

## V. SHRNU TÍ VÝSLEDKŮ

### IRESITE: THE DATABASE OF EXPERIMENTALLY VERIFIED IRES STRUCTURES

([WWW.IRESITE.ORG](http://WWW.IRESITE.ORG))

- IRESite je kurátorovaná relační databáze typu MySQL-4.1 využívající InnoDB tabulky.
- Do databáze je možné vložit položky dvojího typu:
  - *natural* položky obsahují veškerá experimentální data týkající se určité IRES struktury (kompletní sekvence mRNA s vymezením pozic IRES sekvence a kódovaného proteinu, veškeré proteiny interagující s IRES, případná sekundární struktura)
  - *engineered* položky popisují uměle vytvořené plazmidy. Většinou se jedná o bicistronní plazmidy sloužící k testování funkčnosti sekvence, o níž se předpokládá, že obsahuje IRES element, a případné mutantní deriváty této sekvence. Do IRESite se v tomto případě vkládají údaje o sekvenci mRNA s vymezením IRES oblasti, informace o reportérových proteinech, informace o translačních experimentech včetně použitého promotoru a informace o pozitivních a negativních kontrolách.
- V databázi je nyní uloženo 288 položek; 67 *natural* (20 virových a 47 buněčných) a 221 *engineered*.
- IRESite slouží nejen k ukládání experimentálních dat, ale umožňuje také jejich prohledávání podle klíčových slov, případně následné porovnávání vybraných experimentů.

### A BIOINFORMATICAL APPROACH TO THE ANALYSIS OF VIRAL AND CELLULAR INTERNAL RIBOSOME ENTRY

- Publikace obsahuje aktuální seznam známých IRES sekvencí virových, buněčných i uměle vytvořených.
- V publikaci je popsána nelehká kurátorská činnost včetně příkladů přípravy databázových položek.
- V práci je uvedeno srovnání IRESite s dalšími databázemi zaměřenými na ukládání dat o IRES sekvencích.

- Rovněž je ukázána první analýza IRES sekvencí uložených v IRESite. Předběžné výsledky ukazují, že zatímco virové IRES tvoří vcelku kompaktní skupinu, IRES buněčné jsou ve všech analyzovaných případech velmi různorodé. To může souviset například s tím, že iniciace translace může být u některých buněčných IRES realizována dvojitým mechanismem, jak závislým na čepičce, tak nezávislým na čepičce.

#### **HEPATITIS C VIRUS INTERNAL RIBOSOME ENTRY SITE INITIATES PROTEIN SYNTHESIS AT THE AUTHENTIC INITIATION CODON IN YEAST**

- V publikaci je popsán nový bicistronní systém umožňující testovat IRES sekvence v kvasinkových buňkách *in vivo*. Tento systém se skládá z vektoru pFGAL4 a vhodného kvasinkového kmene.
- Pomocí tohoto systému byla ověřena funkčnost HCV IRES sekvence v kvasince *in vivo*.
- Mutačními analýzami HCV IRES sekvence bylo potvrzeno, že translace u kvasinek začíná stejně jako u savců na AUG iniciačním kodónu 342.
- Srovnáním mutovaných HCV IRES sekvencí v kvasinkách a v lidských tkáňových kulturách bylo prokázáno, že HCV IRES sekvence je v kvasinkách plně funkční a že mechanismus iniciace translace je v obou případech velmi podobný.

#### **FIREFLY LUCIFERASE GENE CONTAINS A CRYPTIC PROMOTER – RE-EVALUATION OF THE HEPATITIS C VIRUS IRES PROMOTER**

- Gen kódující luciferázu z *Photinus pyralis* (*firefly* luciferáza) obsahuje kryptický promotor funkční v kvasinkách a v lidských tkáňových kulturách. Jelikož je tento typ luciferázy používán jako jeden z nejběžnějších signálních genů v mnoha experimentech z různých oblastí molekulárně biologického výzkumu, mohlo by nalezení tohoto promotoru vést k přehodnocení řady výsledků publikovaných v odborné literatuře.
- Byla korigována v literatuře udávaná účinnost kryptického promotoru lokalizovaného v cDNA odpovídající HCV IRES sekvenci.

### **FUNCTIONAL ANALYSIS OF THE PUTATIVE CAPPING ENZYME ENCODED BY LINEAR CYTOPLASMIC PLASMIDS OF THE YEAST *KLUYVEROMYCES LACTIS***

- Podařilo se nám produkovat *capping* enzym kódovaný pGKL2 plazmidem kvasinky *K. lactis* v bakteriálním a bakulovirovém expresním systému s různými typy kotev.
- Potvrdili jsme předpokládanou guanylyltransferázovou aktivitu *capping* enzymu.
- Potvrdit předpokládanou metyltransferázovou aktivitu *capping* enzymu se nepodařilo.
- Dosavadní výsledky naznačují, že otázka přítomnosti či nepřítomnosti čepičky na 5' koncích pGKL-specifických mRNA je stále nejasná; čepička buď na 5' koncích plazmidových mRNA není přítomna vůbec, případně se vyskytuje v neklasické, například v nemetylované formě.

### **DENATURING RNA ELECTROPHORESIS IN TAE AGAROSE GELS**

- V publikaci je ukázána možnost zjednodušení elektroforetické analýzy molekul RNA spočívající v nahrazení běžně používaného pufrčního systému (MOPS s formamidem) pufrem TAE (Tris/acetát/EDTA) v kombinaci s minimálně 60 % v/v obsahem formamidu v analyzovaném vzorku.

### **MULTIPLE CATHEPSIN B ISOFORMS IN SCHISTOSOMULA OF *TRICHOILHARZIA REGENTI*: IDENTIFICATION, CHARACTERISATION AND PUTATIVE ROLE IN MIGRATION AND NUTRITION**

- Bylo identifikováno a charakterizováno šest nových endopeptidáz motolice *T. regenti*. Dvě z nich byly produkovány v kvasinkovém expresním systému a dále charakterizovány biochemickými a molekulárně biologickými metodami.