

**Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta
Katedra genetiky a mikrobiologie**

Význam ITAF ve virových IRES

Vypracovala: Jitka Dubská

Školitel: RNDr. Martin Pospíšek, Ph.D.

Praha 2007

OBSAH

| | |
|--|----|
| Abstrakt a klíčová slova..... | 3 |
| Abstract and keywords..... | 3 |
| 1. SEZNAM ZKRATEK | 4 |
| 2. ÚVOD | 5 |
| 3. VNITŘNÍ VAZEBNÉ MÍSTO PRO RIBOZÓMY (IRES) | 7 |
| 3.1. Experimentální důkaz IRES..... | 8 |
| 3.2. IRESite a IRESdb | 9 |
| 4. IRES VAZEBNÉ PROTEINY (ITAF)..... | 9 |
| 4.1. protein vázající se na polypyrimidinové oblasti (PTB) | 9 |
| 4.2. La autoantigen..... | 11 |
| 4.3. poly(rC) vazebný protein 2 (PCBP2)..... | 15 |
| 4.4. protein 76 vázající dvouřetězcovou RNA (DRBP76)..... | 16 |
| 4.5. protein Unr (produkt genu ležícího před N-ras) | 16 |
| 4.6. Glyceraldehyd-3-fosfátdehydrogenáza (GAPDH) | 17 |
| 4.7. Protein 1 asociovaný s NS1 (NSAP1) | 18 |
| 5. ZÁVĚR | 18 |
| 6. PŘEHLED POUŽITÉ LITERATURY..... | 19 |

Abstrakt: Picornaviry a některé další jednořetězcové RNA viry užívají pro zahájení translace místo čepičkové struktury tzv. IRES element v 5' nepřekládané oblasti RNA. Tento element, na který nasedají ribozomální podjednotky, se nachází v těsné blízkosti AUG iniciačního kodónu a zprostředkovává iniciaci translace i za podmínek, kdy je čepičková struktura funkčně vyřazena. Pro účinné fungování virových IRES elementů je esenciální jejich sekundární struktura a pokud je z nějakého důvodu její integrita narušena, IRES elementy se stávají nefunkčními. ITAF, jakožto RNA vazebné proteiny, mají schopnost se vázat a modifikovat stabilitu struktury IRES elementů tak, aby bylo nasedání ribozomálních podjednotek na IRES co nejvíce usnadněno. Mezi nejprostudovanější zástupce ITAF proteinů patří polypyrimidin vazebný protein (PTB), lidský La autoantigen, poly(rC) vazebný protein 2 (PCBP2). ITAF proteiny prostřednictvím IRES tedy regulují účinnost iniciace translace virové RNA.

Klíčová slova: iniciace translace, IRES, ITAF, PTB, La autoantigen, PCBR, DRBP 76, Unr, GAPDH, NSAP1

Abstract: In the case of picornaviruses and some other ssRNA viruses is cap-dependent translation initiation replaced with direct binding of a ribosome to a specialized RNA element called an Internal Ribosome Entry Site (IRES). IRESs are well-defined and highly structured sequence elements. These elements usually reside in 5'UTR of viral RNA close to AUG initiator codon and thus are able to promote internal translation initiation either by direct binding of 40S ribosomal subunit or through interaction with translation initiation factors. IRES mediated translation initiation occur when cap-dependent translation initiation is inhibited. The activity of an IRES depends on its structural integrity. ITAFs (IRES trans-acting factors) represent a family of RNA binding proteins that can facilitate RNA secondary structure folding. The most remarkable ITAFs are for example: polypyrimidine tract-binding protein (PTB), human La autoantigen, poly(rC)-binding protein 2 (PCBP2). ITAFs control the translation initiation of viral RNA due to their binding to IRES and the modification of these structures.

Keywords: translation initiation, IRES, ITAF, PTB, La autoantigen, PCBP, DRBP 76, Unr, GAPDH, NSAP1

1. SEZNAM ZKRATEK

- ATP – adenosintrifosfát
- CSD – domény chladového šoku (cold-shock domains)
- DRBP 76 – protein 76 vázající dsRNA
- dsRNA – dvouřetězcová ribonukleová kyselina
- eIF – eukaryotický iniciační faktor
- EMCV – virus encephalomyelitidy
- FMDV – virus slintavky a kulhavky (foot-and-mouth disease virus)
- GAPDH – glycerinaldehyd-3-fosfátdehydrogenáza
- GDP – guanosindifosfát
- GTP – guanosintrifosfát
- HAV – virus žloutenky typu A
- HCV – virus žloutenky typu C
- HIV – virus lidského imunodeficitu (human immunodeficiency virus)
- HRV2 – lidský rhinovirus typu 2
- IRES – vnitřní vazebné místo pro ribozóm (internal ribosome entry site)
- ITAF – faktory *trans* aktivující IRES elementy (IRES trans-acting factor)
- NF45 – jaderný faktor aktivovaných T-buněk
- nt – nukleotid
- ORF – otevřený čtecí rámec (open reading frame)
- PCBP – poly(rC) vazebný protein
- PKR – protein kináza R (dsRNA-dependent protein kinase)
- PTB – protein vázající se na polypyrimidinové oblasti (polypyrimidine tract-binding protein)
- PV – virus dětské obrny (poliovirus)
- RNA – ribonukleová kyselina
- RNP – ribonukleoprotein
- RRM – motiv rozeznávající RNA
- ssRNA – jednořetězcová RNA
- TAR – transaktivační element (transactivation response element)
- Unr – protein kodovaný genem ležícím před N-ras (upstream of N-ras)
- UTR – nepřekládaná oblast (untranslated region)

2. ÚVOD

Translace je proces, při kterém se v organizmech syntetizují proteiny. Proteiny jsou velice důležité, neboť se uplatňují ve všech pochodech probíhajících v buňce, od replikace nukleových kyselin, přes výstavbu buněk a tkání až po regulaci těchto dějů samotných. Zahájení (iniciace) translace probíhá ve většině případů pomocí tzv. čepičky, ale za jistých okolností (které vyřadí čepičku) se uplatňují i jiné modely iniciace translace. Jednou z alternativních cest je právě iniciace pomocí vnitřního vazebného místa pro ribozóm (IRES).

Na čepičce závislá iniciace translace (viz obr. 1. panel A.) u eukaryot je souhrn dějů, který můžeme zjednodušeně nastínit ve třech krocích.

Nejprve se vytvoří 43S komplex. Eukaryotické iniciační faktory eIF3 a eIF1A se naváží na 40S podjednotku. Pod vlivem faktoru eIF2B dojde k výměně GDP za GTP na eIF2. Komplex eIF2-GTP se spojí s iniciátorovou Met-tRNA_i a vznikne ternární komplex eIF2-GTP-Met-tRNA_i. Spojením ternárního komplexu s eIF3-40S-eIF1A vzniká tzv. 43S komplex.

