

**PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA UNIVERZITY KARLOVY**

**KATEDRA GENETIKY A MIKROBIOLOGIE**



Dizertační práce

**ROLE 5' KONCOVÝCH STRUKTUR U EUKARYOTICKÝCH  
mRNA**

Václav Vopálenský

Školitel: RNDr. Martin Pospíšek, PhD.

Praha 2007

## **PODĚKOVÁNÍ**

Na tomto místě bych rád poděkoval zejména svému školiteli Martinu Pospíškovi za nezměrný optimismus a brilantní vytváření možných i nemožných hypotéz v průběhu řešení mé dizertační práce. Další velký dík patří i mým spolupracovníkům Tomáši Maškovi a Martinu Mokrejšovi, s nimiž jsem strávil nemálo času při debatách a diskuzích týkajících se odborné i neodborné problematiky. Děkuji také Janu Dvořákovi za velmi ochotné a rychlé zásobování odbornými články těžko dostupnými v našich krajích a všem laborantkám, v čele s Vlastou Pelechovou, které zvládaly moje vrtochy a požadavky na neodkladnou přípravu čehokoliv nejlépe ihned. Také děkuji všem spolupracovníkům minulým (Petře S., Martině P., Míše S.) i současným (Zuzaně F., Blance V., Míše V., Jiřímu Č., Jiřímu D. a Jitce D. a Ondřejovi K.) za příkladnou spolupráci a vůbec za možnost s nimi pracovat. Stejně tak děkuji i všem členům Katedry genetiky a mikrobiologie, kteří mi byli nápomocni při řešení této práce.

Na závěr děkuji i rodině, zejména své ženě Ireně, za neobvyklou trpělivost a podporu po celou dobu mého postgraduálního studia.

Tato práce byla podporována mimo jiné i grantovými projekty Grantové agentury Univerzity Karlovy (129/2000/B-BIO/PřF; 251/2004/B-BIO/PřF), Grantové agentury ČR (204/03/1487; 301/07/0607) a grantovým projektem Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy ČR (MSM 0021620813).

## OBSAH

I. Seznam použitých zkratk a termínů	3
II. Úvod	5
III. Literární přehled	8
1. Lineární plazmidy kvasinek	8
1.1. Lineární plazmidy kvasinky <i>Kluyveromyces lactis</i>	8
1.1.1. Genetické uspořádání pGKL plazmidů	11
1.1.2. Replikace pGKL plazmidů	15
1.1.3. Transkripce genů kódovaných pGKL plazmidy	16
1.1.4. Translace genů kódovaných pGKL plazmidy	18
1.1.5. <i>Killer toxin</i> (zymocin) kvasinky <i>K. lactis</i>	18
1.1.6. Využití lineárních plazmidů	22
1.2. Lineární dsDNA plazmidy ostatních kvasinek	22
2. Syntéza čepičky na 5' konci mRNA	27
2.1. Jak získat čepičku legálně	27
2.2. Jak získat čepičku nelegálně	30
2.3. Past na čepičku	32
2.4. Funkce čepičky	32
2.5. Jak být ve správný čas na správném místě	36
2.6. Organizace aparátu syntetizujícího čepičku	38
2.6.1. .... u kvasinek	42
2.6.2. .... u prvoků	47
2.6.3. .... u mnohobuněčných	49
2.6.4. .... a u virů	52
IV. Publikace	62
V. Shrnutí výsledků	73
VI. Seznam použité literatury	76

## I. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A TERMÍNŮ

4E-BP	proteiny vážící se na eIF4E ( <i>eIF4E Binding Proteins</i> )
AdoHcy	S-adenozyl-L-homocystein
AdoMet	S-adenozyl-L-methionin
ATCC	sbírka organismů, USA, <i>American Type Culture Collection</i>
bp	pár bází ( <i>Base Pair</i> )
cap (0, 1, 2, 4)	N <sup>7</sup> -metylguanozinová čepička (a její různé metylace)
capping enzym	enzym připojující N <sup>7</sup> -metylguanozinovou čepičku na 5' mRNA; vždy obsahuje GTázovou aktivitu
cap-snatching	uchvácení čepičky
CBC	komplex vážící se na čepičku ( <i>Cap Binding Complex</i> )
CBP	protein vážící se na čepičku ( <i>Cap Binding Protein</i> )
CBS	sbírka organismů, Nizozemsko, <i>Centraalbureau voor Schimmelcultures</i>
CTD	C-koncová doména RNA polymerázy II ( <i>Carboxy Terminal Domain</i> )
DNA	deoxyribonukleová kyselina ( <i>Deoxyribonucleic Acid</i> )
dsDNA	dvouřetězcová deoxyribonukleová kyselina ( <i>Double Stranded DNA</i> )
dsRNA	dvouřetězcová ribonukleová kyselina ( <i>Double Stranded RNA</i> )
eIFX	eukaryotický iniciační faktor X ( <i>Eukaryotic Initiation Factor X</i> )
FLuc	<i>firefly</i> luciferáza; izolována ze světlušky <i>Photinus pyralis</i>
Gppp/Gpp/Gp	guanozintrifosfát/guanozindifosfát/guanozinmonofosfát
GpppN	nemetylovaná guanozinová čepička
GTáza	mRNA-guanyltransferáza
HCV	virus žloutenky typu C ( <i>Hepatitis C Virus</i> )
IFO	sbírka organismů, Japonsko, <i>Institute for Fermentation, Osaka</i>
IGR IRES	oblast mezi 2 geny obsahující IRES ( <i>Intergenic Region</i> )
IRES	vnitřní vazebné místo pro ribozóm ( <i>Internal Ribosome Entry Site</i> )
ITR	invertovaná terminální repetice ( <i>Inverted Terminal Repeat</i> )
kbp	1000 párů bází ( <i>Kilo Base Pairs</i> )
kDa	Kilodalton, 1000 daltonů (1 dalton = přibližná váha jednoho vodíkového atomu; $1,66 \cdot 10^{-21}$ gramů; <i>Kilodalton</i> )
m <sup>7</sup> G	metylovaný guanozin na pozici N <sup>7</sup>
m <sup>7</sup> GDP	metylovaný guanozindifosfát na pozici N <sup>7</sup>
m <sup>7</sup> GMP	metylovaný guanozinmonofosfát na pozici N <sup>7</sup>
m <sup>7</sup> GpppN	N <sup>7</sup> -metylguanozinová čepička
m <sup>7</sup> GTP	metylovaný guanozintrifosfát na pozici N <sup>7</sup>
mRNA	mediátorová RNA ( <i>Messenger RNA</i> )
MTáza	RNA-guanin-N <sup>7</sup> -metyltransferáza
Northern blot	kapilární přenos RNA
NRRL	sbírka organismů, USA, <i>Northern Regional Research Laboratory</i>
nsP	nestruturní protein ( <i>Nonstructural Protein</i> )
nt	Nukleotid ( <i>Nucleotide</i> )
NT doména	nukleotidyltransferázová doména ( <i>Nucleotidyl Transferase Domain</i> )
OB doména	oligonukleotid vážící doména ( <i>Oligonucleotide Binding Domain</i> )
ORF	otevřený čtecí rámec ( <i>Open Reading Frame</i> )
ORFXp	protein kódovaný otevřeným čtecím rámcem X
PBCV-1	<i>Paramecium Bursaria Chlorella Virus 1</i>
Pi/PPi	fosfát/pyrofosfát
pppRNA/ppRNA/pRNA	trifosforylovaná /difosforylovaná/monofosforylovaná mRNA
pre-mRNA	prekurzorová mRNA ( <i>Precursor mRNA</i> )

primer extension	metoda prodlužování primerů
RNA	ribonukleová kyselina ( <i>Ribonucleic Acid</i> )
RTáza	RNA-trifosfatáza
S	jednotka sedimentačního koeficientu (Svedberg; $10^{-13}$ sekund)
S <sup>5</sup> -PO <sub>4</sub>	fosforylovaný serin
SL RNA	<i>Spliced Leader RNA</i>
snoRNA	malé jadéřkové RNA ( <i>Small Nucleolar RNA</i> )
snRNA	malé jaderné RNA ( <i>Small Nuclear RNA</i> )
snRNP	malý jaderný ribonukleoprotein ( <i>Small Nuclear Ribonucleoprotein</i> )
Southern blot	kapilární přenos DNA
ssDNA	jednořetězcová deoxyribonukleová kyselina ( <i>Single Stranded DNA</i> )
TMG	trimetylovaná čepička ( <i>Trimethylguanosine</i> )
TP	terminální protein ( <i>Terminal Protein</i> )
TRF1	<i>Terminal Region Recognition Factor 1</i>
UCS	promotorová regulační oblast ( <i>Upstream Conserved Sequence</i> )
UTR	nepřekládaná oblast mRNA ( <i>Untranslated Region</i> )
UV	ultrafialové záření ( <i>Ultra Violet</i> )
vD1/vD12	proteiny kódované geny D1/D12 viru vakcinie
vRNA	virová RNA ( <i>viral RNA</i> )
VSV	virus vezikulární stomatitidy ( <i>Vesicular Stomatitis Virus</i> )
Western blot	elektrický přenos proteinů
XΔ	delece genu X
zymocin	obecně houbový <i>killer toxin</i> , zde <i>killer toxin K. lactis</i>
ρ <sup>-</sup>	rozsáhlé delece v mitochondriální DNA
ρ <sup>0</sup>	absence mitochondriální DNA

#### AMINOKYSELINY

Alanin	Ala	A	Leucin	Leu	L
Arginin	Arg	R	Lysin	Lys	K
Asparagin	Asn	N	Methionin	Met	M
Asparagová kyselina	Asp	D	Fenylalanine	Phe	F
Cystein	Cys	C	Prolin	Pro	P
Glutamová kyselina	Glu	E	Serin	Ser	S
Glutamin	Gln	Q	Threonin	Thr	T
Glycin	Gly	G	Tryptofan	Trp	W
Histidin	His	H	Tyrosin	Tyr	Y
Isoleucin	Ile	I	Valin	Val	V
libovolná aminokyselina		x			

#### NUKLEOTIDY

Adenin	A	Thymin	T
Cytosin	C	Uracil	U
Guanin	G	Pu/Py	purin/pyrimidin
libovolný nukleotid	N		

## II. ÚVOD

Svou dizertační práci jsem vypracoval v Laboratoři biochemie RNA na Přírodovědecké fakultě Univerzity Karlovy. Tato laboratoř byla založena dr. Martinem Pospíškem v roce 1997, název vznikl v roce 2001. V této laboratoři pracuji prakticky od jejího založení. Prvotním zájmem naší pracovní skupiny bylo studium cytoplazmatických dsRNA i dsDNA virů u kvasinek, zejména s ohledem na translaci genů kódovaných těmito viry. Později následoval posun k současnému tématu Laboratoře biochemie RNA, tj. k iniciaci translace se zaměřením na iniciaci translace nezávislou na čepičce.

Původní zadání mé dizertační práce se týkalo dsDNA lineárních plazmidů kvasinky *Kluyveromyces lactis*. Tyto dva plazmidy, nazvané pGKL1 a pGKL2, jsou pozoruhodné cytoplazmatickou lokalizací a uspořádáním genomu, čímž připomínají DNA genomy cytoplazmatických virů čeledi *Poxviridae* či *Asfarviridae*. Velmi zajímavý je i fenomén produkce *killer* toxinu (zymocinu), s jehož produkcí je přítomnost lineárních plazmidů spojena. Ačkoliv již uplynulo více než 25 let od objevu pGKL plazmidů, stále ohledně nich existuje řada nezodpovězených otázek. Velmi dobře je popsán mechanismus účinku zymocinu *K. lactis* na kvasinku *Saccharomyces cerevisiae*. V poslední době se znalost o účinku zymocinu na citlivé buňky velmi rozrostla zejména díky skupině dr. R. Schaffratha (Univerzita Martina Luthera, Halle, SRN).

Naopak mnoho není známo o transkripci a translaci plazmidy kódovaných genů. Pomocí počítačových analýz a pilotních experimentů bylo zjištěno, že si tyto plazmidy samy kódují součásti svého transkripčního aparátu, čímž připomínají již zmíněné cytoplazmatické viry. Přesný mechanismus transkripce ovšem není znám. Tato práce by měla alespoň malým dílem přispět k osvětlení mechanismu iniciace translace pGKL-specifických genů. V souladu se zaměřením naší laboratoře jsem se věnoval charakterizaci proteinu kódovaného otevřeným čtecím rámcem 3 plazmidu pGKL2. O tomto proteinu se soudí, že je schopen připojit N<sup>7</sup>-metylguanozinovou čepičku na 5' konce plazmidových mRNA. Tato práce se nakonec „zvrhla“ v řešení problému, zda lineární plazmidy kvasinky *K. lactis* čepičku na svém 5' konci vůbec obsahují, případně v jaké podobě. Výsledkem této části práce je připravovaná publikace „FUNCTIONAL ANALYSIS OF THE PUTATIVE CAPPING ENZYME ENCODED BY LINEAR CYTOPLASMIC PLASMIDS OF THE YEAST *KLUYVEROMYCES LACTIS*“, která bude zaslána k posouzení oponentům v průběhu srpna či září.

V průběhu mého postgraduálního studia jsem se také podílel na řešení dalších dvou témat studovaných naší laboratoří. Oba směry bádání se týkají iniciace translace na čepičce

nezávislé. První projekt se zabývá vytvořením a zprovozněním databáze experimentálně ověřených IRES struktur – tzv. IRESite. Jedná se o databázi mRNA využívajících ke své iniciaci translace mechanismus na čepičce nezávislý. Zatímco tento mechanismus iniciace translace byl uznán za obecně platný u virů, o buněčných mRNA se neustále pochybuje. V předkládaných publikacích, „IRESITE: THE DATABASE OF EXPERIMENTALLY VERIFIED IRES STRUCTURES (WWW.IRESITE.ORG)“ a „A BIOINFORMATICAL APPROACH TO THE ANALYSIS OF VIRAL AND CELLULAR INTERNAL RIBOSOME ENTRY“, popisujeme vznik a technické řešení této databáze, problémy spojené s přípravou databázových položek a v neposlední řadě ukazujeme pilotní analýzu IRES sekvencí obsažených v této databázi. Hlavním garantem této části práce je dr. Martin Mokrejš.

Druhým tématem, do jehož řešení jsem se zapojil, bylo testování, zda interní vazebné místo pro ribozóm viru hepatitidy C iniciuje translaci v kvasince *S. cerevisiae* stejným mechanismem, jako bylo ukázáno v savčích buňkách. Mimo IGR IRES z *Cricket Paralysis Virus* totiž v současnosti chybí další publikovaný případ „pravé“ IRES sekvence, která by byla funkční v kvasinkových buňkách. Přitom studium viru hepatitidy C v kvasinkách je velmi lákavé, zejména proto, že dosud nebyl při výzkumu HCV a hledání či testování potenciálních léků nalezen (výjimkou šimpanzů) uspokojivý zvířecí nebo buněčný model. A právě jednoduchý kvasinkový model by mohl pomoci k nalezení účinných látek proti viru hepatitidy C. Výsledkem bádání na tomto poli je přiložená publikace „HEPATITIS C VIRUS INTERNAL RIBOSOME ENTRY SITE INITIATES PROTEIN SYNTHESIS AT THE AUTHENTIC INITIATION CODON IN YEAST“. Hlavním řešitelem problematiky funkčnosti IRES sekvencí v kvasince *S. cerevisiae* je dr. Tomáš Mašek.

Při testování možnosti využití kvasinky *S. cerevisiae* jako modelového organismu pro studium viru hepatitidy C jsme zjistili, že se v běžně používaném signálním genu kódujícím tzv. *firefly* luciferázu vyskytuje kryptický promotor. Toto zjištění je velmi zajímavé a může vést pokud ne k přehodnocení, tak minimálně k větší opatrnosti při hodnocení výsledků dosažených s použitím luciferázy jako signálního genu. Tato část práce je součástí článku „FIREFLY LUCIFERASE GENE CONTAINS A CRYPTIC PROMOTER – RE-EVALUATION OF THE HEPATITIS C VIRUS IRES PROMOTER“. V tomto článku také zpřesňujeme účinnost již dříve popsaného promotoru vyskytujícího se v cDNA odpovídající IRES sekvenci viru hepatitidy C.

Do své dizertační práce jsem zahrnul také články „DENATURING RNA ELECTROPHORESIS IN TAE AGAROSE GELS“ a „MULTIPLE CATHEPSIN B ISOFORMS IN

SCHISTOSOMULA OF TRICHOBLHARZIA REGENTI: IDENTIFICATION, CHARACTERISATION AND PUTATIVE ROLE IN MIGRATION AND NUTRITION“, na kterých je můj podíl především metodický.

Na závěr si dovoluji požádat potenciální čtenáře o shovívavost s možná lehce obsáhlým literárním úvodem. Jeho rozsah je dán potřebou uvést čtenáře jednak do problematiky lineárních plazmidů kvasinek, jednak do problematiky syntézy čepičky na 5' konci mRNA. Stále totiž není zcela jasné, jakým způsobem jsou formovány 5' konce pGKL-specifických transkriptů. V části literárního úvodu věnované syntéze čepičky jsem se soustředil, vzhledem k zadání dizertační práce, hlavně na syntézu čepičky typu 0 (monometylovaná forma čepičky). Jen okrajově jsem se věnoval mechanismu iniciace translace nezávislé na čepičce, který je velmi podrobně popsán a diskutován v dizertační práci dr. Tomáše Maška, obhájené v naší skupině v roce 2006.



### III. LITERÁRNÍ PŘEHLED

#### 1. LINEÁRNÍ PLAZMIDY KVASINEK

Původní definice plazmidů (mimochromozomální, autonomně se replikující, kruhově uzavřená, dvouřetězcová DNA (dsDNA, *Double Stranded DNA*) prokaryotických organismů [1]) musela být po nalezení cirkulárního 2 μm plazmidu u kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) [2] rozšířena i na organismy eukaryotické. Následně byly DNA plazmidy objeveny i u vláknitých hub [3], u dalších rodů kvasinek jako např. u rodu *Zygosaccharomyces* [4] a rodu *Kluyveromyces* [5]. Po objevení prvních lineárních dsDNA plazmidů u kukuřice [6] došlo k popsání mnoha dalších obdobných plazmidů u vláknitých hub, zelených řas a kvasinek (viz souhrnné články [7-11]). Lineární dsDNA plazmidy mají charakteristické uspořádání, na obou koncích mají invertované terminální repetice (ITR, *Inverted Terminal Repeat*), kódují vlastní DNA a RNA polymerázu a jejich 5' konec je chráněn kovalentně navázaným terminálním proteinem (TP; *Terminal Protein*). Většinou jsou lokalizovány v mitochondriích svých hostitelů. V roce 1981 Gunge se spolupracovníky [12] objevil u kvasinky *Kluyveromyces lactis* (*K. lactis*) 2 lineární, cytoplazmaticky lokalizované dsDNA plazmidy. Do současné doby byl obdobný typ plazmidů popsán u 28 kvasinkových kmenů patřících do 18 druhů z 9 kvasinkových rodů [13, 14]. Cytoplazmatické plazmidy kvasinek *K. lactis*, *Pichia inositovora*, *Pichia accaciae*, *Debaryomyces hansenii* a *Wingea robertsiae* jsou spojeny s produkcí toxinu inhibujícího růst citlivých kvasinkových kmenů. Původ lineárních plazmidů není znám, podle jejich charakteristického uspořádání podobného adenovirům či lineárním fágům a podle srovnávání sekvencí (zejména konzervovaných domén DNA polymeráz [15-18]) se zdá, že lineární plazmidy pocházejí pravděpodobně z jednoho společného předka, patrně vzniklého endosymbiózou [7, 13, 15, 19, 20].

Modelovým systémem pro studium lineárních DNA plazmidů se stala kvasinka *K. lactis*, která obsahuje 2 plazmidy zodpovědné za produkci *killer* toxinu (zymocinu) inhibujícího růst citlivých kvasinkových buněk.

##### 1.1. Lineární plazmidy kvasinky *Kluyveromyces lactis*

Plazmidy pGKL1 (synonymum k1; 8874 bp) a pGKL2 (k2; 13457 bp) byly objeveny u kvasinky *K. lactis* IFO 1267 (ATCC 8585, CBS 2359, NRRL Y-1140) v roce 1981 [12]. Jedná se o cytoplazmatické, lineární, dsDNA plazmidy s vysokým obsahem A+T bází, velmi kompaktním genomem, invertovanými terminálními repeticemi na obou koncích plazmidu a

s terminálním proteinem navázaným na 5' konci plazmidové DNA. Pro cytoplazmatickou lokalizaci svědčí:

- vyšší citlivost pGKL plazmidů k UV záření ve srovnání s plazmidy lokalizovanými v jádře [21]
- barvitelnost pGKL plazmidů v cytoplazmě pomocí DAPI (4',6-diamidino-2-fenylindol) u  $\rho^0$  kvasinek [22]
- po lyzi buněčných protoplastů v hypotonickém prostředí se plazmidy nacházejí v cytoplazmatické frakci [23]
- přítomnost promotorů funkčních pouze v cytoplazmě [23-27]

Vznášivá hustota obou plazmidů ( $1,687 \text{ g/cm}^3$ ) je nižší než vznášivá hustota mitochondriální DNA ( $1,692 \text{ g/cm}^3$ ) i jaderné DNA ( $1,699 \text{ g/cm}^3$ ) kvasinky *K. lactis*, což umožňuje relativně snadnou izolaci pGKL plazmidů pomocí centrifugace v izopyknickém gradientu chloridu cesného [12, 23].

Plazmidy se vyskytují obvykle v počtu 50-100 kopií na buňku [28]. pGKL plazmidy jsou v kultuře velmi stabilní, k jejich ztrátě dochází za normálních okolností s frekvencí nižší než 1 %. Kmeny bez pGKL plazmidů lze vytvořit uměle pomocí UV záření (frekvence vzniku klonů bez pGKL plazmidů se pohybuje od 10 do 90 %). Citlivost k UV záření je pravděpodobně typická pro všechny cytoplazmaticky lokalizované dsDNA plazmidy [21, 29, 30]. Plazmidy není možno odléčit pomocí ethidium bromidu, cykloheximidu ani pomocí zvýšené teploty [29, 31, 32].

Přenos pGKL plazmidů u kvasinek *K. lactis* probíhá vertikálně i horizontálně; horizontální přenos se uskutečňuje pouze sexuálním párováním. Vertikální přenos mezi potomstvem a rodiči neodpovídá zákonům Mendelovské dědičnosti, což potvrzuje mimochromozomální lokalizaci pGKL plazmidů [12]. Přenos pGKL plazmidů do kvasinky *S. cerevisiae* se podařil pomocí indukované fúze protoplastů (s účinností zhruba 25 %) [33] a pomocí transformace protoplastů (s účinností zhruba 0,05 %) [22, 34]. Při přenosu pomocí transformace protoplastů dochází ke vzniku kmenů obsahujících kromě plazmidu pGKL2 i různé deleční varianty plazmidu pGKL1. Vznikl například kmen obsahující plazmid pGKL2 a 2 plazmidy nové, F1 (3,9 kbp) a F2 (7,8 kbp). Plazmid F1 má deletováno cca 5 kbp z pravé části plazmidu pGKL1 a jsou na něm přítomny dvě různé koncové struktury. Na jednom konci je navázaný terminální protein, na druhém je přítomna vlásenka s volným 3' koncem. Plazmid F2 je invertovaný dimer plazmidu F1 [33, 35]. Při přenosu pGKL plazmidů do kvasinky *S. cerevisiae* byla zjištěna neslučitelnost mitochondriální DNA této kvasinky

s pGKL plazmidy; pGKL plazmidy lze stabilně udržovat pouze v  $\rho^0$  nebo v  $\rho^-$  kmenech *S. cerevisiae* [36]. Oba plazmidy je také možné přenést do kvasinek *Kluyveromyces fragilis* (párováním) a do kvasinek *Candida pseudotropicalis* (indukovanou fúzí protoplastů). Některé hybridní kmeny odvozené od *K. fragilis* i od *C. pseudotropicalis* vykazují značně zvýšenou produkci zymocinu (17x, resp. 6x) v porovnání s mateřským kmenem *K. lactis* [37].

Ačkoliv se pGKL plazmidy vyskytují v cytoplazmě, může výjimečně docházet k jejich migraci do jádra. K tomuto jevu dochází v případě integrace jaderného genu s příslušným jaderným promotorem do jednoho z pGKL plazmidů a následné selekci na produkt integrovaného genu [25, 38-40]. V případě migrace do jádra dochází buď k vytvoření cirkulárního plazmidu nebo ke vzniku lineárního plazmidu s telomerními sekvencemi svého hostitele (TG<sub>1-3</sub> u *S. cerevisiae*) o délce 300-350 bp na obou koncích plazmidu [40-44]. Pokud se do pGKL plazmidů integruje vhodný jaderný gen (*LEU2*, *URA3*) bez svého přirozeného promotoru pod kontrolu plazmidového UCS elementu (*Upstream Conserved Sequence*; viz níže) ve „fázi“, dochází k expresi integrovaných markerových genů [25, 38, 45]. V tomto případě plazmidy zůstávají v cytoplazmě a mají standardní uspořádání [25, 26, 45-51]. Možnosti takto manipulovat s pGKL plazmidy bylo využito při testování nepostradatelnosti genových produktů všech otevřených čtecích rámců (ORF, *Open Reading Frame*) obou pGKL plazmidů pro jejich udržení v buňce. Ukázalo se, že pouze 2 čtecí rámce (ORF2-pGKL1 a ORF1-pGKL2; ORF11-pGKL2 testován nebyl) nejsou esenciální pro udržení plazmidů v buňce. U ostatních čtecích rámců nedošlo po jejich disrupci, ani při dlouhodobé kultivaci, k nahrazení původních pGKL plazmidů *de novo* vytvořenými plazmidy [46, 48, 52-55].

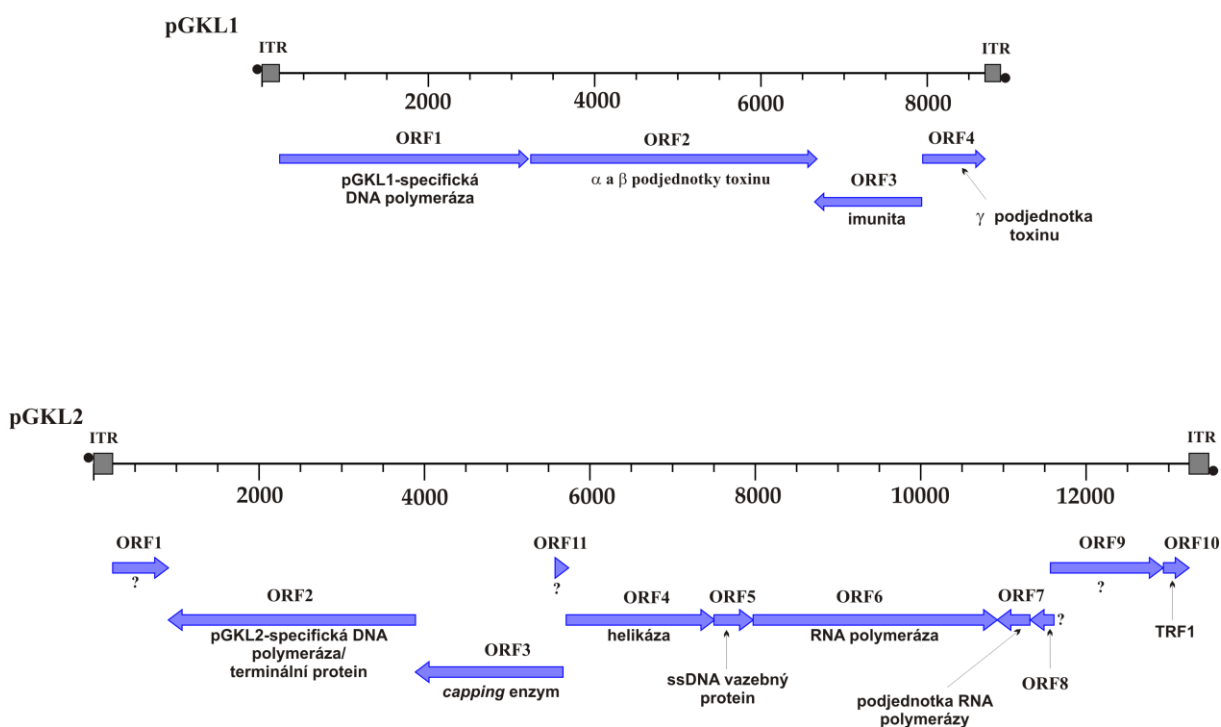
U pGKL plazmidů byl popsán tzv. *gene-shuffle* systém; tj. možnost přemístit gen z plazmidu pGKL2 (a současně ho na něm inaktivovat disrupcí) do neesenciálního čtecího rámce (ORF2) plazmidu pGKL1 [56]. Po této manipulaci je zcela zachována funkce „přehozeného“ genu, v průběhu kultivace dochází k nahrazení původních plazmidů *de novo* vytvořenými plazmidy. Možnost přemístění genů byla prokázána u ORF4-pGKL2 (kóduje pravděpodobnou helikázu [46]), u ORF5-pGKL2 (kóduje ssDNA vazebný protein) [46, 49, 57] a u ORF6-pGKL2 (kóduje pravděpodobnou RNA polymerázu [50]).

Obdobné lineární dsDNA plazmidy byly později nalezeny i u dalších kmenů *K. lactis*, u kmene CBS 1065 plazmidy pKL2A/2B; u kmene CBS 5618 plazmidy pKL3A/3B; u kmene CBS 8043 plazmidy pKL4A/4B a u kmene NRRL Y-1115 plazmidy pKL5A/5B. Přítomnost všech těchto plazmidů je spojena s *killer* fenotypem; restriční analýza pKL2-5 plazmidů potvrdila jejich blízkou příbuznost, ne-li shodnost, s pGKL plazmidy [30].

### 1.1.1. Genetické uspořádání pGKL plazmidů

Plazmid pGKL1 je dlouhý 8874 bp a obsahuje 73 % A+T bází. Nacházejí se na něm 4 otevřené čtecí rámce s již přiřazenými bílkovinnými produkty. Tyto čtecí rámce zaujímají více než 99 % z kódující sekvence pGKL1 plazmidu [58-61]. Plazmid pGKL1 má na obou koncích invertované terminální repetice o délce 202 bp [62] a na 5' konci kovalentně navázaný terminální protein o hmotnosti 28 kDa [23, 63], který se pravděpodobně účastní iniciace replikace tohoto plazmidu [32]. Plazmid pGKL1 se vyskytuje vždy pouze v přítomnosti plazmidu pGKL2, přičemž tato závislost může být transkripčního i replikačního charakteru [64]. Orientace otevřených čtecích rámců plazmidu pGKL1 je vyznačena na obrázku 1.

OBRÁZEK 1 – Uspořádání pGKL plazmidů. ITR – invertovaná terminální repetice; ● – terminální protein; ? – neznámá funkce genu.



Jednotlivé otevřené čtecí rámce pGKL1 plazmidu kódují následující proteiny:

*ORF1* – *pGKL1* (pravděpodobná pGKL1-specifická DNA polymeráza; 987 aminokyselin)  
ORF1 vykazuje sekvenční podobnosti s DNA polymerázami patřícími do rodiny B DNA polymeráz. Předpokládá se proto, že i tento ORF kóduje DNA polymerázu [65, 66]. Tato DNA polymeráza je nezbytná k udržení pGKL1 plazmidu v buňce; v případě přerušení otevřeného čtecího rámce, který ji kóduje, dojde ke ztrátě pGKL1 plazmidu z buněčné kultury. To nastane i v případě, kdy je v buňce přítomna funkční pGKL2-specifická DNA polymeráza (kódovaná ORF2-pGKL2). Obě DNA polymerázy jsou tedy pravděpodobně

plazmid-specifické, což může souviset s rozeznáváním vlastního terminálního proteinu či vlastní invertované terminální repetice při iniciaci replikace pGKL plazmidů [48, 67]. Tuto specifitu pGKL polymeráz podporuje také fakt, že se podařilo vytvořit několik defektních plazmidů odvozených od pGKL1 plazmidu. Tyto plazmidy však vždy obsahovaly neporušený ORF1-pGKL1. Pro správnou funkci polymerázy je nezbytná přítomnost minimálně 778 N-koncových aminokyselin [29, 35, 67, 68]. Promotor pGKL1-specifické polymerázy je lokalizován v levé invertované terminální repetici plazmidu pGKL1 [69].

*ORF2-pGKLI* (prekurzorový protein  $\alpha$  a  $\beta$  podjednotek zymocinu; 1146 aminokyselin)

Funkce tohoto prekurzorového proteinu vyplynula z několika delečních experimentů. Při delecích velké části ORF2-pGKL1 došlo ke ztrátě *killer* fenotypu, zatímco imunita vůči zymocinu zůstala zachována [58, 59, 68]. Při delecích části ORF2-pGKL1 a ORF3-pGKL1 došlo jak ke ztrátě *killer* fenotypu, tak i imunity vůči zymocinu [29, 59]. Výše uvedená zjištění naznačují, že ORF2-pGKL1 je alespoň částečně zodpovědný za produkci zymocinu [58] a ORF3-pGKL1 je pravděpodobně zodpovědný za imunitu vůči němu. ORF2-pGKL1 je překládán jako protein o velikosti 128 kDa. Z tohoto proteinu vznikají následnými posttranslačními úpravami dvě ze tří podjednotek zymocinu *K. lactis* [60, 70].

*ORF3-pGKLI* (imunita vůči zymocinu; 428 aminokyselin)

Tímto čtecím rámcem je kódována imunita vůči vlastnímu zymocinu. Pravděpodobně se jedná o jaderný nebo cytoplazmatický protein, o mechanismu jeho účinku není nic bližšího známo [71, 72].

*ORF4-pGKLI* ( $\gamma$ -podjednotka toxinu; 249 aminokyselin)

Tento otevřený čtecí rámec kóduje nejmenší podjednotku ( $\gamma$ ) *killer* toxinu (tzv.  $\gamma$ -toxin), která je výkonnou částí zymocinu (viz níže) [60].

Plazmid pGKL2 je dlouhý 13457 bp a obsahuje 75 % A+T bází. Na plazmidu pGKL2 se nachází 11 otevřených čtecích rámců, které zaujímají více než 99 % z jeho kódující sekvence [27, 64, 73, 74]. Bílkovinné produkty byly přiřazeny (většinou pomocí počítačové analýzy) pouze některým čtecím rámcům. Také plazmid pGKL2 obsahuje invertované terminální repetice (182 bp) [59, 62, 73] a na 5' konci kovalentně navázaný terminální protein o hmotnosti 36 kDa [23, 63, 75], který se pravděpodobně účastní iniciace replikace tohoto plazmidu [32]. Orientace otevřených čtecích rámců plazmidu pGKL2 je vyznačena na obrázku 1. Jednotlivé otevřené čtecí rámce pGKL2 plazmidu kódují následující proteiny:

*ORF1-pGKL2* (neznámá funkce; 224 aminokyselin)

Jelikož proteinový produkt tohoto otevřeného čtecího rámce vykazuje podobnost s ORF3-pGKL1 kódujícím imunitu vůči zymocinu, předpokládalo se, že by se také tento protein mohl podílet na imunitě vůči vlastnímu zymocinu [64]. To se však nepotvrdilo [45]. Podle stejných autorů by se produkt tohoto genu mohl podílet na udržení normálního počtu plazmidů v buňce (50-100 kopií) [45].

*ORF2-pGKL2* (pGKL2-specifická DNA polymeráza/terminální protein; 994 aminokyselin)

Protein kódovaný tímto čtecím rámcem vykazuje zhruba 46 % sekvenční podobnost s předpokládanou polymerázou plazmidu pGKL1 [73]. Po izolaci proteinu navázaného na 5' konci pGKL2 plazmidu byla v jeho N-koncové části nalezena sekvence deseti aminokyselin (Val<sup>228</sup>-Trp<sup>237</sup>) vykazující naprostou shodu s N-koncovou částí předpokládané DNA polymerázy plazmidu pGKL2. Je tedy velmi pravděpodobné, že stejným čtecím rámcem jsou kódovány terminální protein i pGKL2-specifická DNA polymeráza [75]. Situace, kdy jsou DNA polymeráza a terminální protein kódovány stejným čtecím rámcem, je běžná u lineárních genomů s terminálním proteinem hrajícím roli proteinového primeru v replikaci DNA, například u adenovirů či u bakteriofága Φ29 [76-78].

*ORF3-pGKL2* (enzym připojující N<sup>7</sup>-metylguanozinovou čepičku na 5' konec mRNA; *capping* enzym; 594 aminokyselin)

Tímto čtecím rámcem je kódován protein o velikosti 67 kDa. Jedná se pravděpodobně o enzym připojující N<sup>7</sup>-metylguanozinovou čepičku na 5' konec mRNA (*capping* enzym). Experimentálně byly ověřeny dvě ze tří aktivit nezbytných k syntéze čepičky, guanylyltransferázová a trifosfatázová aktivita tohoto proteinu. Třetí aktivita nutná k syntéze čepičky na 5' konci mRNA, RNA-guanin-N<sup>7</sup>-metyltransferázová aktivita, detekována nebyla, ačkoli se v tomto proteinu vyskytuje možné S-adenozyl-L-methionin vazebné místo [52, 79].

*ORF4-pGKL2* (pravděpodobná helikáza; 579 aminokyselin)

V tomto čtecím rámcu byly pomocí počítačové analýzy zjištěny určité homologie s helikázou viru vakcinie [64, 73].

*ORF5-pGKL2* (ssDNA vazebný protein; 158 aminokyselin)

Tímto čtecím rámcem je kódován protein o velikosti 18 kDa. Pravděpodobně se jedná o ssDNA vazebný protein účastnící se replikace obou pGKL plazmidů [53].

*ORF6-pGKL2* (pravděpodobná RNA polymeráza; 974 aminokyselin)

Pomocí počítačové analýzy byly v tomto čtecím rámci identifikovány 3 regiony vykazující sekvenční podobnosti se známými RNA polymerázami:

- úsek o délce 80 aminokyselin vykazující sekvenční podobnost s  $\beta$  podjednotkou RNA polymerázy bakterie *Escherichia coli*
- 2 úseky o délce 43 a 59 aminokyselin vykazující sekvenční podobnost s  $\beta'$  podjednotkou RNA polymerázy *E. coli* [15, 27]

Teorii pGKL-specifické RNA polymerázy potvrzuje i to, že jaderné geny nejsou exprimovány v cytoplazmě pod kontrolou svých promotorů a *vice versa*, nedochází k expresi genů lineárních plazmidů přenesených do *K. lactis* nebo *S. cerevisiae* na jaderném vektoru [24-26]. Zdá se tedy, že geny kódované lineárními plazmidy nepoužívají pro svoji transkripci jaderných RNA polymeráz I-III [27]. Kromě toho je přítomnost plazmidu pGKL1 v buňce zcela závislá na přítomnosti plazmidu pGKL2, přičemž jedním z hlavních důvodů této závislosti mohou být proteiny účastníci se transkripce a postranskripčních úprav pGKL-specifických mRNA, včetně pravděpodobné RNA polymerázy a její podjednotky či *capping* enzymu [64].

*ORF7-pGKL2* (pravděpodobná podjednotka RNA polymerázy; 132 aminokyselin)

Také v tomto čtecím rámci byly pomocí počítačové analýzy nalezeny homologie s  $\beta'$  podjednotkou RNA polymerázy *E. coli*. Protein kódovaný tímto genem byl nadprodukován v bakteriálním expresním systému s *c-myc* značkou. Následně byl identifikován genový produkt o očekávané velikosti zhruba 18,5 kDa [55].

*ORF10-pGKL2* (TRF1; Terminal Region Recognition Factor 1; 103 aminokyselin)

Otevřený čtecí rámec 10 kóduje malý bazický protein o hmotnosti okolo 16 kDa nazvaný TRF1. Tento protein se váže na terminální repetice obou plazmidů, konkrétně mezi báze 107-183 plazmidu pGKL1 a báze 126-179 plazmidu pGKL2 [80, 81]. Afinita tohoto proteinu k terminální repetici plazmidu pGKL1 je nižší než afinita k terminální repetici plazmidu pGKL2 [80]. TRF1 se pravděpodobně účastní iniciace replikace (např. rozeznání počátku replikace) obou plazmidů [80, 81].

