Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta

CHARAKTERIZACE DSRNA VIRU KVASINKOVITÉHO ORGANIZMU *Dipodascus magnusii*

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MARTIN MOKREJŠ

22. září 2000

Vedoucí diplomové práce: RNDr. Martin Pospíšek, PhD.

Děkuji svému školiteli RNDr. Martinu Pospíškovi, PhD. nejen za cenné rady a trpělivost během mé práce v laboratoři, ale také za trpělivost při korekturách této práce. Dále všem členům katedry, kteří mne podporovali a pomáhali mi při práci během studia. Zejména však doc. Jitce Forstové a doc. Zdeně Palkové za zapůjčení některých přístrojů a další všestrannou pomoc. RNDr. Blance Zikánové děkuji za cenné mikrobiologické konzultace a neustálou morální podporu. Zvláštní poděkování patří Dr. Bastianovi Hengererovi z firmy Novartis Pharma AG (Basilej) za šestiměsíční studijní pobyt v jeho laboratoři, který ovlivnil moji práci na tomto tématu. Po vzoru Dr. Bastiana Hengerera a jeho testů v mikrotitračních destičkách, sloužících k vyhledávání určitých typů látek mezi desetitisíci vzorků substancí, jsem se pokusil vytvořit podobnou metodu umožňující vyhledávání kmenů *Dipodascus magnusii* neprodukujících inhibitor do kultivačního média. Chtěl bych také poděkovat rodičům a všem přátelům za jejich neméně důležitou podporu a pochopení.

Martin Mokrejš

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracoval samostatně a že uvádím veškerou literaturu, kterou jsem při jejím zpracování používal. Souhlasím s jejím zapůjčením ke studijním účelům.

Martin Mokrejš

Obsah

1 Úvod **8**

2 Literární přehled **9**

2.1 Systém dsRNA virů hub 10
2.1.1 *Totiviridae* 10
2.1.1.1 *Totivirus* 10
2.1.1.1.1 L-A virus *Saccharomyces cerevisiae* (ScV-L-A) 11
2.1.1.1.1.1 Varianty ScV-L-A 12
2.1.1.1.1.2 Replikace, transkripce a kompletace virionů 15
2.1.1.1.1.3 Sekundární struktury RNA totivirů 18
2.1.1.1.1.4 Hostitelské geny ve vztahu k biologii dsRNA virů 25
2.1.1.1.1.5 Buněčný antivirový systém 31
2.1.1.1.1.6 Vznik virových proteinů 35
2.1.1.1.1.7 X dsRNA – deleční derivát ScV-L-A 37
2.1.1.1.1.8 Satelitní dsRNA viru ScV-L-A a jejich deleční deriváty 37
2.1.1.1.1.8.1 M1 dsRNA – satelitní dsRNA ScV-L-A 38
2.1.1.1.1.8.1.1 S dsRNA – deleční derivát M1 dsRNA 42
2.1.1.1.1.8.2 M2 dsRNA – satelitní dsRNA ScV-L-A 43
2.1.1.1.1.8.2.1 NS dsRNA – deleční derivát M2 dsRNA 45
2.1.1.1.1.8.3 M28 dsRNA – satelitní dsRNA ScV-L-A 45
2.1.1.1.2 L-BC virus *Saccharomyces cerevisiae* (ScV-L-BC) 46
2.1.1.1.3 *Ustilago maydis* dsRNA virus 46
2.1.1.1.4 *Hanseniaspora uvarum* virus (HuV) 47
2.1.1.1.5 *Helmintosporium victoriae* 190S virus (HvV-190S) 48
2.1.1.1.6 *Zygosaccharomyces bailii* virus 49
2.1.1.1.7 Virus kvasinkovitého organizmu *Dipodascus magnusii* 50
2.1.1.2 *Giardiavirus* 50
2.1.1.2.1 *Giardia lamblia* virus (GlV) 50
2.1.1.3 *Leishmaniavirus* 51
2.1.1.3.1 *Leishmania* virus 1 (LRV1) 51
2.1.2 *Partitiviridae* 52

2.1.2.1 *Partitivirus* 52
2.1.2.2 *Chrysovirus* 52
2.1.3 *Hypoviridae* 52
2.1.3.1 *Hypovirus* 53
2.1.4 *Barnaviridae* 54
2.1.5 Taxonomicky nezařazené dsRNA viry a T a W dsRNA *S. cerevisiae* 54
2.1.5.1 T a W dsRNA 55
2.1.5.1.1 W dsRNA (20S RNA) 55
2.1.5.1.2 T dsRNA (23S RNA) 56
2.2 Teoretické přístupy při studiu sekundárních struktur nukleových kyselin 57
2.2.1 Sekundární struktury 57
2.2.1.1 Schematické zobrazení sekundárních struktur 60
2.2.1.2 Teoretické přístupy ke studiu sekundárních struktur nukleových kyselin 64
2.2.1.2.1 Programové prostředky 64
2.2.1.2.1.1 Mfold 64
2.2.1.2.1.2 GCG package 65
2.2.1.2.1.3 Vienna package 65
2.2.1.2.1.4 cove – Covariance models 65
2.2.1.2.1.5 pfrali 66

3 Materiál a metody **68**
3.1 Použité kmeny kvasinek 68
3.2 Chemikálie, roztoky a kultivační média 68
3.2.1 Chemikálie 68
3.2.2 Roztoky 68
3.2.3 Kultivační média 69
3.3 Metody 69
3.3.1 Kultivace 69
3.3.2 Detekce toxinu 69
3.3.2.1 Čárkový test 69
3.3.2.2 Komínkový test 69
3.3.2.3 Test v mikrotitrační destičce 69
3.3.3 Léčení infikovaného kmene kvasinky 70
3.3.3.1 Iradiace UV zářením 70
3.3.3.2 Léčení 5–fluorouracilem 70
3.3.4 Detekce dsRNA v biomase 70
3.3.5 Izolace virových částic 71
3.3.5.1 Izolace virových částic následovaná izopyknickou centrifugací 71
3.3.5.1.1 Mrazová izolace viru 71
3.3.5.1.1.1 Isopyknická centrifugace v gradientu CsCl 71

3.3.5.2 Chromatografická separace virových částic 73
3.3.6 Srážení proteinů pomocí etanol–chloroformové metody 73
3.3.7 Separace nukleových kyselin v agarózovém gelu 73
3.3.8 Separace proteinů pomocí elektroforézy v PAA gelu 74
3.4 Použité programy, nastavení parametrů, způsob využití 74

4 Výsledky **75**
4.1 Mikrobiologická charakterizace používaných kmenů
Dipodascus magnusii a *Pichia anomala* 75
4.1.1 Růstové křivky třepaných kultur v závislosti na teplotě 75
4.1.2 Distribuční křivka inhibitoru produkovaného do média v čase a jeho stabilita v čase 77
4.2 Výběr vhodných kmenů *Hansenula* sp. citlivých na přítomnost inhibitoru 77
4.3 Výběr vhodných testovacích postupů pro vyhledávání odléčených kmenů *D. magnusii* 78
4.3.1 Čárkový test 78
4.3.2 Komínkový test 78
4.3.3 Test aktivity inhibitoru v médiu v mikrotitrační destičce 80
4.4 Odléčování 98
4.4.1 UV iradiace 98
4.4.2 5–fluorouracil 98
4.4.3 Chromatografická separace virových částic 100
4.5 Izolace a charakterizace viru 105
4.5.1 Mrazová izolace viru s následnou centrifugací v izopyknickém gradientu CsCl . . 105
4.6 Modelování sekundárních struktur dsRNA virů 115

5 Diskuse **117**
5.1 Mikrobiologická charakterizace používaného kmene *Dipodascus magnusii* 117
5.2 Výběr vhodných kmenů *Hansenula* sp. citlivých na přítomnost inhibitoru 117
5.3 Výběr vhodných testovacích postupů pro vyhledávání kmenů *D. magnusii* (ne)produkujících inhibitor 117
5.4 Test přítomnosti inhibitoru v médiu v mikrotitrační destičce 118
5.5 Odléčování od dsRNA nebo produkce inhibitoru 120
5.6 Izolace a charakterizace viru 121
5.6.1 Mrazová izolace viru s následnou centrifugací v izopyknickém gradientu CsCl . . 121
5.6.2 Chromatografická separace virových částic 122
5.7 Modelování sekundárních struktur dsRNA virů 122

6 Závěr **123**

7 Seznam použité literatury **125**

8 Seznam použitých zkratek, tabulek a obrázků **149**

A Abstrakt přednášky na konferenci Tomáškovy dny **153**

B Sekvence dsRNA virů a jejich satelitních dsRNA v databázi GenBank 154

Kapitola 1

Úvod

Houbové viry se vyskytují v izolátech hub z přírody ale také v průmyslově využívaných kmenech kvasinek. Jsou známy mykoviry, které modulují patogenicitu infekčních hub. Některé houby včetně jednobuněčných kvasinek kódují a produkují toxiny na bázi proteinů. S některými houbovými dsRNA viry jsou asociovány dsRNA molekuly, které mohou rovněž kódovat proteinové toxiny a případně tak doplnit spektrum toxinů kódovaných genomem vlastní houby. Z produkce nějakého toxinu studovaným kmenem houby ani ze současné přítomnosti dsRNA viru nebo samotné dsRNA uvnitř buňky nelze předem odhadnout, zda je toxin kódován jaderně, virově nebo s virem asociovanou dsRNA. Samotná detekce toxinu závisí na vhodné volbě citlivého mikroorganizmu. V praxi to znamená, že o existenci možná mnoha toxinů nevíme jen proto, že neznáme spektrum citlivých organizmů.

Cílem mé práce bylo pokusit se objasnit některé biologické vlastnosti dsRNA viru kvasinkovitého organizmu *Dipodascus magnusii*, řazeného dříve do rodu *Endomyces*. Hledat vhodné podmínky pro růst kmene, detekci inhibitoru produkovaného kvasinkovitým organizmem *Dipodascus magnusii* a hledat kmeny rodu *Pichia* (*Hansenula*) co nejvíce citlivé k produkovanému inhibitoru. Dále se pokusit zbavit buňky *Dipodascus magnusii* cytoplazmatického viru (případně je zbavit produkce inhibitoru a objasnit tak možnou souvislost mezi přítomností viru v buňce a produkcí inhibitoru), pokusit se virus purifikovat a dále jej molekulárně-biologickými metodami popsat. Dílčím cílem bylo zavedení techniky modelování sekundárních struktur nukleových kyselin v naší laboratoři.

Kapitola 2

Literární přehled

První houbový dsRNA virus byl nalezen v roce 1948 jako původce nemoci žampiónů *Agaricus bisporus* na farmě bratří La Franceových v Pennsylvánii (angl. La France Disease). Tento virus i v současnosti stále způsobuje velké ekonomické ztráty při celosvětové produkci žampiónů. Hollings (1962) pozoroval 3 rozdílné typy virových částic v mycéliu. Následně byl objeven fenomén "killer" [1] toxinů produkovaných kvasinkou *Saccharomyces cerevisiae* (Bewan a Makower, 1963) a objeveny virům podobné částice (angl. virus-like particles) u rodů *Penicillium* a *Aspergillus* (Ellis *et al.*, 1967; Banks *et al.*, 1969a,b; Banks *et al.*, 1970). Puhalla (1968) publikoval obdobný fenomén u sněti (angl. smut) *Ustilago maydis*. Byly nalezeny dsRNA zodpovědné za cytoplazmatickou dědičnost "killer" fenotypu (Berry a Bevan, 1972) u kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*. V práci prokazující souvislost mezi přítomností dsRNA a "killer" fenotypem zmiňuje Bevan *et al.* (1973) virům podobné částice o průměru 39,2 nm v post-mitochondriálních supernatantových frakcích "killer" kmenů *Saccharomyces cerevisiae*.

dsRNA viry hub jsou nejvíce probádanou skupinou houbových virů (mykovirů). Předpokládá se, že **viry hub se šíří cytoplazmaticky při dělení buněk, hyfálními anastomózami, pohlavními a nepohlavními sporami**. V životním cyklu houbových virů **nejsou známa mimobuněčná stadia**. Přítomnost dsRNA virů v buňce se nemusí fenotypicky projevovat (Ghabrial, 1994). Nejen díky přítomnosti buněčné stěny jako fyzické bariéry možného přenosu viru ale i díky časté sporulaci a párování v životním cyklu hub, se jeví mimobuněčný přenos těchto virů jako nepravděpodobný (Wickner, 1996; Magliani *et al.*, 1997).

Kvasinka *Saccharomyces cerevisiae* **může být infikována až dvěma cytoplazmatickými viry**, označovanými ScV-L-A a ScV-L-BC. Přítomnost těchto virů v buňce nezpůsobuje zpomalení růstu buňky ani její lyzi. Naopak, oba se stabilně replikují a to jak v kmenech infikovaných pouze jedním z nich, tak i v kmenech infikovaných oběma viry zároveň (Wickner, 1996).

Jsou známy dsRNA, které jsou díku svým *cis* signálům replikovány virovými polymerázami a baleny virem kódovanými proteiny do virům podobných částic (např. 3 typy M dsRNA kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* — označujeme je jako **satelitní dsRNA** L-A viru *S. cerevisiae*). Tyto satelitní dsRNA (M1, M2, M28) napodobují virové RNA a na úkor viru se množí (nicméně jsou na něm replikačně závislé).

[1] Anglické slovo *killer* znamená zabiják, zabijácký. V dalším textu používám slova "killer" a "superkiller" v případě fenotypického popisu kmene, nebo při zdůraznění účinku toxinu ("killer toxin").

Jejich vznik není jasný. Navíc existují deleční deriváty těchto satelitních dsRNA, které označujeme jako **defektní interferující dsRNA**, protože si zachovaly některé důležité *cis* sekvence původních dsRNA a tak jsou schopny se enkapsidovat do virových částic stejně dobře, jako původní dsRNA (např. X a S dsRNA vzniklé delecí L-A resp. M1 dsRNA, viz dále). Přívlastek interferující dsRNA mají proto, že obsahují pozměněné *cis* sekvence takovým způsobem, že jsou dokonce přednostně baleny do virových partikulí a tak interferují s procesy sloužícími k množení původní satelitní dsRNA a vlastního viru [2]. Existuje ještě deleční derivát L-A dsRNA (t.j. dsRNA viru ScV-L-A), označovaný jako X dsRNA. X dsRNA si obdobně jako S dsRNA zachovala důležité *cis* sekvence a úspěšně existuje v buňkách *S. cerevisiae* současně s L-A virem. Ačkoli X a S dsRNA mají rozdílný původ a M dsRNA jsou 3 různých typů, všechny tyto dsRNA jsou existenčně závislé na přítomnosti L-A viru v buňce a vykazují mnoho podobností, včetně shodných závislostí na některých hostitelských genech (viz kapitola 2.1.1.1.1.4). V případě totivirů, které mají nesegmentovaný genom, používáme termíny **pomocný virus** (angl. helper virus) a jeho **satelitní dsRNA**, např. M1 dsRNA je satelitní RNA viru ScV-L-A [3].

2.1 Systém dsRNA virů hub

Systematicky lze rozdělit dsRNA viry hub na několik čeledí: *Totiviridae* (Ghabrial *et al.*, 1995a), *Partitiviridae* (Ghabrial *et al.*, 1995b), *Hypoviridae* (Hillman *et al.*, 1995), *Barnaviridae* (Romaine, 1995)

2.1.1 *Totiviridae*

(Wickner, 1996, Ghabrial *et al.*, 1995a; Ghabrial 1994)

Obsahuje monopartitní viry s nesegmentovaným genomem tvořeným jedinou, lineární molekulou dsRNA o velikosti 4,6–7,0 kbp. Isometrické neobalené viriony mají průměr 40–43 nm a obsahují jeden hlavní kapsidový protein o velikosti 70–100 kDa. Virová RNA dependentní RNA polymeráza (Fujimura a Wickner, 1988a; Icho a Wickner, 1989) vzniká jako fúzní protein polypeptidů Gag a Pol (Dinman *et al.*, 1991; Tu *et al.*, 1992), ačkoli nejnovější poznatky ukazují, že RNA dependentní RNA polymeráza (dále jen RDRP) viru 190S *Helmintosporium victoriae* výjimečně nevzniká jako fúzní protein, viz dále (Soldevila a Ghabrial, 2000). Replikace genomu je konzervativní. Čeleď se dělí na rody *Totivirus*, *Giardiavirus*, *Leishmaniavirus*, viz příslušné kapitoly.

2.1.1.1 *Totivirus*

Typovým druhem je virus L-A kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* (ScV-L-A) (Bevan *et al.*, 1973; Ghabrial, 1994). Dalšími zástupci jsou:

- L-BC virus *Saccharomyces cerevisiae* (ScV-L-BC) (Sommer a Wickner, 1982a; Fujimura *et al.*, 1986; Park *et al.*, 1996a)
- 190S virus *Helmintosporium victoriae* (HvV-190S)

[2] S dsRNA vznikla delecí části M1 dsRNA a díky interferenci s replikací M1 dsRNA dochází k postupné eliminaci M1 dsRNA z buňky (v buňce pak zůstává jen L-A dsRNA a S dsRNA).

[3] Jiná terminologie se používá u partitivirů, které mají bipartitní genomem a proto hovoříme o dsRNA segmentech (Ghabrial, 1994).

- viry 1, 4, 6 *Ustilago maydis* (UmV-P1, UmV-P4, UmV-P6).
- viry SsRV1 a SsRV2 *Sphaeropsis sapinea* (Preisig *et al.*, 1998)

Předběžně jsou do rodu *Totivirus zařazeny*:

- virus S *Aspergillus foetidus* (AfV-S) (Banks *et al.*, 1970; Ratti a Buck, 1975, 1978; Buck a Ratti, 1975, 1977)
- virus S *Aspergillus niger* (AnV-S) (Varga *et al.*, 1994)
- virus 87-1-H *Gaeumannomyces graminis* (GgV-87-1-H) (Jamil a Buck, 1986)
- virus *Mycogone perniciosa* (MpV)
- *Yarrowia lipolytica* (YlV) (Groves *et al.*, 1983; Tréton *et al.*, 1985; El-Sherbeini *et al.*, 1987).

Pravděpodobně budou do tohoto rodu patřit i mykoviry nalezené u *Wickerhamia fluorescens*, *Dipodascus (Endomyces) magnusii*, *Zygosaccharomyces bailii*.

Totiviry mají neobalené isometrické viriony o průměru 40–43 nm. Odhadovaná relativní molekulová hmotnost M_r virových částic ScV-L-A je 12,3 x 10^6. Sedimentační koeficient S(20,w) plných virových částic nabývá hodnot v rozmezí 160–190 S, virové obaly bez RNA v rozmezí 98–113 S. Vznášivá hustota virionů ρ při centrifugaci v CsCl se pohybuje mezi 1,40–1,43 g/cm^3. Viriony obsahující satelitní nebo defektní dsRNA mají jiný sedimentační koeficient a vznášivou hustotu. Například, lehké viriony obsahující 1 molekulu satelitní M1 dsRNA viru *Saccharomyces cerevisiae* (ScV-L-A) mají vznášivou hustotu 1,3513 g/cm^3. Těžké viriony obsahující 2 molekuly téže dsRNA mají vznášivou hustotu 1,3834 g/cm^3 (Esteban a Wickner, 1986; Ghabrial 1994, Ghabrial *et al.*, 1995a).

Kapsida totivirů je složena z **kapsidového proteinu** (angl. capsid protein) o molekulové hmotnosti 73–100 kDa a **RNA dependentní RNA polymerázy** (dále jen RDRP) o hmotnosti 92–170 kDa. RDRP vzniká buď jako fúzní protein hlavního kapsidového proteinu Gag a proteinu polymerázy Pol (např. L-A virus *Saccharomyces cerevisiae*), nebo je celá kódována vlastním čtecím rámcem (např. 190S virus *Helminstosporium victoriae*).

Ikosaedrické viriony virů ScV-L-A a UmV-P4 mají průměr 42 nm a jsou složené ze 12 pentonů. Každý penton obsahuje 10 podjenotek složených do 2 pětic. V povrchu virionů je 60 pórů o průměru 1,5 nm, které zřejmě slouží pro vstup prekurzorů syntézy RNA, případných kofaktorů potřebných k činnosti polymerázy a pro uvolnění mRNA transkriptů. Viriony jsou složeny ze **120 molekul Gag proteinu**, základní strukturní jednotkou je asymetrický dimer Gag proteinu (Castón *et al.*, 1997; Cheng *et al.*, 1994; Wickner, 1996). Díky dimerizaci Gag proteinu je **ikosaedr tvořen 60 stavebními molekulami a má tedy $T1$ symetrii** [4] Ukázalo se, že i další viry mají $T = 1$ symetrii a zároveň kapsidy složené ze 120 molekul proteinů, např. reoviry (Schiff *et al.*, 1990; Dryden *et al.*, 1993) a rotaviry (Estes, 1996), orbiviry (Burroughs *et al.*, 1995), aquareovirus (Shaw *et al.*, 1996), bakteriofág $\phi6$ (Mindich a Bamford, 1988; Mindich, 1999).

2.1.1.1.1 L-A virus *Saccharomyces cerevisiae* (ScV-L-A)

Genom je tvořen dsRNA o velikosti 4579 bp [5] (Diamond *et al.*, 1989; Icho a Wickner 1989). Obsahuje 2 otevřené čtecí rámce ORF1 a ORF2 na (+) RNA řetězci (viz **Obrázek 1**) a **není zakončena**

[4] Tím se vyřešila záhada, jak může vzniknout struktura ikosaedru ze 120 stavebních jednotek. Definitoricky, mají ikosaedry složené ze 60 stavebních jednotek T symetrii rovnou 1 ($T = 1$), $T = 2$ symetrii ikosaedry složené ze 180 jednotek ...

[5] Sekvence ScV-L-A viru uložená pod číslem J04692 v databázi GenBank obsahuje některé neurčené báze v pozicích $N_{824-830}$, kompletní sekvence ScV-L-A je přístupná pod číslem M28353=X13426; záznam X02232=M24336 zahrnuje 819 bp a báze 170–1

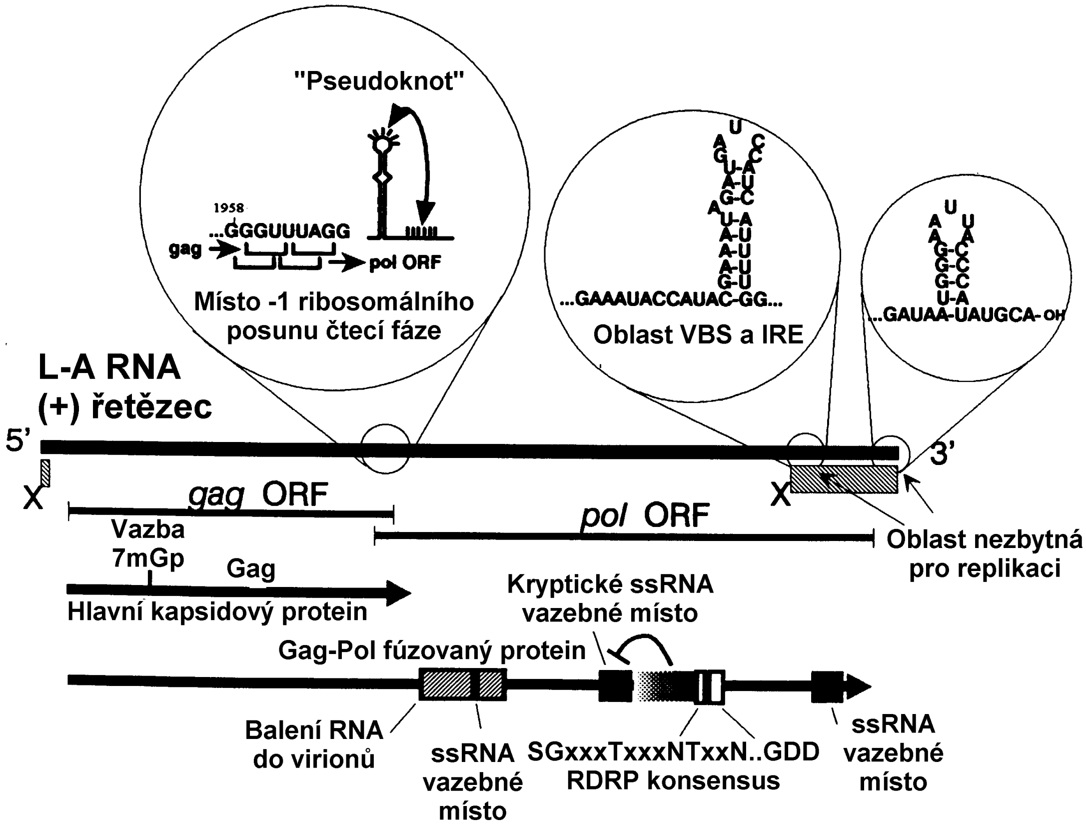
na 5' konci čepičkou (Ghabrial, 1994; Ghabrial *et al.*, 1995a). ORF1 začíná AUG kodonem v pozici 30, končí UAA kodonem v pozici 2072 a kóduje protein Gag s teoretickou hmostností 76 kDa. ORF2 začíná na pozici 1939 a končí na pozici 4546, jeho čtecí rámec je vzhledem k ORF1 posunut o -1 bázi (překrývá se s ORF1 o 130 bází, hovoříme pak o fúzním proteinu) a kóduje polymerázu Pol, která má RDRP aktivitu (Fujimura a Wickner, 1988b; Tzeng *et al.*, 1992). Polymeráza bývá někdy označována jako Gag-Pol fúzní protein (o teoretické velikosti 170 kDa), který se při elektroforéze v PAA gelu v denaturačních podmínkách (SDS-PAGE) pohybuje jako protein o hmotnosti 180 kDa. Gag-Pol fúzní protein ScV-L-A viru je přítomen v počtu 2 molekul na virion, což koreluje s vypočtenou i skutečnou frekvencí -1 posunu čtecí fáze, viz kapitola 2.1.1.1.1.2 (Ribas a Wickner, 1998; Bruenn, 1980; Ghabrial *et al.*, 1995a; Diamond *et al.*, 1989; Icho a Wickner, 1989; Esteban a Wickner, 1986; Fujimura a Wickner, 1988b). Účinnost posunu ribozomální čtecí fáze je důležitá pro propagaci viru a je ovlivňována jadernými *MOF* (angl. maintenance of frame) geny (viz kapitola 2.1.1.1.1.4). Současné znalosti L-A viru *Saccharomyces cerevisiae* jsou podloženy analýzou kompletní nukleotidové sekvence L-A dsRNA, imunologickými technikami a *in vitro* translací a expresí virových proteinů z virové cDNA (Ghabrial, 1994; Icho a Wickner, 1989; Diamond *et al.*, 1989; Hopper *et al.*, 1977; Bostian et. al., 1980b; El-Sherbeni *et al.*, 1984; Harris, 1978; Ridley *et al.*, 1984; Fujimura a Wickner, 1988b; Wickner *et al.*, 1991, Ribas a Wickner, 1998).

2.1.1.1.1.1 Varianty ScV-L-A

Virus ScV-L-A je označován jako **pomocný virus** (angl. helper virus) nutný pro **udržení obou typů M dsRNA** v buňce. Některé kmeny *Saccharomyces cerevisiae* infikované ScV-L-A a zároveň ScV-M (viz kapitola 2.1.1.1.1.8) se liší v pomocné aktivitě přítomného L-A viru vůči M dsRNA. Byly provedeny experimenty s křížením různých kmenů které vedly ke zjištění, že se nejedná o Mendelovsky děděné znaky. Ukázalo se, že zmíněné determinanty jsou cytoplazmatické (Wickner, 1983a) a jedná se o **různé varianty L-A dsRNA** označované: L-A-H, L-A-E, L-A-HN, L-A-HE, L-A-B, L-A-HNB. Ve všech případech se ve skutečnosti jedná o **různé formy kapsidového proteinu L-A viru**, viz dále (Sommer a Wickner, 1982a; Wickner, 1983b; Ghabrial, 1994). Alespoň viriony obsahující L-A-H, L-A-E, L-A-HN, L-A-HNB dsRNA mají identické proteinové složení a štěpení T1 nukleázou naznačuje 99 % sekvenční homologii (Sommer a Wickner, 1982a).

- Udržení M dsRNA v buňce nápomáhá determinanta **[HOK]** (angl. helper of killer) resp. **[H]**, která byla později přisouzena **kapsidovému proteinu** (např. exprimovanému z expresního vektoru, Wickner *et al.*, 1991). Jinými slovy, [HOK] je vlastností kapsidového proteinu kódovaného L-A-H dsRNA **suprimovat defekt L-A-E** (defekt kapsidového proteinu kódovaného L-A-E dsRNA, viz dále) a udržet tak M dsRNA v buňce. [HOK] aktivitu bylo možné experimentálně porušit vytvořením terminačního kodónu v genu pro kapsidový protein umístěném na plazmidu, ale ne vytvořením terminačního kodónu v ORF2 kódujícím část RDRP. Rovněž došlo ke ztrátě [HOK] aktivity a následné ztrátě M1 dsRNA při kultivaci buněk podmínkách, které umožňovaly ztrátu

odpovídají bázím 2509–2678 (($-$) vlákna J04692, 1 nespárovaná báze), báze 166–819 odpovídají bázím 2173–2830 (($+$) vlákna J04692, 5 nespárovaných bází).



Obrázek 1: Schéma genomové struktury L-A viru. Na obrázku jsou znázorněny hlavní funkční oblasti (+) RNA řetězce viru ScV-L-A a jím kódovaných proteinů `Gag` a `Gag-Pol`. `VBS` označuje "virus binding site", `IRE` označuje "internal replication enhancer", `ORF` čtecí rámec daného proteinu. `RDRP` je RNA dependentní RNA polymeráza, `X` je oblast označená v X dsRNA. Bližší vysvětlení je v textu. Obrázek z původní práce Wickner (1996) je převzat z práce Pospíšek (1998a).

plazmidu. Z výsledků s terminačním kodónem dále plyne, že ani mRNA kódovaná ORF1 pro kapsidový protein nenesla [HOK] aktivitu, ale jedná se skutečně jen o výsledný protein. Použitý kmen byl připraven křížením Ski$^+$ L-A$^-$ kmene se *ski2-2* L-A-E M1$^+$ kmenem, výsledný diploid byl Ski2$^+$ L-A-E M1$^+$ a docházelo v něm díky Ski2$^+$ k samovolné ztrátě M1 dsRNA (srovnej s následujícím odstavcem věnovaným L-A-E). Protože [HOK] je vyžadován k udržení M dsRNA jen ve Ski$^+$ hostiteli (*ski*$^-$ umožňuje superkiller fenotyp), je možné že hlavní **úlohou kapsidového proteinu je chránit M dsRNA (a asi také L-A dsRNA) před buněčným antivirovým systémem *SKI* genů** a nebo je samotný kapsidový protein cílem antivirového systému (Wickner *et al.*, 1991). L-A-H se vykytuje v K28 kmenech (Schmitt a Tipper, 1992).

- Eliminaci M2 dsRNA v přítomnosti M1 dsRNA umožňuje determinanta **[EXL]** (angl. excluder of killer) resp. **[E]** (Wickner, 1980 a 1983). Novější poznatky po přehodnocení starých výsledků naznačují, že **L-A-E varianta není schopna udržet ve Ski$^+$ hostiteli žádnou satelitní dsRNA či její deleční derivát (konkrétně žádnou z X, M1, M2, M28 dsRNA)** (Wickner *et al.*, 1991; Ridley *et al.*, 1984; Sommer a Wickner, 1982a; Wickner, 1980; Schmitt a Tipper, 1992). **L-A-E varianta je schopna udržet tyto dsRNA pouze ve Ski$^-$ hostiteli** (Wickner *et al.*, 1991), ve kterém již tyto dsRNA nevyžadují některé *MAK* geny (viz **Tabulka: 1**) (Toh-e a Wickner, 1980; Schmitt a Tipper, 1992). Defekt neschopnosti L-A-E varianty v udržování M resp. X dsRNA lze komplementovat L-A-H variantou nebo expresí kapsidového proteinu z vneseného plazmidu obsahujícího [HOK] (Ridley *et al.*, 1984; Wickner a Toh-e, 1982; Wickner *et al.*, 1991). Samotný **defekt L-A-E varianty spočívá v defektním kapsidovém proteinu**, ať již ve kvalitativní nebo kvantitativní změně. Nicméně, L-A-E dodává do cytoplazmy nějak funkční Gag i Gag-Pol protein použitelné k replikaci L-A dsRNA, které ve Ski$^-$ buňkách dostačují na replikaci všech M dsRNA a X dsRNA. Bohužel, sekvence L-A-E dsRNA nebyla zatím určena a tak není možné ji porovnat se sekvencí L-A-HNB dsRNA (Wickner *et al.*, 1991).

- Determinanta **[NEX]** (angl. neutralizer of [EXL]) resp. **[N]** brání eliminaci M1 a M2 v přítomnosti [EXL] (a pravděpodobně také X dsRNA) (Hannig *et al.*, 1985; Wickner, 1980; Wickner, 1983a). Weinstein *et al.* (1993) navrhli, že L-A-HN varianta je přirozeně teplotně-senzitivní varianta L-A dsRNA objevující se v kombinaci s M1 dsRNA. Při inkubačních teplotách nad 37 °C dochází k vyléčení kmenů od M dsRNA, ale ne L-A dsRNA, úspěšnost odléčení zvyšuje diploidní stav buněk a heterozygotnost diploida [6] (Wickner, 1974; Sommer a Wickner, 1982b). V případech, kdy se vyskytuje M2 dsRNA v kombinaci s L-A-HN, je M2 dsRNA chráněna [NEX] před eliminací [EXL] po případné cytoplazmatické fúzi. Některé buňky obsahující L-A-HN a M2 dsRNA lze přeci jen vyléčit zvýšenou teplotou, pokud se vyskytne M2 dsRNA v kombinaci s L-A-HN a *mkt1* nebo *mkt2* mutací — ke ztrátě M2 dsRNA dochází při kultivační teplotě nad 30 °C (při teplotě 20 °C se M2 dsRNA v buňce udrží) (Wickner, 1980; Ridley *et al.*, 1984; Zorg *et al.*, 1988; Wickner, 1983b). Nestabilitu M2 v přítomnosti *mkt1* nebo *mkt2* lze potlačit *ski2*, *ski3*, *ski4*, *ski6*, *ski7*, *ski8*, nebo mutacemi *mks1*, *mks2*, *MKS50*, srovnej viz **Tabulka: 2** (Wickner 1980, 1983a, 1987; Ridley *et al.*, 1984). Přítomnost M1 případně M2 dsRNA ve *ski* mutantech snižuje počet

[6] V K2 kmenech se naopak vyskytuje v L-A-H [NEX]$^-$, která je rezistentní ke zvýšené teplotě (Weinstein *et al.*, 1993).

kopií L-A-HN dsRNA na buňku (Ball *et al.*, 1984).

- Další determinantou je **[B]** (angl. bypassing) (neboli [KIL-b], viz kapitola 2.1.1.1.1.8.1), která se vyskytuje jako **L-A-B** nebo **L-A-HNB** dsRNA (Ball *et al.*, 1984; Toh-e *et al.*, 1978; Uemura a Wickner, 1988). Ta má schopnost udržovat přítomnost X, M1, M28 dsRNA (patrně též M2) i v případě Mak$^-$ hostitele (viz **Tabulka: 2**), navíc je zvýšen počet kopií M1 dsRNA na buňku (Uemura a Wickner, 1980). Ve Ski$^+$ hostiteli (ve Ski$^-$ některé *mak* mutace není třeba obcházet vůbec) **[B] obchází mutace v některých *mak* genech** (viz **Tabulka 2**) (Ball *et al.*, 1984) v případech, kdy by jinak došlo ke ztrátě M resp. X dsRNA. *MAK* geny jsou blíže popsány v kapitole 2.1.1.1.1.4, ve zkratce lze říci, že *MAK* **geny jsou zahrnuty v regulaci exprese kapsidového proteinu**, pravděpodobně ve smyslu regulace účinnosti tvorby proteinu. **Za [B] vlastností se skrývá kapsidový protein L-A**, který stačí exprimovat z plazmidu. To koreluje se zjištěním, že ačkoli X dsRNA vznikla z L-A-HNB, ztratila delecí [B] vlastnost a vyžaduje buď funkční *MAK* geny, nebo *ski mak* kombinaci, nebo L-A-HNB [7] (Wickner *et al.*, 1991; Uemura a Wickner, 1988; Esteban a Wickner, 1988; Ghabrial, 1994).

L-A-HNB varianta byla použita pro syntézu cDNA (Icho a Wickner, 1989) a konstrukci L-A expresních vektorů (Wickner *et al.*, 1991). V tomto vektoru dochází pod kontrolou PGK promotoru k tvorbě kapsidového proteinu z ORF1 a RDRP z ORF2, jejichž přítomnost umožňuje udržet v *mak10* kmeni M1 dsRNA i v nepřítomnosti ScV-L-A (*MAK3*, *MAK10* a *PET18* jsou nutné pro udržení L-A dsRNA, viz kapitola 2.1.1.1.1.4). Kmeny obsahující *mak27*, L-A-HNB (příp. L-A-HN) a M1 dsRNA nejsou schopny produkovat K1 toxin, ačkoli "killer" fenotyp lze obnovit expresí kapsidového proteinu z plazmidu. Znamená to, že gen *MAK27* **je zodpovědný za expresi virového kapsidového proteinu**. Rovněž kmen obsahující *mak18* L-A-HN M1 dsRNA nevykazoval "killer" fenotyp, dokud nebyl kapsidový protein exprimován z plazmidu. Protože *mak18* a *mak27* mutace jsou suprimovatelné *ski* mutacemi (viz **Tabulka 2**), buňky exprimující kapsidový protein se mohou zdát fenotypicky jako Ski$^-$ (ačkoli genotyp je *SKI*). V souladu s touto předpovědí, expresí kapsidového proteinu buňky skutečně získaly superkiller fenotyp a inhibiční zóna na agarových miskách měla výrazně větší průměr (Wickner *et al.*, 1991).

2.1.1.1.1.2 Replikace, transkripce a kompletace virionů

Replikace [8] **L-A dsRNA je konzervativní**. Nově syntetizovaná $(+)$ ssRNA je uvolněna z virionu, později obalena kapsidovými proteiny (vznik partikule) a doplněna do dsRNA řetězce. $(+)$ ssRNA slouží rovněž jako mRNA, podle které jsou překládány proteiny Gag a Gag-Pol. **Tvorbu** $(+)$ **ssRNA lze nazývat transkripcí nebo replikací** a **tvorbu** $(-)$ **ssRNA replikací**. Replikáza připojuje na 3' konec vzniklého produktu adenosin, který nemá předlohu v templátu (Fujimura a Wickner, 1986; Newman *et al.*, 1981; Sclafani a Fangman, 1984; Williams a Leibowitz, 1987; Hopper *et al.*, 1977; Icho a Wickner, 1989; Fujimura a Wickner 1988a,b; Hannig a Leibowitz (1985)). Wickner *et al.* (1991) vyvinuli *in vivo*

[7] X i M1 dsRNA v *mak* [B]$^-$ hostiteli vyžadují *ski*, jinak dochází k jejich ztrátě (viz **Kapitola 2.1.1.1.1.4**) (Toh-e a Wickner, 1980).

[8] Zakian *et al.* (1981) uvádí, že L a M dsRNA se v buňkách replikují jen v G1 fázi, v S fázi je replikace zastavena (na rozdíl od replikace 2μm plazmidu, který se replikuje v S fázi, a na rozdíl od mtDNA, která se replikuje neustále).

metodu ke studiu funkce RDRP, zejména ke studiu role RDRP konsensus sekvence (Icho a Wickner, 1989) a ssRNA vazebné aktivity polymerázy (Fujimura a Wickner, 1988b).

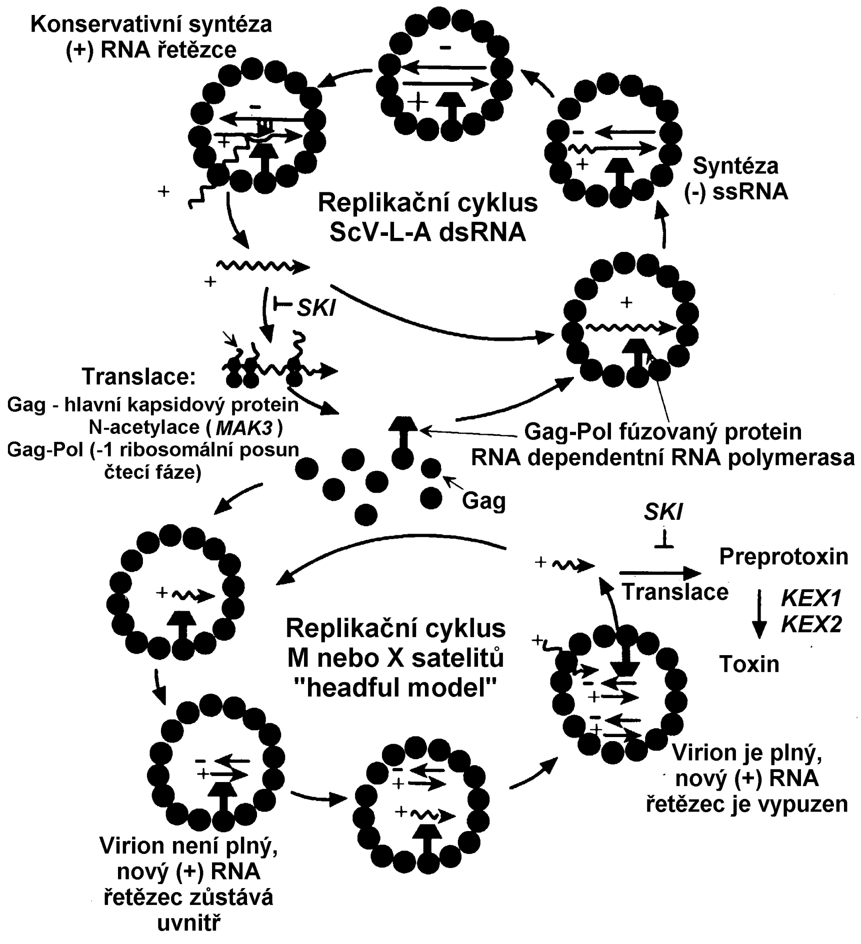
Každý **virion ScV-L-A obsahuje pouze 1 molekulu L-A dsRNA**. V případě balení kratších dsRNA (např. satelitních nebo defektních interferujících dsRNA) existují např. viriony obsahující 1-2 molekuly M1 dsRNA (násobky 1,8 kbp) nebo 1–8 molekul X dsRNA (násobky 530 bp). Pouze viriony naplněné do výše své kapacity jsou schopny *in vitro* produkovat do prostředí $(+)$ ssRNA transkripty. **Viriony nikdy neobsahují kombinace různých dsRNA**, ačkoli by jejich celková velikost jistě naplnila kapacitu partikulí. Na základě těchto poznatků Esteban a Wickner (1986, 1988) navrhli hypotézu, že se **do virové partikule dostává pouze 1 molekula $(+)$ ssRNA, podle níž je syntetizována $(-)$ ssRNA** a tak vznikne dsRNA. Následně polymeráza začne fungovat jako transkriptáza a podle $(-)$ vlákna dsRNA vytvoří novou $(+)$ ssRNA, která slouží jako templát pro druhou $(-)$ ssRNA (vzniká další molekula dsRNA)... Tento proces probíhá tak dlouho, dokud není virion plný. Teprve poté je $(+)$ ssRNA uvolňována do cytoplazmy a je ribozómem rozeznána jako mRNA, případně interaguje s nově syntetizovanými virovými proteiny v cytoplazmě a je včleněna do nově vznikající kapsidy. Tento model autoři nazvali "headful replication" [9] . Uniformita dsRNA obsažených v partikulích byla později experimentálně potvrzena (Fujimura *et al.*, 1990). Analýza "killer" kmenů *Ustilago maydis*, kde je také popsán systém několika virových dsRNA, rovněž dokládá jednotnost dsRNA segmentů uvnitř každého virionu (Bozarth *et al.*, 1981) (viz **Kapitola 2.1.1.1.3**).

M1 dsRNA [10] je mnohem více citlivá ke změnám posunu čtecí fáze (Dinman a Wickner, 1992 a 1994) a nedostatku 60S ribozomálních podjednotek (Ball *et al.*, 1984; Newman *et al.*, 1981), než L-A dsRNA. Zdá se, že limitující virové proteiny jsou preferenčně využívány samotným L-A virem, protože translační produkty L-A viru jsou v těsné blízkosti L-A $(+)$ ssRNA ze které vznikly a mohou se na ní ihned navázat. Hovoří se o *cis* **balení L-A viru** (angl. *cis*-assembly) (Valle a Wickner, 1993; Esteban a Wickner, 1988; Dinman a Wickner, 1994). Protože se nepodařilo prokázat preferenční požadavek, aby Gag i Gag-Pol molekuly vznikly ze stejné mRNA, Ribas a Wickner (1998) **popírají dříve navrhovanou teorii**. Modifikovaný Gag-Pol protein exprimovaný ze stejné mRNA jako funkční Gag se inkorporoval do partikulí méně než funkční Gag-Pol exprimovaný v *trans*. V obráceně koncipovaném experimentu se funkční Gag-Pol (exprimovaný ze stejné mRNA jako Gag) inkorporoval do partikulí stejně často jako modifikovaný Gag-Pol protein v *trans* (Ribas a Wickner, 1998).

Ribas a Wickner (1998) se pokusili najít oblast Gag-Pol proteinu, která by mohla být nějakým specifickým způsobem rozpoznávána molekulami Gag proteinu a díky které by docházelo k inkorporaci fúzního proteinu do formujících se kapsid (která by odlišovala Gag-Pol od ostatních Gag proteinů tak, aby mohl být udržován poměr Gag-Pol/Gag proteinů v kapsidě). Nenalezli žádnou oblast, jejíž delece by způsobila vyšší inkorporaci Gag-Pol proteinu do partikulí. Uvažují proto o možnosti, že by jakákoli sekvence připojená na C–konec Gag proteinu obecně omezovala možnost inkorporace, nebo že Gag-Pol nejdříve dimerizuje a teprve potom jako dimer iniciuje vznik

[9] Wickner (1996) uvádí, že "headful replication" model je záměrně odlišně pojmenován od známého "headful packaging" mechanismu známého u některých DNA bakteriofágů, protože kapacita partikulí je vymezena strukturou obalového proteinu a ne velikostí genomu.

[10] Patrně také M2 a M28 dsRNA, všechny S dsRNA a X dsRNA přítomné v některých kmenech *S. cerevisiae*, budou stejně citlivé vůči změnám posunu čtecí fáze, jako M1 dsRNA.



Obrázek 2: Schéma replikačního cyklu L-A viru a jeho satelitních dsRNA. Funkce *MAK* a *SKI* genů je diskutována v kapitole 2.1.1.1.1.4, geny *KEX1,2* jsou diskutovány v kapitole 2.1.1.1.1.8.1. Obrázek z původní práce Wickner (1996) je převzat z práce Pospíšek (1998a).

partikule (čímž by byl zajistěn požadovaný poměr obou druhů proteinů) [11]. Otázka, zda jsou dvě molekuly Gag-Pol proteinu obsažené v kapsidě opravdu dimerizovány (Castón *et al.*, 1997), zatím nebyla zodpovězena.

Jako možný způsob jak zbavit kvasinky virové infekce, se jeví látky specificky blokující posun čtecí fáze ribozómů (Dinman 1995; Dinman a Wickner, 1992, 1994, 1995; Dinman *et al.*, 1991). Studie translace mRNA obsahujících zároveň Gag i Gag-Pol protein ukázaly, že je tolerováno nejvýše 2–násobné zvýšení poměru Gag-Pol/Gag (Dinman a Wickner, 1992; Dinman *et al.*, 1997). Překvapivě, až 4–násobné zvýšení poměru Gag-Pol/Gag při expresi obou proteinů z různých plazmidů nevedlo ke změně poměru Gag-Pol/Gag v izolovaných virových částicích, t.j. stále byly obsaženy 2 molekuly Gag-Pol v každé částici (Ribas a Wickner, 1998).

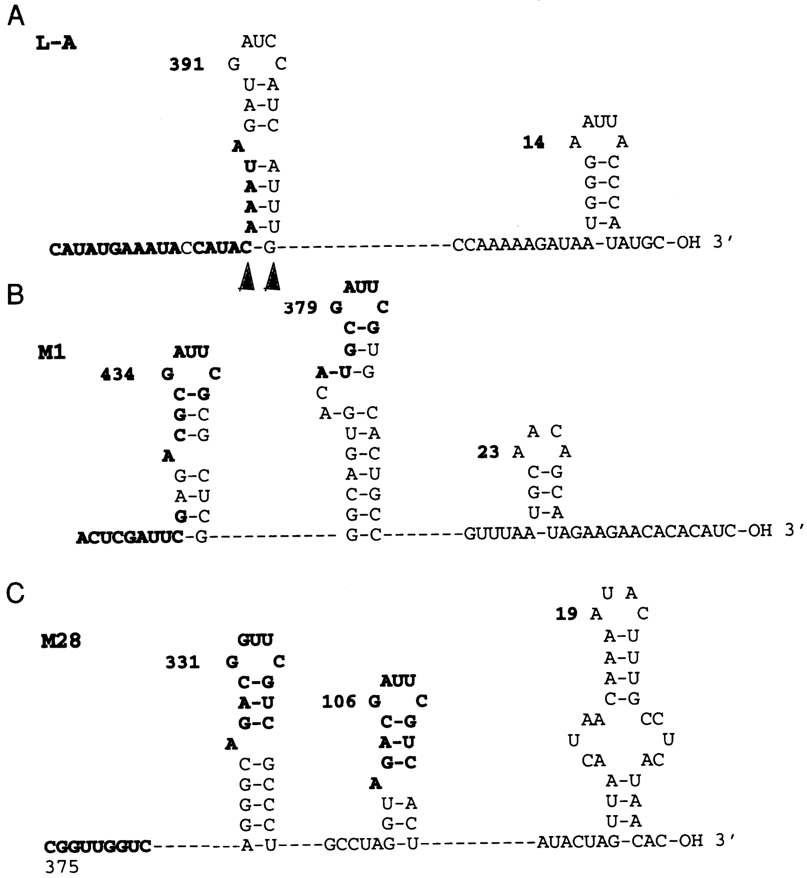
Transkriptáza L-A viru zahajuje transkripci připojením bází na 3'–OH skupinu pppGp nebo ppGp. Izolované $(+)$ ssRNA obsahují sice ppGp, ale není jasné jestli se nemůže jednat o molekuly zbavené terminálního γ–fosfátu cytoplazmatickou fosfotransferázou. Tuto otázku by mohla zodpovědět analýza 5'–konce $(-)$ řetězce (Leibowitz a Georgopoulus, 1985). Fujimura a Wickner (1989) zlepšili *in vitro* systém pro studium syntézy $(+)$ RNA řetězce (transkripci). Ačkoli se předpokládá existence signálu pro RDRP ve 3' oblasti $(-)$ ssRNA, která má navíc určitou podobnost s některými dsRNA viry, přesný signál rozeznávaný RDRP není znám (Ghabrial, 1994).