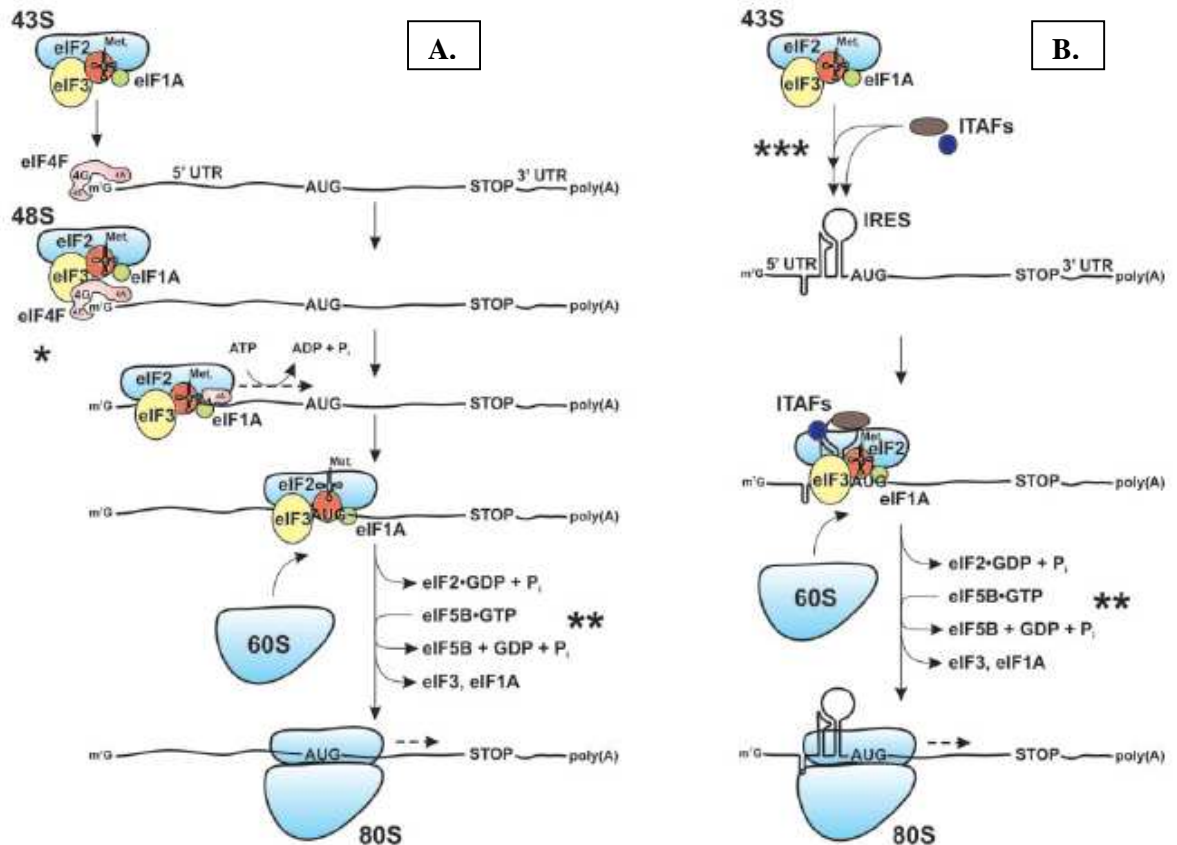
V druhém kroku vznikne komplex 48S. Komplex 43S se přes eIF4E naváže na methylguanidinovou čepičku (m⁷GpppN), která se nachází na 5'konci mRNA. eIF4E je součástí eIF4F, jehož další komponentou je eIF4G a eIF4A. eIF4A má helikázovou aktivitu, čímž rozvolňuje sekundární strukturu mRNA.

Posledním krokem je prohledávání (skenování) 5'UTR mRNA ve směru od 5'konce k 3'konci. Tento krok se děje za podpory eIF4A a v okamžiku, kdy 48S narazí na iniciační kodón (kterým je první AUG triplet po proudu translace, vzdálen od 5'koncové čepičky většinou 50 – 100 nukleotidů (Pestova et al. 2001)), se ribozóm zachytí kodón – antikodónovou interakcí. Za hydrolyzy GTP a působení faktoru eIF5B se uvolní komplex eIF2-GDP a faktory: eIF3 a eIF1A. Nakonec se připojí 60S podjednotka, čímž vzniká 80S ribozóm. Překlad je tímto zahájen.

Iniciace translace pomocí IRES struktury (viz obr 1. panel B.)

U některých virů neprobíhá iniciace translace na čepičce závislým mechanismem, jak je popsáno výše, nýbrž pomocí tzv. IRES struktury. IRES struktura je až několik stovek nukleotidů dlouhá sekvence v 5'UTR oblasti RNA, tvořící zpravidla stabilní sekundární strukturu, na kterou se přímo nebo přes eukaryotické iniciační faktory (eIF) váže malá ribozomální podjednotka. IRES elementy leží v těsné blízkosti iniciačního AUG kodónu, což celý proces výrazně zjednodušuje, neboť je vynechán krok prohledávání RNA.

Iničiačným AUG, na rozdiel od iniciácie závislé na čepičke, nebýva prvý (5'proximálny) triplet. IRES elementy pro svou funkci sice také vyžadují faktory eIF, ale na rozdiel od majoritního způsobu zahájení translace však mají tyto nároky poněkud skromnější. Aktivita mnohých IRES může být navíc modulována tzv. ITAF proteiny, které proces nasednutí iničiačného komplexu malé ribozomální podjednotky usnadňují.



Obr. 1. Schématické znázornění iniciace translace

A. na čepičce závislým mechanismem (eukaryota)

B. pomocí IRES struktury (požadavek na faktory eIF či ITAF proteiny se pro různé viry liší)

Převzato z Komar a Hatzoglou (2005)

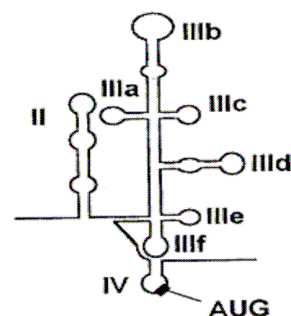
Souhrnně lze výhody a charakteristiky iniciace translace pomocí IRES elementů vytyčit do následujících tří bodů:

- 1) iniciace translace virové RNA řízené pomocí IRES struktury probíhá i v podmínkách, kdy je potlačena iniciace translace pomocí čepičky
- 2) IRES má obecně nižší požadavky na faktory eIF

3) aktivita IRES je velice často ještě modulována tzv. ITAF proteiny (nároky na eIF faktory a ITAF proteiny se různí pro IRES z různých virů)

3. VNITŘNÍ VAZEBNÉ MÍSTO PRO RIBOZÓMY (IRES)

Obr. 2. Organizace IRES struktury v RNA HCV
Převzato z Martinez *et al.* (2001)



Jako první byl IRES element prokázán u RNA viru dětské obrny (poliovirus – PV; Pelletier a Sonenberg 1988) a dalšího picornaviru - viru encephalomyelitidy (EMCV; Jang *et al.* 1988). Původně se tato struktura označovala jako „ribosome landing pads“ (Pelletier a Sonenberg 1988). Jedná se o přibližně 300 – 600 nukleotidů dlouhou sekvenci v sousedství AUG iniciačního kodónu, která se nachází ve virových 5'UTR. Tato část RNA je u různých virů různě dlouhá – v porovnání 650 nt u rhinoviru *versus* 1300 nt u EMCV (Belsham a Sonenberg 1996). Doposud vůbec nejkratší virová IRES struktura v délce 231 nukleotidů byla zjištěna u viru hepatitidy C (HCV), a to konkrétně v úseku 101 – 332 nt (Tsukiyama-Kohara *et al.* 1992). Ukazuje se však, že i oblasti v bezprostřední blízkosti IRES tohoto viru hrají určitou roli v kontrole iniciace translace (Pudi *et al.* 2003). Při studiu IRES struktury HCV RNA se mimo jiné osvědčila i elektronová mikroskopie, pomocí které se např. podařilo odhalit velikosti jednotlivých domén IRES struktury tohoto viru, nebo se zjistilo, že doména II a doména III navzájem svírají úhel od 70° do 130° s průměrem 95° (Beales *et al.* 2001).