*ORF8-pGKL2* (80 aminokyselin)

*ORF9-pGKL2* (453 aminokyselin)

*ORF11-pGKL2* (70 aminokyselin)

U těchto otevřených čtecích rámců zatím nebyla detekována ani navrhnutá žádná funkce.

### 1.1.2. Replikace pGKL plazmidů

O mechanismu replikace pGKL plazmidů není nic známo, nicméně díky jejich cytoplazmatické lokalizaci a díky specifickému uspořádání, tj. přítomnosti plazmidem kódovaných proteinů, pGKL1- a pGKL2-specifických DNA polymeráz, ssDNA vazebného proteinu, TRF1, a přítomnosti invertovaných terminálních repetice a terminálních proteinů na 5' konci plazmidové DNA, se u nich může uplatňovat obdobný replikační mechanismus jako například u adenovirů nebo u bakteriofága  $\Phi 29$  [64]. Adenoviry také kódují vlastní DNA polymerázu (140 kDa), terminální protein (80 kDa) a ssDNA vazebný protein a mají také invertované repetice s kovalentně navázaným terminálním proteinem (55 kDa) na 5' konci virové DNA. Při iniciaci replikace je TP kovalentně navázaný na DNA rozeznán komplexem DNA polymeráza/TP (80 kDa). TP (80kDa) se následně štěpí za vzniku proteinu o velikosti 55 kDa, který se váže esterovou vazbou přes hydroxylovou skupinu serinu na první nukleotid (dCMP) druhého vlákna DNA. Elongace replikace je poté zajišťována adenoviry kódovanou DNA polymerázou [77, 78, 82]. Model pro replikaci bakteriofága  $\Phi 29$  je obdobný s tím rozdílem, že prvním nukleotidem je dAMP [76, 77]. Z výše uvedeného vyplývá, že terminální protein navázaný na 5' konci lineárních plazmidů kvasinky *K. lactis* může hrát roli proteinového primeru při iniciaci replikace těchto plazmidů [32]. Kromě toho byla v otevřeném čtecím rámci kódujícím DNA polymerázu/TP plazmidu pGKL2 (ORF2-pGKL2), ale i v otevřených čtecích rámcích kódujících DNA polymerázu plazmidů pGKL1, pSKL (*Lachancea kluyveri*), pPE1B (*Pichia etchellsii*) a pDH1 (*Debaryomyces hansenii*), nalezena pravděpodobná konsensus sekvence SYKN typická pro terminální proteiny kódované kryptickými N-koncovými oblastmi DNA polymeráz lineárních plazmidů a virů [14, 75, 83].

Lineární pGKL plazmidy se stabilně replikují v haploidních kmenech *S. cerevisiae*  $\rho^0$  párovacího typu **a** (MATa) i párovacího typu  $\alpha$  (MAT $\alpha$ ). Jejich replikace je však značně nestabilní v diploidních  $\rho^0$  kmenech *S. cerevisiae* (MATa/MAT $\alpha$ ), což znamená, že průběh replikace lineárních plazmidů může být pod kontrolou MAT lokusu, pokud se v něm exprimuje  $\alpha 2$ -a1 represor haploidně specifických genů. Pomocí počítačové analýzy byly nalezeny konsensus sekvence pro  $\alpha 2$ -a1 represor v plazmidu pGKL2, konkrétně v ORF2-pGKL2 (DNA polymeráza, 3 místa s více než 80 % homologií), v ORF4-pGKL2 (helikáza, 1 místo s 86 % homologií) a v ORF3-pGKL2 (*capping* enzym, 2 místa s 80 % homologií) [84].

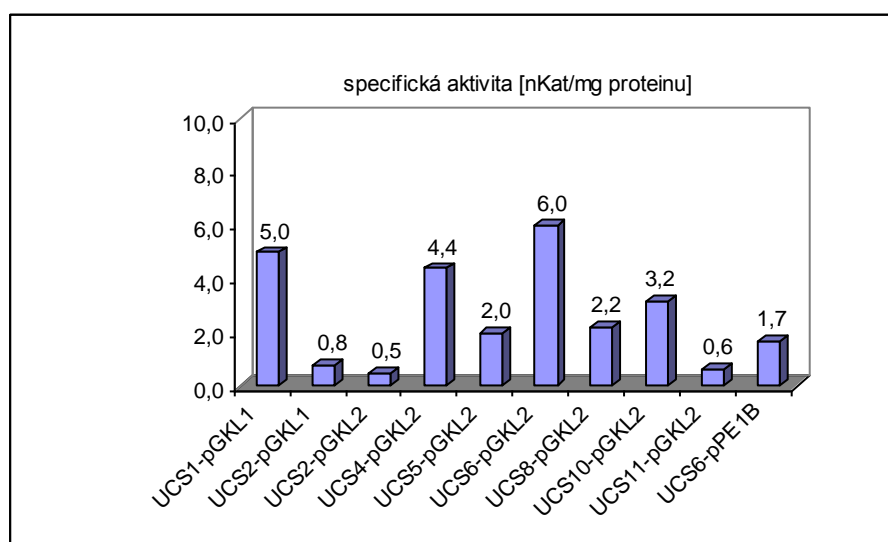


### 1.1.3. Transkripce genů kódovaných pGKL plazmidy

Transkripční aparát lineárních plazmidů kvasinky *K. lactis* je velmi zajímavý, ale zatím ne příliš prostudovaný. Díky své cytoplazmatické lokalizaci nemají za přirozených podmínek pGKL plazmidy přístup k buněčnému transkripčnímu aparátu. Transkripce plazmidy kódovaných genů probíhá i v  $\rho^0$  buňkách, což vylučuje účast mitochondriálního transkripčního systému. Je proto pravděpodobné, že transkripce plazmidem kódovaných genů je zajišťována genovými produkty plazmidu pGKL2 (pravděpodobnou RNA polymerázou a její podjednotkou), jak je běžné u cytoplazmaticky lokalizovaných virů. pGKL plazmidy navíc velmi neochotně exprimují jaderné geny a *vice versa*, geny kódované pGKL plazmidy nejsou exprimovány v jádře [25, 38].

Promotory genů kódovaných pGKL plazmidy ještě nebyly lokalizovány, nicméně ve vzdálenosti cca 20-40 nukleotidů před startovacím AUG kodonem byla nalezena promotorová regulační oblast (UCS; *Upstream Conserved Sequence*) vyskytující se před každým z patnácti genů. Tato šestinukleotidová konsensus sekvence (ATNTGA) je nutnou součástí promotorů lineárních plazmidů a je pravděpodobně univerzální pro všechny cytoplazmaticky lokalizované dsDNA plazmidy (viz tabulka 1) [24, 25, 49, 58, 64, 85, 86]. U několika vybraných „promotorů“ genů kódovaných pGKL plazmidy (v tomto případě se nejedná o přesně definovaný promotor, ale o sekvenci o délce cca 170-250 nukleotidů proti proudu transkripce obsahující příslušnou UCS a startovací AUG kodon) byla testována aktivita jimi řízené exprese. Tato aktivita byla nejnižší u předpokládané DNA polymerázy plazmidu pGKL2 (ORF2-pGKL2) a nejvyšší u předpokládané RNA polymerázy (ORF6-pGKL2) (viz obrázek 2) [19, 74, 85].

OBRÁZEK 2 – Účinnost promotorových regulačních oblastí pGKL plazmidů. UCS1-pGKL1 – promotorová regulační oblast otevřeného čtecího rámce 1 plazmidu pGKL1; UCS6-pPE1B – promotorová regulační oblast otevřeného čtecího rámce 1 plazmidu pPE1B apod. Upraveno podle [19, 85].



Při testování aktivit „promotorů“ pGKL plazmidů je nutné, aby markerový gen byl ve „fázi“ s testovaným UCS elementem [25, 26, 51]. Pouze v případě exprese řízené promotorovou regulační oblastí otevřeného čtecího rámce 5 (UCS5) to není nezbytně nutné, nicméně exprese markerového genu je v případě, kdy je UCS5 ve „fázi“ s markerovým genem, cca 40x vyšší [47, 87, 88].

TABULKA 1 – Srovnání promotorových regulačních oblastí (UCS) lineárních plazmidů kvasinek. Vždy je uvedena promotorová regulační oblast a vzdálenost (v nukleotidech) k příslušnému AUG startovacímu kodonu. **A** – porovnání promotorových regulačních oblastí autonomně se replikujících plazmidů, **B** - porovnání promotorových regulačních oblastí neautonomně se replikujících plazmidů; NA – není známo; × - ORF není přítomen; pGKL1/2 – plazmidy *K. lactis*; pSKL – plazmid *Saccharomyces kluyveri*; pPE1B/1A – plazmidy *Pichia etchellsii*; pPac1-1/2 – plazmidy *Pichia accaciae*; pWR1A – plazmid *Wingea robertsiae*; pPin1-3 – plazmid *Pichia inositovora*; pDHL1 – plazmid *Debaryomyces hanseni*. Upraveno podle [18, 64, 86, 89-91]

## A

	pGKL2	pSKL	pPE1B	pPac1-1
<b>ORF1</b>	ATATGA-21	ATTTGA-24	×	×
<b>ORF2</b>	ATATGA-82	ATCTGA-21	ATCTGA-47	ATATGA-129
<b>ORF3</b>	ATCTGA-153	ATATGA-46	ATGTGA-46	ATATGA-49
<b>ORF4</b>	ATCTGA-20	ATATGA-18	ATGTGA-20	ATATGA-26
<b>ORF5</b>	ATGTGA-102	ATCTGA-53	ATATGA-111	ATGTGA-111
<b>ORF6</b>	ATATGA-20	ATGTGA-20	ATGTGA-20	ATGTGA-23
<b>ORF7</b>	ATGTGA-21	ATGTGA-18	ATGTGA-20	ATGTGA-21
<b>ORF8</b>	ATTTGA-29	ATATGA-29	ATGTGA-29	ATTTGA-29
<b>ORF9</b>	ATTTGA-40	ATTTGA-40	AGTTGA-83	ATATGA-207
<b>ORF10</b>	ATATGA-20	ATATGA-22	ATATGA-22	ATATGA-20
<b>ORF11</b>	ATTTGA-25	ATATGA-250	ATTTGA-40	ATCTGA-103
<b>konsensus sekvence</b>	<b>ATNTGA</b>	<b>ATNTGA</b>	<b>A<sup>T</sup>/<sub>G</sub>NTGA</b>	<b>ATNTGA</b>

## B

	pGKL1	pWR1A	pPE1A	pPac1-2	pPin1-3	pDHL1
<b>ORF1</b>	ATATGA-20	ATATGA-22	ATATGA-47	ATTTGA-24	ATTTGA-27	CTCTGA-25/ ATGTGA-19
<b>ORF2</b>	ATATGA-22	ATATGA-21	ATATGA-22	ATATGA-20	ATCTGA-21	ATATGA-21
<b>ORF3</b>	ATATGA-22	ATATGA-22	ATATGA-18	ATTTGA-24	ATATGA-21/ ATATGA-14	NA
<b>ORF4</b>	ATCTGA-38	ATATGA-20	ATGTGA-19	ATATGA-28	ATTTGA-24	NA
<b>ORF5</b>	×	ATATGA-23	ATATGA-50	×	×	NA
<b>konsensus sekvence</b>	<b>AT<sup>A</sup>/<sub>c</sub>TGA</b>	<b>ATATGA</b>	<b>AT<sup>A</sup>/<sub>G</sub>TGA</b>	<b>AT<sup>A</sup>/<sub>T</sub>TGA</b>	<b>ATNTGA</b>	<b>NTNTGA</b>

Přesné uspořádání jednotlivých transkriptů zatím není dostatečně prostudované. Pomocí metody *Northern blot* bylo prokázáno, že všechny předpokládané otevřené čtecí rámce pGKL1 plazmidu jsou aktivně transkribovány [24, 58]. Pomocí metody prodlužování primerů (*primer extension*) společně s mapováním S1 exonukleázou byly detekovány pravděpodobné transkripční počátky u všech produktů čtecích rámců plazmidu pGKL1. Ve všech případech bylo zjištěno více potenciálních transkripčních startů ve vzdálenosti 2-27

nukleotidů před AUG startovacím kodonem [24, 58, 64]. U plazmidu pGKL2 byla přítomnost specifických transkriptů potvrzena pomocí metody *Northern blot* pro ORF 4, 5, 6, 7 a 9 [54, 55, 73]. Produkty otevřených čtecích rámců 3 a 7 byly nadprodukovány v bakteriálních expresních systémech [55, 79], produkty otevřených čtecích rámců 2 a 10 byly částečně charakterizovány pomocí metod *Southern* a *Western blot*, případně izolovány přímo z kultury *K. lactis* nesoucí pGKL plazmidy [75, 80, 81]. U ORF5 a ORF9 plazmidu pGKL2 bylo pomocí metody *primer extension* nalezeno více možných transkripčních startů; u ORF5 jich bylo detekováno 5 ve vzdálenosti 85-89 nukleotidů před AUG startovacím kodonem [53] u ORF9 byly detekovány 4 transkripční starty lokalizované 21-24 nukleotidů před AUG startovacím kodonem [54]. Mapování 3' konců plazmidu pGKL1 pomocí metody *primer extension* nebylo příliš úspěšné, předpokládá se, že každý transkript má jinak dlouhou 3' nepřekládanou oblast [58, 64].

#### **1.1.4. Translace genů kódovaných pGKL plazmidy**

Mechanismus translace pGKL-specifických genů je zatím zcela nejasný. Účinnost translace je pravděpodobně ovlivněna extrémně krátkými 5' nepřekládanými oblastmi (např. u ORF1-pGKL1 pouze 2 nukleotidy) a také vysokým obsahem A+T bází [64].

#### **1.1.5. Killer toxin (zymocin) kvasinky *K. lactis***

Zymocin je tvořen třemi podjednotkami ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ) o velikostech 99, 30 a 28 kDa [70]. Všechny 3 podjednotky jsou kódovány plazmidem pGKL1; dvě větší podjednotky jsou produktem proteolytického štěpení  $\alpha\beta$  proteinu kódovaného ORF2,  $\gamma$ -podjednotku kóduje ORF4 [70]. Podjednotka  $\alpha$  je pravděpodobně, na rozdíl od obou dalších podjednotek zymocinu, N-glykosylována [70, 92]. ORF2 plazmidu pGKL1 je překládán jako jeden polypeptid o délce 1146 aminokyselin. V tomto proteinu, který na svém N-konci obsahuje sekreční a lokalizační sekvence (tzv. pre-pro sekvence), štěpí Kex2 proteáza (kódovaná *KEX1* genem *K. lactis*) v místech KR<sup>29</sup> a KR<sup>894</sup> za vzniku  $\alpha$  a  $\beta$  podjednotek zymocinu [64, 93, 94]. Obdobným způsobem probíhá maturace  $\alpha$  a  $\beta$  podjednotek i u *S. cerevisiae*. Také  $\gamma$ -podjednotka má na svém N-konci sekreční signál, nicméně sekretována je pouze v přítomnosti ostatních podjednotek nebo v případě, že je původní sekreční signál  $\gamma$ -podjednotky nahrazen cizí pre-pro-sekvencí [95-97]. Terciární struktura zymocinu je závislá na vnitřních disulfidických vazbách [70, 98], zymocin se po redukci disulfidických můstků rozpadá na jednotlivé podjednotky a ztrácí aktivitu [70]. Zymocin je aktivní při pH v rozmezí 6,8 až 8,0 s výrazným vrcholem při pH 7,0, poločas jeho denaturace při 50 °C je 10 minut [92, 98, 99]. Účinek

zymocinu je pravděpodobně pod kontrolou MAT lokusu kvasinky *S. cerevisiae*. Zatímco haploidní MAT $\alpha$  kmeny jsou na působení zymocinu velmi citlivé, citlivost haploidních MAT $\alpha$  či diploidních kmenů *S. cerevisiae* vůči zymocinu je značně nižší [100].

Vlastní výkonnou částí zymocinu je  $\gamma$ -podjednotka ( $\gamma$ -toxin), její intracelulární exprese vede k usmrcení citlivé buňky, zatímco její extracelulární exprese nemá na citlivé buňky žádný vliv [97, 101, 102]. Jedná se tedy o výkonnou část zymocinu *K. lactis*, která ovšem může vstupovat do cílové buňky pouze ve formě holozymocinu, tj. v přítomnosti ostatních dvou podjednotek. Zymocin *K. lactis* je aktivní nejen vůči kmenům *K. lactis* bez pGKL plazmidů, ale i vůči dalším druhům kvasinek [12, 33, 37, 64]:

- *Kluyveromyces thermotolerans*, *K. vanudenii*, *K. africanus*, *K. drosophilarum*, *K. marxianus*, *K. phaffii*, *K. polysporus*, *K. wickerhamii*, *K. fragilis*
- *Saccharomyces cerevisiae*, *S. italicus*, *S. rouxii*, *S. uvarum*
- *Torulopsis glabrata*
- *Candida utilis*, *C. intermedia*, *C. albicans*, *C. glabrata*
- *Cryptococcus neoformans*
- *Pichia anomala*

Účinek zymocinu se studuje převážně na kvasince *S. cerevisiae*. Původně se předpokládalo, že zymocin inhibuje adenylátcyklázu citlivých kvasinek [103], což se ovšem nepotvrdilo [104]. Citlivé haploidní kvasinky se působením zymocinu hromadí jako velké, nepučící buňky obsahující pre-replikační (1n) DNA, což je známkou zastavení buněčného cyklu v G<sub>1</sub> fázi [99, 105]. V případě zymocinu jde o zastavení nevratné.

Do současné doby bylo identifikováno několik mutací ovlivňujících citlivost kvasinky *S. cerevisiae* vůči zymocinu. Tyto mutace se dají rozdělit podle schopnosti růstu buněk v přítomnosti zymocinu na následující skupiny [101, 102, 106-110]:

- skt (Sensitivity to K. lactis Toxin) mutanty
- iki (Insensitive to Killer) mutanty
- kti (K. lactis Toxin Insensitive) mutanty a
- tot (Toxin Target site) mutanty

Z hlediska citlivosti na intracelulární produkci  $\gamma$ -toxinu z indukibilního promotoru je možné výše uvedené mutanty rozdělit do následujících tříd (viz tabulka 2) [72, 101, 102, 111]:

- mutanty I. třídy - mající defekt v navázání či ve vstupu zymocinu do buňky

- mutanty II. třídy - mající defekt v místě účinku zymocinu
- mutanty III. třídy – mající zatím neurčený defekt

TABULKA 2 – Geny kvasinky *S. cerevisiae* ovlivňující její citlivost vůči zymocinu *K. lactis*.

GEN	FUNKCE PROTEINU	VZTAH K ZYMOcinu	CITACE
<b>MUTANTY I. TŘÍDY</b>			
<i>CHS3/KTI2</i>	syntéza chitinu	vazba zymocinu	[106, 112]
<i>CHS4/SKT5</i>	syntéza chitinu	vazba zymocinu	[107, 108, 112, 113]
<i>CHS5</i>	syntéza chitinu	vazba zymocinu	[112]
<i>CHS6</i>	syntéza chitinu	vazba zymocinu	[112]
<i>CHS7</i>	syntéza chitinu	vazba zymocinu	[112]
<i>PMA1/KTI10</i>	H <sup>+</sup> -ATPáza	po navázání zymocinu	[114]
<i>PTK2</i>	aktivátor Pma1	před TOT <sup>1</sup>	[114]
<i>KTI6/IPT1</i>	M(IP) <sub>2</sub> C <sup>2</sup>	po navázání zymocinu	[106, 115]
<i>GRX3<sup>3</sup></i>	glutaredoxin	po navázání zymocinu	[112]
<b>MUTANTY II. TŘÍDY</b>			
<i>KTI1</i>	?	?	[106]
<i>IKI3/ELP1/TOT1</i>	<i>elongátor</i>	syntéza mcm <sup>5</sup> U/ncm <sup>5</sup> U*	[102, 110, 116]
<i>ELP2/TOT2</i>	<i>elongátor</i>	syntéza mcm <sup>5</sup> U/ncm <sup>5</sup> U*	[102, 116, 117]
<i>ELP3/TOT3</i>	<i>elongátor</i>	syntéza mcm <sup>5</sup> U/ncm <sup>5</sup> U*	[102, 116]
<i>KTI12/TOT4<sup>3</sup></i>	<i>elongátor-AP<sup>4</sup></i>	syntéza mcm <sup>5</sup> U/ncm <sup>5</sup> U*	[102, 106, 116, 118, 119]
<i>IKI1/ELP5/TOT5/ HAP2</i>	<i>elongátor</i>	syntéza mcm <sup>5</sup> U/ncm <sup>5</sup> U*	[102, 110, 116]
<i>ELP6/TOT6/HAP3</i>	<i>elongátor</i>	syntéza mcm <sup>5</sup> U/ncm <sup>5</sup> U*	[116, 120]
<i>ELP4/TOT7/HAP1</i>	<i>elongátor</i>	syntéza mcm <sup>5</sup> U/ncm <sup>5</sup> U*	[116, 120]
<i>KTI11/TRM9</i>	tRNA metyltransferáza	syntéza mcm <sup>5</sup> U/ncm <sup>5</sup> U*	[116, 118, 121]
<i>ATS1/KTI13</i>	homolog RCC1 <sup>5</sup>	syntéza mcm <sup>5</sup> U/ncm <sup>5</sup> U*	[116, 118]
<i>HRR25/KTI14</i>	kasein kinázaI	?	[122]
<i>SIT4</i>	PPáza <sup>6</sup>	TOT <sup>1</sup> -DP <sup>7</sup>	[123, 124]
<i>SAP155<sup>3</sup></i>	Sit4-AP <sup>4</sup>	?	[123, 124]
<i>SAP185</i>	Sit4-AP <sup>4</sup>	TOT <sup>1</sup> -DP <sup>7</sup>	[123, 124]
<i>SAP190</i>	Sit4-AP <sup>4</sup>	TOT <sup>1</sup> -DP <sup>7</sup>	[123, 124]
<i>URM1</i>	urmylace <sup>8</sup>	stabilita TOT ?	[125]
<i>tRNA<sub>3</sub><sup>Glu<sup>3</sup></sup></i>	transferová-RNA	?	[106]
<b>MUTANTY III. TŘÍDY</b>			
<i>UBA4</i>	urmylace <sup>8</sup>	stabilita TOT <sup>1</sup> ?	[125]
<i>KAP120</i>	karyoferin	TOT <sup>1</sup> ?	[125]
<i>DPH2</i>	diftamid	?	[125]
<i>YIL103w</i>	diftamid	?	[125]
<i>MATa</i>	párovací typ	?	[106]

<sup>1</sup> TOT: potenciální cíl  $\gamma$ -toxinu; <sup>2</sup>M(IP)<sub>2</sub>C: manosyl-diinositolfosfoceramid; <sup>3</sup>vícekopiový supresor zymocinu; <sup>4</sup>AP: asociovaný protein; <sup>5</sup>RCC1: regulátor dekonenzace chromatinu; <sup>6</sup>PPáza: protein fosfatáza; <sup>7</sup>DP: defosforylace; <sup>8</sup>urmylace: spojení s Urm1 (*Ubiquitin Related Modifier*); \*mcm<sup>5</sup>U/ncm<sup>5</sup>U: metoxykarbonylmetyl/5-karbamoylmetyl skupina na uridinu v pozici 34 (*wobble*), ? – zatím nepotvrzená hypotéza. Upraveno podle [72, 115, 116, 121].

Receptorem zymocinu na buněčné stěně je pravděpodobně chitin [126, 127].  $\alpha$ -podjednotka zymocinu obsahuje chitin-vazebnou doménu a chitinázový motiv s esenciální aminokyselinou Glu<sup>466</sup> [128]. Zymocin také váže chitin *in vitro*, vykazuje exochitinázovou

aktivitu [112, 126, 129] a jeho účinek je blokován  $\beta$ -alosanidinem, kompetitivním inhibitorem chitináz [126]. Navázání zymocinu na buněčnou stěnu umožňuje pravděpodobně hydrofobní  $\beta$ -podjednotka [64]. Prakticky nic není známo o mechanismu, jakým vstupuje  $\gamma$ -podjednotka do buňky, zda vstupuje sama či s  $\beta$ -podjednotkou, kdy a kde dochází ke štěpení  $\beta/\gamma$  disulfidických můstků [72, 105]. Jednou z hypotéz je, že po navázání na plazmatickou membránu je  $\gamma$ -podjednotka aktivována membránovou  $H^+$ -ATPázou (*PMA1/KTI10*) a vstupuje do buněčného cytozolu v závislosti na syntéze sfingolipidů (*KTI6/IPT1*) [114, 115]. Vstup  $\gamma$ -podjednotky do buňky je také ovlivněn mutací v genu kódujícím oxidoreduktázu (*GRX3*) *S. cerevisiae* [112].

Při analýze TOT mutantů (mutantů v potenciálním cílovém místě zymocinu) bylo identifikováno několik genů. Později se ukázalo, že část z nich patří ke komplexu, nazvanému *elongátor*, spojenému s RNA polymerázou II kvasinky *S. cerevisiae*. *Elongátor* se skládá z šesti podjednotek (Elp1-Elp6; případně Tot1-3 a Tot5-7 podle původních prací týkajících se zymocinu *K. lactis*). Podjednotky Elp1-3 (jádro *elongátoru*) jsou spojeny s hyperfosforylovanou formou RNA polymerázy II [130], podjednotky Elp4-Elp6 jsou k *elongátoru* připojeny ve formě jakéhosi subkomplexu [131, 132]. Celý komplex *elongátoru* vykazuje *in vitro* histon H3/H4 acetyltransferázovou aktivitu [133, 134]. *Elongátor* hraje roli při iniciaci a elongaci transkripce *in vivo* [130], při modifikacích tRNA [116] a při regulaci exocytózy [135]. Mutace v komplexu *elongátor* vyvolávají značně pleiotropní efekt: pomalejší adaptace na změnu podmínek, pomalý růst, zvýšená citlivost k teplotě, vysoké koncentraci solí, 6-azauracilu a fluorescenční barvičce *Calcofluor white* [102, 120, 130-132]. Mutace v *elongátoru* také způsobují rezistenci k zymocinu *K. lactis* [102, 120, 136]. Obdobný pleiotropní efekt vyvolávají i mutace v genech *KTI11-KTI13* [102, 118, 120]; navíc produkty genů *KTI11* a *KTI13* jsou ve fyzickém kontaktu s podjednotkami *elongátoru* [125, 137]. Všechny podjednotky *elongátoru* (Elp1-Elp6) a proteiny Kti11-Kti13 jsou nezbytné pro syntézu 5-metoxycarbonylmetylové ( $mcm^5$ ) a 5-karbamoylmetylové ( $ncm^5$ ) skupiny v molekule tRNA na uridinu v pozici 34 (tzv. *wobble* nukleotid) [116]. Nedávno byly identifikovány 3 tRNA ( $tRNA_{mcm^5s^2UUC}^{Glu}$ ,  $tRNA_{mcm^5s^2UUU}^{Lys}$  a  $tRNA_{mcm^5s^2UUG}^{Gln}$ ), které jsou štěpeny  $\gamma$ -toxinem na 3' konci modifikovaného *wobble* nukleotidu (5-metoxycarbonylmetyl-2-thiouridin –  $mcm^5s^2U_{34}$ ), přičemž pro účinnost tohoto štěpení je důležitá přítomnost  $mcm^5$  skupiny. To také vysvětluje, proč jsou mutanty v genech *TRM9*, *ELP1-6* a *KTI11-KTI13* (viz tabulka 2) rezistentní k účinkům zymocinu [138]. Z výše uvedených poznatků vyplývá, že zymocin *K. lactis* (přesněji jeho  $\gamma$ -podjednotka) pravděpodobně štěpí tRNA molekuly

( $\text{tRNA}_{\text{mcm}^5\text{s}^2\text{UUC}}^{\text{Glu}}$ ,  $\text{tRNA}_{\text{mcm}^5\text{s}^2\text{UUU}}^{\text{Lys}}$  a  $\text{tRNA}_{\text{mcm}^5\text{s}^2\text{UUG}}^{\text{Gln}}$ ) v antikodonovém místě [121, 138]. Mechanismus tohoto štěpení připomíná štěpení prekurzorů tRNA sestřihovými endonukleázami [139], případně štěpení molekul tRNA bakteriálními tRNA endonukleázami PrrC, kolicinem E nebo kolicinem D [140-143].

### 1.1.6. Využití lineárních plazmidů

Kvasinka *K. lactis* patří do skupiny tzv. GRAS organismů (Generally Regarded As Safe) [144], což umožňuje její široké využití i v potravinářském či farmaceutickém průmyslu. Z hlediska praktického využití lineárních plazmidů se dá uvažovat o následujících aplikacích:

- využití zymocinu produkovaného *K. lactis* k inhibici růstu kontaminujících kvasinek při výrobě vína či moštu [145], případně při přípravě siláže [146-148]
- možnost vytvořit jakési minichromozómy s využitím invertovaných terminálních repetit a UCS elementů z lineárních pGKL plazmidů [149]
- možnost vytvoření relativně účinného expresního systému, s možností sekrece produkovaných proteinů do média; do současnosti byla popsána exprese několika proteinů (lidský interleukin 1 $\beta$ , lidský albumin, myší  $\alpha$ -amyláza, glykoprotein E2 viru hepatitidy C, bakteriální  $\beta$ -laktamáza a glukooamyláza, xylanáza a laktáza z hub apod.) za použití signálních sekvencí zymocinového komplexu [87, 95, 150-163]

### 1.2. Lineární dsDNA plazmidy ostatních kvasinek

V kvasince *Pichia inositovora* (NRRL Y-18709) byly nalezeny 3 lineární dsDNA plazmidy (pPin1-1, pPin1-2 a pPin1-3) o velikostech cca 18, 10 a 9,7 kbp. Všechny plazmidy mají pravděpodobně na 5' konci navázaný terminální protein. Podrobněji byl analyzován pouze plazmid pPin1-3, který je 9683 bp dlouhý, obsahuje 71 % A+T bází a na jeho koncích jsou přítomny invertované terminální repeticity o délce 154 bp. Na tomto plazmidu se nacházejí 4 otevřené čtecí rámce zabírající více než 95 % z kódující sekvence plazmidu pPin1-3. Před každým z těchto čtecích rámců je patrný šestinukleotidový UCS element (viz tabulka 1). Otevřené čtecí rámce plazmidu pPin1-3 vykazují sekvenční podobnosti s plazmidem pGKL1. ORF1 vykazuje sekvenční podobnost s ORF3-pGKL1 (u *K. lactis* kóduje imunitu vůči vlastnímu zymocinu); ORF2 vykazuje sekvenční podobnost s ORF1-pGKL1 (pGKL1-specifická DNA polymeráza); ORF3 vykazuje sekvenční podobnost s ORF2-pGKL1 (prekurzorový protein  $\alpha$  a  $\beta$  podjednotek zymocinu); ORF4 vykazuje slabou sekvenční podobnost s ORF4-pGKL1 ( $\gamma$ -podjednotka zymocinu) [18].

Plazmidy *P. inositovora* jsou spojeny s *killer* fenotypem. *Killer* toxin o velikosti cca 100 kDa funguje s největší pravděpodobností obdobným mechanismem jako zymocin *K. lactis*. Receptorem toxinu je pravděpodobně chitin [18, 164].

V kvasince *Pichia pastoris* (NRRL Y-4290) byly objeveny 2 plazmidy o velikostech cca 8 a 11 kbp. Oba plazmidy jsou rezistentní k RNáze A a k exonukleáze  $\lambda$ , naopak jsou citlivé k DNáze I. Jde tedy pravděpodobně o dsDNA lineární plazmidy s 5' chráněným koncem. Jejich předpokládaná linearita bylo potvrzena restričním mapováním. Tyto plazmidy nejsou spojeny s *killer* fenotypem [165, 166].

V kvasince *Pichia accaciae* (NRRL Y-18665) byly nalezeny 2 lineární dsDNA plazmidy pPac1-1 (12646 bp) a pPac1-2 (6785 bp). Oba 2 plazmidy se vyznačují vysokým obsahem A+T bází (75 %, resp. 73 %), velmi kompaktním genomem (otevřené čtecí rámce zabírají 97 %, resp. 95 % z kódující sekvence plazmidů) a invertovanými repeticemi na koncích plazmidu (138 bp, resp. 203 bp) [86, 90, 167, 168]. Před každým z čtecích rámců je patrný šestinukleotidový UCS element (viz tabulka 1) [86]. Plazmid pPac1-2 obsahuje 4 otevřené čtecí rámce, z nichž 2 (ORF1 a ORF3) vykazují sekvenční podobnost (47 %, resp. 34 %) s ORF2-pGKL2, který kóduje prekurzorový protein  $\alpha$  a  $\beta$  podjednotek zymocinu. Nicméně pouze u proteinu, který je kódován ORF1-pPac1-2, se vyskytuje typický chitin vazebný motiv a chitinázová doména rodiny 18, umožňující vazbu zymocinu (u *K. lactis*) na chitin v buněčné stěně cílové buňky. Oproti plazmidu pGKL1 se v plazmidu pPac1-2 nevyskytuje žádný ORF s podobností k DNA polymeráze ani s podobností ke  $\gamma$ -podjednotce zymocinu [86, 90]. Plazmid pPac1-1 obsahuje 10 otevřených čtecích rámců vykazujících sekvenční podobnosti s otevřenými čtecími rámci 2 až 11 plazmidu pGKL2 (sekvenční podobnost se pohybuje v rozmezí od 39 % pro ORF10 po 57 % pro ORF4) [86].

Plazmidy kvasinky *P. accaciae* jsou spojeny s *killer* fenotypem. *Killer* toxin se skládá ze tří podjednotek o velikostech přibližně 107,7 kDa (podjednotka kódována ORF1-pPac1-2), 37,7 kDa (kódována ORF2-pPac1-2) a 38 kDa (kódována ORF3-pPac1-2). Toxin je velmi stabilní, jeho aktivitu výrazně neovlivňuje dlouhodobé skladování ve 4 °C, zmrazování a rozmrazování a dokonce ani přítomnost 6 M močoviny. Optimální pH pro aktivitu toxinu leží v rozmezí hodnot 7,0 až 7,5 [90, 169]. Účinek toxinu na kvasinku *S. cerevisiae* je pravděpodobně pod kontrolou MAT lokusu; zatímco haploidní MAT $\alpha$  kmeny jsou na toxin velmi citlivé, citlivost haploidních MAT $\alpha$  či diploidních kmenů *S. cerevisiae* je značně nižší [100]. Receptorem tohoto toxinu na membráně citlivé buňky je pravděpodobně chitin, mutace v hlavní chitináze *S. cerevisiae* (*CHS3*) vede k rezistenci původně citlivé buňky. V ORF1-



pPac1-2 se vyskytuje hydrofobní oblast, o které se u zymocinu *K. lactis* předpokládá, že napomáhá ke vstupu  $\gamma$ -toxinu do buňky. Účinek toxinu není závislý na *elongátoru* RNA polymerázy II. Citlivé buňky jsou inhibovány toxinem během S-fáze růstu; v průběhu působení toxinu se fosforyluje proteinkináza Rad53 [90], která je kontrolním bodem zajišťujícím zastavení buněčného cyklu na přechodu G<sub>1</sub>/S, během S nebo na přechodu G<sub>2</sub>/M fáze [170-172]. Toxin kvasinky *P. accaciae* působí pravděpodobně ve dvou krocích. Během prvních 4 hodin působení toxinu na citlivé buňky dochází ke snížení životaschopnosti těchto buněk na cca 30 % a ke dvanásobnému zvýšenému výskytu mutací v *CAN1* lokusu [173]. Po více než 10 hodinách působení toxinu je možné detekovat u citlivých buněk pozitivní reakci na TUNEL test (*Terminal Transferase dUTP Nick End Labeling*) a formování ROS (*Reactive Oxygen Species*). Na vnější membráně se objevuje fosfatidylserin [173]. Všechny popsány znaky jsou typickými projevy začínající buněčné apoptózy [174, 175].

V kvasince *Pichia etchellsii* (CBS 2011) byly nalezeny 2 lineární dsDNA plazmidy pPE1A (6749 bp) a pPE1B (12835 bp). Oba 2 plazmidy se vyznačují vysokým obsahem A+T bází (78 %, resp. 77 %), invertovanými repeticemi na koncích plazmidů (178 bp, resp. 161 bp) a terminálním proteinem kovalentně navázaným na 5' konci plazmidové DNA [19, 30, 91]. Plazmid pPE1B má velmi kompaktní genom, otevřené čtecí rámce zabírají 97 % z jeho kódující sekvence. Naopak uspořádání genomu plazmidu pPE1A příliš kompaktní není, otevřené čtecí rámce zabírají pouze 73 % z jeho kódující sekvence [19, 91]. Před každým z čtecích rámců je patrný šestinukleotidový UCS element (viz tabulka 1) [19, 91], plazmidy jsou odléčitelné UV zářením [30]. Plazmid pPE1A obsahuje 5 otevřených čtecích rámců. Pro produkty ORF1, 3, 4, 5 zatím nebyla predikována žádná funkce. U produktu ORF2 byla detekována sekvenční podobnost s ORF2-pGKL2 (kóduje prekurzorový protein  $\alpha$  a  $\beta$  podjednotek zymocinu *K. lactis*). Tento protein je možné izolovat pomocí chitin afinitní chromatografie a následně ho detekovat pomocí specifické protilátky proti  $\alpha$ -podjednotce zymocinu *K. lactis*. Nicméně pravděpodobně se nejedná o *killer* toxin, ale o plazmidem kódovaný a následně sekretovaný protein neznámé funkce. Plazmid pPE1A také neobsahuje žádný gen s podobností k DNA polymeráze ani s podobností ke  $\gamma$ -podjednotce zymocinu [91]. Plazmid pPE1B obsahuje 10 otevřených čtecích rámců vykazujících sekvenční podobnost s otevřenými čtecími rámci 2 až 11 plazmidu pGKL2. Sekvenční podobnost se pohybuje v rozmezí od 36 % pro ORF7 do 59 % pro ORF8 [19]. Obdobné plazmidy byly nalezeny i v dalších kmenech *P. etchellsii* (CBS 2012, CBS 5603, CBS 6823). Podle výsledků

restrikčního mapování se zdá, že plazmidy (pPE2-pPE4) izolované z těchto kmenů jsou velmi podobné plazmidům pPE1 [30].

V kvasince *Lachancea kluyveri* (synonymum *Saccharomyces kluyveri*; IFO 1685) byl objeven pouze jeden plazmid (pSKL) o velikosti 14281 bp, který má vysoký obsah A+T bází (72 %), velmi kompaktní genom (otevřené čtecí rámce zabírají 95 % kódující sekvence plazmidu) a invertované repetice (483 bp) na koncích plazmidu. Plazmid pSKL obsahuje 11 otevřených čtecích rámců vykazujících sekvenční podobnost s otevřenými čtecími rámci 1 až 11 plazmidu pGKL2. Tyto sekvenční podobnosti se pohybují v rozmezí od 43 % pro ORF1 po 67 % pro ORF4. Před každým z čtecích rámců je patrný šestinukleotidový UCS element (viz tabulka 1) [74, 176, 177].

Lineární dsDNA plazmidy byly nalezeny u dvou kmenů kvasinky *Debaryomyces hansenii*. Oba typy plazmidů jsou rezistentní k exonukleáze  $\lambda$ , naopak jsou citlivé k exonukleáze III. Jde tedy pravděpodobně o dsDNA lineární plazmidy s 5' chráněným a 3' nechráněným koncem. Plazmidy obou kmenů jsou odléčitelné UV zářením [21, 30].

