation A	2004
		1UVM	2.0	Complex with 5nt RNA, conformation B	2004
		1UVN	3.0	Ca ²⁺ inhibition complex + RNA + NTP	2004
		2JLG	2.8	Complex with GTP, Mn ²⁺	2008
IBDV	ds	2R70	2.7	Complex with oligopeptide mimicking VP3 C-terminus	2007
Rotavirus	ds	2R7R	2.6	Complex with 7nt RNA	2008
		2R7S	3.2	Complex with 6nt RNA	2008
		2R7T	3.0	Complex with 8nt RNA	2008
		2R7U	3.1	Complex with 7nt RNA	2008
		2R7V	2.8	Complex with 6nt RNA	2008
		2R7W	2.6	Complex with 7nt RNA + mRNA 5'-CAP	2008
		2R7X	2.8	Complex with 7nt RNA + GTP	2008
C. RdRp komplex s inhibitory					
HCV typ 1b	(+)ss	1NHU	2.0	Complex with non-nucleoside inhibitor	2003
		1NHV	2.9	Complex with non-nucleoside inhibitor	2003
		1OS5	2.2	Complex with non-nucleoside inhibitor	2003
		1YVF	2.5	Complex with non-nucleoside inhibitor complex	2005
		1Z4U	2.8	Complex with non-nucleoside inhibitor	2005
		2BRK	2.3	Complex with allosteric inhibitor	2005
		2BRL	2.4	Complex with allosteric inhibitor	2005
		2AWZ	2.2	Complex with covalent inhibitor	2006
		2AX0	2.0	Complex with covalent inhibitor	2006
		2AX1	2.1	Complex with covalent inhibitor	2006
		2D3U	2.0	Complex with thiophene-based non-nucleoside inhibitor	2006
		2D3Z	1.8	Complex with thiophene-based non-nucleoside inh.	2006
		2D41	2.1	Complex with thiophene-based non-nucleoside inh.	2006
		2GC8	2.2	Complex with proline sulfonamide inhibitor	2006
		2GIQ	1.7	Complex with non-nucleoside inhibitor	2006
		2GIR	1.9	Complex with non-nucleoside inhibitor	2006
		2JC0	2.2	Complex with acyl pyrrolidine inhibitor	2007
		2JC1	2.0	Complex with acyl pyrrolidine inhibitor	2007
		2I1R	2.2	Complex with thiazolone inhibitor	2007
		3CIZ	1.9	Complex with small molecule, fragment-based inhibitor	2008
		3CJ0	1.9	Complex with small molecule, fragment-based inh.	2008
		3CJ2	1.8	Complex with small molecule, fragment-based inh.	2008
		3CJ3	1.9	Complex with small molecule, fragment-based inh.	2008
		3CJ4	2.1	Complex with small molecule, fragment-based inh.	2008
		3CJ5	1.9	Complex with small molecule, fragment-based inh.	2008
		3FQK	2.2	Complex with non-nucleoside inhibitor	2009
		3FQL	1.8	Complex with non-nucleoside inhibitor	2009
HCV typ 2a		1YVX	2.0	Complex with non-nucleoside inhibitor	2005
		1YVZ	2.2	Complex with non-nucleoside inhibitor	2005

První sloupec obsahuje zkratku viru (viz Seznam použitých zkratk), druhý odkazuje na formu jeho genomu. Třetí sloupec obsahuje PDB kód dané struktury, čtvrtý sloupec její rozlišení v Å, pátý krátký popis struktury, v šestém slupci je rok, kdy byla struktura získána. [Převzato z Cameron C. E., Moustafa I, M. a Arnold J. J. (2009), Dynamics: The missing link between structure and function of the viral RNA-dependent RNA polymerase?. Curr. Opin. Struct. Biol., 19(6), 768-774]

6. Seznam použité literatury

- Alleman, M., Sidorenko, L., McGinnis, K., Seshadri, V., Dorweiler, J. E., White, J., Sikkink, K., Chandler, V. L. (2006). An RNA-dependent RNA polymerase is required for paramutation in maize. *Nature*, *422* (20), str. 295-298.
- Aravind, L., Mazumder, R., Vasudevan, S., Koonin, E. V. (2002). Trends in protein evolution inferred from sequence and structure analysis. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, *12*, str. 392-399.