Tabulka modelových IRES v RNA virech

| | | | citace |
|-----------------------------|-------------|------------------------------|---------------------------------------|
| Pozitivní ssRNA viry | | | |
| Picornaviridae | Enterovirus | poliovirus | Pelletier and Sonenberg, 1988 |
| | Rhinovirus | lidský rhinovirus | Borman and Jackson, 1992 |
| | Cardiovirus | virus encephalomyelitidy | Jang <i>et al.</i> , 1988, 1989 |
| | Aphthovirus | virus slintavky a kulhavky | Belsham and Brangwyn, 1990 |
| | Hepatovirus | virus žloutenky A | Glass <i>et al.</i> , 1993 |
| Flaviviridae | Hepacivirus | virus žloutenky C | Tsukiyama-Kohara <i>et al.</i> , 1992 |
| RNA retroviry | | | |
| Retroviridae | Lentivirus | virus lidského imunodeficitu | Buck <i>et al.</i> , 2001 |

IRES struktury se vyskytují i v buněčných mRNA a uplatňují se za podmínek, kdy je znemožněna iniciace translace pomocí čepičky. Takovými podmínkami je apoptóza, mitóza a stresové podmínky, konkrétně nedostatek růstových faktorů či živin, teplotní šok, ozařování UV světlem, hypoxie či virová infekce. V poliovirem infikovaných buňkách např. dochází v důsledku štěpení eIF4G faktoru poliovirovou proteázou či defosforylace eIF4E vazebných proteinů (nutných pro vazbu eIF4E na eIF4G) k snížení hladiny iniciačního komplexu eIF4F. To má za následek inhibici na čepičce závislé translace. Buněčné IRES jsou výrazně menší (průměrně 150 – 300 nt) a většinou jsou i mnohem méně účinné ve srovnání s většími, vysoce strukturovanými IRES virovými. (Komar a Hatzoglou 2005).

U piconavirů se IRES struktury rozdělují podle primární sekvence a sekundární struktury do tří skupin. Do první skupiny patří rhino- a enteroviry (včetně polioviru), do druhé skupiny pak cardio- a aphthoviry (zahrnující mimo jiné EMCV a FMDV) a do třetí skupiny virus hepatitidy A (HAV) (Jackson a Kaminski 1995).

Připojování ribozómů na IRES struktury je zprostředkováno celou řadou buněčných proteinů, které můžeme rozdělit do dvou skupin. První velkou skupinou jsou eukaryotické iniciační faktory (eIF) a druhou skupinu tvoří tzv. ITAF proteiny. IRES elementy různých virů se ve svých nárocích na přítomnost zástupců obou těchto skupin značně rozcházejí. Piconavirové IRES např. vyžadují - mimo eIF4 – veškeré eukaryotické iniciační faktory a navíc ještě řadu ITAF proteinů, zatímco IRES element viru hepatitidy C, jakožto zástupce flavivirů, je - mimo eIF2 a eIF3 – funkčně nezávislý na eIF faktorech i ITAF proteinech. To ovšem neznamená, že přítomnost některých ITAF proteinů nezvyšuje aktivitu IRES struktury tohoto viru.

3.1. Experimentální důkaz IRES

Při pokusech zaměřených na detekci IRES struktur se nejčastěji užívá bicistronního vektoru (Pelletier a Sonenberg 1988). Vektorová mRNA opatřená čepičkou na 5'konci obsahuje dva otevřené čtecí rámce (ORF) dvou různých reportérových genů (neboli cistronů). Mezi tyto cistrony je vložena sekvence potencionální IRES struktury. Syntéza z prvního genu tedy probíhá pod kontrolou čepičky, zatímco druhý gen odráží míru translace pomocí IRES. Mezi nejčastěji užívané cistrony patří gen pro chloramfenikolacetyltransferázu (CAT), Renilla a Firefly luciferázu (RLuc a FLuc), thimidinkinázu (TK) a EGFP.

Dalším důkazem přítomnosti IRES struktury může být inhibice translace pomocí analogu čepičky (m^7GpppG) a to v systému monocistronním nebo opět v uspořádání bicistronního systému popsaného výše. Pokud dojde k zastavení translace jen z prvního genu, znamená to, že syntéza z druhého genu je na čepičce nezávislá.

3.2. IRESite a IRESdb

Česká IRESite a francouzská IRESdb jsou databáze shromažďující data týkající se IRES struktur. Data zveřejněná na IRESite zahrnují: původ, velikost, sekvenci, strukturu, relativní pozici vzhledem k okolním kódujícím oblastem, negativní i pozitivní kontroly užitá při experimentu, ITAF proteiny a mnohé další informace (Mokrejs *et al.* 2006). Ke dnešnímu dni poskytuje IRESite informace o většině doposud známých IRES elementů, a to jak buněčného, tak virového původu. Oproti tomu z IRESdb získáme data literárního charakteru. IRESdb není od prosince roku 2002 aktualizována.

Obě tyto databáze a veškeré informace na nich zveřejněné jsou volně přístupné na webovských stránkách: www.iresite.org a www.rangueil.inserm.fr/IRESdatabase.

4. IRES VAZEBNÉ PROTEINY (ITAF)

ITAF – neboli IRES trans-acting factors – jsou proteiny, které se váží na IRES struktury a ovlivňují jejich funkci. Předpokládá se, že ITAF proteiny fungují jako RNA chaperony, modifikují strukturu RNA tak, aby co nejvíce umožnily nasednutí 43S komplexu. Tato hypotéza je opřena především o společný znak ITAF proteinů, kterým jsou početné RNA vazebné domény (RRM u PTB a La, KH u PCBP2, CSD u Unr – podrobněji dále). Z těchto hledisek má z ITAF největší vliv protein vážící polypyrimidinové oblasti - PTB (Spriggs *et al.* 2005). Dalšími významnými ITAF proteiny jsou: La autoantigen, poly(rC) vazebný protein 2 (PCBP2), protein 76 vážící dvouřetězcovou RNA (DRBP76), Unr, glycerinaldehyd-3-fosfátdehydrogenáza (GAPDH) a řada dalších.

Interakce mezi ITAF proteiny a IRES strukturami je obvykle zjišťována pomocí metody UV kroslinkování.

4.1. protein vážící se na polypyrimidinové oblasti (PTB)

PTB (též nazývaný p57) je 57 kDa velký RNA vazebný protein (Jang a Wimmer 1990), který se hojně vyskytuje v různých tkáních a váže se na oligopyrimidinové oblasti RNA (tedy UC bohaté sekvence o 12 – 15 nukleotidech). PTB patří do rodiny tzv. heterogenních

ribonukleoproteinů (hnRNP), které se účastní sestavování proteinových komplexů na pre-mRNA eukaryot. PTB (hnPRNP I) konkrétně hraje důležitou roli v sestavování spliceozómu (Patton *et al.* 1991) a následně sestřihu pre-mRNA.

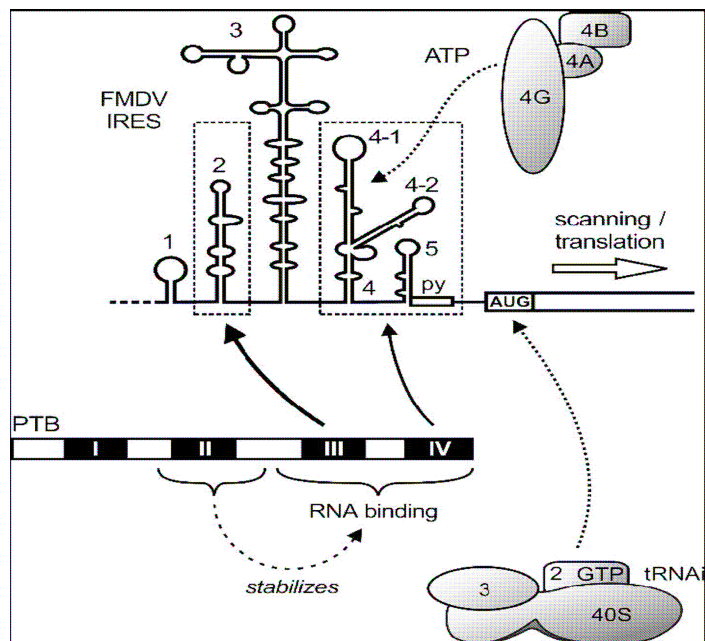
Protein PTB má čtyři vysoce konzervované domény rozpoznávající RNA motivy (domény RRM1 – RRM4; Wagner a Garcia-Blanco 2001), pomocí kterých je zprostředkován kontakt s IRES strukturou. Všechny čtyři domény dlouhé přibližně 80 aminokyselin vykazují poměrně vysokou vzájemnou podobnost (Kenan *et al.* 1991).