U kmene CBS 770 jsou přítomny 2 plazmidy (pDH1A a pDH1B) o velikostech cca 8,2 kbp, resp. 14,4 kbp [30]. Plazmidy jsou stabilně udržovány v buňce při kultivaci v YEPD médiu při 30 °C, v teplotách vyšších než 33 °C se z buněk postupně ztrácejí. Této ztrátě se dá zabránit přidáním 0,3 M NaCl nebo 1 M sorbitolu do kultivačního média, nicméně při zvýšení kultivační teploty nad 35 °C dojde k úplnému odléčení buněk od pDH1 plazmidů [178]. Tyto plazmidy nejsou spojeny s *killer* fenotypem [30].

U kmene TK (CBS 7848) byly nalezeny 3 plazmidy (pDHL1, pDHL2, pDHL3) o velikostech cca 8,4 kbp; 9,2 kbp a 15 kbp [179]. Plazmid pDHL1 byl zčásti osekvenován (AccI-PstI fragment o velikosti 4184 bp, lokalizovaný na 5' konci plazmidu). Tento fragment obsahuje jeden úplný (ORF1 – 3003 bp) a jeden neúplný (ORF2 - 745 bp) čtecí rámec. ORF1 vykazuje zhruba 59 % sekvenční podobnost s ORF1-pGKL1 (kóduje pGKL1-specifickou DNA polymerázu). Neúplný ORF2 vykazuje částečnou sekvenční podobnost (23 %) s N-koncovou částí ORF2-pGKL1 (kóduje  $\alpha$ -podjednotku zymocinu). Obsah A+T bází sekvenovaného fragmentu je vysoký (72 %) [89]. Lineární plazmidy kmene TK jsou stabilně udržovány v buňce při kultivaci v YEPD médiu v teplotách nižších než 25 °C. Ve vyšších teplotách (33-35 °C) dochází k jejich postupné ztrátě z buněk, čemuž se dá zabránit přidáním 0,3 M NaCl nebo 1 M sorbitolu do kultivačního média [178]. V přítomnosti NaCl (0,1-2,1 M) také dochází k produkci *killer* toxinu působícího na některé citlivé kvasinkové kmeny (*Pichia anomala*, *Pichia subpelliculosa*, *Debaryomyces hansenii*, *Candida parapsilosis*, *Torulopsis*

*glabrata*, *Saccharomyces exiguus* a *S. cerevisiae*). Toxin je zcela inaktivován působením teploty 50 °C po dobu 15 minut [179].

V kvasince *Wingea robertsiae* (synonymum *Debaryomyces robertsiae*; CBS 6693) byly objeveny 2 cytoplazmaticky lokalizované plazmidy (pWR1A a pWR1B) o velikostech 8137 bp a cca 14,6 kbp. Tyto plazmidy jsou rezistentní k exonukleáze  $\lambda$ , naopak jsou citlivé k exonukleáze III. Jde tedy pravděpodobně o dsDNA lineární plazmidy s 5' chráněným a 3' nechráněným koncem. Plazmidy jsou odléčitelné UV zářením [30, 180]. Plazmid pWR1A se vyznačuje vysokým obsahem A+T bází (72 %), velmi kompaktním genomem (otevřené čtecí rámce zabírají 93 % z kódující sekvence plazmidu) a invertovanými repeticemi na koncích plazmidu (233 bp). Plazmid pWR1A obsahuje 5 otevřených čtecích rámců, z nichž 2 (ORF2 a ORF4) vykazují sekvenční podobnost (43 %, resp. 34 %) s ORF2-pGKL2 (prekurzorový protein  $\alpha$  a  $\beta$  podjednotek zymocinu). Nicméně pouze u proteinu, který je kódován ORF2-pWR1A, se vyskytuje typický chitin vazebný motiv a chitinázová doména rodiny 18, umožňující vazbu zymocinu (u *K. lactis*) na chitin v buněčné stěně cílové buňky. Oproti plazmidu pGKL1 se v plazmidu pWR1A nevyskytuje žádný otevřený čtecí rámec s podobností k DNA polymeráze ani s podobností ke  $\gamma$ -podjednotce toxinu [90].

Plazmidy kvasinky *W. robertsiae* jsou spojeny s *killer* fenotypem. *Killer* toxin je možné izolovat pomocí chitin afinitní chromatografie a detekovat ho pomocí specifické protilátky proti  $\alpha$ -podjednotce zymocinu *K. lactis* [180]. Receptorem tohoto toxinu na membráně citlivé buňky je pravděpodobně chitin, mutace v hlavní chitináze *S. cerevisiae* (*CHS3*) vede k rezistenci původně citlivé buňky. V ORF2 se vyskytuje hydrofobní oblast, o které se předpokládá (u zymocinu *K. lactis*), že napomáhá ke vstupu  $\gamma$ -podjednotky toxinu do buňky. Účinek toxinu není závislý na *elongátoru* RNA polymerázy II. Citlivé buňky jsou zastavovány toxinem během S-fáze růstu; v průběhu působení toxinu se fosforyluje proteinkináza Rad53 [90], která je kontrolním bodem zajišťujícím zastavení buněčného cyklu na přechodu G<sub>1</sub>/S, během S nebo na přechodu G<sub>2</sub>/M fáze [170-172]. Velikost toxinu je zhruba 110 kDa [90]. Toxin je zcela inaktivován působením teploty 65 °C po dobu 10 minut [180].

V kvasince *Saccharomycopsis crataegensis* (NRRL Y-5902) byly nalezeny 3 lineární plazmidy (pScrl-1, pScrl-2, pScrl-3) o velikostech cca 13,7 kbp; 7 kbp a 5,8 kbp. V kmenech NRRL Y-5903 a NRRL Y-5904 byly nalezeny 2 plazmidy o velikostech cca 14 kbp a 7 kbp vykazující vysoký stupeň podobnosti s plazmidy pScrl-1 a pScrl-2. V obou případech se jedná pravděpodobně o cytoplazmatické, dsDNA lineární plazmidy s 5' chráněným koncem. Tyto plazmidy nejsou spojeny s *killer* fenotypem [181, 182].

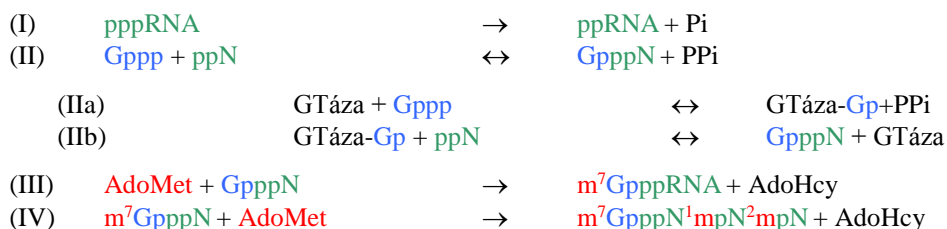
## 2. SYNTÉZA ČEPIČKY NA 5' KONCI mRNA

Naprostá většina eukaryotických a virových mRNA má na svém 5' konci specifickou strukturu, metylovaný guanozin spojený s prvním nukleotidem nově syntetizované pre-mRNA neobvyklou 5'-5' trifosfátovou vazbou. Tato struktura se nazývá N<sup>7</sup>-metylguanozinová (m<sup>7</sup>GpppN) čepička (*cap*) [183]. Brzy po jejím objevení se ukázalo, že jde o důležitou strukturu hrající roli v ochraně mRNA před degradací, v exportu mRNA z jádra, v iniciaci translace a v sestřihu pre-mRNA. Čepička je přidána na 5' konec řetězce pre-mRNA krátce po inicializaci transkripce, kdy vznikající transkript dosahuje délky zhruba 25-30 nukleotidů [184, 185], odstraněna je až v okamžiku, kdy je mRNA určena k degradaci.

### 2.1. Jak získat čepičku legálně

Mechanismus syntézy N<sup>7</sup>-metylguanozinové čepičky byl poprvé popsán u reovirů, u nichž dochází pomocí tří nezávislých enzymatických reakcí ke vzniku čepičky na 5' konci pre-mRNA [183, 186]. Obdobný mechanismus (nazvaný mechanismus typu 1) syntézy čepičky byl následně popsán i u viru vakcinie, u CPV (*Cytoplasmic Polyhedrosis Virus*) [187, 188] a později i u většiny eukaryotických a virových mRNA. V současné době je tento typ syntézy čepičky přijímán jako obecný. Mimo něj byl popsán i mechanismus syntézy čepičky typu 2, vyskytující se u nesegmentovaných „-RNA“ virů [189].

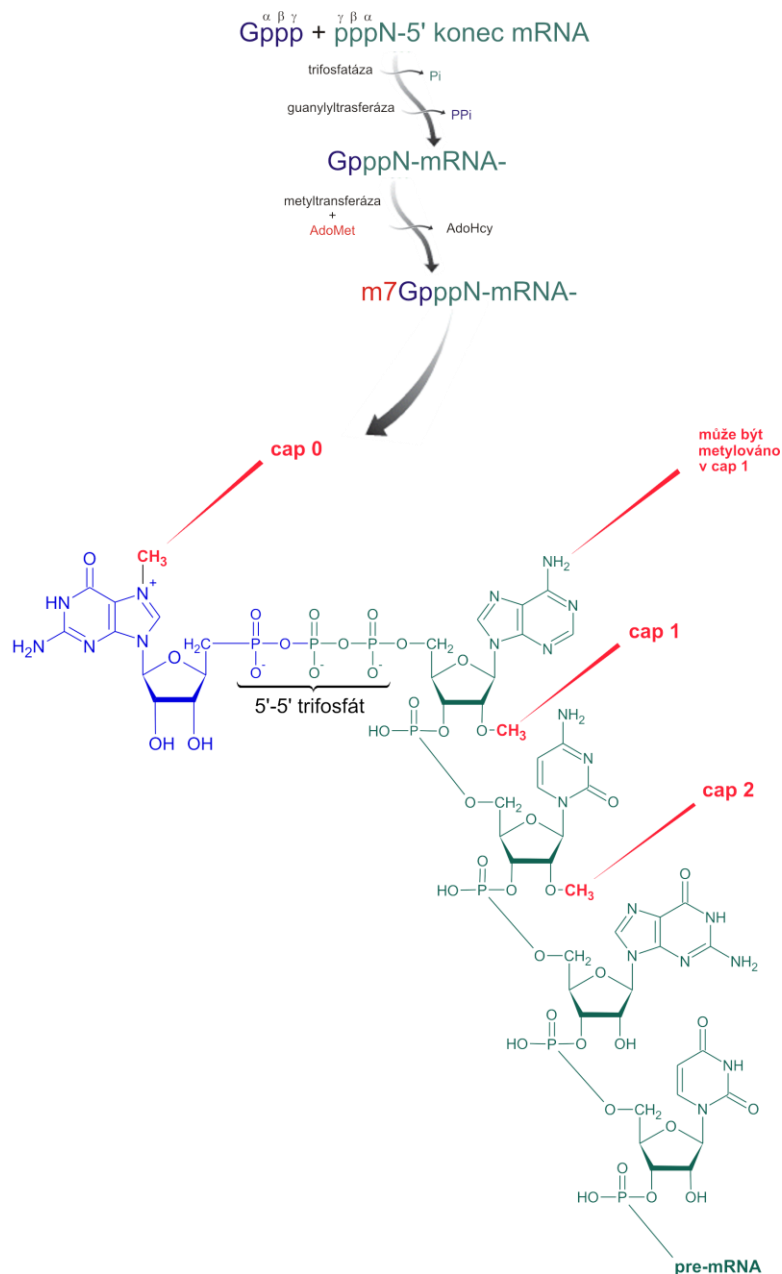
Syntéza čepičky typu 1 probíhá ve třech krocích. Nejprve je ze vznikajícího transkriptu trifosforylovaná RNA (pppRNA) odštěpen koncový 5'-γ-fosfát enzymem RNA-trifosfatáza (RTáza) za vzniku difosforylovaného konce pre-mRNA (reakce I), který je následně upraven přidáním GMP vzniklým po hydrolýze GTP enzymem mRNA-guanylyltransferáza (GTáza) (reakce II). V průběhu druhého kroku GTáza hydrolyzuje GTP na GMP, které se následně váže kovalentní vazbou na ε-amino skupinu lysinu v sekvenci



KxDG za vzniku dočasného komplexu GMP-GTáza (reakce IIa). Poté následuje přenos GMP na difosforylovaný konec mRNA za vzniku struktury GpppN (reakce IIb) [190, 191], která je metylována na pozici N<sup>7</sup>-guanozinu enzymem RNA-guanin-N<sup>7</sup>-metyltransferáza (MTáza) (reakce III). Tento typ čepičky se nazývá *cap 0*. Následně může docházet k metylaci prvních

dvou nukleotidů vznikajícího mRNA řetězce (reakce IV) pomocí enzymu 2'-O-ribózometyltransferáza za vzniku *cap 1*, resp. *cap 2* struktur (viz obrázek 3). Zatímco metylace na koncovém guanozinu a na prvním nukleotidu nově vznikající pre-mRNA probíhají v jádře, přidání metylu na druhý nukleotid pre-mRNA je realizováno v cytoplazmě. Tomu odpovídá i to, že 2'-O-metyltransferáza metylující jak purinové, tak pyrimidinové nukleotidy na první pozici v řetězci vznikající pre-mRNA (*Cap 1* metyltransferáza) je lokalizována v jádře, zatímco *Cap 2* metyltransferáza, metylující 2'-O ribózu druhého nukleotidu, je lokalizována v cytoplazmatické frakci lyzátů připravených z HeLa buněk [192].

OBRÁZEK 3 – Schéma vzniku čepičky na 5' konci mRNA. Pi – fosfát; PPI – pyrofosfát; AdoMet – S-adenozyl-L-methionin; AdoHcy – S-adenozyl-L-homocystein; *cap 0*, *1*, *2* – různé stupně metylace čepičky (viz text); N – libovolný nukleotid



Způsob regulace této metylace zatím není zcela jasný [193]. U nižších eukaryot (u kvasinek a hub) a virů se vyskytuje převážně *cap 0*, vyšší eukaryota většinou mají na 5' konci mRNA více metylových zbytků (viz obrázek 3) [183, 189, 194, 195].

U trypanozom se vyskytuje tzv. *cap 4*, hypermetylovaná forma čepičky na 5' konci mRNA. Tato čepička je syntetizovaná výhradně na SL RNA (*Spliced Leader*). SL RNA je syntetizována RNA polymerázou II a následně je procesem zvaným *trans-splicing* přenesena na 5' konec všech pre-mRNA vznikajících z polycistronních transkriptů trypanozom [196, 197]. Čepička typu 4 se skládá z klasické čepičky (*cap 0*) a následných 2'-*O*-metylovaných prvních čtyř (AACU) ribonukleotidů. Navíc na první adenin a čtvrtý uracil je přidáno ještě po jednom metylovém zbytku za vzniku  $m^7Gpppm_3^{6,6,2'}Apm^2'Apm^2'Cpm_2^{3,2'}U$  struktury [198].

U viru vezikulární stomatitidy (VSV; *Vesicular Stomatitis Virus*, *Rhabdoviridae*) byl popsán typ 2 syntézy čepičky na 5' konci mRNA [189]. Předpokládá se, že tento typ syntézy čepičky se uplatňuje u většiny nesegmentovaných „-RNA“ virů (mimo VSV např. u viru vztekliny (*Rhabdoviridae*), viru spalniček (*Paramyxoviridae*), případně u viru ebola (*Filoviridae*)) [199]. Syntéza čepičky typu 2 probíhá v několika krocích a je katalyzována komplexem proteinů P a L kódovaných genomem viru vezikulární stomatitidy. Protein L obsahuje všechny aktivity nezbytné k syntéze čepičky (RNA-GDP polyribonukleotidyl-transferázová aktivita, guanozin-5'-trifosfatázová aktivita a metyl-transferázová aktivita) [200-202] a katalyzuje všechny níže uvedené kroky syntézy N<sup>7</sup>-methylguanozinové čepičky. U viru VSV začínají všechny mRNA 5' konsensus sekvencí AACAGNNN [203, 204]. Na tuto strukturu je následně připojena čepička, která je poté metylována. Na rozdíl od syntézy čepičky typu 1 jsou na vznikajícím transkriptu pre-mRNA nejprve odštěpeny 2 (γ a β) 5' fosfáty za vzniku monofosforylovaného konce pre-mRNA. Předpokládá se, že se při syntéze čepičky tohoto typu neváže na *capping* enzym (tedy protein L) GDP vzniklé po hydrolýze GTP pomocí proteinu L (reakce I), ale spíše se na protein L váže kovalentní vazbou monofosforylovaná 5' koncová (pApApCpApGNNN) struktura



vznikající pre-mRNA (reakce II). Monofosforylovaný konec pre-mRNA je následně upraven přidáním GDP vzniklým po hydrolýze GTP (reakce III) [202]. Poté dochází k metylaci na N<sup>7</sup>-guanozinu (reakce IV) a na 2'-*O*-adenozinu za vzniku konečné dimetylované struktury (reakce

V) [205]. Čepička je přidána na 5' konec řetězce pre-mRNA pravděpodobně kotranskripčně [202].

Malé jaderné a jadéřkové RNA (snRNA; *Small Nuclear* RNA, resp. snoRNA; *Small Nucleolar* RNA) mají na svém 5' konci trimetylované struktury  $m^{2,2,7}GpppN$  (TMG; *Trimethylguanosine cap*) a metyl-pppN (Mppp čepička) [195, 206]. Za syntézu trimetylovaných U1-U5 snRNA je zodpovědná většinou RNA polymeráza II. Při syntéze U1 snRNA je na primární transkript přidána N<sup>7</sup>-metylgunosinová čepička podle klasického schématu (typ 1), k přidání metylu na první nukleotid snRNA ( $m^7GpppA^m pN$ ) dochází v jádře [207]. Následně je U1 snRNA transportována do cytoplazmy, kde jsou přidány zbývající metylové skupiny za vzniku  $m^{2,2,7}GpppA^m pN$  struktury [208, 209]. Poté se U1 snRNA vrací zpět do jádra jako ribonukleoprotein (společně s Sm proteiny) [210-212], kde se účastní sestřihu pre-mRNA [213, 214]. Obdobný mechanismus vzniku trimetylovaných snRNA existuje pravděpodobně i u U2, U4 a U5 snRNA [209]. Naproti tomu úprava 5' konce U3 snRNA u drápatky vodní (*Xenopus laevis*) probíhá v jádře, kde dochází jak k přidání čepičky, tak k trimetylaci [215]. U kvasinek dochází k hypermetylaci pravděpodobně také v jádře, čemuž napovídá i objev v jadérku lokalizované metyltransferázy nezbytné k hypermetylaci sn/snoRNA [216]. Zajímavou výjimku v syntéze U2-U4 snRNA vykazují trypanozomy; jejich snRNA jsou pravděpodobně syntetizovány RNA polymerázou III [217], přesto obsahují na 5' konci trimetylovanou čepičku [218]. Ostatní transkripty trypanozom syntetizované RNA polymerázou III (např. tRNA, 5S RNA, 7SL RNA) čepičku nemají [219].

Čepička typu Mppp se vyskytuje u savců (U6, 7SK, B2) a rostlinných (U3) snRNA [195, 220, 221], které jsou pravděpodobně syntetizovány RNA polymerázou III. Syntéza čepičky tohoto typu se odehrává pravděpodobně posttranskripčně a je značně odlišná od klasického schématu. Při syntéze čepičky U6 snRNA je na koncový 5'- $\gamma$ -fosfát přímo připojena metylová skupina [222]. K této metylaci je nezbytná přítomnost vlásenky na 5' konci RNA, která je pravděpodobně rozeznávána pomocí zatím neidentifikované jaderné sekvenčně specifické metyltransferázy [223]. Při zkrácení nebo při úplné delecii vlásenky dochází u kvasinek k syntéze TMG čepičky na 5' konci U6 snRNA [224].

## 2.2. Jak získat čepičku nelegálně

U některých virů, které nekódují vlastní *capping* enzymy, se vyvinuly mechanismy umožňující získat čepičku z hostitelských mRNA. U segmentovaných „-RNA“ virů je popsán tzv. *cap-snatching* (uchvácení čepičky) mechanismus. Nejpodrobněji je tento mechanismus prostudován u viru chřipky (*Orthomyxoviridae*). Virem chřipky kódovaná RNA polymeráza,

sestavající se ze tří podjednotek (PB1, PB2, PA), není sama schopna připojit čepičku na 5' konce svých mRNA. Je ovšem schopna několika kroky odštěpit čepičku z hostitelských mRNA přepsaných hostitelskou RNA polymerázou II a takto vzniklý fragment využít jako primer pro syntézu vlastních mRNA [225]. V případě chřipky dochází nejprve k navázání podjednotky PB1 virové RNA polymerázy na vlásenky nacházející se na 5' a 3' konci virové RNA (vRNA). To vede k cirkularizaci vRNA a také k následné změně konformace RNA polymerázy [226], na jejíž podjednotku PB2 je poté navázána hostitelská mRNA. Endonukleázová aktivita PB2 podjednotky odštěpí fragment o délce 9-17 nukleotidů obsahující hostitelskou čepičku na 5' konci [227-229], který je použit jako primer k transkripci virových mRNA. Čepička hostitelských mRNA se pravděpodobně váže na PB2 podjednotku virové RNA polymerázy mezi dvě aromatické aminokyseliny [230]. Vlastní odštěpení požadovaného úseku obsahujícího čepičku je realizováno podjednotkami PB1 a PA virové polymerázy [231, 232]. Přesný mechanismus štěpení není zcela jasný; bylo však prokázáno, že pouze fragmenty obsahující na svém 3' konci dvojici nukleotidů CA jsou použity jako primery pro transkripci virové RNA. Je možné, že poslední báze odštěpeného fragmentu (adenozin) vytvoří nukleotidový pár s posledním nukleotidem na 3' konci vRNA [233], což umožňuje zahájení transkripce. Stejně tak není zcela jasné, jakým způsobem se virová RNA polymeráza dostane přímo k hostitelským mRNA, které čepičku na svém 5' konci obsahují. Nedávné výsledky ukazují možnou interakci virové RNA polymerázy s C-koncovou doménou RNA polymerázy II hostitelského organismu v době syntézy čepičky na 5' konci hostitelských mRNA [234]. Obdobný systém získávání čepičky se předpokládá i u *Thogoto* viru (*Orthomyxoviridae*) s tím rozdílem, že jako primer pro syntézu virové mRNA je použita podstatně kratší struktura m<sup>7</sup>GpppAm odštěpená z hostitelské mRNA [235-237].

*Cap-snatching* mechanismus pravděpodobně využívají i viry z čeledi *Bunyaviridae* [238-252] a *Tenuiviridae* [253-256]. U těchto čeledí bylo zjištěno, že se na jejich 5' konci vyskytuje 10-20 nukleotidová sekvence nevykazující homologii s virovou RNA. U *Dugbe* viru (*Bunyaviridae*) se délka odštěpené sekvence pohybuje v rozmezí 5-16 nukleotidů [257]. Zástupci čeledi *Arenaviridae*, kteří také využívají *cap-snatching* mechanismus, odštěpují sekvence kratší (1-4 nukleotidy) [258, 259]. Pro mnoho z výše uvedených virů byla popsána preference endonukleázového štěpení, obdobně jako u viru chřipky, specificky za určitým nukleotidem. Je možné, že pro syntézu virové mRNA je třeba, aby primer vykazoval homologii minimálně k poslednímu nukleotidu na 3' konci vRNA [245]. U rostlinných virů bylo také prokázáno, že fragment mRNA obsahující čepičku může být získán nejenom z hostitelských mRNA, ale při koinfekci s jiným virem i z virových mRNA opatřených



čepičkou, jak tomu bylo u viru bronzovitosti rajčete (TSW; *Tomato Spotted Wilt virus*, *Bunyviridae*) [244] a MSt viru (*Maize Stripe virus*, *Tenuiviridae*) [254].

### 2.3. Past na čepičku

U cytoplazmatického dsRNA L-A viru (*Totiviridae*) kvasinky *S. cerevisiae* byl popsán neobvyklý mechanismus odštěpování čepičky z hostitelských mRNA [260]. L-A virus je dlouhý cca 4,6 kbp a kóduje pouze 2 proteiny, hlavní kapsidový protein (Gag) a RNA polymerázu (Pol), která je ovšem translatována jako Gag-Pol fúzní protein díky -1 posunu čtecí fáze [261]. Virová RNA je syntetizována Gag-Pol proteinem ve virových částicích a nemá pravděpodobně čepičku na 5' konci ani poly(A) sekvenci na 3' konci [262]. Po syntéze je mRNA uvolněna do cytozolu hostitelské buňky. Jelikož mRNA L-A viru nemá ani čepičku ani poly(A) konec, měla by být ideálním cílem exonukleáz [263, 264], v případě kvasinek hlavně exonukleázy Xrn1 [265]. Nicméně L-A virus chrání své mRNA před degradací zajímavým způsobem; Gag protein je schopen odštěpovat čepičky z hostitelských mRNA [260], čímž pravděpodobně zcela zasytí Xrn1 exonukleázu [266]. Proces odštěpení čepičky není příliš jasný, hypotéza odštěpování čepičky je založena na dvou krystalografických studiích a částečných mutačních analýzách [267, 268]. Čepička přítomná na hostitelské mRNA je pravděpodobně stabilizována v prohlubni Gag proteinu. Dno této prohlubně je tvořeno smyčkou I (aminokyseliny 144-163) obsahující esenciální aminokyselinu His<sup>154</sup>, stěny prohlubně jsou tvořeny smyčkami II-IV. Stabilizace čepičky je pravděpodobně zajištěna vložením metylované čepičky mezi dvě aromatické aminokyseliny (Tyr<sup>150</sup> a Tyr<sup>538</sup>), obdobně jak tomu je u eIF4E proteinu (viz níže). Na stabilizaci hostitelské mRNA se podílejí také aminokyseliny Arg<sup>568, 570</sup> a Lys<sup>536</sup>, které elektrostatickými interakcemi s fosfátovými vazbami udržují molekulu mRNA ve správné pozici. Následkem těchto interakcí je pravděpodobně  $\alpha$ -fosfát trifosfátového řetězce umístěn v blízkosti imidazolového kruhu His<sup>154</sup>; předpokládá se, že na odštěpení čepičky (ve formě m<sup>7</sup>GMP) se podílí mimo His<sup>154</sup> také Tyr<sup>452</sup>. Odštěpený m<sup>7</sup>GMP se váže fosfoimidazolovou vazbou mezi  $\alpha$ -fosfátem pocházejícím z čepičky a dusíkem v His<sup>154</sup> imidazolovém kruhu [269]. Mutace His<sup>154</sup> vede k zrušení schopnosti Gag proteinu vázat čepičku, její rozeznání však touto mutací ovlivněno není [269].

### 2.4. Funkce čepičky

O biologické funkci čepičky se debatuje od jejího objevení. V současné době se zdá, že navzdory různým metylačním schémátům je důležitá zejména přítomnost N<sup>7</sup>-metylu na

koncovém guanozinu a dvě pyrofosfátové vazby spojující m<sup>7</sup>G s prvním nukleotidem mRNA. Hlavní funkce čepičky lze rozdělit na:

#### A. OCHRANA PRE-mRNA A mRNA PŘED 5' EXONUKLEÁZOVÝM ŠTĚPENÍM

Záhy po popsání čepičky bylo prokázáno, že mRNA bez metylované čepičky na pozici N<sup>7</sup>-guanozinu, případně bez čepičky vůbec, jsou velmi náchylné k exonukleázové degradaci [270-272]. Později bylo zjištěno, že mRNA je degradována buď 5'→3' nebo 3'→5' exonukleázovým mechanismem; v obou případech je degradace iniciována zkrácením poly(A) sekvence na 3' konci mRNA na méně než 10 nukleotidů [273-275]. V průběhu degradace ve směru 5'→3' je po částečné deadenylaci odstraněna čepička pomocí tzv. *decapping* enzymů [276]. U kvasinek byl popsán proteinový komplex Dcp1-Dcp2 zodpovědný za odstranění čepičky z 5' konce mRNA [270]. Výkonná podjednotka tohoto komplexu, protein Dcp2, katalyzuje odštěpení m<sup>7</sup>GDP z 5' konce mRNA za vzniku monofosforylované RNA (pRNA) [277-280]. Dcp2 protein není funkční v případě, že mRNA obsahující čepičku je kratší než 25 nt [277], pokud nedojde ke zkrácení poly(A) sekvence či pokud mRNA nejsou opatřeny čepičkou. K odstranění čepičky pomocí komplexu Dcp1-Dcp2 proteinů dochází pravděpodobně v tzv. P tělískách [281, 282]. Obdobné proteiny (Dcp1a a Dcp1b) katalyzující pravděpodobně shodnou reakci byly objeveny i u savců [283, 284] či u *Caenorhabditis elegans* [285]. Po odštěpení čepičky z konce mRNA dochází k rychlé degradaci mRNA ve směru 5'→3' pomocí 5' exonukleáz [263, 264].

Degradace ve směru 3'→5' probíhá v exozómech a je také iniciována deadenylací. Poté dochází u kvasinek k degradaci mRNA ve směru 3'→5' a následně k částečné hydrolyze čepičky na 5' konci mRNA pomocí enzymu DcpS. Výsledkem této reakce je vznik m<sup>7</sup>GMP a difosforylovaného mRNA oligonukleotidu [286, 287]. Protein DcpS je také schopen, minimálně u savců a kvasinek, dále hydrolyzovat m<sup>7</sup>GDP vzniklé při odstranění čepičky pomocí Dcp1-Dcp2 komplexu na finální produkt m<sup>7</sup>GMP [288].

Je nutné si uvědomit, že se čepička v cytoplasmě vyskytuje s navázaným eIF4E proteinem (viz níže). Odstranění čepičky z 5' konce mRNA je tedy možné pouze tehdy, pokud dochází k určité kompetici mezi Dcp1/2 a eIF4E proteiny, jak bylo potvrzeno *in vitro* [289, 290] a *in vivo* [290, 291].

#### B. ROLE V SESTRÍHU A V TRANSPORTU mRNA

Bylo prokázáno, že přítomnost čepičky na 5' konci mRNA zvyšuje účinnost a přesnost sestřihu pre-mRNA jak v lyzátech ze savčích buněk [292, 293], tak přímo v oocytech drápatky vodní (*Xenopus laevis*) [294]. Čepička na 5' konci mRNA interaguje se složkami

sestřihového komplexu (*spliceosom*), které se účastní sestřihové reakce na 5' rozhraní mezi prvním exonem a prvním intronem [295]. Tato interakce je zprostředkována pomocí jaderného na čepičku se vážícího komplexu (CBC, *Cap Binding Complex*) skládajícího se ze dvou vysoce konzervovaných proteinů CBP20 a CBP80 (*Cap Binding Protein*) [296]. Čepička se váže mezi 2 tryptofanové zbytky na proteinu CBP20 (obdobně jako u eIF4E, viz níže). Tato vazba probíhá pouze v přítomnosti CBP80 [296, 297]. Při sestřihu intronu, lokalizovaného nejbližší k 5' konci pre-mRNA, se metylovaná čepička specificky váže na CBC. CBC s navázanou čepičkou poté interaguje s U1 snRNP (*Small Nuclear Ribonucleoprotein*), což umožní spojení sestřihového místa na pre-mRNA s U1 snRNP a následné interakce mezi složkami sestřihového komplexu (U1, U2, U4/6, U5 snRNA a mnoho dalších faktorů) a 5' sestřihovým místem pomocí CBC [298]. U kvasinek se zdá, že čepička na 5' konci pre-mRNA sice zvyšuje účinnost sestřihu intronu lokalizovaného nejbližší k 5' konci pre-mRNA, nicméně není pro něj nezbytně nutná [299].

Role čepičky v exportu mRNA z jádra do cytoplazmy není zatím příliš jasná. Přítomnost čepičky není nutná k exportu mRNA z jádra do cytoplazmy [300], nicméně přítomnost CBC navázaného na čepičku má na tento export stimulační efekt [301-303]. Disrupční analýzy CBP v kvasinkových kmenech neměly velký vliv na export mRNA z jádra [304], stejně tak jako mikroinjekce protilátek proti CBP20 do oocytů drápatky nijak neovlivnila export mRNA z jádra. Protilátky proti CBP20 proteinu naopak kompletně zablokovaly export U1 snRNA z jádra do cytoplazmy. Je tedy pravděpodobné, že zatímco export mRNA z jádra do cytoplazmy není přímo závislý na přítomnosti čepičky, pro export U1 snRNA je nutná přítomnost CBP20/80 komplexu [305-308].

CBC má také stimulační vliv na formování 3' konce mRNA. Jeho přítomnost stimuluje první krok polyadenylace, endonukleázové štěpení mezi polyadenylačním signálem AAUAAA a následnou G/U bohatou oblastí [302, 309, 310].

CBC zůstává navázaný na čepičku i v průběhu transportu z jádra do cytoplazmy, ve které se pravděpodobně účastní jakéhosi prvního kola translace mRNA, než je nahrazen eIF4E iniciačním faktorem [311, 312]. S tím může souviset i zjištění, že na CBC se v jádře váže protein eIF4G, o kterém se předpokládá, že zůstává na mRNA navázaný i v průběhu transportu do cytoplazmy [313].

### C. *ROLE V INICIACI TRANSLACE*

Základním limitujícím krokem při syntéze proteinů je vazba 40S podjednotky ribozómu na mRNA [314]. V tomto procesu hraje velmi významnou roli čepička na 5' konci mRNA díky vazbě na cytoplazmatický proteinový komplex eIF4F [315]. Tento komplex se skládá z

několika iniciačních faktorů (eIF4A, eIF4E a eIF4G) [316]. Čepička se váže na eukaryotický iniciační faktor 4E (eIF4E; 25 kDa), který sám o sobě hraje důležitou úlohu v post-transkripční kontrole genové exprese, ve vývojových procesech a v řadě lidských onemocnění (viz přehledové články [317-323]). eIF4E specificky rozeznává čepičku na 5' konci mRNA a současně i další komponenty komplexu eIF4F [322]. Zde se budu věnovat pouze vazbě čepičky na eIF4E, ostatní informace týkající se tohoto iniciačního faktoru jsou k dohledání v uvedených přehledových člancích.

Přesný mechanismus a konformace vazby čepičky na eIF4E byl vyřešen pomocí několika krystalografických studií [324-329]. Vazebné místo pro čepičku je na proteinu eIF4E lokalizováno v dutině jinak sférického proteinu. Na okrajích této dutiny jsou 2 evolučně konzervované tryptofanové zbytky (Trp<sup>56</sup> a Trp<sup>102</sup> u savců, Trp<sup>58</sup> a Trp<sup>104</sup> u kvasinek), kterými je pomocí  $\pi$ - $\pi$  kooperativních interakcí mezi m<sup>7</sup>G a indolovými kruhy tryptofanů čepička stabilizována. Stabilita této interakce výrazně vzrůstá (zhruba o 4 až 5 řádů), pokud je na guanozinu přítomna metylová skupina [324]. Tato stabilizace v přítomnosti metylové skupiny má velký biologický význam, jelikož hladina GTP v buňce (zhruba milimolární v logaritmicky rostoucí kultuře [330]) je ve srovnání s hladinou mRNA či eIF4E zhruba o 3 až 4 řády vyšší [331]. Efektivní vazba nemetylovaného GTP by tedy vedla k jeho kompetici s vazbou metylované čepičky na 5' konci mRNA o vazebné místo na eIF4E proteinu. Stabilita komplexu čepička-eIF4E je ještě zvýšena díky van der Waalsovým a vodíkovým interakcím mezi aminokyselinami vytvářejícími vazebnou dutinu eIF4E proteinu a třemi fosfátovými skupinami a ribózovým kruhem tvořícím čepičku na 5' konci mRNA. Tyto interakce se podílejí na stabilitě komplexu zhruba z poloviny, druhou polovinu obstarává výše zmíněná interakce mezi indolovými kruhy dvou tryptofanů a koncového guanozinu [324]. Vazba komplexu eIF4E-čepička je dále stabilizována vazbou proteinu eIF4G na protein eIF4E [332, 333]. Interakce mezi eIF4G a mRNA nebyly zaznamenány, ale nelze je vyloučit [317].

Z výše uvedeného vyplývá, že všechny mRNA obsahující čepičku na 5' konci mRNA se váží na eIF4E se stejnou afinitou. Pokud by ovšem docházelo k interakci dalších aminokyselin proteinu eIF4E s nukleotidy v mRNA transkriptu, mohlo by to znamenat zvýšení stability komplexu mRNA-eIF4E, a tím i možné ovlivnění účinnosti translace primárním transkriptem [317]. Při testování této možnosti pomocí nukleární magnetické rezonance a krystalografických analýz komplexu eIF4E s m<sup>7</sup>GpppA analogem čepičky byly prokázány interakce mezi C-koncovou částí eIF4E a adenzinem [329, 334, 335]. Při použití dalších analogů čepičky bylo zjištěno, že jejich afinita k eIF4E proteinu vzrůstá v řadě m<sup>7</sup>GpppC < m<sup>7</sup>GpppA < m<sup>7</sup>GpppG [324]. Studie s lidským eIF4E prokázaly, že několik

prvních nukleotidů mRNA s ním může být v kontaktu a že různé složení 5' konce mRNA může ovlivňovat afinitu mRNA k eIF4E až čtyřnásobně [336, 337]. Nicméně pomocí nukleární magnetické rezonance tyto kontakty nebyly potvrzeny, jedná se pravděpodobně o interakce velmi slabé [334]. Po navázání čepičky na eIF4E dochází k malým konformačním změnám tohoto proteinu; flexibilita smyček, tvořících okraje dutiny pro vazbu čepičky, se snižuje a pravděpodobně dochází k malým změnám v sekundární struktuře eIF4E proteinu [329, 332, 338]. Tyto konformační změny mohou znamenat, že proteiny interagující s eIF4E proteinem jsou pravděpodobně schopny rozeznávat mezi eIF4E s navázanou a bez navázané čepičky [317]. Toto bylo prokázáno v případě vazby malých translačních inhibitorů (4E-BP; eIF4E *Binding Proteins*) na eIF4E protein. Afinita 4E-BP proteinů vůči eIF4E výrazně vzrůstá u proteinu s navázanou čepičkou [339, 340]. Předpokládá se, že malé 4E vazebné proteiny kompetují s proteinem eIF4G o navázání na komplex eIF4E-mRNA, čímž zabraňují předčasnému vytváření translačně aktivního komplexu eIF4E-eIF4G-mRNA [317].

Na závěr této kapitoly je třeba zdůraznit, že přítomnost čepičky na 5' konci mRNA není pro iniciaci translace stoprocentním požadavkem. Existuje skupina buněčných a virových RNA nesoucích na svém 5' konci tzv. IRES (*Internal Ribosome Entry Site*) strukturu, která umožňuje přímé nasednutí ribozómu v blízkosti AUG iniciačního kodonu a následné zahájení translace bez vazby čepičky na eIF4E protein [341, 342].

## 2.5. Jak být ve správný čas na správném místě

Již dříve bylo uvedeno, že přidání čepičky na 5' konec pre-mRNA je kotranskripční. Dochází k němu v době, kdy je vznikající transkript dlouhý cca 25-30 nukleotidů. Hlavní roli v koordinaci kotranskripční syntézy čepičky hraje C-koncová doména (CTD; *Carboxy Terminal Domain*) největší podjednotky RNA polymerázy II [343]. Tato doména, skládající se z několika opakování heptapeptidu Tyr-Ser-Pro-Thr-Ser-Pro-Ser ( $Y^1S^2P^3T^4S^5P^6S^7$ ), je vysoce konzervována mezi eukaryoty; u jednotlivých organismů se liší pouze počtem opakování tohoto heptapeptidu. U savců se tato sekvence opakuje 52x, u *Schizosaccharomyces pombe* 29x a u *S. cerevisiae* a *Candida albicans* 25x až 27x [344]. V motivu  $Y^1S^2P^3T^4S^5P^6S^7$  je pět ze sedmi aminokyselin schopno opakované fosforylace, která je hlavní modifikací CTD domény v průběhu transkripce *in vivo* [345, 346]. Nefosforylovaná forma RNA polymerázy II (RNAP IIA) je fosforylována na Ser<sup>2</sup> a Ser<sup>5</sup> za vzniku aktivní hyperfosforylované formy (RNAP IIO) cyklin dependentními proteinkinázami (např. Kin28, podjednotka transkripčního faktoru TFIIH) [345, 347]. Ser<sup>5</sup> je fosforylován v průběhu iniciace transkripce, zatímco Ser<sup>2</sup> je fosforylován v průběhu elongace a terminace transkripce [348].