2.1.1.1.1.3 Sekundární struktury RNA totivirů

Na molekule X $(+)$ ssRNA (viz kapitola 2.1.1.1.1.7) byla nalezena 24 bází dlouhá sekvence zodpovědná za vazbu k virionu, označovaná jako **VBS** (angl. virus binding site) (viz **Obrázek 3**) (Esteban *et al.*, 1988; Esteban *et al.*, 1989; Fujimura *et al.*, 1990; Fujimura a Wickner, 1992). $(+)$ X ssRNA pravděpodobně v tomto místě tvoří vlásenku s nespárovanou A bází vyčnívající ze stonku, přičemž přítomnost stonku je nezbytná pro správnou funkci VBS, ačkoli není nutná přesná primární sekvence. Pozdější analýza M1 dsRNA a *in vitro* trankriptů prokázala podobnou strukturu v oblasti bází 1377-1406 $^{(+)}$ ssRNA. cDNA fragmenty obsahující VBS byly exprimovány v ScV-L-A$^{(+)}$ kmeni *Saccharomyces cerevisiae*. Heterologní transkripty byly pouze po jedné kopii baleny do partikulí. Byla prokázána **funkce VBS vlásenky jako enkapsidačního signálu** *in vivo* a podpořen dříve postulovaný mechanizmus replikace dsRNA uvnitř virionů, tzv. "headful model" (Fujimura *et al.*, 1990). Podobná struktura s vyčnívajícím A na stonku byla popsána také u některých colifágů, kde má zřejmě vliv na iniciaci skládání fágových částic (Beckett *et al.*, 1988).

Na molekule S14 dsRNA se podařilo Huanovi *et al.* (1991) prokázat 132 bp dlouhou oblast, zodpovědnou za virovou interferenci. V této oblasti jsou dvě VBS vlásenky (jedna odpovídá M1 VBS vlásence, druhá je mírně odlišná, srovnej viz **Obrázek 3**). S14 dsRNA obsahující pouze VBS vlásenku typu M1 neměla vlastnosti interferující dsRNA. Následně Shen a Bruenn (1993) ukázali, že i samotná M1 dsRNA obsahuje další vlásenku podobnou VBS, ale která má vyšší disociační konstantu než VBS vlásenka. Přítomnost 2 VBS vlásenek zesílila vazbu RNA na virion (Shen a Bruenn, 1993). M28 $(+)$ ssRNA má na svém 3' konci podobné konsensus sekvence a potenciální sekundární struktury jako M1 a L-A $(+)$ ssRNA (viz **Obrázek 3**) (Schmitt a Tipper, 1995). Kompetice různých variant

[11] Fujimura a Wickner (1988b) již dříve ukázali, že Gag-Pol iniciuje kompletaci virionů *in vivo*. Ačkoli Gag-Pol není nutný ke tvorbě partikulí (Fujimura *et al.*, 1992), mohl by tento Gag-Pol dimer urychlovat celý proces.



Obrázek 3: Srovnání sekundárních struktur 3' konců (+) L-A A, M1 B a M28 C ssRNA. Čísla odpovídají vzdálenosti bází od 3' konců. Šipkami (▶) je vyznačena **VBS** vlásenka prokázaná u L-A (+) ssRNA. Přímé repetice **IRE** a potenciální oblasti IRE jsou vyznačeny v sekvenci nukleotidů tučným písmem. Obrázek z původní práce Schmitt a Tipper (1995) převzat z publikace Pospíšek (1998b).

VBS vlásenek o Gag-Pol protein je pravděpodobně molekulární mechanizmus zodpovědný za eliminaci M2 dsRNA z buňky po vnesení M1 dsRNA do buňky (Naumova a Naumov, 1973a; Wickner, 1983a). Vyšší počet VBS vlásenek umožňuje pravděpodobně M dsRNA navázat se alespoň někdy na Gag-Pol protein dříve než L-A dsRNA (Shen a Bruenn, 1993).

Přibližně 400 bází od 3' konce $(+)$ X dsRNA se nachází druhá oblast významná pro replikaci. **IRE sekvence (angl. internal replication enhancer) je tvořena dvěma přímými repeticemi a částečně se překrývá s VBS vlásenkou**. Deleční mutace mezi IRE sekvencí a 3' koncovou oblastí dlouhé až 300 bp neměly vliv na templátovou aktivitu IRE (Esteban *et al.*, 1989; Fujimura a Wickner, 1992).

Sekundární struktury na 5' a 3' koncích dsRNA

1. **L-A a X dsRNA**

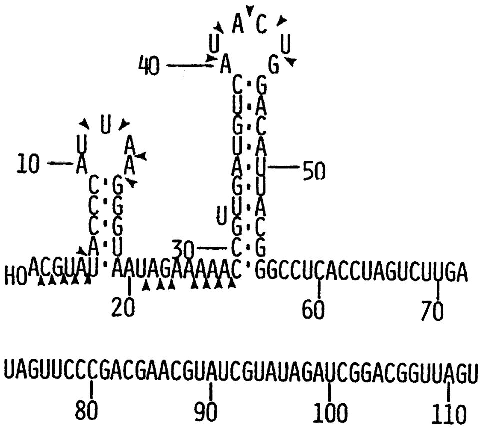
   Mezi 5-19 bází od 3' konce $(+)$ X (viz **Obrázky 4 a 5**) (příp. L-A) ssRNA je vlásenková struktura nutná pro replikaci virové RNA (pro tvorbu $(-)$ ssRNA). Přítomnost této vlásenky potvrdili ve své práci mapováním S1 nukleázou Thiele *et al.* (1984a).

   Thiele *et al.* (1984a) prokázali štěpením S1 nukleázou přítomnost sekundárních struktur na 3' konci $(+)$ řetězce L-A (viz **Obrázky 4 a 5**), kdy dochází ke štěpení mezi bázemi 1–6, 11–14, 20–28, 40–44 (od 3' konce). Naopak, na 3' konci $(-)$ řetězce docházelo k silnému štěpení S1 nukleázou a proto se autoři domnívají, že v odpovídající 5' oblasti $(+)$ řetězce nejsou dvouřetězcové úseky. Pro vyhodnocení výsledků štěpení S1 nukleázou použili předpokládanou sekvenci 3' konce $(-)$ řetězce, kterou dedukovali z výsledků přímého sekvenování 5' konce $(+)$ vlákna. Podobná vlásenka byla nalezena v oblasti 1-33 bází od 3' konce M1 $(+)$ ssRNA. Zajímavé je, že určitou shodu má posledních 4-5 bází obou dsRNA (Esteban *et al.*, 1989). Tyto výsledky jsou shrnuty v práci Leibowitz *et al.* (1988).

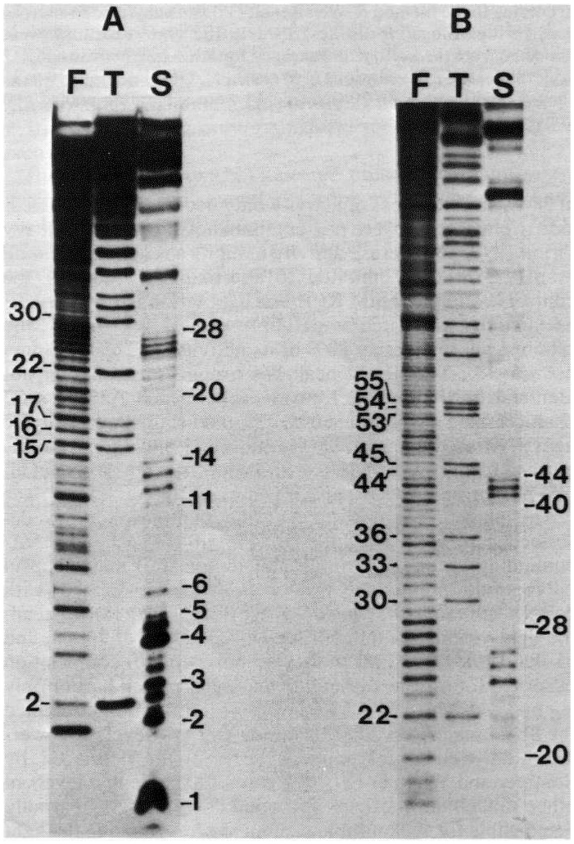
2. **M1 dsRNA**

   Na 5' koncích $(+)$ ssRNA transkriptů M1 (Thiele *et al.*, 1982; Thiele a Leibowitz, 1982; Leibowitz *et al.*, 1983; Hannig *et al.*, 1984) a M2 (Hannig a Leibowitz, 1985) byla nalezena vlásenková struktura zahrnující samotný iniciační AUG kodón, která by se mohla párovat s určitými krátkými úseky rRNA (5,8S a 18S) (Hannig a Leibowitz, 1985; Leibowitz *et al.*, 1983) (viz **Obrázek 6**).

   - Thiele *et al.*, (1982) rozdělili podle mobility v nativním polyakrylamidovém gelu populaci virových M1 dsRNA na 4 různé konformery označené M_A–M_D, které měly z obou konců alespoň 33 bází shodných (sekvenovali enzymaticky 3' konce $(+)$ i $(-)$ řetězce). Jako možný důvod vzniku různých populací uvádějí "bublinu" spatřenou u 50-70 % molekul M1 dsRNA v elektronovém mikroskopu (Fried a Fink, 1978). Tepelnými denaturačními podmínkami (75 °C) denaturovali na všech molekulách do stejné míry tuto AU bohatou oblast, ve které došlo díky kyselému prostředí (pH 4,5) ke štěpení na 2 dsRNA fragmenty $M_{[A-D]}$-1 o velikosti 1 kbp a $M_{[A-D]}$-2 600 bp. Ve stejné oblasti štěpí S1 nukleáza (Welsh a Leibowitz, 1982), protože generuje stejně veliké dsRNA fragmenty. Protože byly v experimentu radioaktivně značeny 3' konce původní M1 dsRNA (připojili 5'–[^{32}P]–pCp pomocí T4 RNA ligázy na



Obrázek 4: Sekundární struktura 3' konce genomové (+) L-A ssRNA značené na 3' konci ^{32}P. Mapování S1 nukleázou prokázalo přítomnost dvou vlásenek, místa štěpení jsou označena šipkami (▶) (Thiele *et al.*, 1984a).



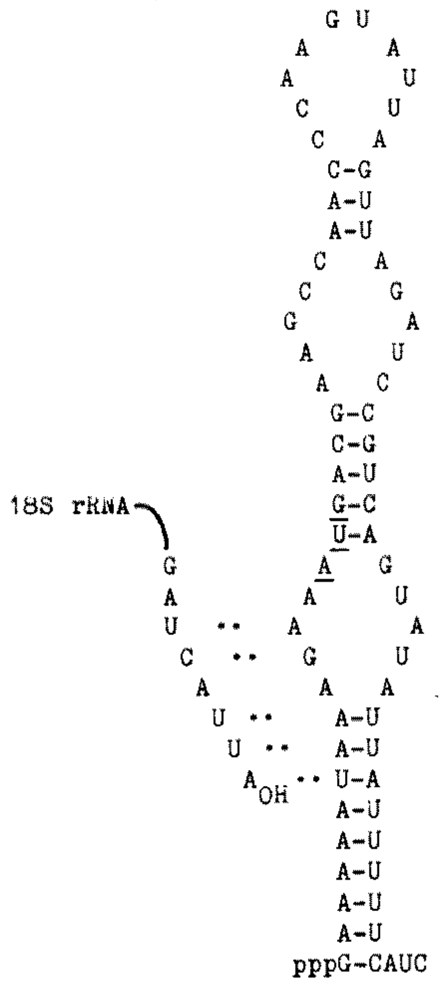
Obrázek 5: Mapování 5' konce genomové (+) L-A ssRNA značené na 5' konci ^{32}P pomocí `S1` a `T1` nukleáz. `F` označuje formamidový hmotnostní standard. `T` označuje dráhu se vzorkem štěpeným `T1` nukleázou, `S` označuje dráhu se vzorkem štěpeným `S1` nukleázou. Polyakrylamidový gel `A` obsahoval 20 % PAA, resp. gel `B` obsahoval 12 % PAA (oba obsahovaly 8M močovinu). Čísla označují velikost fragmentů, resp. pozici štěpení (Thiele *et al.*, 1984a).

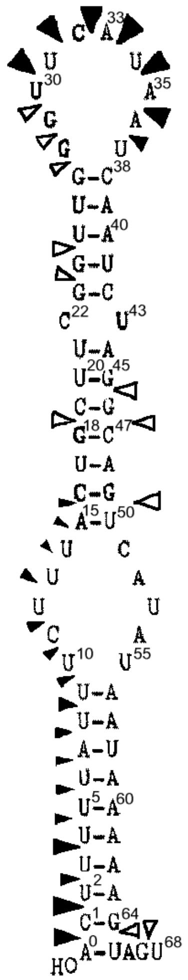
3' konec M1 dsRNA), fragment M_D-2 odpovídal 3' konci $(+)$ řetězce a M_D-1 odpovídal 3' konci $(-)$ řetězce. Určili 3' sekvenci 175 bází fragmentu M_D-1 (t.j. 175 bází od 5' konce $(+)$ vlákna) a 231 bází od 3' konce M_D-2 (t.j. 231 bází od 3' konce $(+)$ vlákna)[12]. Navrhli sekundární strukturu 5' konce M_D konformeru (viz **Obrázek 6**). Primární sekvenci dedukovali z M_D-1. Určili sekundární strukturu 3' konce sekvenovaného M_D-1 konformeru (získali téměř stejnou strukturu jako v případě 3' konce $(-)$ vlákna, viz **Obrázek 7**). Konstatovali, že sekvence 3' konce M_D-1 $\texttt{AUUUUUA}_{OH}$ je podobná vysoce konzervované sekvenci na jednom ze dvou 3' konců L, M a S dsRNA (Bruenn a Brennan, 1980; Brennan *et al.*, 1981). Nijak nevyužili sekvenační data z fragmentu M_D-2, tedy ze 3' konce $(+)$ vlákna. K vlásence na 5' konci $(+)$ vlákna (M_D) nalezli krátkou sekvenční podobnost s 18S rRNA.

- Thiele a Leibowitz (1982) se pokusili ověřit strukturu předpovídané (Thiele *et al.*, 1982) vlásenky na 3' konci $(+)$ a $(-)$ řetězců M1 dsRNA. Výsledky mapování 3' konce $(-)$ vlákna byly nezávislé na koncentraci Na^+ kationtů v prostředí (0–400 mM) a potvrdili sekundární strukturu na 3' konci $(-)$ M1 ssRNA (viz **Obrázek 7** z práce Thiele *et al.*, (1982)) v rozsahu 17–48 s tím, že se občas párují navzájem báze 1–10 a 56–64 (skutečné mapování 5' konce provedli později až Hannig *et al.*, 1984). Thiele a Leibowitz (1982) na 3' konci $(+)$ řetězce nenašli jednořetězcové oblasti štěpitelné S1 nukleázou, nejmenší fragmenty se značenými 3' konci obsahovaly 81–86 bp od 3' konce $(+)$ řetězce M1 dsRNA. Dokladují tímto, že ve 3' koncových 81 bázích nejsou jednořetězcové úseky nebo nejsou přístupné S1 nukleáze. Vyvinuli metodu na separaci dsRNA na dvě ssRNA molekuly v denaturačních podmínkách (30 % dimetylsulfoxidu, dále jen DMSO) v polyakrylamidovém gelu, která byla potom ještě využita při přípravách templátu pro reverzní transkripci jinými autory. Tento postup použili s mírnou změnou koncentrace DMSO i pro separaci řetězců L-A dsRNA (Thiele a Leibowitz, 1982).
- Hannig *et al.* (1984) charakterizovali strukturu 5' konce $(+)$ vlákna M1 dsRNA, která se liší od vlásenky 3' konce $(-)$ vlákna v rozvolnění úseků, kde nemohou vniknout `G-U` páry (tak jako na $(-)$ vlákně). V těchto místech jsou na $(+)$ vlákně nespárované `C` a `A` báze, které se nemohou párovat (Thiele *et al.*, 1982). Jinými slovy, struktura na 3' konci $(-)$ vlákna je díky odlišnému poměru `GC/AU` bází schopna v některých jednořetězcových oblastech potenciálně tvořit navíc alespoň `G-U` páry. V těchto `G-U` bohatých oblastech nicméně stejně dochází k občasnému rozvolnění na jednořetězcové úseky (Thiele *et al.*, 1982). V práci Hannig *et al.* (1984) je vidět výrazně se snižující schopnost S1 nukleázy štěpit v `AU` bohatém dvouřetězcovém úseku (viz **Obrázek 8**) (počátek vlásenky a zároveň 5' konec $(+)$ řetězce odpovídá sekvenčně bázím 1–12 a 56–64), ve kterém S1 nukleáza výrazně štěpí v rozsahu bází 1–3, ale v rozsahu 10–12 páru (který je těsně před vlásenkou uvozenou `GC` párem) již téměř neštěpí (Hannig *et al.*, 1984).

Hannig *et al.* (1984) studovali vazbu L-A, L-BC, M1, S dsRNA a jejich samotných

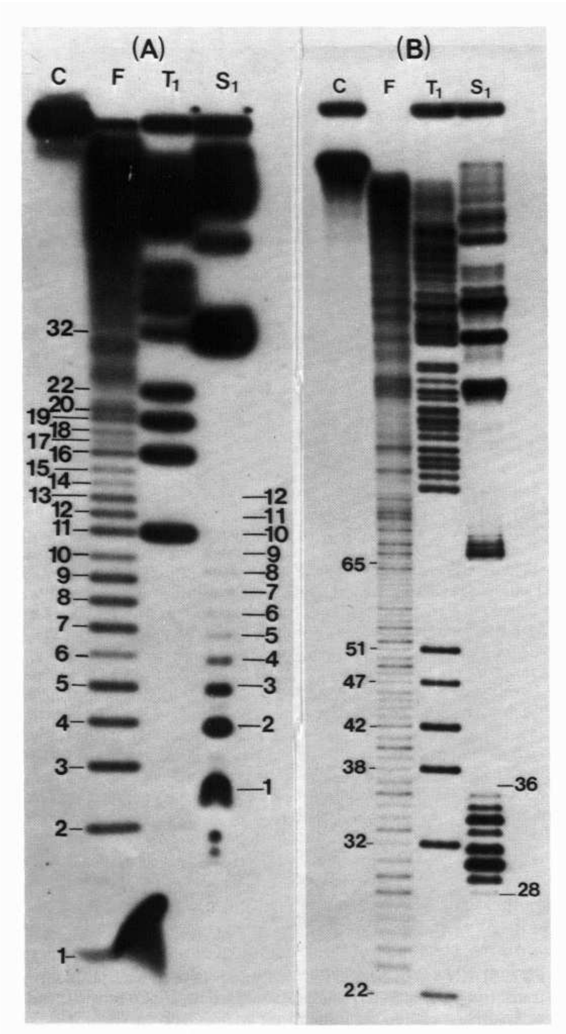
[12] M_D-1: skutečný 3' konec $(-)$ vlákna odpovídající M1 $(-)$ ssRNA GenBank J01337=M10998, báze 1–237 odpovídají bázím 1–240 $(-)$ vlákna J01337, 6 nespárovaných bází; M_D-2 (skutečný 3' konec (+) vlákna M1 ssRNA Genbank J01338=M10999): báze 291–1 přesně odpovídají bázím 1511–1801 $(+)$ vlákna J01338.



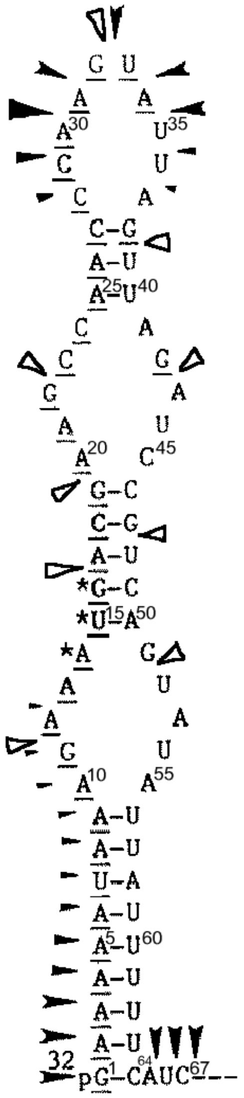


Obrázek 6: Sekundární struktura 5' konce (+) M1 dsRNA má energii ΔG(25 °C)=-13 kcal/mol a zahrnuje báze 1–64. Iniciační AUG kodón čtecího rámce kódujícího K1 toxin je podtržen. Tečkami jsou vyznačena místa potenciální interakce se 3' koncem 18S rRNA (Thiele *et al.*, 1982). Zobrazená sekvence GenBank 12522 přesně odpovídá bázím 1–67 později kompletně určeného genomu ScV-M1 (GenBank SCU78817). Struktura je identická se strukturou na **Obrázku 9.**

Obrázek 7: Sekundární struktura 3' konce ($-$) M1 dsRNA má energii ΔG(25 °C)=$-16,2$ kcal/mol (Thiele *et al.*, 1982). Zobrazená sekvence Genbank 12538 přesně odpovídá posledním 68 bázím ($-$) vlákna později kompletně určeného genomu ScV-M1 (GenBank SCU78817). Terminální A_0 je připojen virovou RDRP nezávisle na templátu. Černé šipky (▶) označují místa štěpení S1 nukleázou, bílé šipky (▷) označují místa štěpení T1 nukleázou.



Obrázek 8: Mapování 5' konce genomové (+) M1 ssRNA značené ^{32}P pomocí `S1` a `T1` nukleáz. `C` označuje kontrolní dráhu, `F` označuje formamidový hmotnostní standard. Polyakrylamidový gel `(A)` obsahoval 20 % PAA, resp. gel `(B)` obsahoval 12 % PAA (oba obsahovaly 8M močovinu). Čísla označují velikost fragmentů, resp. pozici štěpení (Hannig *et al.*, 1984).



Obrázek 9: Sekundární struktura 5' konce (+) M1 dsRNA má energii $\Delta G(25\,^{\circ}C) = -13$ kcal/mol a zahrnuje báze 1–64. Mapování S1 nukleázou ukázalo, že `A-U` páry na samém 5' konci RNA se občas rozvolňují a RNA je tak přechodně náchylná ke štěpení S1 nukleázou (označeno šipkami ▶) a T1 nukleázou (bílé šipky ▷). Podtržením jsou zvýrazněny báze, jejichž přítomnost byla ověřena přímým sekvenováním genomové (+) ssRNA. Hvězdičkou $*$ jsou označeny báze iniciačního kodónu (Hannig *et al.*, 1984). Stejná struktura je zobrazena na **Obrázku 6**. GenBank M12522.

(+) a (−) řetězců na oligo(dT) celulózu a poly(U) Sepharosu. Z výsledků vyplývá, že na oligo(dT) celulózu se z 85-87 % vázala jen (+) forma L-A a M1 RNA (včetně transkriptů L-A a M1), obsahující uvnitř sekvence asi 200 bází dlouhý úsek adenosinů (nevázaly se tedy ani (−) řetězce ani dsRNA forma). Jako citlivější test na kratší úseky oligo(A) se ukázala poly(U)-Sepharosa, ze které eluovali navázané (+) řetězce při 45 °C. Dále provedli mapování S1 nukleázou předpovídané vlásenky na 5' konci (+) M1 ssRNA (viz **Obrázek 9**). Kvůli případným kontaminacím (−) řetězcem použili transkript a ne separovaný (+) řetězec M1 dsRNA. Při radioaktivním značení 3' konců dsRNA T4 RNA ligázou a [^{32}P]pCp docházelo k rovnoměrnému značení (+) i (−) řetěze, ale při značení 5' konců dsRNA T4 polynukleotid kinázou a [γ–^{32}P]ATP byl 10x více značen (+) řetězec, pravděpodobně díky odlišné konformaci řetězců.

3. **M2 dsRNA**

   Hannig a Leibowitz (1985) prokázali poly(A) oblast v M2 dsRNA, která je štěpena tepelně i S1 nukleázou na dva fragmenty M_2-1 (1,05 kbp) a M_2-2 (370 bp). M_2-1 fragment obsahoval 3' konec (−) vlákna a M_2-2 fragment obsahoval 3' konec (+) vlákna. Přímou sekvenací určili sekvenci 209 bází 3' konce (−) řetězce a 209 bází od 3' konce (+) řetězce. Předpověděli a enzymatickým štěpením ověřili sekundární strukturu 5' konce (+) vlákna pomocí S1 a T1 nukleáz (viz **Obrázek 10**) podobně jako v práci Hannig *et al.* (1984) zmiňují tzv. dýchání `A-U` párů bází na samém počátku (+) vlákna, na kterém se někdy rozpadají `A-U` páry a vznikají tak jednořetězcové úseky přístupné S1 nukleáze. Sekvence je umístěna v databázi Genbank pod číslem X03535.

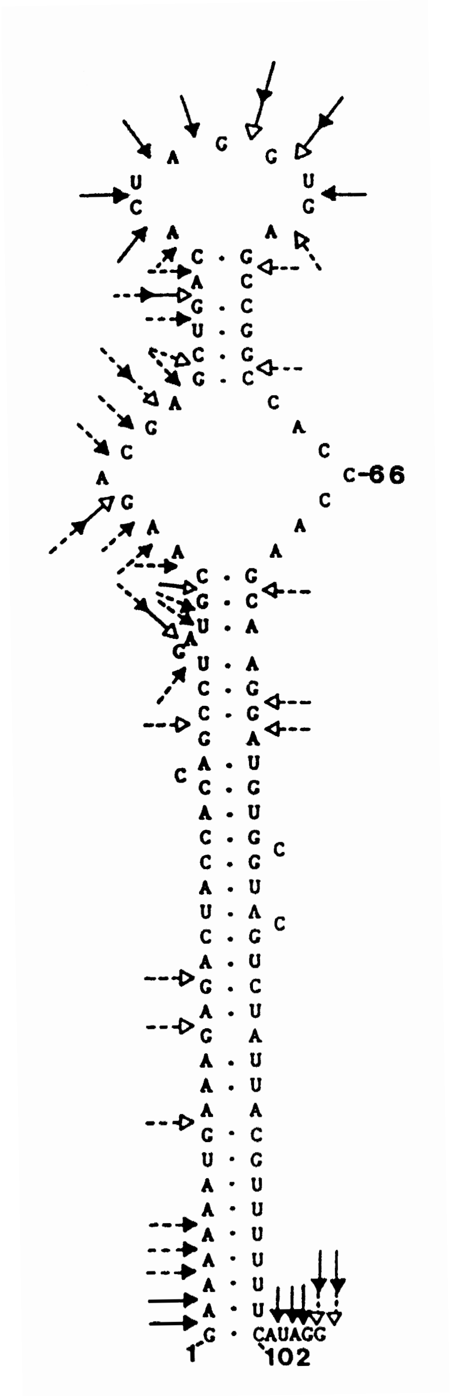
2.1.1.1.1.4 Hostitelské geny ve vztahu k biologii dsRNA virů

Mnoho RNA virů se snaží ovlivnit translační aparát hostitele ve svůj prospěch. Například vypnout syntézu hostitelských proteinů (poliovirus, chřipkový virus, virus vezikulární stomatitidy, Sindbis virus, coronaviry aj.) [13] a ignorovat DNA replikační aparát buňky, transkripci jaderných genů a buněčný cyklus.

ScV-L-A nevypíná syntézu hostitelských proteinů, ale protože nemá 5' čepičku na RNA ani 3' poly(A) konec, musí se nějakým jiným způsobem vyrovnávat s translačním aparátem hostitele, který preferuje "čepičkované" mRNA mající poly(A) sekvenci.

Ukázalo se, že buněčné geny regulující translaci závislou na čepičce a poly(A) konci, regulují expresi a propagaci L-A dsRNA a ostatních dsRNA. Pro udržení L-A dsRNA v buňce jsou esenciální zdánlivě jen geny *MAK3*, *MAK10*, *PET18* (Sommer a Wickner, 1982a; Wickner a Toh-e, 1982; Toh-e a Sahashi, 1985). Pro replikaci X dsRNA jsou potřeba stejné *MAK* geny jako pro M dsRNA (X dsRNA nedostačují stejné 3 geny jako L-A dsRNA, ačkoli z ní vznikla delecí, viz odstavec 2.1.1.1.1.1) (Esteban a Wickner, 1988; Icho a Wickner, 1988; Uemura a Wickner, 1988).

[13] Chřipkový virus replikující se v jádře odštěpuje z buněčných mRNA čepičky (Plotch *et al.*, 1981) a virová polymeráza je používá jako primer pro virové mRNA (Bouloy *et al.*, 1978). 3' poly(A) sekvence je připojena virovou polymerázou podle interní oligo(U) sekvence obsažené ve virové RNA (Kingsbury, 1990). Bunyaviry rovněž odštěpují čepičky z buněčných mRNA (Bishop *et al.*, 1983; Patterson *et al.*, 1984). Reoviry a rotaviry mají vlastní čepičkující enzym (Cleveland *et al.*, 1986; Furuichi *et al.*, 1976), ale nemají 3' poly(A) sekvenci. Sindbis virus má čepičku syntetizovanou virovým proteinem nsP1 (Scheidel *et al.*, 1989) a kóduje poly(A) sekvenci. Pikornaviry mají 3' poly(A) sekvenci a nemají čepičku, ale zato mají IRES struktury umožňující zahájení translace nezávisle na čepičce z míst na mRNA daleko od 5' konce (Jang *et al.*, 1988; Pelletier a Sonenberg, 1988). Také coronaviry využívají IRES struktury při translaci svých mRNA (Liu a Inglis, 1992).



Obrázek 10: Sekundární struktura 5’ konce genomové (+) M2 ssRNA (GenBank X03535). Mapování S1 a T1 nukleázou prokázalo přítomnost sekundární struktury. Místa štěpení S1 nukleázou jsou vyznačena černými trojúhelníky (▶), místa štěpení T1 nukleázou jsou vyznačena bílými trojúhelníky (▷) (Hannig a Leibowitz, 1985).

Existuje přes 30 *MAK* genů (angl. maintenance of killer) (Ohtake a Wickner, 1995a), které jsou nutné pro udržení X, M a S dsRNA v buňce a jsou buď důležité nebo nutné pro růst buňky. Většina *mak* mutací vede ke snížení počtu volných 60S podjednotek v cytoplazmě a tím dochází ke snížení transkripce virových RNA a vyléčení buňky od např. M1 dsRNA (Ohtake a Wickner, 1995a). Konkrétně *mak1*, *mak2*, *mak5-9*, *mak11-14*, *mak16-20*, *mak22-24* a *mak27* mutanty vzkazují snížené hladiny 60S podjednotek ve srovnání s 40S podjednotkami (Carroll a Wickner, 1995; Ohtake a Wickner, 1995a). *MAK* geny regulují účinnost tvorby hlavního kapsidového proteinu u ScV-L-A viru z ORF1 (Wickner *et al.*, 1991), srovnej s variantami L-A dsRNA v kapitole 2.1.1.1.1.1. Kressler *et al.* (1999) nedávno publikovali přehledový článek na téma *trans*–aktivních faktorů majících roli v biogenezi ribozómů.

Závislost M1 dsRNA na některých *MAK* genech je zcela potlačena v buňkách exprimujících proteiny L-A viru z cDNA (Wickner *et al.*, 1991). Tyto buňky nelze odléčit od M1 dsRNA ani cykloheximidem (Fink a Styles, 1972), který působí na ribozomální protein L29 (CYH2) (Woolford a Warner, 1991) a který je součástí 60S ribozomálních podjenotek (Wickner *et al.*, 1991; Carrol a Wickner, 1995; Ohtake a Wickner, 1995a). Vliv *mak* mutací je potlačen *ski* mutacemi pravděpodobně proto, že *SKI* geny mají vliv na koncentraci volných 60S ribozomálních podjednotek (Toh-e a Wickner, 1980; Masison *et al.*, 1995; Wickner, 1996). Ohtake a Wickner (1995a) navrhují hypotézu, že závislost M1 na L-A je dána zavislostí M1 na přísunu proteinů kódovaných L-A, který je ovlivňován právě *MAK* geny a že překlad L-A mRNA (neobsahující 3' poly(A) sekvenci) je kriticky závislý na koncentraci volných 60S podjednotek ribozómu pravěpodobně proto, protože spojení 60S a 40S podjednotek v oblasti `AUG` kodónu je umožněno 3' poly(A) sekvencí.

Gen	Vyžadovaný dsRNA	Kódovaný protein nebo funkce	Citace
MAK1 (=*TOP1*)	M1, M28, L	DNA topoizomeráza I, vyžadována [EXL]	Thrash *et al.*, 1984; Wickner a Toh-e, 1982, Schmitt a Tipper, 1992
MAK5	M1, S	potenciální RNA helikáza zahrnutá v biosyntéze 60S riboz. podj.	Ohtake a Wickner, 1995; Ridley a Wickner, 1983; Kressler *et al.*, 1999
MAK6	M1, S	biosyntéza 60S riboz. podj.	Ohtake a Wickner, 1995; Ridley a Wickner, 1983
MAK2, *MAK5*, *MAK6*, *MAK9*, *MAK12*, *MAK13*, *MAK14*, *MAK17*, *MAK20*, *MAK22*, *MAK23*, *MAK24*	M1	biosyntéza 60S riboz. podj.	Ohtake a Wickner, 1995
MAK3	L-A, M1, S	N–acetyltransferáza	Tercero a Wickner, 1992; Tercero *et al.*, 1992, 1993; Ridley a Wickner, 1983
MAK4, *MAK15*, *MAK25*	M1	neznámo	Wickner, 1977b
MAK7 (=*RPL4A*)	M1	biosyntéza 60S riboz. podj., protein L4A	Ohtake a Wickner, 1995b; Carrol a Wickner, 1995; Wickner *et al.*, 1983
MAK8 (=*TCM1*)	M1, M2	rezistence k trichoderminu, biosyntéza 60S riboz. podj., ribozomální protein L3	Wickner *et al.*, 1982, Hannig a Leibowitz, 1985; Fried a Warner, 1981
MAK10	L-A, M1, S, M2, X	pro M1 nutný zprostředkovaně, respirace, nemá homologii, nutný pro udržení stability L-A patikulí	Dihanich *et al.*, 1989; Lee a Wickner, 1992; Wickner *et al.*, 1991; Hannig a Leibowitz, 1985; Somers, 1973
MAK11	M1	membránově-asociovaný protein s β–transducinovými repeticemi, esenciální pro buňku	Wickner a Leibowitz, 1979; Icho a Wickner, 1988; Ohtake a Wickner, 1995
MAK16	M1, S, M2, M28, X	jaderný protein, biosyntéza 60S riboz. podj., regulace buněčného cyklu	Ridley a Wickner, 1983; Wickner ,1988; Hannig a Leibowitz, 1985; Fujimura a Wickner, 1986; Esteban a Wickner, 1988; Wickner *et al.*, 1987; Barton a Kaback, 1994; Milhon *et al.*, 2000; Schmitt a Tipper, 1992
MAK18 (=*RPL41B*)	M1, M28, X	biosyntéza 60S riboz. podj., ribozomální protein L41B	Carrol a Wickner, 1995; Esteban a Wickner, 1988; Schmitt a Tipper, 1985
MAK19	M1	biosyntéza 60S riboz. podj.	Carrol a Wickner, 1995

MAK21	M1, X	biosyntéza 60S riboz. podj.	Wickner, 1977b; Esteban a Wickner, 1988; Kressler *et a;.*, 1999
MAK26	M1, S, M28, X	neznámo	Wickner, 1977b; Ridley a Wickner, 1983; Esteban a Wickner, 1988; Schmitt a Tipper, 1992
MAK27	M1, S, M28, X	biosyntéza 60S riboz. podj.	Ohtake a Wickner, 1995; Ridley a Wickner, 1983; Esteban a Wickner, 1988; Schmitt a Tipper, 1992
MAK32	M1, L-A	komplementuje *pet18* mutaci a udržuje stabilitu partikulí L-A	Toh-e a Sahashi, 1985
MKT1, *MKT2*	M2	vyžadovány jen v případě teploty 30°C a pokud buňka obsahuje L-A dsRNA [NEX], při teplotě 20°C nejsou nutné	Wickner, 1980; Wickner a Toh-e, 1982; Wickner, 1987; Hannig a Leibowitz, 1985; Ridley *et al.*, 1984
PET18 (=Δ*MAK31* + Δ*MAK32*)	M1, S, M2, L-A	mitochondrie ztrácí mtDNA, udržuje stabilitu partikulí ScV-L-A, nutný patrně jen při teplotě nad 30 °C	Leibowitz a Wickner, 1978; Wickner a Toh-e, 1982; Toh-e a Sahashi, 1985; Fujimura a Wickner, 1986, 1987; Ridley a Wickner, 1983
SPE1	M1	ornitindekarboxyláza	
SPE2	M1, M2	S–adenosylmetionin dekarboxyláza, buňky z nedostatku sperminu příp. spermidinu neprochází meiózou (nesporulují) a vykazují pomalý růst	Cohn *et al.* (1978a,b); Hannig a Leibowitz, 1985; Tyagi *et al.*, 1984
SPE10	M1, M2	neznámo	Hannig a Leibowitz, 1985; Tyagi *et al.*, 1984; Cohn *et al.*, 1978b
UPF1 (*mof4-1*)	minimálně M1	udržení správného čtecího rámce, degradace nesmyslných mRNA	
GCD1, *GCD10*, *GCD11*, *GCD13*	M1	translační faktory	
CLO	L-BC	neznámo	Wesolowski a Wickner, 1984
KRB1	M1	fragment chromoz. XII, obsahující druhou kopii *RPL4B* (*MAK7*) nutnou k propagaci M1, ačkoli k růstu buňky stačí 1 kopie *RPL4A*	Wickner *et al.*, 1983; Ohtake a Wickner, 1995b

Tabulka 1: Chromozomální geny nutné k propagaci totivirů *Saccharomyces cerevisiae* a jejich satelitní dsRNA. Geny jsou nutné k propagaci M dsRNA pravděpodobně kvůli udržení hladiny ribozomálních 60S podjednotek, tedy nepřímo (viz *MAK1*, *MAK11*, *MAK16*). Propagace L-A dsRNA je závislá pouze na genech *MAK3*, *MAK10*, *PET18*, ostatní *mak* mutace jen snižují počet kopií L-A. Tabulka převzata z práce Wickner (1996), upravena a doplněna podle prací: Wickner (1979, 1983b, 1986, 1991, 1992, 1995), Mitchell a Bevan (1983), Cohn *et al.* (1978a,b), Tyagi *et al.* (1984), Schmitt a Tipper (1992), Dinman (1995), Ridley a Wickner (1983), Somers (1973). K tabulce je nutno dodat, že např. geny *KEX1* (Cooper a Bussey, 1989; Dmochowska *et al.*, 1987; Wagner a Wolf, 1987), *KEX2* (Julius *et al.*, 1984) a dále *SEC* geny (Novick *et al.*, 1980) jsou nutné pro expresi killer fenotypu.

- Produktem **MAK3** genu je N–acetyltransferáza (Tercero a Wickner, 1992; Tercero *et al.*, 1992, 1993), která acetyluje N–konec hlavního kapsidového proteinu (Wickner *et al.*, 1994) a rozeznává proteinovou sekvenci `Met-Leu-Arg-Phe` (`MLRF`). N–acetylace Gag-Pol proteinu není nutná pro kompletaci partikulí, ale je nutná v případě Gag proteinu, který jinak partikule netvoří (to koreluje se znalostmi o tvorbě partikulí HIV viru) (Park a Morrow, 1992; Smith *et al.*, 1993). Acetylaci nelze funkčně nahradit myristylací (v případě viru Rousova sarkomu se virová jádra zkládají i bez myristylace, ale nejsou správně lokalizována do membrány) a Gag-Pol se tak stává nefunkční (Ribas a Wickner, 1998). *mak3* mutanty nemohou replikovat L-A ani M dsRNA dokonce ani v případě, kdy je exprimován kapsidový a RDRP protein ScV-L-A z plazmidu. *MAK3* je tedy mnohem příměji vyžadován M1 dsRNA než gen *MAK10*, který je vyžadován zprostředkovaně, viz níže. Dále, je asi *MAK3* nutný k replikaci L-A dsRNA a ne k tvorbě proteinů Gag a Gag-Pol (Wickner *et al.*, 1991). V *MAK3* kmenech je hlavní kapsidový protein v L-A a M virionech blokován (acetylován), zatímco v *mak3* kmenech není blokován, neskládá se do virionů a je pravděpodobně degradován (Ghabrial, 1994). *MAK3* gen není pro kvasinku životně důležitý, nicméně je nutný pro rychlý růst na nefermentovatelných zdrojích uhlíku (Wickner *et al.*, 1994). Specifická sekvence `MLRF` byla nalezena na N–konci jaderných genů kódujících mitochondriální proteiny. To naznačuje, že tyto proteiny mohou potřebovat acetylaci [14] pro transport do mitochondrií (Sommer a Wickner, 1982a; Dihanich *et al.*, 1989; Tercero *et al.*, 1992). **Proteiny modifikované Mak3p byly nalezeny v podjednotkách α–5 a α–6 proteazómu 20S kvasinky *S. cerevisiae*.** β–4 podjednotka proteazómu 20S byla acetylována Nat3p, zatímco podjednotky α–1,2,3,4,7 a β–3 byly acetylovány Nat1p (Kimura *et al.*, 2000).

- **MAK10** podléhá glukózové represi (Oliver *et al.*, 1977, Lee a Wickner, 1992) a *mak10* mutanty nemohou replikovat L-A ani M dsRNA (Fujimura a Wickner, 1987). Úroveň exprese v glukózovém médiu je velmi slabá, zatímco v etanolovém nebo glycerolovém médiu je velmi vysoká. ρ^0 buňky rostou jen na glukózovém médiu a mají velmi nízkou hladinu exprese *MAK10* (Wickner *et al.*, 1994). ρ^0 *mak10* buňky zbavené mtDNA překvapivě jsou schopny udržet L-A dsRNA (Wickner, 1977a; Lee a Wickner, 1992). *MAK10* je důležitý pro optimální růst v prostředí obsahujícím nefermentovatelné zdroje uhlíku (nezávisle na jeho efektu na přítomnost L-A dsRNA) (Lee a Wickner, 1992).

M dsRNA sama o sobě není závislá přímo na *MAK10*, protože je replikována v *mak10* mutantech, které z plazmidu obsahujícího L-A-H exprimovaly kapsidový a RDRP protein. V těchto buňkách došlo ke ztrátě L-A viru (díky *mak10*), ačkoli v cytoplazmě byl přítomen kapsidový protein i virová polymeráza. M1 dsRNA tedy potřebuje replikázu a kapsidový protein ke svému udržení (a replikaci) a nevyžaduje replikující se L-A virus. Protože exprese kapsidového proteinu a RDRP umožňuje replikaci M1 ale ne L-A dsRNA (buňky bez L-A viru exprimující L-A proteiny z plazmidu stabilně tvoří "killer" toxin), ukazuje se i zde odlišnost v mechanizmu replikace L-A viru a jeho satelitních dsRNA, včetně jejich delečních derivátů (Wickner *et al.*, 1991). Jinými slovy, M1 dsRNA virus vyžaduje zprostředkovaně Mak10$^+$ hostitele jen proto, protože *MAK10* je nutný pro L-A virus.

[14] Potenciální role kotranslačních acetylací ribozomálních proteinů způsobených *MAK3* byla srovnána s dalšími buněčnými N–koncovými acetyltransferázami — bylo zjištěno, že žádný z ribozomálních proteinů nebyl acetylován *MAK3* ani neobsahoval žádnou jím rozpoznávanou sekvenci `N-Met-Ile` nebo `N-Met-Leu` nebo `N-Met-Phe` (30 ribozomálních proteinů z analyzovaných 68 proteinů bylo N–acetylováno v mutantech s deletovanými geny *ard1*Δ, *nat3*Δ, *mak3*Δ). Některé ribozomální proteiny (obsahující na N–konci `N-Ser-Asp-Phe` nebo `N-Ser-Asp-Ala`) byly acetylovány neznámými enzymy, které jsou různě závislé na Ard1p a Nat1p (Mullen *et al.*, 1989; Sherman *et al.*, 1993), ale i na faktorech acetylovaných Mak3p a Nat3p (Arnold *et al.*, 1999). Jsou známy další acetylázy: Kulkarni a Sherman (1994) charakterizovali Nat2p acetylázu, Lee *et al.* (1997) nalezli M–(N)α–acetylázu.

- Milhon *et al.* (2000) nalezli u *Schistosoma mansoni* gen SmMAK16, pravděpodobný homolog genu *MAK16 S. cerevisiae*. Protein obsahuje několik proteinových motivů, včetně signálu pro jadernou lokalizaci a pro fosforylaci. Experimentálně bylo zjištěno, že je lokalizován v jadérku a podařilo se ho fosforylovat lidskou proteinkinázou CK2. Tento experiment potvrzuje klíčovou roli **MAK16** v biogenezi 60S podjednotek. SmMAK16 i **MAK16** jsou sekvenčne podobné hypotetickému proteinu CeMAK16 *Caenorhabditis elegans*.

- **PET18** kóduje neznámý protein, nutný pro udržení L-A dsRNA při teplotách nad 30 ^{o}C, ve skutečnosti se jedná i o mutace *mak31* a *mak32* (protože *pet18* je ve skutečnosti delece obou genů) (Toh-e a Sahashi, 1985; Kawakami *et al.*, 1992). Fujimura a Wickner (1986, 1987) ukázali, že v *mak10*^{ts} *pet18*^{ts} mutantech L-A dsRNA partikule (t.j. plné partikule) nebyly stabilní, ačkoli partikule obsahující L-A ssRNA zdánlivě byly (viz **Kapitola 2.1.5.1.1**).

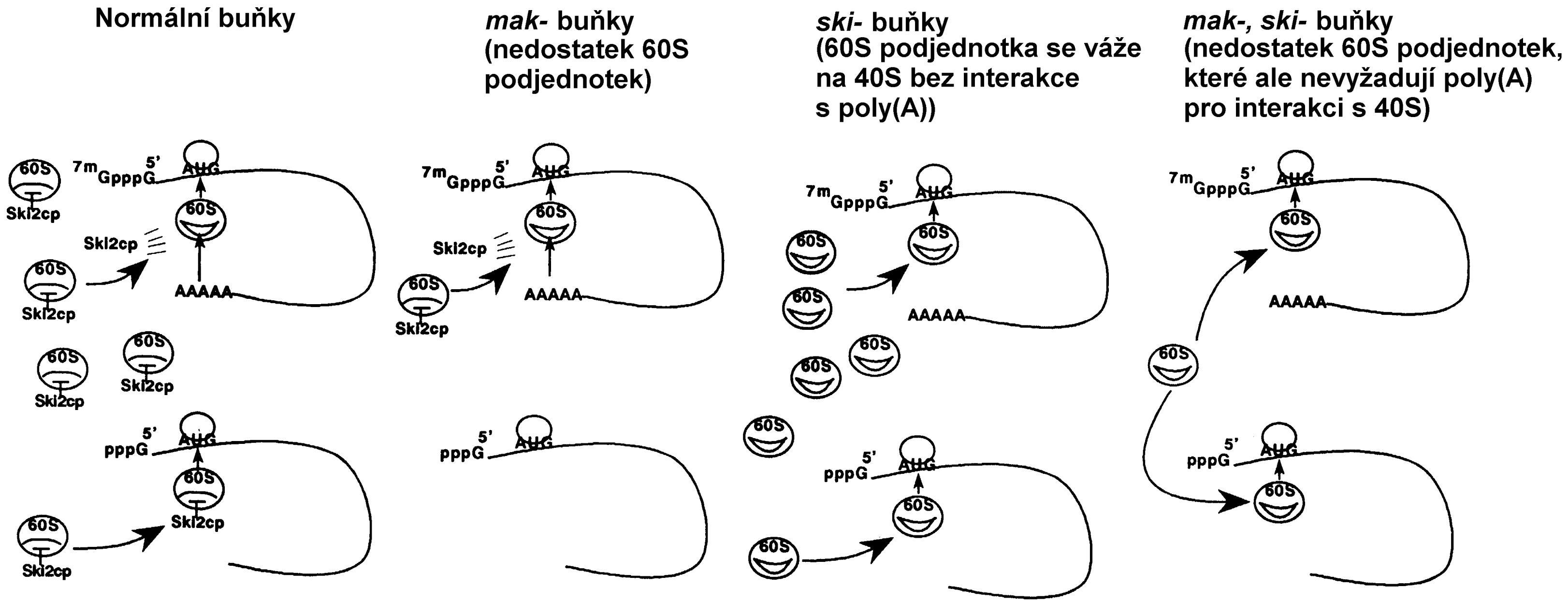
Je velmi málo informací o závislosti T a W dsRNA na hostitelských *MAK* genech. Icho a Wickner (1988) uvádějí, že tyto dsRNA stejně jako L-A a L-BC nejsou závislé na *MAK11*. L-BC dsRNA není závislá ani na *MAK1,4,7,10,11,17,24*, *PET18*, *MKT1,2* (Wickner, 1983a; Ball *et al.*, 1984). X dsRNA je závislá minimálně na genech *MAK16,18,21,26,27* (Esteban a Wickner, 1988) a proto v tomto smyslu X dsRNA více připomíná M1 dsRNA (a odlišuje se od L-A) (Wickner, 1996). Předpokládá se, že S dsRNA jsou závislé na stejných genech jako M1 dsRNA, ze kterých vznikly (*MAK3,5,6,10,16,26,27* a *PET18* (Somers, 1973; Ridley a Wickner, 1983)). M28 dsRNA je závislá na *MAK1,16,18,26* a není závislá na *MKT1* — svými nároky připomíná M1 dsRNA a liší se od M2 dsRNA svým vztahem k [NEX] (Schmitt a Tipper, 1992).