PTB reguluje aktivitu IRES struktur u viru dětské obrny, žloutenky typu A a C, EMCV, FMDV, ve spolupůsobení s Unr pak ještě rhinoviru a dále i některých buněčných IRES, jako např. IRES v mRNA pro faktor aktivující apoptotickou proteázu Apaf-1 (Mitchell *et al.* 2003).

Detaily vazby PTB na virové IRES na modelu viru slintavky a kulhavky (FMDV)

Obr. 3. Schématické znázornění interakce PTB a faktorů eIF s IRES FMDV

Převzato z Song *et al.* (2005)



IRES struktura tohoto viru obsahuje dvě vazebná místa pro PTB, která jsou navzájem oddělena dlouhou vlásenkou 3 (viz obr 3.). Na C-koncové části proteinu jsou domény III a IV. Tyto domény se váží na PTB vazebná místa na IRES tak, že každá doména interaguje jen s jedním vazebným místem. Doména III interaguje s vlásenkou 2, doména IV pak s 3'koncovou oblastí RNA viru, konkrétně vlásenkou 4-2, 5 a oligopyrimidinovou oblastí. (V 3'koncové oblasti se též nachází vazebné místo pro eIF4G a eIF4B, tedy doména 4-1).

Tímto je zaručena orientace vazby (celé viz obr. 3.). Jen v minimální míře dochází k vazbě dvou různých PTB na dvě vazebná místa v jednom IRES. Na N-koncové části proteinu PTB leží doména I a doména II. Doména I se s největší pravděpodobností přímé vazby s RNA vůbec neúčastní, zatímco doména II stabilizuje RNA, která již je v kontaktu s doménami III a IV. Všechna tato tvrzení podporuje experiment, v němž Song *et al.* (2005) použili PTB s delecemi jednotlivých domén. Chybění domény II mělo za následek značné snížení stability vazby PTB s IRES. Oproti tomu delece domény I způsobila snížení vazebné stability RNA jen nepatrně. Delece jedné z domén III nebo IV (samostatně) vždy vedla k úplnému přerušení vazby PTB s IRES.

Způsob, jakým PTB stimuluje aktivitu IRES u FMDV a tudíž pozitivně ovlivňuje iniciaci translace, je posílení vazby iniciačního faktoru eIF4G na IRES strukturu. Takovýto účinek je PTB schopno dosáhnout i v případě, že obsahuje jen výše zmíněné C-koncové domény (tedy pouze domény III a IV). Domény I a II mohou být deletovány bez ztráty stimulačního účinku proteinu na vazbu iniciačního faktoru na IRES (Song *et al.* 2005). Pro vazbu PTB na IRES není třeba ATP, naopak vazba eIF4B přítomnost ATP striktně vyžaduje. Přestože se IRES FMDV a EMCV svou sekundární strukturou dosti podobají, způsob vazeb PTB proteinů k jednotlivým IRES se různí. Zatímco je u FMDV síla vazby k RNA výrazně posunuta ve prospěch C-koncové části PTB, u EMCV se na RNA váží oba konce stejně silně. Song *et al.* (2005) tak dokázali, že na vazbě s EMCV IRES se přímo podílejí všechny čtyři domény.

4.2. La autoantigen

Lidský La autoantigen, 52 kDa velký RNA vazebný protein, je cílem pro autoimunitní reakce v organizmech pacientů se systémovým lupus erythematoses a Sjögnerovou chorobou (Tan, 1989). Charakteristickým rysem je jeho evoluční neměnnost od kvasinek až po člověka a výskyt jak v jádře, tak v cytoplazmě široké škály buněk.

Hühn *et al.* (1997) rozšířili poznatek o schopnosti La rozvolňovat DNA-RNA hybridy o zjištění, že La je ATP-dependentní enzym rozvolňující dsRNA. Takováto dsRNA však musí mít alespoň jeden 3'přesahující konec. Tím, že La rozvolňuje dsRNA zároveň působí jako inhibitor protein kinázy PKR, jejíž kinázová aktivita je závislá na přítomnosti dsRNA (Langland *et al.* 1999).

La protein (nebo též p52 či SS-B) obsahuje tři RRM (viz obr. 3), RRM1 a RRM2 na N-koncové polovině proteinu a RRM3 na počátku C-konce. (C-konec navíc obsahuje homodimerizační doménu, jejíž delece se u viru dětské obrny projevuje zastavením stimulačního účinku La proteinu na IRES (Pudi *et al.* 2003)). Každý ze tří RRM motivů hraje nezastupitelnou úlohu při vazbě La antigenu na RNA, ale role RRM3 je přece jen nejvýraznější.

Obr. 4. Počítačová analýza domén rozeznávajících RNA (RRM domén)

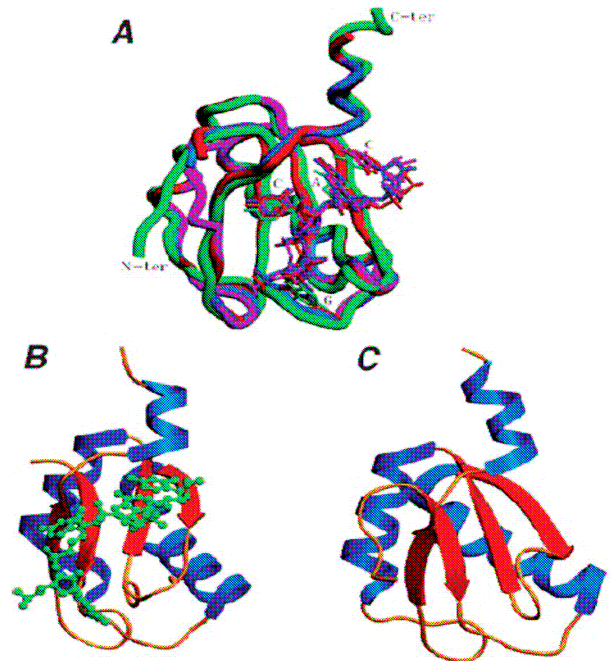
A. trojrozměrný model superpozice čtyř proteinů obsahujících RRM domény. Každý protein je znázorněn jinou barvou. V modelu je zachyceno i umístění GCAC sekvence na navázané RNA

B. trojrozměrný model RRM2 vázaného na GCAC motiv RNA

C. trojrozměrný model RRM3

Struktury α -helixů jsou vyznačeny modře, β -listů červeně

Převzato z Pudi *et al.* (2003)



N-konec jako celek udává La antigenu jeho stimulační vliv na translaci. Na C-konci je přítomna ještě navíc oblast bazických a kyselých aminokyselin (Goodier *et al.* 1997), přičemž oblast bazických aminokyselin je důležitá pro schopnost La proteinu vůbec rozpoznat 5'UTR RNA. Bylo prokázáno, že La autoantigen interaguje s mnohými buněčnými mRNA i virovými RNA, konkrétně např. s 5'UTR u viru dětské obrny, zarděnek, vztekliny, chřipky, vezikulární stomatitidy, TAR elementy HIV a HCV, kde interaguje nejen s 5', ale i s 3'UTR (Spangberg *et al.* 2001). U posledně jmenovaného viru, tedy HCV, byly dokonce prokázány tři formy La proteinu interagující s HCV RNA. Dvě z těchto forem se velikostně pohybují okolo 50/52 kDa, poslední forma proteinu je velká 43 kDa a soudí se, že vznikla jako produkt štěpení formy 50/52 kDa (Ali *et al.* 2000). Zajímavé je, že interakce s 5'UTR HCV RNA se účastní C-konec, zatímco vazbu s 5'UTR RNA polioviru tvoří N-koncová část La proteinu (Pudi *et al.* 2003).