RNA polymeráza je schopná zahájit další kolo iniciace transkripce pouze po své defosforylaci, která je zajištěna FCP1 fosfatázou (*TFII-stimulated CTD Phosphatase 1*) [349, 350]. C-koncová doména RNA polymerázy II je zodpovědná za většinu kotranskripčních dějů, jako je sestřih [351], formování 3' konce mRNA [352] a přidání čepičky na 5' konec mRNA [353]. Každý proces je nezávisle řízen jinou částí CTD. Pro syntézu čepičky u savců je dostačující přítomnost prvních patnácti opakování  $Y^1S^2P^3T^4S^5P^6S^7$  sekvence [354].

Pro navázání proteinů, zajišťujících kotranskripční syntézu čepičky u kvasinek, na CTD doménu RNA polymerázy II je důležitá fosforylace serinu na pozici 5 v opakující se sekvenci heptapeptidu [355, 356]. U kvasinky *S. cerevisiae* se GTáza (Ceg1) váže na fosforylovanou CTD doménu. Poté se na Ceg1 váže RTáza (Cet1), která pravděpodobně allostericky aktivuje Ceg1 a tím zvyšuje její afinitu ke GTP, což umožňuje vytvoření přechodného komplexu Ceg1-GMP [357-359]. V savčích buňkách, kde jsou obě výše popsané aktivity (RTáza a GTáza) přítomny na jednom proteinu, se na fosforylovanou C-koncovou doménu RNA polymerázy II váže GTázová doména *capping* enzymu [353, 355]. RTázová doména bifunkčního *capping* enzymu savců je aktivní až po navázání GTázové domény na fosforylovaný Ser<sup>5</sup> [360]. Nakonec se na komplex CTD/GTáza/RTáza savců i kvasinek váže MTáza [361]. Po syntéze čepičky dochází k defosforylaci Ser<sup>5</sup> fosfatázou Fce1, čímž je komplex GTáza-RTáza rychle uvolněn z CTD domény. MTáza je na CTD doméně stabilně navázána (nebo je průběžně uvolňována a navazována v průběhu elongace RNA řetězce) až do terminace transkripce RNA [362, 363]. Předpokládá se, že MTáza je bifunkční enzym, který mimo přidání metylu na čepičku ovlivňuje funkci RNA polymerázy II. Při mutačních analýzách kvasinkové MTázy (Abd1) se prokázalo, že určité mutace v Abd1 mají vliv na nasedání RNA polymerázy II na promotory určitých genů, zatímco jiné mutace v Abd1 u jiných genů ovlivňují pravděpodobně časnou fázi elongace [364]. Bifunkční účinek byl prokázán také pro kvasinkovou RTázu (Cet1). Zjistilo se, že pokud je Cet1 v buňce přítomna a současně je nepřítomna GTáza (Ceg1), má Cet1 inhibiční účinek na funkci RNA polymerázy II [365].

Vše výše uvedené by mohlo vysvětlovat, proč jsou pouze transkripty RNA polymerázy II opatřeny čepičkou [191]. Nevysvětluje to ovšem fakt, že u trypanozom je čepička přidávána i na vybrané transkripty RNA polymerázy III (viz výše). Navíc se ani u RNA polymerázy II trypanozom nevyskytuje klasická CTD doména, která by umožňovala koordinaci kotranskripčních dějů [366]. Přitom i u trypanozom dochází k přidání čepičky kotranskripčně. Předpokládá se, že N<sup>7</sup>-methylguanozinová čepička je na 5' konec SL RNA trypanozom přidána při délce vznikajícího transkriptu cca 30 nukleotidů a že k hypermetylaci

dochází vzápětí. SL RNA je plně metylována při délce vznikajícího transkriptu 112 nukleotidů [367]. Jedním z vysvětlení kotranskripční koordinace syntézy čepičky by mohla být přítomnost opakujících se dvojic serinů v C-koncové doméně největší podjednotky RNA polymerázy II trypanozom [368], které mohou být fosforylovány, a tím plnit obdobou funkci jako fosforylované seriny klasických CTD domén [197].

## 2.6. Organizace aparátu syntetizujícího čepičku

Aparát přidávající čepičku na 5' konec pre-mRNA se liší u různých organismů. U kvasinky *S. cerevisiae* je složen ze třech nezávislých proteinů, z nichž každý katalyzuje jednu enzymatickou reakci. Obdobné uspořádání bylo popsáno i u kvasinek *Schizosaccharomyces pombe*, *Candida albicans*, prvoků *Encephalitozoon cuniculi*, *Giardia lamblia*, *Trypanosoma brucei*, *Plasmodium falciparum* a u *Paramecium bursaria* *Chlorella Virus 1*. Capping enzymy *S. pombe* a *C. albicans* jsou schopny komplementovat mutace v příslušných delečních kmenech *S. cerevisiae*. Lze dokonce nahradit enzymy účastnící se syntézy čepičky u *S. cerevisiae* obdobnými enzymy z kvasinky *C. albicans* [369]. U mnohobuněčných organismů (*Mus musculus*, *Homo sapiens*, *Caenorhabditis elegans*) se vyskytuje dvoukomponentový systém tvořený proteinem kódujícím MTázovou aktivitu a bifunkčním proteinem nesoucím RTázovou (v N-koncové doméně proteinu) i GTázovou aktivitu (v C-koncové doméně proteinu). Bylo zjištěno, že také lidské enzymy účastnící se syntézy čepičky mohou nahradit odpovídající enzymy *S. cerevisiae* [370]. Virové systémy jsou různé, velmi často je GTázová a MTázová aktivita kódována jedním proteinem (*Reoviridae*), případně jsou jedním proteinem kódovány všechny aktivity (RTáza, GTáza, MTáza) (*Poxviridae*, alfaviry).

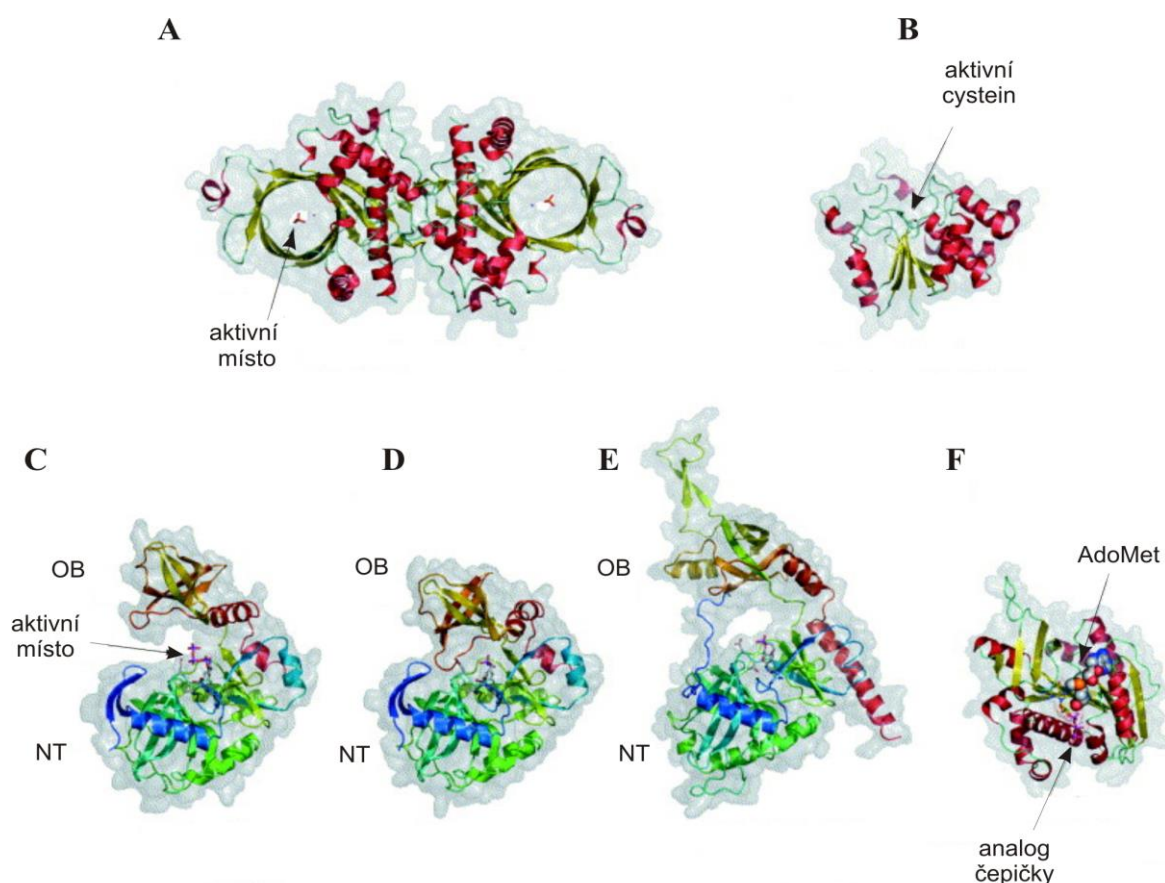
Přidání čepičky na 5' konec mRNA probíhá ve třech krocích. V prvním kroku dochází k odstranění koncového  $\gamma$ -fosfátu ze vznikající pre-mRNA enzymem RNA-trifosfatáza (RTáza). Tento enzym není mezi eukaryoty a viry příliš konzervovaný; je možné definovat dvě funkčně a strukturně odlišné skupiny RTáz [371, 372]:

- RTázy závislé na aktivaci dvojmocnými kationty u prvoků, eukaryotických virů a hub
- RTázy nezávislé na aktivaci dvojmocnými kationty u mnohobuněčných organismů

Skupina RTáz závislých na aktivaci dvojmocnými kationty je definována třemi konzervovanými doménami (A, B, C) obsahujícími kyselá a bazická aminokyseliny nezbytné pro jejich aktivitu. Domény A a C jsou charakteristické výskytem několika glutamových aminokyselin, jejichž mutace se často používají k ověření funkčnosti případných RTáz

závislých na aktivaci dvojmocnými ionty [373, 374]. Modelovým příkladem RTáz tohoto typu je Cet1 protein kvasinky *S. cerevisiae* [375]. Krystalografická analýza odhalila, že Cet1 protein je funkční ve formě dimeru a že obsahuje 2 paralelní tunely, z nichž každý je tvořen osmi antiparalelními  $\beta$ -řetězci. V centru těchto tunelů se nachází několik postranních řetězců hydrofilních aminokyselin, které jsou schopné vázat trifosforylovanou pre-mRNA a manganaté ionty (viz obrázek 4A). Ty se pravděpodobně podílejí na aktivaci  $\gamma$ -fosfátu pro jeho následnou reakci s molekulou vody [371]. V současné době se uvažuje o využití RTáz

OBRÁZEK 4 – Krystalografické struktury *capping* enzymů. **A** - RTáza *S. cerevisiae*; manganatý a sulfátový kationt (sulfátový kationt pravděpodobně obsazuje místo  $\gamma$ -fosfátu trifosforylované pre-mRNA) jsou zobrazeny v aktivním tunelu. **B** – myší RTáza; aktivní cystein v hluboké proláklině je označen šipkou. **C** – GTáza PBCV-1; otevřená konformace s navázanou molekulou GTP. **D** - GTáza PBCV-1; uzavřená konformace s kovalentně navázanou molekulou GMP v aktivním místě. GTáza s GMP jsou v *syn* konformaci. **E** - GTáza *C. albicans*; otevřená konformace s kovalentně navázanou molekulou GMP v aktivním místě. GTáza s GMP jsou v tomto případě v konformaci *anti*. **F** – MTáza *E. cuniculi*; vyznačena jsou vazebná místa pro AdoMet a analog čepičky. OB - oligonukleotid vázící doména, NT - nukleotidyltransferázová doména. Převzato z [376].



totoho typu jako cílů pro zablokování transkripce eukaryotických virů; nedávno bylo prokázáno, že RTáza *Paramecium bursaria Chlorella Virus 1* (PBCV-1) je inhibována dekavanadátem [377].



Modelovým příkladem RTáz nezávislých na aktivaci dvojmocnými kationty je RTázová doména myšího *capping* enzymu (viz obrázek 4B), která vykazuje významnou podobnost s rodinou cysteinových fosfatáz. Tyto RTázy katalyzují přenos fosfátové skupiny z pre-mRNA ve dvou krocích. Nejprve je vytvořen mezi vysoce konzervovaným cysteinem v sekvenci HCxxxxR(S/T) a  $\gamma$ -fosfátem trifosforylované RNA dočasný komplex protein-cysteinyl-S-fosfát za vzniku difosforylované RNA. Vzniklý fosfoprotein je následně hydrolyzován bez přítomnosti dvojmocných kationtů [372].

Ve druhém kroku syntézy čepičky dochází k přenosu GMP na difosforylovaný konec pre-mRNA enzymem mRNA-guanylyltransferáza (GTáza). Tyto enzymy jsou oproti RTázám mezi eukaryoty a viry vcelku konzervované. Skládají se ze dvou domén, N-koncové nukleotidyltransferázové domény (NT doména, *Nucleotidyl Transferase Domain*) a C-koncové oligonukleotid vazebné domény (OB doména, *Oligonucleotide Binding Domain*) [378]. Eukaryotické a virové GTázy jsou v poslední době řazeny, spolu s ATP/NAD<sup>+</sup> dependentními DNA ligázami a s ATP dependentními RNA ligázami, do enzymové rodiny kovalentních mononukleotidyltransferáz. Vyznačují se přítomností šesti konzervovaných motivů charakteristických pro tuto rodinu (motivy **I**, **III**, **IIIa**, **IV**, **V** jsou lokalizované v NT doméně, motiv **VI** je lokalizovaný v OB doméně; viz tabulka 3). V motivu **I** se nalézá vysoce konzervované aktivní místo (KxDG), ve kterém je aminokyselina lysin zodpovědná za vytvoření přechodného komplexu enzym-(lysyl-N-)-GMP. Po vytvoření tohoto komplexu je molekula GMP přenesena z GTázy na difosforylovaný konec pre-mRNA. Obdobným způsobem fungují pravděpodobně i ligázy, kdy lysin v konzervovaném motivu Kx(D/N)G reaguje s ATP či NAD<sup>+</sup> za vzniku přechodného komplexu enzym-(lysyl-N-)-AMP [379].

Krystalografické analýzy virové (PBCV-1) a kvasinkové (*C. albicans*) GTázy [356, 378, 380] ukázaly, že se tyto enzymy vyskytují ve dvou konformacích, otevřené a uzavřené. Na základě krystalografických studií a na základě podobnosti s ostatními mononukleotidyltransferázami byl navržen pravděpodobný mechanismus funkce GTáz [379]. Nejprve dochází k navázání hořčnatého iontu současně s GTP do otevřené formy GTázy. Tato vazba způsobí uzavření struktury a vytvoření vazeb mezi GTP a OB doménou GTázy. Výsledkem je vytvoření přechodného komplexu enzym-(lysyl-N-)-GMP, který následně prochází konformační změnou ze *syn* do *anti* konformace, tak aby bylo možné GMP přenést na difosforylovaný konec pre-mRNA. GTáza musí poté opět přejít do uzavřené a následně ještě jednou do otevřené konformace, aby byla schopna katalyzovat připojení GMP na difosforylovaný konec mRNA a poté vzniklý produkt uvolnit (viz obrázek 4C, D, E) [376].

TABULKA 3 – Srovnání konzervovaných motivů charakteristických pro rodinu mononukleotidyltransferáz. Jsou uvedeny příslušné konzervované motivy (I-VI) a vzdálenosti (v aminokyselinách) mezi nimi. Esenciální lysin v motivu I je vyznačen červeně, ostatní konzervované aminokyseliny jsou označeny modře. Ve spodní části jsou naznačeny kontakty esenciálních aminokyselin s molekulou GTP.

	I	III	IIIa	IV	V	VI
<i>S. cerevisiae</i>	<b>KTDG</b> -53-	TLLDGELV -14-	LMPDCL -70-	DGLIF -15-	LLKWK--PEQENTVD -105-	WEMLRFRDDK
<i>S. pombe</i>	<b>KSDG</b> -50-	TLLDGELV -13-	LVPDCL -71-	DGLIF -14-	LLKWK--PKEMNTID -71-	WRFLRFRDDK
<i>Candida albicans</i>	<b>KTDG</b> -50-	TLLDGELV -13-	VIPDAL -72-	DGLIY -14-	LLKWK--PAEENTVD -84-	WEMLRFRDDK
<i>K. lactis</i>	<b>KTDG</b> -53-	TLLDGELV -14-	LMPDCL -70-	DGLIF -15-	LLKWK--PEVENTVD -105-	WKLRFRRDDK
<i>PBCV-1</i>	<b>KTDG</b> -40-	SIFDGEIC -10-	VLPDAV -63-	DGLII -14-	LFKLLK--PGTHHTID -44-	WKYIQGRSDDK
<i>Xenopus laevis</i>	<b>KADG</b> -42-	TLLDGEMI -12-	LIYDII -72-	DGLIF -13-	ILKWK--PPMLNSVD -55-	WVFMQRVDK
<i>Homo sapiens</i>	<b>KADG</b> -42-	TLLDGEMI -12-	LIYDII -72-	DGLIF -13-	ILKWK--PPSLNSVD -55-	WVFMQRVDK
<i>Mus musculus</i>	<b>KADG</b> -42-	TLLDGEMI -12-	LIYDII -72-	DGLIF -13-	ILKWK--PPSLNSVD -55-	WVFMQRVDK
<i>C. elegans</i>	<b>KADG</b> -39-	TLVDTEVI -16-	LIYDIM -72-	DGLIF -14-	VLKWK--PPSHNSVD -61-	WTFMRERTDK
<i>E. cuniculi</i>	<b>KSDG</b> -37-	VLVDGEVL -9-	AIPDCL -88-	DGLIF -14-	ILKWK--PALSNTID -64-	WKLKIRTDK
<i>Plasmodium falciparum</i>	<b>KTDG</b> -40-	TLLDGELV -18-	LIYDGL -222-	DGIIF -14-	LLKWK--PLMLNTVD -83-	WIAQKIRDDK
<i>Giardia lamblia</i>	<b>KTDG</b> -89-	AMFDGELV -22-	YLPDAL -69-	DGIIF -14-	IQKWK--FLYQNTVD -148-	WVGQKYRLDK
<i>Cyanidioschyzon merolae</i>	<b>KSDG</b> -40-	TLLDGELV -9-	YLAYDV -92-	DGIIF -14-	LLKYK--YPTHTNTVD -65-	WRFLRPRDDK
<i>Trypanosoma brucei</i>	<b>KADG</b> -57-	FLLDTEVV -8-	YIDPFI -59-	DGLIF -13-	LKWK--PVHLCTVD -80-	WTFMRERTDK
<i>Crithidia fasciculata</i>	<b>KVDG</b> -53-	WMLDAELS -12-	HIIDYV -64-	DGLVF -13-	LLKWK--PLSLCTAD -85-	WRLHRLSDDK
<i>Arabidopsis thaliana</i>	<b>KADG</b> -44-	TLLDGELV -14-	LIYDMV -72-	DGLIF -14-	LLKWK--YPEMNSVD -55-	WVSMRVKDDK
<i>Drosophila melanogaster</i>	<b>KADG</b> -42-	TLVDGEMV -12-	LIYDIV -73-	DGLIF -14-	VFKWK--PHELNSVD -57-	WDFMERTDDK
<i>K. lactis</i> pGKL2	<b>KADG</b> -30-	RIFEGELM -5-	LYPDCL -48-	DGYII -8-	VYKSK----FKNTVD -38-	MNLIRERKDK
<i>S. kluyveri</i> pSKL	<b>KADG</b> -35-	YVYEAELM -5-	LYPDCL -46-	DGYII -8-	VYKSK----FINTVD -38-	MNLIKERKDK
<i>P. acaciae</i> pPac1-1	<b>KADG</b> -30-	NVYEGELM -5-	LYDICI -47-	DGFVI -8-	IYKSK----FINTVD -38-	LNLIKERKDK
<i>P. etchellsii</i> pPE1B	<b>KADG</b> -36-	NIFEAEELI -4-	LYYDCL -47-	DGFVI -8-	IYKSK----FINTVD -37-	LNVIKERKDK
<i>A. californica</i> NPV	<b>KLDG</b> -35-	VAFQCEVM -21-	TQYECG -57-	DGYVV -6-	YVKYKWMPTTELEYD -39-	INVLKRRDR
<i>Bombyx mori</i> NPV	<b>KLDG</b> -35-	VAFQCEVM -21-	TQYECG -57-	DGYVV -6-	YVKYKWMPTTELEYD -39-	INVLKRRDR
<i>Helicoverpa armigera</i> NPV	<b>KLDG</b> -35-	VAFQCELL -21-	TQYECG -57-	DGFVV -6-	YVKYKHIKTIEVEYD -40-	LFIMKRRDR
<i>Hyphantria cunea</i> NPV	<b>KLDG</b> -35-	VAFQCEVM -21-	TQYECG -57-	DGYVV -6-	YVKYKWMPTTELEYD -39-	INVLKRRDR
<i>ASFV</i>	<b>KADG</b> -32-	TLLDGEMF -6-	YGFVDI -66-	DGIIL -11-	TFKWK--PTWDNTLD -104-	WEIVKIREDR
<i>Vaccinia virus</i>	<b>KTDG</b> -34-	VVVFGEAV -5-	TVYLIK -58-	DGVIL -10-	DFKIKK----ENTVD -86-	GELIKPRIDK
<i>Molluscum contagiosum virus</i>	<b>KTDG</b> -34-	VALFGEAV -8-	TVYLIK -56-	EGVVL -10-	DLKLR----DNTVD -86-	GRLLRPRIDK
<i>Rabbit fibroma virus</i>	<b>KTDG</b> -34-	VTLYGEAV -6-	QIYLIK -56-	EGVVL -9-	DYKIKL----DNTVD -86-	GELIKPRIDK
<i>Mule deer poxvirus</i>	<b>KTDG</b> -34-	IVLYGEAL -6-	NIPLIK -56-	EGAIL -10-	DYKIKN----DNTVD -86-	GEFIKPRIDK

↓ α fosfát      ↓ O2' nbózy      ↓ guanin      ↓ guanin      ↓ α fosfaty      ↓ β fosfat      ↓ β fosfat  
 O3' nbózy      dvojmocný kationt      γ fosfat

Na vytvoření meziprojektu enzym-GMP se mimo esenciálního lysinu v motivu I podílejí další aminokyseliny. Arginin v motivu I, kyselina glutamová v motivu III a tyrosin v motivu IIIa pravděpodobně vytvářejí vodíkové vazby s ribózovým kruhem molekuly GTP. Dva lysiny v motivu V pravděpodobně interagují s α-fosfátem GTP v uzavřené, respektive otevřené konformaci enzymu. Kyselina asparagová v motivu I a arginin v motivu VI interagují s β-fosfátem. Arginin v motivu III, první lysin v motivu V, lysin a asparagin v motivu IV interagují s γ-fosfátem GTP [356, 378] (viz tabulka 3). Mutace aminokyselin v těchto velmi konzervovaných doménách se často používají k ověření funkčnosti případných *capping* enzymů.

Posledním krokem syntézy čepičky je přenesení metylové skupiny z S-adenozyl-L-methioninu (AdoMet) na koncový guanozin (GpppN) enzymem RNA-guanin-N<sup>7</sup>-metyltransferáza (MTáza) za vzniku m<sup>7</sup>GpppN struktury. MTázy jsou prozatím nejméně prostudované enzymy účastníci se přidání čepičky na 5' konec pre-mRNA. Většina MTáz byla predikována díky přítomnosti motivu (VLDLGGxGxG) zodpovědného za vazbu S-adenozyl-L-methioninu. MTázy jsou obvykle silně inhibovány S-adenozyl-L-homocysteinem (AdoHcy), výsledným produktem po přenesení metylu na 5' koncový guanozin [381]. Krystalografické studie MTázy parazita *E. cuniculi* (Ecm1) s jejími substráty odhalily dvě

nezávislá vazebná místa, jedno pro donor metylové skupiny (AdoMet) a druhé pro akceptor téhož (5' koncový guanozin a trifosforylovaný řetězec pre-mRNA) (viz obrázek 4F) [382, 383].

### 2.6.1. .... u kvasinek

#### *Saccharomyces cerevisiae*

RTáza (Cet1; 459 aminokyselin) je modelem pro RTázy závislé na aktivaci dvojmocnými kationty. Její delece je pro *S. cerevisiae* letální [375]. RTáza je schopná odštěpovat fosfát z trifosforylovaného konce mRNA za aktivace hořčnatými ionty. Fosfát z deoxyribonukleotidů odštěpuje RTáza preferenčně za přítomnosti iontů kobaltu či manganu [373]. Obsahuje 3 domény; N-koncová část (aminokyseliny 1-230) je postradatelná pro funkci RTázy, oblast aminokyselin 230-265 je zodpovědná za tvorbu Cet1 dimerů a za vazbu na GTázu Ceg1 a C-koncová oblast aminokyselin 265-539 je vlastní katalytickou doménou RTázy. Bylo prokázáno, že pro plnou funkčnost RTázy *in vivo* a *in vitro* je dostačující fragment Cet1(241-539) [357, 384], kterého se týkají následující zjištění. Krystalografická studie prokázala, že tento protein je biologicky aktivní ve formě dimeru, že je oblast aminokyselin 230-275 lokalizovaná na povrchu proteinu a tudíž může hrát roli v dimerizaci proteinu a v interakci s Ceg1, a že Cet1 obsahuje 2 paralelní tunely, z nichž je každý tvořen osmi antiparalelními  $\beta$ -řetězci. Byly také detekovány postranní řetězce aminokyselin orientované dovnitř tunelu a hrající pravděpodobně roli v odštěpování  $\gamma$ -fosfátu z pre-mRNA (viz obrázek 4A) [371]. Následnými mutačními analýzami<sup>1</sup> byly detekovány esenciální aminokyseliny [374, 385, 386], které se dají rozdělit na do několika skupin:

- aminokyseliny přímo se účastní odštěpení  $\gamma$ -fosfátu díky nastavení správné orientace fosfátu (Arg<sup>393</sup>, Lys<sup>456</sup>, Arg<sup>458</sup>) nebo dvojmocného iontu (Glu<sup>305</sup>, Glu<sup>307</sup>, Glu<sup>496</sup>)
- aminokyseliny podílející se na zprostředkování kontaktu  $\gamma$ -fosfátu (Asp<sup>377</sup>, Glu<sup>433</sup>) nebo dvojmocného iontu (Asp<sup>471</sup>, Glu<sup>494</sup>) s vodou
- aminokyseliny interagující s esenciálními aminokyselinami, případně podílející se na stabilizaci RTázového tunelu (Gln<sup>405</sup>, Lys<sup>409</sup>, Arg<sup>454</sup>, Glu<sup>492</sup>, Arg<sup>469</sup>, Thr<sup>473</sup>)
- aminokyseliny, jejichž mutace způsobují teplotní (Leu<sup>306</sup>, Arg<sup>321</sup>, Asp<sup>425</sup>, Val<sup>493</sup>, Leu<sup>495</sup>) či chladovou (Ser<sup>429</sup>) citlivost

---

<sup>1</sup> Při těchto i dalších v textu uvedených mutačních analýzách byla uvedená aminokyselina zaměněna za neutrální aminokyselinu alanin, pokud není uvedeno jinak.

Jak již bylo uvedeno, Cet1 se vyskytuje ve formě dimeru, což potvrzují i sedimentační analýzy [384]. N-koncová deleční mutanta Cet1(276-549) sedimentuje jako monomer, přitom *in vitro* vykazuje normální katalytickou aktivitu, není však sama o sobě schopna komplementovat *cet1Δ* mutaci v *S. cerevisiae in vivo*. Ke komplementaci *cet1Δ* mutace došlo pouze při její produkci společně s myší GTázovou doménou Mce1(211-597) [384]. Předpokládá se tedy, že dimerizace Cet1 je důležitá *in vivo* zejména pro allosterickou aktivaci Ceg1 [357, 358]. Cet1 v monomerní formě navíc vykazuje termosenzitivní fenotyp [387]. Pro dimerizaci Cet1 jsou důležité aminokyseliny Phe<sup>272</sup>, Leu<sup>273</sup>, Cys<sup>330</sup> a Val<sup>331</sup> [388]. Cet1 se váže na Ceg1 *in vitro* a *in vivo*, pro interakci je důležitá oblast mezi aminokyselinami 239-259, zejména <sup>243</sup>WAQKW<sup>247</sup> motiv v Cet1 [389] a C-koncová oblast Ceg1 [390]. Funkce této vazby je v allosterické aktivaci Ceg1. Ceg1 je sice sama o sobě schopná navázat se na CTD doménu RNA polymerázy II, ale bez navázaného Cet1 není schopná guanylace. Další funkcí je fyzické přiblížení RTázy k RNA polymeráze II v průběhu iniciace transkripce [390, 391].

Delece GTázy (Ceg1; 459 aminokyselin) je pro *S. cerevisiae* letální [392]. V její proteinové sekvenci bylo nalezeno 6 konzervovaných motivů charakteristických pro rodinu mononukleotidyltransferáz včetně esenciálního lysinu (Lys<sup>70</sup>), který vytváří kovalentní spojení s GMP [393, 394]. Mutační analýzy odhalily esenciální aminokyseliny ve všech motivech. V motivu I jsou to aminokyseliny Lys<sup>70</sup>, Gly<sup>73</sup>, Arg<sup>75</sup>; v motivu III Asp<sup>130</sup>, Glu<sup>132</sup>; v motivu IIIa Phe<sup>151</sup>, Asp<sup>152</sup>; v motivu IV Asp<sup>225</sup>, Gly<sup>226</sup>; v motivu V Lys<sup>247</sup>, Lys<sup>249</sup>, Asp<sup>257</sup> a v motivu VI Trp<sup>363</sup>, Arg<sup>369</sup>, Asp<sup>371</sup> a Lys<sup>372</sup> [395, 396].

MTáza (Abd1; 436 aminokyselin) je nutná pro růst *S. cerevisiae*, její delece je letální [397]. Pro funkci MTázy *in vivo* je dostačující fragment Abd1(110–436) [381]. Plná funkce Abd1 zůstává zachována i při deleci posledních deseti C-koncových aminokyselin. Aminokyseliny 110-129 jsou nezbytné pro aktivitu *in vivo*, v případě jejich delece zůstává zachována katalytická aktivita Abd1 *in vitro* [398]. Při rozsáhlých mutačních analýzách bylo odhaleno osm esenciálních aminokyselin (Glu<sup>170</sup>, Gly<sup>174</sup>, Asp<sup>178</sup>, Asp<sup>194</sup>, Arg<sup>206</sup>, Tyr<sup>254</sup>, Phe<sup>256</sup>, Tyr<sup>330</sup>) nezbytných pro funkci MTázy *in vivo* a *in vitro* [398, 399]. Pozice těchto aminokyselin je vysoce konzervována ve všech zatím popsáných MTázách [400]. MTázová aktivita Abd1 je silně inhibována sinefunginem, přirozeným analogem AdoMet, který vykazuje zhruba 900x vyšší afinitu k AdoMet vazebnému místu než AdoMet nebo AdoHcy [401].

## *Candida albicans*

RTáza (CaCet1; 520 aminokyselin) patří do skupiny RTáz závislých na aktivaci dvojmocnými kationty, je funkční jako dimer [356]. Na rozdíl od *S. cerevisiae* není delece RTázy pro *C. albicans* letální. Buňky s delecí tohoto genu rostou pomaleji, ale jsou životaschopné. Předpokládá se, že mají nemetylovanou čepičku se čtyřmi fosfáty (GppppN) [402]. RTáza obsahuje 3 domény. N-koncová část (aminokyseliny 1-202) je postradatelná pro funkci RTázy, oblast aminokyselin 202-250 je zodpovědná za vazbu na GTázu Cgt1 a C-koncová oblast aminokyselin 257-520 je vlastní katalytickou doménou CaCet1. Bylo prokázáno, že pro plnou funkčnost RTázy *in vivo* a *in vitro* je dostačující fragment Cet1(202-539) [369, 403]. Mutačními analýzami a porovnáním CaCet1 s krystalografickou strukturou Cet1 *S. cerevisiae* byly detekovány esenciální aminokyseliny [403], které se dají rozdělit na následující skupiny:

- aminokyseliny přímo se účastní odštěpení  $\gamma$ -fosfátu díky nastavení správné orientace fosfátu (Arg<sup>379</sup>, Lys<sup>443</sup>, Arg<sup>445</sup>) nebo dvojmocného iontu (Glu<sup>287</sup>, Glu<sup>289</sup>, Glu<sup>476</sup>)
- aminokyseliny podílející se na zprostředkování kontaktu  $\gamma$ -fosfátu (Asp<sup>363</sup>, Glu<sup>420</sup>) nebo dvojmocného iontu (Asp<sup>458</sup>, Glu<sup>474</sup>) s vodou
- aminokyseliny interagující s esenciálními aminokyselinami, případně se podílející na stabilizaci RTázového tunelu (Gln<sup>287</sup>-Lys<sup>396</sup>, Arg<sup>441</sup>-Glu<sup>472</sup>).

CaCet1 je sama o sobě schopna komplementovat *cet1Δ* mutaci v *S. cerevisiae in vivo*. Mimo vazby na vlastní GTázu (Cgt1) je pravděpodobně schopna vázat se i na GTázu *S. cerevisiae* (Ceg1) [404].

V proteinové sekvenci GTázy (Cgt1; 449 aminokyselin) bylo nalezeno 6 konzervovaných motivů charakteristických pro rodinu mononukleotidyltransferáz včetně esenciálního lysinu (Lys<sup>67</sup>), který vytváří kovalentní spojení s GMP. Cgt1 je schopna komplementovat *ceg1Δ* mutaci v *S. cerevisiae*, pro její funkci *in vivo* je dostačující fragment Cgt1(1–387) [369, 405]. Delece Cgt1 je pro *C. albicans* letální [402]. Díky krystalografické studii proteinu Cgt1(1–387), navázaného na fosforylovanou C-koncovou doménu RNA polymerázy II [356], patří tato GTáza k nejlépe prostudovaným. Bylo zjištěno, že Cgt1 interaguje s prvním tyrosinem, třetím a šestým prolinem a fosforylovaným pátým serinem (T<sub>1</sub>P<sub>3</sub> P<sub>6</sub>S<sub>5</sub>-PO<sub>4</sub>) na CTD doméně RNA polymerázy II. Dále byla detekována místa v Cgt1 proteinu (CDS; CTD-Docking Sites) podílející se na interakci Cgt1 a CTD domény RNA polymerázy II:

- CDS1 – obsahuje aminokyseliny Lys<sup>152</sup>, Arg<sup>157</sup> a Tyr<sup>165</sup>, vytvářející vodíkové nebo elektrostatické interakce s fosfátem Ser<sub>5</sub>-PO<sub>4</sub>, a aminokyseliny Phe<sup>63</sup>, Leu<sup>163</sup>, Gly<sup>164</sup>,

Tyr<sup>165</sup>, Phe<sup>196</sup>, Met<sup>199</sup> vytvářející van der Waalsovy kontakty s CTD RNA polymerázy II

- CDS2 – obsahuje aminokyselinu Asp<sup>175</sup>, která vytváří vodíkové spojení s hydroxylovou skupinou prvního tyrosinu, a dále aminokyseliny Arg<sup>140</sup>, Lys<sup>178</sup>, Lys<sup>193</sup>, které interagují s fosfátem Ser<sub>5</sub>-PO<sub>4</sub>, a nakonec aminokyseliny Thr<sup>167</sup>, Met<sup>171</sup>, Phe<sup>196</sup> vytvářející van der Waalsovy kontakty s prvním tyrosinem
- CDS3 – obsahuje aminokyseliny Tyr<sup>203</sup>, His<sup>204</sup>, Lys<sup>382</sup>, které interagují s fosfátem Ser<sub>5</sub>-PO<sub>4</sub>

Pro všechny výše uvedené aminokyseliny byly provedeny mutační analýzy. Ukázalo se, že žádná z nich není esenciální. Kvartérní struktura GTázy *C. albicans* se skládá ze dvou jasně oddělených domén, a to NT domény (aminokyseliny 1-243), která se podílí na interakci s CTD doménou RNA polymerázy II, a OB domény (aminokyseliny 244-387), která interaguje s TPázou CaCet1 (viz obrázek 4E). Oproti krystalografické analýze PBCV-1 viru [380] byl u NT domény Cgt1 objeven úsek šesti N-koncových aminokyselin interagujících s OB doménou. Mutační analýzy těchto aminokyselin ukazují, že hrají pravděpodobně úlohu ve vazbě CaCet1 na GTázu [356].

MTáza (Ccm1; 474 aminokyselin) je schopna komplementovat *abd1Δ* mutaci v *S. cerevisiae* [369]. Její delece překvapivě není pro *C. albicans* letální, kvasinky s delecí tohoto genu rostou pomaleji, ale jsou životaschopné. Předpokládá se, že mají nemetylovanou čepičku se třemi fosfáty (GpppN) [402]. Pro funkci Ccm1 *in vivo* je dostačující fragment Ccm1(137–474), který se váže na C-koncovou doménu RNA polymerázy II. Tato vazba je zesílena při současné fosforylaci obou serinů (Ser<sup>2</sup> a Ser<sup>5</sup>) vyskytujících se na CTD doméně RNA polymerázy II [369].

### ***Schizosaccharomyces pombe***

RTáza (Pct1; 303 aminokyselin) patří do skupiny RTáz závislých na aktivaci dvojmocnými kationty, je funkční jako dimer [387]. Její delece je pro *S. pombe* letální [406]. Mutace v esenciálních aminokyselinách (Glu<sup>78</sup>, Glu<sup>80</sup>, Glu<sup>260</sup>) vedou ke ztrátě RTázové aktivity. Pct1 není sama o sobě schopna komplementovat *cet1Δ* mutaci v *S. cerevisiae in vivo*; ke komplementaci *cet1Δ* mutace došlo pouze při vytvoření hybridního konstruktů Pct1(276-549) s myší GTázovou doménou Mce1(211-597) [407]. Bylo zjištěno, že pravděpodobně nedochází k přímé interakci mezi RTázou a GTázou *S. pombe*, oba 2 proteiny nasedají na fosforylovanou C-terminální doménu RNA polymerázy II nezávisle, GTáza nevyžaduje ke

své aktivaci kontakt s RTázou [408]. K dimerizaci Pce1 je nezbytná sekvence <sup>41</sup>VPKIEMNFLN<sup>50</sup>, Pce1 v monomerní formě vykazuje termosenzitivní fenotyp [387].

V proteinové sekvenci GTázy (Pce1; 402 aminokyselin) bylo nalezeno 6 konzervovaných motivů charakteristických pro rodinu mononukleotidyltransferáz včetně esenciálního lysinu (Lys<sup>67</sup>), který vytváří kovalentní spojení s GMP [409]. Její delece je pro *S. pombe* letální [406].

MTáza (Pcm1; 389 aminokyselin) je schopna komplementovat *abd1Δ* mutaci v *S. cerevisiae*, pro její funkci *in vivo* je dostačující fragment Pcm1(94–389) [370].

### Lineární plazmidy *K. lactis*

U lineárního plazmidu pGKL2 kvasinky *K. lactis* byla u proteinu kódovaného ORF3 popsána RTázová a GTázová aktivita.

RTázová aktivita je kódována N-koncovou částí ORF3p; je závislá na aktivaci dvojmocnými kationty. Tato RTázová doména vykazuje sekvenční podobnost s konzervovanými doménami cytoplazmatických virů [52, 79].

GTázová aktivita je kódována střední částí ORF3p, obsahuje 6 konzervovaných motivů charakteristických pro rodinu mononukleotidyltransferáz včetně esenciálního lysinu (Lys<sup>212</sup>), který vytváří kovalentní spojení s GMP. Mutace tohoto lysinu zcela inhibuje schopnost vazby GMP na ORF3p [79]. Potenciální AdoMet vazebné místo se nachází v C-koncové oblasti ORF3p, nicméně MTázová aktivita dosud detekována nebyla (viz obrázek 5) [79].