2.1.1.1.1.5 Buněčný antivirový systém

Buněčný antivirový systém snižuje počet kopií M1, M2, L-A a L-BC dsRNA. Mutace ve *SKI* (angl. superkiller) genech (Toh-e a Wickner, 1980) mají za následek zvýšené hladiny dsRNA a vysokou — “superkiller” aktivitu. *ski* **mutace suprimují většinu** *mak* **mutací** s výjimkou těch, které jsou nutné pro L-A dsRNA virus; t.j. *MAK3* , *MAK10*, *PET18*. *ski* mutanty mající L-A a M1 dsRNA rostou velmi pomalu v 8 ^{o}C a téměř nerostou při vyšších teplotách v závislosti na dalších, ne-Mendelovsky děděných faktorech (viz závěr této kapitoly) (Toh-e *et al.*, 1978; Ridley *et al.*, 1984; Ball *et al.*, 1984; Sommer a Wickner, 1987, Esteban a Wickner, 1987; Rhee *et al.*, 1989).

Produkty genů *SKI2,3,8* blokují translaci mRNA bez poly(A), tedy také L-A, M a X (+) ssRNA (Ball *et al.*, 1984; Ridley *et al.* 1984; Toh-e *et al.*, 1978) a účastní se normální degradace mRNA začínající na 3’ poly(A) konci. Alespoň geny *SKI2,8* také negativně ovlivňují počet kopií L-BC dsRNA (Ball *et al.*, 1984) a ssRNA replikonu 20S RNA (Matsumoto *et al.*, 1990). Je zřejmé, že alespoň některé *SKI* geny jsou vlastním antivirovým buněčným systémem, ačkoli mají důležité buněčné funkce a jejich protivirový charakter je patrně druhotný.

SKI2,3,8 geny hypoteticky způsobují, že 60S ribozomální podjednotka vyžaduje na 3’ konci mRNA poly(A) sekvenci mnohem dříve předtím, než se spojí s 40S podjednotkou a kompletní ribozóm zahájí překlad (Wickner, 1996). K posunování 40S podjednotky spolu s asociovanými proteiny dochází od 5’ konce mRNA směrem k `AUG` kodónu, kde vyčkává příchod 60S podjednotky, která předtím interagovala s poly(A) na 3’ konci (Munroe a Jacobson, 1990). Byla vyslovena hypotéza, že geny *SKI2,3,8* způsobují interaktivitu 60S podjednotky s poly(A) koncem, pravděpodobně díky ovlivnění biogeneze ribozómu (Wickner, 1996). S tímto souhlasí zjištění, že Ski3p je jaderný protein (Rhee *et al.*, 1989) a Ski2p obsahuje doménu bohatou na `Gly` a `Arg`, typickou pro jadérkové proteiny (Widner a Wickner, 1993). Také byly nalezeny dva blízké savčí homologické proteiny genu Ski2p (Dangel *et al.*, 1995; Lee *et al.*,



Obrázek 11: Funkce *SKI2*, *SKI3*, *SKI8* genů v translaci. A Normální buňky, B *Mak*$^-$ buňky (nedostatek 60S ribozomálních podjednotek), C *Ski*$^-$ buňky (60S ribozomální podjenotka se váže na 40S bez předchozí interakce s poly(A)), D *Mak*$^-$ *Ski*$^-$ buňky (nedostatek 60S podjenotek, ty přítomné nevyžadují poly(A) pro interakci se 40S podjednotkou). Zdá se, že produkty genů *SKI2,3,8* umožňují 60S podjenotce ribozómu preferenční spojení se 40S podjednotkou vyčkávají v oblasti iniciačního AUG kodónu až po interakci s poly(A) sekvencí na mRNA. V některých *Mak*$^-$ kmenech, kde je nedostatek 60S podjednotek, není pak virová mRNA schopna soutěžit s normálními buněčnými poly(A) mRNA. Vliv těchto *mak* mutací je potlačen ve *ski2,3,8* kmenech, aniž by se zvýšila koncentrace 60S podjednotek ribozómu. Obrázek z původní práce Wickner (1996) je převzat z práce Pospíšek (1998a).

1995; Nomura *et al.*, 1994). Jeden z nich nazývaný SKI2W (Dangel *et al.*, 1995) resp. 170A (Lee *et al.*, 1995) byl lokalizován do jadérka HeLa buněk.

- Mutace genu *SKI1* způsobuje "superkiller" fenotyp a pomalý růst buněk (Toh-e *et al.*, 1978). Stevens (1980) identifikoval **Xrn1** exonukleázu zodpovědnou za degradaci RNA ve směru 5'→3'. Xrn1p protein není esenciální, ačkoli se účastní degradace mRNA a v *xrn1* buňkách se hromadily mRNA bez čepičky nebo poly(A) (Hsu a Stevens, 1993). Xrn1p je využíván při degradaci mRNA, jejichž poly(A) konec je neustále zkracován (Muhlrad *et al.*, 1994; Muhlrad *et al.*, 1995), k degradaci rRNA a sestřihu snoRNA (Kressler *et al.*, 1999). *xrn1* mutanty mají různy fenotypický projev (Hsu a Stevens, 1993; Kim *et al.*, 1990; Kipling *et al.*, 1991; Larimer *et al.*, 1992; Stevens, 1980; Tishkoff *et al.*, 1991; Kressler *et al.*, 1999). Johnson a Kolodner (1995) zjistili, že ***XRN1* a *SKI1* jsou ve skutečnosti jeden a tentýž gen**, což bylo později potvrzeno Masisonem a Wicknerem (Wickner, 1996). Dvojité mutanty defektní v systému *ski1/xrn1* a *ski2,3,8* buď nejsou životaschopné (Johnson a Kolodner, 1995) nebo vykazují velmi pomalý růst citlivý k teplotě (Jacobs Anderson a Parker, 1998; Benard *et al.*, 1999), pravděpodobně kvůli zvýšené hladině částečně degradovaných buněčných mRNA, které mohou být stále překládány, nebo díky hromadění špatně sestřižených snoRNA, 5,8S rRNA (Kressler *et al.*, 1999).

- **Ski2p** protein je pravděpodobně RNA helikáza o velikosti 146 kDa, potřebná při degradaci mRNA (Widner a Wickner, 1993) a je podobná kvasinkové mitochondriální RNA helikáze Suv3p (Stepien *et al.*, 1992). Suv3p je součástí mitochondriálního degradozómu, který také obsahuje 3' exoribonukleázu Dss1p/Msu1p (Dziembowski *et al.*, 1998) a je nutný pro degradaci intronů (Margossian *et al.*, 1996). Podobně, degradozóm *Escherichia coli* obsahuje RNázu E, polynukleotid fosforylázu a DEAD-box obsahující RNA helikázu RhlB a je vyžadován pro 3' degradaci mRNA. *In vitro* analýzy degradozómu *Escherichia coli* naznačují že RhlB helikáza je nutná pro degradaci v místech za sekundárními strukturami (Py et al, 1996; Coburn a Mackie, 1999; Carpousis *et al.*, 1999).

  Valle a Wickner (1993) vyléčili kmen obsahující L-A virus pomocí exprese téměř celé L-A cDNA. K eliminaci L-A dsRNA došlo v závislosti exprese rekombinantního Gag a Gag-Pol proteinu, pravděpodobně ne díky nadbytečné expresi mRNA obsahujících *cis* signály viru L-A. *ski2* mutace, která obecně reprimuje výskyt dsRNA replikonů v *S. cerevisiae*, téměř zablokovala tuto možnost eliminace L-A dsRNA. Navrhují, že eliminace proběhla díky kompetici mezi exprimovanými a virovými proteiny o neznámé buněčné faktory. Výsledky dávají do souvislosti s obdobnými experimenty u rostlinných virů (Abel *et al.*, 1986; Braun a Hemenway, 1992; Golemboski *et al.*, 1190; MacFarlane a Davies, 1992), kde rovněž exprese virových proteinů uděluje buňkám rezistenci vůči virové infekci (Valle a Wickner, 1993)

- **Ski3p** je 164 kDa velký protein, který obsahuje 10 kopií tetratrikopeptidové repetice TPR (angl. tetratricopeptid repeat, Sikorski *et al.*, 1990) (Rhee *et al.*, 1989). TPR proteiny jsou nacházeny v proteinových komplexech a často asociovány s proteiny obsahujícími WD-repetice (angl. WD-repeat) (Goebl a Yanagida, 1991; van der Voorn a Ploegh, 1992; Neer *et al.*, 1994; Smith *et al.*, 1999). Ski3p také obsahuje motiv leucinového zipu (LX6LX6LX6L) mezi aminokyselinovými zbytky 1232-1253 (Brown *et al.*, 2000), což naznačuje oligomerizaci proteinu Ski3p. Rhee *et al.* (1989) ukázal, že Ski3p je jaderný protein, ačkoli Brown *et al.* (2000) ho prokazují v cytoplazmě. Matsumoto *et al.* (1993) uvádí, že TPR motiv se nachází v *S. cerevisiae* Cdc16p, Cdc23p, Cyc8p a v produktu *NUC2* genu *Schizosaccharomyces pombe*.

- **Ski6p/Rrp41p** je 3' exoribonukleáza a důležitou složkou exozómu (Mitchell *et al.*, 1997), velkého komplexu 3' exoribonukleáz, který se účastní mnoha činností upravujících RNA při vývoji ribozómu, *ski6-2* mutace vede k akumulaci 38S ribozomální podjednotky obsahující na 5' konci poškozenou 25S rRNA a neobsahující 5,8S rRNA, jinak mutant obsahuje normální množství 40S a 60S podjednotek. Dává se to do souvislosti se špatně složenou 60S podjednotkou nebo spíše s částečně degradovanou 60S podjednotkou, díky špatné 3'→5' exoribonukleázové aktivitě Ski6p nutné k degradaci starých ribozómů (Mitchell *et al.*, 1996, 1997; Zanchin a Goldfarb, 1999).

- **Ski8p** je 44 kDa velký protein obsahující 5 WD-40 repetic (Smith *et al.*, 1999); The WD-repeat family of proteins at `http://bmerc-www.bu.edu/wdrepeat`, které se nachází u savčích beta-transducinů, t.j. beta podjednotek různých G proteinů, včetně kvasinkového Ste4p (Whiteway *et al.*, 1989), *MAK11* (Duronio *et al.*, 1994; Matsumoto *et al.*, 1993; Icho a Wickner, 1988), Cdc4p (Fong *et al.*, 1986), Cdc20p (Sethi *et al.*, 1991), Tup1p (Williams a Trumbly, 1990), Msi1p (Ruggieri *et al.*, 1989) a Prp4p (Bjorn *et al.*, 1989) kvasinek, produktů genu Enhancer of Split u *Drosophila* (Dalrymple *et al.*, 1989; Hartley *et al.*, 1987) a genu AAC3 u *Dictyostelium* (Matsumoto *et al.*, 1993; Shaw *et al.*, 1989). Vzhledem k podobnosti fenotypů *ski3* a *ski8* mutant a k rodinám proteinů, do kterých oba proteiny patří, byla navržena fyzická interakce obou proteinů (Matsumoto *et al.*, 1993; Masison *et al.*, 1995).

Role Ski proteinů v 3' mRNA degradaci by byla podpořena zejména cytoplazmatickou lokalizací, role v biogenezi ribozómů by byla podpořena spíše jadernou lokalizací (Wickner, 1996). Brown *et al.* (2000) prokázali, že **proteiny Ski2,3,8 spolu vytvářejí v cytoplazmě komplex v poměru 1:1:1**. Tato interakce není ovlivněna *ski4* ani *ski6* mutacemi. Podpořili tak hypotézu, že alespoň proteiny Ski2,3,8 se účastní cytoplazmatické 3' degradace mRNA.

Wickner (1983b) uvádí klasifikaci **MAK** a **SKI** genů založenou na rozdílných schopnostech **ski** mutací a **[KIL-b]** suprimovat mutace *mak*. Vycházel z faktu, že `1.`: na rozdíl od **ski1** mutace **ski2**, **ski3**, **ski4** zvyšují množství M1 dsRNA v buňce; `2.` pouze *mak3*, *mak10* a *pet18* zapřičiňují ztrátu L-A dsRNA. **[KIL-b]** je ve skutečnosti L-A-E dsRNA, viz 2.1.1.1.1.1 (Uemura a Wickner, 1988).

Skupina	Recesivní mutace	S-I *ski1*	S-II *ski2*, *ski3*, *ski4*	S-III [KIL-b]
M-I	*mak16*	−	−	−
M-II	*mak3*, *mak10*, *pet18*	+	−	−
M-III	*mak12*, *mak18*, *mak21*, *mak26*, *mak27*	+	+	−
M-IV	*mak1*, *mak4*, *mak5*, *mak6*, *mak7*, *mak8*, *mak11*, *spe2*, *spe10*	+	+	+

Tabulka 2: Vzájemné vztahy mezi [KIL-b] a některými *mak* a *ski* mutacemi. + znamená, že recesivní mutace ve skupinách **S** genů (viz **S** v tabulce) suprimují recesivní mutace v **M**-skupinách genů (viz **M** v tabulce) a daný kmen je schopen udržet M1 dsRNA ve *ski* hostiteli, nebo udržet M1 dsRNA v případě **[KIL-b]**, − znamená, že tato suprese nebyla pozorována. Mutace do původní tabulky z práce Wickner (1983b) byly zařazeny podle publikací Icho a Wickner (1988), Toh-e a Wickner (1980), Cohn *et al.* (1978b), Esteban a Wickner (1988), Schmitt a Tipper (1992), Wickner (1990), Wickner *et al.* (1991).

Ball *et al.* (1984) studovali mechanizmus obcházení *mak* mutací. Zjistili, že [KIL-b] schopnosti kmenů obcházet různé *mak* mutace nějakým způsobem korelují s vyšším obsahem M1 dsRNA, kmeny vykazují "superkiller" fenotyp a jako všechny M1 kmeny mají snížený počet kopií L-A-HN (přičemž vyloučili možnost, že by obcházení *mak* mutací bylo ve skutečnosti jenom zpožděním projevu *mak* mutace díky vyššímu počtu M1 dsRNA kopií na začátku pokusu) (Ball *et al*, 1984). Uemura a Wickner (1988) ukázali, že [KIL-b] je ve skutečnosti [B] varianta L-A dsRNA. Snížený počet kopií koreluje také se zjištěním, že [HOK] je ve skutečnosti kapsidový protein L-A, který chrání samotnou dsRNA před účinkem *SKI* genů (Wickner *et al.*, 1991) a proto dochází ke zvýšení počtu kopií M1 dsRNA na úkor L-A dsRNA. X dsRNA stejně jako M1 dsRNA snižuje počet kopií L-A, zejména ve *ski* hostiteli. Snížení množství L-A dsRNA je v obou případech spojeno se zvýšením množství X resp. M1 dsRNA (Esteban a Wickner, 1988). Jediným rozdílem je, že *ski* $M1^+$ buňky jsou citlivé na chlad a rostou pomalu (kultivace v 8–12 °C po dobu až 15 dnů) (Ball *et al.*, 1984; Ridley *et al.*, 1984), nebo v případě *ski* $M1^+$ a cytoplazmatického faktoru [D] [15] rostou pomalu i při normálních růstových teplotách. Buňky obsahující *ski* X^+ nevykazují tento defekt (Esteban a Wickner, 1988).

Blanc *et al.* (1992) prokázali schopnost Gag proteinů Scv-L-A a ScV-L-BC odštěpovat *in vitro* čepičku. Gag protein L-A viru *S. cerevisiae* je schopen odštěpovat 7mGMP z čepičky a vázat ho na sebe přes `His-154` tak, že význačná část Gag molekul je takto modifikována; reakce vyžaduje pouze Mg^{2+} kationty (Blanc *et al.*, 1994). Toto bylo ověřeno později *in vivo* (Masison *et al.*, 1995). Mutanty s Gag bez `His-154` měly nedetekovatelnou expresi "killer" toxinu, ačkoli počet kopií M1 dsRNA bych zachován, ale v případě mutant *xrn1/ski1* se hladina M1 mRNA a produkce toxinu obnovila (Masison *et al.*, 1995). Wickner (1996) navrhuje, že Gag protein se snaží zbavit některé buněčné mRNA čepičky proto, aby nebyly degradovány jen virové "nečepičkované" RNA ale i nějaké buněčné mRNA bez čepičky. Za předpokladu 1000 kopií viru a 120 molekul Gag na virovou částici soudí, že může docházet k místnímu navýšení nečepičkovaných buněčných mRNA a tedy snížení rizika degradace virových mRNA.

2.1.1.1.1.6 Vznik virových proteinů

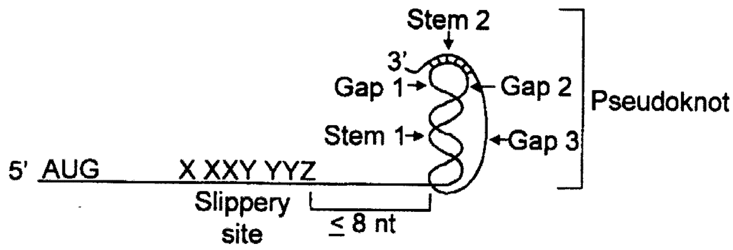
Klasické posunové mutace obvykle znamenají díky inzerci nebo deleci bází a následně produkci defektního proteinu, ať již s odlišným aminokyselinovým složením nebo zkrácením proteinu. Posun čtecí fáze ribozómu také nastává vlivem specifické primární a sekundární struktury mRNA, s tímto mechanismem se setkáváme i u totivirů.

RNA dependentní RNA polymeráza viru ScV-L-A označovaná jako protein Gag-Pol vzniká fúzí proteinů Gag a Pol, jejichž čtecí rámce se u L-A viru překrývají o 130 bází (Fujimura a Wickner, 1988b). Mechanizmem tvorby fúzního proteinu je -1 posun ribozomální čtecí fáze [16] (Dinman *et al.*, 1991; Icho a Wickner, 1989; Jacks *et al.*, 1988). Se stejným mechanismem se setkáváme v případě retrovirů (Jacks *et al.*, 1988), ačkoli je znám i u jiných virů — jsou dostupné přehledové články (Dinman, 1995; Atkins *et al.*, 1991; Farabaugh, 1993, 1996; Hatfield *et al.*, 1992; Jacks, 1990). Nedávno byla publikována velmi dobře zmapovaná (enzymaticky a cílenou mutagenezí) sekundární struktura pseudouzlové vlásenky viru Rousova sarkomu (Marczinke *et al.*, 1998).

Vlastní místo skluzu (angl. slippery site) na molekule $(+)$ ssRNA je tvořeno vlásenkovitou strukturou, jejíž nespárovaná jednořetězcová oblast se páruje s jednořetězcovou oblastí mimo vlásenku; hovoříme o pseudouzlové struktuře. Vlastní místo sklouznutí je tvořeno heptanukleotidovou sekvencí `X XXY YYZ`, přičemž původní čtecí rámec je vyznačen trojicemi bází. Všechny `X` báze musí být shodné,

[15] [D] cytoplazmatický element pravděpodobně není lokalizován na L-A dsRNA, ani na M1 dsRNA nebo mtDNA a ačkoli byly nalezeny mutace *mad* způsobující ztrátu [D] elementu, není o něm známo téměř nic (Esteban a Wickner, 1987; Toh-e *et al.*, 1978; Sommer a Wickner, 1987, Esteban a Wickner, 1987; Rhee *et al.*, 1989).

[16] *Proč dochází k tvorbě fúzních proteinů pomocí posunu čtecí fáze?* Retroviry, $(+)$ ssRNA viry a dsRNA viry používají své celé molekuly RNA současně pro 3 důležité děje: jako mRNA pro translaci, k enkapsidaci genomové informace do virových částic a jako templát pro replikaci. Kdyby bylo nutné kvůli translaci a tvorbě nějakého fúzního proteinu sestřihovat nebo editovat tuto jedinou RNA, tvořily by se zároveň defektní genomové RNA (za předpokladu že by se zároveň neodstranily alespoň sekvence potřebné pro replikaci nebo enkapsidaci) (Icho a Wickner, 1989). Proto není znám sestřih nebo editace RNA u většiny $(+)$ ssRNA a dsRNA virů. Sestřih u retrovirů v genu *env* jde ruku v ruce s vystřižením enkapsidačního signálu ψ. Fúzní proteiny jsou místo toho vytvářeny posunem čtecí fáze nebo pročtením ribozómu skrz terminační kodón, přičemž ani jeden z těchto mechanismů neupravuje genomovou RNA. Sestřih je dobře znám u $(-)$ ssRNA virů a u DNA virů, kterých se toto omezení netýká (Wickner, 1996).



Obrázek 12: Schéma pseudouzlové struktury. Na obrázku je vyznačen `5'` a `3'` konec mRNA a místo sklouznutí `slippery site` obsahující heptanukleotidovou sekvenci `X XXY YYZ` a jeho vzdálenost od vlastního pseudouzlu. `Stem1` a `Stem2` ukazují na obě vlásenky, `Gap1,2,3` zdůrazňují různé vzdálenosti, které charakterizují vlásenku (angl. `Pseudoknot`). Obrázek převzat z publikace Hammel *et al.* (1999).

`Y` musí být `A` nebo `T`. Při dosažení vlásenky ribozómem dochází k jeho zastavení právě nad heptanukleotidovou sekvencí a následně ke sklouznutí (Somogyi *et al.*, 1993; Tu *et al.*, 1992). Obyčejná vlásenka ve srovnání s pseudouzlem se stejnou teoretickou energetickou stabilitou způsobuje s mnohem nižší účinností posun ribozomální čtecí fáze (Brierley *et al.*, 1989; Brierley *et al.*, 1991; Somogyi *et al.*, 1993).

Pol doména Gag-Pol proteinu viru L-A obsahuje oblast potřebnou k interakci s virovou $(+)$ ssRNA, která zajišťuje přítomnost virové RNA v nově vznikající částici (Fujimura *et al.*, 1992; Ribas *et al.*, 1994; Ribas a Wickner, 1998). Za předpokladu, že Gag doména fúzního Gag-Pol proteinu interaguje s Gag proteiny v kapsidě, existence fúzního proteinu zajišťuje, že během tvorby partikulí (vzájemnou interakcí Gag proteinů) je do partikule zabalena i virová polymeráza (Wickner, 1996). Tvorba částic vzájemné interakce Gag a Gag-Pol proteinů byly podrobně diskutovány v kapitole 2.1.1.1.1.2 a v kapitole 2.1.1.1.1.4 (v odstavci věnovanému MAK3 proteinu na straně 30).

V genomu kvasinky *S. cerevisiae* je známo 9 *MOF* genů ovlivňujících posun čtecí fáze. To naznačuje různorodost faktorů ovlivňujících udržení správného čtecího rámce. Některé *mof* mutace dramaticky zvyšují frekvenci posunu čtecího rámce, která vede např. ke ztrátě M1 dsRNA (pravděpodobně ztrátou L-A dsRNA), k pomalému růstu buňky nebo zablokování buněčného cyklu (pravděpodobně díky produkci abnormálního buněčného proteinu) (Dinman a Wickner, 1994; Dinman a Wickner, 1995; Wickner, 1996). *MOF9* kóduje 5S rRNA a jeho 2 cílené bodové mutace vedly ke zvýšení frekvence posunu čtecí fáze (van Ryk, 1990).

Byla publikována **heterogenita kapsidových proteinů** totivirů GgV-87-1-H, ScV-L-BC, YlV (Sommer a Wickner, 1982a; Jamil a Buck, 1986; El-Sherbeini *et al.*, 1987). U každého studovaného viru bylo nalezeno dva nebo více kapsidových proteinů, ačkoli není známo, co způsobuje jejich heterogenitu. V případě viru HvV-190S jde o heterogenitu kapsiového proteinu způsobenou **různou mírou fosforylace** (viz kapitola 2.1.1.1.5). Ghabrial (1994) navrhuje, že by se mohlo jednat o mechanizmus společný všem totivirům, který může mít svoji roli v regulaci replikace nebo transkripce. Heterogenita proteinů byla demonstrována většinou při elektroforetické separaci v PAA gelu v přítomnosti SDS (SDS–PAGE). V případě HvV-190S viru se fosfoproteiny pohybovaly pomaleji než nefosforylovaný protein (Ghabrial a Havens, 1992). Toto zjištění souhlasí se dřívějšími studiemi věnovanými fosfoproteinům a jejich chování při polyakrylamidové elektroforéze (Tung a Knight, 1971; Marnell a Summer, 1984; Bell a Prevec, 1985; Hsu a Kingsbury, 1985).

Mutant	Frekvence	Přítomnost M1 dsRNA	Růst
mof1-1	3,3	−	+
mof2-1	7,9	−	teplotně senzitivní
mof3-1	2,9	+	+
mof4-1	4,0	−	+
mof5-1	4,0	−	teplotně senzitivní
mof6-1	2,5	−	teplotně senzitivní
mof7-1	2,6	+	+
mof8-1	2,7	+	+
mof9-1	3,0	+	+

Tabulka 3: Vliv *mof* mutací na přítomnost M1 dsRNA a růst buněk. Mutanty byly získány vyhledáváním mutantních kolonií z buněk majících pozměněné chromozomální geny, ovlivňující frekvenci posunu ribozomální čtecí fáze. V experimentu bylo hodnoceno zvýšení aktivity β–galaktozidázy, jejíž exprese byla závislá na posunu čtecí fáze (aktivita divokého kmene měla aktivitu=1). Skutečná frekvence posunu ribozomální čtecí fáze ScV-L-A v divokém kmeni *S. cerevisiae* je 1,9 %. Mutanty s výrazně zvýšenou frekvencí posunu čtecí fáze ztratily M1 dsRNA. Mutanty *mof2-1*, *mof5-1* a *mof6-1* měly v závislosti na teplotě zvýšenou frekvenci posunu čtecí fáze, případně zablokován buněčný cyklus (při teplotě 20 °C měly normální frekvenci posunu). *MOF9* kóduje 5S rRNA (Dinman a Wickner, 1994). Tabulka byla převzata a upravena z práce Wickner, 1996.

2.1.1.1.1.7 X dsRNA – deleční derivát ScV-L-A

Jedná se o defektní L-A dsRNA (srovnej s **kapitolou 2.1.1.1.1.8.1.1** věnovanou S dsRNA), vzniklou delecí převážné části genomu viru ScV-L-A [17] . Tato dsRNA je replikována, přepisována a balena do virových partikulí za účasti proteinů kódovaných ScV-L-A (Esteban *et al.*, 1988). Předpokládá se, že obsahuje všechna *cis*-aktivní místa potřebná pro tyto procesy stejně jako původní dsRNA viru ScV-L-A.

Je dlouhá 530 bp, obsahuje prvních 25 bází z 5' konce a 440 bp ze 3' konce L-A dsRNA [18] , nekóduje žádný protein. Byla nalezena sekvence `5'-UUUGGCCAGG-3'`, která je 2x obsažena v (+) X ssRNA, rovněž se nachází v (+) M1 ssRNA a jejích delečních mutantách. Tato sekvence je pravděpodobně zodpovědná za vazbu (+) ssRNA do virových partikulí (viz kapitola 2.1.1.1.1.3). X dsRNA je překvapivě závislá na *MAK* genech stejně jako M1 dsRNA a které nejsou nutné pro L-A dsRNA replikaci, t.j. na všech *MAK* genech vyjma *MAK3*, *MAK10* a *PET18* (tyto geny jsou nutné k replikaci L-A dsRNA, viz kapitola 2.1.1.1.1.4 věnovaná hostitelským genům) (Esteban a Wickner, 1988; Esteban *et al.*, 1988).

2.1.1.1.1.8 Satelitní dsRNA viru ScV-L-A a jejich deleční deriváty

Některé kmeny *Saccharomyces cerevisiae* obsahují kromě L-A dsRNA další typy dsRNA molekul. Jedná se o satelitní dsRNA viru ScV-L-A, které jsou někdy souhrnně označovány jako virus ScV-M (jedná se o M1, M2 a M28 dsRNA). Tyto satelitní dsRNA kódují "killer" toxiny (K1, K2 a K28), které různými mechanizmy zabíjí buňky citlivých kvasinek. Buňky exprimující geny obsažené v M dsRNA (a pochopitelně v L-A genomu, ať již ve formě dsRNA nebo DNA plazmidu, viz kap. věnovaná variantám ScV-L-A) produkují "killer" toxin a jsou zároveň vůči němu imunní. Naopak, buňky neobsahující M dsRNA toxin neprodukují a nejsou ani vůči jeho působení imunní. Imunita se od rezistence liší mechanizmem vůči působení toxinu. Rezistence je způsobena pozměněnou strukturou buněčné stěny. Imunita

[17] Konkrétně se jednalo o L-A-HNB, která delecí ztratila [B] vlastnost a vyžaduje funkční *MAK* geny nebo *ski mak* kombinaci nebo L-A-HNB (Wickner *et al.*, 1991; Uemura a Wickner, 1988; Esteban a Wickner, 1988; Ghabrial, 1994).

[18] X (+) ssRNA J03234 - 1–25 odpovídá bázím 1–25(+) vlákna L-A ssRNA J04692, báze 41–521 odpovídají bázím 4090–4579 ((+) vlákna L-A ssRNA J04692), v zarovnané sekevenci je 1 nespárovaná báze.

je dána nějakým způsobem přítomností preprotoxinu v buňce (viz dále). Přítomnost M dsRNA je závislá na přítomnosti L-A dsRNA a tudíž závislá na genech *MAK3* (viz kapitola věnovaná hostitelským genům), *MAK10*, *PET18*. Udržení "killer"–kódujících dsRNA v buňce je ovlivňováno geny označovanými *MAK* (angl. maintenance of killer), *SKI* (angl. superkiller) (viz kapitola 2.1.1.1.1.4 věnovaná hostitelským genům) a některými dalšími. Preprotoxin kódovaný M dsRNA je posttranslačně upravován Kex1p a Kex2p (angl. killer expression) proteázami.

M1 i M2 dsRNA mají proměnlivou velikost v průběhu po sobě následujících generací kvasinek. Pokud se M1 a M2 dsRNA dostanou spolu do buňky, M1 eliminuje M2 dsRNA. Z M1 a M2 dsRNA vznikají samovolně jejich deleční varianty (S dsRNA), které původní nepoškozené satelitní M1 a M2 dsRNA různě rychle eliminují z buňky. Podstatou vzniku delečních variant je delece úseků M dsRNA a případně následná amplifikace alespoň některých zbylých úseků. S dsRNA mezi sebou rovněž soutěží, různě efektivně se navzájem eliminují, vlastním mechanizmem vzniku variant S dsRNA z M dsRNA je rovněž kombinace delecí a amplifikací jejich nukleotidové sekvence (Sommer a Wickner, 1984; Ball *et al.*, 1984). Zvláště důležité je si uvědomit, že se ve skutečnosti amplifikují patrně zejména úseky obsahující (některé již známé) sekundární struktury, mající roli v replikaci a pravděpodobně i v jiných procesech. Například M1 dsRNA má na rozdíl od L-A dsRNA dvě vlásenky připomínající VBS/IRE vlásenku (viz kapitola věnovaná sekundárním strukturám). V některých případech S dsRNA známe buď jejich sekvenci nebo alespoň úseky M1 dsRNA, se kterými hybridizují, a proto je zřejmé, že S dsRNA obsahují rovněž právě tyto struktury. Spektrum možných delečních variant a různých strategií jejich soužití s původní M dsRNA nedávno rozšířila NS dsRNA, která je deleční variantou M2 dsRNA ale nezpůsobuje její eliminaci (supresi výskytu) jak ji známe z dobře dokumentovaného vztahu M1 dsRNA a S dsRNA (Cansado *et al.*, 1999). Pokud se M1 a X dsRNA dostanou spolu do buňky, kompetují spolu pravděpodobně stejným způsobem výše uvedené deleční supresivní deriváty o kapsidový protein L-A, X dsRNA vytěsní M1 dsRNA (viz [B] varianta L-A dsRNA v kapitole 2.1.1.1.1.1 věnované variantám L-A a [KIL-b] fenotyp M1 dsRNA v kapitole 2.1.1.1.1.8.1 věnované M1) (Esteban a Wickner, 1988; Uemura a Wickner, 1988).

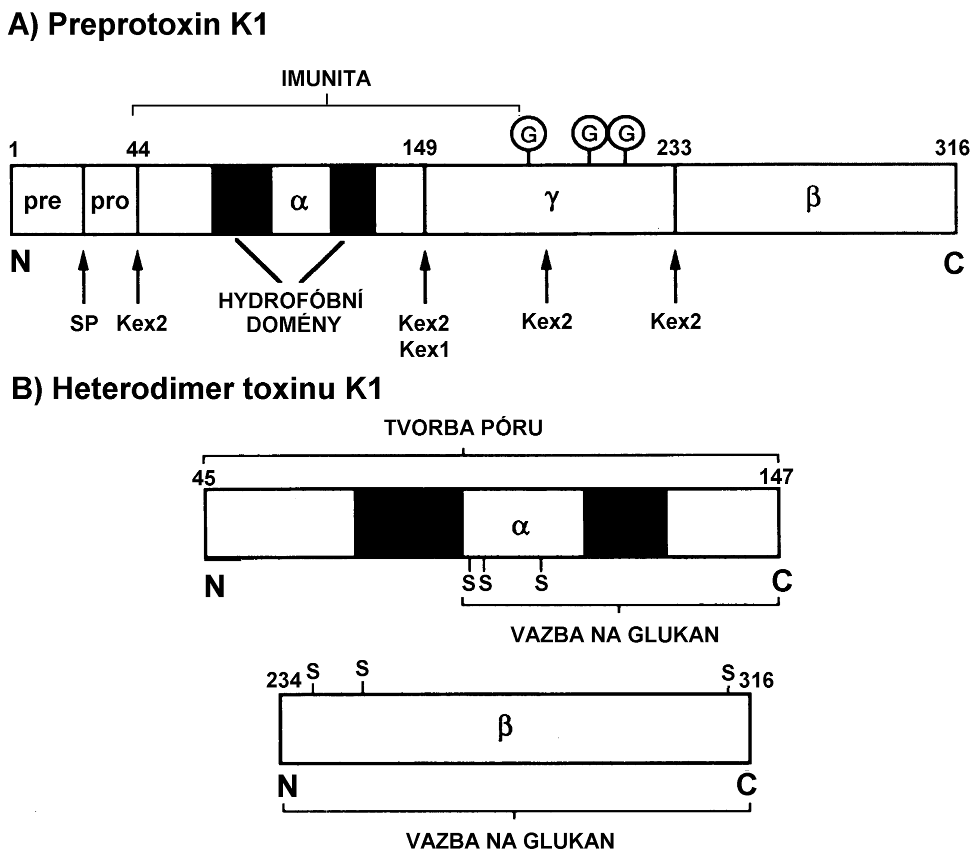
2.1.1.1.1.8.1 M1 dsRNA – satelitní dsRNA ScV-L-A

Satelitní M1 dsRNA kódující "killer" toxin K1 a imunitu vůči němu má velikost 1,8 kbp [19] (Bostian *et al.*, 1980a,b; Sommer *et al.*, 1982b; Bussey, 1988; Bussey *et al.*, 1990; Tipper a Schmitt, 1991). Toxin vzniká postupnými posttranslačními úpravami (glykozylací a proteolytickým štěpením) v endoplazmatickém retikulu a Golgiho aparátu, sekrečními váčky je sekretován ven z buňky (Bussey *et al.*, 1983; Lolle a Bussey, 1986; Bostian *et al.*, 1983).

Preprotoxin má velikost 35 kDa (Bostian *et al.*, 1980a; Welsh a Leibowitz, 1982), odštěpením N–koncových 26 aminokyselinových zbytků signální peptidázou endoplazmatického retikula mezi Ala^{26}–Leu^{27} (Lolle a Bussey, 1986). Následuje štěpení Kex2p proteázou (Julius *et al.*, 1984; Fuller *et al.*, 1988, 1991) nebo na přítomnosti Kex2p závislou proteázou (ačkoli v *kex2* kmenech dochází ke stěpení jinou proteázou, pravděpodobně *KEX2*–podobnou *YAP3* proteázou) (Egel-Mitani *et al.*, 1990) v pozici Arg^{44} a vzniká 32 kDa veliký **protoxin** (Zhu *et al.*, 1992; Bostian *et al.*, 1984; Bourbonnais *et al.*, 1991; Whiteway *et al.*, 1994). Protoxin je glykozylován v Golgiho aparátu a obsahuje 3 mannózové jednotky, na SDS-PAGE gelu má mobilitu odpovídající 42 kDa. KEX2p endoproteáza štěpí protoxin za Lys^{232}–Arg^{233} na rozhraní γ–β podjenotek a dále za aminokyselinovými zbytky Arg^{148}–Arg^{149} na rozhraní α a γ podjednotky. Pravděpodobně dochází ke štěpení za Lys^{187}–Arg^{188}, ale zdá se že není esenciální pro

[19] Kompletní genom ScV-M1 je v databázi GenBank pod čísly SCU78817=NC001782 (1801 bp); báze 1–1057 v sekvenci X00285 (1080 bp) zhruba odpovídají bázím 1–1054$_{SCU78817}$, 6 nespárovaných bází; báze 1–1010 v sekvenci K02042 (1010 bp) zhruba odpovídají bázím 1–1010$_{SCU78817}$, 1 nespárovaná báze; báze 59–612 v sekvenci M35150 (612 bp) zhruba odpovídají bázím 1248–1801$_{SCU78817}$, 1 nespárovaná báze.

aktivitu sekretovaného toxinu (Zhu *et al.*, 1987; Zhu *et al.*, 1992). Následně Kex1p karboxypeptidáza odštěpí C–koncové bazické aminokyseliny z α podjednotky (viz **Obrázek 13**) (Cooper a Bussey, 1989; Dmochowska *et al.*, 1987; Wagner a Wolf, 1987). Objev těchto proteáz vedl k objevu úprav savčích prohormonů (Steiner *et al.*, 1992).



Obrázek 13: A Preprotoxin K1. B Toxin K1. N a C značí N a C konec proteinu, Čísla odpovídají pořadí aminokyselinových zbytků v sekvevenci preprotoxinu. Šipky označují pozice štěpení endopeptidázami `Kex1`, `Kex2`, signální peptidázou `SP`. Řeckými písmeny jsou vyznačeny domény. `G` označuje místo glykozylace. `S` označuje pozice cysteinových zbytků. Funkční úseky proteinů jsou označeny úsečkami a popsány. Upravený obrázek z práce Bussey (1991) byl převzat z práce Pospíšek (1998b).

Jako **imunitní faktor** vystupuje samotný preprotoxin (prekurzor) nebo též jeho část(i) (Boone *et al.*, 1986). Mapování imunitní oblasti zaměřené především na oblast α podjednotky vedlo ke zjištění, že se imunitní doména alespoň částečně překrývá s doménou nutnou pro tvorbu iontového kanálu. Předpokládá se, že nějaký netoxický derivát preprotoxinu obsahující α podjednotku může interferovat s tvorbou póru toxinem, nebo interakcí s receptorem buněčné stěny (viz dále) (Boone *et al.*, 1986; Hanes *et al.*, 1986; Lolle *et al.*, 1984; Sturley *et al.*, 1986). Whiteway *et al.* (1994) naznačují, že by se na imunitě mohla také významně podílet signální sekvence tím, že by ovlivňovala výslednou terciární strukturu proteinu.

Mutanty *kex* a *sec* defektní v buněčné sekretorické dráze neprodukují funkční toxin do prostředí ale jsou rezistentní (rezistenci odlišujeme na základě molekulární podstaty od imunity) vůči toxinu ($K^{(-)}$ $R^{(+)}$). Proto se předpokládá, že imunitu vůči toxinu přítomnému ve vnějším prostředí zajišťuje preprotoxin (viz dále). Sekretovaný **toxin** se zkládá z α a β podjednotek spojených disulfidickou vazbou

(Bostian *et al.*, 1983b; Bussey *et al.*, 1983; Lolle a Bussey, 1986; Dmochowska *et al.*, 1987) a svojí α, β kompozicí a jejich vzájemným spojením S–S můstky připomíná některé toxin záškrtu (*diphteria*) [20] (ačkoli se původně z neznalosti molekulárního mechanizmu účinku zdály blízké i koliciny [21] .)

Na základě primární struktury toxinových podjednotek byly přiřazeny předpokládané domény jednotlivým úsekům (Bostian *et al.*, 1984). α podjednotka je zodpovědná za tvorbu iontového kanálu a obsahuje vysoce hydrofóbní oblasti mezi aminokyselinovými zbytky 72–91 a 112–127, oddělené krátkým hydrofilním úsekem. β podjednotka je hydrofilní a analogií s abrinovými a ricinovými třídami toxinů jí byla přisouzena vazba na β–1,6–glukan (viz dále) (Olsnes a Phil, 1973; Bostian *et al.*, 1984). Nalezení mutantů β–podjednotky produkujících toxin nefunkční vůči buňkám ale funkční vůči sféroplastům dokazuje vazbu β–podjednotky na buněčný receptor a roli α podjednotky při tvorbě iontového kanálu (Sturley *et al.*, 1986).

Zhu a Bussey (1991) připravili mutanty, které měly mutace v obou podjednotkách, jejich toxin nezabíjel buňky s buněčnou stěnou, nevázal se na β–1,6–glukanový receptor, ale zabíjel sféroplasty. Znamenalo by to, že K1 toxin není podobný záškrtovému toxinu (*diphteria*) ani ricinovému toxinu (ačkoli nelze vyloučit, že mutace v α podjednotce jen nepřímo ovlivnila vazebné schopnosti β podjednotky). Na rozdíl od mutací v hydrofobních úsecích α podjednotky (toxin ztrácí schopnost zabíjet a rovněž poskytovat imunitu), mutace v β podjednotce neovlivnily schopnost toxinu zabíjet protoplasty (Zhu a Bussey, 1991; Ghabrial, 1994). Zhu *et al.* (1993) studovali vliv γ podjednotky na imunitu a prokázali nutnost její části současně s α podjednotkou (nelze vyloučit ani vliv γ podjednotky na správné prostorové uspořádání preprotoxinu).

Toxin se váže na receptor v buněčné stěně obsahující $\beta(1\rightarrow6)$–D–glukan (pravděpodobně glukomannoprotein) [22] (Hutchins a Bussey, 1983; Bussey, 1991) a vytváří napěťově nezávislé kationtové kanály v buněčné membráně následované zhroucením membránového potenciálu (de la Peña *et al.*, 1980, 1981; Martinac *et al.*, 1990). Tvorba β–1,6–glukanu vyžaduje několik *KRE* (angl. killer resistance) (Brown *et al.*, 1994; Boone *et al.*, 1990; Bussey *et al.*, 1994) genů (*kre* mutanty jsou **rezistentní** vůči působení toxinu, ale po konverzi na sféroplasty jsou jejich sféroplasty citlivé) (Boone *et al.*, 1990). *KRE5* kóduje předpokládaný protein endoplazmatického retikula, vykazující homologii s glukozyltransferázou octomilky (*Drosophila*), jeho delece znamená úplné přerušení syntézy β–1,6–glukanu (Meaden *et al.*, 1990; Parker *et al.*, 1995). *KRE6* a *SKN1* jsou funkčními homology, tvoří membránový glykoprotein v Golgiho aparátu a jejich C–konce mají význačnou podobnost proteinům vázajícím glukany (jejich delece způsobuje 70–80 % snížení tvorby β–1,6–glukanů) (Roemer a Bussey, 1991; Roemer *et al.*, 1993, 1994). *KRE1* kóduje protein bohatý na aminokyseliny Ser a Thr lokalizovaný na buněčném povrchu, jeho porušení znamená 40 % snížení množství β–1,6–glukanu (který má méně β1,6–spojených jednotek, což znamená, že *KRE1* připojuje další cukerné jednotky na buněčném povrchu) (Boone a Sommer, 1990). *KRE9* kóduje malý O–glykozylovaný protein, jehož porušení znamená 80 % redukci množství β–1,6–glukanu, při nadprodukci je nacházen v živném médiu (Brown a Bussey, 1993; Brown *et al.*,

[20] Záškrtový toxin je tvořen A a B podjednotkami, A podjednotka je zodpovědná za ADP–ribozylaci elongačního faktoru EF2 a inhibuje tak syntézu proteinů (Neville *et al.*, 1986; van Ness *et al.*, 1980). B podjednotka je zodpovědná za vazbu na membránový receptor a translokaci toxinu do cytoplazmy (Neville *et al.*, 1986).

[21] Koliciny jsou tvořeny jedním polypeptidem se 3 funkčními doménami, N–koncová translokační doména přenáší toxin přes vnější membránu, centrální doména je zodpovědná za vazbu na receptor, C–koncová doména je zodpovědná za tvorbu iontového kanálu (Pattus *et al.*, 1990)

[22] Buněčná stěna *S. cerevisiae* obsahuje zejména chitin, mannoproteiny a β–glukany. β–glukany jsou glukózové homopolymery které tvoří asi 50 % suché váhy buněčné stěny (Fleet G.H., 1991; Stratford, 1994; Klis, 1994). β–glukany se dělí na β–1,3–glukany a β–1,6–glukany (Manners *et al.*, 1973a,b). β–1,3–glukany jsou zejména lineární molekuly obsahující zhruba 1500 molekul glukózy, jejich syntéza probíhá enzymy plazmatické membrány, které jsou regulovány G proteiny (Cabib a Kang, 1987; Mol *et al.*, 1994). Gen *FKS1 = ETG1 = CWH53* kóduje 215 kDa veliký protein s několika transmembránovými doménami a jedná se pravděpodobně o podjednotku β–1,3–syntázy (Douglas *et al.*, 1994; Ram *et al.*, 1995). β–1,6–glukan je vysoce větvený a zkládá se zejména z β–1,6–spojených molekul glukózy (Bussey, 1991; Manners *et al.*, 1973b).

1993). *KRE11* kóduje 63 kDa veliký cytoplazmatický protein, jehož porušení znamená 50 % snížení množství β–1,6–glukanu (Brown *et al.*, 1993). Navržený model předpokládá tvorbu β–1,6–glukanu v sekretorické dráze ve stupňovitém procesu., který zahrnuje Kre5p–závislou iniciaci v endoplazmatickém retikulu, Kre6p a Skn1p–závislou úpravu v Golgiho aparátu a Kre1p–závislé rozšíření β–1,6–větvení na buněčném povrchu, cytoplazmatický Kre11p má pravděpodobně regulační roli (Brown *et al.*, 1993; Roemer *et al.*, 1993). Nedávno byl objeven *CWH41* N–glykoprotein rovněž zahrnutý ve tvorbě β–1,6–glukanu a lokalizovaný v endoplazmatickém retikulu (jeho porušení vede k 50 % snížení množství β–1,6–glukanu a rezistenci ke K1 toxinu) (Jiang *et al.*, 1996). *cwh41* má silné synergistické efekty ve dvojitých mutantech *cwh41*Δ *kre1*Δ, které vykazují pomalý růst, 75 % snížení množství β–1,6–glukanu a sekreci glukomannoproteinu buněčné stěny Cwp1p, který je normálně připevněn do buněčné stěny (kombinace *cwh41*Δ *kre6*Δ je letální) (Jiang *et al.*, 1996).

Toxin je účinný především na rostoucí a vysoce metabolicky aktivní buňky, jejichž membrána je v energizovaném stavu (Woods a Bevan, 1968; Skipper a Bussey, 1977). Jakým způsobem se dostává od buněčné stěny do blízkosti plazmatické membrány není jasné. Je možné, že toxin působí jen v místech se slabou buněčnou stěnou kdy je v relativní blízkosti plazmatické membrány (například v místech v blízkosti puku na pučící buňce), nebo že se váže jenom na část populace receptorů (Bussey *et al.*, 1979; Kurzweilová a Sigler, 1994). pH optimum účinku K1 toxinu je 4,7 (Pfeiffer a Radler, 1984).

Přirozeně se v K1 kmenech vyskytuje teplotně senzitivní L-A-HN varianta dsRNA (viz kapitola 2.1.1.1.1.1 věnovaná variantám ScV-L-A a kapitola 2.1.1.1.1.4 věnovaná hostitelským genům) (Weinstein *et al.*, 1993; Wickner, 1983a). Ball *et al.* (1984) uvádí, že *ski2* L-A L-BC kmeny obsahují více dsRNA než kmeny *ski2* L-A L-BC M1 (které jsou citlivé na chlad); tento rozdíl autoři dokládají jako projev negativního vlivu M1 dsRNA na L-A.

Mutace v sekvenci M1 dsRNA lze rozdělit podle pozice na dvě skupiny:

1. v oblasti genu pro preprotoxin K1, ovlivňující expresi, stabilitu a funkci toxinu, imunitu

   - neutrální mutace (genotyp [KIL-n], fenotyp $K^{(-)}$ $R^{(+)}$) způsobují defekt v produkci funkčního toxinu, ale exprese imunity k toxinu je nedotčena
   - sebevražedné mutace ([KIL-i], $K^{(+)}$ $R^{(+/-)}$)
   - superkiller mutace ([KIL-sk], $K^{(++)}$ $R^{(+)}$), produkuje stabilnější toxin (kmen *S. cerevisiae* T158c) (Vodkin *et al.*, 1974; Palfree a Bussey, 1979)

2. v oblastech nezbytných pro interakci s proteiny L-A viru, případně buněčnými proteiny, a rozsáhlé deleční mutace zapřičiňující vznik defektních interferujících RNA

   - "dominantní supresivní" [KIL-s] s fenotypem ($K(-)$ $R(-)$), které mají za následek vznik defektních interferujících dsRNA a postupné vymizení původní M1 dsRNA z buňky
   - "killer bypass" ([KIL-b] K(+) R(+)), které umožňují propagaci M1 dsRNA i v přítomnosti některých *mak* mutací, viz **Tabulka 2**
   - [KIL-d] způsobující, že M1 dsRNA je stabilní pouze v diploidních kmenech
   - [KIL-sd] způsobující, že M1 dsRNA je stabilní pouze ve *ski* kmenech

Tematikou mutací M1 dsRNA se zabývali zejména Tipper a Bostian (1984), Mitchell a Bevan (1983), Bussey (1981), Wickner (1981). Byla publikována odlišnost velikostí transkriptů M1 – jsou známy transkripty plné genomové délky 1,9 kbp i subgenomové o velikosti 1,2 kbp (Hannig *et al.*, 1984; Bostian *et al.*, 1983a).