Mechanismus vazby a účinku La autoantigenu na RNA viru hepatitidy C (HCV)

Genomová RNA u HCV je přibližně 9,5 kb velká, skládá se z 5'UTR (viz obrázek 5.), jednoho dlouhého ORF kódujícího virový polyprotein a 3'UTR. 5'UTR (341 nt dlouhá), na

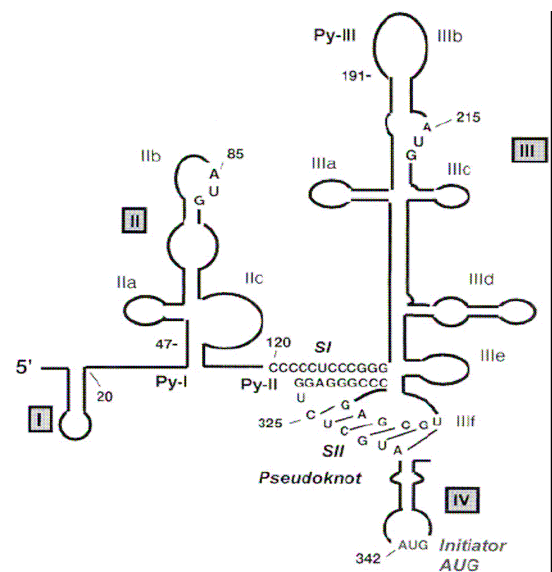
jejíž 3'konec se váže La protein (Ali *et al.* 1997), je vysoce strukturovaná oblast s množstvím AUG kodónů a oligopyrimidinových oblastí (Py úseky). Tvoří sekundární strukturu představující čtyři domény (doména I – IV) a jeden pseudoknot v blízkosti iniciačního kodónu AUG (Brown *et al.* 1992) Doména I není součástí IRES struktury a nejspíše se účastní RNA replikace. Domény II (10 nm velká) a doména III (největší doména, 18 nm velká) jsou oproti tomu komplexní struktury skládající se z množství vlásenek, které tvoří funkční element IRES (Tsukiyama-Kohara *et al.* 1992) a pro vazbu La autoantigenu jsou nepostradatelné. Tuto domněnku potvrdil pracovní tým Ali a Siddiqui (1997). Delecí upravená 5' nekódující oblast RNA viru HCV, které postrádala doménu III, nebyla schopna tvořit vazbu s La proteinem. Doména IV (nejmenší, jen 2 nm velká doména) tvoří vlásenku zahrnující AUG iniciační kodón na pozici 342 - 344 nt a GCAC motif na pozici 346 – 349 nt (místo pro vazbu La proteinu) a hraje tak klíčovou roli v regulaci iniciace translace RNA viru žloutenky typu C (Kamoshita *et al.* 1997). Jak již bylo výše řečeno, 5' nepřekládaná oblast RNA tohoto viru obsahuje více kodónů AUG, ale právě kodón ³⁴²AUG je nutný pro interakci La proteinu s HCV RNA. Důkazem tohoto tvrzení je měření skupiny Ali a Siddiqui (1997), kteří užili fragmentu 1 – 131 nt 5'UTR obsahujícího neiniciační AUG kodón na pozici 85 nt. Takovýto fragment, který iniciační ³⁴²AUG neobsahoval, nebyl schopen interakce s La autoantigenem. Fakt, že iniciační AUG kodón je důležitý pro IRES zprostředkovanou iniciaci translace HCV RNA, je patrný i dalšího pokusu. Mutace iniciačního AUG na AAG výrazně snížila efektivitu translace (Reynolds *et al.* 1995).

Obr. 5. Schématické znázornění sekundární struktury 5' nekódující oblasti genomové RNA viru HCV

Py I – III označují polypyrimidinové oblasti (místa vazby PTB proteinu): Py I leží v oblasti 37 – 45 nt, Py II v oblasti 120 – 130 nt a na Py III připadá sekvence 191 – 199 nt

Římskými číslicemi v rámečcích jsou označeny vlásenky I - IV

Převzato z Ali *et al.* 2000



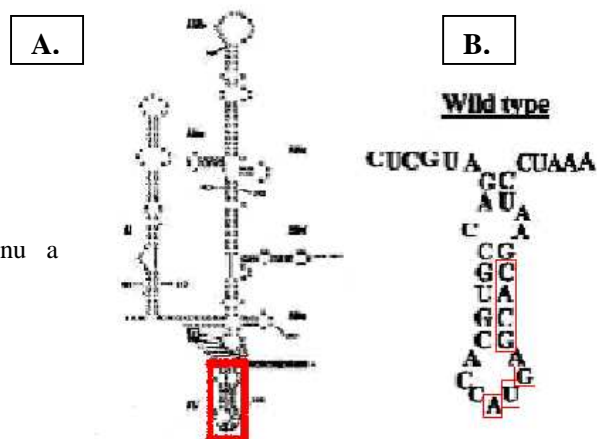
Funkce HCV IRES je nezávislá na přítomnosti jakýchkoliv iniciačních faktorů, ať už eukaryotických (eIF) – mimo eIF2 a eIF3 (Pestova et al. 1998) či ITAF a dokonce i hydrolýze ATP. V praxi to znamená, že pro vytvoření 48S komplexu na HCV IRES není třeba žádné z výše zmíněných komponent.

Na HCV RNA jsou schopny se vázat oba konce (N- i C-konec) La proteinu *in vivo* a oba konce jsou důležité pro stimulaci iniciace translace pomocí IRES struktury. Pudi et al (2003) dokázali, že nejvyšších stimulačních účinků je dosaženo při současné přítomnosti obou polovin La proteinu, i když stimulační účinky jsou do určité míry schopny i oba konce La proteinu přidané samostatně. RRM2 se váže do oblasti okolo GCAC motivu (346 – 349 nt), který leží za iniciačním kodónem. Ukázalo se totiž, že pro rozpoznání HCV RNA jsou důležité i oblasti ležící okolo iniciačního AUG, a sice právě sekvence GCAC - viz obr. 6. (Pudi et al. 2003). RRM3 s největší pravděpodobností vyhledává jiné vazebné místo, neboť absence jak sekvence GCAC, tak iniciačního kodónu AUG ovlivnila jeho afinitu k HCV RNA jen zcela nepatrně (Pudi et al. 2003). Změnou sekvence GCAC u iniciačního kodónu se výrazně zhoršila translace pomocí IRES a to jak *in vitro*, tak *in vivo* (Pudi et al. 2004).

Obr. 6. IRES element HCV RNA

A. Sekundární struktura HCV IRES

B. Znárodnění rozložení iniciačního AUG kodónu a sekvence GCAC na vlásence IV HCV IRES



Převzato z Pudi et al. 2004

Míru afinit jednotlivých RRM k RNA studovali Ali et al. (2000) a došli k závěru, že nejvyšší afinitu vykazuje RRM2, nižší pak RRM3 a téměř zanedbatelnou RRM1. Svoje tvrzení opřeli o výsledky s různě rozsáhlými delecemi v La autoantigenu. La protein, v němž zůstala oblast 1. – 103. aminokyseliny (tzn. pouze RRM1) vůbec neinteragoval s 5'UTR HCV RNA, zatímco pokud zůstala zachována sekvence 1. – 160. aminokyselin (tzn. celá RRM1 včetně části RRM2) afinita byla zachována, jen v menší intenzitě než u kompletního La autoantigenu. RRM1 sama o sobě sice RNA neváže, ale výrazně se podílí na rozpoznávání polyU oblastí v RNA (Maria et al. 1994).

Navázání La proteinu na RNA viru HCV poblíž iniciačního kodónu AUG způsobí konformační změnu RNA, neboť La protein má schopnost rozvolňovat dsRNA (Huhn *et al.* 1997). To v důsledku umožní lepší nasednutí 40S ribosomální podjednotky (Pudi *et al.* 2004). 40S ribosomální podjednotka se přímo váže pomocí ribosomálního S5 proteinu na doménu III (Fukushi *et al.* 2001).