OBRÁZEK 5 – Organizace *capping* enzymu lineárních pGKL plazmidů. Konzervované domény RTázové oblasti jsou popsány arabskými číslicemi; konzervované domény GTázové oblasti jsou popsány římskými číslicemi; potenciální vazebné místo pro S-adenozyl-L-methionin (SAM) je vyznačeno oválem.



## 2.6.2. .... u prvoků

### *Encephalitozoon cuniculi*

RTáza (EcCet1; 221 aminokyselin) patří do skupiny RTáz závislých na aktivaci dvojmocnými kationty, funkční je pravděpodobně jako monomer. Mutace v esenciálních aminokyselinách (Glu<sup>32</sup>, Glu<sup>34</sup>, Glu<sup>193</sup> a Glu<sup>195</sup>) vedou ke ztrátě RTázové aktivity [410].

V proteinové sekvenci GTázy (EcCeg1; 364 aminokyselin) bylo nalezeno 6 konzervovaných motivů charakteristických pro rodinu mononukleotidyltransferáz včetně esenciálního lysinu (Lys<sup>63</sup>), který vytváří kovalentní spojení s GMP. Tato GTáza je schopná komplementovat *ceg1Δ* mutaci v *S. cerevisiae*; po mutagenезi esenciálního lysinu dojde ke ztrátě schopnosti této komplementace [410].

MTáza (Ecm1; 298 aminokyselin) je nejmenší a v současnosti nejlépe charakterizovanou MTázou. Je schopna komplementovat *abd1Δ* mutaci v *S. cerevisiae* [410]. Krystalografickými studiemi byla odhalena vazebná místa pro AdoMet i pro nemetylovanou čepičku (viz výše). Dále byly popsány mutace výrazně ovlivňující účinnost MTázy *in vivo* a *in vitro*. Jedná se o mutace ve vazebném místě pro AdoMet (Lys<sup>54</sup>, Asp<sup>70</sup>, Asp<sup>78</sup>, Asp<sup>94</sup>), v místě vazby trisfosfátového řetězce (Arg<sup>106</sup>) a v místě vazby guanozinu (Phe<sup>141</sup>, His<sup>144</sup>, Tyr<sup>145</sup>) [382, 383, 401]. Byla také provedena krystalografická studie se sinefunginem, přirozeným analogem AdoMet, schopným inhibovat MTázovou aktivitu. Z této studie vyplynulo, že se sinefungin váže do obdobného místa jako AdoMet, ovšem s přibližně třikrát vyšší afinitou [401].

### *Plasmodium falciparum*

RTáza (Prt1; 596 aminokyselin) patří do skupiny RTáz závislých na aktivaci dvojmocnými kationty, je funkční pravděpodobně jako monomer [411]. Mutace v esenciálních aminokyselinách (Glu<sup>46</sup>, Glu<sup>48</sup>, Arg<sup>197</sup>, Glu<sup>301</sup>, Arg<sup>320</sup>, Glu<sup>350</sup>, Glu<sup>352</sup> a Glu<sup>354</sup>) vedou ke ztrátě RTázové aktivity, mutace v Arg<sup>295</sup> vede naopak k více než šestisetnásobnému zvýšení aktivity ve srovnání s původním enzymem [412].

V proteinové sekvenci GTázy (Pgt1; 520 aminokyselin) bylo nalezeno 6 konzervovaných motivů charakteristických pro rodinu mononukleotidyltransferáz včetně esenciálního lysinu (Lys<sup>62</sup>), který vytváří kovalentní spojení s GMP [411].

MTáza u *Plasmodium falciparum* zatím detekována nebyla.



### ***Giardia lamblia***

RTáza (GlCet1; 344 aminokyselin) patří do skupiny RTáz závislých na aktivaci dvojmocnými kationty, je funkční pravděpodobně jako monomer [413].

V proteinové sekvenci GTázy (GlCeg1; 511 aminokyselin) bylo nalezeno 6 konzervovaných motivů charakteristických pro rodinu mononukleotidyltransferáz včetně esenciálního lysinu (Lys<sup>66</sup>), který vytváří kovalentní spojení s GMP [413].

MTázová aktivita zatím popsána nebyla. Nicméně byly popsány metyltransferázové aktivity vedoucí k syntéze trimetylované čepičky. Funkce těchto metyltransferáz je závislá na přítomnosti N<sup>7</sup>-metylované čepičky [414-416]. Dá se tedy předpokládat, že MTáza bude v *G. lamblia* přítomna.

### ***Trypanosoma brucei gambiense***

RTáza (TbCet1; 252 aminokyselin) patří do skupiny RTáz závislých na aktivaci dvojmocnými kationty, je funkční pravděpodobně jako monomer. V TbCet1 byly popsány mutace v aminokyselinách Glu<sup>52</sup>, Arg<sup>127</sup>, Glu<sup>168</sup>, Arg<sup>186</sup>, Glu<sup>216</sup>, Glu<sup>218</sup>, které výrazně ovlivňují RTázovou aktivitu. Katalytická doména TbCet1 je velmi termostabilní, RTáza je aktivní i po inkubaci v 70 °C po dobu dvou hodin [417, 418]. Částečně byla charakterizována i RTáza z *Trypanosoma cruzi* (TcCet1, 251 aminokyselin), která vykazuje 30 % sekvenční podobnost s TbCet1. Aktivní místa jsou v obou RTázách velmi konzervovaná, předpokládá se, že kinetika jejich reakcí je obdobná. TcCet1 je ovšem oproti TbCet1 mnohem méně termostabilní [419].

V proteinové sekvenci GTázy (TbCe1; 586 aminokyselin) bylo nalezeno 6 konzervovaných motivů charakteristických pro rodinu mononukleotidyltransferáz včetně esenciálního lysinu (Lys<sup>288</sup>), který vytváří kovalentní spojení s GMP. Zvláštností je přítomnost N-koncových 250 aminokyselin se zatím neznámou funkcí [420]. Protein (697 aminokyselin; esenciální Lys<sup>387</sup>) vykazující obdobné charakteristiky byl popsán i u prvoka *Crithia fasciculata* [420]. U *Trypanosoma brucei* byl popsán také další enzym zodpovědný za připojení čepičky na 5' konec SL RNA. Jedná se o bifunkční protein TbCgm1 (1050 aminokyselin), který obsahuje GTázovou i MTázovou aktivitu. N-koncová část tohoto proteinu (aminokyseliny 1-567) obsahuje 6 motivů, charakteristických pro rodinu mononukleotidyltransferáz, nutných pro vazbu GMP a jeho následný přenos na difosforylovaný konec pre-mRNA. Esenciální lysin se vyskytuje v motivu I. Aminokyseliny, které jsou esenciální v GTáze *S. cerevisiae* (Ceg1), jsou konzervovány i v TbCgm1, stejně tak jako aminokyseliny zodpovědné za přímý kontakt

s molekulou GTP. C-koncová část (aminokyseliny 717-1050) TbCgm1 obsahuje vazebný motiv pro AdoMet (VADLCSGRGG) [421]. Rekombinantní protein přenáší GMP na 5' konec SL RNA a metyluje RNA zakončenou GpppN strukturou. Tento protein je nezbytný pro růst *Trypanosoma brucei*. Pokud dojde k jeho umlčení pomocí interference RNA, vzrůstá množství nečepičkované SL RNA. Naopak RNA interference TbCe1 a TbCMt1 nemá vliv na růst *Trypanosoma brucei* ani na syntézu čepičky na SL RNA. Z toho lze usuzovat, že TbCgm1 se pravděpodobně velmi významně podílí na syntéze *cap 0* či *cap 1* struktury, která je nezbytná pro následnou hypermetylací [422].

Mimo výše uvedené MTázové domény TbCgm1 proteinu byly v *Trypanosoma brucei* popsány nezávisle několika skupinami ještě dvě další metyltransferázy, TbCMt1 (TbCOM1/TbMT48/TbMT417; 417 aminokyselin) a TbCMt2 (TbMT57/TbMT511; 511 aminokyselin). V obou případech se jedná o 2'-*O*-metyltransferázy metylující první 4 nukleotidy na SL RNA, a to pravděpodobně po syntéze metylované čepičky (*cap 0* případně *cap 1* struktury) proteinem TbCgm1 [422]. TbCMt1 metyluje specificky druhý nukleotid (A<sub>2</sub>), a to pouze za předpokladu, že je na 5' SL RNA konci přítomna metylovaná čepička. Pro metylaci A<sub>2</sub> není nutná metylace A<sub>1</sub>. Vybrané mutace tohoto proteinu (Tyr<sup>18</sup>, His<sup>75</sup>, Asp<sup>142</sup>, Arg<sup>144</sup>, Tyr<sup>187</sup>, Glu<sup>253</sup>) výrazně snižují aktivitu MTázy [423-425]. TbCMt1 metyluje specificky třetí nukleotid (C<sub>3</sub>), případně nukleotid čtvrtý (U<sub>4</sub>). Předběžné výsledky ukazují, že metylace na C<sub>3</sub> a U<sub>4</sub> může hrát roli v navázání čepičky na CBC [426]. RNA interference obou genů kódujících MTázy nijak výrazně neovlivnila životaschopnost *Trypanosoma brucei* [425].

### **2.6.3. .... u mnohobuněčných**

#### ***Mus musculus***

Mce1 (597 aminokyselin) je bifunkční protein zajišťující RTázovou i GTázovou aktivitu [427]. Mce1 je schopen komplementovat *cet1Δceg1Δ* mutace v *S. cerevisiae* [370]. RTázová doména tohoto enzymu, Mce1(1-210), patří do skupiny RTáz nezávislých na aktivaci dvojmocnými kationty, které jsou charakteristické vysoce konzervovanou sekvencí HCxxxxR(S/T). V případě myši RTázy se jedná o esenciální aminokyseliny Cys<sup>126</sup> a Arg<sup>132</sup>. Aktivita RTázy je inhibována vanadátem a jodacetátem, u nichž se předpokládá, že modifikují aktivní cystein [428]. Mutačními analýzami byla potvrzena nezbytnost esenciálních aminokyselin Cys<sup>126</sup> a Arg<sup>132</sup> a navíc byla objevena další esenciální aminokyselina, Asn<sup>131</sup>. Další studované aminokyseliny (Tyr<sup>74</sup>, His<sup>128</sup>, Arg<sup>160</sup>) vykazují termosenzitivní fenotyp [372,

428]. Protein Mce1(1-210) byl analyzován pomocí krystalografie, která odhalila hluboké, pozitivně nabitě vazebné místo pro trifosforylovaný konec pre-mRNA (viz obrázek 4B) [372]. Nezkrácený Mce1 protein je schopen komplementovat *cet1Δ* mutaci v *S. cerevisiae in vivo*; při mutaci Cys<sup>126</sup> je schopnost komplementace zrušena. Mce1(1-210), který kóduje pouze RTázovou aktivitu *capping* myšího enzymu, není schopen komplementovat *cet1Δ* mutaci v *S. cerevisiae in vivo*. Stejně tak je schopnost komplementace zrušena při mutaci esenciálního Lys<sup>294</sup> v GTázové doméně myšího *capping* enzymu, ačkoliv v tomto případě je katalytická funkce RTázy zachována. Je tedy zřejmé, že u myšího *capping* enzymu musí být RTázová aktivita spojena s aktivitou GTázovou [391, 427]. Souvisí to pravděpodobně s tím, že RTázová doména není schopna nasedat na C-terminální doménu RNA polymerázy II [360].

GTázová aktivita Mce1 je kódována jeho C-koncovou částí, tj. Mce1(211-597). V její proteinové sekvenci bylo nalezeno 6 konzervovaných motivů charakteristických pro rodinu mononukleotidyltransferáz včetně esenciálního lysinu (Lys<sup>294</sup>), který vytváří kovalentní spojení s GMP. Mce1 je schopen komplementovat *ceg1Δ* mutaci v *S. cerevisiae*; pro jeho funkci *in vivo* je dostačující fragment Mce1(211–567) [427, 429]. Rozsáhlé mutační analýzy odhalily esenciální aminokyseliny ve všech motivech. V motivu I jsou to aminokyseliny Arg<sup>299</sup>, Arg<sup>315</sup>; v motivu III Asp<sup>343</sup>, Glu<sup>345</sup>; v motivu IIIa Tyr<sup>362</sup>, Asp<sup>363</sup>, Arg<sup>380</sup>; v motivu IV Asp<sup>438</sup>, Gly<sup>439</sup>; v motivu V Lys<sup>458</sup>, Lys<sup>460</sup>, Asp<sup>468</sup> a v motivu VI Arg<sup>530</sup>, Asp<sup>532</sup>, Lys<sup>533</sup>, Asn<sup>537</sup> [428, 430]. Je zajímavé, že je možné zaměnit pozice RTázové a GTázové domény (tj. vytvořit protein s uspořádáním H<sub>2</sub>N-Mce1(211–597)-(1–210)-COOH), aniž by se změnila schopnost komplementovat *cet1Δceg1Δ* mutace v *S. cerevisiae* [431].

MTáza u *Mus musculus* zatím detekována nebyla.

### ***Homo sapiens***

Hce1/hCap1a (597 aminokyselin) bifunkční protein zajišťující RTázovou i GTázovou aktivitu. Hce1 je schopen komplementovat *cet1Δceg1Δ* mutace v *S. cerevisiae* [432]. RTázová doména tohoto enzymu, Hce1(1-213), patří do skupiny RTáz nezávislých na aktivaci dvojmocnými kationty. Sama o sobě není schopna komplementovat *cet1Δ* mutaci v *S. cerevisiae in vivo* [432, 433].

GTázová doména Hce1(211-597) obsahuje 6 konzervovaných motivů charakteristických pro rodinu mononukleotidyltransferáz včetně esenciálního lysinu (Lys<sup>294</sup>), který vytváří kovalentní spojení s GMP [432, 433]. Mutační analýzy odhalily esenciální aminokyseliny na pozicích Lys<sup>294</sup>, Arg<sup>299</sup>, Glu<sup>345</sup>, Lys<sup>458</sup>, Lys<sup>460</sup> [432]. Byly také popsány 3 další proteiny

(Hce1a, Hce1b; hCap1b) [432, 433] liší se od Hce1 proteinu zkrácenou C-koncovou částí. Všechny 3 proteiny vykazují RTázovou aktivitu, nikoliv však aktivitu GTázovou.

MTáza (Hcm1; 476 aminokyselin) je schopna komplementovat *abd1Δ* mutaci v *S. cerevisiae*. Pro její funkci *in vivo* je dostačující fragment Hcm1(121–476) [361, 370, 434]. Mutační analýzy odhalily esenciální aminokyseliny na pozicích Asp<sup>203</sup>, Gly<sup>207</sup>, Asp<sup>211</sup>, Asp<sup>227</sup>, Arg<sup>239</sup>, Tyr<sup>289</sup>, Phe<sup>291</sup>, Phe<sup>354</sup> [370]. Bylo prokázáno, že jak schopnost vazby Hcm1 na 5' koncovou strukturu GpppN pre-mRNA, tak i účinnost MTázové reakce je stimulována navázáním importinu  $\alpha$  na MTázu [435, 436]. Přítomnost Hce1 MTázy je esenciální, při umlčení *HCE1* genu pomocí malých interferujících RNA (siRNA; *Small Interfering RNA*) došlo v buněčné kultuře k indukci apoptózy [436]. Mimo Hcm1 MTázy byly nalezeny další 2 proteiny (hCmt1b, hCmt1c), které vykazují vysoký stupeň homologie s Hcm1 proteinem, avšak nevykazují MTázovou aktivitu. Jde pravděpodobně o produkty alternativního sestřihu *HCE1* genu [434].

### *Xenopus leavis*

xCap1a (598 aminokyselin) je bifunkční protein zajišťující RTázovou i GTázovou aktivitu. RTázová doména tohoto enzymu, xCap1a(1-220), patří do skupiny RTáz nezávislých na aktivaci dvojmocnými kationty.

GTázová doména, xCap1a(221-598), obsahuje 6 konzervovaných motivů charakteristických pro rodinu mononukleotidyltransferáz včetně esenciálního lysinu (Lys<sup>295</sup>), který vytváří kovalentní spojení s GMP [437].

U MTázy (xCmt1; 402 aminokyselin) byla zatím prokázána pouze funkce *in vitro* [437].

### *Caenorhabditis elegans*

Cel-1 (623 aminokyselin) je bifunkční protein zajišťující RTázovou i GTázovou aktivitu; je schopen komplementovat *cet1Δceg1Δ* mutace v *S. cerevisiae* [438, 439]. Cel-1 je pro vývoj *C. elegans* esenciální, při jeho inaktivaci pomocí interference RNA dochází k hynutí embryí v časně fázi vývoje [438, 439]. RTázová doména tohoto enzymu, Cel-1(13-248), patří do skupiny RTáz nezávislých na aktivaci dvojmocnými kationty. Mutační analýzy této RTázy odhalily esenciální aminokyseliny na pozicích Asp<sup>76</sup>, Glu<sup>111</sup>, Cys<sup>124</sup>, Arg<sup>142</sup> [438, 440]. RTáza Cel-1(13-248) není sama o sobě schopna komplementovat *cet1Δ* mutaci v *S. cerevisiae in vivo*. Ke komplementaci *cet1Δ* mutace došlo pouze při produkci Cel-1(13-248) jako fúzního

proteinu společně s GTázami Mce1(211-597) (*M. musculus*), Pce1 (*S. pombe*) případně Cgt1 (*C. albicans*), nikoliv však při současné produkci s A103R (PBCV-1) [438].

GTázová doména Cel-1(221-623) je schopna komplementovat *ceg1Δ* mutaci v *S. cerevisiae*. V její proteinové sekvenci bylo nalezeno 6 konzervovaných motivů charakteristických pro rodinu mononukleotidyltransferáz včetně esenciálního lysinu (Lys<sup>311</sup>), který vytváří kovalentní spojení s GMP [438, 439].

MTáza u *C. elegans* zatím detekována nebyla, byl pouze pomocí počítačové analýzy předpovězen otevřený čtecí rámec, který by ji mohl kódovat [398].

#### **2.6.4. .... u virů**

**PBCV-1** (*Paramecium Bursaria Chlorella Virus 1; Phycodnaviridae*)

RTáza (cvRTP; 193 aminokyselin) patří do skupiny RTáz závislých na aktivaci dvojmocnými kationty, je nejmenší známou trifosfatázou z této rodiny. Tato RTáza není sama o sobě schopna komplementovat *cet1Δ* mutaci v *S. cerevisiae in vivo*; ke komplementaci *cet1Δ* mutace došlo pouze při vytvoření hybridního konstruktů cvRTP(1-193) s myší GTázovou doménou Mce1(211-597). Mutace v esenciální aminokyselině Glu<sup>26</sup> vede ke ztrátě RTázové aktivity *in vitro* [441]. Aktivita RTázy je výrazně inhibována dekanadátém [377].

GTáza (A103R; 330 aminokyselin) je nejmenší ze známých GTáz. V její proteinové sekvenci bylo nalezeno 6 konzervovaných motivů charakteristických pro rodinu mononukleotidyltransferáz včetně esenciálního lysinu (Lys<sup>82</sup>), který vytváří kovalentní spojení s GMP [442]. Pomocí krystalografických analýz aktivního fragmentu GTázy (aminokyseliny 11-327) [378, 380, 443] byla popsána její kvartérní struktura, která se skládá ze dvou jasně oddělených domén, a to NT domény (aminokyseliny 11-236 a 319-327) a OB domény (aminokyseliny 238-317). Motivy I, III, IIIa, IV jsou umístěny v NT doméně, motiv VI je umístěn v OB doméně a motiv V je umístěn na rozhraní obou domén. Byly popsány dvě konformace enzymu, otevřená (s širokou mezerou mezi oběma doménami) a uzavřená struktura (s mezerou úzkou). Molekula GTP se pravděpodobně váže do otevřené formy enzymu a je situována částečně do mezery mezi oběma doménami. ε-amino skupina aktivního Lys<sup>82</sup> je umístěna v blízkosti α-fosfátu GTP, ke kontaktům enzymu s β a γ fosfátem pravděpodobně nedochází. Po konformační změně z otevřené do uzavřené formy se motiv VI dostává do blízkosti β a γ fosfátů GTP a orientuje se tak, aby mohlo dojít k vazbě GMP na Lys<sup>82</sup>. Pokud je krystal v této fázi nasycen roztokem obsahujícím manganaté ionty, proběhne

guanylyltransferázová reakce za vytvoření kovalentního intermediátu enzym-GMP (viz obrázek 4C, D).

MTáza u *Paramecium bursaria Chlorella Virus 1* zatím detekována nebyla.

### **Virus vakcinie (*Poxviridae*)**

Virus vakcinie patří mezi DNA viry replikující se v cytoplazmě. Při enkapsidaci její DNA jsou do partikulí zavzaty i všechny proteiny účastníci se transkripce časných mRNA, včetně RNA polymerázy, poly(A) polymerázy a *capping* enzymu s RTázovou, GTázovou a MTázovou aktivitou [444].

*Capping* enzym viru vakcinie je heterodimer skládající se z proteinu vD1 o velikosti 844 aminokyselin (kódován genem D1) a proteinu vD12 o velikosti 287 aminokyselin (kódován genem D12). Aminokyseliny 1-545 vD1 vykazují RTázovou a GTázovou aktivitu [445], aminokyseliny 546-844 vD1 vykazují velmi slabou MTázovou aktivitu, která je silně stimulována v přítomnosti vD12 proteinu [446]. Aktivní místa RTázy a GTázy jsou lokalizovaná v různých částech C-koncové domény vD1 proteinu [447]. RTázová doména tohoto enzymu, vD1(1-221), sice patří do skupiny RTáz závislých na aktivaci dvojmocnými kationty, má však malou sekvenční podobnost s ostatními proteiny této skupiny. RTáza viru vakcinie obsahuje motivy A a C, podílející se patrně na vazbě dvojmocného iontu, což je charakteristické pro RTázy tohoto typu. RTázová doména viru vakcinie pravděpodobně neobsahuje 2 paralelní tunely, její aktivní místo je zcela odlišné od ostatních RTáz závislých na aktivaci dvojmocnými kationty. Mutační analýzy odhalily esenciální aminokyseliny na pozicích Glu<sup>37</sup>, Glu<sup>39</sup>, Arg<sup>77</sup>, Lys<sup>107</sup>, Glu<sup>126</sup>, Asp<sup>159</sup>, Lys<sup>161</sup>, Glu<sup>192</sup>, Glu<sup>194</sup> [448-451]. Tyto aminokyseliny jsou konzervované u všech zatím popsaných RTázových domén poxvirů a jsou možným cílem léčiv zaměřených proti nim [448].

GTázová doména viru vakcinie, vD1(222-545), obsahuje 6 konzervovaných motivů charakteristických pro rodinu mononukleotidyltransferáz včetně esenciálního lysinu (Lys<sup>260</sup>), který vytváří kovalentní spojení s GMP [452]. Mutační analýzy odhalily esenciální aminokyseliny Gly<sup>263</sup>, Glu<sup>303</sup>, Glu<sup>375</sup>, Gly<sup>376</sup>, Lys<sup>392</sup>, Asp<sup>400</sup> nezbytné pro správnou funkci GTázy [452, 453]. RTázová a GTázová doména viru vakcinie vD1(1-545) je schopna komplementovat *cet1Δceg1Δ* mutace v *S. cerevisiae*. Ovšem díky cytoplazmatické lokalizaci viru vakcinie pouze tehdy, je-li *capping* enzym v kvasinkách produkován jako fúzní protein s GTázovou doménou myšího *capping* enzymu Mce1(211-597), který má mutovaný esenciální

Lys<sup>294</sup>. Tento nefunkční myší enzym slouží pro zacílení *capping* enzymu viru vakcinie na C-koncovou doménu RNA polymerázy II [450].

K plně funkční MTázové aktivitě viru vakcinie je třeba současné přítomnosti C-koncové oblasti vD1 proteinu, vD1(498-844), a s ní interagujícího proteinu vD12 [454]. MTáza je schopna komplementovat *abd1Δ* mutaci v *S. cerevisiae* [455]; pro její funkci *in vivo* je dostačující fragment vD1(540–844) produkovaný v přítomnosti vD12 [456]. MTázová doména proteinu D1, vD1(498-844), vykazuje velmi slabou MTázovou aktivitu, což znamená, že je to vlastní katalytická podjednotka MTázy. Její MTázová aktivita je výrazně zesílena (zhruba 50x) v přítomnosti vD12, který je sám o sobě katalyticky neaktivní [456, 457]. Mutační analýzy odhalily esenciální aminokyseliny Gly<sup>600</sup>, Asp<sup>604</sup>, Asp<sup>620</sup>, Arg<sup>632</sup>, Phe<sup>775</sup>, Tyr<sup>608</sup>, Phe<sup>609</sup>, Asp<sup>676</sup>, Trp<sup>677</sup>, His<sup>682</sup>, Tyr<sup>683</sup>, Glu<sup>763</sup>, Tyr<sup>764</sup> nezbytné pro správnou funkci MTázy [455, 458]. Při mutacích aminokyselin, které jsou lokalizované ve vazebném místě pro guanozin (mutace Tyr<sup>752</sup> na Ser, Cys nebo His a mutace Asn<sup>753</sup> na Ile), byla mutace *abd1Δ* v *S. cerevisiae* plně komplementována [459]. Mutační analýzy vD12 proteinu odhalily mutace v aminokyselinách Asn<sup>42</sup>, Tyr<sup>43</sup>, Lys<sup>156</sup>, Leu<sup>157</sup>, Phe<sup>176</sup>, Lys<sup>177</sup>, Asp<sup>192</sup>, Ser<sup>193</sup>, které ovlivňují MTázovou aktivitu [455, 460, 461]. Zkrácení vD12 proteinu o 60 aminokyselin z N-konce či o 48 aminokyselin z C-konce vede k inhibici jeho schopnosti vázat se na vD1(498-844) [460]; zkrácená forma zároveň vD12 proteinu nestimuluje MTázovou aktivitu proteinu vD1[462]. Pravděpodobnou funkcí vD12 proteinu je allosterická aktivace vD1 proteinu; v přítomnosti vD12 podjednotky dochází ke zvýšení vazebné schopnosti vD1 proteinu pro AdoMet a pro N-koncový guanozin 7x, resp. 14x [459].

### **ASFV (*African Swine Fever Virus*; *Asfarviridae*)**

ASFV patří mezi DNA viry replikující se v cytoplazmě. Při enkapsidaci její DNA jsou do partikulí zavzaty i všechny proteiny účastníci se transkripce časných mRNA [463], pravděpodobně včetně *capping* enzymu. V sekvenci tohoto proteinu (kódován genem NP868R; 868 aminokyselin) bylo nalezeno 6 konzervovaných motivů charakteristických pro rodinu mononukleotidyltransferáz včetně esenciálního lysinu (Lys<sup>282</sup>), který vytváří kovalentní spojení s GMP [464].

### **Alfaviry a viry jim podobné (*alphavirus-like* skupina virů)**

Do této skupiny virů, které obsahují „+RNA“ genom a replikují se v cytoplazmě, patří například *Semliki Forest Virus* (SFV), virus žloutenky E (HEV; *Hepatitis E Virus*), virus

mozaiky tabáku (TMV; *Tobacco Mosaic Virus*), virus mozaiky sveřepu (BMV; *Brome Mosaic Virus*), virus mozaiky bambusu (BaMV; *Bamboo Mosaic Virus*), virus mozaiky vojtěšky (AMV; *Alfalfa Mosaic Virus*) a *Sindbis Virus* (SV). Tato skupina virů je definována specifickým mechanismem přidávání čepičky na 5' konec mRNA, který je odlišný od všech výše popsaných schémat. Viry této skupiny kódují AdoMet-závislou GTázu; na *capping* enzym se sice váže kovalentní vazbou GMP, ale u těchto virů pouze za přítomnosti AdoMet. Jde tedy o spojení MTázové a GTázové aktivity, obě fungují ve vzájemné souvislosti a vzájemně se ovlivňují. Pravděpodobný mechanismus této reakce byl popsán u BaMV, jehož otevřený čtecí rámec 1 (ORF1; 1365 aminokyselin) obsahuje 3 domény:

- aminokyseliny 1-442 na N-konci proteinu nesou GTázovou a MTázovou aktivitu [465]
- aminokyseliny 514-892 vykazují RNA helikázovou a RTázovou aktivitu [466]
- aminokyseliny 893-1365 vykazují RNA polymerázovou aktivitu [467]

N-koncová doména ORF1(1-442) je schopna vytvořit přechodný komplex enzym- $m^7GMP$ , tato vazba ovšem není zprostředkována lysinem. Stejně tak se v sekvenci *capping* enzymů nevyskytují konzervované motivy charakteristické pro rodinu mononukleotidyltransferáz. Při srovnávání sekvencí mezi *capping* enzymy alfavirů a virů jim podobných byly nalezeny pouze 4 aminokyseliny konzervované ve všech sekvencích [468]. Mutační analýzy těchto konzervovaných aminokyselin (u BaMV jde o aminokyseliny His<sup>66</sup>, Asp<sup>122</sup>, Arg<sup>125</sup>, Tyr<sup>213</sup>) prokázaly jejich naprostou nepostradatelnost pro syntézu čepičky; mutované proteiny nejsou schopny metylovat GTP ani metylované GTP na sebe vázat. Testováním mutací v dalších aminokyselinách *capping* enzymu BaMV bylo vytipováno pravděpodobné aktivní místo GTázové/MTázové domény, na jehož vytvoření se mohou podílet sekvence aminokyselin <sup>66</sup>HPH<sup>68</sup>, <sup>310</sup>DVWAKLR<sup>316</sup>, <sup>121</sup>KDLA<sup>124</sup> a <sup>344</sup>KLDS<sup>347</sup>. Navrhovaný model přidání čepičky na 5' konec mRNA vypadá takto:

- Současné navázání GTP a AdoMet do aktivního místa ORF1(1-442). Navázání AdoMet do aktivního místa je pravděpodobně spojeno s konformační změnou *capping* enzymu, čímž se zvýší jeho afinita k GTP.
- Metylace GTP za vzniku  $m^7GTP$  a AdoHcy.
- Vytvoření kovalentního meziprojektu (enzym-His<sup>68</sup>- $m^7GMP$ ). Pro přenos  $m^7GMP$  z molekuly  $m^7GTP$  na enzym je důležitá přítomnost AdoHcy v aktivním místě *capping* enzymu; AdoHcy se pravděpodobně podílí na udržení správné konformace proteinu.



- Přenos  $m^7GMP$  na difosforylovaný konec mRNA. Ten je pravděpodobně vytvořen odštěpením koncového  $\gamma$ -fosfátu mRNA RTázovou aktivitou lokalizovanou ve střední části ORF1p. Pro účinný přenos  $m^7GMP$  na 5' konec mRNA je důležitá přítomnost guanozinu případně adenosinu jakožto prvního nukleotidu ve vznikajícím řetězci mRNA [469, 470].

U ostatních zástupců této skupiny se předpokládá obdobný mechanismus přidávání čepičky na 5' konec mRNA, o čemž svědčí i výsledky získané u jednotlivých zástupců alfavirů a virů jim podobných:

- Nestrukturní protein nsP1 *Sindbis* viru je schopen guanylylace v přítomnosti AdoMet [471]. Mutace konzervovaných aminokyselin v N-koncové části (aminokyseliny 1-540) nsP1 proteinu vedou k inhibici MTázové aktivity [472]. RTázová aktivita tohoto viru je kódována nsP2 proteinem [473].
- Nestrukturní protein nsP1 TMV je schopen guanylylace v přítomnosti AdoMet [474, 475] stejně tak jako nestrukturní protein nsP1 HEV [476].
- N-koncová část (aminokyseliny 1-516) nestrukturního proteinu nsP1 BMV je schopna guanylylace v přítomnosti AdoMet [477, 478]. Mutace tří ze čtyř konzervovaných aminokyselin v této N-koncové části vedou k inhibici jak MTázové, tak i GTázové aktivity [478]. RTázová aktivita tohoto viru je pravděpodobně kódována C-koncovou částí nsP1 proteinu [479].
- Nestrukturní protein nsP1 *Semliki Forest* viru je schopen guanylylace v přítomnosti AdoMet [471, 480]. Mutace konzervovaných aminokyselin vedou k inhibici jak MTázové, tak i GTázové aktivity [481]. Pro správnou funkci *capping* enzymu tohoto viru je nezbytná jeho vazba na membránové fosfolipidy [482, 483]. RTázová aktivita je kódována nsP2 proteinem [473].
- Mutace konzervovaných aminokyselin AMV viru vedou k poruchám v jeho syntéze [484].

### ***Reoviridae***

Tato skupina virů se segmentovaným dsRNA genomem replikující se v cytoplazmě patří mezi významné patogeny člověka. Všechny viry této čeledi využívají *capping* enzymy kódované vlastními geny. U savčího reoviru typu 3 je *capping* enzym kódován proteinem  $\lambda 2$ . GTázová aktivita je kódována jeho N-koncovou částí [485], k plné aktivitě je dostačující fragment  $\lambda 2(1-387)$  [486-488], který je schopen vytvořit kovalentní intermediát s molekulou GMP

[489]. Nicméně se v sekvenci tohoto proteinu, stejně tak jako v sekvenci *capping* enzymů ostatních zástupců čeledi *Reoviridae*, nevyskytují konzervované motivy charakteristické pro rodinu mononukleotidyltransferáz. Předpokládá se, že se molekula GMP váže na lysin v sekvenci <sup>190</sup>KDSL<sup>194</sup>. Mutací tohoto lysinu je GTázová aktivita naprosto inhibována. Na vazbě GMP se také podílí Lys<sup>171</sup> a Asp<sup>191</sup> [486, 490]. Maximální aktivita reovirových GTáz byla naměřena v rozmezí hodnot pH 4,0-5,0, zatímco maximální aktivita GTázy viru vakcinie byla naměřena v rozmezí hodnot pH 6,5-7,0. Jedním z možných vysvětlení požadavku nižšího pH pro optimální funkci GTázy může být přítomnost dvojice vysoce konzervovaných histidinů (His<sup>223</sup> a His<sup>232</sup>), jejichž mutací je zcela inhibován vznik dočasného komplexu enzym-GMP. Tato dvojice histidinů je vysoce konzervována u všech zatím známých reovirových GTáz [491].

MTázová doména reovirů je lokalizována ve střední části  $\lambda 2$  proteinu. V této oblasti byla lokalizována dvě nezávislá vazebná místa pro AdoMet (metyltransferázová doména I, aminokyseliny 434-691 a metyltransferázová doména II, aminokyseliny 804-1022). Předpokládá se, že tyto oblasti katalyzují jak N<sup>7</sup>, tak i 2-*O*'-metyltransferázové reakce; oblast I pravděpodobně katalyzuje 2-*O*'-metylaci, zatímco oblast II pravděpodobně katalyzuje N<sup>7</sup>-metylaci [487, 492, 493]. Protein  $\lambda 1$  reoviru typu 3 obsahuje mimo helikázové aktivity i aktivitu RTázovou a pravděpodobně se účastní syntézy čepičky na 5' konci mRNA. Aktivita této RTázy je závislá na přítomnosti dvojmocných kationtů, hořečnatých či manganatých [494, 495].

U ostatních virů této čeledi se předpokládá obdobný mechanismus syntézy čepičky, čemuž nasvědčují i výsledky získané u dalších zástupců:

- U ptačího reoviru je GTázová aktivita kódována proteinem  $\lambda 3$ , který je schopen vytvořit kovalentní intermediát s molekulou GMP [496]. K plné aktivitě GTázy je dostačující fragment  $\lambda 3(1-374)$  [497].
- U *Grass carp* reoviru je GTázová aktivita kódována proteinem  $\lambda 1$ , který je schopen vytvořit kovalentní intermediát s molekulou GMP. K plné aktivitě GTázy je dostačující fragment  $\lambda 1(1-391)$  [491].
- U *Banna* viru je GTázová aktivita kódována proteinem VP3, který je schopen vytvořit kovalentní intermediát s molekulou GMP [498].
- U viru způsobujícího katarální horečku ovcí (BTV; *Blue Tongue Virus*) jsou pravděpodobně všechny nezbytné aktivity (RTázová, GTázová, MTázová) kódovány

proteinem VP4. Zdá se, že MTázová aktivita je zodpovědná jak za N<sup>7</sup>, tak i 2'-O'-metyltransferázové reakce [499-501].

- U rotavirů je GTázová aktivita kódována proteinem VP3, který je schopen vytvořit kovalentní intermediát s molekulou GMP [502-504], MTázová aktivita je pravděpodobně kódována stejným proteinem [505]. RTázová aktivita je kódována pravděpodobně proteinem VP2 [506, 507].

### ***Birnaviridae***

U IBDV (*Infectious Bursal Disease Virus*) byl identifikován protein p90 schopný vytvořit kovalentní intermediát s molekulou GMP [508].

### ***Flaviviridae***

Do této čeledi virů, které se vyznačují nesegmentovaným ssRNA genomem a replikují se v cytoplazmě, patří významné patogeny člověka. Iniclace translace u těchto virů je zahajována jak na čepičce nezávislým způsobem, např. u viru žloutenky typu C (HCV, *Hepatitis C Virus*), tak na čepičce závislým způsobem, například u viru horečky dengue, viru západního Nilu (WNV; *West Nile Virus*) či viru japonské encefalitidy. O enzymech syntetizujících čepičku na 5' konci mRNA, pokud je přítomna, zatím není mnoho známo. Konkrétně protein obsahující GTázovou aktivitu zatím nebyl u žádného viru této čeledi popsán. RTázová aktivita byla popsána u viru horečky dengue a u WNV. V obou případech je lokalizována do C-koncové oblasti nestrukturního proteinu 3 (nsP3) [509, 510]. V případě viru horečky dengue jde o fragment aminokyselin 169-619, jehož aktivita je závislá na přítomnosti hořečnatých kationtů [511] a je stimulována přítomností nsP5 proteinu, který je v savčích buňkách infikovaných virem horečky dengue v komplexu s nsP3 proteinem [511, 512].

MTázová aktivita viru horečky dengue zatím detekována nebyla, nicméně je známá 2'-O'-metyltransferázová aktivita kódovaná 296 N-koncovými aminokyselinami proteinu nsP5 [513]. MTázová i 2'-O'-metyltransferázová aktivita WNV je kódována N-koncovými aminokyselinami 1-300 proteinu nsP5. Ačkoliv bylo v tomto proteinu detekováno pouze jedno vazebné místo pro AdoMet, každá z metylačních reakcí vyžaduje jiné reakční podmínky a účastní se jí jiné aminokyseliny. Pro 2'-O'-metyltransferázovou aktivitu je důležitá přítomnost MTázového konzervovaného motivu aminokyselin Lys<sup>61</sup>, Asp<sup>146</sup>, Lys<sup>182</sup>, Glu<sup>218</sup>, zatímco pro MTázovou aktivitu je dostačující přítomnost nemutované aminokyseliny Asp<sup>146</sup>.

Metylace na N<sup>7</sup> koncového guanozinu také předchází 2'-O-metylaci a je nezbytná pro životní cyklus WNV [514, 515].

#### **AcMNPV (*Autographa Californica Multiple NucleoPolyhedroVirus*, *Baculoviridae*)**

Bakuloviry jsou DNA viry využívající k transkripci svých časných genů hostitelského aparátu, jmenovitě RNA polymerázy II. Pozdní a velmi pozdní geny jsou transkribovány bakulovirovou RNA polymerázou, která se skládá ze čtyř podjednotek: Lef-8, Lef-9, Lef-4 a p47 [516, 517]. Podjednotka Lef-4 (*Late Expression Factor 4*; 464 aminokyselin) obsahuje RTázovou a GTázovou aktivitu a je pravděpodobně zodpovědná za syntézu čepičky na 5' konci virových mRNA [518, 519]. Gen *Lef-4* je esenciální pro AcMNPV. Při jeho inaktivaci pomocí interference RNA dochází k zastavení transkripce pozdních a velmi pozdních virových genů; transkripce genů časných ovlivněna není [520]. RTázová doména tohoto enzymu, Lef-4(1-236), sice patří do skupiny RTáz závislých na aktivaci dvojmocnými kationty, ale neobsahuje 2 paralelní tunely. Předpokládá se, že patří do obdobné skupiny jako RTáza viru vakcinie [521]. Mutační analýzy odhalily esenciální aminokyseliny na pozicích Glu<sup>9</sup>, Glu<sup>11</sup>, Arg<sup>51</sup>, Arg<sup>53</sup>, Glu<sup>97</sup>, Lys<sup>126</sup>, Arg<sup>179</sup>, Glu<sup>181</sup>, Glu<sup>183</sup> [521, 522].