2.1.1.1.1.8.1.1 S dsRNA – deleční derivát M1 dsRNA

Defektní interferující částice (DI) známé u živočišných virů (von Magnus, 1954; Guild a Stollar, 1977; Holland *et al.*, 1979; Kennedy, 1976; Nomoto *et al.*, 1979; O'Hara *et al.*, 1984) jsou definovány třemi vlastnostmi:

1. defektivnost (vyžadují k propagaci pomocný virus)

2. schopnost interference (vedoucí ke snížení výtěžku divokého viru při koinfekci)

3. schopnost zvýšit svůj výtěžek (dosáhnout vyššího pomnožení než divoký virus)

Podobnost těmto DI částicím připomíná supresivní dsRNA (Somers, 1973), která suprimuje v K1 kmenech (killer kmeny *S. cerevisiae* typu 1) produkci "killer" toxinu a výskyt M1 dsRNA. Proměnlivou velikost S dsRNA pozorovali Bruenn a Kane (1978), Fried a Fink (1978), Kane *et al.* (1979), Sweeney *et al.* (1976), Ridley a Wickner (1983). Například během experimentů Ridley a Wicknera (1983) došlo ke zvětšení velikosti S dsRNA, patrně duplikací některých oblastí. S dsRNA genomy jsou ale i se všemi případnými amplifikacemi celkově stále menší než původní M1 dsRNA genom (rovněž byla publikována variabilita velikosti genomu M1 dsRNA v průběhu 30–76 generací, Sommer a Wickner, 1984). Své izoláty označovali autoři podle variabilních velikostí, známe tedy S1, S3, S4, S1D, S3D, S4D (Ridley a Wickner, 1983), S14 dsRNA (Lee *et al.*, 1986). Byly také nalezeny funkční M1 a M2 dsRNA genomy, které měly sekvenci nukleotidů různě zmnoženou nebo naopak zkrácenou než původní varianty (Toh-e a Wickner, 1979; Wickner, 1977a). Suprese tedy není podmíněna kratší délkou dsRNA (např. S1D suprimuje kratší S dsRNA (Ridley a Wickner, 1983)). S dsRNA jsou závislé na *MAK3,5,6,10,16,26,27* a *PET18*, tedy závislé na stejných genech jako M1 dsRNA, *ski1,2,3,4* mutace neblokují supresivitu S dsRNA (Somers, 1973; Ridley a Wickner, 1983). *ski2*, *ski3*, *ski4* zvyšují počet kopií S dsRNA v buňce (Toh-e *et al.*, 1978).

S dsRNA vznikají interní delecí M1 dsRNA a případnou následnou tandemovou duplikací (Bruenn a Kane, 1978; Bruenn a Brennan, 1980; Fried a Fink, 1978; Kane *et al.*, 1979; Thiele *et al.*, 1984b) některých oblastí, mají velikosti od 600 bp do 1,6 kbp. Lee *et al.* (1986) rozlišuje S dsRNA na dvě skupiny:

1. v rozmezí 600-800 bp, vzniklé interní delecí

2. v rozmezí 1,2-1,6 kbp, obsahující tandemové duplikace

Protože je možné S dsRNA vysrážet protilátkami připravenými proti Gag proteinu ScV-L-A viru, je zřejmé že se S dsRNA nachází v buňkách ve virových částicích tvořených Gag proteinem L-A viru (Harris, 1978; Kane *et al.*, 1979). Jestliže se do jedné buňky dostanou M1 a S dsRNA, dojde k eliminaci M1 dsRNA a buňky výsledně neprodukují toxin, ztratí vůči němu imunitu a jsou vůči němu citlivé (Somers, 1973). Možným vysvětlením je preferenční replikace nebo údržba supresivního genomu RDRP, neboť v experimentech Ridley a Wicknera (1983) došlo během 41 generací k výraznému snížení poměru M1/S dsRNA (autoři vyloučili, že by šlo o rychlejší růst kmene obsahujícího S dsRNA než kmene s M1 dsRNA – sledovali rychlost růstu kmenů obsahujících jednotlivé S dsRNA a směsnou třepanou kulturu obou kmenů a sledovali změny v obsahu jednotlivých S dsRNA). S dsRNA je defektní forma M1 dsRNA, suprimující její výskyt (možná kompeticí o nějaký hostitelský faktor podobně jako M1 dsRNA kompetuje s M2 (Wickner, 1983a,b) nebo M1 dsRNA s L-A dsRNA (Wickner, 1996)). Např. v *in vitro* replikačnímu systému pro replikaci L-A dsRNA je nutno k lehce osmoticky rozvolněným partikulím L-A přidat kromě NTP a (+) ssRNA ještě nějaký hostitelský faktor obsažený v extraktech kmene neobsahujícího L-A dsRNA (Fujimura a Wickner, 1988b).

- S1 dsRNA (0,88–1,02 x 10^6) — S1 suprimuje růst S3 (0,44–0,51 x 10^6) a S4 dsRNA (0,79–0,92 x 10^6). S1 dsRNA obsahuje duplikované asi všechny sekvence obsažené v S3 dsRNA. S4 dsRNA má zdvojené jenom některé úseky obsažené v S3 dsRNA. Z toho plyne, že i největší S dsRNA může suprimovat ostatní, menší S dsRNA genomy. Suprese tedy není jednoduše závislá na velikosti genomu a nedochází jen k supresi M1 dsRNA ale také k různě intenzivní supresi různých variant S dsRNA navzájem. Uváděné velikosti S dsRNA jsou díky jejich nestálosti orientační. S1D (1,4 x 10^6) vznikla amplifikací části S1 a eliminuje jí z buňky. S1D pomalu vítězí v kompetici s S3D (0,9 x 10^6) nebo s S4. V případě S1D a S4 sice S1D také zůstává majoritní a pravděpodobně jedinou S dsRNA, ale z experimentů nebylo zřejmé, zda se nemůže jednat o segregaci obou typů diploida do různých dceřinných buněk. Smísení S3D a S4 v buňkách vedlo ke vzniku nové S dsRNA (Ridley a Wickner, 1983).

- S3 dsRNA (0,44–0,51 x 10^6) — Částečná analýza sekvence 313 bází S3 dsRNA [23] (Thiele *et al.*, 1984b) a analýza heteroduplexu (Fried a Fink, 1978) ukazují že 232 bází je z 5' konce (+) M1 dsRNA (Thiele *et al.*, 1984b) a zbývajících 550 bp je z 3' konce (+) vlákna (Bruenn a Kane, 1978; Somers, 1973; Sweeney *et al.*, 1976). S3D je spontánně vzniklá varianta S3, která je delší než původní S3 a obdobně jako S1D ji eliminuje (Ridley a Wickner, 1983). S3 dsRNA v *in vitro* translačním systému kóduje 8 kDa velký protein jako pozůstatek po 32 kDa velkému preprotoxinu K1 (Bostian *et al.*, 1980a; Bostian *et al.*, 1983b). Nicméně, tento produkt nebyl nalezen *in vivo* (Ball *et al.*, 1984).

- S4 dsRNA (0,79–0,92 x 10^6) — Není jasné, zda vznikla z S1, S3 nebo přímo z M1, jinak viz výše zmínky věnované S4 v odstavci zaměřeném na S1 (Bruenn a Kane, 1978; Fried a Fink, 1978; Sweeney *et al.*, 1976; Ridley a Wickner, 1983).

- S14 dsRNA — S14 dsRNA (Vodkin, 1977; Lee *et al.*, 1986; Thiele *et al.*, 1984b) vznikla delecí uvnitř M1 dsRNA, má velikost 793 bp [24] (sekvenaci provedli Lee *et al.*, 1986), nekóduje žádný protein. Obsahuje 253 bp z 5' konce a 540 bp ze 3' konce (Lee *et al.*, 1986; Bruenn, 1986; Bruenn *et al.*, 1988) M1 dsRNA (Thiele *et al.*, 1984b). Byla nalezena oblast 132 bp, která zřejmě tvoří dvě vlásenkovité struktury; jedna je VBS vlásenka typu M1, druhá je mírně pozměněná VBS. S14 dsRNA, která měla pouze jednu VBS vlásenku neměla vlastnosti interferující dsRNA (Huan *et al.*, 1991). S14 byla použita při studiu iniciace transkripce *in vitro* (Nemeroff a Bruenn, 1987). Heteroduplexní analýza S14-M1 (Lee *et al.*, 1986) ukazuje, že S14 dsRNA má společných 228±35 bp s 5' koncem M1 a 531±45 bp s 3' koncem M1 (nejsou známy polarity vláken).

- S732 (0,52–0,61 x 10^6) — S732 je varianta, která velmi účinně eliminuje M1 dsRNA (ve srovnání s eliminací S3D a S4 pomocí S1D) (Ridley a Wickner, 1983)

- S733 — S733 dsRNA je supresivní dsRNA obsažená v kmeni K733, T1 štěpení provedli (Kane *et al.*, 1979).

2.1.1.1.1.8.2 M2 dsRNA – satelitní dsRNA ScV-L-A

In vitro translací M2 dsRNA o velikosti 1550 bp a obsahující interní AU bohatou oblast vzniká 28 kDa protein, který kóduje "killer" toxin K2 a zároveň imunitu vůči němu (Fried a Fink, 1978; Hannig a Leibowitz, 1985). Thiele *et al.* (1982) enzymatickým a chemickým štěpením RNA sekvenovali

[23] S3 (+) ssRNA GenBank M10762, báze 1–230 odpovídají bázím 1–232 ((+) vlákna M1 ssRNA SCU78817), 6 nespárovaných bází.

[24] S14 (+) ssRNA GenBank M12718, báze 254–793 odpovídají bázím 1263–1801 ((+) vlákna M1 ssRNA SCU78817), 4 nespárované báze.

230 bází z 3' konce (−) M2 ssRNA. Hannig a Leibowitz (1985) rovněž přímo sekvenovali zhruba 210 bp z obou konců M2 dsRNA (sekvenovali 2 fragmenty generované S1 nukleázou označené M2-1 a M2-2 (Genbank X03535), viz kapitola věnovaná sekundárním strukturám RNA totivirů). Meškaukas a Čitavičius (1992) publikovali sekvenační data fragmentu M2–1 kombinovaná se svými dřívějšími výsledky Hannig a Leibowitz (1985) (záznam X54154, Meškaukas, 1990) pod číslem GenBank S88081.

Další sekvenační data publikovali Dignard *et al.* (1991) a jsou přístupná v databázi GenBank pod číslem X56604 (**specifický primer** připravený k nasednutí mezi bázemi 6–24 (dle sekvenačních dat Hannig a Leibowitz, 1985) ale zahájil syntézu až od báze 194 a v cDNA tedy chybí předpokládaná sekundární struktura v rozsahu bází 1–102). Nicméně do publikované sekvence Dignard *et al.* (1991) tuto chybějící sekvenci doplnili (alternativní reverzní transkripce zahájená **oligo(dT)** na templátu denaturovaném hydroxidem metyl–rtuťnatým (angl. metylmercuric–hydroxide) neposkytovala vůbec delší úseky cDNA než 101, 119 a 143 bází, protože reverzní transkriptáza zastavila syntézu kvůli přítomné sekundární struktuře). Přesto tato cDNA (X56604) sloužila k expresi K2 toxinu v kvasinkách a toxin byl dále studován, včetně obou KEX2 cílových sekvencí v proteinu (Dignard *et al.*, 1991).

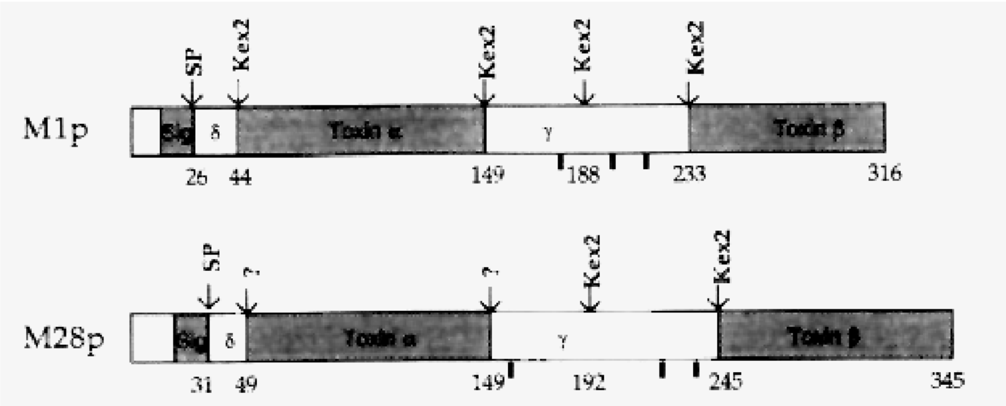
Aktivita toxinu je obdobně jako v případě K1 závislá na *KEX1,2* peptidázách (Dignard *et al.*, 1991). pH optimum K2 toxinu je 4,3 (Pfeiffer a Radler, 1984). Wingfield *et al.* (1989) popsali vysokou variabilitu v délce M2 dsRNA u různých K2 kmenů (podobně jako u M1 a S dsRNA, viz kapitola věnovaná M1 a S dsRNA). Wingfield *et al.* (1990) popsali izolát kmene obsahujícího L-A a M dsRNA, který je imunní vůči působení K2 toxinu (a K3 toxinu, viz dále), ale je citlivý vůči K1 a K28 toxinům. Kmen byl vyléčen cykloheximidem od M dsRNA (1990 bp) a stal se citlivý na působení K2 toxinu. Heteroduplexní analýza ukázala, že M dsRNA obsažená v tomto kmeni obsahuje asi 1070 bp homologních s M2 dsRNA standardních kmenů (produkujících funkční K2 toxin). Studovaný kmen je diploidní a proto se nepředpokládá, že by byl Kex$^{(-)}$. Navíc je schopen sporulovat (K1 kmeny *kex2* nejsou schopné sporulace). Analýzy proteinů pomocí SDS-PAGE z K2 rezistentního kmene obsahujícího tuto M dsRNA a z kmene vyléčeného od M dsRNA neprokázaly rozdíly v proteinovém profilu. Pokud by původní, neléčený kmen obsahoval alespoň preprotoxin nebo protoxin (pokud by šlo o obdobný způsob produkce toxinu jako v případě K1 toxinu), musel by tento neaktivní toxin být prokázán v SDS-PAGE gelu. Molekulární podstata rezistence/imunity tohoto kmene není vyřešena (Wingfield *et al.*, 1990).

M2 dsRNA obsahuje jediný dlouhý čtecí rámec kódující K2 toxin obsahující 362 aminokyselinových zbytků a obsahuje 3 potenciální místa pro N–glykozylaci. Podobně jako v případě K1 toxinu, je od preprotoxinu K2 odštěpena signální peptidázou "pre" sekvence na N–konci proteinu v pozici Ala–Ala^{44}. *KEX2* peptidáza štěpí v pozici Lys^{220} a asi není nutné štěpení v pozici Lys^{267} (Dignard *et al.*, 1991; Meškaukas a Čitavičius, 1992). Samotný K2 toxin je glykozylovaný α–β heterodimer o velikosti 21,5 kDa (podjednotky patrně nejsou spojeny S–S vazbou) (Whiteway *et al.*, 1994). Sekrece toxinu je závislá na *KEX* a *SEC* genech, dále na enzymech citlivých k inhibitoru chymotrypsinu (TPCK) (Bussey *et al.*, 1983; Lolle a Bussey, 1986; Tipper a Bostian, 1984; Dignard *et al.*, 1991).

Dignard *et al.* (1991) mutovali hydrofóbní úsek N–konce K2 toxinu a podařilo se jim snížit imunitu tvořenou toxinem při současném zachování plně účinného toxinu. Toxin se, podobně jako K1 toxin, váže na β–1,6–D–glukany buněčné stěny a porušuje funkci plazmatické membrány citlivých buněk (Bussey, 1991).

Pokusy s křížením K1 a K2 "killer" kmenů ukázaly, že M1 dsRNA vždy eliminuje M2 dsRNA (Naumov a Naumova, 1973b; Wickner, 1983a). Mapování 5' konců dsRNA pomocí RNázy T1 a S1 nukleázy prokázalo sekundární strukturu na 5' konci dsRNA (viz kap. věnovaná sekundárním strukturám RNA totivirů). Zároveň byla postulována možnost párování 5,8S a 18S rRNA s úseky této vlásenky, napomáhající iniciaci translace (Hannig *et al.*, 1984; Hannig a Leibowitz, 1985).

Byly nalezeny mutace určující neutrální fenotyp K$^{(-)}$ R$^{(+)}$ (Wingfield *et al.*, 1990) a "sebevražedný" fenotyp K$^{(+)}$ R$^{(+/-)}$ (Dignard *et al.*, 1991).



Obrázek 14: Srovnání struktury preprotoxinu K1 `M1p` a preprotoxinu K28. `M28p`. Čísla odpovídají pořadí aminokyselinových zbytků v sekvevenci preprotoxinů. Šipky označují pozice štěpení endopeptidázou `Kex2`, signální peptidázou `SP` a neznámou peptidázou `?`. Řeckými písmeny jsou vyznačeny domény. Upravený obrázek z práce Schmitt a Tipper (1995) byl převzat z práce Pospíšek (1998b).

K2 kmeny se přirozeně vyskytují v kombinaci s L-A-H variantou dsRNA (viz kapitola věnovaná variantám ScV-L-A), která je odolná vůči zvýšené teplotě (Weinstein *et al.*, 1993). V literatuře zmiňovaná K3 varianta je pravděpodobně varianta K2 typu (Young, 1987; Wingfield *et al.*, 1990).

2.1.1.1.1.8.2.1 NS dsRNA – deleční derivát M2 dsRNA

Cansado *et al.* (1999) nalezli v jednom z 88 spontánně kvasících izolátů vinných kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* K2 typu dsRNA o velikosti 1,3 kbp, který byl odolný vůči působení RNázy A v prostředí s vysokou koncentrací solí. Virové částice obsahující NS dsRNA měly vznášivou hustotu 1,38 g/mL. Štěpení S1 nukleázou neposkytovalo žádné fragmenty, zatímco štěpení M2 dsRNA poskytlo fragmenty o velikosti 1,1 a 0,5 kbp (pravděpodobně štěpením v interní `AU` bohaté oblasti, viz Hannig a Leibowitz, 1985). Ani během 180 pasážovacích kroků při seriové kultivaci se nezměnil počet kopií na buňku, ani nedošlo k eliminaci M2 dsRNA.

2.1.1.1.1.8.3 M28 dsRNA – satelitní dsRNA ScV-L-A

M28 dsRNA má velikost 1748 bp a je závislá na ScV-L-A (je to tedy satelitní dsRNA viru ScV-L-A) (Schmitt a Tipper, 1992, 1995). Schmitt a Tipper (1995) publikovali kompletní cDNA sekvenci M28 dsRNA — přímým sekvenováním RNA zjistili sekvenci obou konců dsRNA a následně provedli reverzní transkripci pomocí specifických "primerů". Preprotoxin je tvořen 345 aminokyselinovými zbytky a jeho překlad začíná na pozici ^{13}AUG M28 $(+)$ ssRNA. Fakultativní iniciační kodón je v pozici 15, ale vzniklý toxin je méně účinný. Prekurzor (viz **Obrázek 14**) je štěpen signální peptidázou nejspíše v pozici Ala^{24} nebo Leu^{31}, skládá se z α, β a γ domény stejně jako K1 toxin. K28 toxin je upravován Kex1p, Kex2p proteázami, pravděpodobně také Yap3 nebo jinou proteázou. *kex1* mutanty produkují asi 80 %toxinu ve srovnání s divokým kmenem. *kex2* mutanty neprodukují aktivní toxin vůbec. *kex1* i *kex2* mutanty jsou vůči působení toxinu imunní. K28 toxin je glykozylován, váže se na buněčnou stěnu přes α–1,3–mannan a způsobuje blok syntézy DNA (Schmitt a Radler, 1987; Tipper a Schmitt, 1991; Schmitt a Tipper, 1995; Schmitt, 1995).

M28 dsRNA se vyskytovala v experimentech Schmitta a Tippera (1992) současně s L-A-H $[B]^-$ $[N]^-$, protože buňky bylo možné vyléčit od M28 dsRNA cykloheximidem (jako L-A-H), ale ne zvýšenou teplotou (to lze v případě L-A-HN) a zároveň buňky ztrácely "killer" fenotyp v *mak11* hostiteli ([B] ale obchází *mak11* mutace) (viz kapitola věnovaná variantám ScV-L-A).

2.1.1.1.2 L-BC virus *Saccharomyces cerevisiae* (ScV-L-BC)

Genomová dsRNA má velikost 4.6 kbp, kóduje obalový Gag protein a polymerázu Pol. Thiele *et al.* (1984a) ve svých pokusech studovali strukturní a sekvenční podobnost L-A a L-BC dsRNA. Je pravděpodobné, že L-BC dsRNA rovněž postrádá 5' čepičkovou strukturu a proto se předpokládá, že expresi L-BC reprimuje *SKI1/XRN1* antivirový systém (Wickner, 1996). Podobně jako Gag protein ScV-L-A, i v případě L-BC viru 82 kDa Gag protein (El-Sherbeini *et al.*, 1984) odštěpuje čepičkové struktury z buněčných mRNA (viz kapitola věnovaná hostitelským genům) (Blanc et. al., 1992; Blanc *et al.*, 1994). L-BC dsRNA se vyskytuje v buňce v 10–20x nižší koncentraci než L-A (Reilly *et al.*, 1984). Označení L-BC vychází z faktu, že byly nalezeny alespoň 2 virové entity mající velikost shodnou s L-A dsRNA (na základě mapování RNázou T1 rozlišené na L-B a L-C), jejichž propagace byla na rozdíl od L-A nezávislá na *MAK3* , *MAK10* a *PET18* genech, obě dsRNA byly enkapsidovány v jiných kapsidových proteinech a s jejich přítomností v buňce nebyl spojen žádný ("killer" nebo jiný) fenotyp (Sommer a Wickner, 1982a; Wickner a Toh-e, 1982). V současné době se používá označení L-BC, ačkoli tento virus není dostatečně prozkoumán. L-BC je závislý na *CLO* genu a počet kopií L-BC dsRNA je negativně ovlivňován geny *SKI2*,*3*,*8* (Ball *et al.*, 1984; Wesolowski a Wickner, 1984). *MAK1*, *MAK4*, *MAK7*, *MAK17*, *MAK24* neovlivňují počet kopií L-BC ani L-A (Ball *et al.*, 1984).

Replikační cyklus ScV-L-BC je podobný jako u ScV-L-A (Fujimura *et al.*, 1986). Vazebné schopnosti RNA *in vitro* a templátově závislé replikační a transkripční systémy byly popsány (Ribas a Wickner, 1996a). Zatímco L-BC replikáza preferuje L-BC (+) ssRNA, jako templát přijímá i (+) X ssRNA, po které stejně jako L-A replikáza vyžaduje 3'-koncové 4 báze a přilehlou replikační vlásenku. Žádná z těchto struktur nebyla nalezena na 3' konci L-BC dsRNA (Wickner, 1996). *In vitro* syntéza mRNA v L-BC virionech probíhá pouze podle templátu L-BC dsRNA (Ribas a Wickner, 1996a). Vazba virových (+) ssRNA otevřenými partikulemi je specifická pouze pro L-BC (+) ssRNA. Transkriptáza také silně preferuje L-BC dsRNA (Wickner, 1996).

Genom L-BC byl sekvenován a záznam SCU01060 (4615 bp) [25] v databázi GenBank má zavádějící označení jako **La** (Park *et al.*, 1996a). Otevřené čtecí rámce jsou jako u L-A dsRNA umístěny na 5' a 3' koncích genomu (+) řetězce, překrývají se o 154 bází, s Pol genem v -1 čtecí fázi ve srovnání se čtecím rámcem pro Gag (Wickner, 1996).

2.1.1.1.3 *Ustilago maydis* dsRNA virus

"Killer" kmeny *Ustilago maydis* produkují "killer" toxin, který zabíjí některé citlivé kmeny stejného druhu nebo příbuzných druhů. Jsou známy toxiny KP1, KP4 a KP6, které jsou produkovány kmeny označovanými P1, P4 a P6. Rezistence k jednomu druhu toxinu nezahrnuje rezistenci i k ostatním typům toxinu. (Koltin, 1986, 1988). Jsou známy geny *Ustilago maydis*, které jsou v recesivní podobě zodpovědné za rezistenci vůči KP1 toxinu, ale ne vůči KP4 a KP6. Virová cytoplazmatická dsRNA kóduje imunitu. Systém až 8 dsRNA molekul přítomných v individuálním kmeni buněk naznačuje složitost celého systému. Toxiny nebyly detekovány v rostlinných hostitelských tkáních ani neovlivňují růst rostliny a počítá se s jejich využitím při přípravě transgenních rostlin (Ghabrial, 1994).

dsRNA jsou přítomny v kapsidách o velikosti 43 nm, každý kmen obsahuje alespoň jednu dsRNA z každé skupiny: H (angl. heavy), M (angl. medium), L (angl. light) dsRNA. Různé kmeny *Ustilago maydis* obsahují různé kombinace těchto 3 typů dsRNA, například:

[25] Další záznam X54405 (737 bp) - báze 1–737 odpovídají přesně bázím 3831–4567 ((+) vlákna ssRNA L-BC SCU01060).

- P1 kmen obsahuje: H1, H2, M1, M2, M3, L dsRNA
- P4 kmen obsahuje H1, H2, H3, H4, M2, M3, L dsRNA
- P6 kmen obsahuje H1, H2, M2, M3, L nebo také jenom H1, H2, L dsRNA

H dsRNA kódují kapsidový protein a jsou baleny samostatně. M dsRNA kódují toxin a mohou být zabaleny samostatně nebo v kombinaci s dalšími M dsRNA. L dsRNA je pravděpodobně balena zvlášť. Ačkoli H dsRNA nebyla sekvenována, předpokládá se že kóduje totivirus s monopartitiním genomem (označovaný UmV-H). H1 dsRNA má velikost 6,0 kbp, H2 má velikost 4,5 kbp, H3 má velikost 3,2 kbp a H4 má velikost 2,6 kbp. H dsRNA ravděpodobně kódují kapsidový protein a RDRP fúzní protein. Jsou známy izoláty, které obsahují pouze H1 dsRNA. *in vitro* translační produkty H dsRNA mají velikosti od 75 kDa do 128 kDa, patrně díky předčasné terminaci translace nebo nekompletním mRNA (všechny výsledné proteiny lze srážet protilátkou proti virionům UmV-H, ačkoli není jasné zda k imunizaci nebyla použita směs virionů kódovaných typy H1, H2 nebo H3) (Ghabrial, 1994).

M dsRNA kódují “killer” toxin a mají velikosti 1–1,6 kbp.

- KP1 toxin (je kódován P6M2 dsRNA) vzniká štěpením Kex2p proteázou, je glykozylován. Vlastní toxin je tvořen 13,4 kDa velkou β podjednotkou, o funkci α podjednotky není nic známo. P1M2 dsRNA má na rozdíl od ostatních P1M1, P4M2, P6M2 dsRNA odlišné 3’ koncové sekvence na $(+)$ řetězci (Park *et al.*, 1996b; Ghabrial, 1994).
- KP4 toxin je tvořen jedinou glykozylovanou podjednotkou o velikosti 11,1 kDa (Ganesa *et al.*, 1989, 1991). Krystalovou strukturu KP4 toxinu inhibujícího houbové a savčí Ca^{2+} iontové kanály určili Gu *et al.* (1995). KP4 nevyžaduje Kex2p pro svojí aktivitu (Park *et al.*, 1994). KP4 toxin byl úspěšně exprimován a sekretován v rostlinných buňkách (Park *et al.*, 1996b)
- KP6 toxin je složen z α (7,5 kDa) [26] a β (9,0 kDa) [27] podjednotek, které nejsou spojeny kovalentní vazbou. Nejdříve s buněčnou stěnou buňky interaguje α podjednotka teprve poté β. Sféroplasty nejsou citlivé vůči toxinu, ale s obnovou buněčné stěny se dřívější sféroplasty stávají citlivé. P6M2 dsRNA byla sekvenována (Tao *et al.*, 1990). Preprotoxin obsahuje 219 aminokyselinových zbytků a má velikost 24 kDa a jako K1 toxin *S. cerevisiae* štěpen Kex2p proteázou a nějakou další proteázou (P6M2 cDNA byla exprimována s buňkách *S. cerevisiae* a buňky produkovaly funkční “killer” toxin KP6). KP6 byl úspěšně exprimován a sekretován v transgenních rostlinách. Strukturu KP6α podjednotka je rovněž známa (Tao *et al.*, 1990; Ghabrial, 1994; Kinal *et al.*, 1995; Li *et al.*, 1999).

L dsRNA mají velikost 355 bází. L dsRNA z P1 kmene byla sekvenována a na žádném z obou vláken neobsahuje výrazný ORF a obsahuje 3’ konec M dsRNA (zatímco 5’ konec L dsRNA nevykazuje podobnost s 5’ koncem M dsRNA). Vzniká buď interní iniciací transkripce nebo posttranskripčním štěpením transkriptu $(+)$ vlákna (Ghabrial, 1994).

2.1.1.1.4 *Hanseniaspora uvarum* virus (HuV)

Jedná se pravděpodobně o zástupce totivirů, obsahující L dsRNA 4,7 kbp a M dsRNA o velikosti 1,0–1,9 kbp (Schmitt *et al.*, 1997; Schmitt a Neuhausen, 1994; Radler *et al.*, 1985, 1990; Zorg *et al.*, 1988). Oba typy dsRNA jsou odděleně zabaleny do ikosaedrálních kapsid, které mají RDRP aktivitu. HuV-L

[26] KP6α podjednotka působí jako monomer a je podobná neurotoxinům a vyžaduje 8 intramolekulárních S–S můstků (Tao *et al.*, 1990). Možná je také podobnost s některými cytotoxiny, které tvoří iontové kanály (Rees *et al.*, 1984).

[27] KP6β podjednotka není sekvenčně podobná K1 toxinu *S. cerevisiae*, ale profil hydrofobicity ho výrazně připomíná. Na rozdíl od β podjednotky K1 toxinu není glykozylována (Ghabrial, 1994).

dsRNA kóduje kapsidový protein o velikosti 77 kDa a hybridizační studie naznačují, že tato L dsRNA není homologická s dsRNA ScV-L-A. Naopak, HuV-M dsRNA o velikosti 1,0 kbp má určité homologické sekvence s M1, M2, M28 dsRNA ScV (Schmitt *et al.*, 1997). HuV-M dsRNA kóduje "killer" toxin, který působí na buňky rodu *Candida*. Jedná se o protein velikosti 18 kDa, který není glykozylován a má široké spektrum účinku na mnohé kmeny (Radler *et al.*, 1990; Schmitt *et al.*, 1997). Zorg *et al.* fúzovali *H. uvarum* "killer" toxin prodující buňky s buňkami *S. cerevisiae*, výsledné heterokaryontní kmeny sice krátkou dobu produkovaly "killer" toxin, ale jádra heterokaryontů nesplynula a buňky během následujících kultivací nebyly životaschopné (Schmitt *et al.*, 1997).

2.1.1.1.5 *Helmintosporium victoriae* **190S virus (HvV-190S)**

Virus HvV-190S byl nalezen v cytoplazmě fytopatogenní houby *Helmintosporium victoriae* (Lindberg, 1959, 1960; Ghabrial *et al.*, 1979; Sanderlin a Ghabrial, 1978). Partikule jsou izometrické a mají v průměru 40-50 nm (Ghabrial *et al.*, 1995a). Virová "infekce" se projevuje sníženým růstem, zvýšeným sektorováním mycelia, význačnými morfologickými změnami mycelia a ve výsledku generalizovanou lyzí hostitele. *H. victoriae* produkuje do prostředí širokospektrý fungicid **viktoriocin**, pravděpodobně 8 kDa velký protein. Nemocné izoláty *H. victoriae* by mohly být obdobou sebevražedných kmenů kvasinek, které nejsou imunní vůči "killer" toxinu. Protože se v izolátech s virem 190S vždy vyskytuje virus 145S a protože 190S virus má mnohé charakteristiky podobné viru ScV-L-A, je možné, že 145S virus je satelitní virus viru 190S nebo 145S partikule obsahují systém jeho satelitních dsRNA (obsahují 2,6; 2,8; 3,0; 3,4 kbp dsRNA). Zatím není jasné, zda je viktoriocin kódován virovou dsRNA (Ghabrial a Havens, 1989; Ghabrial, 1994).

Genom viru obsahuje 5178 bp, 2 rozsáhlé a vzájemně se překrývající otevřené čtecí rámce. Kóduje kapsidový protein (dále jen CP) a polymerázu o velikosti 165 kDa (RDRP), která nevzniká jako fúzní protein CP-RDRP jako v případě ScV-L-A (Huang a Ghabrial, 1996). Transkripce (vznik ssRNA podle dsRNA templátu) je konzervativní (Ghabrial a Havens, 1989). Ačkoli virová dsRNA kóduje jen jeden kapsidový protein, v buňce se nachází 3 proteiny: hlavní kapsidový fosfoprotein p88, fosfoprotein p83 a nefosforylovaný protein p78 (který je zároveň proteolytickým štěpem p88 na C–konci) (Huang *et al.*, 1997). Samotný translační produkt ORF pro kapsidový protein (CP) je nefosforylovaný p88 (potvrzeno *in vitro* translací a expresí v bakteriích). Pouze proteiny p78 a p88 byly přítomné v partikulích HvV složených z proteinů exprimovaných v bakulovirovém expresním systému hmyzích Sf9 buněk (Huang *et al.*, 1997). Pouze p88 se exprimoval v bakteriích *Escherichia coli* a protože byl nefosforylovaný (autofosforylaci vyloučili Soldevila *et al.*, 1998) a skládal se do prázdných virových partikulí, je zřejmé, že proteiny p78 a p83 nejsou pro tvorbu partikulí nutné (Soldevila *et al.*, 1998). Proteiny p83 a p78 se normálně vyskytují v partikulích v různých poměrných množstvích vůči p88, který je vždy přítomen (majoritní, viz dále). S odlišnou fosforylací virových proteinů se dává do souvislosti s viriony asociovaná proteinkinázová aktivita serin/threoninového typu (Ghabrial *et al.*, 1987; Ghabrial a Havens, 1992; Ghabrial, 1994).

Purifikované partikule se mírně odlišují v sedimentačních rychlostech a jsou označovány jako 190S-1 a 190S-2 viriony. 190S-1 kapsidy obsahují p88 a p83 (v poměru 1:1), 190S-2 kapsidy obsahují p88 a p78 (v poměru 1:1) (Ghabrial a Havens, 1992). Pravděpodobně se nejedná o partikule odlišující se jen v míře fosforylace proteinů, ale jedná se asi o různá přechodná stadia replikace viru (Ghabrial, 1994). S HvV-190S jsou někdy asociovány virové partikule označované podle sedimentačních hodnot jako Hv145S, které obsahují satelitní dsRNA závislou na replikaci a enkapsidaci pomocným virem Hv190SV (Ghabrial, 1994; Soldevila *et al.*, 2000).

5' konec $(+)$ RNA není čepičkován, je vysoce strukturován a obsahuje 289 bází dlouhou nepřekládanou oblast se dvěma ne-inicializačními AUG kodóny. Tato nepřekládaná oblast je považována za místo nasednutí ribozómu díky IRES struktuře (angl. Internal Ribosome Entry Site) nezávisle na čepičce, vzniká tak kapsidový protein (CP). Předpovídaná sekundární struktura přibližuje "ten správný" `AUG` kodón v pozici 290 ke skutečnému 5' konci a možná tak napomáhá iniciaci translace. Čtecí rámec pro RDRP protein je posunut o -1 vůči rámci pro CP protein (290-2608 bp). Translační iniciační kodón pro RDRP protein (2605-2607 bp) se překrývá s terminačním kodónem pro CP (2606-2608 bp) v sekvenci 2605-AUGA-2608. RDRP protein je nacházen pouze jako minoritní, nefúzní, s virionem asociovaný protein a autoři navrhují jeho vznik mechanismem interní iniciace translace. 3' nepřekládaná oblast je v pozici 4918-5178 bp (Huang a Ghabrial, 1996).

Experimenty s dicistronickými konstrukty mRNA Soldevila a Ghabrial (2000) ukázaly, že RDRP protein není v bakteriích exprimován (je exprimován pouze CP, 88 kDa), ale v kvasince *Schizosaccharomyces pombe* byl v malém množství exprimován i protein RDRP. Exprese v *Schizosaccharomyces pombe* probíhala přímo z genomové RNA, nikoli z částečných transkriptů RNA (to je důkazem, že se opravdu jedná o interní iniciaci translace z jedné mRNA a ne o překlad dvou typů mRNA odpovídajících oběma čtecím rámcům). Protože v genomu HvV-190S nebyla nalezena heptanukleotidová sekvence obvykle spojená s posunem ribozomální čtecí fáze, ani nebyla předpovězena přítomnost takové pseudouzlové struktury na základě počítačové analýzy, hledali Soldevila a Ghabrial jiné vhodné modely vysvětlující expresi RDRP proteinu z discistronické mRNA. Uvažovali o "leaky-scanning" mechanismu, který by umožňoval expresi RDRP proteinu, protože iniciační kodón pro RDRP (`ACAAUGA`) je ve výhodnějším kontextu než iniciační kodón pro kapsidový protein (`UCCAUGU`). Vzhledem k velké vzdálenosti mezi těmito iniciačními kodóny tuto hypotézu nepovažují za pravděpodobnou. Uvádí, že dedukcí "z dobře dokumentovaných prací" zabývajících se "leaky-scanning" mechanismem vypočetli, že vzdálenost mezi iniciačními kodóny nebývá více než 150 bp, maximálně však 900 bp. V případě HvV-190S by se muselo jednat o 2316 bp. Jako pravděpodobnější hypotézu navrhují terminaci s ní spojenou opětovnou reiniciaci translace (angl. coupled termination-reiniciation model) (Soldevila a Ghabrial, 2000).

2.1.1.1.6 *Zygosaccharomyces bailii* virus

Radler *et al.* (1993) charakterizovali "killer" toxin produkující kmen *Zygosaccharomyces bailii* obsahující dsRNA. L dsRNA (4,5 kbp) i M dsRNA (1,8 kbp) jsou asociovány s proteinem o molekulové hmotnosti 85 kDa. *Z. bailii* navíc obsahuje Z dsRNA (2,8 kbp), která je asociována s 35 kDa velkým proteinem. Přenos L a M dsRNA do *S. cerevisiae* fůzí buněk *Z. bailii* vedl k získání heterokaryontů exprimujících "killer" toxin *Z. bailii* (Radler *et al.*, 1993).

Schmitt a Neuhausen, (1994) transfekovali virové částice obsahující L a M dsRNA do buněk *S. cerevisiae* obsahující L-A-H dsRNA. Pomocí cykloheximidu se jim dále podařilo vyléčit toxin produkující kmeny od produkce "killer" toxinu a současně M dsRNA (ačkoli v některých kmenech zbylo detekovatelné množství, autoři to dávají do souvislosti s výskytem tohoto jevu při léčbě cykloheximidem). V některých případech buňky zároveň navíc ztratily L dsRNA, ale Z dsRNA zůstala přítomna vždy (kmeny zůstaly imunní/rezistentní vůči působení toxinu!). Rovněž kmeny obsahující jen L dsRNA a které léčením ztratily Z dsRNA zůstaly imunní. Zjistilo se, že jak původní "killer" produkující kmeny, tak kmeny vyléčené od M dsRNA vázaly na buněčnou stěnu toxin. Znamená to, že se zde jedná o jiný mechanizmus imunity/rezistence než v případě *S. cerevisiae* toxinu K1, kdy může být imunita spojena s nepřítomností receptoru na buněčné stěně. Dokonce ani sféroplasty odléčených kmenů nebyly citlivé vůči toxinu — znamená to, že M dsRNA není zahrnuta jak ve tvorbě toxinu, tak v imunitě vůči jeho působení. Podařilo se prokázat sférické virové částice o průměru asi 38-40 nm. L dsRNA pravděpodobně kóduje kapsidový protein o hmotnosti 85 kDa.

Z dsRNA (kódující 35 kDa veliký protein) je pravděpodobně samostatný, na L a M dsRNA nezávislý virus ZbV-Z zejména proto, že se jej podařilo izolovat z heterokaryontů *S. cerevisiae*, které byly předtím infikovány všemy 3 typy dsRNA (viz výše) a následovně zbaveny L a M dsRNA (lze je mnohem snáze zbavit stejných dsRNA cykloheximidem než původní kmen *Z. bailii*). Heterokaryontní kmeny byly mimo jiné odléčeny od Z dsRNA a L dsRNA (zůstala M dsRNA a L-A-H) a ty byly vůči působení "vlastního" toxinu citlivé (sebevražedné mutanty), M dsRNA byla enkapsidována v partikulích složených jen z 88 kDa velkého kapsidového proteinu ScV-L-A. Předpokládají, že ke ztrátě L dsRNA ZbV z transfekovaných buněk *S. cerevisiae* došlo proto, že L-A dsRNA s ní není kompatibilní (Radler *et al.* 1993; Schmitt a Neuhausen, 1994).

Toxin produkovaný *Z. bailii* je účinný na široké spektrum kmenů zahrnujících rody *Saccharomyces*, *Klyuveromyces*, *Sporothrix*, *Zygosaccharomyces* a *Candida*. Mechanizmus účinku není znám (Radler *et al.*, 1990).

2.1.1.1.7 Virus kvasinkovitého organizmu *Dipodascus magnusii*

Virus kvasinky *Dipodascus magnusii* [28] je tvořen izometrickými částicemi o průměru 43 nm a obsahuje dsRNA o velikostech 4,3 kbp, 2,64 kbp, 1,84 kbp, 1,77 kbp, 0,83 kbp, 0,78 kbp (Pospíšek *et al.*, 1994). Kapsidy jsou tvořeny majoritním kapsidovým proteinem o velikosti 75 kDa (Nosek *et al.*, 1993). Nosek *et al.* dále pozorovali polymorfismus velikosti dsRNA molekul přítomných v různých kmenech *Dipodascus magnusii*. Kvasinkový kmen obsahující virus produkuje látku proteinové povahy, která mění morfologii kolonií buněk citlivého kmene *Hansenula anomala* na pevném médiu a inhibuje jejich růst. Souvislost mezi přítomností viru a produkcí toxinu se nepodařilo objasnit, protože se nepodařilo zbavit buňky viru pomocí inkubace při teplotě 35–42 °C, cykloheximidu v koncentraci 2 mg/mL, iradiace UV zářením poskytujícím 0,001–25 % přežívajících buněk, akridinovou oranží v koncentraci 150 μg/mL (Pospíšek *et al.*, 1994).

2.1.1.2 *Giardiavirus*

Tento rod obsahuje viry infikující prvoky (prvoci infikují člověka a způsobují vážná průjmovitá onemocnění v rozvojových zemích, léčba je obtížná). Typovým druhem rodu je *Giardia lamblia* virus (GlV). Předběžně je do rodu zařazen virus *Trichomonas vaginalis* (TvV) [29] . Viriony GlV uvolněné do kultivačního media jsou schopné infikovat buňky nenakažených kmenů *G. lamblia*.

2.1.1.2.1 *Giardia lamblia* virus (GlV)

Giardia lamblia virus má dsRNA genom veliký 6277 bp (Wang *et al.*, 1993; Wu *et al.*, 1995) (GenBank L13218). Virové částice mají průměr 36 nm (Wang a Wang, 1986). Kapsidový protein má hmotnost 100 kDa a RDRP má velikost 190 kDa (ačkoli vzniká -1 posunem ribozomální čtecí fáze, místo posunu je za nalezenou heptanukleotidovou sekvencí). Neznámá cysteinová proteáza posttranslačně štěpí kapsidový protein a odštěpuje 32 aminokyselinových zbytků z N–konce kapsidového proteinu (Yu *et al.*, 1995a). Virová $(+)$ ssRNA byla úspěšně transfekována do *Giardia lamblia* buněk kde došlo k expresi virových proteinů a virové infekci. Tekuté kultury s infikovanými buňkami uvolňují do prostředí virus, který je na rozdíl od ScV-L-A a LRV virů vysoce infekční (Wang *et al.*, 1993).

[28] Jedná se o vícejaderný kvasinkovitý organizmus (Adamíková *et al.*, 1998), studovaný zejména v cytologických studiích díky výrazně velikým buňkám nebo při studiu membránového potenciálu (Slavík, 1983). Elektroforetický karyotyp studovali Filipp *et al.* (1995), strukturu kruhového 40 kbp velkého mtDNA plazmidu studovali Griač *et al.* (1993), o tvorbu genetického transformačního systému pro tento kvasinkovitý organismus se neúspěšně pokoušela Adamíková *et al.* (1998).

[29] TvV obdobně jako ScV-L-A virus je tvořen L dsRNA a jsou s ním asociovány M a S dsRNA. Virus TvV *Trichomonas vaginalis* a některé satelitní dsRNA byl sekvenován a podrobně studován. Protože se jím zde nebudu podrobněji zabývat, čtenáře odkazuji na práce (Khoshnan a Alderete, 1993, 1994, 1995; Khoshnan *et al.*, 1994; Tai a Ip, 1995; Liu *et al.*, 1998; Bessarab *et al.*, 2000).

In vitro transkripty umělého konstruktu obsahujícího 5' a 3' nepřekládané oblasti GlV dsRNA a reportérový luciferázový gen se podařilo transfekovat do jiného kmene *Giardia lamblia* (infikovaného GlV), ve kterém byla následně detekována $(-)$ forma této mRNA (patrně po enkapsidaci do partikulí viru a replikaci replikázou). Antisense RNA byly detekovány pouze v případě, že byl použit konstrukt obsahující zároveň obě nepřekládané oblasti GlV dsRNA, jinak antisense RNA nebyla detekována (Yu *et al.*, 1995b).

2.1.1.3 *Leishmaniavirus*

Tento rod obsahuje viry prvoka *Leishmania*. Typovým druhem je *Leishmania* RNA virus 1-1 (LRV1-1). Dále sem zahrnujeme další viry nalezené v izolátech z Nového světa *Leishmania brasiliensis* a *Leishmania guyanensis*, označované postupně LRV1-2 až LRV1-12. Virus jako jediný nalezený na starém kontinentě v *Leishmania major* je označován jako LRV2-1 [30] .

2.1.1.3.1 *Leishmania* virus 1 (LRV1)

RNA viry z parazitických prvoků *Leishmania brasiliensis* a *Leishmania guyanensis* byly shrnuty do rodiny typu 1 (Stuart *et al.*, 1992). Tyto viry perzistují v cytoplazmě, mají dsRNA genom a nečepičkovanou $(+)$ ssRNA. 5' nepřekládaná oblast obsahuje IRES strukturu, která umožňovala expresi reportérových proteinů z dicistronických mRNA (Maga *et al.*, 1995).

Genomová dsRNA LRV1–4 má velikost přibližně 5,3 kbp (Scheffter *et al.*, 1994) a obsahuje 2 otevřené čtecí rámce (označované ORF2 a ORF3, plus jeden malý na 5' konci označovaný jako ORF1), ORF2 začínající na pozici 450 (obalový protein, ORF2) a RDRP protein (ORF3) (GenBank U01899). Expresí kapsidového proteinu z ORF2 v bakulovirovém expresním systému s použitím hmyzích Sf9 buněk dochází k produkci kapsidového proteinu a samovolné tvorbě kapsid (Cadd a Patterson, 1994). Čtecí rámec pro RDRP protein se překrývá se čtecím rámcem pro obalový protein a je posunut o $+1$ bázi a připomíná tak retroviry (Cadd a Patterson, 1994). Tak, jak bylo očekáváno z cytoplazmatického výskytu virových RNA, nebyl detekován miniexon [31] ani čepička na 5' konci virových RNA (Stuart *et al.*, 1992). Není známo, které báze z rozsahu 1–128 5'nepřekládané oblasti obsahují IRES strukturu (Maga *et al.*, 1995). Vlásenky obsahující báze 1–37 pravděpodobně nemohou nést IRES aktivitu, protože báze 1–8 nebyly obsaženy v testovaných konstruktech a vlásenka by se nacházela ve variabilní oblasti LRV1 (Widmer, 1993). Variabilní oblast LRV1 dsRNA považuje Maga *et al.* (1995) za kritickou pro virovou propagaci. Byla nalezena krátká RNA, která potenciálně obsahuje 5 vlásenkových struktur a vzniká specifickým štěpením endoribonukleázovou aktivitou kapsidového proteinu za 447. bází od 5' konce $(+)$ řetězce (funkce jednotlivých vlásenek byla studována cílenou mutagenezí) (Ro a Patterson, 2000). LRV1-4 kapsidový protein má hmotnost 82 kDa, tvoří dimery. RDRP protein má hmotnost 180 kDa a je degradován buněčnou serinovou proteázou na fragmenty o velikostech 95 kDa a 82 kDa (Ro *et al.*, 1997).

Kapsidový protein nese endoribonukleázovou aktivitu, která specificky štěpí uvnitř 450 nukleotidové 5' nepřekládané oblasti svého vlastního RNA transkriptu (genomu)! Deleční analýzy ukázaly, že determinantou přesného štěpení je oblast 249-342, konkrétně vlásenková struktura 40 bází směrem k 5' konci před místem štěpení (nukleotid 320). V tomto místě se nachází jedna z 5 dříve předpovídaných vlásenek. Její přítomnost a struktura byla ověřována experimentálně a nachází se mezi bázemi 269-284 (Ro *et al.*, 1997; Ro a Patterson, 2000).

[30] O LRV2 viru je ve srovnání s LRV1 známo poměrně málo. Zde se tímto virem nebudu podrobněji zabývat a čtenáře odkazuji na novější práci práci Scheffter *et al.* (1995).

[31] Na rozdíl od většiny eukaryot, je čepička na mRNA trypanozomatických prvoků připojena v průběhu *trans*–sestřihu, při kterém vzniká chimérní mRNA obsahující stále stejný 39 bp dlouhý miniexon na 5' konci (Agabian, 1990).

2.1.2 *Partitiviridae*

(Ghabrial *et al.*, 1995b)

Genom partitivirů je složen ze dvou lineárních, monocistronických segmentů dsRNA (bipartitní genom) dlouhých 1,4 až 3,0 kbp, z nichž menší kóduje kapsidový protein a větší pravděpodobně RNA polymerázu (RDRP). Replikace probíhá na rozdíl od totivirů semikonzervativně. Isometrické viriony mají v průměru 30–40 nm. Viry způsobují latentní infekce hub i rostlin. Do rodiny patří rody Partitivirus, Chrysovirus, Alphacryptovirus, Betacryptovirus.