Negativním regulátorem La proteinu je I-RNA, jen 60 nt dlouhá inhibitorová RNA, která zablokuje jeho interakci se všemi vazebnými místy na HCV RNA (Das *et al.* 1998).

4.3. poly(rC) vazebný protein 2 (PCBP2)

RNA picornavirů má omezenou kódovací kapacitu a viry jsou tudíž nuceny využít hostitelského aparátu napadené buňky k úspěšnému dokončení infekčního cyklu. PCBP2 (též zvaný hnRNP E2 či α CP-2) je právě takovýmto hostitelským proteinem, který virus využívá ve svůj prospěch. PCBP2, interagující s 5'UTR oblastmi všech picornavirů, se účastní iniciace translace i syntézy virové RNA.

PCBP1, izoforma proteinu PCBP2 (83% sekvenční homologie a dokonce 90% shoda na úrovni aminokyselin), se váže na vlásenku I virové RNA s téměř identickou afinitou, jakou vykazuje PCBP2, ale afinita PCBP1 k vlásence IV je oproti PCBP2 omezená. PCBP1 (znám také pod označením hnRNP E1 či α CP-1) navíc pozitivně ovlivňuje RNA replikaci (stejně jako jeho izoforma), ale iniciaci translace už stimulovat nedokáže. Tento handicap je dán jeho neschopností vytvořit funkční RNP komplex s vlásenkou IV (Walter *et al.* 2002).

Mechanismus vazby PCBP2 na poliovirus (PV)

RNA viru dětské obrny zahrnuje přibližně 750 nt dlouhou 5'UTR oblast, která obsahuje sedm či osm AUG kodónů (Pelletier a Sonenberg 1988).

PCBP2, buněčný RNA vazebný protein, se skládá se ze tří KH (z angl. K-homology) RNA vazebných domén a má vazebnou preferenci pro poly(rC) sekvenci, která je podle studií provedených *in vitro* (Dejgaard a Leffers 1996) zajištěna doménami KH 1 a KH 3. Doména KH 1 je hlavním RNA vazebným a naprosto esenciálním prvkem pro iniciaci translace a replikaci PV RNA. Doména KH 2 není zapotřebí ani pro jeden z výše uvedených kroků, zato doména KH 3 je opět nutná pro iniciaci translace, nikoli už pro replikaci. PCBP2 se váže na 5'koncovou vlásenku IV a tvoří tak RNP komplex, který je nezbytný jak pro zajištění replikace poliovirové RNA, tak pro funkci IRES struktury.

PCBP2 je schopen se vázat i na vlásenku I (jak již bylo řečeno výše), ale s nižší afinitou, než k vlásence IV (Walter *et al.* 2002).

PCBP2 je schopen tvořit homodimery či interagovat s jinými hnRNP proteiny, jako jsou PTB (resp. hnRNP I), hnRNP K či hnRNP L.

4.4. protein 76 vázající dvouřetězcovou RNA (DRBP76)

DRBP76 je RNA vazebný protein s dvěma dsRNA vazebnými motivy (Merrill *et al.* 2006). DRBP76 tvoří heterodimer se 45 kDa velkým jaderným faktorem aktivovaných T-buněk, s NF45. Tento komplex (DRBP76:NF45) je schopen navázat se na IRES strukturu lidského Rhinoviru typu 2 (HRV2) v neuronech a zablokovat translaci (Merrill a Gromeier 2006). Dokonce se ukázalo, že DRBP76 nejenže je sám negativním regulátorem translace, ale navíc je i substrátem pro protein kinázu PKR, která má schopnost inhibice translace díky fosforylaci eIF2 (Langland *et al.* 1999). Jiný neuropatogen – poliovirus – je proti působení inhibičního účinku DRBP76 imunní, neboť DRBP76 se na PV IRES vůbec neváže.

4.5. protein Unr (produkt genu ležícího před N-ras)

Unr, člen rodiny proteinů chladového šoku, které váží jednořetězcové nukleové kyseliny (více RNA, než DNA), je tvořen pěti doménami chladového šoku (CSD; Doniger *et al.* 1992).



Obr. 7. Schématické znázornění Unr proteinu

Černě jsou vyznačeny CSD domény, čísla označují první a poslední aminokyselinový zbytek jejich pozice
Převzato z Hunt *et al.* (1999)

CSD je nejvíce konzervovaná sekvence vážící nukleové kyseliny. Vykazuje více jak 40% identitu a nejméně 60% sekvenční podobnost mezi baktériemi a obratlovci. Účast CSD domén byla prokázána v mnoha buněčných pochodech, stimulace translace závislé na IRES struktuře nevyjímaje (Graumann a Marahiel 1998). Konkrétně je Unr vyžadováno pro funkci IRES elementu HRV a polioviru (Hunt *et al.* 1999 a Boussadia *et al.* 2003) a mnohých buněčných IRES, jako např. v mRNA pro Apaf-1 (Mitchell *et al.* 2003).

IRES elementy HRV a PV RNA patří do společné skupiny (viz kapitola 3.) a oba dva pro svou funkci vyžadují spolupůsobení dvou ITAF proteinů, a sice Unr a PTB (Hunt *et al.* 1999). Boussadia *et al.* (2003) zjistili, že nejvyšší stimulace rhinovirového IRES je

dosaženo, pokud se na tuto strukturu nejprve naváže Unr, poté se připojí PTB a celý tento komplex ještě stimuluje protein PCBP2. Zajímavé však je, že samotný PCBP2 nemá na funkci IRES struktury tohoto viru žádný vliv.

Exprese Unr proteinu je závislá na IRES v 5'UTR oblasti UNR. UNR IRES obsahuje dvě oblasti bohaté na pyrimidin (257 – 270 nt a 335 – 355 nt), na které se může vázat PTB (Singh *et al.* 1995). Při nadbytku PTB dochází k inhibici UNR IRES a tedy k zastavení exprese Unr proteinu. PTB navázaný na oblast 335 – 355 nt 5'UTR UNR tedy funguje jako negativní regulátor funkce IRES UNR (Cornelis *et al.* 2005). Přesný mechanismus inhibice UNR IRES sice doposud není zcela znám, ale předpokládá se, že navázaný PTB působí jako sterická překážka pro vazbu jiných ITAF proteinů.

4.6. Glycerinaldehyd-3-fosfátdehydrogenáza (GAPDH)

GAPDH, 39 kDa velký RNA vazebný protein, je důležitý glykolytický enzym využívající NAD^+ pro oxidativní fosforylaci glycerinaldehyd 3-fosfátu na 1,3-difosfoglycerát v procesu glykolýzy Schultz 26,27. Účast tohoto enzymu byla prokázána i v jiných buněčných pochodech, kupříkladu replikace a opravy DNA, endocytóze či fosforylace proteinů. GAPDH, vyhledávající AU bohaté oblasti jednořetězcové RNA, interaguje s IRES strukturou viru hepatitidy A (HAV), hepatitidy C a jiných pozitivních ssRNA virů (Tsukiyama-Kohara *et al.* 1992).