- Area, E., Martín-Benito, J., Gastaminza, P., Torreira, E., Valpuesta, J. M., Carrascosa, J., Ortín, J. (2004). 3D structure of the influenza virus polymerase complex: Localization of subunit domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, *101* (1), str. 308-313.
- Arnold, J. J. a Gohara, C. E. (2004). Poliovirus RNA-Dependent RNA Polymerase (3D^{pol}): Pre-Steady-State Kinetic Analysis of Ribonucleotide Incorporation in the Presence of Mg²⁺. *Biochemistry*, *43* (18), str. 5126–5137.
- Baltimore, D., Eggers, H. J., Franklin, R. M., Tamm, I. (1963). Poliovirus-induced RNA polymerase and the effects of virus-specific inhibitors on its production. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, *49*, str. 843-849.
- Bruenn, J. A. (2003). A structural and primary sequence comparison of the viral RNA-dependent RNA polymerases. *Nucleic Acids Res.*, *31* (7), str. 1821-1829.
- Castillo, R. M., Mizuguchi, K., Dhanaraj, V., Albert, A., Blundell, T. L., Murzin, A. G. (1999). A six-stranded double-psi β barrel is shared by several protein superfamilies. *Structure*, *7* (2), str. 227-236.
- Castro, C., Smidansky, E. D., Arnold, J. J., Maksimchuk, K. R., Moustafa, I., Uchida, A., Gotte, M., Konigsberg, W., Cameron, C.E. (2009). Nucleic acid polymerases use a general acid for nucleotidyl transfer. *Nat. Struct. Mol. Bio.*, *16*, str. 212-218.
- Cogoni, C. a Macino, G. (1999). Gene silencing in *Neurospora crassa* requires a protein homologous to RNA-dependent RNA polymerase. *Nature*, *399*, str. 166-169.
- Ferrer-Orta, C., Agudo, R., Domingo, E., Verdaguer, N. (2009). Structural insights into replication initiation and elongation processes by the FMDV RNA-dependent RNA polymerase. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, *19*, str. 752-758.
- Ferrer-Orta, C., Arias, A., Escarmis, C., Verdaguer, N. (2006a). A comparison of viral RNA-dependent RNA polymerases. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, *16*, str. 27-34.
- Ferrer-Orta, C., Arias, A., Agudo, R., Pérez-Luque, R., Escarmis, C., Domingo, E., Verdaguer, N. (2006b). The structure of a protein primer-polymerase complex in the initiation of genome replication. *Embo J.*, *25*, str. 880-888.
- Fraenkel-Conrat, H. (1983). RNA-dependent RNA polymerases of plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, *80*, str. 422-424.
- Fulci, V. a Macino, G. (2007). Quelling: post-transcriptional gene silencing guided by small RNAs in *Neurospora crassa*. *Curr. Opin. Microbiol.*, *10*, str. 199-203.

- Gent, J. I., Schvarzstein, M., Villeneuve, A. M., Gu, S. G., Jantsch, V., Fire, A. Z., Baudrimont, A. (2009). A *Caenorhabditis elegans* RNA-Directed RNA Polymerase in Sperm Development and Endogenous RNA Interference. *Genetics* , 183, str. 1297-1314.
- Gillis, A. J., Schuller, A. P., Skordalakes, E. (2008). Structure of the *Tribolium castaneum* telomerase catalytic subunit TERT. *Nature* , 455 (2), str. 633-637.
- Gohara, D. W., Arnold, J. J., Cameron, C. E. (2004). Poliovirus RNA-Dependent RNA Polymerase (3D^{pol}): Kinetic, Thermodynamic, and Structural Analysis of Ribonucleotide Selection. *Biochemistry* , 43 (18), str. 5149-5158.
- Gong, P. a Peersen, O. B. (2010). Structural basis for active site closure by the poliovirus RNA dependent RNA polymerase. *Proc. Natl. Acad. sci. USA* , 107 (52), str. 22505-22510.
- Gorbalenya, A. E., Pringle, F. M., Zeddam, J. L., Luke, B. T., Cameron, C. E., Kalkmakoff, J., Hanzlik, T. N., Gordon, K. H., Ward, V. K. (2002). The Palm Subdomain-based Active Site is Internally Permuted in Viral RNA-dependent RNA polymerases of an Ancient Lineage. *J. Mol. Biol.* , 324, str. 47-62.
- Hansen, J. L., Long, A. M., Schultz, S. C. (1997). Structure of the RNA-dependent RNA polymerase of poliovirus. *Structure* , 5, str. 1109-1122.