2.1.2.1 *Partitivirus*

Typovým druhem je virus 019/6-A *Gaeumannomyces graminis*. Dalšími zástupci jsou:

- "mushroom virus 4" *Agaricus bisporus* (AbV-4)
- virus *Aspergillus ochraceous* (AoV)
- virus T1-A *Gaeumannomyces graminis* (GgV-T1-A)
- virus S *Penicillium stoloniferum* (PsV-S) (Lhoas, 1971; Buck, 1975)
- virus *Rhizoctonia solani* (RsV) (Strauss *et al.*, 2000; Lakhsman *et al.*, 1998)

Předběžně jsou do rodu zařazeny:

- virus *Diplocarpon rosae* (DrV)
- virus F *Penicillium stoloniferum* (PsV-F)
- virus 2-2-A *Phialophora radicicola* (PrV-2-2-A)
- virus AsV *Atkinsonella hypoxylon* (Oh a Hillman, 1995)
- virus fytopatogenní houby *Fusarium solani* (FusoV) (Nogawa *et al.*, 1996)
- virus *Fusarium poae* (Fekete *et al.*, 1995; Compel *et al.*, 1998)
- "beet cryptic virus 3" (BcV3R2) (Xie *et al.*, 1993)

2.1.2.2 *Chrysovirus*

Typovým druhem je virus *Penicillium chrysogenum* (PcV) (Nash *et al.*, 1973; Buck a Girvan, 1977). Dalšími zástupci jsou:

- virus *Penicillium brevicompactum* (PbV)
- virus *Penicillium cyaneo-fulvum* (Pc-fV) (Buck a Girvan, 1977)

Předběžne je do rodu zařazen 145S *Helmintosporium victoriae* (HvV-145S) virus

2.1.3 *Hypoviridae*

(Hillman *et al.*, 1995; Ghabrial, 1994; Nuss, 1992)

Tyto viry netvoří pravé viriony a genomová dsRNA o velikosti 10–13 kbp je zabalena v pleomorfních váčcích o průměru 50–80 nm (tvořených hostitelem), které mají virově specifickou RNA dependentní RNA polymerázovou aktivitu. Genomová dsRNA obsahuje minimálně dva dlouhé otevřené čtecí rámce (ORF). Hypoviry byly nalezeny v dřevokazné houbě *Cryphonectria parasitica*, která způsobuje hnilobu stromů rodu *Castanea*. Typovým druhem je virus CHV1-EP713. Dalšími zástupci jsou viry CHV1-EP747, CHV2-NB58 a CHV3-GH2 (Hillman *et al.*, 1994; Smart *et al.*, 1999). V mitochondriích

Cryphonectria parasitica se vyskytuje další dsRNA [32] . Horizontální přenos mezi vegetativně kompatibilními mycelii *C. parasitica* běžně probíhá hyfálními anastomozami, vyjímečně dokonce i v případě mycelií odlišného typu. Na rozdíl od Evropy je v Americe velká různorodost *C. parasitica* a ta patrně omezila šíření hypovirových dsRNA. Hypovirové dsRNA se šíří také vertikálně nepohlavními sporami (konidie), u žádného hypoviru nebyl pozorován přenos pohlavními askosporami (Polashock *et al.*, 1997). Nicméně Choi a Nuss (1992) přenos viru askosporami zjistili (viz dále).

2.1.3.1 *Hypovirus*

Cryphonectria parasitica (*Endothia*) je rostlinný patogen, který ničí kaštanovníky *Castanea dentata* (Marsh.) v Severní Americe (byl introdukován z Asie). Přirozeně se objevující varianty *C. parasitica*, které mají sníženou virulenci, zpomalují postup choroby v Evropě. Tyto hypovirulentní kmeny mají sníženou schopnost sporulace, odlišnou pigmentaci a obsahují dsRNA (která je cytoplazmatickou determinantou hypovirulence). Byly nalezeny L, M a S dsRNA, přičemž M a S dsRNA vznikají delecí části L dsRNA, počet a velikost M a S dsRNA je proměnlivý. Na jednom konci dsRNA je poly(A)/poly(U) sekvence a tento konec je označován jako homopolymerický, druhý konec není sekvenčně jednotný a je označován jako heteropolymerický. M i S dsRNA si zachovaly sekvence obou konců RNA (149, 155 nebo 156 bází z 5' konce (přesněji z heteropolymerního konce) a 440, 447, 449 bází ze 3' konce (přesněji z homopolymerního konce)). Strukturou genomu a sekvenční podobností přípominají hypoviry spíše potyviry, než totiviry (Ghabrial, 1994).

Pozorovaná hypovirulence kmene byla experimentálně navozena v kmenech, které původně neobsahovaly virus ale byly **transformovány** cDNA kmene EP713, došlo k chromozomální integraci cDNA, tvorbě viru v cytoplazmě a následně jeho přítomnosti v konidiích a askosporách (Choi a Nuss, 1992),. Do sféroplastů neinfikovaného kmene se podařilo transfekovat pomocí elektroporace (+) CHV1-EP713 RNA (Chen *et al.*, 1994).

- L dsRNA z kmene EP713 (obsahující variantu viru označovanou HYPV-713, nověji CHV1-EP713) byla kompletně sekvenována a obsahuje 12 712 bp. (+) řetězec obsahuje 495 bází dlouhou 5' nepřekládanou oblast (obsahující 8 `AUG` kodónů a GC bohatým úsekem dlouhým asi 15–20 bází), 1869 bází dlouhý ORFA, 9498 bází dlouhý ORFB, 851 bází dlouhou 3' nepřekládanou sekvenci a je zakončen poly(A) sekvencí. Oba čtecí rámce se překrývají v sekvenci `5'-UAAUG-3'`, kde `UAA` je terminační kodón ORFA a `AUG` je iniciační kodón ORFB (oba kódují polyproteiny, které mají autoproteolytickou aktivitu, k autokatalytickému štěpení dochází kotranslačně). RDRP obsahující helikázový motiv má velikost 87 kDa a vzniká z ORFB. cDNA tohoto kmene byla integrována do genomu virulentního hostitele, ve kterém byla stabilně replikována a došlo k očekávanému snížení virulence. Překvapením ale bylo objevení delece 73 bází v 5' nepřekládané oblasti CHV1-EP713 (+) ssRNA způsobené sestřihem pre-mRNA (Chen *et al.*, 1994). L dsRNA (CHV1-EP713) inhibuje pigmentaci mycélia hostitele (Shapira *et al.*, 1991; Ghabrial, 1994; Fahima *et al.*, 1994; Nuss, 1992; Chen *et al.*, 1994).

- *Cryphonectria parasitica* NM58 je americký pigmentovaný izolát (obsahující variantu viru označovanou HYPV-58), který sekvencí dsRNA (obsahuje pouze L dsRNA o velikosti 12,5 kbp) nápadně připomíná evropské izoláty (ačkoli v Evropě izoláty obsahují navíc M resp. S dsRNA). HYPV-58 obsahuje dlouhou 5' nepřekládanou oblast obsahují 9 `AUG` kodónů (Ghabrial, 1994).

[32] dsRNA obsažená v mitochondriích *C. parasitica* má velikost 2728 bp a je příbuzná T a W dsRNA kvasinky *S. cerevisiae* a ssRNA bakteriofágům,např. Qβ. Šíří se hyfálními anastomózami a v některých případech i pohlavními askosporami (Koonin *et al.*, 1991; Polashock a Hillman, 1994; Polashock *et al.*, 1997). Za zmínku stojí nález dalších mitochondriálních dsRNA u patogenní houby *Ophiostoma novo–ulmi* (Hong *et al.*, 1998a, 1998b; 1999)

- *Cryphonectria parasitica* NB58 (kompletní sekvence přístupná v Genbank L29010) (Hillman *et al.*, 1994).

- *Cryphonectria parasitica* CHV1-Euro7 je evropský izolát (kompletní sekvence přístupná v Genbank AF082191). V polních pokusech infikované houby byly více virulentní (než houby infikované kontrolním CHV1-EP713), vykazovaly menší změny fenotypu. Sekvenční podobnost mezi CHV1-Euro7 a CHV1-EP713 87–93 % (na úrovni RNA) a 90–98 % (na úrovni proteinu) (Chen a Nuss, 1999).

- *Cryphonectria parasitica* GH2 je americký izolát se sníženou virulencí Zachoval si pigmentaci, schopnost tvořit konidie, lakázovou aktivitu. Má velikost 9,8 kbp (ve srovnání s jinými izoláty je podstatně menší) (Smart *et al.*, 1999).

2.1.4 *Barnaviridae*

(Romaine, 1995)

Viriony jsou protáhlého tvaru o délce 48–53 nm a šířce 18–20 nm, jsou složeny z jednoho hlavního kapsidového proteinu o molekulové hmotnosti 24,4 kDa. **Genom tvoří jediná** $(+)$ **ssRNA molekula o velikosti 4,4 kbp ukončená VPg proteinem na 5' konci**. Virus byl izolován ze žampiónu dvouvýtrusého (*Agaricus bisporus*) a často doprovází virus LIV (zodpovědný za chorobu žampiónů zvanou “La France disease”). Rodina obsahuje jediný rod *Barnavirus*, jediným známým druhem je virus MBV (”mushroom bacilliform virus”) (Revill *et al.*, 1998; Revill *et al.*, 1999; Romaine a Schlagnhaufer, 1995).

2.1.5 Taxonomicky nezařazené dsRNA viry a T a W dsRNA *S. cerevisiae*

Dále uvádím taxonomicky nezařazené izoláty houbových a protozoálních dsRNA obsažených buď v membránových váčcích, ve virům podobných partikulích nebo nahých. Pro rámcovou představu o zařazení na základě sekvenční podobnosti RDRP nejen těchto dsRNA, ale i dalších zmíněných v předchozím textu, doporučuji práci (Hong *et al.*, 1998b). Z prostorových a časových důvodů se jimi podrobněji nezabývám, ačkoli některé z nich jsou poměrně dobře prostudovány a velmi vhodně by obohatily probíranou tematiku [33] . Dále doporučují přehledné články (Wickner, 1996; Magliani *et al.*, 1997).

Virům podobné částice obsahující dsRNA byly dále nalezeny u hub:

- La France Isometric Virus *Agaricus bisporus* (LIV) (Goodin *et al.*, 1997; van der Lende *et al.*, 1996; Mayo, 1995; Harmsen *et al.*, 1991)
- *Phaffia rhodozyma* (Castillo a Cifuentes, 1994; Pfeiffer *et al.*, 1996)
- fytopagenní *Magnaporthe grisea* (anamorf: *Pyricularia oryzeae*) (Chun a Lee, 1997)
- fytopatogenní *Botrytis cinerea* (Vilches a Castilli, 1997)
- *Cryptococcus hungaricus* (Pfeiffer *et al.*, 1998)
- saprofytické *Agrocybe aegerita* (Barroso a Labarere J., 1990, 1993)
- *Geotrichum candidum* (Matte *et al.*, 1991)
- *Alternaria solani* (Zabalgogeazcoa *et al.*, 1997)
- *Discula destructiva* (Yao a Tainter, 1996)

[33] Existuje řada publikací věnovaných “killer” toxin produkujícím kmenům hub. V některých případech je známo, že produkovaný toxin je kódován jadernými geny. V ostatních případech se může jednat o další toxin kódovaný dsRNA.

- *Lentinus edodes* (Ushiyama *et al.*, 1977)
- *Monosporascus cannonballus* (Batten *et al.*, 2000)

Virům podobné částice obsahující dsRNA byly dále nalezeny u prvoků:

- *Eimeria nieschulzi* (Sepp *et al.*, 1991)
- *Cryptosporidium parvum* (Khramtsov *et al.*, 1997; Khramtsov a Upton, 1998; Khramtsov a Upton, 2000)

2.1.5.1 T a W dsRNA

Kadowaki a Halvorson (1971a,b) popsali 20S RNA jako nový druh ssRNA, který se indukuje ve sporulujících buňkách *Saccharomyces cerevisiae* při kultivaci na acetátovém médiu. Jedná se o ne-Mendelovsky děděný replikon, který se v buňkách množí indukcí stresovými podmínkami (jako je hladovění, zvýšená teplota, kultivace na acetátovém médiu) a dosahuje až 100 000 kopií/buňku, přenáší se cytoplazmatickou fúzí a jinou horizontální cestou není přenositelný (Garvik a Haber, 1978). Wesolowski a Wickner (1984) nalezli dva druhy dsRNA (W a T), které nejsou zabaleny do virům podobných partikulí kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* [34] , amplifikují se také při kultivaci kvasinek na acetátovém médiu a rovněž vykazují ne-Mendelovskou dědivost. Ukázalo se, že 20S RNA je $(+)$ řetězec W dsRNA a 23S RNA je $(+)$ řetězec T dsRNA (Esteban *et al.*, 1992; Matsumoto a Wickner, 1991; Rodríguez-Cousiño *et al.*, 1991; García-Cuéllar *et al.*, 1995; Esteban *et al.*, 1992). T a W dsRNA se vyskytují v mnoha laboratorních kmenech *S. cerevisiae* současně, T dsRNA byla nalezena zatím vždy v kombinaci s 20S dsRNA, zatímco W dsRNA byla nalezena v kmenech i samostaně (Ribas a Wickner, 1996b).

2.1.5.1.1 W dsRNA (20S RNA)

Cytoplazmatická 20S ssRNA má velikost asi 2,5–2,9 kbp a je částečně sekvenována (nekompletní sekvence 2505 bp, GenBank M63893, Rodríguez-Cousiño *et al.*, 1991 a rovněž nekompletní sekvence 2479 bp, GenBank M64034, Matsumoto a Wickner, 1991). 20 ssRNA není obsažena ve virových partikulích, ale je asociována s 23 kDa velkým proteinem (tvoří tak 32S částice). Replikace probíhá ve formě RNA$\rightarrow$RNA procesu s dsRNA replikačním intermediátem. Při kultivaci buněk na acetátovém médiu (používaném v experimentech k indukci sporulace) nebo také teplotním šokem dochází až k 10 000 násobné amplifikaci počtu kopií na buňku. Počet kopií 20S RNA na buňku je snižován hostitelským antivirovým systémem *SKI* genů (Matsumoto *et al.*, 1990; Wesolowski a Wickner, 1984). Dříve se někteří autoři domnívali, že se jedná o kruhovou molekulu (Matsumoto *et al.*, 1990), ale pozdější výzkumy ukázaly, že jde o lineární dsRNA (označovanou jako W dsRNA) jako replikační formu 20S ssRNA (Rodríguez-Cousiño *et al.*, 1991; Rodríguez-Cousiño a Esteban, 1992; Matsumoto a Wickner, 1991). 20S ssRNA resp. Matsumoto a Wickner (1991) navrhují, že se RNA replikuje mechanizmem valivé kružnice. Widner *et al.* (1991) zjistili, že 23 kDa protein (se kterým tvoří 20S RNA ribonukleoprotein), je chromozomálně kódovaný Hsp26, který nemá žádnou zvláštní úlohu v replikačním cyklu 20S RNA. 20S RNA kóduje 91 kDa velký protein sekvenčně podobný RDRP (který nekovalentně váže 20S RNA) (Esteban *et al.*, 1992; García-Cuéllar *et al.*, 1995).

Ribas a Wickner (1996b) prokázali RNA dependentní RNA polymerázovou aktivitu asociovanou s 20S RNA replikonem, kterou lze do buněk vnést současně s 20S RNA cytoplazmatickou fúzí. Vlastní RDRP se v CsCl gradientech nachází oblasti vznášivé hustoty volného proteinu, nevyžaduje ke své aktivitě ani L-A, L-BC dsRNA ani 23S RNA a podle všech $(-)$ ssRNA testovaných templátů (do velikosti 1 kb) vytvářela dsRNA. Zdá se, že RDRP po disociaci od 20S dsRNA (a možná i nějakého

[34] Ačkoli se pravděpodobně nejedná o mykovirové dsRNA, T a W dsRNA zde uvádím proto, že jejich dsRNA a přítomnost v cytoplazmě kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* připomínají některé aspekty biologie mykovirů.

cytoplazmatického faktoru) ztrácí svojí specifitu a procesivitu, protože kromě očekávaného dsRNA produktu byly vlivem terminálně-transferázové aktivitě enzymu nalezeny i jednořetězcové fragmenty RNA (enzym rovněž vytváří nezávisle na templátu krátké oligonukleotidy a k jejich tvorbě nevyžadujě všechny 4 ribonukleotidy A,U,G,C) (Ribas a Wickner, 1996b).

2.1.5.1.2 T dsRNA (23S RNA)

Cytoplazmatická T dsRNA má velikost asi 2,9–3,0 kbp (sekvenováno 97 % $\approx$ 2871 bp, GenBank 86595, Esteban *et al.*, 1992), její nukleotidová sekvence není podobná W dsRNA, ačkoli protein kódovaný T dsRNA (viz dále) a polymeráza W dsRNA si jsou navzájem podobné (včetně motivu typického pro RDRP) (Ribas a Wickner, 1996b). Navíc jsou RDRP proteiny 20S a 23S podobné RDRP z mitochondrií fytopatogenní houby *Cryphonectria parasitica* (Polashock a Hillman, 1994) (viz 2.1.3.1 a databáze GenBank L31849) [35] . Jednořetězcová forma T dsRNA je označována jako 23S $(+)$ ssRNA, sonda konstruovaná proti $(-)$ řetězci T dsRNA nehybridizovala s 23S ssRNA. 10–20 násobná amplifikace v buňce je indukována obdobně jako v případě W dsRNA hladověním na acetátovém médiu a tepelným šokem při kultivaci v teplotě 37 ^{o}C, nejvyšší zjištěné počty kopií jsou v rozsahu 10 000–100 000 kopií/buňku. Kmeny obsahující zároveň T a W dsRNA obsahují zhruba stejné množství obou typů (Esteban *et al.*, 1992).

T dsRNA kóduje 104 kDa veliký protein, který vykazuje ssRNA vazebnou aktivitu (díky doméně 234 aminokyselinových zbytků na C-konci) a váže se na 23S RNA (Esteban *et al.*, 1994). Podle nejnovějších zjištění T dsRNA ani 23S ssRNA netvoří virové částice tak, jak se předpokládalo (Esteban *et al.*, 1994; Wesolowski a Wickner, 1984; Widner *et al.*, 1991).

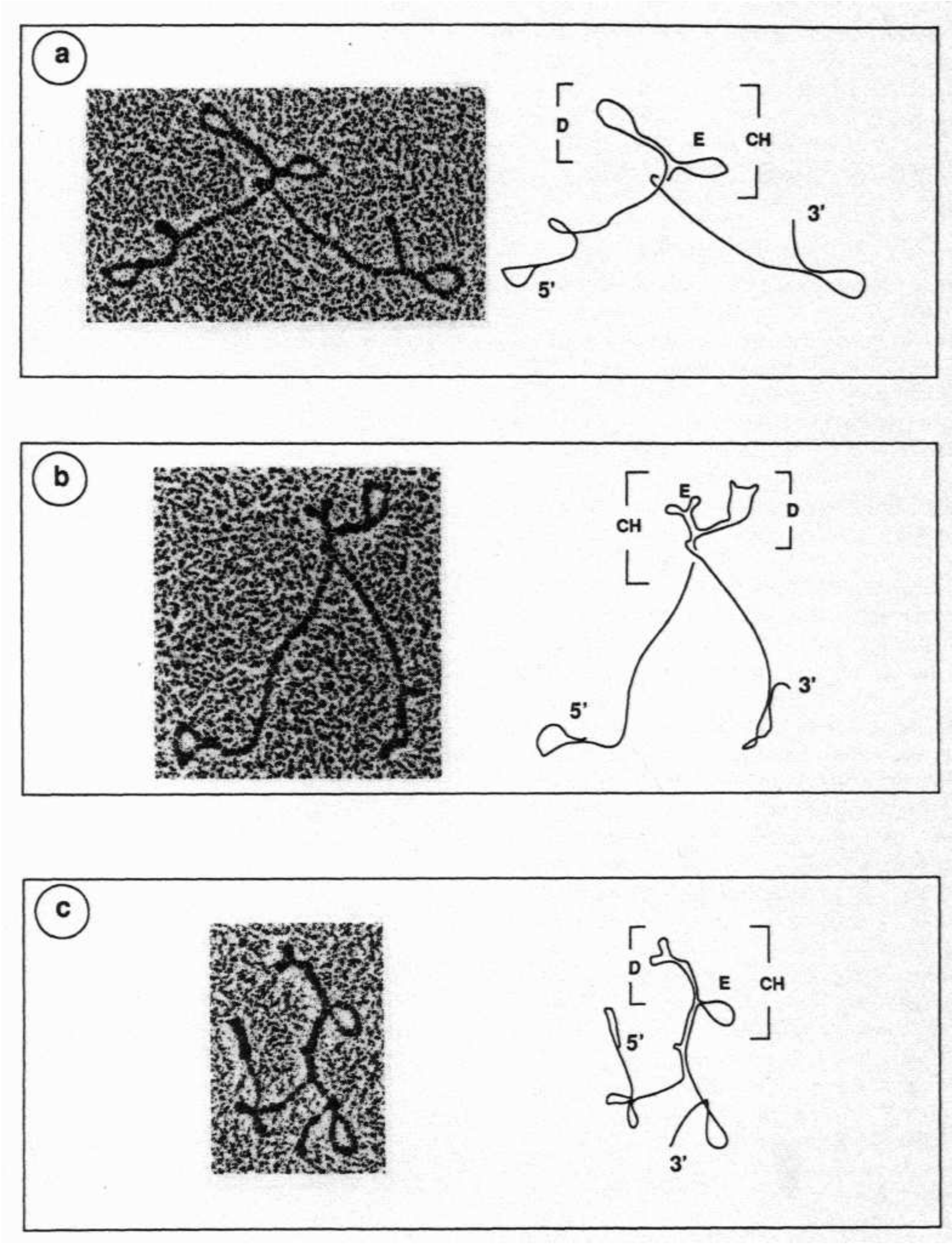
[35] dsRNA viry *Ophiostoma novo-ulmi* OnuMV-3a-Ld, OnuMV-4-Ld, OnuMV-5-Ld, OnuMV-6-Ld budou patrně také řazeny do čeledi *Mitoviridae* spolu s viry *Cryphonectria parasitica* (Hong *et al.*, 1999; Cole *et al.*, 2000). V databázi GenBank jsou přístupné pod čísly OnuMV-4-Ld AJ132754, OnuMV-5-Ld AJ137755, OnuMV-6-Ld AJ132756.

2.2 Teoretické přístupy při studiu sekundárních struktur nukleových kyselin

2.2.1 Sekundární struktury

Na snímcích z elektronového mikroskopu byly pozorovány sekundární struktury nukleových kyselin (např. viz **Obrázek 15**). Sekundární struktury nukleových kyselin jsou tvořeny jednořetězcovými a dvouřetězcovými úseky. Dvoušroubovice obsahuje alespoň 2 páry vzájemně spárovaných bází. Ve dvoušroubovici obsahující `k` bází dochází kromě vlastního spárování bází k `k-1` bočním interakcím planárních molekul bází (angl. base stacking). Sekundární struktury se nachází na všech, dostatečně dlouhých oligonukleotidech, jejich struktura je dána primární strukturou nukleové kyseliny, je ovlivňována iontovým prostředím a řídí se zákony termodynamiky [36] .

[36] Nedávno byla vytvořena databáze 5' a 3' nepřekládaných oblastí nukleových kyselin (UTRdb), která je obohacena o informace neobsažené v primárních databázích (Pesole *et al.*, 1999).



Obrázek 15: Proměnlivost sekundárních struktur RNA colifága Qβ. Mikrofotografie z elektronového mikroskopu zachycují na panelech a a c genomovou RNA, panel b zachycuje RNA transkript připravený T7 polymerázou (Převzato z práce Skripkin a Jacobson, 1993).

Díky počítačové analýze jsme schopni předpovídat přítomnost sekundárních struktur, v případně podobnosti těchto struktur s charakterizovanými strukturami také jejich biologické vlastnosti. První programy, které vypočítávaly energii sekundárních struktur, jednoduše sčítaly počty vodíkových vazeb vytvořených mezi spárovanými bázemi tak, jak je popsali Watson a Crick [37].

Pro sekundární strukturu platí následující pravidla:

1. vzdálenost mezi vzájemně spárovanými bázemi musí být > 4 (minimální sekundární struktura obsahuje 5 bází)
2. jestliže `i.j` a `i'.j'` jsou dva páry bází a `i=<i'` (`i` předchází v sekvenci `i'`), pak:
   (a) `i=i'` a `j=j'` (jedná se o jeden a tentýž pár bází)
   (b) `i<j<i'<j'` (`i.j` pár bází předchází `i'.j'` pár)
   (c) `i<i'<j'<j` (`i.j` zahrnuje v sobě `i'.j'`) (této podmínce nevyhovuje pseudouzlová struktura)

Výpočet energie pseudouzlové struktury (viz **Obrázek 12**) nelze provést pomocí algoritmů pracujících na bázi vyhledávání struktur s minimální energií (např. Mfold, FOLD, “Vienna package”, viz dále). Tyto programy díky výše uvedeným pravidlům eliminují pseudouzlové struktury z řady potenciálně existujících struktur, které postupnými kroky třídí podle energetické stability (viz dále). Jednou z mála vyjímek je program Cove, založený na kovariančních metodách (viz dále) a program STAR [38] . Někdy je proto pseudouzlová struktura považována za terciární strukturu nukleové kyseliny.

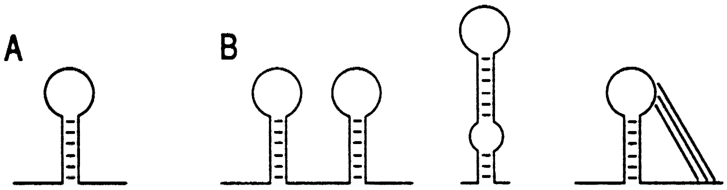
Například mRNA obsahují sekundární struktury, jejichž existence a funkce byla potvrzena *in vivo*. Při vzniku mRNA vznikají metastabilní struktury, které mají natolik vysokou aktivační energii, že na jejich místě ve skutečnosti nemohou vzniknout jiné, byť energeticky výhodnější struktury (jejich vznik by vyžadoval přísun energie na rozvolnění existujících struktur). Molekula mRNA tedy jako celek patrně nemusí dosahovat *in vivo* stavu s minimální energií (globálního minima) [39] . Skutečnost je v pak v rozporu s předpovídanou optimální sekundární strukturou. Optimální konstituce patrně dosahuje molekula nukleové kyseliny v případě, že byla v roztoku tepelně denaturována a ten postupně ochlazován. V případě viroidu PSTV, intronů skupiny `I` rodu *Tetrahymena* (a v některých dalších případech) nebylo možné použít programy jako je Mfold (viz dále), založené právě na termodynamických výpočtech, protože výsledky neodpovídaly skutečnosti. Tyto programy také neposkytují informaci o pořadí postupných svíjení během vzniku výsledné sekundární struktury (o trajektorii). V těchto případech lze využít kinetické přístupy – metodu Monte Carlo, případně její vylepšenou verzi “simmulated annealing” (pro přehled viz Klaff, 1996) nebo program STAR (viz poznámka výše).

Pokud jsou dvě vlásenkové struktury v dostatečné blízkosti, může dojít k jejich sloučení nebo ke vzniku pseudouzlové struktury (**Obrázek 16**). Při vzniku pseudouzlu ze dvou samostatných vlásenek se při 37 ^{o}C uvolní 1,5–2 kcal/mol. energie. Pseudouzly s více jak třemi spárovanými bázemi v `S1` oblasti budou patrně stabilnější. Některé způsoby zobrazení pseudouzlových struktur jsou na **Obrázku 17** (Dam, 1992).

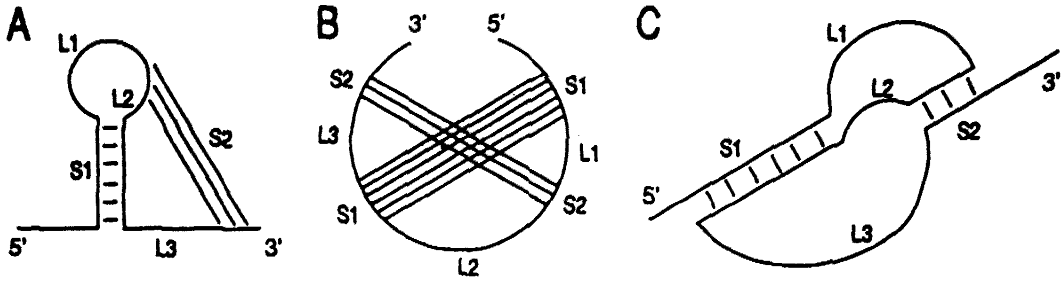
[37] Kombinace bází G≡C, A=T, A=U se označují jako Watson–Crickovské páry bází (“canonical base pairs”), jako “wobble pair” se označuje G–U pár. Vznikají ještě jiné typy párů bází, které jsou méně stabilní a označují se souhrnně jako “non–canonical base pairs”.

[38] STAR je program který umí předpovídat sekundární struktury RNA včetně přítomnosti pseudouzlových struktur a poskytuje informaci o pořadí postupných svíjení RNA při vzniku struktury (`http://wwwbio.leidenuniv.nl/~batenburg/STAR.html`).

[39] Není žádný důvod k představě, že by měla existovat každá nukleová kyselina v dané situace pouze v jediné konformaci. Např. u *Leptomonas collosoma* sestřihované “leader” RNA byla prokázána existence 2 sekundárních struktur, které se mělo téměř stejnou energetickou stabilitu (LeCuyer a Crothers, 1993). Další informace o tomto problému a ukázku změn struktury v animovaném GIF souboru lze nalézt také na adrese `http://bibiserv.techfak.uni-bielefeld.de/rnamovies/`, věnované programu “RNA movies”, který umí zobrazovat postupně obrázky sekundárních struktur (Evers a Giegerich, 1999).



Obrázek 16: Sekundární struktury RNA mohou být velmi proměnlivé v čase. `A` Vlásenka obsahující oblast spárovaných a nespárovaných bází. `B` V případě přítomnosti 2 takových vlásek a podobnosti sekvencí obsažených v obou vlásenkách může dojít k jejich sloučení nebo ke vzniku pseudouzlové struktury (úplně vpravo). Obrázek převzat z práce Dam *et al.* (1992).



Obrázek 17: Různá zobrazení pseudouzlové struktury. Panely `A`, `B` a `C` obsahují různá zobrazení pseudouzlové struktury. Jsou vyznačeny `5'` a `3'` konce nukleové kyseliny, úseky vlásenek `S1,2` (angl. stem) a nespárované úseky `L1,2,3` (angl. loop), které charakterizují každou pseudouzlovou strukturu. Překřížení spojnic v kruhové reprezentaci (panel `B`) prokazuje přítomnost pseudouzlu (bližší vysvětlení v textu). Převzato z publikace Dam *et al.* (1992).

2.2.1.1 Schematické zobrazení sekundárních struktur

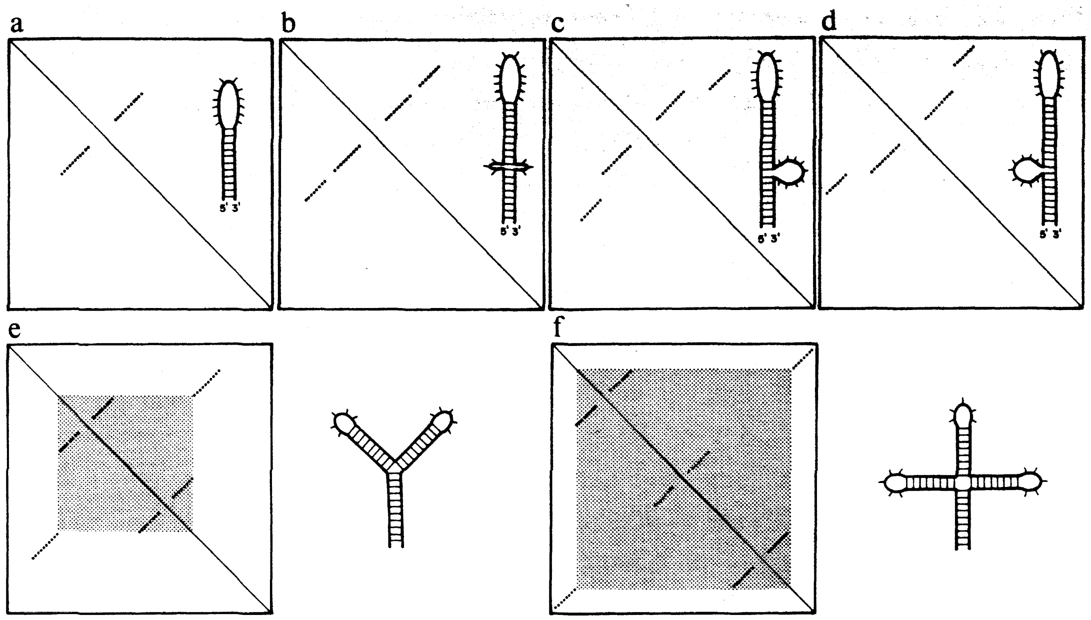
Sekundární struktury je možné zobrazit různými způsoby:

- Trojúhelníkový záznam (angl. Dot plot) zobrazení – do trojúhelníku, případně do dvou trojúhelníků spojených jednou stranou k sobě (vznikne tak čtverec rozdělený diagonálou na dva trojúhelníky). Oba trojúhelníku mohou obsahovat zobrazovat stejnou strukturu, nebo každý odlišnou. To je výhodné v případech, kdy se do jednoho např. zobrazí více struktur současně a do druhého jenom jedna, se kterou je porovnáváme (viz **Obrázky 18, 19, 20**).

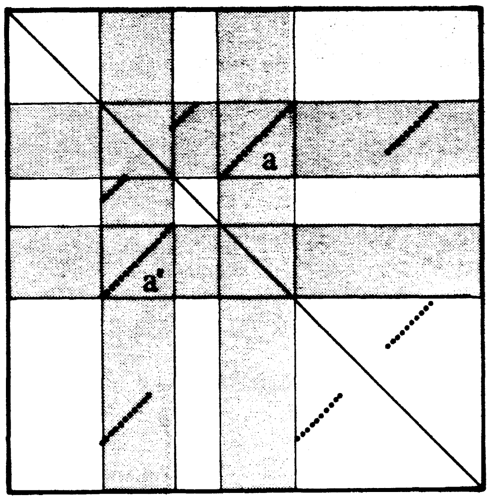
- Kruhový záznam (angl. Circular representation) – kruhový záznam umožňuje zejména zobrazit pseudouzlové struktury, přehledně jsou videt nespárované úseky (viz **Obrázek 21** a **Obrázek 22**).

- Kopcovitý záznam (angl. Mountain view) – úseky nespárovaných bází odpovídají vodorovným čarám, stoupající nebo klesající čáry označují spárované báze. Na ose `x` je pořadové číslo báze.

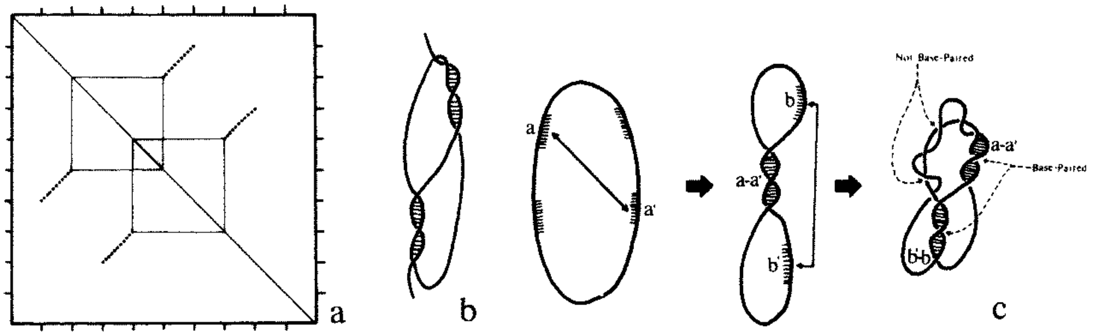
  Existují ještě další způsoby zápisu sekundárních struktur, ale ty nejsou tak časté a proto se zde jimi nebudu zabývat.



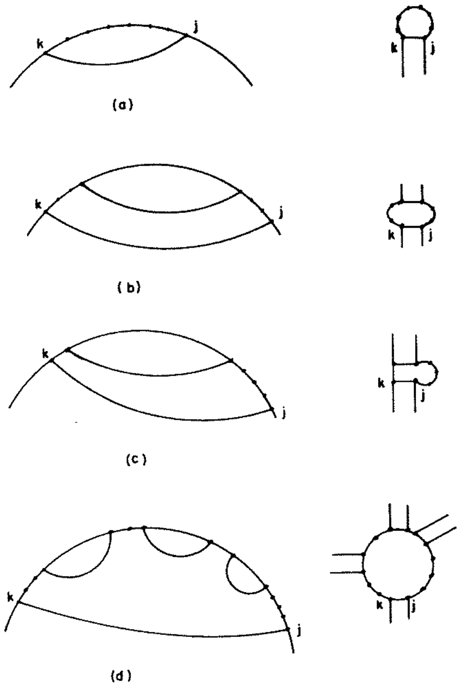
Obrázek 18: V trojúhelníkovém záznamu (angl. Dot Plot) je na `x` a `y` ose číslo pořadí báze od 5' konce. Bod v ploše trojúhelníku odpovídá páru bází $x.y$. Do řádků (osa y) se vynáší pořadí i báze, do sloupců (osa x) se vynáší pořadí báze j. Trojúhelníkový zápis se někdy s výhodou používá pro zobrazení optimální a suboptimální struktury (např. ve výstupu z programu Mfold). Na panelech `a, b, c, d` jsou vedle trojúhelníkového záznamu zobrazeny příslušné struktury. Struktury v panelech `e, f` jsou složitější struktury, úseky odpovídající strukturám za rozvětvením (při postupu od 5' a 3' konců) jsou stínovány. Obrázek převzat z publikace Quigley *et al.* (1984).



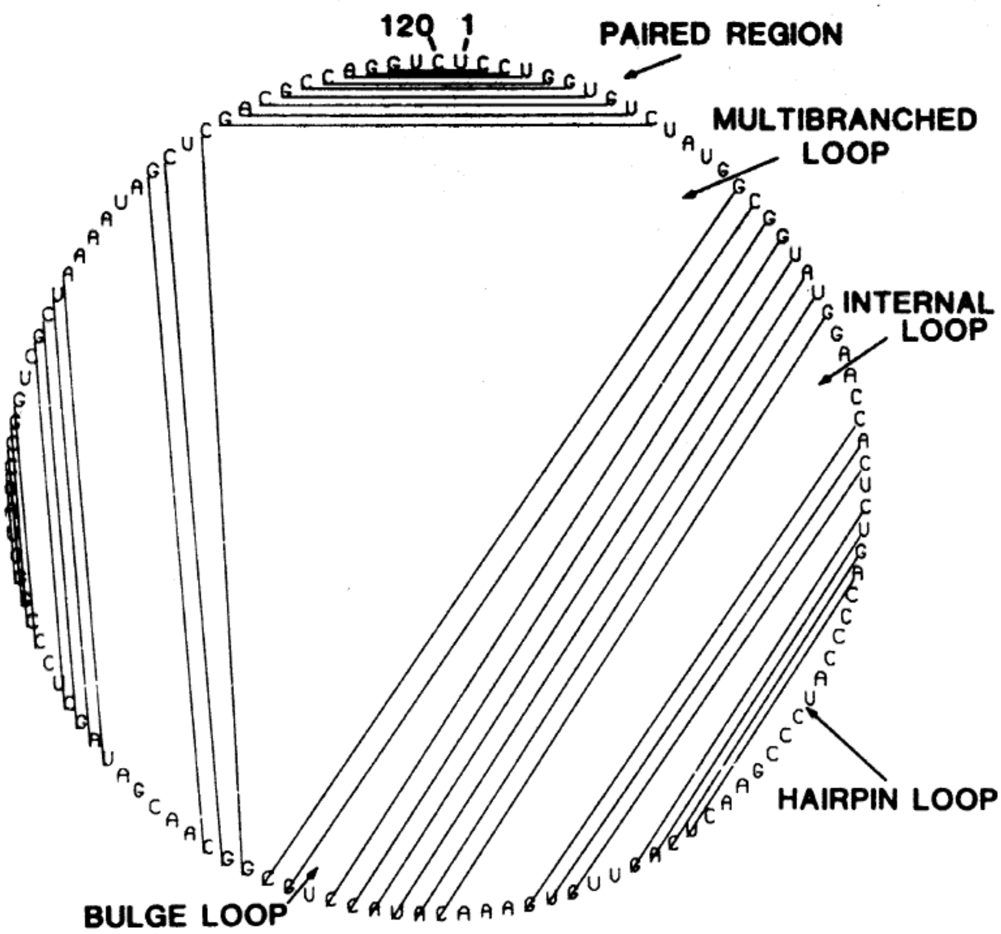
Obrázek 19: V trojúhelníkovém záznamu (angl. Dot Plot) je zobrazena struktura `a`. Díky systému zobrazení vidět identicky struktura `a'` v levém dolním trojúhelníku. Vodorovné a svislé úseky (stínováno) vymezují oblast bází, které tvoří strukturu `a` a již se tedy nemohou účastnit tvorby jiné vlásenky. Dvě vyznačené vlásenky nemohou současně existovat s vlásenkou `a`, ale vlásenka v pravém spodním rohu je mimo zakázanou oblast a proto se s vlásenkou `a` nevylučuje. Obrázek byl převzat z publikace Quigley *et al.* (1984).



Obrázek 20: Zobrazení možných uzlových struktur. Potenciální uzlové struktury se na trojúhelníkovém záznamu `a` projeví v případě, když jsou z krajních bodů vlásenek vedeny svislé a vodorovné úsečky směrem k diagonále. v případě vzájemného protnutí vzniká průnikem trojúhelník (stínován šedě). Pravá uzlová struktura je na panelu `b`. Vznik pseudouzlové struktury je na panelu `c` zaznamenán 3 strukturami, přechod mezi nimi je vyznačen šipkou. Dvouřetězcové úseky jsou na strukturách v panelech `b`, `c` šrafovány. Obrázek převzat z práce Quigley *et al.*, 1984.



Obrázek 21: V kruhovém záznamu se po kružnici rovnoměrně rozprostřou čísla/pozice bází v nukleotidové sekvenci. Každý pár bází se spojí obloukem, který se v kolmém úhlu připojuje na kruhovou osu. Případné překřížení oblouků reprezentuje pseudouzlovou strukturu (viz **Obrázek 17, panel** `B`). Jednotlivé panely `a, b, c, d` zobrazují struktury zobrazené v pravé části (shora): vlásenka, interní smyčka, nespárovaná(é) báze, rozvětvení vlásenek. Obrázek byl převzat z publikace Comay *et al.* (1984).



Obrázek 22: Na Obrázku je vyznačena primární sekvence RNA a čísla bází 1 a 120. Úsečky zobrazují spárovaný úsek bází (angl. paired region). Dále jsou úsečkami vymezeny úseky odpovídající rozvětvení vlásenek (angl. multibranched loop), interní smyčce (angl. internal loop) a smyčce vlásenky (angl. hairpin loop). Obrázek byl převzat z publikace Shapiro *et al.* (1984).

2.2.1.2 Teoretické přístupy ke studiu sekundárních struktur nukleových kyselin

2.2.1.2.1 Programové prostředky

Martinez (1984) postuloval algoritmus, který předpovídal sekundární strukturu na základě předpokladu, že jsou vlásenky (resp. dvouřetězcové oblasti) vytvářeny postupně podle jejich energické výhodnosti. Podmínkou je, že tyto vlásenky nesmí kolidovat s přítomností již existující struktury. Vycházel z úvahy, že nově vznikající struktury pravděpodobně již jen stabilizují strukturu existující, tedy současná struktura omezuje (usměrňuje) vznik nových vlásenek. Výsledky modelování 3 struktur (2 tRNA a intron IVS rRNA *Tetrahymena*) odpovídaly částečně experimentálním výsledkům s T1 a V1 nukleázami. Výsledné struktury nemusí nutně reprezentovat globální energetické minimum. Modifikace algoritmu umožňovala nevybírat striktně jako nově vznikající vlásenku jen tu nejvíce energeticky výhodnou, ale nechat soupeřit (simulací pomocí náhodnostní metody Monte Carlo) o existenci populaci všech vlásenek. "Kompetice" na úrovni 100 % energie umožňovala přítomnost všech vlásenek splňující kriterium minimální energie požadované po každé vlásence (nebyla zvýšena minimální hranice). Kompetice na úrovni 50 % již umožnovala uplatnit se pouze vlásenkám, při jejichž tvorbě by se teoreticky uvolnilo alespoň 50 % energie energeticky nejvýhodnější vlásenky z dané populace (musely by dosahovat alespoň 50 % energie nejstabilnější vlásenky). Předpokládal, že samotným základním algoritmem bez kompetice samotných, méně energeticky výhodných vlásenek, je možné nalézt funkčně konzervované struktury. Jejich statistické zastoupení v populaci různých struktur lze určit jen v případě ponechání systému vzájemné kompetici struktur a následnému vyhodnocení poměru zastoupení.

Hofacker a Stadler tvrdí, že již 10 % sekvenční odlišnost nukleové kyseliny je reálným podkladem pro vznik úplně jiných sekundárních struktur. Přítomnost samotné sekundární struktury neznamená vůbec nic, pokud se nalezená struktura nenaléza zároveň v sekvencích příbuzných organizmů, které mají sekvenční identitu nižší než 95 %. Protože RNA viry mají vysokou mutační rychlost, jsou izoláty díky proměnlivosti sekvenčně odlišné a to umožňuje vyhledávat funkčně konzervované struktury (tvořené jinými primárními sekvencemi). Algoritmy založené na termodynamických pravidlech mají nízkou přesnost — fylogenetické analýzy u známých struktur ukázaly, že obsahují jenom 30–80 % správně párovaných bází. Autoři používají termín "compensatory mutations", kterým charakterizují míru konzervovanosti struktury (definují ho jako počet nutných bodových mutací potřebný k tomu, aby se struktura změnila, resp. zmizela). Uvádějí, že "často" stačí 1–2 "kompenzační mutace" a studovaná struktura zmizí. Zajímavé je zjištění, že "kompenzační mutace" které mohou být fylogeneticky konzervované, se vyskytují v násobcích čísla 2 (protože dojde k vytvoření páru nebo znemožnění párování 2 bází) (Hofacker a Stadler, 1998).

2.2.1.2.1.1 Mfold

(Zuker, 1988, 1994; Zuker *et al.*, 1991; Zuker a Jacobson, 1998)

Program **Mfold** je bezesporu nejpoužívanější program k modelování sekundárních struktur nukleových kyselin. Počítá s energií jedné vodíkové vazby jako 2-3 kcal/mol. Ze znalosti termodynamických zákonů autoři doporučují, že každá struktura, která má ve skutečnosti existovat (rozumí se pokud možno převládat nad ostatními) ve skutečnosti, má mít odstup od odstatních navrhovaných struktur alespoň 12 kcal/mol (při nižších hodnotách energie se blížíme k energii tepelného pohybu molekul) (Zuker, 1988, 1994; Zuker *et al.*, 1991; Zuker a Jacobson, 1998). Program je dostupný na adrese `http://www.ibc.wustl.edu/~zuker/rna/`.

Sekundární struktury obsahují kromě dvouřetězcových úseků také jednořetězcové úseky (energie přiřazené nespárované bázi závisí na na druhu báze). Nespárované báze ve dvouřetězcovém úseku nukleové kyseliny, případně smyčky (angl. loop), vybouleniny (angl. bulge) nebo vnitřní smyčky (angl.

interior loop), se vypočítávají obdobně. Za přítomnost nespárovaných bází Mfold různě penalizuje výsledné vypočtené sekundární struktury (které je obsahují) a od jejich celkové energie odečítá různé penalizační hodnoty, definované pro uvedené typy nespárovaných bází/úseků. Program tedy snižuje vypočtenou číselnou hodnotu energie, která se teoreticky uvolní při vzniku předpovídaných struktur, t.j. jejich energetickou výhodnost (Zuker, 1988, 1994).

Mfold používá další pravidla k výpočtu energií pro báze, které jsou sice nespárované, ale předcházejí (angl. accessible base pair) nebo následují (angl. closing base pair) dvouřetězcový úsek ve větvených vlásenkách (angl. multi-loops) a vnějších smyčkách (angl. exterior loop). Strukturám obsahujícím tyto báze přičítá "bonus" energie a označuje je termínem "dangling energies". Výpočet rozvětvených smyček velmi komplikuje algoritmus a značně zpomaluje vlastní výpočet (Zuker, 1988, 1994).

Algoritmus programu mfold ve zkratce vypadá takto: Program navrhne všechny možné páry bází a utřídí je dle pořadí zúčastněných bází, tím je k dispozici seznam všech mozných dvouřetězcových úseků odpovídající vlásenkám a dalším dvouřetězcovým úsekům. Program utřídí tyto struktury podle energie, která se teoreticky uvolní při jejich vzniku. Vybere energeticky nejvýhodnější vlásenku a všechny zbylé struktury, které obsahují nějaké báze obsažené v této vlásence/struktuře zavrhne. Ze zbylých kandidátů opět vybere nejvýhodnější strukturu a zase eliminuje v paměti konfliktní struktury. Takto pokračuje se všemi zbývajícími strukturami. Výsledná struktura je energeticky nejvýhodnější možná struktura. Program má výstup ve formátu US-ASCII znaků v terminálovém režimu, nebo grafický jako Adobe PostScript (verze 3.0 navíc ve formátu GIF a HTML). Program poskytuje podle požadavků uživatele další, suboptimální struktury, které mají vůči optimální struktuře o zadaný počet procent nižší energii. V tomto případě je výstupem navíc "Energy dot plot" (viz **Obrázky 18, 19, 20**), který obsahuje 2 spojené trojúhelníky, v nichž jsou vyznačeny páry bází v optimální *versus* suboptimální struktuře(Zuker, 1988, 1994; Zuker *et al.*, 1991; Zuker a Jacobson, 1998).

Standardní nastavení programu Mfold 2.x vypočítává energie v podmínkách 37 °C, 1 M NaCl. Mfold verze 3.0 umí navíc simulovat prostředí 1 M $MgCl_2$. Zadanou teplotu program Mfold 3.0 na rozdíl od verze 2.3 nepřepočítává podle termodynamických zákonů (teplota je fixní a je ve výši 37 °C). Jako vstupní data lze použít sekvenci RNA nebo DNA zapsanou velkými písmeny a je třeba parametricky rozlišit lineární a cirkulární molekuly. Dále lze mezi vstupními daty zadat, které úseky bází jsou jedno– nebo dvouřetězcové, například ze znalosti sekundární struktury enzymatickým štěpením (Mathews *et al.*, 1999; Zuker *et al.*, 1999).

2.2.1.2.1.2 GCG package

GCG package je komerční balík programů, obsahující program fold, což je ve skutečnosti mfold-2.3. Proto se s ním zde nebudu podrobněji zabývat.

2.2.1.2.1.3 Vienna package

Vienna RNA package je obdobnou implementací termodynamického algoritmu jako Mfold. Verze programu 1.1 používá stejné energetické parametry jako Mfold-2.3, ačkoli s mírným vylepšením energií pro `GU` páry Daniellou Könings. Program je dostupný na adrese
`http://www.tbi.univie.ac.at/~ivo/RNA/`.