Funkce GAPDH u IRES struktury viru žloutenky A

Genomová RNA se skládá z 5'UTR a kratšího 3'UTR konce a jednoho ORF kódujícího virový polyprotein. IRES struktura HAV se nachází na pozici od 151. nt po první iniciační kodón ležící na pozici 735. Na HAV IRES je několik vazebných míst pro GAPDH (např. 1-148 nt, 155-235 nt či 597-746 nt). Nejvyšší afinitu však GAPDH má k místu ležícímu mezi 1-148 nt (na pyrimidin bohatý úsek) a dále k sekvenci 155-235 nt (vlásenka IIIa) (Schultz *et al.* 1996). Vlášenska IIIa zahrnuje sekvenci pěti uridinových zbytků na pozici 200 – 204 nt. Tato oblast je pro vazbu GAPDH velice důležitá. Ztráta dvou uracilových zbytků vede k výraznému snížení afinity GAPDH k IRES struktuře viru HAV (Yi *et al.* 2000). O vazbu na vlásenku IIIa navíc GAPDH soutěží s proteinem PTB, neboť oba proteiny si jsou svými požadavky na vazebné místo relativně podobné. GAPDH se jeví jako antagonist PTB proteinu, který pozitivně stimuluje translaci pomocí IRES elementu. Pokud se totiž naváže GAPDH, dojde k destabilizaci sekundární struktury daného úseku

RNA. A protože je obecně funkce IRES silně závislá na sekundární struktuře RNA, působí GAPDH na HAV IRES inhibičně. (Schultz *et al.* 1996). V porovnání s ostatními picornaviry je navíc translace HAV RNA pomocí IRES celkově slabší.

4.7. Protein 1 asociovaný s NS1 (NSAP1)

Podle kolektivu Kim *et al.* (2004) je správné fungování IRES elementu na HCV RNA oproti ostatním IRES strukturám závislé nejen na 5'UTR oblasti, ale nejspíše vyžaduje i N-koncovou část kódující sekvence, která leží za iniciačním AUG kodónem. A právě s tímto úsekem interaguje buněčný protein NSAP1. Specificky se váže na A-bohaté úseky kódující oblasti HCV RNA a stimuluje translaci HCV RNA závislou na IRES. Naopak snížení přítomnosti NSAP1 pomocí siRNA translaci tohoto viru blokuje (Kim *et al.* 2004).

NSAP1 pravděpodobně zprostředkovává svou vazbou se 40S ribozomální podjednotkou její nasednutí na správné místo na HCV RNA bez potřeby dalších proteinů, nebo pomáhá IRES struktuře zaujmout takovou konformaci, která usnadňuje vytvoření komplexu 40S podjednotky s IRES. Je však také možné, že aktivuje IRES závislou translaci HCV RNA díky protein-proteinové interakci s iniciačními faktory (eIF) či jinými ITAF proteiny. Interakce mezi některými ITAF proteiny byla dokázána. NSAP1 například asociuje hnRNP L, ale stimulovat translaci závislou na IRES tento protein (hnRNP L) nedokáže a nepodporuje ani stimulační aktivitu NSAP1.

5. ZÁVĚR

ITAF proteiny jsou velice zajímavá skupina RNA vazebných proteinů a jejich role se ukázala být důležitou v procesu iniciace translace pomocí IRES elementů, a to jak v buněčných mRNA, tak ve virových genomových RNA. Působení těchto proteinů na IRES elementy lze shrnout do tří skupin. V první skupině jsou IRES elementy, které bez určitých ITAF proteinů nejsou funkční (např. PCBP2 u IRES polioviru). Druhou skupinu tvoří IRES elementy, které sice fungují i v nepřítomnosti ITAF, ale po přidání těchto proteinů se jejich aktivita zvýší (příklad IRES v RNA viru HCV a La autoantigen). A konečně do poslední skupiny můžeme zahrnout taková IRES, které jsou vazbou ITAF proteinů blokovány (inhibiční účinky DRBP 76 na IRES element HRV2).

RNA viry zmiňované v celé práci, využívající pro svou translaci IRES struktury jsou často původci velice závažných onemocnění lidí či hospodářsky významných zvířat, což každoročně působí rozsáhlé újmy na lidských životech i značné ekonomické ztráty.

Proti některým virům jako je např. virus dětské obrny již existuje účinná vakcína. Ale např. proti velice zákeřnému viru HCV se vakcinací ještě bránit neumíme. A právě detailní studium struktury IRES a proteinů, které svou interakcí s IRES celý proces iniciace translace virů ovlivňují, je důležitým krokem při hledání antivirové terapie. Snížení míry translace virové RNA (či ještě lépe její úplná blokáce) vede totiž ke snížení počtu syntetizovaných proteinů potřebných pro virovou replikaci a dokončení životního cyklu viru.

6. PŘEHLED POUŽITÉ LITERATURY

Ali, N., Pruijn, G. J. M., Kenan, D. J., Keene, J. D., Siddiqui, A. (2000): Human La antigen is required for the hepatitis C virus internal ribosome entry site-mediated translation. *J. Biol. Chem.* 275: 27531 - 27540

Ali, N., Siddiqui, A. (1995): Interaction of polypyrimidine tract-binding protein with the 5' noncoding region the hepatitis C virus RNA genome and its functional requirement in internal initiation of translation. *J. Virol* 69: 6367 - 6375

Ali, N., Siddiqui, A. (1997): The La antigen binds 5' noncoding region of hepatitis C virus RNA in the context of the initiator AUG codon and stimulates internal ribosome entry site-mediated translation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94: 2249 – 2254

Beales, L. P., Rowlands, D. J., Holzenburg, A. (2001): The internal ribosome entry site (IRES) of hepatitis C virus visualized by electron microscopy. *RNA* 7: 661 - 670

Belsham, G. J., Sonenberg, N. (1996): RNA-protein interactions in regulation of Picornavirus RNA translation. *Microbiol. Rev.* 60: 499 – 511

- Boussadia, O., Niepmann, M., Créancier, L., Prats, A., Dautry, F., Jacquemin-Sablon, H. (2003): Unr is required in vivo for efficient initiation of translation from the internal ribosome entry sites of both rhinovirus and poliovirus. *J. Virol* 77: 3353 – 3359
- Brown, E. A., Zhang, H., Ping, L. H., Lemon, S. M. (1992): Secondary structure of the 5' nontranslated regions of hepatitis C virus and pestivirus genomic RNAs. *Nucleic Acids Res.* 20: 5041-5045
- Cornelis, S., Tinton, S. A., Schepens, B., Bruynooghe, Y., Beyaert, R. (2005): UNR translation can be driven by an IRES element that is negatively regulated by polypyrimidine tract binding protein. *Nucleic Acids Res.* 33: 3095 – 3108
- Das, S., Ott, M., Yamane, A., Venkatesan, A., Gupta, S., Dasgupta, A. (1998): Inhibition of internal entry site (IRES)-mediated translation by a small yeast RNA: a novel strategy to block hepatitis C virus protein synthesis. *Front Biosci.* 3: D1241 – D1252
- Dejgaard, K., Leffers, H. (1996): Characterisation of the nucleic-acid-binding activity of KH domains. Different properties of different domains. *Eur. J. Biochem.* 241: 425 - 431
- Doniger, J., Landsman, D., Gonda, M. A., Wistow, G. (1992): The product of UNR, the highly conserved gene upstream of N-ras, contains multiple repeats similar to the cold-shock domain (CSD), a putative DNA-binding motif. *New Biol.* 4: 389 - 395
- Fukushi, S., Okada, M., Stahl, J., Kageyama, T., Hoshino, F. B., Katayama, K. (2001): Ribosomal protein S5 interacts with the internal ribosomal entry site of hepatitis C virus. *J. Biol. Chem.* 276: 20824 – 20826
- Goodier, J. L., Fan, H., and Maraia, R. J. (1997): A carboxy-terminal basic region controls RNA polymerase III Transcription factor activity of human La protein. *Mol. Cell. Biol.* 17: 5823–5832
- Graumann P. L., Marahiel M. A. (1998): A superfamily of proteins that contain the cold-shock domain. *Trends Biochem. Sci.* 23: 286 - 290

Hunt, S. L., Hsuan, J. J., Totty, N., Jackson, R. J. (1999): unr, a cellular cytoplasmic RNA-binding protein with five cold-shock domains, is required for internal initiation of translation of human rhinovirus RNA. *Genes Dev.* 13: 437 - 448

Hühn, P., Pruijn, G. J. M., Venrooij, W. J., Bachmann, M.(1997): Characterization of the autoantigen La (SS-B) as a dsRNA unwinding enzyme. *Nucleic Acids Res.* 25: 410 – 416