- Chandler, V. L. a Stam, M. (2004). Chromatin conversations: mechanisms and implications of paramutation. *Nature Rev. Genet* , 5, str. 532—544.
- Chen, D. a Patton, J. T. (2000). *De novo* synthesis of minus-strand RNA by the rotavirus RNA polymerase in a cell-free system involves a novel mechanism of initiation. *RNA* , 6, str. 1455-1567.
- Iyer, L. M., Koonin, E. V., Aravind, L. (2003). Evolutionary connection between the catalytic subunits of DNA-dependent RNA polymerases and eukaryotic RNA-dependent RNA polymerases and the origin of RNA polymerases. *BMC Struct Biol* , 3 (1).
- Kao, C. Ch., Singh, P., Eckert, D. J. (2001). *De novo* initiation of viral RNA-Dependent RNA Synthesis. *Virology* , 287, str. 251-260.
- Lesburg, C. A., Cable, M. B., Ferrari, E., Hong, Z., Mannarino, A. F., Weber, P. C. (1999). Crystal structure of the RNA-dependent RNA polymerase from hepatitis C virus reveals a fully encircled active site. *Nat. Struct. Biol.* , 6 (10), str. 937-943.
- Lipardi, C. a Paterson, B. M. (2009). Identification of na RNA-dependent RNA polymerase in *Drosophila* involved in RNAi and transposon suppression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* , 106 (37), str. 15645-15650.
- Mahfouz, M. M. (2010). RNA-directed DNA methylation. *Plant Signaling & Behavior* , 5 (7), str. 806-816.
- Maida, Y., Yasukawa, M., Furuuchi, M., Lassmann, T., Possemato, R., Okamoto, N., Kasim, V., Hayashizaki, Y., Hahn, W. C., Masutomi, K. (2009). An RNA dependent RNA polymerase formed by hTERT and the RNase MRP RNA. *Nature* , 461 (7261), str. 230-235.
- Makayev, E. V. a Bamford, D. H. (2002). Cellular RNA-Dependent RNA polymerase Involved in Posttranscriptional Gene Silencing Has Two Distinct Activity modes. *Mol. Cell* , 10, str. 1417-142.
- Maniar, J. A. a Fire, A. Z. (2011). EGO-1, a *C. elegans* RdRP, Modulates Gene Expression via Production of mRNA-Templated Short Antisense RNAs. *Curr. Biol.* , 21 (6), str. 449-459.

- Martienssen, R., Zaratiegui, M., Goto, D. (2005). RNA interference and heterochromatin in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Trends Genet.* , 21, str. 450-456.
- Mourrain, P., Beclin, C., Elmayan, T., Feuerbach, F., Godon, C. A. (2000). *Arabidopsis* SGS2 and SGS3 genes are required for posttranscriptional gene silencing and natural virus resistance. *Cell* , 101, str. 533-542.
- Ng, K. K. S., Arnold, J. J., Cameron, C. E. (2008). Structure-Function Relationships Among RNA-Dependent RNA Polymerases. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* , 320, str. 137-156.
- Nikonov, A., Juronen, E., Ustav, M. (2008). Functional Characterization of Fingers Subdomain-specific Monoclonal Antibodies Inhibiting the Hepatitis C Virus RNA-dependent RNA Polymerase. *J. Biol. Chem.* , 283 (35), str. 24089-24102.
- O'Reilly, E. K. a Kao, C. C. (1998). Analysis of RNA-Dependent RNA Polymerase Structure and Function as Guided by Known Polymerase Structures and Computer Predictions of Secondary Structure. *Virology* , 252, str. 287-303.
- O'Farrell, D., Trowbridge, R., Rowlands, D., Jäger, J. (2003). Substrate Complexes of Hepatitis C Virus RNA Polymerase (HC-J4): Structural Evidence for Nucleotide Import and De-novo Initiation. *J. Mol. Biol.* , 326, str. 1025-1035.
- Ortín, J. a Parra, F. (2006). Structure and Function of RNA Replication. *Annu. Rev. Microbiol.* , 60, str. 305-326.
- Pandey, S. P. a Baldwin, I. T. (2007). RNA-directed RNA polymerase 1 (RdR1) mediates the resistance of *Nicotiana attenuata* to herbivore attack in nature. *Plant J.* , 50, str. 40-53.