2.2.1.2.1.4 cove – Covariance models

Jedná se o pravděpodobnostní modely sekvenčního a strukturního konsensu, které se vytváří buď z uživatelem předem zarovnaných sekvencí nebo nezarovnaných. Program předpovídá **sekundární struktury**

na základě zarovnaných sekvencí a následně umí vyhledávat podobné sekvence/struktury v databázích. Program byl testován na 1415 sekvencích tRNA a výsledně uměl vyhledávat tRNA v mtDNA *Podospora anserina*. Algoritmus kovariančních modelů je zobecněním "Hiddedn Markov Models", který se využívá při vyhledávání sekvenčních motivů v zarovnaných sekvencích proteinů. Teorie těchto algoritmů je velice složitá. Program se zdál výhodnější při prohledávání mtDNA *Podospora anserina* na přítomné tRNA než program TRNASCAN (viz dále). Program může být **trénován na nezarovnaných sekvencích a potom použit pro předpověď konsensus sekvence sekundárních struktur** (na základě pravděpodobnostního algoritmu a ne na základě termodynamického algoritmu). Technicky bylo možné analyzovat fragmenty nejvýše 150–200 bází dlouhé, k trénování systému bylo třeba velké množství sekvencí (miniámálně 10–20, jinak alespoň 100) a prohledávání databází probíhlo rychlostí zhruba 10–20 bází za vteřinu (Eddy a Durbin, 1994). Program je pravděpodobně velmi užitečný, ale ani v současnosti ho nelze díky obrovské výpočetní náročnosti běžně používat, je přístupný na internetu na adrese `http://www.genetics.wustl.edu/eddy/software/`.

2.2.1.2.1.5 pfrali

Program Pfrali umožňuje automatizované vyhledávání konzervovaných oblastí v primárních sekvencích RNA. Provádí vícemístné zarovnání sekvencí [40] (angl. multiple sequence alignment) programem ClustalW a zároveň každou sekvenci zpracuje dříve popsaným programem "Vienna package". Podle výsledku zarovnání sekvencí programem ClustalW posune předpovídané struktury ve výsledném zobrazení vlevo či vpravo. Pfrali používá zarovnání sekvence k potvrzení resp. vyvrácení páru bází. Modelování 13 sekvencí HIV1 viru na superpočítači s 1 GB RAM trvalo 26 hodin. Prakticky není možné pracovat se sekvencemi kolem 10 kb (Hofacker a Stadler, 1998). Program byl zařazen do nových verzí "Vienna package" balíku a je dostupný na adrese
`http://www.tbi.univie.ac.at/~ivo/RNA/ALIDOT/`
(Hofacker *et al.*, 1998; Hofacker s Stadler, 1999).

Vyhledávání sekundárních struktur v primárních databázích a jejich zobrazení

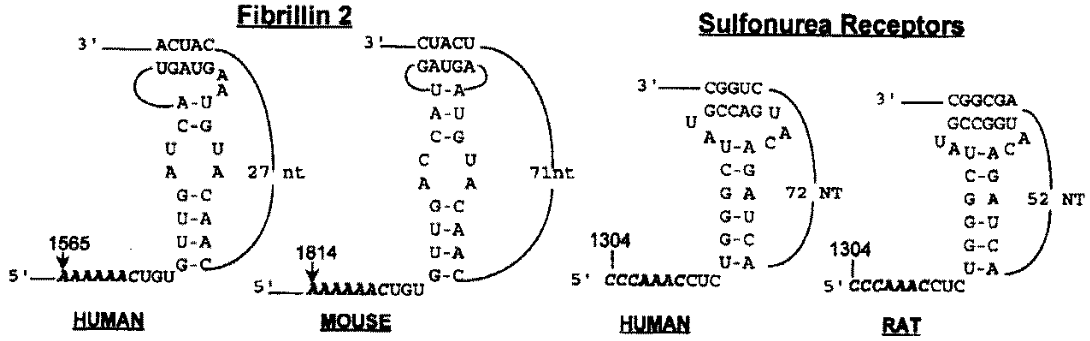
Program RNABOB [41] vyhledává v primární sekvenci sekundární struktury odpovídající zadanému zápisu požadované struktury. "Nevýhodou" programu je, že uživatel musí zadat přesnou syntaxi reprezentující hledanou strukturu. Tímto programem je možné najít i pseudouzlové struktury. Existuje poněkud propracovanější varianta pod názvem TRNASCAN (Gautheret *et al.*, 1990). Oba programy byly zveřejněny na internetu na adresách:
`http://www.genetics.wustl.edu/eddy/software/`
`http://bioweb.pasteur.fr/docs/doc-gensoft/rnabob/`
`http://bioweb.pasteur.fr/docs/man/man/rnabob.1.html`

Hammel *et al.* (1999) vytvořili program, kterým lze vyhledávat pseudouzlové struktury skryté v rozsáhlých databázích. Funkčnost programu byla ověřena na databázích organizmů *Saccharomyces cerevisiae*, *Homo sapiens*, *Mus musculus*, *Rattus norwegicus*, *Gallus gallus*, *Sus scrofa*, *Drosophila melanogaster* a sekvencích virů. Bylo identifikováno mnoho lidských, krysích, myších a kvasinkových genů, které tyto struktury obsahují (viz **Obrázek 23**).

Program ESSA (Chetouani *et al.*, 1997) umožňuje různými způsoby zobrazit sekundární struktury RNA a je přístupný na adrese:

[40] Autoři zmiňují, že program ConStruct rovněž vytváří mezery mezi zarovnanými sekvencemi, ale implicitně předpokládá, že je ve všech zadaných primárních sekvencích jedna společná struktura. Program tak hledá strulturu, která obsahuje maximální množství spárovaných bází určených ale na základě pravděpodobnosti algotimem programu (Luck *et al.*, 1996).

[41] Autorem programu je Sean Eddy a jeho spolupracovníci (Dept. of Genetics, Washington Univ. School of Medicine 660 S. Euclid Box 8232, St Louis, MO 63110 USA, eddy@genetics.wustl.edu).



Obrázek 23: Podobnost pseudouzlových struktur mezi obsažených v genech pro `Fibrillin 2` a “`Sulfonurea receptor`”. `HUMAN` označuje lidský gen, `MOUSE` označuje myší gen, `RAT` označuje krysí gen. Vzdálenosti jednotlivých úseků vlásenky, pozice bází a `5′` a `3′` konce jsou vyznačeny. Místa sklouznutí jsou vyznačena kurzívou. Obrázek převzat z práce Hammell *et al.* (1999).

`http://www-bia.inra.fr/T/essa/Doc/essa_home.html`

Některé další programy a odkazy na literaturu včetně zpracovaných kurzů k procvičení znalostí v této oblasti lze snadno najít na adresách: `http://www.imb-jena.de/RNA.html`
`http://stein.cshl.org/genome_informatics/rna/`
`http://seqaxp.bio.caltech.edu/www/seqanalysis/MAINDOC_SEQ_COURSE.HTML`
`http://www.res.bbsrc.ac.uk/molbio/guide/rnast.html`
`http://www.iacr.bbsrc.ac.uk/notebook/courses/guide/`
`http://www.ibc.wustl.edu/~zuker/seqanal/`
`http://www.pitt.edu/~rna1/links.html`
`http://ndbserver.rutgers.edu/`
`- obsahuje analýzy RNA (obdoba PDB databáze proteinů)`
`http://rrna.uia.ac.be/rnaviz/`
`- RNAViz k zobrazení sekundárních struktur`
`http://rnadraw.base8.se/`
`- program RNADraw k zobrazení sekundárních struktur`
`http://www-lecb.ncifcrf.gov/~bshapiro/RNAstructure.html`
`http://www-lbit.iro.umontreal.ca/RNA_Links/RNA.shtml`

Kapitola 3

Materiál a metody

Pokud není uvedeno jinak, během práce jsem používal běžné laboratorní postupy včetně sterilizace pomůcek a médií, inokulace médií, sestavení elektroforetických aparátů, centrifugací atp. podle prací (Sambrook *et al.*, 1989; Coligan *et al.*, 1998; Ausubel *et al.*, 1998).

3.1 Použité kmeny kvasinek

Dipodascus magnusii DMUP4–1–1, *Pichia anomala* CCY38–1–1, *Pichia anomala* CCY38–1–24, *Pichia anomala* CCY38–1–25, *Pichia anomala* CCY38–1–26, *Pichia anomala* Y151, *Pichia membranaefaciens*, *Pichia saturnus* CCY38–4–4, *Pichia dimenae* CCY38–15–1, *Pichia beijerinckii* CCY38–17–2, *Pichia mrakii* CCY38–7–1, *Pichia mrakii* CCY38–7–2, *Pichia mrakii* CCY38–7–3, *Pichia californica* CCY38–6–1, *Pichia* DK11, *Pichia* N CYC 750

3.2 Chemikálie, roztoky a kultivační média

3.2.1 Chemikálie

Během experimentů byly použity běžné laboratorní roztoky a média připravené většinou z chemikálií firem Sigma Chemical Co., USA; Serva, Německo; Lachema Brno; Imuna, Šarišské Michaľany. Zvláště pak uvádím:

- 5–fluorouracil (Sigma Chemical Co., USA, 99 % čistota, katalogové číslo F–6627)

3.2.2 Roztoky

- **Barvící roztok Coomassie G–250:** 2 % H_3PO_4; 0,45 M $(NH_4)_2SO_4$; 0,1 %Coomassie Brilliant Blue G–250 (je vhodné nejdříve naředit kyselinu, potom v ní rozpustit síram amonný a na závěr přidat vodný roztok barvy, která se v kyselém prostředí nerozpouští)
- **Odsolovací roztok pro Coomassie G–250:** 2 % H_3PO_4; 0,45 M $(NH_4)_2SO_4$
- **TESP pufr:** 20 mM Tris–HCl, pH 8; 50 mM EDTA–NaOH, pH 8; 2 % SDS; 0,05 % pronáza E
- **VPB pufr:** 20 mM Tris, pH 8; 1 mM EDTA–NaOH, pH 8 (v některých případech byl použit roztok s 10 mM EDTA–NaOH, pH 8); 150 mM NaCl

3.2.3 Kultivační média

- **cibulový agar:** v 1 litru vody rozvařit 250 g cibule (vařit 20 min), zfiltrovat přes gázu, 0,1 % glukózy, 2 % agar
- **YPD:** 2 % kvasničný autolyzát, 2 % glukóza, 1 % pepton (neupravené pH mělo hodnotu pH 6–7)
- **YPDA:** 2 % kvasničný autolyzát, 2 % glukóza, 1 % pepton, 2 % agar (neupravené pH mělo hodnotu pH 6–7)
- **YPD–pH 7,5:** 2 % kvasničný autolyzát, 2 % glukóza, 1 % pepton, pH 7,5 (upraveno 10 M NaOH)
- **YPDA–pH 7,5:** 2 % kvasničný autolyzát, 2 % glukóza, 1 % pepton, 2 % agar, pH 7,5 (upraveno 10 M NaOH)

3.3 Metody

3.3.1 Kultivace

Ke kultivaci kvasinek jsem používal YPD nebo YPDA médium, kultivace v tekutém YPDA médiu probíhala aerobně na reciproční třepačce. Standardní kultivační teplota byla 28 °C, při experimentech sledujících aktivitu toxinu jsem rutinně používal teplotu 18 °C.

3.3.2 Detekce toxinu

Toxin byl původně detekován na cibulovém agaru (Pospíšek *et al.*, 1994), později na YPDA–pH 7,5. Na pevné médium jsem inokuloval suspenzi 10^5 buněk citlivého kmene *Pichia* (*Hansenula*) sp., kterou jsem rozetřel po celém povrchu misky sterilní skleněnou tyčinkou (zahnutou do tvaru hokejové hole). Po zaschnutí suspenze jsem vhodným způsobem na takto připravený "trávník" citlivého kmene inokuloval kmen *Dipodascus magnusii* (testovaný na produkci toxinu), nebo do komínku aplikoval přímo roztok obsahující toxin. Podle způsobu provedení testu se odlišuje metoda čárková a komínková. Zásadně odlišným přístupem je test v mikrotitrační destičce, který používá tekuté živné médium obsahující toxin.

3.3.2.1 Čárkový test

Na podklad ("trávník") citlivého kmene se pomocí párátka inokuluje velké množství biomasy toxin produkujícího kmene ve tvaru čárky. Během kultivace dochází k růstu jak buněk citlivého kmene, tak toxin produkujícího kmene (a současně k produkci samotného toxinu, který zpomaluje růst citlivého kmene). Výsledkem je inhibiční zóna okolo "načárkovaných" buněk, patrná po 3–4 dnech (při kultivační teplotě 18 °C). S prodlužující se dobou kultivace počínají kolonie citlivého kmene vrůstat dovnitř inhibiční zóny, čímž dochází k vizuálnímu zmenšení jejího průměru. K tomuto jevu dochází zejména na YPD mediu a teplotě 24–28 °C. Naopak snížení teploty (na 15–20 °C) a případné použití chudého růstového media zmenšuje tento nežádoucí efekt.

3.3.2.2 Komínkový test

Do agaru s vysetým podkladem ("trávníkem") citlivého kmene se po zaschnutí vyrazí (vyvrtá) jamka, do které je napipetován roztok testovaný na přítomnost "killer" toxinu. Kultivace probíhala v 18 °C (viz Kultivace).

3.3.2.3 Test v mikrotitrační destičce

Principem metody je stacionární kultivace citlivého kmene v médiu obsahujícím toxin. Metoda umožňuje ve srovnání s komínkovým testem přesnější detekci různě ředěných množství toxinu. V případech, kdy se jako médium obsahující toxin použije filtrací sterilizované (filtry Milipore, Whatman nebo Nalgene nasaditelné na injekční stříkačku, velikost pórů 20 nebo 40 μm) postkultivační YPD médium po 4 denní kultivaci *Dipodascus magnusii*, je možné vzájemně odlišit ředění obsahující 100–12 % postkultivačního média (ředěného čerstvým YPD médiem).

Ve standardním schématu pokusu je v jamce mikrotitrační destičky obsaženo (125 μL výsledný objem): YPD médium (105 μL), inokulum 10^3–10^4 buněk (10 μL) případně 10 μL YPD média, testovaný roztok s toxinem, např. postkultivační médium (10 μL). Výsledný objem 125 μL suspenze v každé jamce umožňuje obsah jamek dostatečně promíchat třepáním celé mikrotitrační destičky. Během stacionární inkubace dochází k postupnému růstu inokulovaného citlivého kmene *Pichia* sp., který je zpomalen v závislosti na koncentraci toxinu v médiu. Dochází k různě silnému optickému zakalení média a později i k tvorbě blanky na hladině a drobnému sedimentu na dně jamky. Jamky obsahující toxin se nezakalují stejně rychle (případně výrazně pomaleji) jako kontrolní úplně bez toxinu (nebo s vysokým ředěním toxinu, t.j. 1–4 % postkultivačního média 4-denní kultivace). Kultivace může probíhat v libovolně požadované teplotě. Při teplotě 28 °C dochází ve srovnání s teplotou 18 °C k rychlejšímu růstu citlivého kmene, citlivost testu v obou případech je proto odlišná. Rozdíly mezi jamkami, které umožnují kvantifikaci toxinu, jsou podle množství inokula patrné většinou nejdříve po 2 dnech, ačkoli při inokulaci zhruba 10^6–10^7 buněk do jamky je možné přítomnost (resp. nepřítomnost) toxinu vyhodnotit již po 1 dni.

Test umožňuje měřit změny optické denzity v čase během růstu buněk, měření optické denzity při vlnové délce 600 a 660 nm neovlivňuje růst buněk. Ve všech inokulovaných jamkách se zvyšuje optická denzita, ačkoli v případě růstu buněk citlivého kmene *Pichia* sp. v samotném postkultivačním médiu obsahujícím vysokou koncentraci toxinu (po započtení objemu inokula obsahuje 92 % postkultivačního média) velmi nepatrně. Růst se při kultivaci v 18 °C zastavuje (dospívá do stacionární fáze) asi po 6 dnech. Asi po 8 dnech jsou velmi dobře patrné rozdíly ve výsledné optické denzitě a jsou přímo úměrné koncentraci toxinu. Optické denzity jsem měřil na přístroji SpectraMax340PC (Molecular Devices) v mikrotitračních destičkách s plochým dnem používaných pro tkáňové kultury (Corning). Titrační destičky byly vždy před každým měřením intenzivně protřepány minimálně po dobu 3 minut na třepačce mikrotitračních destiček (Titertek).

3.3.3 Léčení infikovaného kmene kvasinky

3.3.3.1 Iradiace UV zářením

Na YPDA médium se rozetře suspenze buněk *Dipodascus magnusii*, kterou chceme zbavit cytoplazmatického viru. Po zaschnutí inokula se provede ozáření odkrytých (otevřených) misek požadovanou dávkou UV záření. Používal jsem zařízení Stratalinker UV Crosslinker 1800 (Stratagene) při vlnové délce 254 nm v rozsahu 10–9999 μJ/cm^2. Po ozáření je vhodné zamezit přístupu bílého světla např. hliníkovou folií, aby nedocházelo k fotoreparaci způsobených mutací. Vyrostlé kolonie se přeočkují na zásobní YPDA pevné misky a zároveň se otestují na produkci toxinu, případně přítomnost virové dsRNA.

3.3.3.2 Léčení 5–fluorouracilem

Do sterilního YPDA média rozehřátého na teplotu asi 50 °C se přidává sterilně navážený 5–fluorouracil. Po důkladném rozmíchání látky se médium nalije do Petriho misek. Během tuhnutí a zasychání čerstvě nalitých misek je nutno dbát na to, aby nedošlo k případnému ozáření misek UV světlem v očkovací místnosti, které nějakým způsobem snižuje toxicitu 5–fluorouracilu. Roztok 5–fluorouracilu je možné rozetřít po povrchu již nalitých YPDA misek, dochází ale k nerovnoměrnému rozdělení a k dosažení stejného inhibičního efektu (jako v případě vmísení 5–fluorouracilu do tekutého agaru) je třeba méně 5–fluorouracilu. Proto tento způsob není vhodný. Na misky se zaočkuje suspenze buněk *Dipodascus magnusii*, jednotlivě vyrostlé kolonie jsou izolovány a testovány na produkci toxinu a přítomnost dsRNA.

3.3.4 Detekce dsRNA v biomase

Tuto metodu publikovali Pospíšek a Pálková (1991), principem je přenesení biomasy buněk z pevného media do mikrotitrační destičky, usušení biomasy během 2 h v termostatu při 37 °C, následované přidáním TESP pufru, po krátkém protřepání a následné 4–6 hodinové inkubaci při 37 °C dojde k částečné autolyzi buněk a vyschnutí vzorku. Potom je přidáno 20 μL vody a elektroforetický vzorkový pufr, vzorky jsou resuspendovány přímo v jamkách mikrotitrační destičky a analyzovány elektroforeticky v agarózovém gelu.

3.3.5 Izolace virových částic

3.3.5.1 Izolace virových částic následovaná izopyknickou centrifugací

3.3.5.1.1 Mrazová izolace viru

Narostlá kultura kvasinky (asi 5 dní stará recipročně třepaná) o objemu 500 mL (považováno za jeden referenční objem) je centrifugována při 5 000 g po dobu 5 min, sedimentované buňky jsou 3x promyty 1 objemem destilovanou vodou a 1x 1 objemem na 4 °C vychlazeným VPB pufrem (150 mM NaCl, 20 mM TRIS, pH 8, 10 mM EDTA–NaOH, pH 8). Biomasa je přenesena do suché, tekutým dusíkem předchlazené třecí misky. Buňky jsou drceny v hluboce zmrazeném stavu za občasného přilévání dusíku (celková spotřeba asi 1,5 L) tak dlouho, dokud se drcená suspenze buněk nezmění v bílý prášek (asi po 1–2 hodinách). Míru rozbití buněk je možné v průběhu drcení sledovat občasným mikroskopickým rozborem části drceného vzorku. Po rozdrcení buněk je vhodné před roztáním prášku přenést materiál do centrifugačních zkumavek, přidat inhibitor proteáz (např. phenyl–metyl–sulfonylfluorid, PMSF) a vzorky resuspendovat ve vychlazeném VPB pufru a rozmrzající hmotu dobře resuspendovat. Během všech následujících kroků (t.j. centrifugací nebo chromatografické separace) je nutné při práci používat veškerý materiál a roztoky vychlazené na teplotu 0–4 °C. Buněčné fragmenty a některé membránové organely se 2x peletují při 20 000 g po dobu 30 min. Výsledný supernatant (označovaný jako 20 000 g) se použije pro další experimenty (izopyknickou centrifugaci nebo chromatografickou separaci).

3.3.5.1.1.1 Isopyknická centrifugace v gradientu CsCl

- Virové částice v supernatantu 20 000 g se zakoncentrují sedimentací v centrifugačních zkumavkách 11x60 (Beckman) v rotoru SW60 Ti (Beckman) při 200 000 g (38 000 rpm) po dobu 2 h při teplotě 4 °C. Pokud se používají zamražené supernatanty obsahující částečně purifikovaný virus (viz odstavec Mrazová izolace viru), je vhodné je znovu předem centrifugovat při 20 000 g po dobu 30 min při teplotě 4 °C, a teprve poté přikročit k centrifugaci při 200 000 g.
- Alternativně, lze v centrifugačních zkumavkách UltraClear nebo "thinwall polyallomer" 14x89 mm (Beckman) zakoncentrovat větší objemy supernatantu (až do objemu 79,2 mL) centrifugací při 200 000 g (34 000 rpm) v rotoru SW41 Ti (Beckman) (po dobu 2 h při teplotě 4 °C, viz výše).

Ve zjednodušené proceduře (srovnej viz dále) se pelety po 200 000 g resuspendují vychlazeným roztokem (4 mL) VPB obsahujícím CsCl (1,42 g/mL) tak, aby výsledný roztok měl požadovanou hustotu CsCl (objem roztoku se zvýší např. na 4,2 mL, hustota je 1,40 g/mL).

K centrifugaci při 645 000 g (82 000 rpm) lze použít např. centrifugační zkumavky Quick–Seal UltraClear 13x51 (objem 5,1 mL) do rotoru NVT90 (Beckman), které jsou v něm umístěny v téměř svislé pozici (sklon 8 úhlových stupňů), musí se plnit přesně 5,1 mL roztoku a vstupní otvor zatavit. Dělení probíhá po celé šíři centrifugační zkumavky 13 mm (ve skutečnosti výšce formovaného gradientu na dráze 18,7 mm, díky naklonění centrifugační zkumavky). Při zastavování centrifugy dochází k převrácení gradientu a na výšku asi 51 mm. Protože je ve vzorku velké množství proteinů, vzniká ve vznášivé hustotě asi 1,2 g/mL plovoucí upěchovaná hmota, která ale po převrácení gradientu na výšku kyvety prochází napříč celým výsledným gradientem. Podle teoretických výpočtů by mělo dostačovat asi 20 h centrifugace k ustanovení gradientu CsCl (viz výpočetní vzorec dále), v praxi se tento rotor používá ke krátké 5 hodinové izopyknické centrifugaci, kdy není dosaženo úplné rovnováhy. Pokud je to možné, je výhodné použít pomalý brzdný režim centrifugy.

S výhodou lze použít výkyvného rotoru SW60 Ti (Beckman), ve kterém jsou sice nutné delší časy k dosažení optimálního rozdělení částic, ale nedochází k převrácení gradientu, jeho rozmytí a kontaminaci materiálem obsaženým v upěchované plovoucí hmotě (pravděpodobně proteiny s nízkou vznášivou hustotou). Např. ve vylepšeném schematu se rozdělí vzorek do 5 z poloviny naplněných centrifugačních zkumavek UltraClear 11x60 (max. objem 4,4 mL) a do 6. se připraví čistý roztok CsCl o stejné hustotě (v jakém jsou rozpuštěny vzorky) a přidají se do něj kuličky Cal–Spheres (Reproductive Systems Inc., Menlo Park, Kalifornie) mající definovanou vznášivou hustotu. Detailní postup je následující: pelety v 5 centrifugačních zkumavkách se resuspendují pipetováním každá zvlášť v 300 μL vychlazeného VPB pufru. Připraví se 9,6 mL roztoku CsCl o hustotě 1,5 g/mL (rozpustí se 4,8 g CsCl asi v 8,4 mL VPB). Do 1. centrifugační zkumavky s kuličkami standardní vznášivé hustoty se napipetuje 400 μL VPB pufru a 1,6 mL roztoku CsCl (1,5 g/mL). Do skleněného homogenizátoru se přenesou všechny vzorky resuspendované ve VPB pufru (5x 300 μL) a smísí se se zbývajícími 8 mL roztoku CsCl (1,5 g/mL), výsledný objem je v rozmezí 9,5–10 mL. Vzorky se důkladně homogenizují tak, aby všechny zbytky pelety po centrifugaci při 200 000 g byly rozvolněny. Výsledný objem se doplní roztokem VPB pufru tak, aby byl přesně 10 mL a rozdělí se po 2 mL do 5 centrifuganích zkumavek. Celkem je výsledný objem 6x2 mL a je v něm rovnoměrně rozděleno 4,8 g CsCl, výsledná hustota roztoku CsCl je tedy 1,4 g/mL. K dělení částic dochází ve sloupci 2,8 cm (odpovídá objemu 2 mL). Pokud je to možné, je výhodné použít pomalý brzdný režim centrifugy.

Po vyvážení všech centrifugačních zkumavek se vzorky převrství vychlazeným roztokem parafínového nebo minerálního oleje tak, aby byl naplněn požadovaný objem centrifugační zkumavky podle doporučení výrobce. Po opětovné kontrole shody hmotností se centrifugační zkumavky vloží ve vychlazených kyvetách do vychlazeného rotoru a centrifugují se při 260 000 g (44 000 rpm) po dobu nutnou k ustavení gradientu a dosažení rozdělení částic, v našem případě to bylo alespoň 44 h.

Doba centrifugace v hodinách $t = k_{[CsCl]}$ x l^2 = 5,6 x 2,8^2 = 44 h
; kde $k_{[CsCl]}$ je konstanta daná druhem látky, která tvoří gradient
; l je dráha v centimetrech, na které se gradient vytváří
Vzorec převzat z publikace Osterman (1981).

Po dokončení vysokoobrátkové centrifugace se kyvety opatrně vyjmou a v chladové místnosti při teplotě 4 °C se gradient vhodným způsobem rozdělí na frakce. Pokud se sleduje vzestupná nebo sestupná tendenci množství obsažené dsRNA, je důležité aby frakce měly alespoň přibližně stejný objem (jinak je nutno brát v úvahu rozdíly objemu). Pokud se sleduje pouze kvalitativní rozdíl mezi frakcemi, pak na velikosti frakcí nezáleží.

- Jedním přístupem je odebrání oleje shora a následné odsávání vzorku shora dolů. Bohužel, z důvodu přítomnosti plovoucí vrstvy materiálu v oblasti blízko hladiny (1,2 g/mL), tento postup není příliš vhodný.

- Alternativně lze opatrně napíchnout jehlou centrifugační kyvetu kousek nad jejím dnem (na dně může být peletovaná RNA) a postupné vykapávání vzorku (vodní sloupec svojí tíhou resp. tlakem vytlačujě do jehly kapalinu pod sebou). V tomto případě je občas vhodné ponechat olej převrstvující vzorek ve zkumavce, protože svojí tíhou také tlačí na vodný roztok CsCl a ten ještě snáze vykapává jehlou ven. Jehla se ale občas ucpe materiálem a její vytažení znamená vytečení zbývajícího roztoku vpichem ven (občas se tak nestane, pokud je odebrána vrstva minerálního oleje a zbylý sloupec roztoku CsCl nevyvíjí dostatečný tlak, což nelze určitě předpokládat). Po novém napíchnutí v jiné oblasti a případném opětovném doplnění minerálního oleje lze odebrat jiné části gradientu.

- Jako vhodný kompromis se ukázalo postupné (vícenásobné) napichování a odběry nejdříve z vyšších (méně hustých) partií gradientu vždy až do odebrání celého sloupce gradientu od vpichu ke hladině (resp. mezifázi voda/olej), vyjmutí jehly (díky lehkému oleji nedochází k vytékání oleje místem vpichu) a nového vpichu níže v oblasti s vyšší hustotou. Pokud roztok vykapává pomalu, je možné (pokud to volný objem zkumavky dovolí) přidat opět minerální olej a zvětšit tím tlak. Obecně lze říci, že se vyplatí obsahy několika centrifugačních zkumavek se stejným vzorkem rozdělovat na frakce podle odlišných postupů (stačí napichovat každou centrifugační zkumavku UltraClear v různém místě, případně každou až ve 3 místech vždy počínaje vpichem do horní části gradientu), zejména pokud se napichuje zkumavka **nad** nebo **pod** studovanou zónou. Po analýze jednotlivých frakcí lze snáze usuzovat na příslušnost jednotlivých frakcí k jednotlivým zónám a je možné snáze odhalit případné rozmyté zbytky z dříve odebraných frakcí, které kontaminují následující frakce, nebo kontaminace způsobené neopatrným rozdělením gradientu do frakcí. Stává se, že se jehla ucpe plovoucím (a občas zdánlivě velmi jemným vločkovitým materiálem), případně plovoucí materiál sice neucpe samotnou jehlu, ale uchytí se na špičce jehly a jeho nasávané části kontaminují následující frakce. Tomuto potenciálnímu problému lze alespoň v některých případech předejít právě vícenásobným napichováním zkumavek.

3.3.5.2 Chromatografická separace virových částic

K separaci virových částic (po sedimentaci supernatantu 20 000 g vzniklém po mrazové izolaci viru při 200 000 g) lze použít Sephacryl S1000 SuperFine (Pharmacia), který se používá k separaci supramolekulárních komplexů. Vlastní suspenze nosiče o objemu 8 mL se nalije do skleněné minikolonky (vnitřní průměr 1 cm), zakončené skleněnou fritou. Výsledný objem sloupce nosiče v mém případě odpovídal 7 mL nosiče v kolonce. Kolona byla převedena promýváním peristaltickou pumpou (Guldener, Švýcarsko) do VPB pufru. Pelety získané centrifugací při 200 000 g se resuspendují VPB pufrem v objemu 500 μL, homogenizují skleněným homogenizátorem a po krátké centrifugaci při 15 000 g po dobu 2 min se nanese 400 μL na kolonu. Kolona se postupně promývá 400 μL VPB pufru a každých 400 μL vyteklých z kolony se sbírá do zvláštní plastové mikrocentrifugační zkumavky. Jednotlivé frakce se analyzují spektrofotometricky a elektroforeticky.

3.3.6 Srážení proteinů pomocí etanol–chloroformové metody

Vzorek proteinů (doplněný do objemu 150 μL, dále v proceduře považovaný za 1 objem) obsažených ve frakcích CsCl gradientu jsem srážel 4 objemy etanolu (-20 ^{o}C), promíchal, přidal 1 objem chloroformu (může být upravený 1/25 objemu izoamylalkoholu). Po opětovném promíchání dojde k denaturaci a delipidaci proteinů, směs se neodděluje na 2 různé fáze. Fázové rozhraní se vytvoření až po přidání 3 objemů H_2O, promíchání a krátké centrifugaci. Po odebrání vodné fáze (obsahující etanol, soli a v mém případě i malé množství dsRNA) se ke zbylé chloroformové fázi přidají 3 objemy etanolu, promíchá a precipitované proteiny spolu s dsRNA stočí do peletu (Wessel a Flugge, 1984).

Použití detergentu SDS k rozrušení struktury virových částic nevedlo k separaci dsRNA do vodné fáze spolu se solemi, naopak došlo k solubilizaci části proteinů v této vodné fázi a snížení celkového výtězku proteinů obsažených v peletě.

3.3.7 Separace nukleových kyselin v agarózovém gelu

Používal jsem dříve publikovanou metodu (Sambrook *et al.*, 1989), ve zkratce uvádím hlavní body. K separaci dsRNA byla použita 0,8–1,2 % agaróza rozehřátá v Tris–Acetát–EDTA (TAE) pufru, separace probíhala při vloženém napětí 4–8 V/cm. V případě analýzy obsahu dsRNA virových částic jsem navíc ke vzorku před nanášením na dráhu přidával SDS v konečné koncentraci 2 % a vzorek několikrát promíchal nasátím do špičky pipety. K vizualizaci nukleových kyselin jsem používal etidiumbromid v konečné koncentraci 3 μg/mL a ozáření gelu UV světlem.

3.3.8 Separace proteinů pomocí elektroforézy v PAA gelu

Používal jsem diskontinuální elektroforézu v polyakrylamidovém gelu (PAA) (Patterson, 1998; Gallagher, 1998; Coligan *et al.*, 1998) v provedení homogenního PAA gelu v přítomnosti SDS nebo gradientu PAA v přítomnosti SDS (SDS-PAGE). Zásobní roztok akrylamidu obsahoval celkem 30 % akrylamidu, příčného zasíťování akrylamidu bylo dosaženo 0,81 % N,N–dimetylakrylamidu. Vlastní dělení probíhalo v aparátu Biorad "Protean Mini–2D Cell". Separace proteinů v homogenních gelech (4/10 %, t.j. 4 % *horní* koncentrační gel a 10 % *dolní* separační gel) probíhala při konstantním napětí 100–150 V, v případě gradientových gelů (4/5–20 %, obsahujícím gradient 5 až 20 % akrylamidu) při konstantním proudu 4 mA po dobu 16–20 h nebo 8 mA po dobu 8–10 h.

Před vlastním barvením fixovaných proteinů v gelu (DeSilva *et al.*, 1995) jsem volitelně používal **Odsolovací roztok pro Coomassie G–250** (roztok síranu amonného a kyseliny fosforečné k odsolení a vymytí SDS z PAA gelu, jeho ekvilibraci síranem amonným a k ustálení kyselého pH). V tomto roztoku jsem ponechal gely alespoň 2 h, případně přes noc. Barvení probíhalo 1–5 h **roztokem Coomassie Blue G–250**, obsahujícím stejné množství síranu amonného a kyseliny fosforečné jako předchozí roztok použitý k odsolení. Gely byly případně odbarveny ve vodě, zejména u gradientových gelů se mnohem více barví pozadí v místech s nižší koncentrací akrylamidu.

Některé gely byly **po barvení Coomassie G-250 dobarveny stříbrem** metodou "Nonammoniacal silver staining" podle (DeSilva *et al.*, 1995), která je shodná s prací (Morrissey, 1981).

Gely obarvené stříbrem je možné odbarvit roztokem obsahujícím 3,35 mM $K_3Fe(CN)_6$, 25,5 mM Na_2SO_2, 5,6 mM Na_2CO_3. Protože roztok velmi rychle ztrácí účinnost (mění barvu od žluté na zelenou), je vždy nutno připravit nový. Na odbarvení jednoho minigelu je třeba 50 mL. Reakce se zastavuje přenesením gelu do vody a intenzívním promýváním. Takto odbarvené gely se velmi dobře barví znovu stříbrem, ale tentokrát překvapivě s mnohem menším pozadím v gelu (Ondřej Toman, ústní sdělení).

3.4 Použité programy, nastavení parametrů, způsob využití

Program Mfold k predikci sekundárních struktur je možné získat na adrese `http://www.ibc.wustl.edu/~zuker/rna` (Zuker 1988, 1994). Zdrojový kód programu je nutno přeložit překladači jazyků FORTRAN a ANSI C a C++.

Kapitola 4

Výsledky

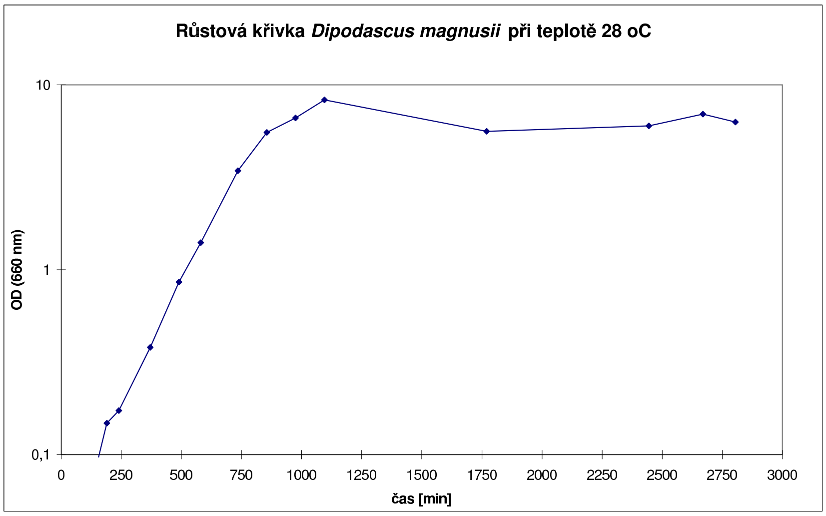
Během práce v laboratoři jsem používal označení "killer" toxin, neboť jsem předpokládal analogii s produkcí "killer" toxinů jinými kvasinkami. Z výsledků však vyplývá, že se jedná spíše o inhibitor růstu než toxin, proto používám v textu slovo inhibitor.

4.1 Mikrobiologická charakterizace používaných kmenů *Dipodascus magnusii* a *Pichia anomala*

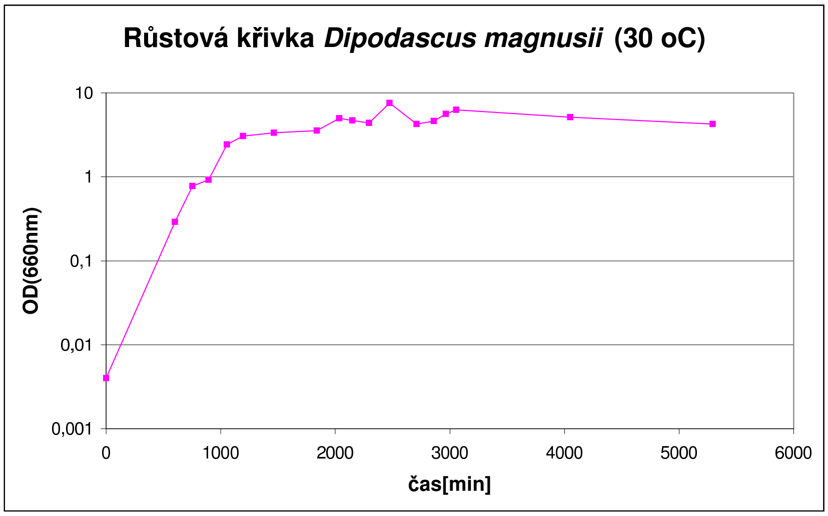
4.1.1 Růstové křivky třepaných kultur v závislosti na teplotě

Protože jsem pozoroval, že *Dipodascus magnusii* nepřežívá 5 dní kultivace při 37 ^{o}C, stanovil jsem růstové křivky v teplotách 28 a 30 ^{o}C (viz graf na **Obrázku 24 a 25**) a křivku přežití recipročně třepané kultury *Dipodascus magnusii* při teplotě 35 ^{o}C (viz graf na **Obrázku 26**). Buňky *Dipodascus magnusii* při této teplotě velmi rychle umírají a po 40 hodinách kultura neobsahuje žádné životaschopné buňky (viz graf na **Obrázku 26**). Optická denzita po počátečním vzrůstu spojeném s krátkodobým růstem buněk stagnuje [1] . Počet buněk v kultuře mírně klesá. Teplotní šok, který byl v případě *Saccharomyces cerevisiae* úspěšně použit k odléčení od virů, nelze použít jako léčebný postup.

[1] Během prvních 3–4 hodin kultivace jsou buňky většinou protáhlé, je patrná buněčná přehrádka, ale nedochází k oddělování dceřinných buněk. Dokonce lze pozorovat buňky, kterým se nepodařilo buněčné dělení dokončit již dvakrát. Bylo tak možné pozorovat 4 buňky spojené navzájem, 2 buňky vypadaly jako mrtvé (rodičovské) a dvě jako dceřinné. Ostatní buňky měly zvýšenou zrnitost cytoplazmy. Během dalších 5–10 hodin bylo vidět více buněk kterým se nepodařilo dokončit buněčné dělení a zůstaly navzájem spojené, některé z nich vypadaly mrtvé (ačkoli jsem nepoužil žádný postup na stanovení propustnosti buněčné membrány, v buňkách nebyly vidět žádné cytoplazmatické struktury). Během 8.–11. hodiny se u většiny buněk objevilo velké množství vakuol (v počtu asi 5–10 na jednu buňku), vyplňující většinu cytoplazmy. Již od 8. hodiny a během následujících hodin bylo možné pozorovat buňky, ve kterých se pravděpodobně protoplast odděluje od buněčné stěny. Přibylo buněk které vypadají jako mrtvé a objevily se v médiu zbytky buněk, které se zdají být kontaminace. Výsledky ale jednoznačně prokázaly, že se nejedná o kontaminaci ale o lyzované buňky.



Obrázek 24: Růstová křivka *Dipodascus magnusii* při teplotě 28 °C. Buňky byly inkubovány v YPD médiu na reciproční třepačce při teplotě 28 °C a v zaznamenaných časech byla měřena optická denzita `OD(660nm)`. Generační doba byla v průběhu exponenciální fáze rovna 120 min.



Obrázek 25: Růstová křivka *Dipodascus magnusii* při teplotě 30 °C. Buňky byly inkubovány v YPD médiu na reciproční třepačce při teplotě 30 °C a v zaznamenaných časech byla měřena optická denzita `OD(660nm)`. Generační doba byla v průběhu exponenciální fáze rovna 287 min.

4.1.2 Distribuční křivka inhibitoru produkovaného do média v čase a jeho stabilita v čase

Aby bylo možné zlepšit naši schopnost detekovat kmeny produkující inhibitor, pokusil jsem se zjistit jak se mění aktivita inhibitoru v postkultivačním médiu a jaká je jeho stabilita během 12–18 dnů v teplotách $+4$ a -20 °C. Následné testování aktivit inhibitoru v komínkovém testu ukázalo, že inhibitor obsažený v postkultivačním médiu ve sledovaných podmínkách neztrácí aktivitu, nebo jen v rámci detekční chyby (viz **Tabulka 4**).

Orientační stanovení produkce inhibitoru *Dipodascus magnusii* do média a jeho stabilita v čase					
`Čas [h]`	`OD(660nm)`	`Počet buněk` [10^7/mL]	`Ref. poloměr`	-20 °C	$+4$ °C
0	0,05	0,028	0,90	0,90	0,90
15	3,40	0,860	1,40	1,35	1,35
29,5	3,81	1,160	–	2,60	2,60
47,5	7,20	2,190	2,70	3,00	3,00
70	4,20	2,700	2,90	2,70	2,80
91	5,11	3,130	**3,40**	2,80	2,80
98	4,90	2,650	2,60	2,60	2,60
109,5	5,50	2,580	2,30	2,60	2,70
152,5	6,74	2,200	2,60	2,70	2,70

Tabulka 4: Kultura *Dipodascus magnusii* byla kultivována při teplotě 28 °C na reciproční třepačce a v uvedených časech byla měřena optická denzita (`OD(660nm)`). Postkultivační médium bylo zbaveno centrifugací buněk, následně sterilizováno filtrací a bylo ihned použito v komínkovém testu ke stanovení referenční aktivity přítomného inhibitoru (`Ref. poloměr`). Alikvóty sterilního média byly uloženy v $+4$ nebo -20 °C po dobu 12–18 dní a poté znovu (všechny naráz) testovány v komínkovém testu na aktivitu inhibitoru.

Z těchto výsledků vyplývá, že postkultivační médium lze uchovávat po delší dobu v laboratoři a používat ho jako referenční médium. To umožňuje kvantifikovat (byť jen relativně) aktivitu inhibitoru v dalších vzorcích. Nejvyšší aktivita inhibitoru v postkultivačním médiu je mezi 3. a 4. dnem kultivace (91 h).

Produkce inhibitoru je závislá na způsobu kultivace. Na reciproční třepačce dochází k intenzivnějšímu růstu kultury *Dipodascus magnusii* a maxima aktivity inhibitoru v čase je dosaženo dříve (3-4 dny). Na orbitální třepačce je růst kultury pomalejší a aktivita v postkultivačním médiu je po 4 dnech nižší než v postkultivačním médiu recipročně třepané kultury (data nejsou zobrazena). Inhibitor je produkován do média zejména v pozdní, stacionární fázi růstu (viz **Tabulka 4**).

4.2 Výběr vhodných kmenů *Hansenula* sp. citlivých na přítomnost inhibitoru

Pomocí čárkového testu na cibulovém agaru byla testována citlivost různých kmenů *Hansenula* a *Pichia* sp. Test byl proveden při teplotě 15 °C, zóny byly zřetelné po 7–12 dnech.

- *Pichia anomala* CCY38-1-1
- *Pichia anomala* CCY38-1-1 (SPK12)
- *Pichia anomala* CCY38-1-24
- *Pichia anomala* CCY38-1-25

- *Pichia anomala* CCY38-1-26
- *Pichia anomala* Y151
- *Pichia beijerinckii* CCY38-17-2
- *Pichia californica* CCY38-6-1
- *Pichia dimenae* CCY38-15-1
- *Pichia mrakii* CCY38-7-1
- *Pichia mrakii* CCY38-7-2
- *Pichia mrakii* CCY38-7-3
- *Pichia saturnus* CCY38-4-4
- *Pichia* sp. DK11
- *Pichia* sp. N CYC 750
- *Pichia membranaefaciens*

Byla sledována přítomnost a čistota inhibiční zóny. Nejlepší citlivost byla potvrzena u již používaného kmene *Pichia* (*Hansenula*) *anomala* CCY38-1-1. Dále byly téměř stejně citlivé kmeny *Pichia anomala* CCY38-1-1 (SPK12) a *Pichia anomala* Y151 (data nejsou zobrazena).

4.3 Výběr vhodných testovacích postupů pro vyhledávání odléčených kmenů *D. magnusii*

Zjištění přítomnosti nejen kvasinkových toxinů závisí na pečlivé volbě detekčního systému a to nejen na kombinaci citlivého kmene a různých kultivačních podmínek, ale také na provedení testu. Pokusil jsem se porovnat citlivosti 2 často používaných testů. Dále jsem se pokusil vytvořit nový detekční systém a ověřit jeho citlivost a spolehlivost.

4.3.1 Čárkový test

Bylo testováno komplexní YPDA médium a dříve osvědčený cibulový agar (Pospíšek *et al.*, 1993). Jako citlivý kmen byl použit kmen *Pichia anomala* CCY38-1-1 (optimální citlivost tohoto kmene byla později potvrzena v dalších srovnávacích experimentech, viz **Kapitola: 4.2**). Byly testovány kultivační teploty 12, 15, 18, 24, 28, 37 °C a různá množství vysetých buněk na misku. Jako nejlepší systém se ukázalo 15–18 °C v kombinaci s cibulovým nebo YPDA agarem. Inhibiční zóny v okolí čárky kmene produkujícího inhibitor byly nejlépe vidět po 7–12 dnech.

4.3.2 Komínkový test

Komínkový test (viz **Obrázky 27(a), 27(b)**) se ukázal ve všech srovnávacích pokusech (podmínky viz **Kapitola: 4.3.1**) jako citlivější a především reprodukovatelnější než čárkový test. Podobně, jako v případě čárkového testu, se jeví **teplota 15 nebo 18 °C jako nejlepší** (inhibiční zóna je dobře patrná po 4 dnech kultivace). Z porovnání výsledků měření průměrů inhibičních zón v komínkových testech při různých teplotách vyplývá, že při teplotách 24 a 28°C dochází k sekundárnímu růstu buněk citlivého kmene v okrajové oblasti inhibiční zóny. Tím dochází ke zmenšení vizuálního průměru inhibiční zóny a snížení detekčního limitu. Naopak příliš nízká teplota prodlužuje dobu kultivace a výsledný efekt zlepšení není tak výrazný. Z tohoto důvodu byla vyhodnocena jako optimální teplota 18 nebo 20 °C, kdy je zóna patrná po 2–3 dnech a vliv sekundárního růstu citlivého kmene je zanedbatelný. Porovnal jsem výhodnost cibulového (OA) a komplexního (YPDA) média (viz **Obrázky 27(a), 27(b)**) pro výsledný průměr inhibiční zóny v komínkovém testu při teplotách 15, 18, 20, 24 a 28 °C. Výsledkem srovnávacích testů bylo, že OA médium není nutné, pokud je použita teplota pod 20 °C. YPDA médium navíc díky tmavému zbarvení zvýrazňuje inhibiční zónu. Komínkový test nelze použít k přesnější kvantifikaci aktivity inhibitoru v médiu (viz grafy **Obrázku 28, 29**).

4.3.3 Test aktivity inhibitoru v médiu v mikrotitrační destičce

Během pokusů vyléčit *D. magnusii* od dsRNA viru vyplynula naléhavá nutnost spolehlivého detekčního systému. Hledaný detekční systém měl v ideálním případě umožňovat kvantifikaci množství inhibitoru, být snadno proveditelný a umožňovat testování velkého množství kmenů na schopnost produkce inhibitoru. Protože se zdálo, že současné testy již nelze více zlepšovat, pokusil jsem se z těchto důvodů vytvořit nový systém detekce inhibitoru. Je založen na testování postkultivačních médií *D. magnusii* na přítomnost inhibitoru v jamkách mikrotitrační destičky. Navržený systém byl podrobně testován ve dvou zcela nezávislých experimentech, druhý experiment zpřesňoval některé předešlé výsledky ale také obsahoval nové prvky:

- grafy z prvního experimentu provedené při teplotě 18 °C jsou na **Obrázcích 32, 33, 34, 35, 36**
- grafy ze druhého experimentu provedené při teplotě 18 °C jsou na **Obrázcích 30, 37, 38, 39, 40, 41**
- grafy ze druhého experimentu provedené při teplotě 28 °C jsou na **Obrázcích 31, 42, 43, 44**

V prvním experimentu byl počet inokulovaných buněk stanoven počítáním v počítací komůrce, v druhém experimentu byl navíc ověřen výsevem buněk na YPDA misky. Citlivost druhého provedení testu byla srovnávána s citlivostí komínkového testu, viz graf na **Obrázku 29**. Díky provedení testu, ve kterém je do postkultivačního média pipetováno inokulum buněk citlivého kmene (naředěné čerstvým YPD médiem) nelze provést experiment v neředěném postkultivačním médiu (100 %) [2] . 92 nebo 93 %-ní koncentrace postkultivačního média byla maximální možná koncentrace použitelná v tomto experimentu.