Jackson, R. J., Kaminski, A. (1995): Internal initiation of translation in eukaryotes: the picornavirus paradigm and beyond. *RNA* 10: 985 – 1000

Jang, S. K., Kräusslich, H. G., Nicklin, M. J. H., Duke, G. M., Palmenberg, A. C., Wimmer, E. (1988): A segment of 5' nontranslated region of encephalomyocarditis virus RNA directs internal entry of ribosomes during in vitro translation. *J. Virol* 62: 2636 - 2643

Jang, S. K., Wimmer, E. (1990): Cap-independent translation of encephalomyocarditis virus RNA: structural element of the internal ribosome entry site and involvement of a cellular 57-kD RNA-binding protein. *Genes Dev.* 4: 1560 - 1572

Kamoshita, N., Tsukiyama-Kohara, K., Kohara, M., Nomoto, A. (1997): Genetic analysis of internal ribosomal entry site on hepatitis C virus RNA: implication for involvement of the highly ordered structure and cell type-specific transacting factors. *J. Virol.* 233: 9 – 18

Kenan, D. J., Query, C. C., Keene, J. D. (1991): RNA recognition: towards identifying determinants of specificity. *Trends Biochem. Sci.* 16: 214 – 220

Kim, J. H., Paek, K. Y., Ha, S. H., Cho, S., Choi, K., Kim, C. S., Ryu, S. H., Jang, S. K. (2004): A cellular RNA-binding protein enhances internal ribosomal entry site-dependent translation through an interaction downstream of the hepatitis C virus polyprotein initiation codon. *Mol. Cel. Biol.* 24: 7878 - 7890

Komar, A. A., Hatzoglou, M. (2005): Internal ribosome entry sites in cellular mRNAs: mystery of their existence. *J. Biol. Chem.* 280: 23425 – 23428

- Langland, J. O., Kao, P. N., Jacobs, B. L. (1999): Nuclear factor-90 of activated T-cells: A double-stranded RNA-binding protein and substrate for the double-stranded RNA-dependent protein kinase, PKR. *Biochemistry* 38: 6361 – 6368
- Maraia, R. J., Kenan, D. J., and Keene, J. D (1994): Eukaryotic transcription termination factor La mediates transcript release and facilitates reinitiation by RNA polymerase III. *Mol. Cell. Biol.* 14: 2147–2158
- Merrill, K. M., Dobrikova, E. Y., Gromeier, M. (2006): Cell-type-specific repression of internal ribosome entry site activity by double-stranded RNA-binding protein 76. *J. Virol.* 80: 3147 - 3156
- Merrill, K. M., Gromeier, M. (2006): The double-stranded RNA binding protein 76:NF45 heterodimer inhibits translation at the Rhinovirus type 2 internal ribosome entry site. *J. Virol.* 80: 6936 – 6942
- Mitchell, S. A., Spriggs, K. A., Coldwell, M. J., Jackson, R. J., Willis, A. E. (2003): The Apaf-1 internal ribosome entry segment attains the correct structural conformation for function via interactions with PTB and unr. *Mol. Cell* 11: 757 - 771
- Mokrejs, M., Vopalensky, V., Kolenaty, O., Masek, T., Feketova, Z., Sekyrova, P., Skaloudova, B., Kriz, V., Pospisek, M. (2006): IRESite: the database of experimentally verified IRES structures (www.iresite.org). *Nucleic Acids Res.* 34: D125 - D130
- Patton, J. G., Mayer, S. A., Tempst, P., Nadal-Ginard, B. (1991): Characterization and molecular cloning of polypyrimidine tract-binding protein: a component of a complex necessary for pre-mRNA splicing. *Genes Dev.* 5: 1237 – 1251
- Pelletier, J., Sonenberg, N. (1988): Internal initiation of translation of eukaryotic mRNA directed by a sequence derived from poliovirus RNA. *Nature* 334: 320 - 325
- Pestova, T. V., Kolupaeva, V. G., Lomakin, I. B., Pilipenko, E. V., Shatsky, I. N., Agol, V. I., Hellen, C. U. T. (2001): Molecular mechanisms of translation initiation in eukaryotes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98: 7029 – 7036

- Pestova, T. V., Shatsky, I. N., Fletcher, S. P., Jackson, R. J., and Hellen, C. U. (1998): A prokaryotic-like mode of cytoplasmic eukaryotic ribosome binding to the initiation codon during internal translation initiation of hepatitis C and classical swine fever virus RNAs. *Genes Dev.* 12, 67–83
- Pudi, R., Abhiman, S., Srinivasan, N., Das, S. (2003): Hepatitis C virus internal ribosome entry site-mediated translation is stimulated by specific interaction of independent regions of human La autoantigen. *J. Biol. Chem.* 278: 12231 - 12240
- Pudi, R., Srinivasan, P., Das, S. (2004): La protein binding at the GCAC site near the initiator AUG facilitates the ribosomal assembly on the hepatitis C virus RNA to influence internal ribosome entry site-mediated translation. *J. Biol. Chem.* 279: 29879 – 29888
- Reynolds, J. E., Kaminski, A., Kettinin, H. J., Grace, K., Clarke, B. E., Carroll, A. R., Rowlands, D. J. & Jackson, R. J. (1995): Unique features of internal initiation of hepatitis C virus RNA translation. *EMBO J.* 14: 6010 – 6020
- Rosenfeld, A. B., Racaniello, V. R. (2005): Hepatitis C virus internal ribosome entry site-dependent translation in *Saccharomyces cerevisiae* is independent of polypyrimidine tract-binding protein, poly(rC)-binding protein 2, and La protein. *J. Virol.* 79: 10126 - 10137
- Schultz, D. E., Hardin, C. C., Lemon, S. M. (1996): Specific interaction of glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase with the 5′-nontranslated RNA of hepatitis A virus. *J. Biol. Chem.* 271: 14134 – 14142
- Singh, R., Valcarcel, J., Green, M. R. (1995): Distinct binding specificities and functions of higher eukaryotic polypyrimidine tract-binding proteins. *Science* 268: 1173 – 1176
- Song, Y., Tzima, E., Ochs, K., Bassili, G., Trusheim, H., Linder, M., Preissner, K. T., Niepmann, M. (2005): Evidence for an RNA chaperone function of polypyrimidine tract-binding protein in picornavirus translation. *RNA* 11: 1809 – 1824

Spångberg, K., Wiklund, L., Schwarz, S. (2001): Binding of the La autoantigen to the hepatitis C virus 3' untranslated region protects the RNA from rapid degradation *in vitro*. J. Gen. Virol. 82: 113–120

Spriggs, K. A., Bushell, M., Mitchell, S. A., Willis, A. E. (2005): Internal ribosome entry segment-mediated translation during apoptosis: the role of IRES-trans-acting factors. Cell Death Differ. 12: 585 - 591

Tan, E. M. (1989): Antinuclear antibodies: diagnostic markers for autoimmune diseases and probes for cell biology. Adv. Immunol. 44: 93 - 151.

Tsukiyama-Kohara, K., Iizuka, N., Kohara, M., Nomoto, A. (1992): Internal ribosome entry site within hepatitis C virus RNA. J. Virol. 66: 1476 - 1483

Wagner, E. J., Garcia-Blanco, M. A. (2001): Polypyrimidine tract binding protein antagonizes exon definition. Mol. Cell. Biol. 20: 3281 – 3288

Walter, B. L., Parsley, T. B., Ehrenfeld, E., Semler, B. L. (2002): Distinct poly(rC) binding protein KH domain determinants for Poliovirus translation initiation and viral RNA replication. J. Virol. 76: 12008 – 12022

Yi, M., Schultz, D. E., Lemon, S. M. (2000): Functional significance of the interaction of hepatitis A virus RNA with glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH): opposing effects of GAPDH and polypyrimidine tract binding protein on internal ribosome entry site function. J. Virol. 74: 6459 – 6468