GTázová doména Lef-4(237-464) proteinu je lokalizovaná v jeho C-koncové oblasti. V její proteinové sekvenci bylo nalezeno 6 konzervovaných motivů charakteristických pro rodinu mononukleotidyltransferáz včetně esenciálního lysinu (Lys<sup>255</sup>), který vytváří kovalentní spojení s GMP [519, 523].

MTázová aktivita zatím popsána nebyla. Nicméně byla popsána metyltransferázová aktivita vedoucí k syntéze čepičky typu 1, která se vyskytuje u většiny bakulovirových pozdních mRNA. Aktivita této metyltransferázy je závislá na přítomnosti metylované čepičky typu 0 [524]. Dá se tedy předpokládat, že MTázová aktivita bude u bakulovirů přítomna.

#### **Virus vezikulární stomatitidy (*Rhabdoviridae*)**

Virus vezikulární stomatitidy (VSV), u něhož byl popsán mechanismus syntézy čepičky typu 2, patří mezi nesegmentované „-RNA“ viry s genomem o délce 11161 bp. VSV kóduje 5 genů [189, 525]. Hlavním proteinem zodpovědným za syntézu virových mRNA je protein L (2109 aminokyselin), který obsahuje RNA dependentní RNA polymerázovou aktivitu [526], 3' polyadenylační aktivitu [527] a všechny aktivity nezbytné k syntéze čepičky na 5' konci, tj. RNA:GDP polyribonukleotidyltransferázovou aktivitu, guanozin-5'-trifosfatázovou aktivitu a

metyltransferázovou aktivitu [202, 205]. Protein L se vyskytuje v komplexu s proteinem P (30 kDa), který je pravděpodobně zodpovědný za správné složení proteinu L [525].

V proteinu L zatím nebyly experimentálně ověřeny oblasti zodpovědné za syntézu čepičky. Výjimku tvoří identifikování oblastí zodpovědných za metylaci čepičky. Aminokyseliny 1643-1843 proteinu L (doména VI) vykazují sekvenční podobnost s bakteriální FtsJ/RrmJ 2'-*O*-ribózometyltransferázou. Tato doména obsahuje pravděpodobně vazebné místo pro AdoMet. Mutace esenciálních aminokyselin Asp<sup>1671</sup>Val a Gly<sup>1672</sup>Ala vede k naprosté inhibici metylace N<sup>7</sup>-guanozinu i metylace na 2'-*O*-adenozinu [205, 528, 529]. Mutace v blízkém okolí AdoMet vazebného místa ovlivňují různým způsobem účinnost metylace N<sup>7</sup>-guanozinu, resp. 2'-*O*-adenozinu [205, 529]. Mutace aminokyselin v oblasti 1450-1481 vedou k úplnému potlačení metylace na N<sup>7</sup>-guanozinu, zatímco metylace na 2'-*O*-adenozinu je potlačena z necelých 90 %. To vše může vést k závěru, že každá metylace na 5' čepičce je katalyzována jinou oblastí proteinu L, nicméně na L proteinu se vyskytuje pouze jedno S-adenozyl-L-methionin vazebné místo [205, 529, 530]. Tomu odpovídá i zjištění počítačové analýzy, že doména VI je spojena s metylací 2'-*O*-adenozinu, ale nikoliv s metylací N<sup>7</sup>-guanozinu [201, 531]. Počítačové analýze naproti tomu odporuje experimentálně zjištěný fakt, že u jiného nesegmentovaného viru (*Sendai* virus, *Paramyxoviridae*) vykazuje C-koncová část L proteinu, obsahující pouze doménu VI, N<sup>7</sup>-guanozinmetyltransferázovou ale nikoliv 2'-*O*-adenozinmetyltransferázovou aktivitu [532]. Dalším otazníkem je pořadí, v jakém dochází k přidání metylů na čepičku. V současné době jsou k dispozici data podporující obě možnosti. Buď se nejdříve metyluje N<sup>7</sup>-guanozin [533, 534], nebo se nejdříve metyluje 2'-*O*-adenozin [530, 535]. Nedávno bylo zjištěno, že sinefungin, přirozený analog S-adenozyl-L-methioninu, je schopen inhibovat metyltransferázové aktivity L proteinu, přičemž k jeho účinku je citlivější metylace na N<sup>7</sup>-guanozinu než na 2'-*O*-adenozinu [536].

*Capping* enzym VSV rozeznává a opatřuje čepičkou pouze sekvenci pppApApCpApG (5' konsensus sekvence všech VSV mRNA), nikoliv však sekvenci ppApApCpApG (difosforylovaná forma téhož), ani pppApCpGpApA sekvenci (RNA startovací sekvence VSV). Podrobnější analýzy prokázaly, že L protein velmi ochotně přidává čepičku na mRNA obsahující na svém 5' konci sekvence APuCNG [202], což je sekvence vyskytující se na 5' konci mRNA sekvencí u většiny rhabdovirů [537-539]. U ostatních nesegmentovaných „-RNA“ virů (např. *Paramyxoviridae*, *Filoviridae*, *Bornaviridae*) je konsensus sekvence na 5' konci mRNA odlišná [540], nicméně i u těchto virů se předpokládá, že jejich L protein

specificky rozeznává trifosforylovaný 5' konec vlastní mRNA, na který následně přidá metylovanou čepičku [202].

## 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.

## VI. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. Lederberg, J., *Cell genetics and hereditary symbiosis*. Physiol Rev, 1952. **32**(4): p. 403-30.
2. Sinclair, J.H., et al., *Mitochondrial-satellite and circular DNA filaments in yeast*. Science, 1967. **156**(779): p. 1234-7.
3. Stahl, U., et al., *Evidence for plasmid like DNA in a filamentous fungus, the ascomycete Podospora anserina*. Mol Gen Genet, 1978. **162**(3): p. 341-3.
4. Toh-e, A. and I. Utatsu, *Physical and functional structure of a yeast plasmid, pSB3, isolated from Zygosaccharomyces bisporus*. Nucleic Acids Res, 1985. **13**(12): p. 4267-83.
5. Falcone, C., et al., *Analysis of a 1.6-micron circular plasmid from the yeast Kluyveromyces drosophilae: structure and molecular dimorphism*. Plasmid, 1986. **15**(3): p. 248-52.
6. Pring, D.R., et al., *Unique DNA associated with mitochondria in the "S"-type cytoplasm of male-sterile maize*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1977. **74**(7): p. 2904-2908.
7. Meinhardt, F., et al., *Linear plasmids among eukaryotes: fundamentals and application*. Curr Genet, 1990. **17**(2): p. 89-95.
8. Meinhardt, F., R. Schaffrath, and M. Larsen, *Microbial linear plasmids*. Appl Microbiol Biotechnol, 1997. **47**(4): p. 329-36.
9. Griffiths, A.J., *Natural plasmids of filamentous fungi*. Microbiol Rev, 1995. **59**(4): p. 673-85.
10. Sakaguchi, K., *Invertrons, a class of structurally and functionally related genetic elements that includes linear DNA plasmids, transposable elements, and genomes of adeno-type viruses*. Microbiol Rev, 1990. **54**(1): p. 66-74.
11. Volkert, F.C., D.W. Wilson, and J.R. Broach, *Deoxyribonucleic acid plasmids in yeasts*. Microbiol Rev, 1989. **53**(3): p. 299-317.
12. Gunge, N., et al., *Isolation and characterization of linear deoxyribonucleic acid plasmids from Kluyveromyces lactis and the plasmid-associated killer character*. J Bacteriol, 1981. **145**(1): p. 382-90.
13. Fukuhara, H., *Linear DNA plasmids of yeasts*. FEMS Microbiol Lett, 1995. **131**(1): p. 1-9.
14. Gunge, N. and M. Tokunaga, *Linear DNA plasmids and killer system of Kluyveromyces lactis*. In: Kück U (ed) The Mycota II, Genetics and biotechnology (2nd ed), Springer-Verlag Berlin, 2004: p. 199-217.
15. Kempken, F., J. Hermanns, and H.D. Osiewacz, *Evolution of linear plasmids*. J Mol Evol, 1992. **35**(6): p. 502-13.
16. Braithwaite, D.K. and J. Ito, *Compilation, alignment, and phylogenetic relationships of DNA polymerases*. Nucleic Acids Res, 1993. **21**(4): p. 787-802.
17. Rohe, M., et al., *Phylogenetic relationships of linear, protein-primed replicating genomes*. Curr Genet, 1992. **21**(2): p. 173-6.
18. Klassen, R. and F. Meinhardt, *Structural and functional analysis of the killer element pPin1-3 from Pichia inositolovora*. Mol Genet Genomics, 2003. **270**(2): p. 190-9.
19. Klassen, R., et al., *Genome organization of the linear cytoplasmic element pPE1B from Pichia etchellsii*. Yeast, 2001. **18**(10): p. 953-61.
20. Meinhardt, F. and R. Schaffrath, *Extranuclear inheritance: cytoplasmic linear doublestranded DNA killer elements of the dairy yeast Kluyveromyces lactis*. In: Esser K, Lüttge U, Kadereit JW, Beyschlag W (eds) Progress in Botany, Springer-Verlag Berlin, 2001. **62**: p. 51-70.
21. Gunge, N., et al., *UV hypersensitivity of yeast linear plasmids*. Curr Genet, 1994. **26**(4): p. 369-73.
22. Gunge, N., K. Murata, and K. Sakaguchi, *Transformation of Saccharomyces cerevisiae with linear DNA killer plasmids from Kluyveromyces lactis*. J Bacteriol, 1982. **151**(1): p. 462-4.
23. Stam, J.C., et al., *Efficient isolation of the linear DNA killer plasmid of Kluyveromyces lactis: evidence for location and expression in the cytoplasm and characterization of their terminally bound proteins*. Nucleic Acids Res, 1986. **14**(17): p. 6871-84.
24. Romanos, M.A. and A. Boyd, *A transcriptional barrier to expression of cloned toxin genes of the linear plasmid kI of Kluyveromyces lactis: evidence that native kI has novel promoters*. Nucleic Acids Res, 1988. **16**(15): p. 7333-50.
25. Kamper, J., et al., *Heterologous gene expression on the linear DNA killer plasmid from Kluyveromyces lactis*. Curr Genet, 1991. **19**(2): p. 109-18.
26. Kamper, J., et al., *New recombinant linear DNA-elements derived from Kluyveromyces lactis killer plasmids*. Nucleic Acids Res, 1989. **17**(4): p. 1781.
27. Wilson, D.W. and P.A. Meacock, *Extranuclear gene expression in yeast: evidence for a plasmid-encoded RNA polymerase of unique structure*. Nucleic Acids Res, 1988. **16**(16): p. 8097-112.
28. Gunge, N., *Yeast DNA plasmids*. Annu Rev Microbiol, 1983. **37**: p. 253-76.
29. Niwa, O., K. Sakaguchi, and N. Gunge, *Curing of the killer deoxyribonucleic acid plasmids of Kluyveromyces lactis*. J Bacteriol, 1981. **148**(3): p. 988-90.

30. Cong, Y.S., et al., *Linear DNA plasmids from Pichia etchellsii, Debaryomyces hansenii and Wingea robertsiae*. Microbiology, 1994. **140** ( Pt 6): p. 1327-35.
31. Wésolowski, M., et al., *Killer DNA Plasmids of the Yeast Kluyveromyces lactis. I. Mutations affecting the killer phenotype*. Curr Genet, 1982. **5**(3): p. 191-197.
32. Gunge, N., *Linear DNA killer plasmids from the yeast Kluyveromyces*. Yeast, 1986. **2**(3): p. 153-62.
33. Gunge, N. and K. Sakaguchi, *Intergeneric transfer of deoxyribonucleic acid killer plasmids, pGKL1 and pGKL2, from Kluyveromyces lactis into Saccharomyces cerevisiae by cell fusion*. J Bacteriol, 1981. **147**(1): p. 155-60.
34. de Louvencourt, L., et al., *Transformation of Kluyveromyces lactis by killer plasmid DNA*. J Bacteriol, 1983. **154**(2): p. 737-42.
35. Kikuchi, Y., et al., *Hairpin plasmid--a novel linear DNA of perfect hairpin structure*. Embo J, 1985. **4**(7): p. 1881-6.
36. Gunge, N. and C. Yamane, *Incompatibility of linear DNA killer plasmids pGKL1 and pGKL2 from Kluyveromyces lactis with mitochondrial DNA from Saccharomyces cerevisiae*. J Bacteriol, 1984. **159**(2): p. 533-9.
37. Sugisaki, Y., et al., *Transfer of DNA killer plasmids from Kluyveromyces lactis to Kluyveromyces fragilis and Candida pseudotropicalis*. J Bacteriol, 1985. **164**(3): p. 1373-5.
38. Kamper, J., et al., *In vivo construction of linear vectors based on killer plasmids from Kluyveromyces lactis: selection of a nuclear gene results in attachment of telomeres*. Mol Cell Biol, 1989. **9**(9): p. 3931-7.
39. Fujimura, H., F. Hishinuma, and N. Gunge, *Terminal segment of Kluyveromyces lactis linear DNA plasmid pGKL2 supports autonomous replication of hybrid plasmids in Saccharomyces cerevisiae*. Curr Genet, 1987. **12**(2): p. 99-104.
40. Takata, H. and N. Gunge, *Progressive alteration of telomeric sequences at one end of a yeast linear plasmid and its possible association with reduced plasmid stability*. Mol Genet Genomics, 2001. **266**(4): p. 686-94.
41. Gunge, N., et al., *Relocation of a cytoplasmic yeast linear plasmid to the nucleus is associated with circularization via nonhomologous recombination involving inverted terminal repeats*. Mol Gen Genet, 2000. **263**(5): p. 846-53.
42. Takata, H., et al., *Telomere sequences attached to nuclearly migrated yeast linear plasmid*. Plasmid, 2000. **43**(2): p. 137-43.
43. Gunge, N., et al., *Migration of the yeast linear DNA plasmid from the cytoplasm into the nucleus in Saccharomyces cerevisiae*. Curr Genet, 1995. **28**(3): p. 280-8.
44. Gunge, N., et al., *Progressive Rearrangement of Telomeric Sequences Added to Both the ITR Ends of the Yeast Linear pGKL Plasmid*. Biol Proced Online, 2003. **5**: p. 29-42.
45. Schaffrath, R., et al., *Kluyveromyces lactis killer system: ORF1 of pGKL2 has no function in immunity expression and is dispensable for killer plasmid replication and maintenance*. Curr Genet, 1992. **21**(4-5): p. 357-63.
46. Schaffrath, R., F. Meinhardt, and P.A. Meacock, *Genetic manipulation of Kluyveromyces lactis linear DNA plasmids: gene targeting and plasmid shuffles*. FEMS Microbiol Lett, 1999. **178**(2): p. 201-10.
47. Meinhardt, F., et al., *A novel approach to express a heterologous gene on Kluyveromyces lactis linear killer plasmids: expression of the bacterial aph gene from a cytoplasmic promoter fragment without in-phase fusion to the plasmid open reading frame*. Plasmid, 1994. **32**(3): p. 318-27.
48. Schaffrath, R., S.M. Soond, and P.A. Meacock, *The DNA and RNA polymerase genes of yeast plasmid pGKL2 are essential loci for plasmid integrity and maintenance*. Microbiology, 1995. **141** ( Pt 10): p. 2591-9.
49. Schaffrath, R., F. Meinhardt, and P.A. Meacock, *Yeast killer plasmid pGKL2: molecular analysis of UCS5, a cytoplasmic promoter element essential for ORF5 gene function*. Mol Gen Genet, 1996. **250**(3): p. 286-94.
50. Schaffrath, R., K. Sasnauskas, and P.A. Meacock, *Use of gene shuffles to study the cytoplasmic transcription system operating on Kluyveromyces lactis linear DNA plasmids*. Enzyme Microb Technol, 2000. **26**(9-10): p. 664-670.
51. Tanguy-Rougeau, C., et al., *Expression of a foreign KmR gene in linear killer DNA plasmids in yeast*. Gene, 1990. **91**(1): p. 43-50.
52. Larsen, M., N. Gunge, and F. Meinhardt, *Kluyveromyces lactis killer plasmid pGKL2: evidence for a viral-like capping enzyme encoded by ORF3*. Plasmid, 1998. **40**(3): p. 243-6.
53. Schaffrath, R. and P.A. Meacock, *Kluyveromyces lactis killer plasmid pGKL2: molecular analysis of an essential gene, ORF5*. Yeast, 1995. **11**(7): p. 615-28.

54. Jeske, S., M. Tiggemann, and F. Meinhardt, *Yeast autonomous linear plasmid pGKL2: ORF9 is an actively transcribed essential gene with multiple transcription start points*. FEMS Microbiol Lett, 2006. **255**(2): p. 321-7.
55. Schaffrath, R., F. Meinhardt, and P.A. Meacock, *ORF7 of yeast plasmid pGKL2: analysis of gene expression in vivo*. Curr Genet, 1997. **31**(2): p. 190-2.
56. Schaffrath, R., *Genetic manipulation of the Kluyveromyces lactis killer plasmids k1 and k2*. In: Wolf K, Breunig KD, Barth G (eds) Non-conventional yeasts in genetics, biochemistry and biotechnology, Springer-Verlag Berlin, 2003: p. 185-190.
57. Schaffrath, R. and P.A. Meacock, *A cytoplasmic gene-shuffle system in Kluyveromyces lactis: use of epitope tagging to detect a killer plasmid-encoded gene product*. Mol Microbiol, 1996. **19**(3): p. 545-54.
58. Sor, F. and H. Fukuhara, *Structure of a linear plasmid of the yeast Kluyveromyces lactis; Compact organization of the killer genome*. Curr Genet, 1985. **9**(2): p. 147-155.
59. Hishinuma, F., et al., *Cloning and nucleotide sequences of the linear DNA killer plasmids from yeast*. Nucleic Acids Res, 1984. **12**(19): p. 7581-97.
60. Stark, M.J., et al., *Nucleotide sequence and transcription analysis of a linear DNA plasmid associated with the killer character of the yeast Kluyveromyces lactis*. Nucleic Acids Res, 1984. **12**(15): p. 6011-30.
61. Stark, M.J., *Resolution of sequence discrepancies in the ORF1 region of the Kluyveromyces lactis plasmid k1*. Nucleic Acids Res, 1988. **16**(2): p. 771.
62. Sor, F., M. Wesolowski, and H. Fukuhara, *Inverted terminal repetitions of the two linear DNA associated with the killer character of the yeast Kluyveromyces lactis*. Nucleic Acids Res, 1983. **11**(15): p. 5037-44.
63. Kikuchi, Y., K. Hirai, and F. Hishinuma, *The yeast linear DNA killer plasmids, pGKL1 and pGKL2, possess terminally attached proteins*. Nucleic Acids Res, 1984. **12**(14): p. 5685-92.
64. Stark, M.J., et al., *The plasmid-encoded killer system of Kluyveromyces lactis: a review*. Yeast, 1990. **6**(1): p. 1-29.
65. Jung, G.H., M.C. Leavitt, and J. Ito, *Yeast killer plasmid pGKL1 encodes a DNA polymerase belonging to the family B DNA polymerases*. Nucleic Acids Res, 1987. **15**(21): p. 9088.
66. Fukuhara, H., *The RF1 gene of the killer DNA of yeast may encode a DNA polymerase*. Nucleic Acids Res, 1987. **15**(23): p. 10046.
67. Kitada, K. and N. Gunge, *Palindrome-hairpin linear plasmids possessing only a part of the ORF1 gene of the yeast killer plasmid pGKL1*. Mol Gen Genet, 1988. **215**(1): p. 46-52.
68. Wésolowski, M., P. Dumazert, and H. Fukuhara, *Killer DNA Plasmids of the Yeast Kluyveromyces lactis. II. Restriction Endonuclease Maps*. Curr Genet, 1982. **5**(3): p. 199-203.
69. Chen, X.J., et al., *Promoter activity associated with the left inverted terminal repeat of the killer plasmid k1 from yeast*. Biochimie, 1991. **73**(9): p. 1195-203.
70. Stark, M.J. and A. Boyd, *The killer toxin of Kluyveromyces lactis: characterization of the toxin subunits and identification of the genes which encode them*. Embo J, 1986. **5**(8): p. 1995-2002.
71. Tokunaga, M., N. Wada, and F. Hishinuma, *Expression and identification of immunity determinants on linear DNA killer plasmids pGKL1 and pGKL2 in Kluyveromyces lactis*. Nucleic Acids Res, 1987. **15**(3): p. 1031-46.
72. Schaffrath, R. and F. Meinhardt, *Kluyveromyces lactis zymocin and other plasmid-encoded yeast killer toxins*. Topics in Current Genetics, 2005. **11**(2005): p. 133-155.
73. Tommasino, M., S. Ricci, and C.L. Galeotti, *Genome organization of the killer plasmid pGK12 from Kluyveromyces lactis*. Nucleic Acids Res, 1988. **16**(13): p. 5863-78.
74. Larsen, M. and F. Meinhardt, *Kluyveromyces lactis killer system: identification of a new gene encoded by pGKL2*. Curr Genet, 2000. **38**(5): p. 271-5.
75. Takeda, M., et al., *The terminal protein of the linear DNA plasmid pGKL2 shares an N-terminal domain of the plasmid-encoded DNA polymerase*. Yeast, 1996. **12**(3): p. 241-6.
76. Salas, M., et al., *Protein-nucleic acid interactions in bacteriophage phi 29 DNA replication*. FEMS Microbiol Rev, 1995. **17**(1-2): p. 73-82.
77. Salas, M., *Protein-priming of DNA replication*. Annu Rev Biochem, 1991. **60**: p. 39-71.
78. Liu, H., J.H. Naismith, and R.T. Hay, *Adenovirus DNA replication*. Curr Top Microbiol Immunol, 2003. **272**: p. 131-64.
79. Tiggemann, M., et al., *Kluyveromyces lactis cytoplasmic plasmid pGKL2: heterologous expression of Orf3p and proof of guanylyltransferase and mRNA-triphosphatase activities*. Yeast, 2001. **18**(9): p. 815-25.

80. McNeel, D.G. and F. Tamanoi, *Terminal region recognition factor 1, a DNA-binding protein recognizing the inverted terminal repeats of the pGKI linear DNA plasmids*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(24): p. 11398-402.
81. Tommasino, M., *Killer system of Kluyveromyces lactis: the open reading frame 10 of the pGK12 plasmid encodes a putative DNA binding protein*. Yeast, 1991. **7**(3): p. 245-52.
82. de Jong, R.N., P.C. van der Vliet, and A.B. Brenkman, *Adenovirus DNA replication: protein priming, jumping back and the role of the DNA binding protein DBP*. Curr Top Microbiol Immunol, 2003. **272**: p. 187-211.
83. Chan, B.S., et al., *The kalilo linear senescence-inducing plasmid of Neurospora is an invertron and encodes DNA and RNA polymerases*. Curr Genet, 1991. **20**(3): p. 225-37.
84. Gunge, N., et al., *Mating type locus-dependent stability of the Kluyveromyces linear pGKL plasmids in Saccharomyces cerevisiae*. Yeast, 1990. **6**(5): p. 417-27.
85. Schickel, J., C. Helmig, and F. Meinhardt, *Kluyveromyces lactis killer system: analysis of cytoplasmic promoters of the linear plasmids*. Nucleic Acids Res, 1996. **24**(10): p. 1879-86.
86. Jeske, S. and F. Meinhardt, *Autonomous cytoplasmic linear plasmid pPac1-1 of Pichia acaciae: molecular structure and expression studies*. Yeast, 2006. **23**(6): p. 479-86.
87. Schrunder, J., N. Gunge, and F. Meinhardt, *Extranuclear expression of the bacterial xylose isomerase (xylA) and the UDP-glucose dehydrogenase (hasB) genes in yeast with Kluyveromyces lactis linear killer plasmids as vectors*. Curr Microbiol, 1996. **33**(5): p. 323-30.
88. Schrunder, J. and F. Meinhardt, *An extranuclear expression system for analysis of cytoplasmic promoters of yeast linear killer plasmids*. Plasmid, 1995. **33**(2): p. 139-51.
89. Fukuda, K., et al., *The linear plasmid pDHL1 from Debaryomyces hansenii encodes a protein highly homologous to the pGKLI-plasmid DNA polymerase*. Yeast, 1997. **13**(7): p. 613-20.
90. Klassen, R., S. Teichert, and F. Meinhardt, *Novel yeast killer toxins provoke S-phase arrest and DNA damage checkpoint activation*. Mol Microbiol, 2004. **53**(1): p. 263-73.
91. Klassen, R., et al., *Genome organization of the linear Pichia etchellsii plasmid pPE1A: evidence for expression of an extracellular chitin-binding protein homologous to the alpha-subunit of the Kluyveromyces lactis killer toxin*. Plasmid, 2002. **47**(3): p. 224-33.
92. Sugisaki, Y., et al., *Characterization of a novel killer toxin encoded by a double-stranded linear DNA plasmid of Kluyveromyces lactis*. Eur J Biochem, 1984. **141**(2): p. 241-5.
93. Wesolowski-Louvel, M., C. Tanguy-Rougeau, and H. Fukuhara, *A nuclear gene required for the expression of the linear DNA-associated killer system in the yeast Kluyveromyces lactis*. Yeast, 1988. **4**(1): p. 71-81.
94. Tanguy-Rougeau, C., M. Wesolowski-Louvel, and H. Fukuhara, *The Kluyveromyces lactis KEX1 gene encodes a subtilisin-type serine proteinase*. FEBS Lett, 1988. **234**(2): p. 464-70.
95. Tokunaga, M., N. Wada, and F. Hishinuma, *A novel yeast secretion vector utilizing secretion signal of killer toxin encoded on the yeast linear DNA plasmid pGKLI*. Biochem Biophys Res Commun, 1987. **144**(2): p. 613-9.
96. Tokunaga, M., N. Wada, and F. Hishinuma, *A novel yeast secretion signal isolated from 28K killer precursor protein encoded on the linear DNA plasmid pGKLI*. Nucleic Acids Res, 1988. **16**(15): p. 7499-511.
97. Tokunaga, M., A. Kawamura, and F. Hishinuma, *Expression of pGKL killer 28K subunit in Saccharomyces cerevisiae: identification of 28K subunit as a killer protein*. Nucleic Acids Res, 1989. **17**(9): p. 3435-46.
98. Wilson, C. and P.A. Whittaker, *Factors Affecting Activity and Stability of the Kluyveromyces lactis Killer Toxin*. Appl Environ Microbiol, 1989. **55**(3): p. 695-699.
99. Butler, A.R., J.H. White, and M.J. Stark, *Analysis of the response of Saccharomyces cerevisiae cells to Kluyveromyces lactis toxin*. J Gen Microbiol, 1991. **137**(7): p. 1749-57.
100. Klassen, R., et al., *Mating-type locus control of killer toxins from Kluyveromyces lactis and Pichia acaciae*. FEMS Yeast Res, 2006. **6**(3): p. 404-13.
101. Butler, A.R., M. Porter, and M.J. Stark, *Intracellular expression of Kluyveromyces lactis toxin gamma subunit mimics treatment with exogenous toxin and distinguishes two classes of toxin-resistant mutant*. Yeast, 1991. **7**(6): p. 617-25.
102. Frohloff, F., et al., *Saccharomyces cerevisiae Elongator mutations confer resistance to the Kluyveromyces lactis zymocin*. Embo J, 2001. **20**(8): p. 1993-2003.
103. Sugisaki, Y., et al., *Kluyveromyces lactis killer toxin inhibits adenylate cyclase of sensitive yeast cells*. Nature, 1983. **304**(5925): p. 464-6.
104. White, J., A. Butler, and M. Stark, *Kluyveromyces lactis toxin does not inhibit yeast adenylate cyclase*. Nature, 1989. **341**: p. 666 - 668

105. Schaffrath, R. and K.D. Breunig, *Genetics and molecular physiology of the yeast Kluyveromyces lactis*. Fungal Genet Biol, 2000. **30**(3): p. 173-90.
106. Butler, A.R., et al., *Two Saccharomyces cerevisiae genes which control sensitivity to G1 arrest induced by Kluyveromyces lactis toxin*. Mol Cell Biol, 1994. **14**(9): p. 6306-16.
107. Kawamoto, S., et al., *A mutant allele skt5 affecting protoplast regeneration and killer toxin resistance has double mutations in its wild-type structural gene in Saccharomyces cerevisiae*. Biosci Biotechnol Biochem, 1993. **57**(8): p. 1391-3.
108. Kawamoto, S., et al., *Isolation and characterization of mutants of Saccharomyces cerevisiae Resistant to Killer Toxin of Kluyveromyces lactis*. Journal of fermentation and bioengineering, 1990. **70**(4): p. 222-227.
109. Kishida, M., et al., *Isolation and genetic characterization of pGKL killer-insensitive mutants (iki) from Saccharomyces cerevisiae*. Biosci Biotechnol Biochem, 1996. **60**(5): p. 798-801.
110. Yajima, H., et al., *Characterization of IK11 and IK13 genes conferring pGKL killer sensitivity on Saccharomyces cerevisiae*. Biosci Biotechnol Biochem, 1997. **61**(4): p. 704-9.
111. Schaffrath, R., M. Stark, and K. Struhl, *Toxin-mediated cell cycle arrest in yeast: the killer phenomenon of Kluyveromyces lactis*. Bioforum Int, 1997. **1**: p. 83-85.
112. Jablonowski, D., et al., *Saccharomyces cerevisiae cell wall chitin, the Kluyveromyces lactis zymocin receptor*. Yeast, 2001. **18**(14): p. 1285-99.
113. Kawamoto, S., M. Nomura, and T. Ohno, *Cloning and characterization of SKT5, a Saccharomyces cerevisiae gene that affects protoplast regeneration and resistance to killer toxin of Kluyveromyces lactis*. Journal of fermentation and bioengineering, 1992. **74**(4): p. 199-208.
114. Mehlgarten, C. and R. Schaffrath, *After chitin docking, toxicity of Kluyveromyces lactis zymocin requires Saccharomyces cerevisiae plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase*. Cell Microbiol, 2004. **6**(6): p. 569-80.
115. Zink, S., et al., *Mannosyl-diinositolphospho-ceramide, the major yeast plasma membrane sphingolipid, governs toxicity of Kluyveromyces lactis zymocin*. Eukaryot Cell, 2005. **4**(5): p. 879-89.
116. Huang, B., M.J. Johansson, and A.S. Bystrom, *An early step in wobble uridine tRNA modification requires the Elongator complex*. Rna, 2005. **11**(4): p. 424-36.
117. Frohloff, F., et al., *Subunit communications crucial for the functional integrity of the yeast RNA polymerase II elongator (gamma-toxin target (TOT)) complex*. J Biol Chem, 2003. **278**(2): p. 956-61.
118. Fichtner, L. and R. Schaffrath, *KTI11 and KTI13, Saccharomyces cerevisiae genes controlling sensitivity to G1 arrest induced by Kluyveromyces lactis zymocin*. Mol Microbiol, 2002. **44**(3): p. 865-75.
119. Fichtner, L., et al., *Protein interactions within Saccharomyces cerevisiae Elongator, a complex essential for Kluyveromyces lactis zymocin toxicity*. Mol Microbiol, 2002. **45**(3): p. 817-26.
120. Jablonowski, D., et al., *Kluyveromyces lactis zymocin mode of action is linked to RNA polymerase II function via Elongator*. Mol Microbiol, 2001. **42**(4): p. 1095-105.
121. Jablonowski, D., et al., *tRNAGlu wobble uridine methylation by Trm9 identifies Elongator's key role for zymocin-induced cell death in yeast*. Mol Microbiol, 2006. **59**(2): p. 677-88.
122. Mehlgarten, C. and R. Schaffrath, *Mutant casein kinase I (Hrr25p/Kti14p) abrogates the G1 cell cycle arrest induced by Kluyveromyces lactis zymocin in budding yeast*. Mol Genet Genomics, 2003. **269**(2): p. 188-96.
123. Jablonowski, D., et al., *The yeast elongator histone acetylase requires Sit4-dependent dephosphorylation for toxin-target capacity*. Mol Biol Cell, 2004. **15**(3): p. 1459-69.
124. Jablonowski, D., et al., *Sit4p protein phosphatase is required for sensitivity of Saccharomyces cerevisiae to Kluyveromyces lactis zymocin*. Genetics, 2001. **159**(4): p. 1479-89.
125. Fichtner, L., et al., *Elongator's toxin-target (TOT) function is nuclear localization sequence dependent and suppressed by post-translational modification*. Mol Microbiol, 2003. **49**(5): p. 1297-307.
126. Butler, A.R., et al., *Kluyveromyces lactis toxin has an essential chitinase activity*. Eur J Biochem, 1991. **199**(2): p. 483-8.
127. Takita, M.A. and B. Castilho-Valavicius, *Absence of cell wall chitin in Saccharomyces cerevisiae leads to resistance to Kluyveromyces lactis killer toxin*. Yeast, 1993. **9**(6): p. 589-98.
128. Terwisscha van Scheltinga, A.C., et al., *Stereochemistry of chitin hydrolysis by a plant chitinase/lysozyme and X-ray structure of a complex with allosamidin: evidence for substrate assisted catalysis*. Biochemistry, 1995. **34**(48): p. 15619-23.
129. Jablonowski, D., et al., *Chitin binding capability of the zymocin complex from Kluyveromyces lactis*. In: Wolf K, Breunig KD, Barth G (eds) Non-conventional yeasts in genetics, biochemistry and biotechnology, Springer-Verlag Berlin, 2003: p. 191-194.
130. Otero, G., et al., *Elongator, a multisubunit component of a novel RNA polymerase II holoenzyme for transcriptional elongation*. Mol Cell, 1999. **3**(1): p. 109-18.

131. Krogan, N.J. and J.F. Greenblatt, *Characterization of a six-subunit holo-elongator complex required for the regulated expression of a group of genes in Saccharomyces cerevisiae*. Mol Cell Biol, 2001. **21**(23): p. 8203-12.
132. Winkler, G.S., et al., *RNA polymerase II elongator holoenzyme is composed of two discrete subcomplexes*. J Biol Chem, 2001. **276**(35): p. 32743-9.
133. Wittschieben, B.O., et al., *A novel histone acetyltransferase is an integral subunit of elongating RNA polymerase II holoenzyme*. Mol Cell, 1999. **4**(1): p. 123-8.
134. Winkler, G.S., et al., *Elongator is a histone H3 and H4 acetyltransferase important for normal histone acetylation levels in vivo*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(6): p. 3517-22.
135. Rahl, P.B., C.Z. Chen, and R.N. Collins, *Elp1p, the yeast homolog of the FD disease syndrome protein, negatively regulates exocytosis independently of transcriptional elongation*. Mol Cell, 2005. **17**(6): p. 841-53.
136. Kitamoto, H.K., et al., *Defects in yeast RNA polymerase II transcription elicit hypersensitivity to G1 arrest induced by Kluyveromyces lactis zymocin*. Mol Genet Genomics, 2002. **268**(1): p. 49-55.
137. Fichtner, L., et al., *Molecular analysis of KTI12/TOT4, a Saccharomyces cerevisiae gene required for Kluyveromyces lactis zymocin action*. Mol Microbiol, 2002. **43**(3): p. 783-91.
138. Lu, J., et al., *The Kluyveromyces lactis gamma-toxin targets tRNA anticodons*. Rna, 2005. **11**(11): p. 1648-54.
139. Trotta, C.R., et al., *The yeast tRNA splicing endonuclease: a tetrameric enzyme with two active site subunits homologous to the archaeal tRNA endonucleases*. Cell, 1997. **89**(6): p. 849-58.
140. Jiang, Y., et al., *Structural features of tRNALys favored by anticodon nuclease as inferred from reactivities of anticodon stem and loop substrate analogs*. J Biol Chem, 2002. **277**(6): p. 3836-41.
141. Jiang, Y., et al., *Specific interaction between anticodon nuclease and the tRNA(Lys) wobble base*. J Mol Biol, 2001. **305**(3): p. 377-88.
142. Tomita, K., et al., *A cytotoxic ribonuclease which specifically cleaves four isoaccepting arginine tRNAs at their anticodon loops*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(15): p. 8278-83.
143. Ogawa, T., et al., *A cytotoxic ribonuclease targeting specific transfer RNA anticodons*. Science, 1999. **283**(5410): p. 2097-100.
144. Bonekamp, F. and J. Oosterom, *On the safety of Kluyveromyces lactis - a review* Appl Microbiol Biotechnol, 1994. **41**(1): p. 1-3.
145. Yap, N.A., et al., *The incidence of killer activity of non-Saccharomyces yeasts towards indigenous yeast species of grape must: potential application in wine fermentation*. J Appl Microbiol, 2000. **89**(3): p. 381-9.
146. Kitamoto, H.K., S. Ohmomo, and T. Nakahara, *Selection of killer yeasts (Kluyveromyces lactis) to prevent aerobic deterioration in silage making*. J Dairy Sci, 1993. **76**(3): p. 803-11.
147. Kitamoto, H.K., et al., *Prevention of aerobic spoilage of maize silage by a genetically modified killer yeast, Kluyveromyces lactis, defective in the ability to grow on lactic acid*. Appl Environ Microbiol, 1999. **65**(10): p. 4697-700.
148. Kitamoto, H.K., S. Ohmomo, and Y. Iimura, *Isolation and nucleotide sequence of the gene encoding phosphoenolpyruvate carboxykinase from Kluyveromyces lactis*. Yeast, 1998. **14**(10): p. 963-7.
149. Bennett, A.M., et al., *Replication of a linear mini-chromosome with terminal inverted repeats from the Kluyveromyces lactis linear DNA plasmid k2 in the cytoplasm of Saccharomyces cerevisiae*. Plasmid, 2002. **48**(1): p. 13-23.
150. Durand, R., C. Rasclé, and M. Fevre, *Expression of a catalytic domain of a Neocallimastix frontalis endoxylanase gene (xyn3) in Kluyveromyces lactis and Penicillium roqueforti*. Appl Microbiol Biotechnol, 1999. **52**(2): p. 208-14.
151. Bergquist, P., et al., *Expression of xylanase enzymes from thermophilic microorganisms in fungal hosts*. Extremophiles, 2002. **6**(3): p. 177-84.
152. Lodi, T., B. Neglia, and C. Donnini, *Secretion of human serum albumin by Kluyveromyces lactis overexpressing KIPDII and KIEROI*. Appl Environ Microbiol, 2005. **71**(8): p. 4359-63.
153. Lee, J., et al., *Novel secretion system of recombinant Saccharomyces cerevisiae using an N-terminus residue of human IL-1 beta as secretion enhancer*. Biotechnol Prog, 1999. **15**(5): p. 884-90.
154. Piscitelli, A., et al., *Recombinant expression of Pleurotus ostreatus laccases in Kluyveromyces lactis and Saccharomyces cerevisiae*. Appl Microbiol Biotechnol, 2005. **69**(4): p. 428-39.
155. Saliola, M., et al., *Use of the KIADH4 promoter for ethanol-dependent production of recombinant human serum albumin in Kluyveromyces lactis*. Appl Environ Microbiol, 1999. **65**(1): p. 53-60.
156. Walsh, D.J. and P.L. Bergquist, *Expression and secretion of a thermostable bacterial xylanase in Kluyveromyces lactis*. Appl Environ Microbiol, 1997. **63**(8): p. 3297-300.
157. Walsh, D.J., M.D. Gibbs, and P.L. Bergquist, *Expression and secretion of a xylanase from the extreme thermophile, thermotoga strain FjSS3B.1, in Kluyveromyces lactis*. Extremophiles, 1998. **2**(1): p. 9-14.