- Aby bylo možné porovnávat výsledky testů v mikrotitrační destičce s neinhibovanou kulturou, byla stanovena růstová křivka *Pichia anomala* v kultivačních teplotách 18 °C (viz graf na **Obrázcích 30, 33**) a v kultivační teplotě 28 °C (viz graf na **Obrázku 31**). Z průběhu křivek vyplynulo, že *Pichia anomala* dosahuje při kultivaci v obou teplotách stejně intenzívního nárůstu buněk. Generační doba při růstu v 18 °C byla rovna 72 minutám, při kultivační teplotě 28 °C byla rovna 54 minutám.
- Sledoval jsem růst různých množství inokulovaných buněk *Pichia anomala* **ve sterilním YPD médiu** (viz graf na **Obrázku 32, 33**). Vyplynulo, že do jamek je vhodné inokulovat 10^3–10^4 buněk tak, aby v daných podmínkách došlo k exponenciálnímu růstu. Při inokulaci vyššího počtu buněk do jamky je možné test použít také, ale nedochází k exponenciálnímu růstu buněk a buněčná kultura nižší růstovou rychlostí dosáhne maximální denzity. Různě naředěná inokula buněk dorůstají ve výsledku stejných optických denzit (viz graf na **Obrázku 32, 33**). Příliš ředěná inokula buněk (240–24 buněk/jamku) nezaručují rychlý růst kultury tak, aby bylo možné případné snížení jejího nárůstu použít k měření aktivity inhibitoru v reálném čase (viz graf na **Obrázku 32**).
- Sledoval jsem růst různých množství inokulovaných buněk *Pichia anomala* **ve sterilním neředěném postkultivačním médiu obsahujícím inhibitor** (viz graf na **Obrázku 34**). Rovněž z tohoto experimentu vyplynulo, že do jamek je vhodné inokulovat 10^3–10^4 buněk, aby byl růst buněk pozvolný a zaručoval průchod buněčné kultury všemi růstovými fázemi (které by mohly být ovlivněny), včetně exponenciální fáze.

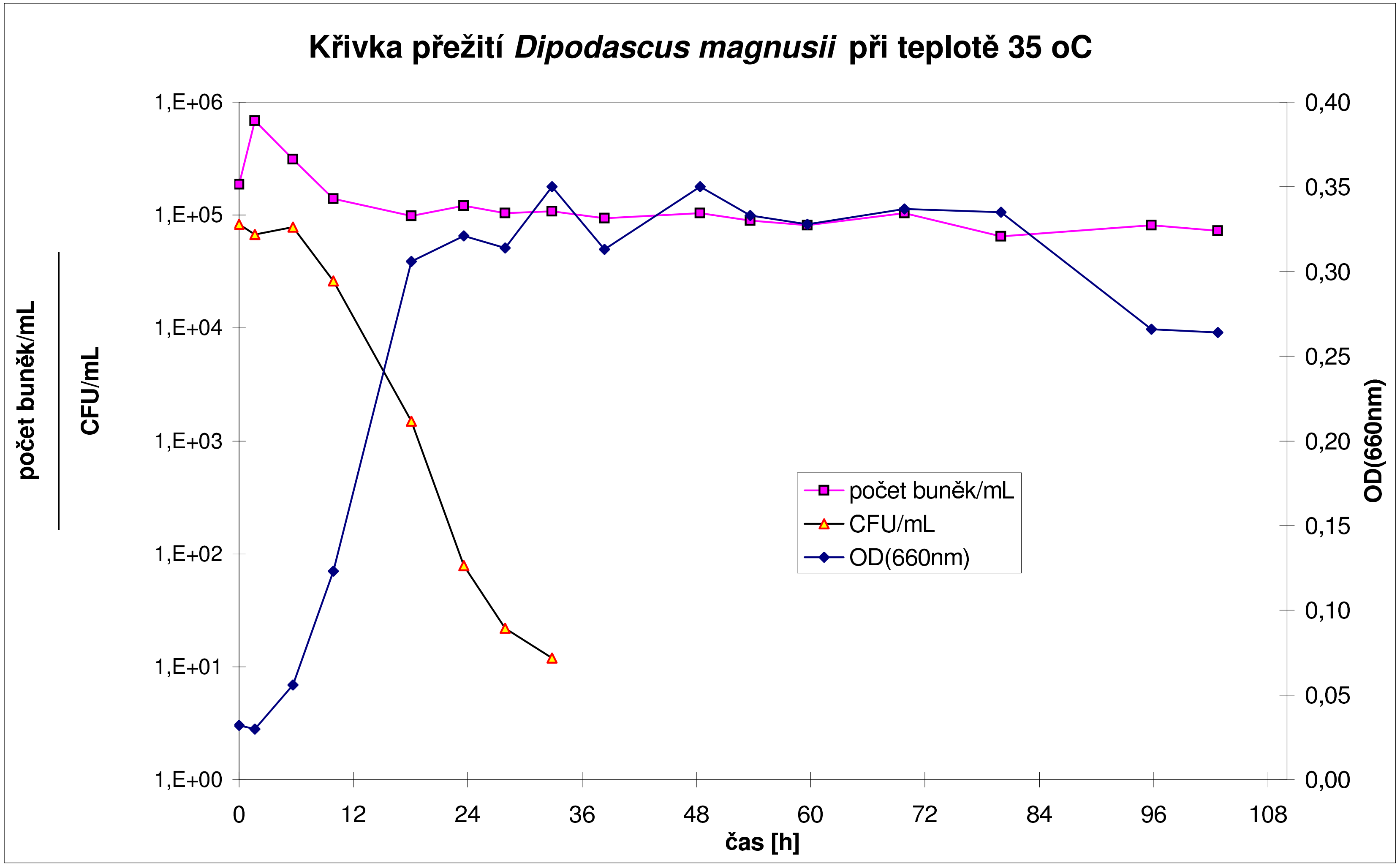
[2] Ačkoli ředěním kultury citlivého kmene samotným postkultivačním médiem by umožnilo testovat alespoň 99,99 %-ní postkultivační médium, tato možnost nebyla využita, protože by pravděpodobně nijak neovlivnila současné závěry (viz dále).

- Stanovil jsem růst *Pichia anomala* přímo v médiích obsahujících různě naředěné postkultivační médium (s obsahem 93–0 % postkultivačního média *D. magnusii*). Ředění jsem provedl čerstvým sterilním YPD médiem. Výsledky jsou zobrazeny na několika obrázcích včetně semilogaritmického vynesení, umožňující přesnější určení exponenciální fáze růstu kultur, ostatní vynesení naopak umožňují lépe zobrazit rozdíly vlivu různých koncentrací inhibitoru ve stacionární fázi, viz **Obrázky 37, 40, 38, 39**. Stejný experiment byl proveden současně při teplotě 28 °C (**Obrázek 42, 43**). Při inokulaci vyššího počtu buněk do jamky je možné test použít také, ale nedochází k exponenciálnímu růstu buněk a buněčná kultura dříve dosáhne maximální denzity. Příliš ředěná inokula buněk (240–24 buněk/jamku) nezaručují rychlý růst buněk tak, aby bylo možné snížení jejich nárůstu použít k měření aktivity inhibitoru.

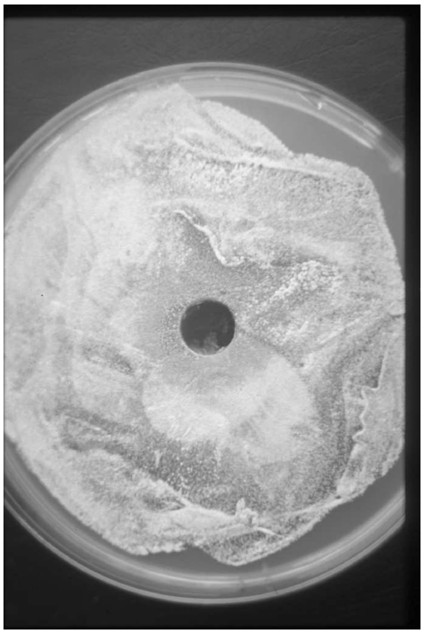
  V prostředí 92/93 %-ního postkultivačního média dochází k exponenciálnímu růstu buněk *P. anomala*, který je ale mnohem dříve zpomalen a buněčná kultura pomaleji (méně zřetelně, t.j. ne prudkou změnou růstové rychlosti) přechází do stacionární fáze (srovnej grafy na **Obrázcích 32, 33, 34, případně křivku označenou** `93 %` **na Obrázcích 37, 40**). Průběh křivek dokazuje, že **růst buněk citlivého kmene je působením inhibitoru zpomalen**. Domnívám se proto, že se jedná o inhibici růstu a ne o zabíjení buněk citlivého tak, jak to bylo popsáno u "killer" toxinů *Saccharomyces cerevisiae*. Růstové rychlosti sledovaných kultur v exponenciální fázi růstu jsou přibližně stejné (viz graf na **Obrázku 43, 40**). Znamená to, že **inhibitor neovlivňuje růst buněk v exponenciální fázi**. Výsledkem zpomalení růstu buněk v jiné než exponenciální fázi nebo způsobení časnějšího přechodu do stacionární fáze, má za následek konečné rozdíly v optických denzitách jednotlivých kultur (srovnej výsledné optické denzity v konečných časových bodech na grafech na **Obrázcích 37, 42**). Při inokulaci vyššího počtu buněk do jamky je možné test použít také, ale dochází ke krátkému exponenciálnímu růstu kultury, která potom dříve dosáhne stacionární fáze. Příliš ředěná inokula buněk (240–24 buněk/jamku) nezaručují rychlý růst buněk tak, aby bylo možné snížení jejich nárůstu použít k měření aktivity inhibitoru.

- Byla prokázána lineární závislost mezi aktivitou inhibitoru v kultivačním médiu a optickou denzitou buněčné kultury. V případě kultivace při teplotě 18 °C v rozmezí od 92. hodiny kultivace v rozsahu 92–2 % postkultivačního média, úplná linearita v tomto rozsahu nastává okolo 200.–213. hodiny (viz graf na **Obrázku 41**). V případě kultivace při teplotě 28 °C je linearity dosaženo již od 37. hodiny v rozsahu 92–12 % postkultivačního média *D. magnusii* (lineární rozsah ani linearita se s prodloužením kultivace již dále nezlepšuje) (viz **Obrázek 44**). Test lze použít k přesnému stanovení aktivity inhibitoru, např. mezi 68.–92. hodinou ke stanovení aktivity inhibitoru v médiu naředěného na 92–44 % referenční aktivity (neředěného média) při kultivaci v teplotě 18 °C. V pozdějších časech, jak již bylo řečeno, dochází k rozšíření lineárního úseku a inhibitor je proto možné kvantifikovat v ještě širším rozmezí ≈92–2 %.

Ze srovnání citlivostí komínkového testu a testu v mikrotitrační destičce vyplynulo, že test v mikrotitrační destičce mnohem pružněji detekuje malé změny aktivity toxinu. Naopak komínkový test je omezen nespojitou stupnicí hodnot, kterých může nabývat. Tato nespojitost se projevuje v nerovnostech křivky (viz graf na **Obrázku 29**) a její podstatou je nemožnost přesného odečtení poloměru zóny s přesností vyšší než 0,5 mm (ve skutečnosti jsou odchylky zhruba ±1–2 mm vlivem různých zakřivení zón a případně jejího nejasného obrysu). V případě testu v mikrotitrační destičce je optická denzita spojitá veličina a umožňuje odstupňovat drobné rozdíly optických denzit.



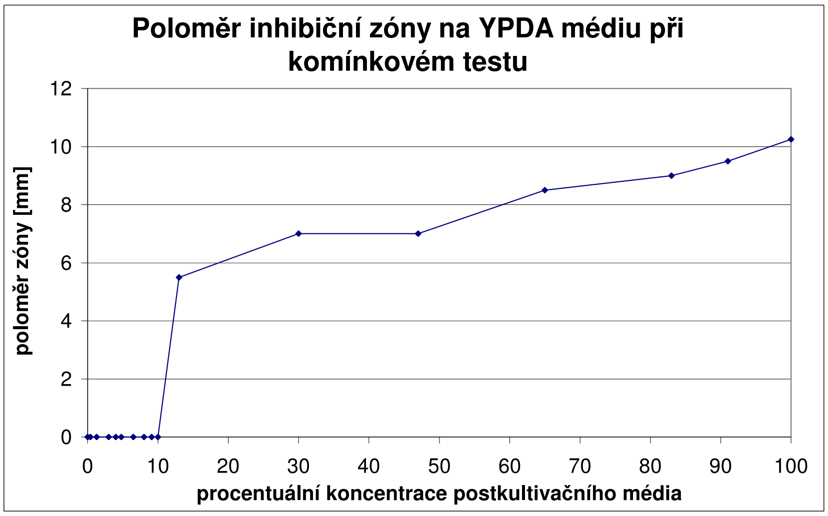
Obrázek 26: Křivka přežití *Dipodascus magnusii* při teplotě 35 °C. Buňky byly inkubovány v YPD médiu na reciproční třepačce při teplotě 35 °C a v zaznamených časech byla měřena optická denzita `OD(660nm)`, vysety buňky v různých ředěních z 0,1, 1 a 10 mL média a byl stanoven `počet buněk na mL` média. Průběžně byly počítány kolonie vyrostlé na YPDA miskách (`CFU/mL`). Z křivky je patrné, že po počátečním růstu buněk, který není zakončen dělením, nerozdělené buňky velmi rychle umírají. LD_{50} byla rovna 315 min.



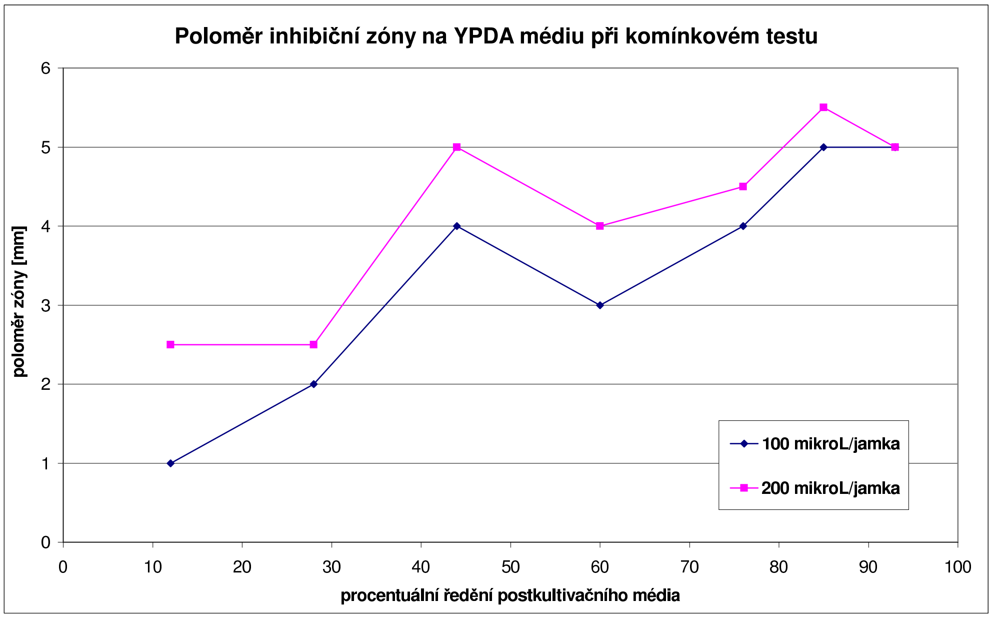
(a) Komínkový test: inhibiční zóna na OA misce.

(b) Komínkový test: inhibiční zóna na YPDA misce.

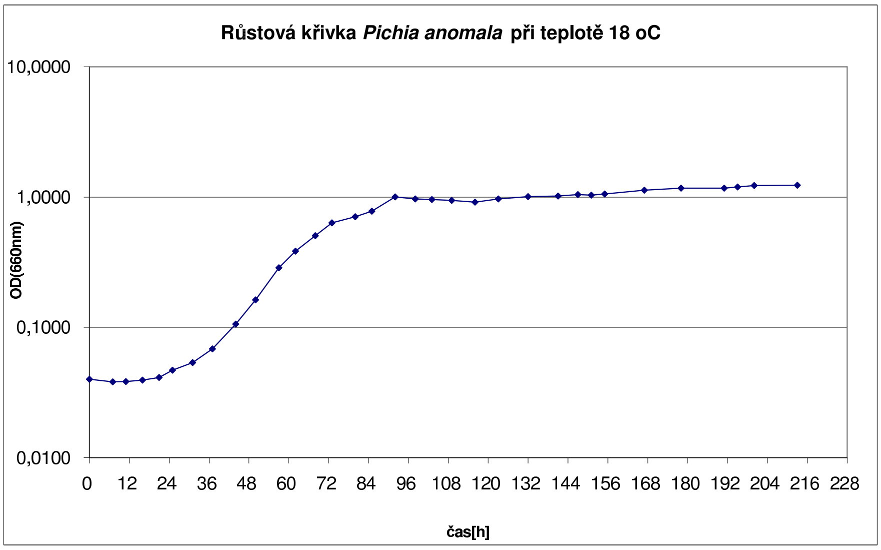
Obrázek 27: Komínkový test: inhibiční zóna na OA a YPDA misce. Do komínku vyraženého do agaru (zaočkovaného "trávníkem" citlivého kmene *Pichia anomala*) bylo pipetováno 200 μL postkultivačního média. Během kultivace dochází ke zpomalení růstu buněk *Pichia anomala* v okolí komínku vlivem difúze inhibitoru do okolí.



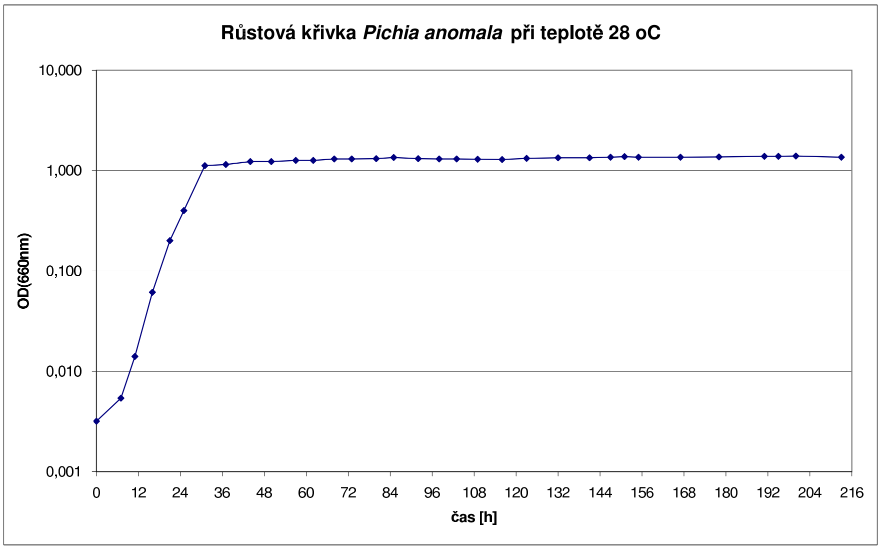
Obrázek 28: Citlivost komínkového testu při teplotě 18 °C. Do komínků na YPDA média s podkladem citlivého kmene bylo pipetováno 200 μL postkultivačního média starého 4 dny. V nejlepších provedeních experimentu (vyobrazeno) lze dosáhnout téměř lineární závislosti v rozsahu 12–92 % postkultivačního média obsahujícího inhibitor. Procentuální koncentrací postkultivačního média se rozumí množství postkultivačního média po kultivaci *D. magnusii* ředěného čerstvým YPD médiem.



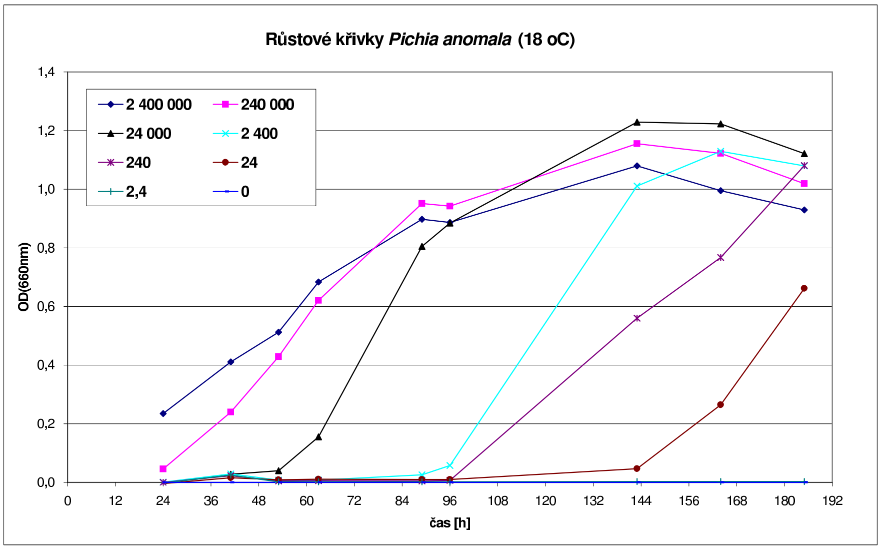
Obrázek 29: Citlivost komínkového testu při teplotě 18 ^{o}C v horším provedení experimentu. Do komínků na YPDA médiu s podkladem citlivého kmene bylo pipetováno 100 nebo 200 μL postkultivačního média starého 4 dny. Poloměr inhibičních zón dosahuje asi poloviny poloměru dosaženého na a díky nepřesnostem při jeho měření jsou na grafu velké rozdíly **Obrázku 28**.



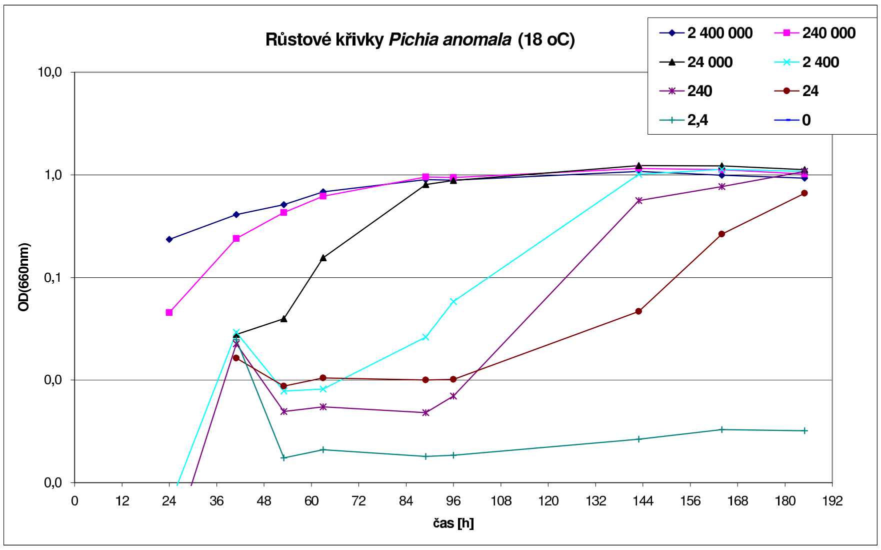
Obrázek 30: Růstová křivka *Pichia anomala* při teplotě 18 °C. Do každé jamky bylo inokulováno 6x10^3 buněk, inkubace probíhala v netřepané mikrotitrační destičce v YPD médiu při teplotě 18 °C. V zaznamených časech byla měřena optická denzita `OD(660nm)`. Generační doba byla v průběhu exponenciální fáze rovna 72 min.



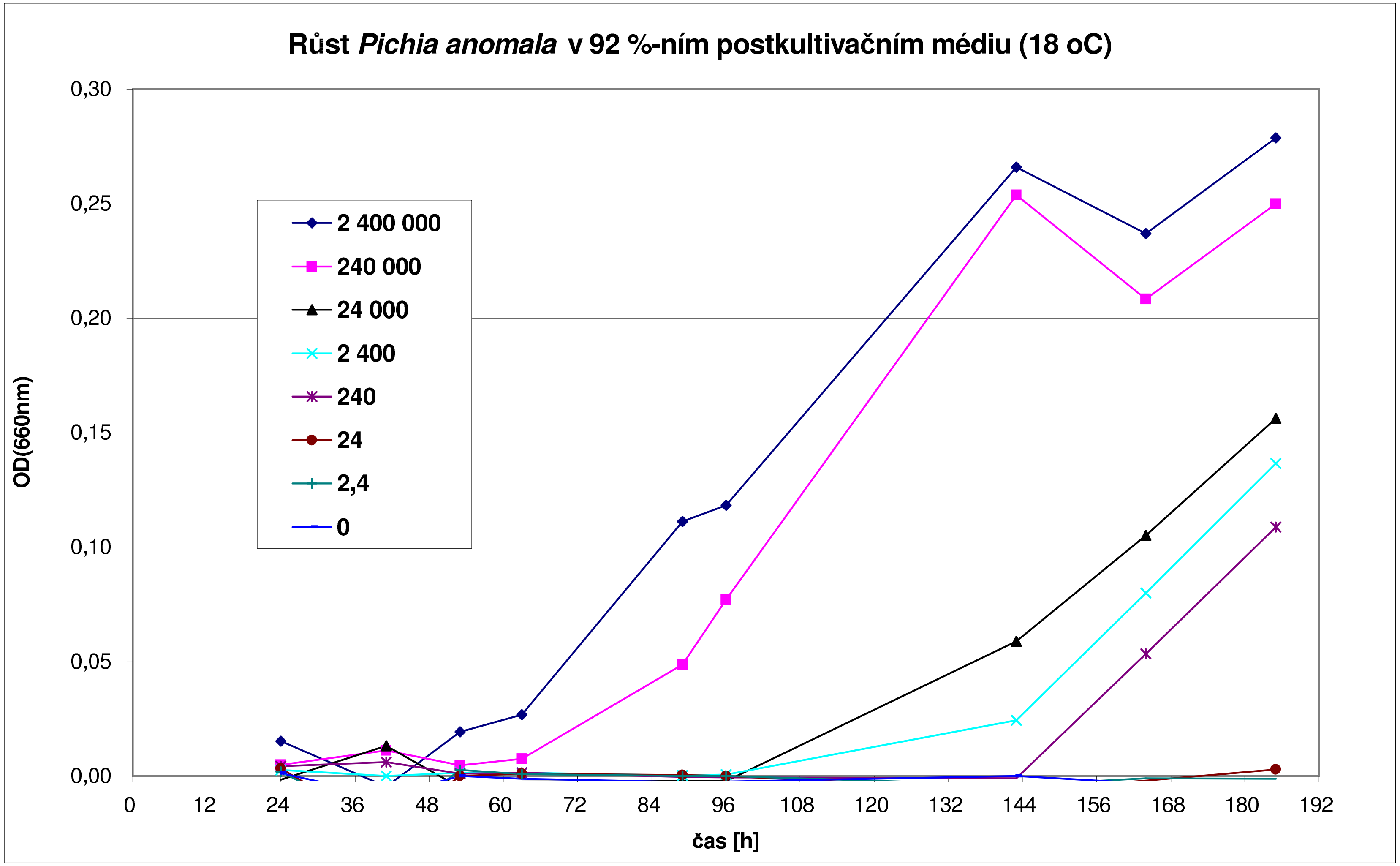
Obrázek 31: Růstová křivka *Pichia anomala* při teplotě 28 °C. Do každé jamky bylo inokulováno 6x10^3 buněk, inkubace probíhala v netřepané mikrotitrační destičce v YPD médiu při teplotě 28 °C. V zaznamených časech byla měřena optická denzita `OD(660nm)`. Generační doba byla v průběhu exponenciální fáze rovna 54 min.



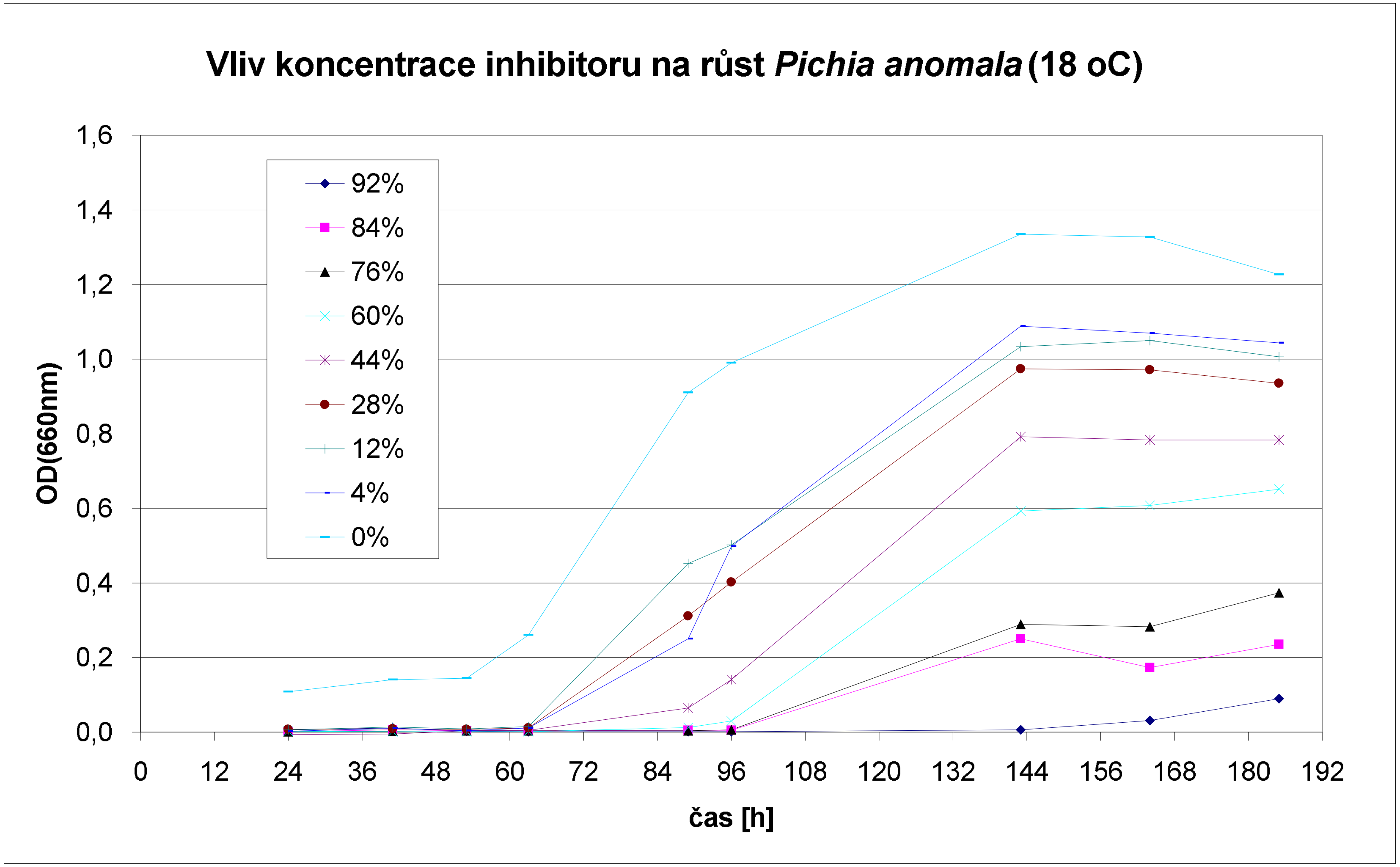
Obrázek 32: Růstová křivka *Pichia anomala* při teplotě 18 °C v YPD médiu *D. magnusii*. Byl studován vliv dávky inokula na průběh růstu kultury. Do každé jamky bylo inokulováno různé množství buněk *P. anomala* v rozsahu 0–2,4x10^6 buněk (viz legenda uvnitř vyobrazeného grafu) a byly sledovány změny optické denzity. Z průběhu křivek vyplynulo, že plně dostačuje inokulovat 10^3–10^4 buněk do jamky tak, aby v daných podmínkách došlo k exponenciálnímu růstu. Tato informace byla využita v dalších pokusech.



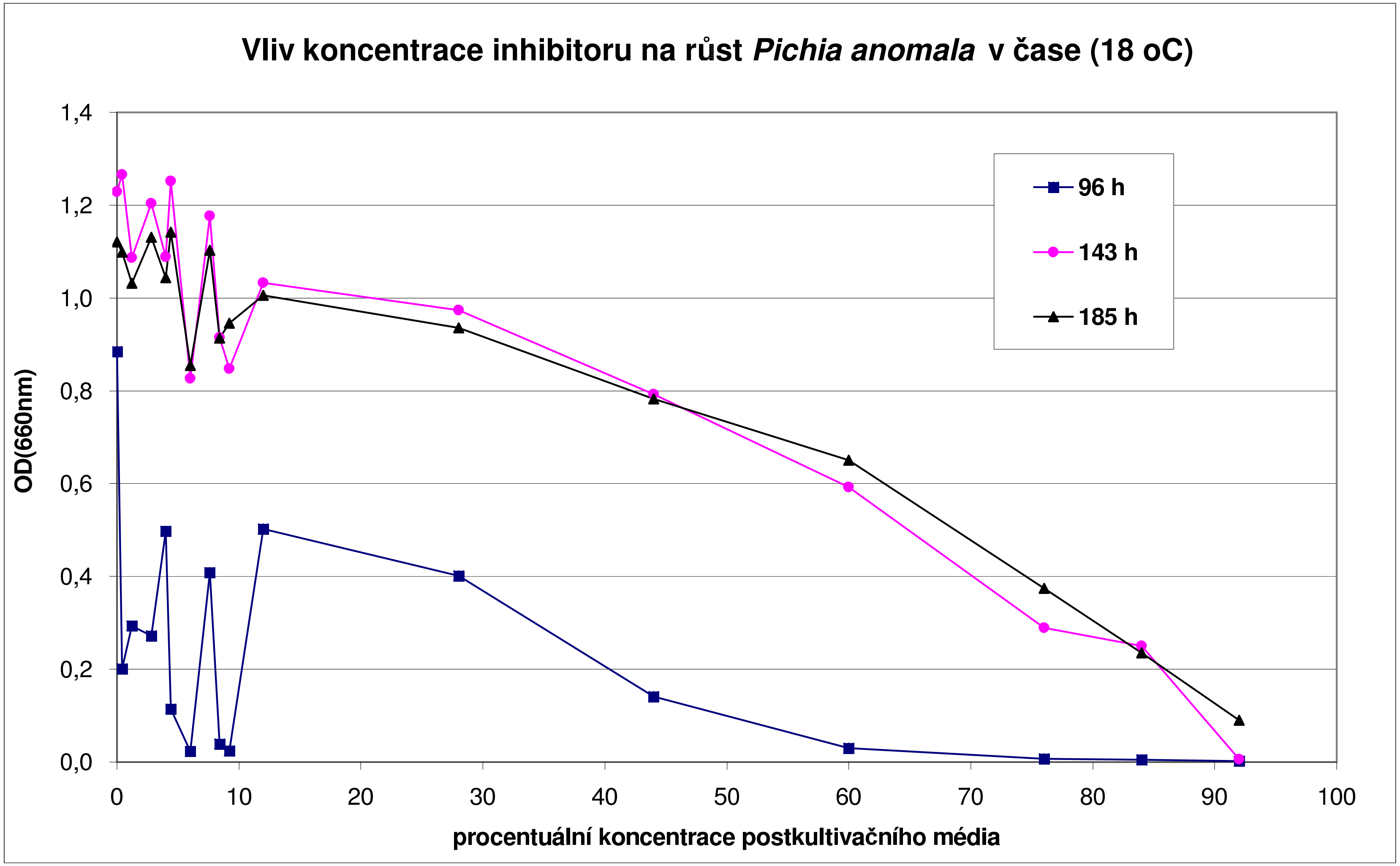
Obrázek 33: Semilogaritmické vynesení růstové křivky na **Obrázku 32**.



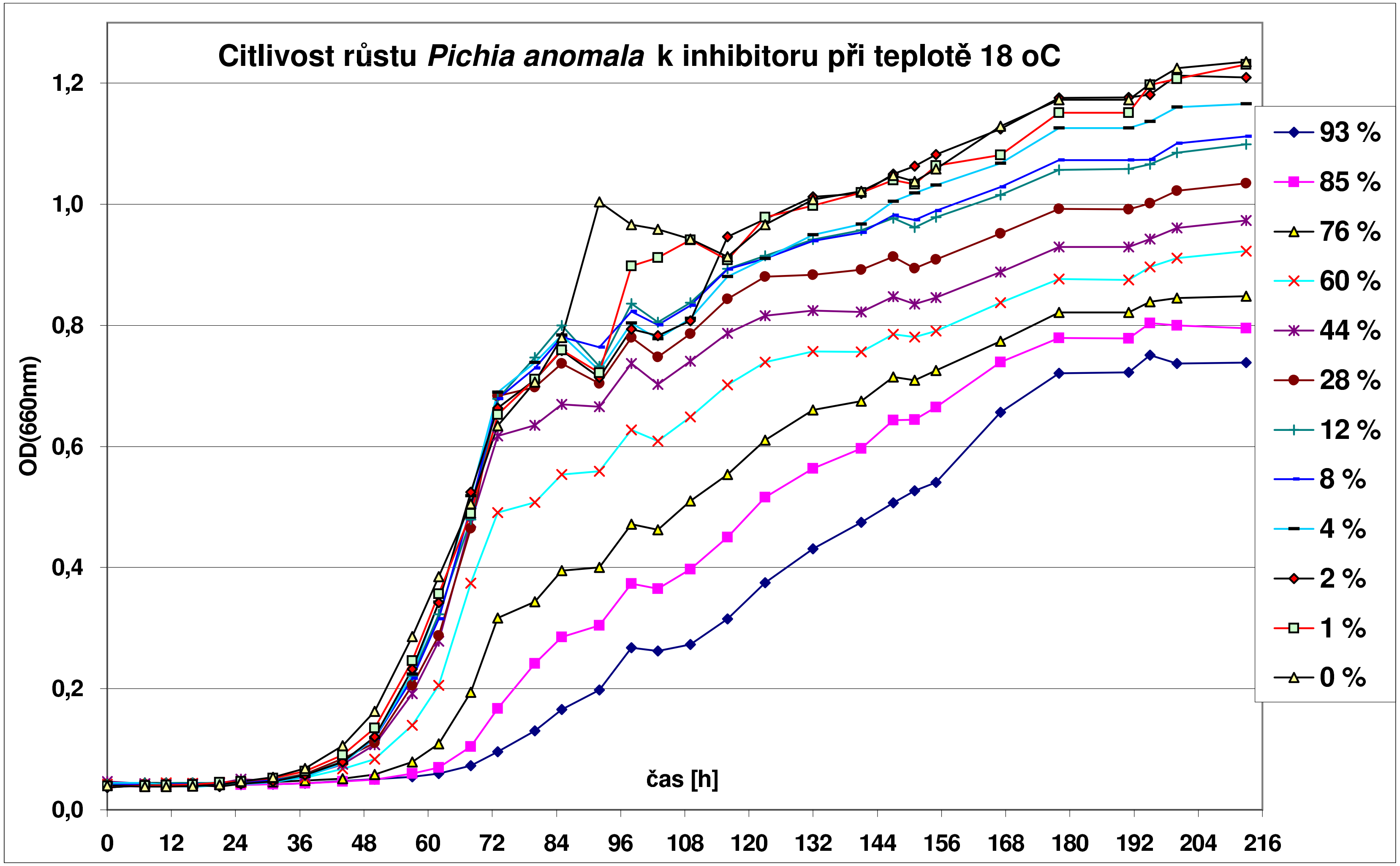
Obrázek 34: Růst *Pichia anomala* při teplotě 18 °C v 92 %-ním postkultivačním médiu *D. magnusii*. Byl sledován růst kultur v různě silně inokulovaných jamkách. Do každé jamky bylo inokulováno různé množství buněk v rozsahu 0–2,4x10^6 buněk (viz legenda uvnitř vyobrazeného grafu).



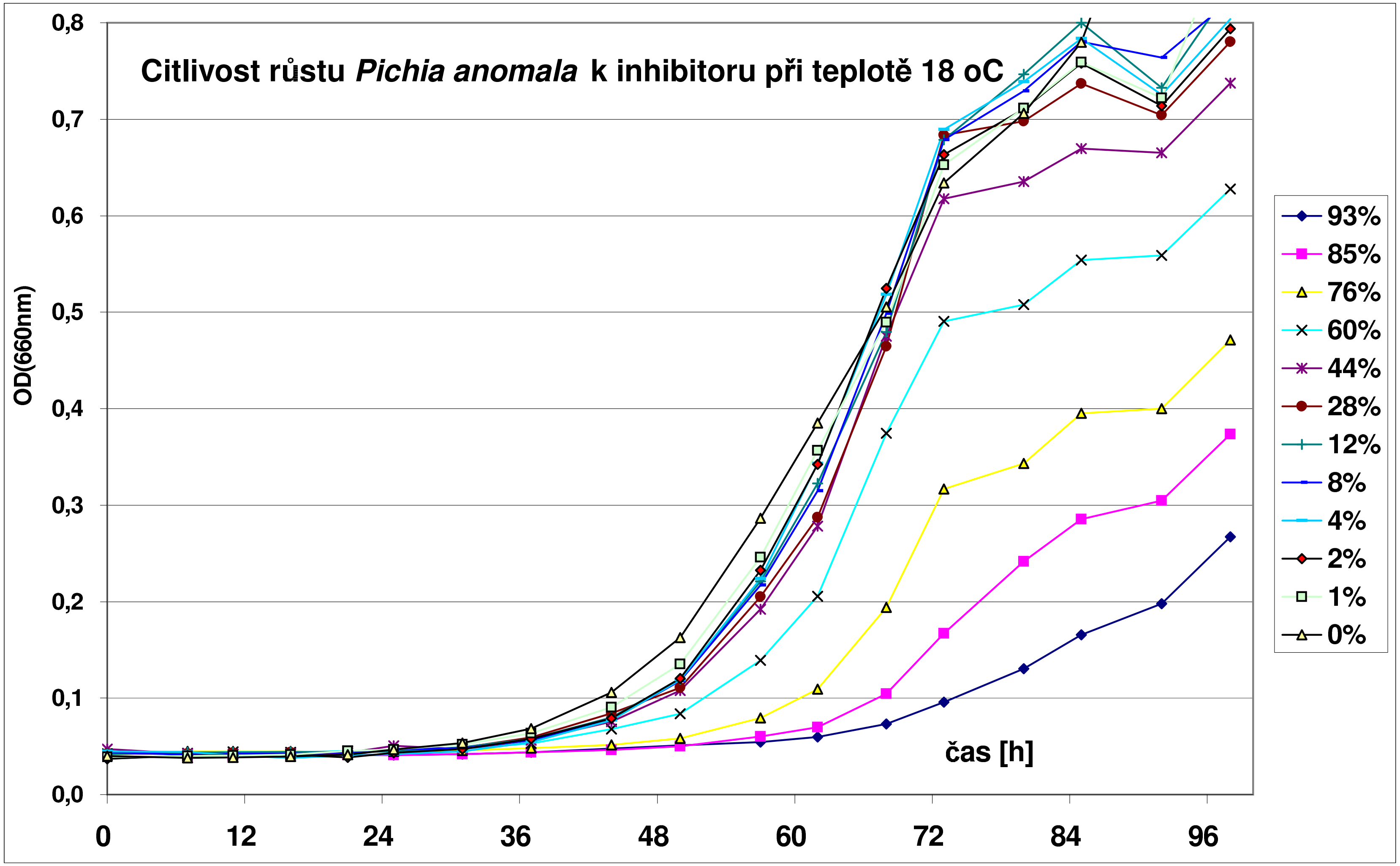
Obrázek 35: Růst *Pichia anomala* při teplotě 18 °C v různě koncentrovaném postkultivačním médiu *D. magnusii*. Byl sledován vliv koncentrace inhibitoru na průběh růstu kultury, zejména s ohledem na citlivost detekce inhibitoru. Do jamek bylo inokulováno $2{,}4 \times 10^4$ buněk. Procenta v legendě uvnitř vyobrazeného grafu označují procentuální koncentrací postkultivačního média, ve kterém byly jednotlivé kultury inkubovány. Procentuální koncentrací se rozumí množství postkultivačního média (po kultivaci *D. magnusii*) ředěného čerstvým YPD médiem.



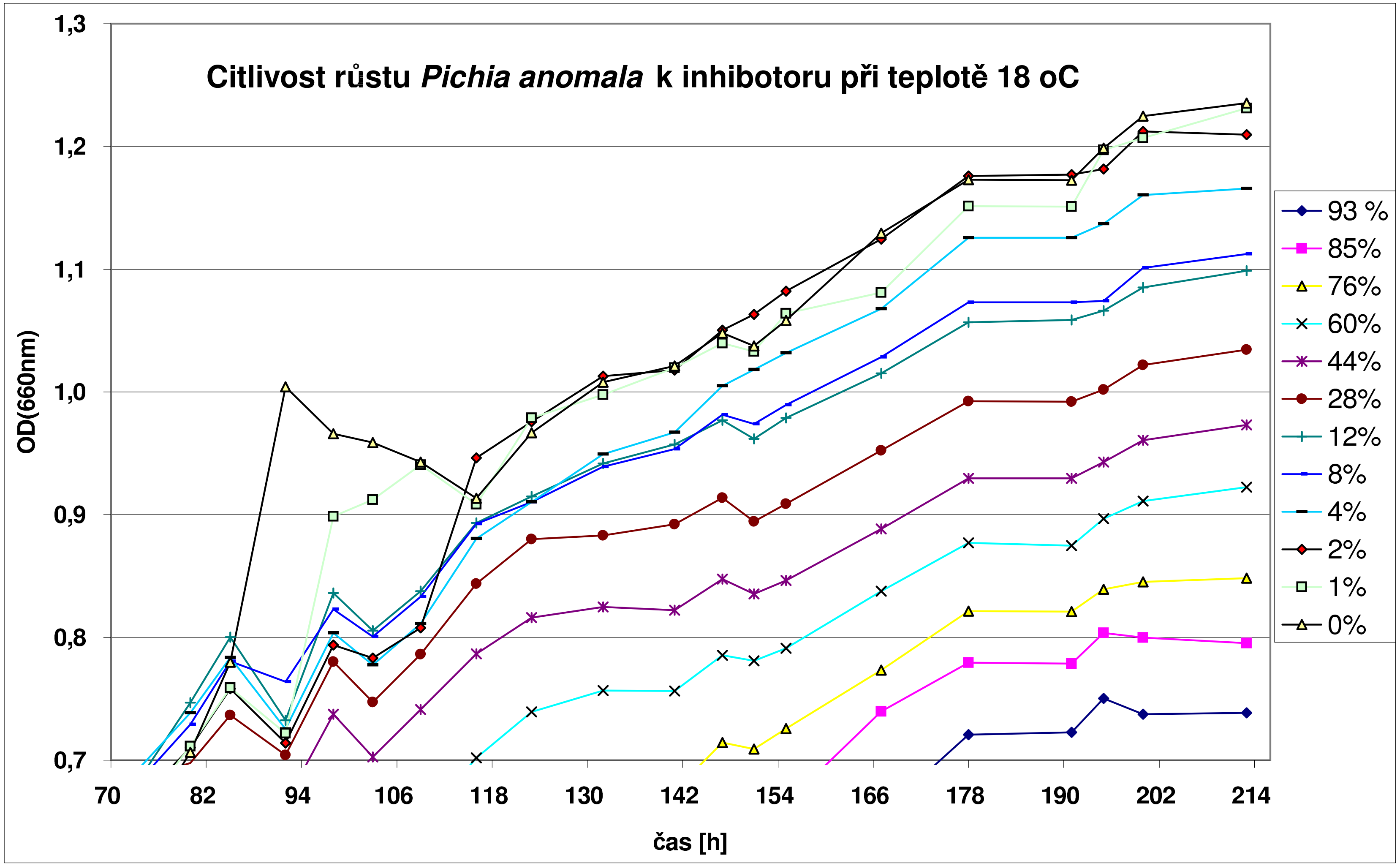
Obrázek 36: Časový průřez grafem na **Obrázku 35** zobrazujícím růstové křivky *Pichia anomala* při teplotě 18 °C v YPD médiu obsahujícím 92–0 % postkultivačního média. Jednotlivé křivky zobrazují závislost vlivu koncentrací inhibitoru na růst buněk *P. anomala*, viz graf na **Obrázku 35**. Do každé jamky bylo inokulováno 2,4x10^4 buněk *P. anomala* a byly sledovány změny optické denzity v čase. Procentuální koncentrací postkultivačního média se rozumí množství postkultivačního média po kultivaci *D. magnusii* ředěného čerstvým YPD médiem. Jednotlivé časy uvedené v legendě vyobrazeného grafu označují čas, kdy byly zaznamenány hodnoty `OD(660nm)` jednotlivých kultur.



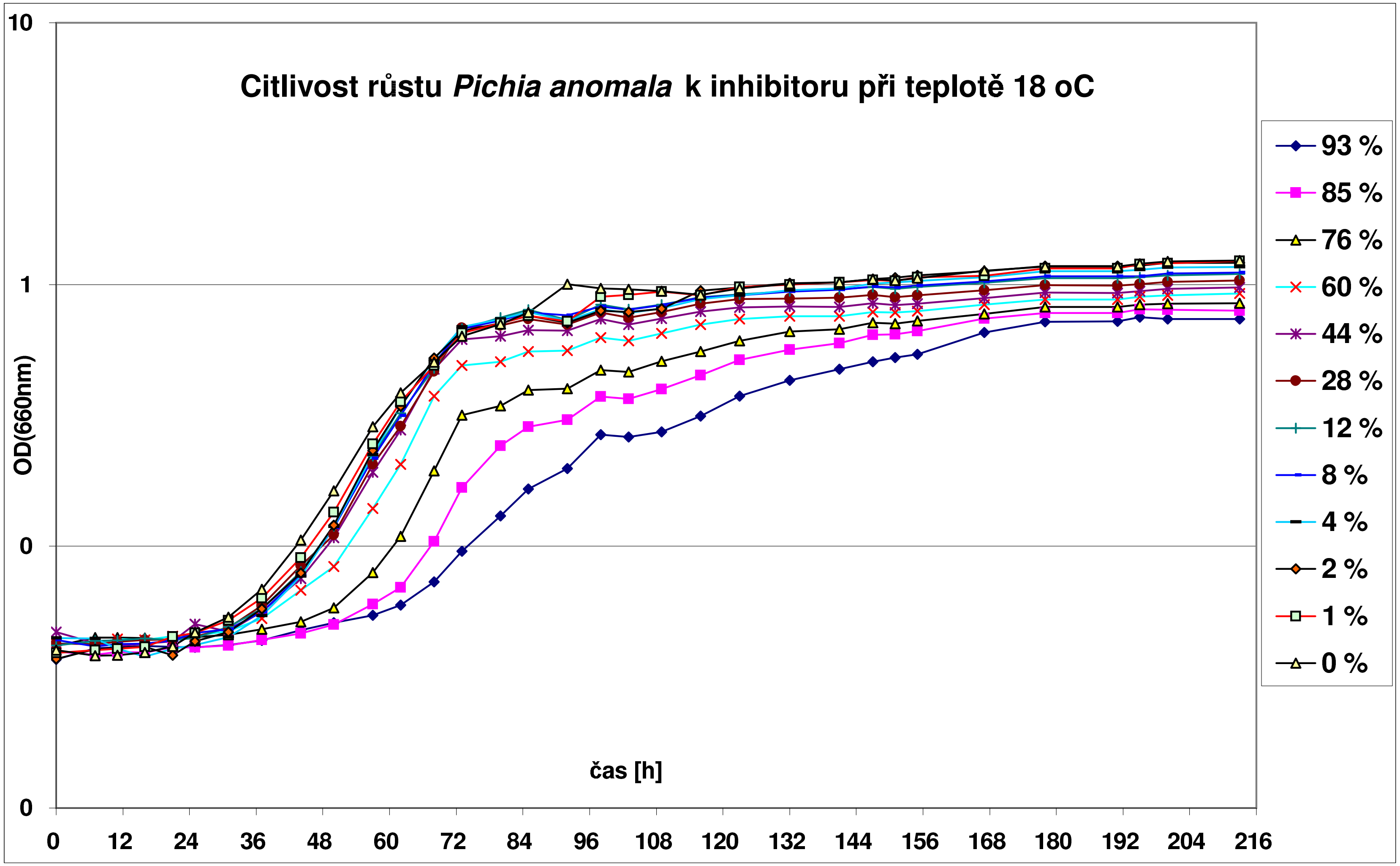
Obrázek 37: Růst *Pichia anomala* při teplotě 18 °C v YPD médiu obsahujícím 93-0 % postkultivačního média *D. magnusii*. Do každé jamky bylo inokulováno 6x10^3 buněk *P. anomala* a byly sledovány změny optické denzity. Procenta v legendě uvnitř vyobrazeného grafu označují procentuální koncentraci postkultivačního média, kterou se rozumí množství postkultivačního média (po kultivaci *D. magnusii*) ředěného čerstvým YPD médiem. **Obrázek 38** a **Obrázek 39** obsahují zvětšené výřezy z toho grafu.