- Peragine, A., Yoshikawa, M., Wu, G., Albrecht, H., Poethig, R. (2004). SGS3 and SGS2/SDE1/RDR6 are required for juvenile development and the production of trans-acting siRNAs in *Arabidopsis*. *Genes & Dev* , 18, str. 2368-2379.
- Sabanadzovic, S., Ghanem-Sabanadzovic, N. A., Gorbalenya, A. E. (2009). Permutation of the active site of putative RNA-dependent RNA polymerase in a newly identified species of plant alpha-like virus. *Virology* , 394, str. 1-7.
- Salgado, P. S., Koivunen, M. R., Makayev, E. V., Bamford, D. H., Stuart, D. I., Grimes, J. M. (2006). The structure of an RNA i Polymerase Links RNA silencing and Transcription. *PLoS Biol* , 4 (12), str. e434.
- Shiu, P. K., Raju, N. B., Zickler, D., Metznerberg, R. L. (2001). Meiotic Silencing by Unpaired DNA. *Cell* , 107, str. 905-916.
- Schiebel, W., Haas, B., Marinkovik, S., Klanner, A., Sängler, H. L. (1993). RNA-directed RNA Polymerase from Tomato Leaves. I. Purification and physical properties. *J. Biol. Chem.* , 16 (5), str. 1185-11857.
- Schwach, F., Vaistij, F., Jones, L., Baulcombe, D. (2005). An RNA-dependent RNA polymerase prevents meristem invasion by potato virus X and is required for the activity but not the production of a systemic silencing signal. *Plant Physiol.* , 138, str. 1842-1852.
- Schwarz, D., Hutvagner, G., Haley, B., Zamore, P. (2002). Evidence that siRNAs function as guides, not primers, in the *Drosophila* and human RNAi pathways. *Mol. Cell* , 10, str. 537-548.

- Smardon, A., Spoerke, J. M., Stacey, S. C., Klein, M. E., Mackin, N. (2000). EGO-1 is related to RNA-directed RNA polymerases and functions in germ-line development and RNA interference in *C. elegans*. *Curr. Biol.* , 10, str. 169-178.
- Takanami, Y. a Fraenkel-Conrat, H. (1982). Comparative studies on ribonucleic acid dependent RNA polymerases in cucumber mosaic virus infected cucumber and tobacco and uninfected tobacco plants. *Biochemistry* , 21 (13), str. 3161-3167.
- van Dijk, A. A., Makeyev, E. V., Bamford, D. H. (2004). Initiation of viral RNA-dependent RNA polymerization. *J. Gen. Virol.* , 85, str. 1077-1093.
- Wassenegger, M. a Krczal, G. (2006). Nomenclature and functions of RNA-directed RNA polymerases. *Trends in Plant Science* , 11 (3), str. 142-151.
- Xie, Q. a Guo, H. S. (2006). Systemic antiviral silencing in plants. *Virus Research* , 118 (1-2), str. 1-6.
- Xie, Z., Fan, B., Chen, C.H., Chen, Z. (2001). An important role of an inducible RNA-dependent RNA polymerase in plant antiviral defense. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* , 98, str. 6516-6521.
- Xie, Z., Johansen, L., Gustafson, A., Kasschau, K., Lellis, A., Zilberman, D., Jacobsen, S. E., Carrington, J. C. (2004). Genetic and functional diversification of small RNA. *PLoS Biol.* , 2, str. 642-652.
- Yamakawa, M., Furuichi, Y., Nakashima, K., La Fiandra, A. J., Shatkin, A. J. (1981). Excess synthesis of viral mRNA 5-terminal oligonucleotides by reovirus transcriptase. *J. Biol. Chem.* , 256, str. 6507-6514.
- Yoshikawa, M., Peragine, A., Park, M. Y., Poethig, R. S. (2005). A pathway for the biogenesis of trans-acting siRNAs in Arabidopsis. *Genes & Development* , 19, str. 2164-2175.
- Yu, D. F. (2003). Analysis of the involvement of an inducible Arabidopsis RNA-dependent RNA polymerase in antiviral defense. *Mol. Plant Microbe Interact* , 16, str. 206-216.
- Zong, J., Yao, X., Yin, J., Zhang, D., Ma, H. (2009). Evolution of the RNA-dependent RNA polymerase (RdRP) genes: Duplications and possible losses before and after the divergence of major eukaryotic groups. *Gene* , 447, str. 29-39.