158. Fler, R., *Engineering yeast for high level expression*. Curr Opin Biotechnol, 1992. **3**(5): p. 486-96.
159. Fler, R., et al., *High-level secretion of correctly processed recombinant human interleukin-1 beta in Kluyveromyces lactis*. Gene, 1991. **107**(2): p. 285-95.
160. Tokunaga, M., et al., *Secretion of mouse alpha-amylase from Kluyveromyces lactis*. Yeast, 1997. **13**(8): p. 699-706.
161. Tokunaga, M., et al., *Purification and determination of the NH<sub>2</sub>-terminal amino acid sequence of mouse alpha-amylase secreted from Saccharomyces cerevisiae: correct processing of the secretion signal from pGKL killer 28 kDa precursor protein*. Biochim Biophys Acta, 1991. **1080**(2): p. 135-7.
162. Tokunaga, M., et al., *Structure of yeast pGKL 128-kDa killer-toxin secretion signal sequence. Processing of the 128-kDa killer-toxin-secretion-signal-alpha-amylase fusion protein*. Eur J Biochem, 1992. **203**(3): p. 415-23.
163. Mustilli, A.C., et al., *Comparison of secretion of a hepatitis C virus glycoprotein in Saccharomyces cerevisiae and Kluyveromyces lactis*. Res Microbiol, 1999. **150**(3): p. 179-87.
164. Hayman, G.T. and P.L. Bolen, *Linear DNA plasmids of Pichia inositovora are associated with a novel killer toxin activity*. Curr Genet, 1991. **19**(5): p. 389-93.
165. Banerjee, H., C. Kopvak, and D. Curley, *Identification of linear DNA plasmids of the yeast Pichia pastoris*. Plasmid, 1998. **40**(1): p. 58-60.
166. Banerjee, H. and M. Verma, *Search for a novel killer toxin in yeast Pichia pastoris*. Plasmid, 2000. **43**(2): p. 181-3.
167. Worsham, P.L. and P.L. Bolen, *Killer toxin production in Pichia acaciae is associated with linear DNA plasmids*. Curr Genet, 1990. **18**(1): p. 77-80.
168. Bolen, P.L., et al., *Isolation and sequence analysis of a gene from the linear DNA plasmid pPacl-2 of Pichia acaciae that shows similarity to a killer toxin gene of Kluyveromyces lactis*. Yeast, 1994. **10**(3): p. 403-14.
169. McCracken, D.A., et al., *The linear-plasmid-encoded toxin produced by the yeast Pichia acaciae: characterization and comparison with the toxin of Kluyveromyces lactis*. Microbiology, 1994. **140** ( Pt 2): p. 425-31.
170. Allen, J.B., et al., *The SADI/RAD53 protein kinase controls multiple checkpoints and DNA damage-induced transcription in yeast*. Genes Dev, 1994. **8**(20): p. 2401-15.
171. Elledge, S.J., *Cell cycle checkpoints: preventing an identity crisis*. Science, 1996. **274**(5293): p. 1664-72.
172. Weinert, T., *DNA damage checkpoints update: getting molecular*. Curr Opin Genet Dev, 1998. **8**(2): p. 185-93.
173. Klassen, R. and F. Meinhardt, *Induction of DNA damage and apoptosis in Saccharomyces cerevisiae by a yeast killer toxin*. Cell Microbiol, 2005. **7**(3): p. 393-401.
174. Madeo, F., et al., *Apoptosis in yeast: a new model system with applications in cell biology and medicine*. Curr Genet, 2002. **41**(4): p. 208-16.
175. Burhans, W.C., et al., *Apoptosis-like yeast cell death in response to DNA damage and replication defects*. Mutat Res, 2003. **532**(1-2): p. 227-43.
176. Kitada, K. and F. Hishinuma, *A new linear DNA plasmid isolated from the yeast Saccharomyces kluyveri*. Mol Gen Genet, 1987. **206**(3): p. 377-381.
177. Hishinuma, F. and K. Hirai, *Genome organization of the linear plasmid, pSKL, isolated from Saccharomyces kluyveri*. Mol Gen Genet, 1991. **226**(1-2): p. 97-106.
178. Fukuda, K., et al., *Stress responses of linear plasmids from Debaryomyces hansenii*. FEMS Microbiol Lett, 2004. **237**(2): p. 243-8.
179. Gunge, N., et al., *Osmophilic linear plasmids from the salt-tolerant yeast Debaryomyces hansenii*. Curr Genet, 1993. **23**(5-6): p. 443-9.
180. Klassen, R. and F. Meinhardt, *Linear plasmids pWR1A and pWR1B of the yeast Wingea robertsiae are associated with a killer phenotype*. Plasmid, 2002. **48**(2): p. 142-8.
181. Shepherd, H.S., et al., *Cryptic DNA plasmids of the heterothallic yeast Saccharomycopsis crataegensis*. Curr Genet, 1987. **12**(4): p. 297-304.
182. Bolen, P.L., et al., *Physical and genetic characterization of linear DNA plasmids from the heterothallic yeast Saccharomycopsis crataegensis*. Antonie Van Leeuwenhoek, 1992. **61**(3): p. 195-205.
183. Shatkin, A.J., *Capping of eucaryotic mRNAs*. Cell, 1976. **9**(4 PT 2): p. 645-53.
184. Coppola, J.A., A.S. Field, and D.S. Luse, *Promoter-proximal pausing by RNA polymerase II in vitro: transcripts shorter than 20 nucleotides are not capped*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1983. **80**(5): p. 1251-5.
185. Jove, R. and J.L. Manley, *In vitro transcription from the adenovirus 2 major late promoter utilizing templates truncated at promoter-proximal sites*. J Biol Chem, 1984. **259**(13): p. 8513-21.



186. Furuichi, Y., et al., *Mechanism of formation of reovirus mRNA 5'-terminal blocked and methylated sequence, m7GpppGmpC*. J Biol Chem, 1976. **251**(16): p. 5043-53.
187. Moss, B., et al., *Formation of the guanylated and methylated 5'-terminus of vaccinia virus mRNA*. Virology, 1976. **72**(2): p. 341-51.
188. Shimotohno, K. and K. Miura, *The process of formation of the 5' -terminal modified structure in messenger RNA of cytoplasmic polyhedrosis virus*. FEBS Lett, 1976. **64**(1): p. 204-8.
189. Banerjee, A.K., *5'-terminal cap structure in eucaryotic messenger ribonucleic acids*. Microbiol Rev, 1980. **44**(2): p. 175-205.
190. Shuman, S., *RNA capping by HeLa cell RNA guanylyltransferase. Characterization of a covalent protein-guanylate intermediate*. J Biol Chem, 1982. **257**(12): p. 7237-45.
191. Shuman, S., *Origins of mRNA identity: capping enzymes bind to the phosphorylated C-terminal domain of RNA polymerase II*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(24): p. 12758-60.
192. Langberg, S.R. and B. Moss, *Post-transcriptional modifications of mRNA. Purification and characterization of cap I and cap II RNA (nucleoside-2'-)-methyltransferases from HeLa cells*. J Biol Chem, 1981. **256**(19): p. 10054-60.
193. Furuichi, Y. and A.J. Shatkin, *Viral and cellular mRNA capping: past and prospects*. Adv Virus Res, 2000. **55**: p. 135-84.
194. Furuichi, Y. and A.J. Shatkin, *Characterization of cap structures*. Methods Enzymol, 1989. **180**: p. 164-76.
195. Reddy, R., R. Singh, and S. Shimba, *Methylated cap structures in eukaryotic RNAs: structure, synthesis and functions*. Pharmacol Ther, 1992. **54**(3): p. 249-67.
196. Liang, X.H., et al., *trans and cis splicing in trypanosomatids: mechanism, factors, and regulation*. Eukaryot Cell, 2003. **2**(5): p. 830-40.
197. Palenchar, J.B. and V. Bellofatto, *Gene transcription in trypanosomes*. Mol Biochem Parasitol, 2006. **146**(2): p. 135-41.
198. Bangs, J.D., et al., *Mass spectrometry of mRNA cap 4 from trypanosomatids reveals two novel nucleosides*. J Biol Chem, 1992. **267**(14): p. 9805-15.
199. Whelan, S.P., J.N. Barr, and G.W. Wertz, *Transcription and replication of nonsegmented negative-strand RNA viruses*. Curr Top Microbiol Immunol, 2004. **283**: p. 61-119.
200. Poch, O., et al., *Sequence comparison of five polymerases (L proteins) of unsegmented negative-strand RNA viruses: theoretical assignment of functional domains*. J Gen Virol, 1990. **71** ( Pt 5): p. 1153-62.
201. Bujnicki, J.M. and L. Rychlewski, *In silico identification, structure prediction and phylogenetic analysis of the 2'-O-ribose (cap 1) methyltransferase domain in the large structural protein of ssRNA negative-strand viruses*. Protein Eng, 2002. **15**(2): p. 101-8.
202. Ogino, T. and A.K. Banerjee, *Unconventional mechanism of mRNA capping by the RNA-dependent RNA polymerase of vesicular stomatitis virus*. Mol Cell, 2007. **25**(1): p. 85-97.
203. Abraham, G., D.P. Rhodes, and A.K. Banerjee, *The 5' terminal structure of the methylated mRNA synthesized in vitro by vesicular stomatitis virus*. Cell, 1975. **5**(1): p. 51-8.
204. Rhodes, D.P. and A.K. Banerjee, *5'-terminal sequence of vesicular stomatitis virus mRNA's synthesized in vitro*. J Virol, 1975. **17**(1): p. 33-42.
205. Li, J., J.T. Wang, and S.P. Whelan, *A unique strategy for mRNA cap methylation used by vesicular stomatitis virus*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(22): p. 8493-8.
206. Maxwell, E.S. and M.J. Fournier, *The small nucleolar RNAs*. Annu Rev Biochem, 1995. **64**: p. 897-934.
207. Eliceiri, G.L., *Formation of low molecular weight RNA species in HeLa cells*. J Cell Physiol, 1980. **102**(2): p. 199-207.
208. Mattaj, I.W., *Cap trimethylation of U snRNA is cytoplasmic and dependent on U snRNP protein binding*. Cell, 1986. **46**(6): p. 905-11.
209. Will, C.L. and R. Luhrmann, *Spliceosomal UsnRNP biogenesis, structure and function*. Curr Opin Cell Biol, 2001. **13**(3): p. 290-301.
210. Branlant, C., et al., *U2 RNA shares a structural domain with U1, U4, and U5 RNAs*. Embo J, 1982. **1**(10): p. 1259-65.
211. Liautard, J.P., et al., *Structural organization of ribonucleoproteins containing small nuclear RNAs from HeLa cells. Proteins interact closely with a similar structural domain of U1, U2, U4 and U5 small nuclear RNAs*. J Mol Biol, 1982. **162**(3): p. 623-43.
212. Strasser, A., et al., *Structural basis for m3G-cap-mediated nuclear import of spliceosomal UsnRNPs by snurportin1*. Embo J, 2005. **24**(13): p. 2235-43.
213. Fischer, U. and R. Luhrmann, *An essential signaling role for the m3G cap in the transport of U1 snRNP to the nucleus*. Science, 1990. **249**(4970): p. 786-90.
214. Hamm, J., et al., *The trimethylguanosine cap structure of U1 snRNA is a component of a bipartite nuclear targeting signal*. Cell, 1990. **62**(3): p. 569-77.

215. Terns, M.P. and J.E. Dahlberg, *Retention and 5' cap trimethylation of U3 snRNA in the nucleus*. Science, 1994. **264**(5161): p. 959-61.
216. Mouaikel, J., et al., *Hypermethylation of the cap structure of both yeast snRNAs and snoRNAs requires a conserved methyltransferase that is localized to the nucleolus*. Mol Cell, 2002. **9**(4): p. 891-901.
217. Fantoni, A., A.O. Dare, and C. Tschudi, *RNA polymerase III-mediated transcription of the trypanosome U2 small nuclear RNA gene is controlled by both intragenic and extragenic regulatory elements*. Mol Cell Biol, 1994. **14**(3): p. 2021-8.
218. Mottram, J., et al., *Isolation and sequence of four small nuclear U RNA genes of Trypanosoma brucei subsp. brucei: identification of the U2, U4, and U6 RNA analogs*. Mol Cell Biol, 1989. **9**(3): p. 1212-23.
219. Tschudi, C. and E. Ullut, *Unconventional rules of small nuclear RNA transcription and cap modification in trypanosomatids*. Gene Expr, 2002. **10**(1-2): p. 3-16.
220. Singh, R. and R. Reddy, *Gamma-monomethyl phosphate: a cap structure in spliceosomal U6 small nuclear RNA*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1989. **86**(21): p. 8280-3.
221. Shumyatsky, G.P., S.V. Tillib, and D.A. Kramerov, *B2 RNA and 7SK RNA, RNA polymerase III transcripts, have a cap-like structure at their 5' end*. Nucleic Acids Res, 1990. **18**(21): p. 6347-51.
222. Shimba, S. and R. Reddy, *Purification of human U6 small nuclear RNA capping enzyme. Evidence for a common capping enzyme for gamma-monomethyl-capped small RNAs*. J Biol Chem, 1994. **269**(17): p. 12419-23.
223. Singh, R., S. Gupta, and R. Reddy, *Capping of mammalian U6 small nuclear RNA in vitro is directed by a conserved stem-loop and AUAUAC sequence: conversion of a noncapped RNA into a capped RNA*. Mol Cell Biol, 1990. **10**(3): p. 939-46.
224. Kwan, S., V.L. Gerlach, and D.A. Brow, *Disruption of the 5' stem-loop of yeast U6 RNA induces trimethylguanosine capping of this RNA polymerase III transcript in vivo*. Rna, 2000. **6**(12): p. 1859-69.
225. Engelhardt, O.G. and E. Fodor, *Functional association between viral and cellular transcription during influenza virus infection*. Rev Med Virol, 2006. **16**(5): p. 329-45.
226. Cianci, C., L. Tiley, and M. Krystal, *Differential activation of the influenza virus polymerase via template RNA binding*. J Virol, 1995. **69**(7): p. 3995-9.
227. Leahy, M.B., H.C. Dobbyn, and G.G. Brownlee, *Hairpin loop structure in the 3' arm of the influenza A virus virion RNA promoter is required for endonuclease activity*. J Virol, 2001. **75**(15): p. 7042-9.
228. Leahy, M.B., et al., *Mutagenic analysis of the 5' arm of the influenza A virus virion RNA promoter defines the sequence requirements for endonuclease activity*. J Virol, 2001. **75**(1): p. 134-42.
229. Hagen, M., et al., *Recombinant influenza virus polymerase: requirement of both 5' and 3' viral ends for endonuclease activity*. J Virol, 1994. **68**(3): p. 1509-15.
230. Fechter, P. and G.G. Brownlee, *Recognition of mRNA cap structures by viral and cellular proteins*. J Gen Virol, 2005. **86**(Pt 5): p. 1239-49.
231. Hara, K., et al., *Amino acid residues in the N-terminal region of the PA subunit of influenza A virus RNA polymerase play a critical role in protein stability, endonuclease activity, cap binding, and virion RNA promoter binding*. J Virol, 2006. **80**(16): p. 7789-98.
232. Li, M.L., P. Rao, and R.M. Krug, *The active sites of the influenza cap-dependent endonuclease are on different polymerase subunits*. Embo J, 2001. **20**(8): p. 2078-86.
233. Rao, P., W. Yuan, and R.M. Krug, *Crucial role of CA cleavage sites in the cap-snatching mechanism for initiating viral mRNA synthesis*. Embo J, 2003. **22**(5): p. 1188-98.
234. Engelhardt, O.G., M. Smith, and E. Fodor, *Association of the influenza A virus RNA-dependent RNA polymerase with cellular RNA polymerase II*. J Virol, 2005. **79**(9): p. 5812-8.
235. Leahy, M.B., J.T. Dessens, and P.A. Nuttall, *In vitro polymerase activity of Thogoto virus: evidence for a unique cap-snatching mechanism in a tick-borne orthomyxovirus*. J Virol, 1997. **71**(11): p. 8347-51.
236. Albo, C., J. Martin, and A. Portela, *The 5' ends of Thogoto virus (Orthomyxoviridae) mRNAs are homogeneous in both length and sequence*. J Virol, 1996. **70**(12): p. 9013-7.
237. Weber, F., O. Haller, and G. Kochs, *Nucleoprotein viral RNA and mRNA of Thogoto virus: a novel "cap-stealing" mechanism in tick-borne orthomyxoviruses?* J Virol, 1996. **70**(12): p. 8361-7.
238. Eshita, Y., et al., *Analyses of the mRNA transcription processes of snowshoe hare bunyavirus S and M RNA species*. J Virol, 1985. **55**(3): p. 681-9.
239. Vialat, P. and M. Bouloy, *Germiston virus transcriptase requires active 40S ribosomal subunits and utilizes capped cellular RNAs*. J Virol, 1992. **66**(2): p. 685-93.
240. Jin, H. and R.M. Elliott, *Characterization of Bunyamwera virus S RNA that is transcribed and replicated by the L protein expressed from recombinant vaccinia virus*. J Virol, 1993. **67**(3): p. 1396-404.
241. Garcin, D., et al., *The 5' ends of Hantaan virus (Bunyaviridae) RNAs suggest a prime-and-realign mechanism for the initiation of RNA synthesis*. J Virol, 1995. **69**(9): p. 5754-62.

242. Kormelink, R., et al., *Non-viral heterogeneous sequences at the 5' ends of tomato spotted wilt virus mRNAs*. J Gen Virol, 1992. **73** ( Pt 8): p. 2125-8.
243. van Poelwijk, F., J. Kolkman, and R. Goldbach, *Sequence analysis of the 5' ends of tomato spotted wilt virus N mRNAs*. Arch Virol, 1996. **141**(1): p. 177-84.
244. Duijsings, D., R. Kormelink, and R. Goldbach, *Alfalfa mosaic virus RNAs serve as cap donors for tomato spotted wilt virus transcription during coinfection of Nicotiana benthamiana*. J Virol, 1999. **73**(6): p. 5172-5.
245. Duijsings, D., R. Kormelink, and R. Goldbach, *In vivo analysis of the TSWV cap-snatching mechanism: single base complementarity and primer length requirements*. Embo J, 2001. **20**(10): p. 2545-52.
246. van Knippenberg, I., et al., *Tomato spotted wilt virus transcriptase in vitro displays a preference for cap donors with multiple base complementarity to the viral template*. Virology, 2005. **335**(1): p. 122-30.
247. Simons, J.F. and R.F. Pettersson, *Host-derived 5' ends and overlapping complementary 3' ends of the two mRNAs transcribed from the ambisense S segment of Uukuniemi virus*. J Virol, 1991. **65**(9): p. 4741-8.
248. Okuda, M., et al., *Nucleotide sequence of melon yellow spot virus M RNA segment and characterization of non-viral sequences in subgenomic RNA*. Arch Virol, 2006. **151**(1): p. 1-11.
249. Patterson, J.L., B. Holloway, and D. Kolakofsky, *La Crosse virions contain a primer-stimulated RNA polymerase and a methylated cap-dependent endonuclease*. J Virol, 1984. **52**(1): p. 215-22.
250. Ihara, T., Y. Matsuura, and D.H. Bishop, *Analyses of the mRNA transcription processes of Punta Toro phlebovirus (Bunyaviridae)*. Virology, 1985. **147**(2): p. 317-25.
251. Collett, M.S., *Messenger RNA of the M segment RNA of Rift Valley fever virus*. Virology, 1986. **151**(1): p. 151-6.
252. Gro, M.C., et al., *Analysis of 3' and 5' ends of N and NSs messenger RNAs of Toscana Phlebovirus*. Virology, 1992. **191**(1): p. 435-8.
253. Huiet, L., et al., *The maize stripe virus major noncapsid protein messenger RNA transcripts contain heterogeneous leader sequences at their 5' termini*. Virology, 1993. **197**(2): p. 808-12.
254. Estabrook, E.M., J. Tsai, and B.W. Falk, *In vivo transfer of barley stripe mosaic hordeivirus ribonucleotides to the 5' terminus of maize stripe tenuivirus RNAs*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(14): p. 8304-9.
255. Ramirez, B.C., et al., *Capped nonviral sequences at the 5' end of the mRNAs of rice hoja blanca virus RNA4*. J Virol, 1995. **69**(3): p. 1951-4.
256. Shimizu, T., et al., *Non-viral sequences at the 5' termini of mRNAs derived from virus-sense and virus-complementary sequences of the ambisense RNA segments of rice stripe tenuivirus*. J Gen Virol, 1996. **77** ( Pt 3): p. 541-6.
257. Jin, H. and R.M. Elliott, *Non-viral sequences at the 5' ends of Dugbe nairovirus S mRNAs*. J Gen Virol, 1993. **74** ( Pt 10): p. 2293-7.
258. Raju, R., et al., *Nontemplated bases at the 5' ends of Tacaribe virus mRNAs*. Virology, 1990. **174**(1): p. 53-9.
259. Garcin, D. and D. Kolakofsky, *A novel mechanism for the initiation of Tacaribe arenavirus genome replication*. J Virol, 1990. **64**(12): p. 6196-203.
260. Blanc, A., C. Goyer, and N. Sonenberg, *The coat protein of the yeast double-stranded RNA virus L-A attaches covalently to the cap structure of eukaryotic mRNA*. Mol Cell Biol, 1992. **12**(8): p. 3390-8.
261. Wickner, R.B., *Double-stranded and single-stranded RNA viruses of Saccharomyces cerevisiae*. Annu Rev Microbiol, 1992. **46**: p. 347-75.
262. Bruenn, J. and B. Keitz, *The 5' ends of yeast killer factor RNAs are pppGp*. Nucleic Acids Res, 1976. **3**(10): p. 2427-36.
263. Newbury, S.F., *Control of mRNA stability in eukaryotes*. Biochem Soc Trans, 2006. **34**(Pt 1): p. 30-4.
264. Meyer, S., C. Temme, and E. Wahle, *Messenger RNA turnover in eukaryotes: pathways and enzymes*. Crit Rev Biochem Mol Biol, 2004. **39**(4): p. 197-216.
265. Decker, C.J. and R. Parker, *Mechanisms of mRNA degradation in eukaryotes*. Trends Biochem Sci, 1994. **19**(8): p. 336-40.
266. Masison, D.C., et al., *Decoying the cap- mRNA degradation system by a double-stranded RNA virus and poly(A)- mRNA surveillance by a yeast antiviral system*. Mol Cell Biol, 1995. **15**(5): p. 2763-71.
267. Naitow, H., et al., *L-A virus at 3.4 A resolution reveals particle architecture and mRNA decapping mechanism*. Nat Struct Biol, 2002. **9**(10): p. 725-8.
268. Tang, J., et al., *The structural basis of recognition and removal of cellular mRNA 7-methyl G 'caps' by a viral capsid protein: a unique viral response to host defense*. J Mol Recognit, 2005. **18**(2): p. 158-68.
269. Blanc, A., et al., *His-154 is involved in the linkage of the Saccharomyces cerevisiae L-A double-stranded RNA virus Gag protein to the cap structure of mRNAs and is essential for M1 satellite virus expression*. Mol Cell Biol, 1994. **14**(4): p. 2664-74.

270. Parker, R. and H. Song, *The enzymes and control of eukaryotic mRNA turnover*. Nat Struct Mol Biol, 2004. **11**(2): p. 121-7.
271. Furuichi, Y., A. LaFiandra, and A.J. Shatkin, *5'-Terminal structure and mRNA stability*. Nature, 1977. **266**(5599): p. 235-9.
272. Shimotohno, K., et al., *Importance of 5'-terminal blocking structure to stabilize mRNA in eukaryotic protein synthesis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1977. **74**(7): p. 2734-8.
273. Muhlrud, D., C.J. Decker, and R. Parker, *Turnover mechanisms of the stable yeast PGK1 mRNA*. Mol Cell Biol, 1995. **15**(4): p. 2145-56.
274. Decker, C.J. and R. Parker, *A turnover pathway for both stable and unstable mRNAs in yeast: evidence for a requirement for deadenylation*. Genes Dev, 1993. **7**(8): p. 1632-43.
275. Shyu, A.B., J.G. Belasco, and M.E. Greenberg, *Two distinct destabilizing elements in the c-fos message trigger deadenylation as a first step in rapid mRNA decay*. Genes Dev, 1991. **5**(2): p. 221-31.
276. Tucker, M. and R. Parker, *Mechanisms and control of mRNA decapping in Saccharomyces cerevisiae*. Annu Rev Biochem, 2000. **69**: p. 571-95.
277. LaGrandeur, T.E. and R. Parker, *Isolation and characterization of Dcp1p, the yeast mRNA decapping enzyme*. Embo J, 1998. **17**(5): p. 1487-96.
278. Dunckley, T. and R. Parker, *The DCP2 protein is required for mRNA decapping in Saccharomyces cerevisiae and contains a functional MutT motif*. Embo J, 1999. **18**(19): p. 5411-22.
279. Beelman, C.A., et al., *An essential component of the decapping enzyme required for normal rates of mRNA turnover*. Nature, 1996. **382**(6592): p. 642-6.
280. Steiger, M., et al., *Analysis of recombinant yeast decapping enzyme*. Rna, 2003. **9**(2): p. 231-8.
281. Ingelfinger, D., et al., *The human LSM1-7 proteins colocalize with the mRNA-degrading enzymes Dcp1/2 and Xrn1 in distinct cytoplasmic foci*. Rna, 2002. **8**(12): p. 1489-501.
282. Sheth, U. and R. Parker, *Decapping and decay of messenger RNA occur in cytoplasmic processing bodies*. Science, 2003. **300**(5620): p. 805-8.
283. Piccirillo, C., R. Khanna, and M. Kiledjian, *Functional characterization of the mammalian mRNA decapping enzyme hDcp2*. Rna, 2003. **9**(9): p. 1138-47.
284. Wang, Z., et al., *The hDcp2 protein is a mammalian mRNA decapping enzyme*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(20): p. 12663-8.
285. Lall, S., F. Piano, and R.E. Davis, *Caenorhabditis elegans decapping proteins: localization and functional analysis of Dcp1, Dcp2, and DcpS during embryogenesis*. Mol Biol Cell, 2005. **16**(12): p. 5880-90.
286. Liu, H., et al., *The scavenger mRNA decapping enzyme DcpS is a member of the HIT family of pyrophosphatases*. Embo J, 2002. **21**(17): p. 4699-708.
287. Liu, S.W., et al., *Functional analysis of mRNA scavenger decapping enzymes*. Rna, 2004. **10**(9): p. 1412-22.
288. van Dijk, E., H. Le Hir, and B. Seraphin, *DcpS can act in the 5'-3' mRNA decay pathway in addition to the 3'-5' pathway*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(21): p. 12081-6.
289. Vilela, C., et al., *The eukaryotic mRNA decapping protein Dcp1 interacts physically and functionally with the eIF4F translation initiation complex*. Embo J, 2000. **19**(16): p. 4372-82.
290. Ramirez, C.V., et al., *Modulation of eukaryotic mRNA stability via the cap-binding translation complex eIF4F*. J Mol Biol, 2002. **318**(4): p. 951-62.
291. Schwartz, D.C. and R. Parker, *mRNA decapping in yeast requires dissociation of the cap binding protein, eukaryotic translation initiation factor 4E*. Mol Cell Biol, 2000. **20**(21): p. 7933-42.
292. Edery, I. and N. Sonenberg, *Cap-dependent RNA splicing in a HeLa nuclear extract*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1985. **82**(22): p. 7590-4.
293. Konarska, M.M., R.A. Padgett, and P.A. Sharp, *Recognition of cap structure in splicing in vitro of mRNA precursors*. Cell, 1984. **38**(3): p. 731-6.
294. Inoue, K., et al., *Effect of the cap structure on pre-mRNA splicing in Xenopus oocyte nuclei*. Genes Dev, 1989. **3**(9): p. 1472-9.
295. Lewis, J.D., et al., *A nuclear cap-binding complex facilitates association of U1 snRNP with the cap-proximal 5' splice site*. Genes Dev, 1996. **10**(13): p. 1683-98.
296. Izaurralde, E., et al., *A nuclear cap binding protein complex involved in pre-mRNA splicing*. Cell, 1994. **78**(4): p. 657-68.
297. Worch, R., et al., *Specificity of recognition of mRNA 5' cap by human nuclear cap-binding complex*. Rna, 2005. **11**(9): p. 1355-63.
298. Colot, H.V., F. Stutz, and M. Rosbash, *The yeast splicing factor Mud13p is a commitment complex component and corresponds to CBP20, the small subunit of the nuclear cap-binding complex*. Genes Dev, 1996. **10**(13): p. 1699-708.

299. Fresco, L.D. and S. Buratowski, *Conditional mutants of the yeast mRNA capping enzyme show that the cap enhances, but is not required for, mRNA splicing*. *Rna*, 1996. **2**(6): p. 584-96.
300. Jarmolowski, A., et al., *Nuclear export of different classes of RNA is mediated by specific factors*. *J Cell Biol*, 1994. **124**(5): p. 627-35.
301. Visa, N., et al., *A nuclear cap-binding complex binds Balbiani ring pre-mRNA cotranscriptionally and accompanies the ribonucleoprotein particle during nuclear export*. *J Cell Biol*, 1996. **133**(1): p. 5-14.
302. Flaherty, S.M., et al., *Participation of the nuclear cap binding complex in pre-mRNA 3' processing*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997. **94**(22): p. 11893-8.
303. Nojima, T., et al., *The interaction between cap-binding complex and RNA export factor is required for intronless mRNA export*. *J Biol Chem*, 2007.
304. Izaurralde, E. and S. Adam, *Transport of macromolecules between the nucleus and the cytoplasm*. *Rna*, 1998. **4**(4): p. 351-64.
305. Izaurralde, E., et al., *A cap-binding protein complex mediating U snRNA export*. *Nature*, 1995. **376**(6542): p. 709-12.
306. Rodriguez, M.S., C. Dargemont, and F. Stutz, *Nuclear export of RNA*. *Biol Cell*, 2004. **96**(8): p. 639-55.
307. Hamm, J. and I.W. Mattaj, *Monomethylated cap structures facilitate RNA export from the nucleus*. *Cell*, 1990. **63**(1): p. 109-18.
308. Gorlich, D., et al., *Importin provides a link between nuclear protein import and U snRNA export*. *Cell*, 1996. **87**(1): p. 21-32.
309. Lewis, J.D. and E. Izaurralde, *The role of the cap structure in RNA processing and nuclear export*. *Eur J Biochem*, 1997. **247**(2): p. 461-9.
310. Lewis, J.D., S.I. Gunderson, and I.W. Mattaj, *The influence of 5' and 3' end structures on pre-mRNA metabolism*. *J Cell Sci Suppl*, 1995. **19**: p. 13-9.
311. Ishigaki, Y., et al., *Evidence for a pioneer round of mRNA translation: mRNAs subject to nonsense-mediated decay in mammalian cells are bound by CBP80 and CBP20*. *Cell*, 2001. **106**(5): p. 607-17.
312. Fortes, P., et al., *Genetic and physical interactions involving the yeast nuclear cap-binding complex*. *Mol Cell Biol*, 1999. **19**(10): p. 6543-53.
313. McKendrick, L., et al., *Interaction of eukaryotic translation initiation factor 4G with the nuclear cap-binding complex provides a link between nuclear and cytoplasmic functions of the m(7) guanosine cap*. *Mol Cell Biol*, 2001. **21**(11): p. 3632-41.
314. Hentze, M.W., *eIF4G: a multipurpose ribosome adapter?* *Science*, 1997. **275**(5299): p. 500-1.
315. Hershey, J.W.B. and W.C. Merrick, *The pathway and mechanism of initiation of protein synthesis*. In: Sonenberg N, Hershey JWB, Mathews M (eds) *Translational Control of Gene Expression*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 2000: p. 33-88.
316. Gingras, A.C., B. Raught, and N. Sonenberg, *eIF4 initiation factors: effectors of mRNA recruitment to ribosomes and regulators of translation*. *Annu Rev Biochem*, 1999. **68**: p. 913-63.
317. von der Haar, T., et al., *The mRNA cap-binding protein eIF4E in post-transcriptional gene expression*. *Nat Struct Mol Biol*, 2004. **11**(6): p. 503-11.
318. Morley, S.J., M.J. Coldwell, and M.J. Clemens, *Initiation factor modifications in the preapoptotic phase*. *Cell Death Differ*, 2005. **12**(6): p. 571-84.
319. Richter, J.D. and N. Sonenberg, *Regulation of cap-dependent translation by eIF4E inhibitory proteins*. *Nature*, 2005. **433**(7025): p. 477-80.
320. Sonenberg, N., *Regulation of translation and cell growth by eIF-4E*. *Biochimie*, 1994. **76**(9): p. 839-46.
321. Polunovsky, V.A. and P.B. Bitterman, *The Cap-Dependent Translation Apparatus Integrates and Amplifies Cancer Pathways*. *RNA Biol*, 2006. **3**(1).
322. Sonenberg, N. and A.C. Gingras, *The mRNA 5' cap-binding protein eIF4E and control of cell growth*. *Curr Opin Cell Biol*, 1998. **10**(2): p. 268-75.
323. Culjkovic, B., I. Topisirovic, and K.L. Borden, *Controlling gene expression through RNA regulons: the role of the eukaryotic translation initiation factor eIF4E*. *Cell Cycle*, 2007. **6**(1): p. 65-9.
324. Niedzwiecka, A., et al., *Biophysical studies of eIF4E cap-binding protein: recognition of mRNA 5' cap structure and synthetic fragments of eIF4G and 4E-BP1 proteins*. *J Mol Biol*, 2002. **319**(3): p. 615-35.
325. Matsuo, H., et al., *Structure of translation factor eIF4E bound to m7GDP and interaction with 4E-binding protein*. *Nat Struct Biol*, 1997. **4**(9): p. 717-24.
326. Marcotrigiano, J., et al., *Cocrystal structure of the messenger RNA 5' cap-binding protein (eIF4E) bound to 7-methyl-GDP*. *Cell*, 1997. **89**(6): p. 951-61.
327. Marcotrigiano, J., et al., *Cap-dependent translation initiation in eukaryotes is regulated by a molecular mimic of eIF4G*. *Mol Cell*, 1999. **3**(6): p. 707-16.
328. Gross, J.D., et al., *Ribosome loading onto the mRNA cap is driven by conformational coupling between eIF4G and eIF4E*. *Cell*, 2003. **115**(6): p. 739-50.

329. Tomoo, K., et al., *Structural features of human initiation factor 4E, studied by X-ray crystal analyses and molecular dynamics simulations*. J Mol Biol, 2003. **328**(2): p. 365-83.
330. Ditzelmuller, G., et al., *Nucleotide pools of growing, synchronized and stressed cultures of Saccharomyces cerevisiae*. Arch Microbiol, 1983. **135**(1): p. 63-7.
331. von der Haar, T. and J.E. McCarthy, *Intracellular translation initiation factor levels in Saccharomyces cerevisiae and their role in cap-complex function*. Mol Microbiol, 2002. **46**(2): p. 531-44.
332. von Der Haar, T., P.D. Ball, and J.E. McCarthy, *Stabilization of eukaryotic initiation factor 4E binding to the mRNA 5'-Cap by domains of eIF4G*. J Biol Chem, 2000. **275**(39): p. 30551-5.
333. Ptushkina, M., et al., *Cooperative modulation by eIF4G of eIF4E-binding to the mRNA 5' cap in yeast involves a site partially shared by p20*. Embo J, 1998. **17**(16): p. 4798-808.
334. Matsuo, H., et al., *Efficient Synthesis of 13C,15N-Labeled RNA Containing the Cap Structure m7GpppA*. J. Am. Chem. Soc., 2000. **122**(11): p. 2417-2421.
335. McGuire, A.M., H. Matsuo, and G. Wagner, *Internal and overall motions of the translation factor eIF4E: cap binding and insertion in a CHAPS detergent micelle*. J Biomol NMR, 1998. **12**(1): p. 73-88.
336. Spivak-Kroizman, T., et al., *Mutations in the S4-H2 loop of eIF4E which increase the affinity for m7GTP*. FEBS Lett, 2002. **516**(1-3): p. 9-14.
337. Carberry, S.E., et al., *Binding of protein synthesis initiation factor 4E to oligoribonucleotides: effects of cap accessibility and secondary structure*. Biochemistry, 1992. **31**(5): p. 1427-32.
338. McCubbin, W.D., et al., *Circular dichroism and fluorescence studies on protein synthesis initiation factor eIF-4E and two mutant forms from the yeast Saccharomyces cerevisiae*. J Biol Chem, 1988. **263**(33): p. 17663-71.
339. Moerke, N.J., et al., *Small-molecule inhibition of the interaction between the translation initiation factors eIF4E and eIF4G*. Cell, 2007. **128**(2): p. 257-67.
340. Youtani, T., et al., *Regulation of human eIF4E by 4E-BP1: binding analysis using surface plasmon resonance*. IUBMB Life, 2000. **49**(1): p. 27-31.
341. Baird, S.D., et al., *Searching for IRES*. Rna, 2006. **12**(10): p. 1755-85.
342. Mokrejs, M., et al., *Bioinformatical Approach to the Analysis of Viral and Cellular Internal Ribosome Entry Sites*. in: Lee B. Kwang (ed) New Messenger RNA Research Communications. Hauppauge, NY: Nova Science Publishers, 2007: p. 133-166.
343. McCracken, S., et al., *The C-terminal domain of RNA polymerase II couples mRNA processing to transcription*. Nature, 1997. **385**(6614): p. 357-61.
344. Corden, J.L., *Tails of RNA polymerase II*. Trends Biochem Sci, 1990. **15**(10): p. 383-7.
345. Palancade, B. and O. Bensaude, *Investigating RNA polymerase II carboxyl-terminal domain (CTD) phosphorylation*. Eur J Biochem, 2003. **270**(19): p. 3859-70.
346. Dahmus, M.E., *Reversible phosphorylation of the C-terminal domain of RNA polymerase II*. J Biol Chem, 1996. **271**(32): p. 19009-12.
347. Rodriguez, C.R., et al., *Kin28, the TFIIH-associated carboxy-terminal domain kinase, facilitates the recruitment of mRNA processing machinery to RNA polymerase II*. Mol Cell Biol, 2000. **20**(1): p. 104-12.
348. Hirose, Y. and Y. Ohkuma, *Phosphorylation of the C-terminal Domain of RNA Polymerase II Plays Central Roles in the Integrated Events of Eukaryotic Gene Expression*. J Biochem (Tokyo), 2007.
349. Cho, H., et al., *A protein phosphatase functions to recycle RNA polymerase II*. Genes Dev, 1999. **13**(12): p. 1540-52.
350. Palancade, B., et al., *Dephosphorylation of RNA polymerase II by CTD-phosphatase FCP1 is inhibited by phospho-CTD associating proteins*. J Mol Biol, 2004. **335**(2): p. 415-24.
351. Hirose, Y., R. Tacke, and J.L. Manley, *Phosphorylated RNA polymerase II stimulates pre-mRNA splicing*. Genes Dev, 1999. **13**(10): p. 1234-9.
352. Hirose, Y. and J.L. Manley, *RNA polymerase II is an essential mRNA polyadenylation factor*. Nature, 1998. **395**(6697): p. 93-6.
353. McCracken, S., et al., *5'-Capping enzymes are targeted to pre-mRNA by binding to the phosphorylated carboxy-terminal domain of RNA polymerase II*. Genes Dev, 1997. **11**(24): p. 3306-18.
354. Fong, N. and D.L. Bentley, *Capping, splicing, and 3' processing are independently stimulated by RNA polymerase II: different functions for different segments of the CTD*. Genes Dev, 2001. **15**(14): p. 1783-95.
355. Ho, C.K., et al., *The guanylyltransferase domain of mammalian mRNA capping enzyme binds to the phosphorylated carboxyl-terminal domain of RNA polymerase II*. J Biol Chem, 1998. **273**(16): p. 9577-85.
356. Fabrega, C., et al., *Structure of an mRNA capping enzyme bound to the phosphorylated carboxy-terminal domain of RNA polymerase II*. Mol Cell, 2003. **11**(6): p. 1549-61.

357. Cho, E.J., et al., *Allosteric interactions between capping enzyme subunits and the RNA polymerase II carboxy-terminal domain*. Genes Dev, 1998. **12**(22): p. 3482-7.
358. Takase, Y., et al., *The essential interaction between yeast mRNA capping enzyme subunits is not required for triphosphatase function in vivo*. Mol Cell Biol, 2000. **20**(24): p. 9307-16.
359. Cho, E.J., et al., *mRNA capping enzyme is recruited to the transcription complex by phosphorylation of the RNA polymerase II carboxy-terminal domain*. Genes Dev, 1997. **11**(24): p. 3319-26.
360. Ho, C.K. and S. Shuman, *Distinct roles for CTD Ser-2 and Ser-5 phosphorylation in the recruitment and allosteric activation of mammalian mRNA capping enzyme*. Mol Cell, 1999. **3**(3): p. 405-11.
361. Pillutla, R.C., et al., *Recombinant human mRNA cap methyltransferase binds capping enzyme/RNA polymerase II complexes*. J Biol Chem, 1998. **273**(34): p. 21443-6.
362. Schroeder, S.C., et al., *Dynamic association of capping enzymes with transcribing RNA polymerase II*. Genes Dev, 2000. **14**(19): p. 2435-40.
363. Komarnitsky, P., E.J. Cho, and S. Buratowski, *Different phosphorylated forms of RNA polymerase II and associated mRNA processing factors during transcription*. Genes Dev, 2000. **14**(19): p. 2452-60.
364. Schroeder, S.C., et al., *A function of yeast mRNA cap methyltransferase, *Abd1*, in transcription by RNA polymerase II*. Mol Cell, 2004. **13**(3): p. 377-87.
365. Myers, L.C., et al., *The yeast capping enzyme represses RNA polymerase II transcription*. Mol Cell, 2002. **10**(4): p. 883-94.
366. Chapman, A.B. and N. Agabian, *Trypanosoma brucei RNA polymerase II is phosphorylated in the absence of carboxyl-terminal domain heptapeptide repeats*. J Biol Chem, 1994. **269**(7): p. 4754-60.
367. Mair, G., E. Ullu, and C. Tschudi, *Cotranscriptional cap 4 formation on the Trypanosoma brucei spliced leader RNA*. J Biol Chem, 2000. **275**(37): p. 28994-9.
368. Gilinger, G. and V. Bellofatto, *Trypanosome spliced leader RNA genes contain the first identified RNA polymerase II gene promoter in these organisms*. Nucleic Acids Res, 2001. **29**(7): p. 1556-64.
369. Schwer, B., et al., *Characterization of the mRNA capping apparatus of Candida albicans*. J Biol Chem, 2001. **276**(3): p. 1857-64.
370. Saha, N., B. Schwer, and S. Shuman, *Characterization of human, Schizosaccharomyces pombe, and Candida albicans mRNA cap methyltransferases and complete replacement of the yeast capping apparatus by mammalian enzymes*. J Biol Chem, 1999. **274**(23): p. 16553-62.
371. Lima, C.D., L.K. Wang, and S. Shuman, *Structure and mechanism of yeast RNA triphosphatase: an essential component of the mRNA capping apparatus*. Cell, 1999. **99**(5): p. 533-43.
372. Changela, A., et al., *Structure and mechanism of the RNA triphosphatase component of mammalian mRNA capping enzyme*. Embo J, 2001. **20**(10): p. 2575-86.
373. Ho, C.K., Y. Pei, and S. Shuman, *Yeast and viral RNA 5' triphosphatases comprise a new nucleoside triphosphatase family*. J Biol Chem, 1998. **273**(51): p. 34151-6.
374. Pei, Y., et al., *Mutational analyses of yeast RNA triphosphatases highlight a common mechanism of metal-dependent NTP hydrolysis and a means of targeting enzymes to pre-mRNAs in vivo by fusion to the guanylyltransferase component of the capping apparatus*. J Biol Chem, 1999. **274**(41): p. 28865-74.
375. Tsukamoto, T., et al., *Isolation and characterization of the yeast mRNA capping enzyme beta subunit gene encoding RNA 5'-triphosphatase, which is essential for cell viability*. Biochem Biophys Res Commun, 1997. **239**(1): p. 116-22.
376. Gu, M. and C.D. Lima, *Processing the message: structural insights into capping and decapping mRNA*. Curr Opin Struct Biol, 2005. **15**(1): p. 99-106.
377. Bougie, I. and M. Bisaillon, *Inhibition of a metal-dependent viral RNA triphosphatase by decavanadate*. Biochem J, 2006. **398**(3): p. 557-67.
378. Hakansson, K., et al., *X-ray crystallography reveals a large conformational change during guanyl transfer by mRNA capping enzymes*. Cell, 1997. **89**(4): p. 545-53.
379. Shuman, S. and C.D. Lima, *The polynucleotide ligase and RNA capping enzyme superfamily of covalent nucleotidyltransferases*. Curr Opin Struct Biol, 2004. **14**(6): p. 757-64.
380. Hakansson, K. and D.B. Wigley, *Structure of a complex between a cap analogue and mRNA guanylyl transferase demonstrates the structural chemistry of RNA capping*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(4): p. 1505-10.
381. Mao, X., B. Schwer, and S. Shuman, *Mutational analysis of the Saccharomyces cerevisiae ABD1 gene: cap methyltransferase activity is essential for cell growth*. Mol Cell Biol, 1996. **16**(2): p. 475-80.
382. Fabrega, C., et al., *Structure and mechanism of mRNA cap (guanine-N7) methyltransferase*. Mol Cell, 2004. **13**(1): p. 77-89.
383. Hausmann, S., et al., *Encephalitozoon cuniculi mRNA cap (guanine N-7) methyltransferase: methyl acceptor specificity, inhibition BY S-adenosylmethionine analogs, and structure-guided mutational analysis*. J Biol Chem, 2005. **280**(21): p. 20404-12.

384. Lehman, K., et al., *A conserved domain of yeast RNA triphosphatase flanking the catalytic core regulates self-association and interaction with the guanylyltransferase component of the mRNA capping apparatus.* J Biol Chem, 1999. **274**(32): p. 22668-78.
385. Bisailon, M. and S. Shuman, *Functional groups required for the stability of yeast RNA triphosphatase in vitro and in vivo.* J Biol Chem, 2001. **276**(32): p. 30514-20.
386. Bisailon, M. and S. Shuman, *Structure-function analysis of the active site tunnel of yeast RNA triphosphatase.* J Biol Chem, 2001. **276**(20): p. 17261-6.
387. Hausmann, S., Y. Pei, and S. Shuman, *Homodimeric quaternary structure is required for the in vivo function and thermal stability of Saccharomyces cerevisiae and Schizosaccharomyces pombe RNA triphosphatases.* J Biol Chem, 2003. **278**(33): p. 30487-96.
388. Lehman, K., C.K. Ho, and S. Shuman, *Importance of homodimerization for the in vivo function of yeast RNA triphosphatase.* J Biol Chem, 2001. **276**(18): p. 14996-5002.
389. Ho, C.K., K. Lehman, and S. Shuman, *An essential surface motif (WAQKW) of yeast RNA triphosphatase mediates formation of the mRNA capping enzyme complex with RNA guanylyltransferase.* Nucleic Acids Res, 1999. **27**(24): p. 4671-8.
390. Hausmann, S., et al., *An essential function of Saccharomyces cerevisiae RNA triphosphatase Cei1 is to stabilize RNA guanylyltransferase Ceg1 against thermal inactivation.* J Biol Chem, 2001. **276**(39): p. 36116-24.
391. Ho, C.K., B. Schwer, and S. Shuman, *Genetic, physical, and functional interactions between the triphosphatase and guanylyltransferase components of the yeast mRNA capping apparatus.* Mol Cell Biol, 1998. **18**(9): p. 5189-98.
392. Shibagaki, Y., et al., *mRNA capping enzyme. Isolation and characterization of the gene encoding mRNA guanylyltransferase subunit from Saccharomyces cerevisiae.* J. Biol. Chem., 1992. **267**(14): p. 9521-9528.
393. Shibagaki, Y., et al., *Localization and in vitro mutagenesis of the active site in the Saccharomyces cerevisiae mRNA capping enzyme.* J Biochem (Tokyo), 1995. **118**(6): p. 1303-9.
394. Fresco, L.D. and S. Buratowski, *Active site of the mRNA-capping enzyme guanylyltransferase from Saccharomyces cerevisiae: similarity to the nucleotidyl attachment motif of DNA and RNA ligases.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(14): p. 6624-8.
395. Wang, S.P., et al., *Phylogeny of mRNA capping enzymes.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(18): p. 9573-8.
396. Schwer, B. and S. Shuman, *Mutational Analysis of Yeast mRNA Capping Enzyme.* PNAS, 1994. **91**(10): p. 4328-4332.
397. Mao, X., B. Schwer, and S. Shuman, *Yeast mRNA cap methyltransferase is a 50-kilodalton protein encoded by an essential gene.* Mol Cell Biol, 1995. **15**(8): p. 4167-74.
398. Wang, S.P. and S. Shuman, *Structure-function analysis of the mRNA cap methyltransferase of Saccharomyces cerevisiae.* J Biol Chem, 1997. **272**(23): p. 14683-9.
399. Schwer, B., et al., *Structure-Function Analysis of Yeast mRNA Cap Methyltransferase and High-Copy Suppression of Conditional Mutants by AdoMet Synthase and the Ubiquitin Conjugating Enzyme Cdc34p.* Genetics, 2000. **155**(4): p. 1561-1576.
400. Shuman, S., *Structure, mechanism, and evolution of the mRNA capping apparatus.* Prog Nucleic Acid Res Mol Biol, 2001. **66**: p. 1-40.
401. Zheng, S., et al., *Mutational analysis of Encephalitozoon cuniculi mRNA cap (guanine-N7) methyltransferase, structure of the enzyme bound to sinefungin, and evidence that cap methyltransferase is the target of sinefungin's antifungal activity.* J Biol Chem, 2006.
402. Dunyak, D.S., et al., *Deletion of individual mRNA capping genes is unexpectedly not lethal to Candida albicans and results in modified mRNA cap structures.* Eukaryot Cell, 2002. **1**(6): p. 1010-20.
403. Pei, Y., et al., *Characterization of Candida albicans RNA triphosphatase and mutational analysis of its active site.* Nucleic Acids Res, 2000. **28**(9): p. 1885-92.
404. Yamada-Okabe, T., et al., *Isolation and characterization of the Candida albicans gene for mRNA 5'-triphosphatase: association of mRNA 5'-triphosphatase and mRNA 5'-guanylyltransferase activities is essential for the function of mRNA 5'-capping enzyme in vivo.* FEBS Lett, 1998. **435**(1): p. 49-54.
405. Yamada-Okabe, T., et al., *Isolation of the mRNA-capping enzyme and ferric-reductase-related genes from Candida albicans.* Microbiology, 1996. **142**(9): p. 2515-2523.
406. Pei, Y., et al., *RNA triphosphatase is essential in Schizosaccharomyces pombe and Candida albicans.* BMC Microbiol, 2001. **1**: p. 29.
407. Pei, Y., et al., *Characterization of Schizosaccharomyces pombe RNA triphosphatase.* Nucleic Acids Res, 2001. **29**(2): p. 387-96.
408. Takagi, T., et al., *Divergent subunit interactions among fungal mRNA 5'-capping machineries.* Eukaryot Cell, 2002. **1**(3): p. 448-57.



409. Shuman, S., Y. Liu, and B. Schwer, *Covalent catalysis in nucleotidyl transfer reactions: essential motifs in Saccharomyces cerevisiae RNA capping enzyme are conserved in Schizosaccharomyces pombe and viral capping enzymes and among polynucleotide ligases*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(25): p. 12046-50.
410. Hausmann, S., C.P. Vivares, and S. Shuman, *Characterization of the mRNA capping apparatus of the microsporidian parasite Encephalitozoon cuniculi*. J Biol Chem, 2002. **277**(1): p. 96-103.
411. Ho, C.K. and S. Shuman, *A yeast-like mRNA capping apparatus in Plasmodium falciparum*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(6): p. 3050-5.
412. Gong, C., P. Smith, and S. Shuman, *Structure-function analysis of Plasmodium RNA triphosphatase and description of a triphosphate tunnel metalloenzyme superfamily that includes Cet1-like RNA triphosphatases and CYTH proteins*. Rna, 2006. **12**(8): p. 1468-74.
413. Hausmann, S., et al., *Yeast-like mRNA capping apparatus in Giardia lamblia*. J Biol Chem, 2005. **280**(13): p. 12077-86.
414. Hausmann, S. and S. Shuman, *Specificity and mechanism of RNA cap guanine-N2 methyltransferase (Tgs1)*. J Biol Chem, 2005. **280**(6): p. 4021-4.
415. Hausmann, S., et al., *Biochemical and genetic analysis of RNA cap guanine-N2 methyltransferases from Giardia lamblia and Schizosaccharomyces pombe*. Nucleic Acids Res, 2007. **35**(5): p. 1411-20.
416. Hausmann, S. and S. Shuman, *Giardia lamblia RNA cap guanine-N2 methyltransferase (Tgs2)*. J Biol Chem, 2005. **280**(37): p. 32101-6.
417. Ho, C.K. and S. Shuman, *Trypanosoma brucei RNA triphosphatase. Antiprotozoal drug target and guide to eukaryotic phylogeny*. J Biol Chem, 2001. **276**(49): p. 46182-6.
418. Gong, C., A. Martins, and S. Shuman, *Structure-function analysis of Trypanosoma brucei RNA triphosphatase and evidence for a two-metal mechanism*. J Biol Chem, 2003. **278**(51): p. 50843-52.
419. Massayuki Kikuti, C., I.L. Tersariol, and S. Schenkman, *Divalent metal requirements for catalysis and stability of the RNA triphosphatase from Trypanosoma cruzi*. Mol Biochem Parasitol, 2006. **150**(1): p. 83-95.
420. Silva, E., et al., *Trypanosome capping enzymes display a novel two-domain structure*. Mol Cell Biol, 1998. **18**(8): p. 4612-9.
421. Hall, M.P. and C.K. Ho, *Characterization of a Trypanosoma brucei RNA cap (guanine N-7) methyltransferase*. Rna, 2006. **12**(3): p. 488-97.
422. Takagi, Y., et al., *Trypanosoma brucei encodes a bifunctional capping enzyme essential for cap 4 formation on the spliced leader RNA*. J Biol Chem, 2007.
423. Hall, M.P. and C.K. Ho, *Functional characterization of a 48 kDa Trypanosoma brucei cap 2 RNA methyltransferase*. Nucleic Acids Res, 2006. **34**(19): p. 5594-602.
424. Arhin, G.K., E. Ullu, and C. Tschudi, *2'-O-methylation of position 2 of the trypanosome spliced leader cap 4 is mediated by a 48 kDa protein related to vaccinia virus VP39*. Mol Biochem Parasitol, 2006. **147**(1): p. 137-9.
425. Zamudio, J.R., et al., *Complete cap 4 formation is not required for viability in Trypanosoma brucei*. Eukaryot Cell, 2006. **5**(6): p. 905-15.
426. Arhin, G.K., et al., *A protein related to the vaccinia virus cap-specific methyltransferase VP39 is involved in cap 4 modification in Trypanosoma brucei*. Rna, 2006. **12**(1): p. 53-62.
427. Yue, Z., et al., *Mammalian capping enzyme complements mutant Saccharomyces cerevisiae lacking mRNA guanylyltransferase and selectively binds the elongating form of RNA polymerase II*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(24): p. 12898-903.
428. Wen, Y., Z. Yue, and A.J. Shatkin, *Mammalian capping enzyme binds RNA and uses protein tyrosine phosphatase mechanism*. PNAS, 1998. **95**(21): p. 12226-12231.
429. Liu, L., *Functional characterization of the C-terminal domain of mouse capping enzyme*. Cell Biochem Funct, 2006. **24**(2): p. 95-102.
430. Sawaya, R. and S. Shuman, *Mutational analysis of the guanylyltransferase component of Mammalian mRNA capping enzyme*. Biochemistry, 2003. **42**(27): p. 8240-9.
431. Martins, A. and S. Shuman, *The domain order of mammalian capping enzyme can be inverted and baculovirus phosphatase can function in cap formation in vivo*. Virology, 2002. **304**(2): p. 167-75.
432. Yamada-Okabe, T., et al., *Isolation and characterization of a human cDNA for mRNA 5'-capping enzyme*. Nucleic Acids Res, 1998. **26**(7): p. 1700-6.
433. Tsukamoto, T., et al., *Cloning and characterization of two human cDNAs encoding the mRNA capping enzyme*. Biochem Biophys Res Commun, 1998. **243**(1): p. 101-8.
434. Tsukamoto, T., et al., *Cloning and characterization of three human cDNAs encoding mRNA (guanine-7-)-methyltransferase, an mRNA cap methylase*. Biochem Biophys Res Commun, 1998. **251**(1): p. 27-34.

435. Wen, Y. and A.J. Shatkin, *Cap methyltransferase selective binding and methylation of GpppG-RNA are stimulated by importin-alpha*. *Genes Dev*, 2000. **14**(23): p. 2944-9.
436. Shafer, B., C. Chu, and A.J. Shatkin, *Human mRNA cap methyltransferase: alternative nuclear localization signal motifs ensure nuclear localization required for viability*. *Mol Cell Biol*, 2005. **25**(7): p. 2644-9.
437. Yokoska, J., et al., *Cloning and characterization of mRNA capping enzyme and mRNA (Guanine-7-)-methyltransferase cDNAs from Xenopus laevis*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000. **268**(2): p. 617-24.
438. Takagi, T., et al., *The Caenorhabditis elegans mRNA 5'-capping enzyme. In vitro and in vivo characterization*. *J Biol Chem*, 2003. **278**(16): p. 14174-84.
439. Srinivasan, P., F. Piano, and A.J. Shatkin, *mRNA capping enzyme requirement for Caenorhabditis elegans viability*. *J Biol Chem*, 2003. **278**(16): p. 14168-73.
440. Takagi, T., et al., *An RNA 5'-triphosphatase related to the protein tyrosine phosphatases*. *Cell*, 1997. **89**(6): p. 867-73.
441. Ho, C.K., C. Gong, and S. Shuman, *RNA triphosphatase component of the mRNA capping apparatus of Paramecium bursaria Chlorella virus 1*. *J Virol*, 2001. **75**(4): p. 1744-50.
442. Ho, C.K., J.L. Van Etten, and S. Shuman, *Expression and characterization of an RNA capping enzyme encoded by Chlorella virus PBCV-1*. *J. Virol.*, 1996. **70**(10): p. 6658-6664.
443. Doherty, A.J., et al., *Crystallization of the RNA guanylyltransferase of Chlorella virus PBCV-1*. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 1997. **53**(Pt 4): p. 482-4.
444. Moss, B., *Poxviridae: the viruses and their replication*. in: *Fields Virology 4th ed.*, Lippincott Williams & Wilkins, 2001: p. 2849-2883.
445. Myette, J.R. and E.G. Niles, *Domain Structure of the Vaccinia Virus mRNA Capping Enzyme*. *J. Biol. Chem.*, 1996. **271**(20): p. 11936-11944.
446. Higman, M.A., N. Bourgeois, and E.G. Niles, *The vaccinia virus mRNA (guanine-N7-)-methyltransferase requires both subunits of the mRNA capping enzyme for activity*. *J Biol Chem*, 1992. **267**(23): p. 16430-7.
447. Myette, J.R. and E.G. Niles, *Characterization of the vaccinia virus RNA 5'-triphosphatase and nucleotide triphosphate phosphohydrolase activities. Demonstrate that both activities are carried out at the same active site*. *J Biol Chem*, 1996. **271**(20): p. 11945-52.
448. Gong, C. and S. Shuman, *Mapping the active site of vaccinia virus RNA triphosphatase*. *Virology*, 2003. **309**(1): p. 125-34.
449. Yu, L., et al., *Structure-function analysis of the triphosphatase component of vaccinia virus mRNA capping enzyme*. *J Virol*, 1997. **71**(12): p. 9837-43.
450. Ho, C.K., A. Martins, and S. Shuman, *A yeast-based genetic system for functional analysis of viral mRNA capping enzymes*. *J Virol*, 2000. **74**(12): p. 5486-94.
451. Yu, L. and S. Shuman, *Mutational analysis of the RNA triphosphatase component of vaccinia virus mRNA capping enzyme*. *J Virol*, 1996. **70**(9): p. 6162-8.
452. Cong, P. and S. Shuman, *Covalent catalysis in nucleotidyl transfer. A KTDG motif essential for enzyme-GMP complex formation by mRNA capping enzyme is conserved at the active sites of RNA and DNA ligases*. *J Biol Chem*, 1993. **268**(10): p. 7256-60.
453. Cong, P. and S. Shuman, *Mutational analysis of mRNA capping enzyme identifies amino acids involved in GTP binding, enzyme-guanylate formation, and GMP transfer to RNA*. *Mol Cell Biol*, 1995. **15**(11): p. 6222-31.
454. Higman, M.A. and E.G. Niles, *Location of the S-adenosyl-L-methionine binding region of the vaccinia virus mRNA (guanine-7-)-methyltransferase*. *J Biol Chem*, 1994. **269**(21): p. 14982-7.
455. Saha, N., S. Shuman, and B. Schwer, *Yeast-based genetic system for functional analysis of poxvirus mRNA cap methyltransferase*. *J Virol*, 2003. **77**(13): p. 7300-7.
456. Mao, X. and S. Shuman, *Intrinsic RNA (guanine-7) methyltransferase activity of the vaccinia virus capping enzyme D1 subunit is stimulated by the D12 subunit. Identification of amino acid residues in the D1 protein required for subunit association and methyl group transfer*. *J Biol Chem*, 1994. **269**(39): p. 24472-9.
457. Higman, M.A., L.A. Christen, and E.G. Niles, *The mRNA (guanine-7-)-methyltransferase domain of the vaccinia virus mRNA capping enzyme. Expression in Escherichia coli and structural and kinetic comparison to the intact capping enzyme*. *J Biol Chem*, 1994. **269**(21): p. 14974-81.
458. Mao, X. and S. Shuman, *Vaccinia virus mRNA (guanine-7-)-methyltransferase: mutational effects on cap methylation and AdoHcy-dependent photo-cross-linking of the cap to the methyl acceptor site*. *Biochemistry*, 1996. **35**(21): p. 6900-10.

459. Schwer, B., et al., *Poxvirus mRNA cap methyltransferase. Bypass of the requirement for the stimulatory subunit by mutations in the catalytic subunit and evidence for intersubunit allostery*. J Biol Chem, 2006. **281**(28): p. 18953-60.
460. Saha, N. and S. Shuman, *Effects of alanine cluster mutations in the D12 subunit of vaccinia virus mRNA (guanine-N7) methyltransferase*. Virology, 2001. **287**(1): p. 40-8.
461. Schwer, B. and S. Shuman, *Genetic analysis of poxvirus mRNA cap methyltransferase: suppression of conditional mutations in the stimulatory D12 subunit by second-site mutations in the catalytic D1 subunit*. Virology, 2006. **352**(1): p. 145-56.
462. Cong, P. and S. Shuman, *Methyltransferase and subunit association domains of vaccinia virus mRNA capping enzyme*. J Biol Chem, 1992. **267**(23): p. 16424-9.
463. Dixon, L.K., et al., *African swine fever virus proteins involved in evading host defence systems*. Vet Immunol Immunopathol, 2004. **100**(3-4): p. 117-34.
464. Pena, L., et al., *African swine fever virus guanylyltransferase*. Virology, 1993. **193**(1): p. 319-28.
465. Li, Y.I., et al., *Characterization of the AdoMet-dependent guanylyltransferase activity that is associated with the N terminus of bamboo mosaic virus replicase*. J Virol, 2001. **75**(2): p. 782-8.
466. Li, Y.I., et al., *The helicase-like domain of plant potexvirus replicase participates in formation of RNA 5' cap structure by exhibiting RNA 5'-triphosphatase activity*. J Virol, 2001. **75**(24): p. 12114-20.
467. Li, Y.I., et al., *Identification and characterization of the Escherichia coli-expressed RNA-dependent RNA polymerase of bamboo mosaic virus*. J Virol, 1998. **72**(12): p. 10093-9.
468. Rozanov, M.N., E.V. Koonin, and A.E. Gorbalenya, *Conservation of the putative methyltransferase domain: a hallmark of the 'Sindbis-like' supergroup of positive-strand RNA viruses*. J Gen Virol, 1992. **73** ( Pt 8): p. 2129-34.
469. Huang, Y.L., et al., *mRNA guanylation catalyzed by the S-adenosylmethionine-dependent guanylyltransferase of bamboo mosaic virus*. J Biol Chem, 2005. **280**(13): p. 13153-62.
470. Huang, Y.L., et al., *Critical residues for GTP methylation and formation of the covalent m7GMP-enzyme intermediate in the capping enzyme domain of bamboo mosaic virus*. J Virol, 2004. **78**(3): p. 1271-80.
471. Ahola, T. and L. Kaariainen, *Reaction in alphavirus mRNA capping: formation of a covalent complex of nonstructural protein nsP1 with 7-methyl-GMP*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(2): p. 507-11.
472. Wang, H.L., J. O'Rear, and V. Stollar, *Mutagenesis of the Sindbis virus nsP1 protein: effects on methyltransferase activity and viral infectivity*. Virology, 1996. **217**(2): p. 527-31.
473. Vasiljeva, L., et al., *Identification of a novel function of the alphavirus capping apparatus. RNA 5'-triphosphatase activity of Nsp2*. J Biol Chem, 2000. **275**(23): p. 17281-7.
474. Dunigan, D.D. and M. Zaitlin, *Capping of tobacco mosaic virus RNA. Analysis of viral-coded guanylyltransferase-like activity*. J Biol Chem, 1990. **265**(14): p. 7779-86.
475. Merits, A., et al., *Virus-specific capping of tobacco mosaic virus RNA: methylation of GTP prior to formation of covalent complex p126-m7GMP*. FEBS Lett, 1999. **455**(1-2): p. 45-8.
476. Magden, J., et al., *Virus-specific mRNA capping enzyme encoded by hepatitis E virus*. J Virol, 2001. **75**(14): p. 6249-55.
477. Kong, F., K. Sivakumaran, and C. Kao, *The N-terminal half of the brome mosaic virus 1a protein has RNA capping-associated activities: specificity for GTP and S-adenosylmethionine*. Virology, 1999. **259**(1): p. 200-10.
478. Ahola, T. and P. Ahlquist, *Putative RNA capping activities encoded by brome mosaic virus: methylation and covalent binding of guanylate by replicase protein 1a*. J Virol, 1999. **73**(12): p. 10061-9.
479. Ahola, T., J.A. den Boon, and P. Ahlquist, *Helicase and capping enzyme active site mutations in brome mosaic virus protein 1a cause defects in template recruitment, negative-strand RNA synthesis, and viral RNA capping*. J Virol, 2000. **74**(19): p. 8803-11.
480. Laakkonen, P., et al., *Expression of Semliki Forest virus nsP1-specific methyltransferase in insect cells and in Escherichia coli*. J Virol, 1994. **68**(11): p. 7418-25.
481. Ahola, T., et al., *Critical residues of Semliki Forest virus RNA capping enzyme involved in methyltransferase and guanylyltransferase-like activities*. J Virol, 1997. **71**(1): p. 392-7.
482. Ahola, T., et al., *Semliki Forest virus mRNA capping enzyme requires association with anionic membrane phospholipids for activity*. Embo J, 1999. **18**(11): p. 3164-72.
483. Russo, P., et al., *Synthesis of Semliki Forest virus RNA polymerase components nsP1 through nsP4 in Saccharomyces cerevisiae by expression of cDNA encoding the nonstructural polyprotein*. J Virol, 1996. **70**(6): p. 4086-9.
484. Vlot, A.C., A. Menard, and J.F. Bol, *Role of the alfalfa mosaic virus methyltransferase-like domain in negative-strand RNA synthesis*. J Virol, 2002. **76**(22): p. 11321-8.

485. Seliger, L.S., K. Zheng, and A.J. Shatkin, *Complete nucleotide sequence of reovirus L2 gene and deduced amino acid sequence of viral mRNA guanylyltransferase*. J Biol Chem, 1987. **262**(34): p. 16289-93.
486. Luongo, C.L., et al., *Identification of the Guanylyltransferase Region and Active Site in Reovirus mRNA Capping Protein lambda 2*. J. Biol. Chem., 2000. **275**(4): p. 2804-2810.
487. Reinisch, K.M., M.L. Nibert, and S.C. Harrison, *Structure of the reovirus core at 3.6 Å resolution*. Nature, 2000. **404**(6781): p. 960-7.
488. Luongo, C.L., et al., *Localization of a C-terminal region of lambda2 protein in reovirus cores*. J Virol, 1997. **71**(10): p. 8035-40.
489. Cleveland, D.R., H. Zarbl, and S. Millward, *Reovirus guanylyltransferase is L2 gene product lambda 2*. J Virol, 1986. **60**(1): p. 307-11.
490. Luongo, C.L., *Mutational analysis of a mammalian reovirus mRNA capping enzyme*. Biochem Biophys Res Commun, 2002. **291**(4): p. 932-8.
491. Qiu, T. and C.L. Luongo, *Identification of two histidines necessary for reovirus mRNA guanylyltransferase activity*. Virology, 2003. **316**(2): p. 313-24.
492. Luongo, C.L., et al., *Binding site for S-adenosyl-L-methionine in a central region of mammalian reovirus lambda2 protein. Evidence for activities in mRNA cap methylation*. J Biol Chem, 1998. **273**(37): p. 23773-80.
493. Bujnicki, J.M. and L. Rychlewski, *Reassignment of specificities of two cap methyltransferase domains in the reovirus lambda 2 protein*. Genome Biol, 2001. **2**(9): p. RESEARCH0038.
494. Bisailon, M., J. Bergeron, and G. Lemay, *Characterization of the nucleoside triphosphate phosphohydrolase and helicase activities of the reovirus lambda1 protein*. J Biol Chem, 1997. **272**(29): p. 18298-303.
495. Bisailon, M. and G. Lemay, *Characterization of the reovirus lambda1 protein RNA 5'-triphosphatase activity*. J Biol Chem, 1997. **272**(47): p. 29954-7.
496. Martinez-Costas, J., R. Varela, and J. Benavente, *Endogenous enzymatic activities of the avian reovirus S1133: identification of the viral capping enzyme*. Virology, 1995. **206**(2): p. 1017-26.
497. Hsiao, J., et al., *Cloning, expression, and characterization of avian reovirus guanylyltransferase*. Virology, 2002. **296**(2): p. 288-99.
498. Mohd Jaafar, F., et al., *Identification and functional analysis of VP3, the guanylyltransferase of Banna virus (genus Seadornavirus, family Reoviridae)*. J Gen Virol, 2005. **86**(Pt 4): p. 1141-6.
499. Martinez-Costas, J., et al., *Guanylyltransferase and RNA 5'-triphosphatase activities of the purified expressed VP4 protein of bluetongue virus*. J Mol Biol, 1998. **280**(5): p. 859-66.
500. Ramadevi, N. and P. Roy, *Bluetongue virus core protein VP4 has nucleoside triphosphate phosphohydrolase activity*. J Gen Virol, 1998. **79** ( Pt 10): p. 2475-80.
501. Ramadevi, N., et al., *Capping and methylation of mRNA by purified recombinant VP4 protein of bluetongue virus*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(23): p. 13537-42.
502. Pizarro, J.L., et al., *Characterization of rotavirus guanylyltransferase activity associated with polypeptide VP3*. J Gen Virol, 1991. **72** ( Pt 2): p. 325-32.
503. Patton, J.T. and D. Chen, *RNA-binding and capping activities of proteins in rotavirus open cores*. J Virol, 1999. **73**(2): p. 1382-91.
504. Cook, J.P. and M.A. McCrae, *Sequence analysis of the guanylyltransferase (VP3) of group A rotaviruses*. J Gen Virol, 2004. **85**(Pt 4): p. 929-32.
505. Chen, D., et al., *Rotavirus open cores catalyze 5'-capping and methylation of exogenous RNA: evidence that VP3 is a methyltransferase*. Virology, 1999. **265**(1): p. 120-30.
506. Vasquez-Del Carprio, R., et al., *Histidine triad-like motif of the rotavirus NSP2 octamer mediates both RTPase and NTPase activities*. J Mol Biol, 2006. **362**(3): p. 539-54.
507. Jiang, X., et al., *Cryoelectron microscopy structures of rotavirus NSP2-NSP5 and NSP2-RNA complexes: implications for genome replication*. J Virol, 2006. **80**(21): p. 10829-35.
508. Spies, U. and H. Muller, *Demonstration of enzyme activities required for cap structure formation in infectious bursal disease virus, a member of the birnavirus group*. J Gen Virol, 1990. **71** ( Pt 4): p. 977-81.
509. Bartelma, G. and R. Padmanabhan, *Expression, purification, and characterization of the RNA 5'-triphosphatase activity of dengue virus type 2 nonstructural protein 3*. Virology, 2002. **299**(1): p. 122-32.
510. Wengler, G. and G. Wengler, *The NS 3 nonstructural protein of flaviviruses contains an RNA triphosphatase activity*. Virology, 1993. **197**(1): p. 265-73.
511. Benarroch, D., et al., *The RNA helicase, nucleotide 5'-triphosphatase, and RNA 5'-triphosphatase activities of Dengue virus protein NS3 are Mg<sup>2+</sup>-dependent and require a functional Walker B motif in the helicase catalytic core*. Virology, 2004. **328**(2): p. 208-18.

512. Yon, C., et al., *Modulation of the nucleoside triphosphatase/RNA helicase and 5'-RNA triphosphatase activities of Dengue virus type 2 nonstructural protein 3 (NS3) by interaction with NS5, the RNA-dependent RNA polymerase*. J Biol Chem, 2005. **280**(29): p. 27412-9.
513. Egloff, M.P., et al., *An RNA cap (nucleoside-2'-O)-methyltransferase in the flavivirus RNA polymerase NS5: crystal structure and functional characterization*. Embo J, 2002. **21**(11): p. 2757-68.
514. Ray, D., et al., *West Nile virus 5'-cap structure is formed by sequential guanine N-7 and ribose 2'-O methylations by nonstructural protein 5*. J Virol, 2006. **80**(17): p. 8362-70.
515. Zhou, Y., et al., *Structure and function of flavivirus NS5 methyltransferase*. J Virol, 2007. **81**(8): p. 3891-903.
516. Guarino, L.A. and M. Smith, *Regulation of delayed-early gene transcription by dual TATA boxes*. J Virol, 1992. **66**(6): p. 3733-9.
517. Guarino, L.A., et al., *A virus-encoded RNA polymerase purified from baculovirus-infected cells*. J Virol, 1998. **72**(10): p. 7985-91.
518. Jin, J., W. Dong, and L.A. Guarino, *The LEF-4 Subunit of Baculovirus RNA Polymerase Has RNA 5'-Triphosphatase and ATPase Activities*. J. Virol., 1998. **72**(12): p. 10011-10019.
519. Guarino, L.A., J. Jin, and W. Dong, *Guanylyltransferase activity of the LEF-4 subunit of baculovirus RNA polymerase*. J Virol, 1998. **72**(12): p. 10003-10.
520. Knebel-Morsdorf, D., et al., *Expression of baculovirus late and very late genes depends on LEF-4, a component of the viral RNA polymerase whose guanylyltransferase function is essential*. J Virol, 2006. **80**(8): p. 4168-73.
521. Martins, A. and S. Shuman, *Mutational analysis of baculovirus capping enzyme Lef4 delineates an autonomous triphosphatase domain and structural determinants of divalent cation specificity*. J Biol Chem, 2001. **276**(49): p. 45522-9.
522. Martins, A. and S. Shuman, *Mapping the triphosphatase active site of baculovirus mRNA capping enzyme LEF4 and evidence for a two-metal mechanism*. Nucleic Acids Res, 2003. **31**(5): p. 1455-63.
523. Gross, C.H. and S. Shuman, *RNA 5'-triphosphatase, nucleoside triphosphatase, and guanylyltransferase activities of baculovirus LEF-4 protein*. J Virol, 1998. **72**(12): p. 10020-8.
524. Wu, X. and L.A. Guarino, *Autographa californica nucleopolyhedrovirus orf69 encodes an RNA cap (nucleoside-2'-O)-methyltransferase*. J Virol, 2003. **77**(6): p. 3430-40.
525. Rose, J. and M. Whitt, *Rhabdoviridae: the viruses and their replication*. In: Knipe, D.M., Howley, P.M. (Eds.), *Fundamental Virology*, 4th ed., 2001. **Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia**: p. 665-688.
526. Emerson, S.U. and Y. Yu, *Both NS and L proteins are required for in vitro RNA synthesis by vesicular stomatitis virus*. J Virol, 1975. **15**(6): p. 1348-56.
527. Hunt, D.M. and K.L. Hutchinson, *Amino acid changes in the L polymerase protein of vesicular stomatitis virus which confer aberrant polyadenylation and temperature-sensitive phenotypes*. Virology, 1993. **193**(2): p. 786-93.
528. Grdzlishvili, V.Z., et al., *A single amino acid change in the L-polymerase protein of vesicular stomatitis virus completely abolishes viral mRNA cap methylation*. J Virol, 2005. **79**(12): p. 7327-37.
529. Li, J., E.C. Fontaine-Rodriguez, and S.P. Whelan, *Amino acid residues within conserved domain VI of the vesicular stomatitis virus large polymerase protein essential for mRNA cap methyltransferase activity*. J Virol, 2005. **79**(21): p. 13373-84.
530. Grdzlishvili, V.Z., et al., *Identification of a new region in the vesicular stomatitis virus L polymerase protein which is essential for mRNA cap methylation*. Virology, 2006. **350**(2): p. 394-405.
531. Ferron, F., et al., *Viral RNA-polymerases -- a predicted 2'-O-ribose methyltransferase domain shared by all Mononegavirales*. Trends Biochem Sci, 2002. **27**(5): p. 222-4.
532. Ogino, T., et al., *Sendai virus RNA-dependent RNA polymerase L protein catalyzes cap methylation of virus-specific mRNA*. J Biol Chem, 2005. **280**(6): p. 4429-35.
533. Hammond, D.C. and J.A. Lesnaw, *The fates of undermethylated mRNA cap structures of vesicular stomatitis virus (New Jersey) during in vitro transcription*. Virology, 1987. **159**(2): p. 229-36.
534. Moyer, S.A., *Alteration of the 5' terminal caps of the mRNAs of vesicular stomatitis virus by cycloleucine in vivo*. Virology, 1981. **112**(1): p. 157-68.
535. Testa, D. and A.K. Banerjee, *Two methyltransferase activities in the purified virions of vesicular stomatitis virus*. J Virol, 1977. **24**(3): p. 786-93.
536. Li, J., J.S. Chorba, and S.P. Whelan, *Vesicular stomatitis viruses resistant to the methylase inhibitor sinefungin upregulate RNA synthesis and reveal mutations that affect mRNA cap methylation*. J Virol, 2007. **81**(8): p. 4104-15.
537. Bourhy, H., B. Kissi, and N. Tordo, *Molecular diversity of the Lyssavirus genus*. Virology, 1993. **194**(1): p. 70-81.

538. McWilliam, S.M., et al., *Genome organization and transcription strategy in the complex GNS-L intergenic region of bovine ephemeral fever rhabdovirus*. *J Gen Virol*, 1997. **78 ( Pt 6)**: p. 1309-17.
539. Hoffmann, B., H. Schutze, and T.C. Mettenleiter, *Determination of the complete genomic sequence and analysis of the gene products of the virus of Spring Viremia of Carp, a fish rhabdovirus*. *Virus Res*, 2002. **84**(1-2): p. 89-100.
540. Stillman, E.A. and M.A. Whitt, *Mutational analyses of the intergenic dinucleotide and the transcriptional start sequence of vesicular stomatitis virus (VSV) define sequences required for efficient termination and initiation of VSV transcripts*. *J Virol*, 1997. **71**(3): p. 2127-37.