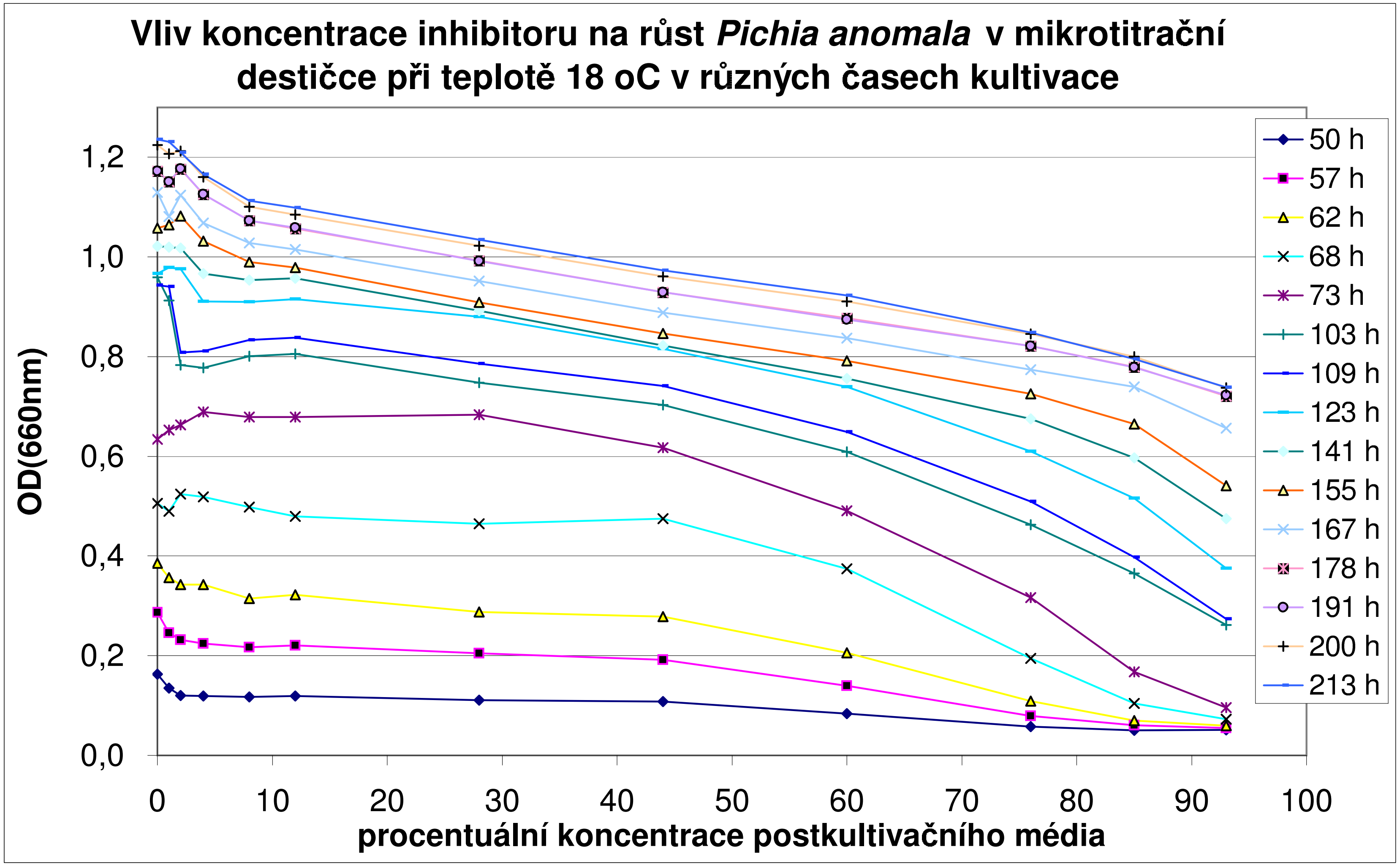
Obrázek 38: Zvětšení spodní části grafu na **Obrázku 37**: Růst *Pichia anomala* při teplotě 18 °C v YPD médiu obsahujícím 93–0 % postkultivačního média *D. magnusii*. Do každé jamky bylo inokulováno $6x10^3$ buněk *P. anomala* a byly sledovány změny optické denzity. Procenta v legendě uvnitř vyobrazeného grafu označují procentuální koncentraci postkultivačního média, kterou se rozumí množství postkultivačního média (po kultivaci *D. magnusii*) ředěného čerstvým YPD médiem.



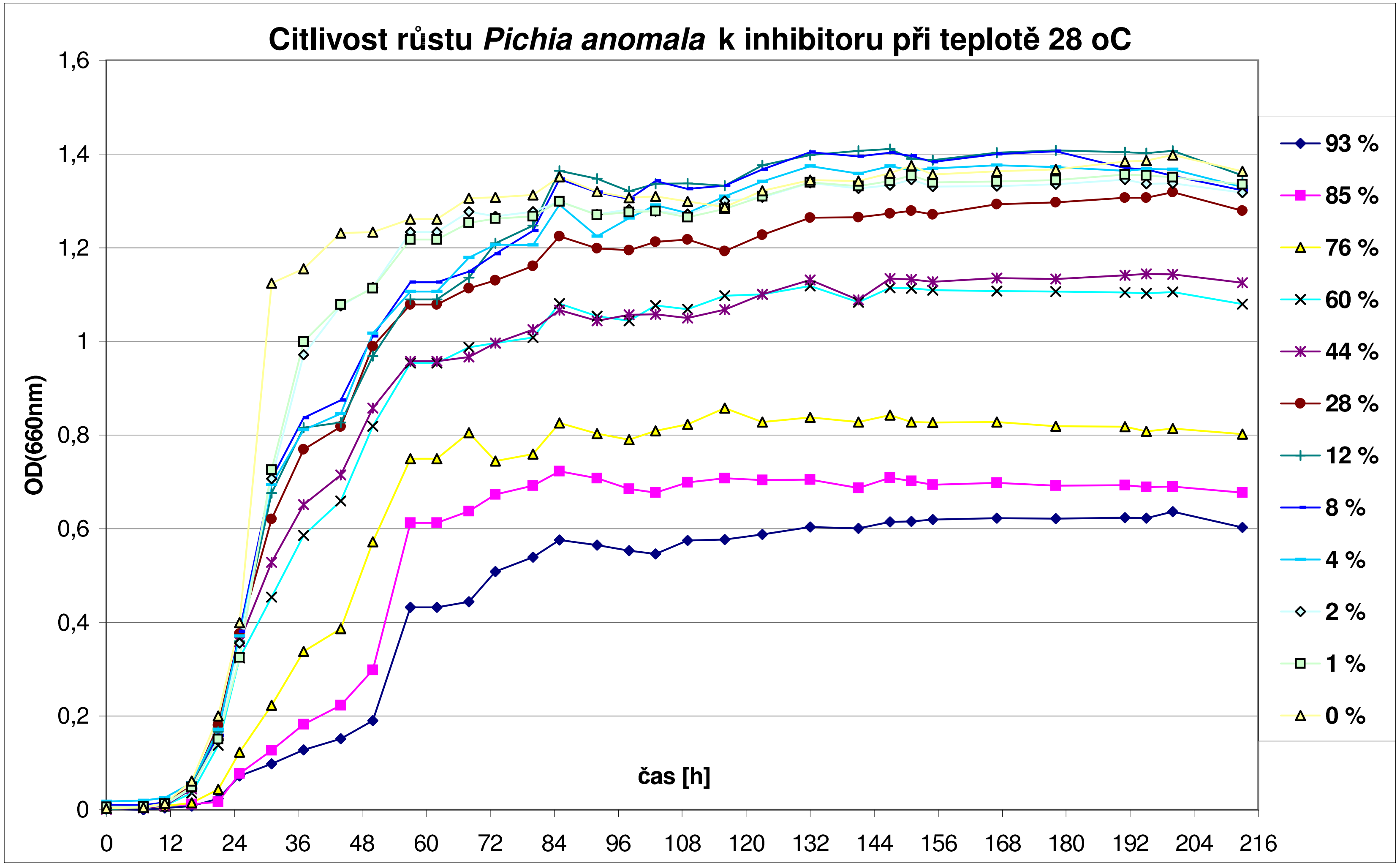
Obrázek 39: Zvětšení horní části grafu na **Obrázku 37**: Růst *Pichia anomala* při teplotě 18 °C v YPD médiu obsahujícím 93–0 % postkultivačního média *D. magnusii*. Do každé jamky bylo inokulováno 6x10^{3} buněk *P. anomala* a byly sledovány změny optické denzity. Procenta v legendě uvnitř vyobrazeného grafu označují procentuální koncentraci postkultivačního média, kterou se rozumí množství postkultivačního média (po kultivaci *D. magnusii*) ředěného čerstvým YPD médiem.



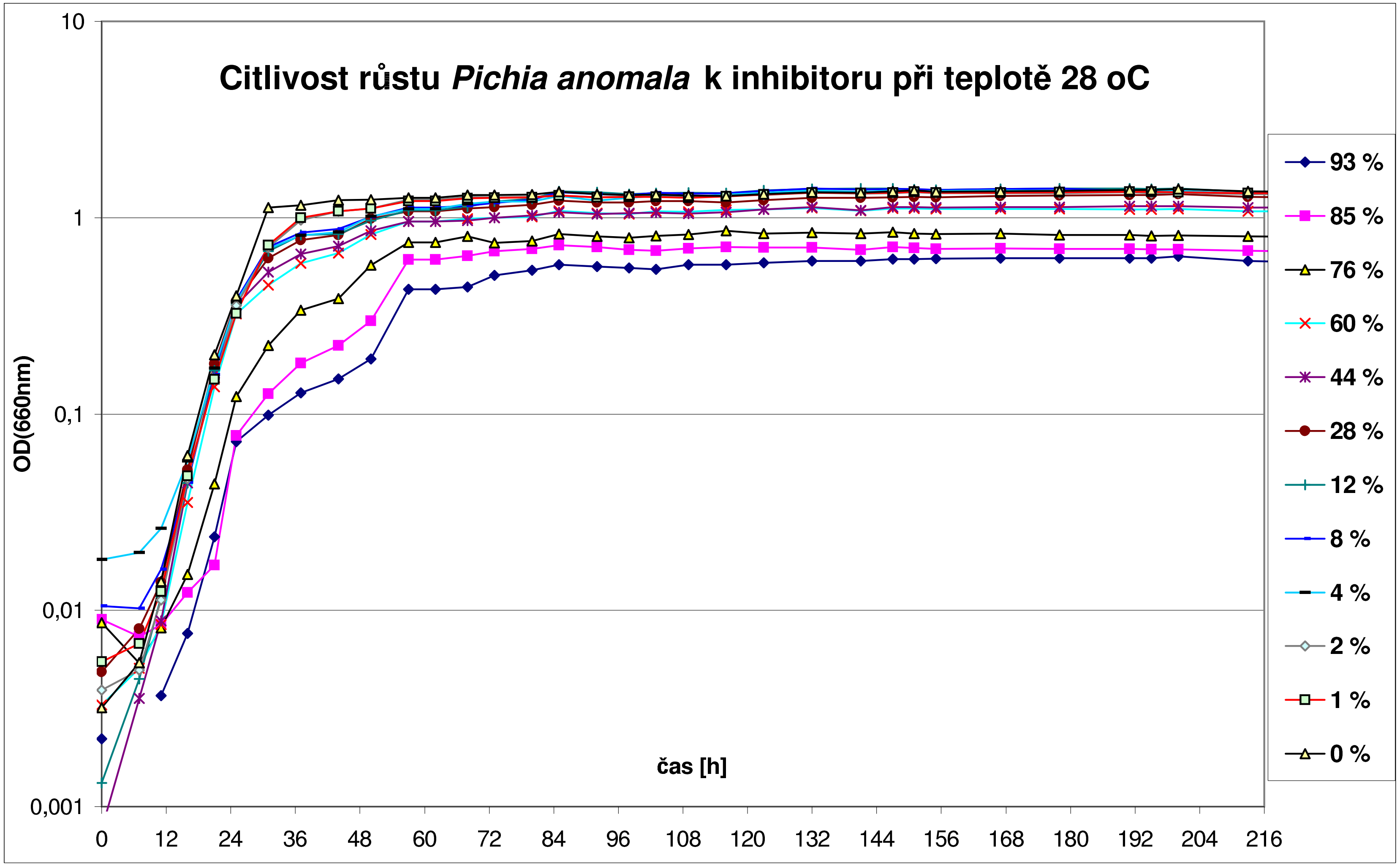
Obrázek 40: Semilogaritmické vynesení grafu na **Obrázku 37** zobrazujícího růst *Pichia anomala* při teplotě 18 °C v YPD médiu obsahujícím 93–0 % postkultivačního média *D. magnusii*. Do každé jamky bylo inokulováno 6x10^3 buněk *P. anomala* a byly sledovány změny optické denzity. Procenta v legendě uvnitř vyobrazeného grafu označují procentuální koncentraci postkultivačního média, kterou se rozumí množství postkultivačního média (po kultivaci *D. magnusii*) ředěného čerstvým YPD médiem.



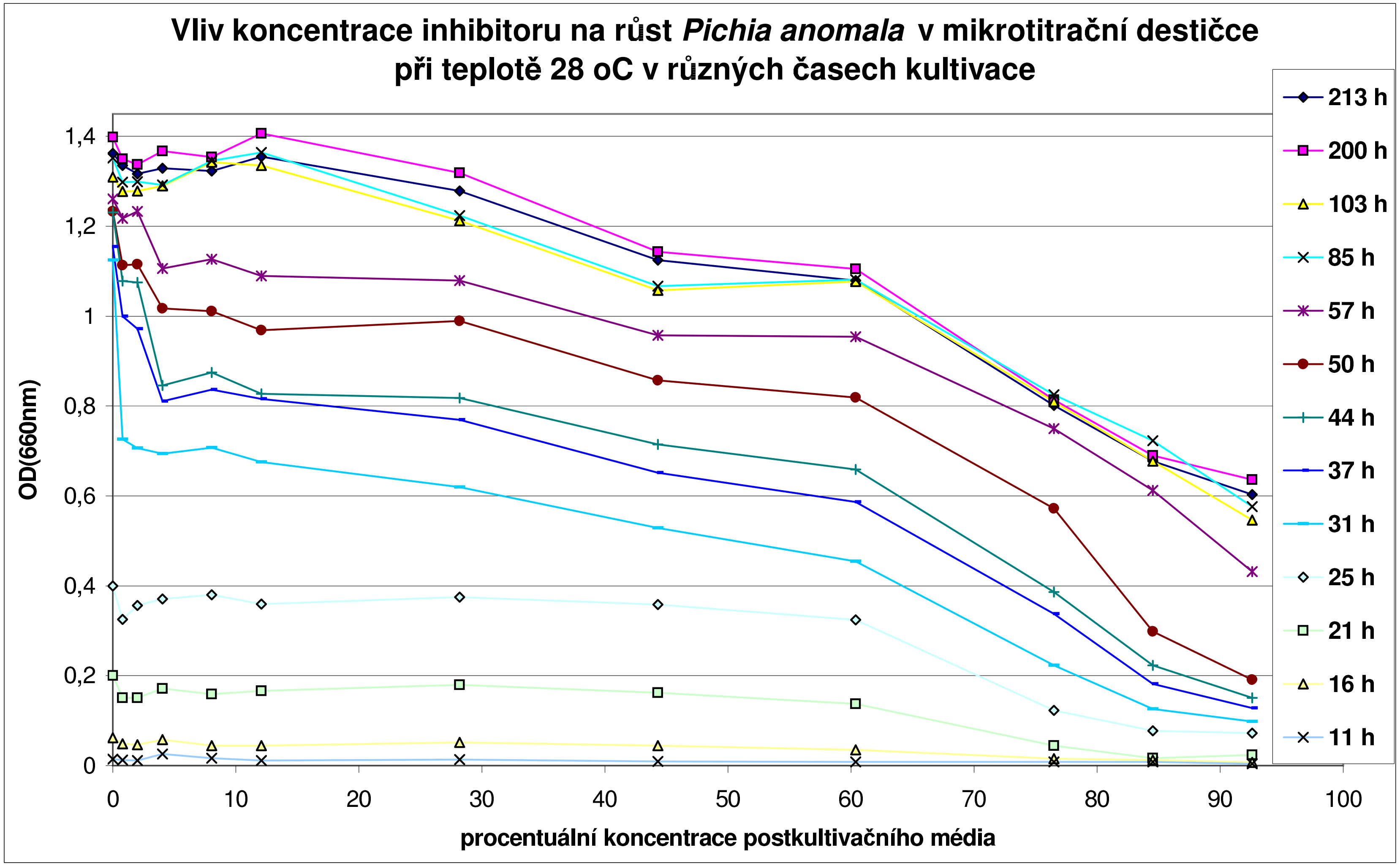
Obrázek 41: Časový průřez grafem na **Obrázku 37** obsahujícím růstové křivky *Pichia anomala* při teplotě 18 °C v YPD médiu obsahujícím 93–0 % postkultivačního média *D. magnusii*. Do každé jamky bylo inokulováno 6x10^3 buněk *P. anomala* a byly sledovány změny optické denzity. Procentuální koncentrací postkultivačního média se rozumí množství postkultivačního média po kultivaci *D. magnusii* ředěného čerstvým YPD médiem. Jednotlivé časy uvedené v legendě vyobrazeného grafu označují čas, kdy byly zaznamenány hodnoty `OD(660nm)` jednotlivých kultur.



Obrázek 42: Růst *Pichia anomala* při teplotě 28 °C v YPD médiu obsahujícím 93–0 % postkultivačního média *D. magnusii*. Do každé jamky bylo inokulováno 6x10^3 buněk *P. anomala* a byly sledovány změny optické denzity. Procenta v legendě uvnitř vyobrazeného grafu označují procentuální koncentraci postkultivačního média, kterou se rozumí množství postkultivačního média (po kultivaci *D. magnusii*) ředěného čerstvým YPD médiem.



Obrázek 43: Semilogaritmické vynesení grafu na **Obrázku 42** zobrazujícího růst *Pichia anomala* při teplotě 28 °C v YPD médiu obsahujícím 93–0 % postkultivačního média *D. magnusii*. Do každé jamky bylo inokulováno 6x10^3 buněk *P. anomala* a byly sledovány změny optické denzity. Procenta v legendě uvnitř vyobrazeného grafu označují procentuální koncentraci postkultivačního média, kterou se rozumí množství postkultivačního média (po kultivaci *D. magnusii*) ředěného čerstvým YPD médiem.



Obrázek 44: Časový průřez grafem na **Obrázku 42** obsahujícím růstové křivky *Pichia anomala* při teplotě 28 °C v YPD médiu obsahujícím 93–0 % postkultivačního média *D. magnusii*. Jednotlivé křivky zobrazují závislost vlivu koncentrací inhibitoru na růst buněk *P. anomala*. Do každé jamky bylo inokulováno $6x10^3$ buněk *P. anomala* a byly sledovány změny optické denzity. Procentuální koncentrací postkultivačního média se rozumí množství postkultivačního média po kultivaci *D. magnusii* ředěného čerstvým YPD médiem. Jednotlivé časy uvedené v legendě vyobrazeného grafu označují čas, kdy byly zaznamenány hodnoty `OD(660nm)` jednotlivých kultur.

4.4 Odléčování

4.4.1 UV iradiace

Na misky s YPDA médiem bylo inokulováno 1,08x10^2–10^7 buněk *Dipodascus magnusii*. Všechna ředění výsevu byla ozářena různými dávkami UV záření: 1, 10, 100, 500, 1000 mJ/cm^2.

Na produkci inhibitoru bylo čárkovým testem analyzováno 84 kolonií vyrostlých na miskách po ozáření UV světlem (viz **Tabulka 5**) (byl použit cibulový agar, teplota 20 ^{o}C). Ačkoli některé klony produkovaly inhibitor v dostatečném množství a objevila se inhibiční zóna na miskách s cibulovým agarem, v některých případech klony inhibitor zdánlivě neprodukovaly (ani pozitivní kontrola v některých případech nevykazovala produkci inhibitoru). Žádný z izolovaných klonů neztratil schopnost produkce inhibitoru nebo nebyla jeho přítomnost detekována. Ačkoli LD_{50} nebylo možné určit, byla v rozsahu 10–100 mJ/cm^2.

Inokulovaných buněk	Dávka [mJ/cm^2]					
	0	1	10	100	500	1000
1x10^7	6x10^4	4x10^4	4,5–5,0x10^4	350	7	1
1x10^7	2,8x10^4	6,5x10^3	2,5x10^4	2	0	0
1x10^5	3,5x10^3	3,7x10^3	3,5x10^3	4	0	0
1x10^4	400	850	580	0	1	0
1x10^3	70	83	37	0	0	0
1x10^2	5	11	8	0	0	0
Vyrostlo celkem buněk	9,2x10^4	5,11x10^4	7,91x10^4	356	8	1
Přežilo celkem buněk		130 565				

Tabulka 5: Léčení *Dipodascus magnusii* UV zářením. Bližší vysvětlení je v textu.

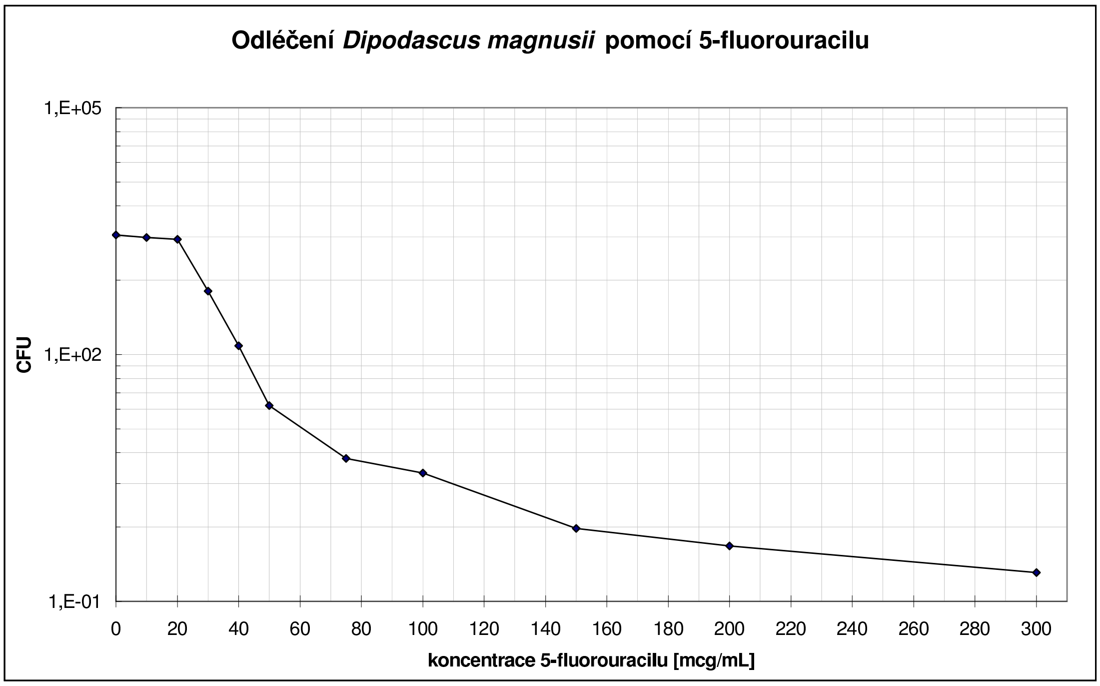
Buňky se nepodařilo zbavit produkce inhibitoru, ačkoli nelze vyloučit že buňky inhibitor neprodukovaly a díky nespolehlivosti detekční metody (čárkový test s OA médiem) nebyly detekovány.

4.4.2 5–fluorouracil

Bylo testováno široké rozmezí koncentrací 1,5, 2,9 5,9, 7,4, 10, 14,7, 20, 29,4, 40, 50, 100, 200 μg/mL 5–fluorouracilu obsaženého v YPDA médiu. Byla stanovena křivka přežití v 5 nezávislých experimentech, LD_{50} byla ve výši 24 μg/mL 5–fluorouracilu (viz **Obrázek 45**). Na miskách s nízkým obsahem 5–fluorouracilu (1,5–20 μg/mL) měly kolonie velký průměr a nebylo možné je přesně zpočítat. Celkem na miskách vyrostlo asi 9319 kolonií.

Celkem bylo izolováno 1656 kmenů (z misek obsahujících 10–200 μg/mL 5–fluorouracilu), u všech klonů byla prokázána přítomnost dsRNA o velikosti 4,3 kbp (z toho 297 kmenů bylo izolováno z misek s koncentrací vyšší než 30 μg/mL). Přítomnost ostatních kratších dsRNA nebylo možné díky rozlišení použité metody sledovat.

Na produkci inhibitoru bylo pomocí čárkového testu analyzováno 1246 kolonií, jednoznačně pozitivních bylo pouze 345 klonů (z těch bylo jednoznačně pozitivních 65 izolovaných z dávek vyšších než 30 μg/mL 5–fluorouracilu — na čárkovém testu byl poloměr inhibiční zóny asi 3 mm). V ostatních případech nebylo možné přítomnost inhibitoru prokázat díky malé citlivosti a reprodukovatelnosti použité metody (viz metoda Detekce dsRNA v biomase). Kvůli nespolehlivosti použité detekční metody jsem přistoupil k hledání vhodnějších podmínek realizace čárkového testu, včetně dalších metod.



Obrázek 45: Křivka přežití *Dipodascus magnusii* po léčení 5–fluorouracilem. LD_{50} byla přibližně 24 μg/mL. Bližší vysvětlení je v textu na straně 98.

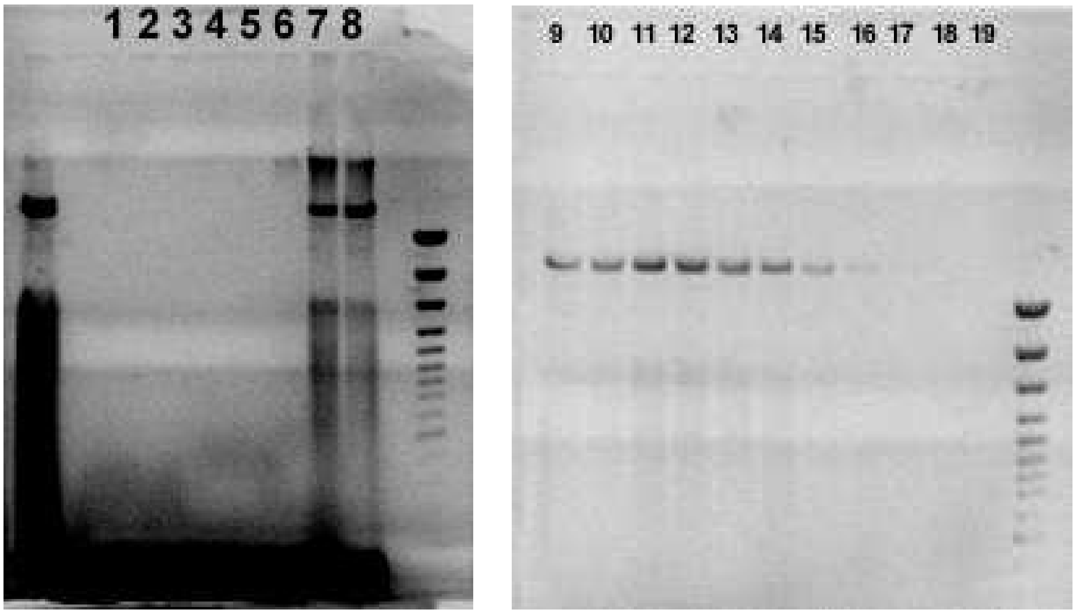
Ačkoli měly některé kolonie pozměněnou morfologii, zpomalený růst spojený s malým vzrůstem kolonií, přesto se buňky *D. magnusii* nepodařilo odléčit minimálně od 4,3 kbp dsRNA.

4.4.3 Chromatografická separace virových částic

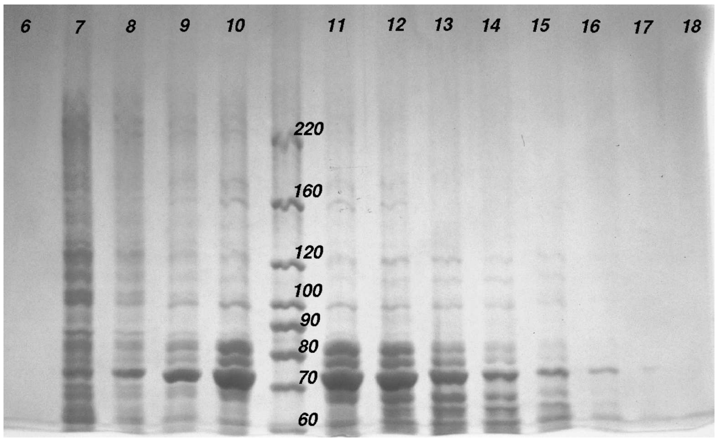
V počátečních experimentech jsem k promývání a k eluci kolonky používal VPB pufr obsahující 1 mM EDTA (viz Pospíšek *et al.* (1994)). Protože elektroforetické analýzy frakcí (SDS-PAGE) ukázaly, že frakce obsahující dsRNA (viz **Obrázek 46**) obsahují stále velké množství proteinů, pokusil jsem se zlepšit dělící podmínky. Obrázek SDS–PAGE frakcí použitých v experimentu vyobrazeném na **Obrázku 46** není zobrazen. **Obrázek 47(a)** je SDS–PAGE jiného alikvótu stejného zamraženého vzorku (jako v případě na **Obrázku 46**) separovaného na stejné koloně za stejných podmínek a je tedy možné jej považovat za zástupný. Následně byly provedeny srovnávací experimenty s použitím standardního VPB pufru obsahujícího 1 mM EDTA (tedy opakován předešlý pokus) a dále experiment se zvýšenou (10 mM) koncentrací EDTA (viz elektroforézy proteinů ve frakcích na **Obrázcích 47(a) a 47(b)**, resp. agarózové elektroforézy frakcí na **Obrázcích 48(a) a 48(b)**).

Z proteinových spekter jednotlivých frakcí a ze spekter nukleových kyselin odpovídajících agarózových elektroforéz vyplývá, že virus a zároveň všechny proteiny jsou ve frakcích 6–17. Spektrofotometrická resp. elektroforetická analýza 36 alikvotních frakcí z kolonky neprokázala přítomnost detekovatelného množství proteinů nebo nukleových kyselin ve frakcích 1–5 a 18–36 (viz Obrázky 49(a), 49(b)). Po zvýšení koncentrace EDTA v používaném pufru jsem dosáhl zlepšení dělení, ačkoli frakce obsahující virus stále obsahují velké množství proteinů (srovnej navzájem dvojice **Obrázků: 47(a), 47(b) a 48(a), 48(b)**). Podle profilu absorbancí jednotlivých frakcí eluovaných pufrem obsahujícím 1 mM resp. 10 mM EDTA (viz **Obrázky 49(a), 49(b)**) se zdá, že během eluce viru z kolonky v prostředí 1 mM EDTA se ve frakcích 6–19 kromě virové dsRNA ještě velké množství jiných nukleových kyselin (patrně také RNA), který je nějakým způsobem chráněna před degradací a zvyšuje absorbanci při 260 nm. Naopak v prostředí 10 mM EDTA dochází k porušení této ochrany a tyto předpokládané RNA jsou degradovány. Mohlo by se jednat o ribozómy nebo například také virovou ssRNA.

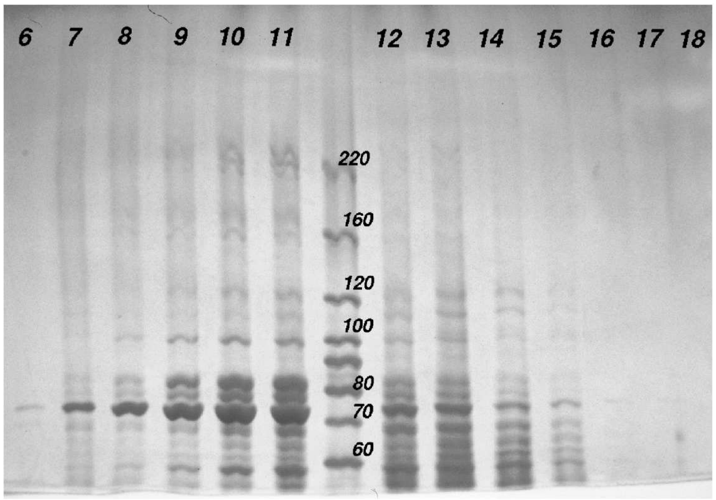
Frakce 7 a 11 z chromatografické separace v pufru obsahujícím 1 mM EDTA obsahující velké množství virové 4,3 kbp dsRNA, byly následně děleny v gradientu CsCl, viz kapitola 4.5.1.



Obrázek 46: Chromatografická separace virových částic: agarózová elektroforéza frakcí `1-19`. Dráhy zleva na levém panelu: Vzorek dělený na koloně, prázdná dráha, vzorky `1-8`, prázdná dráha, standard 100 bp DNA ladder (obsahující shora fragmenty 3000, 2000, 1500, 1200, 1031, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100 bp). Deráhy zleva na pravém panelu: vzorky `8-19`, standard 100 bp DNA ladder. Vzorky frakcí byly smíseny se vzorkovým pufrem a SDS umožňujícím rozpad partikulí. Nejlépe zřetelný fragment (shora) má zhruba hmotnost 4 kbp a odpovídá předpokládané virové L dsRNA (objevuje v `7.` frakci, první maximum je v `7.-8.` frakci, druhé maximum je v `11.-12.` frakci, koncentrace klesá až k viditelnému minimu v `16.` frakci). Ve frakcích `7-15` bylo vidět RNA o hmotnostech ≈1,5 kbp a ≈1 kbp s maximem v `11.-13.` frakci. Ve frakcích `8-15` byla vidět pravděpodobná degradovaná rRNA. Proteiny detekované v těchto frakcích nejsou vyobrazeny, ale na **Obrázku 47(a)** jsou analyzované frakce z identického experimentu (čísla frakcí si navzájem odpovídají). Obsahy nukleových kyselin ve frakcích obou experimentů byly identické (viz **Obrázek 48(a)**). `7.` a `11.` frakce byla použita při centrifugaci v gradientu CsCl (viz **Obrázek 53(a), 53(b)**).

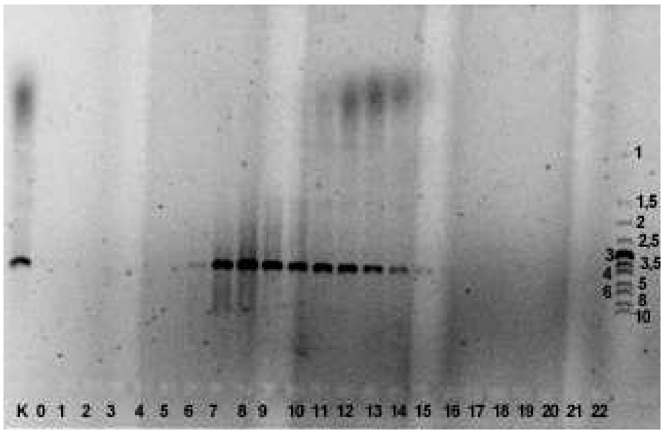


(a) Chromatografická separace virových částic ve VPB pufru obsahujícím 1 mM EDTA. Na dráhy byly nanášeny zleva frakce: `6, 7, 8, 9, 10`, standard Benchmark Protein Ladder (60–220 kDa), `11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18`. Čísla frakcí odpovídají číslům ostatních analýz těchto vzorků, viz **Obrázky 48(a), 49(a)**.

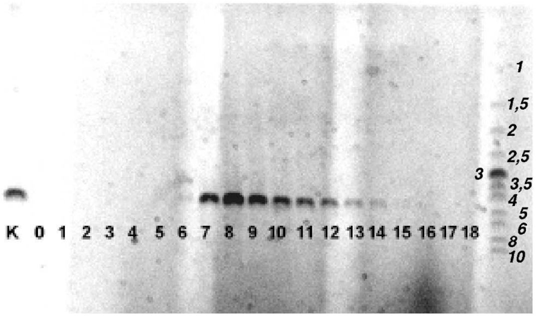


(b) Chromatografická separace virových částic ve VPB pufru obsahujícím 10 mM EDTA. Na dráhy byly nanášeny zleva frakce: `6, 7, 8, 9, 10, 11`, standard Gibco Benchmark (60–220 kDa), `12, 13, 14, 15, 16, 17, 18`. Ve srovnání s gelem na **Obrázku 47(a)** je ve frakci 7 mnohem méně proteinů. Čísla frakcí odpovídají číslům během ostatních analýz těchto vzorků, viz **Obrázky 48(b), 49(b)**.

Obrázek 47: Chromatografická separace virových částic ve VPB pufru obsahujícím 1 nebo 10 mM EDTA. SDS-PAGE gel (gradient 5-20 % PAA) byl po obarvení Coomassie Brilliant Blue G–250 obarven stříbrem. Pro určení molekulových hmotností byl použit standard Benchmark Protein Ladder (Gibco) obsahující proteiny o hmotnostech (shora): 220, 160, 120, 100, 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 25, 20, 15, 10 kDa. Rovněž vlivem 10 mM EDTA zmizely některé proteiny ve frakcích `8-11`. Na obou gelech je patrný protein s hmotností přibližně 75 kDa, který by mohl odpovídat kapsidovému proteinu popsanému v literatuře. Maximum viru je v `11.` a `12.` frakci. Ve frakci `7` a `8` je pravděpodobně holá dsRNA nebo ssRNA.

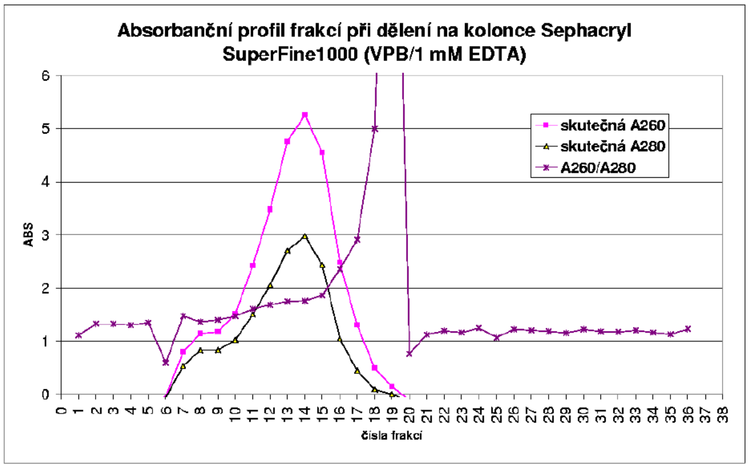


(a) Chromatografická separace virových částic: agarózová elektroforéza frakcí 1–24 v prostředí 1 mM EDTA. Zleva: část supernatantu 20 000 g děleného na koloně (`K`), prázdná dráha, dále vzorky `1-24`, standard 1 kbp DNA ladder. Nejlépe zřetelný proužek má zhruba hmotnost 4,5 kbp a odpovídá virové dsRNA (objevuje v `6.` frakci, max. je v `7.-9.` frakci, koncentrace klesá až k viditelnému minimu v `18.` frakci). Ve frakcích `9.-13` byla vidět RNA o hmotnosti ≈2,3 kbp s maximální koncentrací v `9.` frakci. Ve frakcích `11-14` byla vidět pravděpodobná RNA o velikosti 1 kbp s maximem ve `12.` frakci. Ve frakcích `12-14` byla vidět pravděpodobná degradovaná rRNA. Čísla frakcí odpovídají číslům během ostatních analýz těchto vzorků, viz **Obrázky 47(a), 49(a)**.

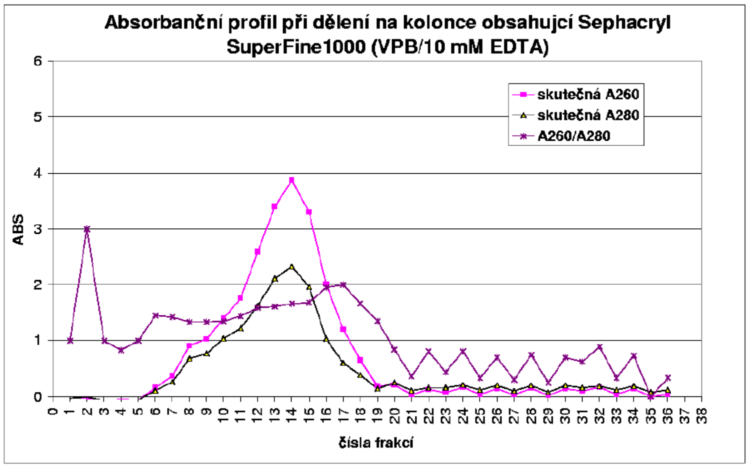


(b) Chromatografická separace virových částic: agarózová elektroforéza frakcí 1–24 v prostředí 10 mM EDTA. Zleva: část supernatantu 20 000 g děleného na koloně (`K`), prázdná dráha, dále vzorky `1-20`, standard 1 kbp DNA ladder. Nejlépe zřetelný proužek má zhruba hmotnost 4,5 kbp a odpovídá virové dsRNA (objevuje v `6.` frakci, max. je v `8.` frakci, koncentrace klesá až k viditelnému minimu v `18.` frakci). Ve frakcích `8-11` byla vidět RNA o hmotnosti ≈2,5 kbp. Ve frakcích `8-13` je vidět RNA o velikosti 1 kbp. Ve frakcích `8-15` byla vidět pravděpodobná degradovaná rRNA. Čísla frakcí odpovídají číslům během ostatních analýz těchto vzorků, viz **Obrázky 47(b), 49(b)**.

Obrázek 48: Chromatografická separace virových částic: agarózová elektroforéza frakcí `1-24` v prostředí 1 resp. 10 mM EDTA. Jako referenční standard byl při elektroforéze v obou případech použit 1 kbp DNA ladder obsahující fragmenty 10, 8, 6, 5, 4, 3,5, **3**, 2,5, 2, 1,5, 1, 0,75, 0,5, 0,25 kbp (3 kbp fragment obsahuje více DNA). Vzorky frakcí byly smíseny se vzorkovým pufrem a SDS umožňujícím rozpad partikulí. Nejlépe zřetelný proužek na obou gelech má zhruba hmotnost 4,5 kbp a odpovídá virové dsRNA.



(a) Profil absorbancí frakcí sbíraných z kolonky promývané pufrem VPB/1 mM EDTA (viz **Obrázky: 48(a), 47(a)**).



(b) Profil absorbancí frakcí sbíraných z kolonky promývané pufrem VPB/10 mM EDTA (viz **Obrázky: 48(b), 47(b)**).

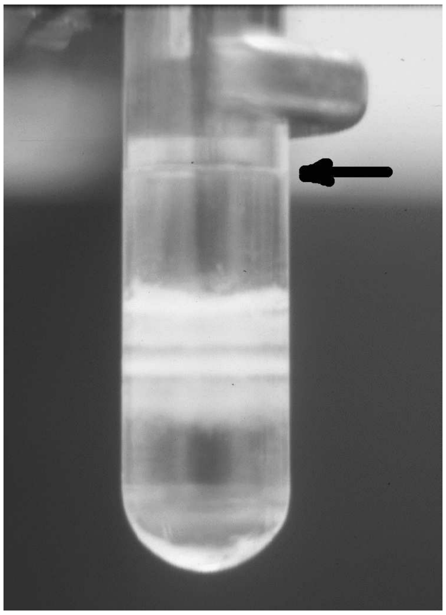
Obrázek 49: Profil absorbancí frakcí sbíraných z kolonky promývané pufrem VPB obsahujícím 1 nebo 10 mM EDTA. Čísla frakcí odpovídají číslům frakcí v obou těchto experimentech i na ostatních **Obrázcích 48(a), 48(b), 47(a), 47(b)**. Ačkoli se nejedná o stejný experiment, experiment zobrazený na **Obrázku 46** byl proveden za identických podmínek.

4.5 Izolace a charakterizace viru

Supernatanty po centrifugaci buněčných lyzátů připravených mrazovou izolací viru (označované jako supernatanty 20 000 g, viz kapitola 3.3.5.2) jsem používal k dělení v gradientu CsCl (viz **Kapitola: 3.3.5.1.1.1**) nebo k chromatografickému dělení na nosiči Sephacryl S1000 SuperFine. Frakce, které jsem získal oběma postupy, jsem analyzoval na přítomnost dsRNA pomocí horizontální agarózové elektroforézy a pomocí diskontinuální elektroforézy proteinů v denaturovaném stavu (SDS–PAGE).

4.5.1 Mrazová izolace viru s následnou centrifugací v izopyknickém gradientu CsCl

Po centrifugaci v gradientu CsCl vzniklo v centrifugační kyvetě 5 různě silných zón. První v oblasti 1,18–1,21 g/cm^3 (silná), druhá v oblasti 1,22 g/cm^3 (slabá), třetí v oblasti 1,27–1,29 g/cm^3 (silná), čtvrtá v oblasti 1,32 g/cm^3 (slabá), pátá v oblasti 1,34–1,42 g/cm^3 (silná) (viz **Obrázek 50**).

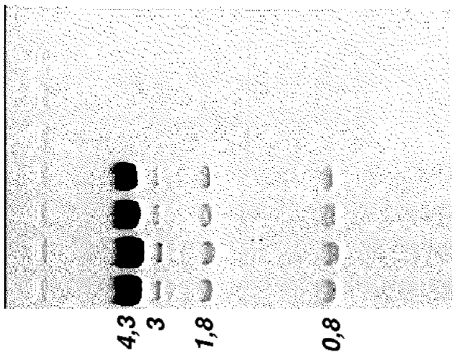


Obrázek 50: Centrifugace virových částic v gradientu CsCl obsažených po předchozí mrazové izolaci v supernatantu 20 000 g (VPB/1 mM EDTA). Šipka vyznačuje úroveň fázového rozhraní olej/voda. Na obrázku je patrná pouze 1., 3., 5. zóna. Srovnej s agarózovou elektroforézou frakcí **Obrázku 51**.

Virová dsRNA o hmotnosti 4,3 kbp byla obsažena ve frakcích odpovídajících rozsahu vznášivých hustot 1,48–1,18(–1,16) g/cm^3. Dvě maxima viru byla v oblasti s hustotami 1,45–1,42 g/cm^3 (se vzrůstající hustotou CsCl jí ubývalo) a v hustotě 1,22 g/cm^3. V prvním maximu byla virová dsRNA o velikosti 4,3 kbp a molekuly nukleových kyselin o hmotnostech 1,3 a 1,0 kbp mající maximum koncentrace v rozsahu hustot 1,27–1,18 g/cm^3 (pravděpodobně tedy kontaminace). V druhém maximu 4,3 kbp dsRNA v hustotě 1,22 byly obsaženy 4,3 3,0 1,8 a 0,8 kbp veliké dsRNA, odpovídající dříve izolovaným virovým dsRNA, viz **Obrázek 52**. V rozsahu hustot 1,18–1,10 g/cm^3 není obsažena žádná nukleová kyselina.

Analýzy proteinů obsažených v jednotlivých frakcích ale ukázaly, že frakce obsahující předpokládanou virovou dsRNA (4,3 kbp) obsahují velké množství proteinů (data nejsou zobrazena).

Obrázek 51: Agarózová elektroforéza CsCl frakcí rozdělených gradientovou centrifugací. Vzorek viru byl připraven metodou mrazové izolace a předčištěn diferenciální centrifugací při 20 000 g. Virus obsažený v supernatantu označovaném 20 000 g byl zakoncentrován peletací při 200 000 g, rozpuštěn v VPB pufru ke kterému bylo přidáno CsCl. Během celé procedury izolace viru byl používán VPB pufr se standardní koncentrací 1 mM EDTA. Na gelu jsou shora frakce: 2-5 (dsRNA není vidět), dr8hy 6–18 obsahují dsRNA. Maximum viru bylo ve fracích 8, 9 a také. Frakce 18 odpovídá peletě RNA. Se vzrůstajícím pořadovým číslem vzrůstá vznášivá hustota. Frakce 9 byla označena jako A9 a byla použita v dalších experimentech (viz **Obrázek 53(d)** a podrobná analýza ve výsledkové části a diskusi).



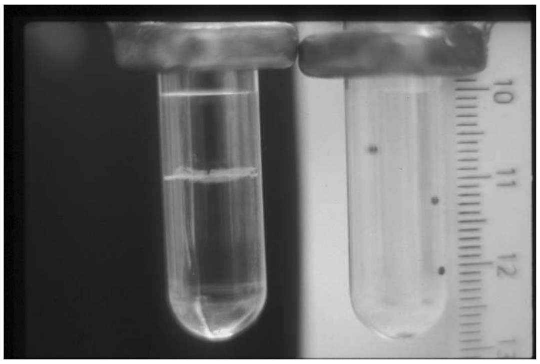
Obrázek 52: Virová dsRNA na izolačním gelu. Zde neváděné analýzy prokázaly velikosti molekul (zleva) 4,3, 3, 1,8, 0,8 kbp. Tyto dsRNA jsou považovány za virové (Pospíšek *et al.*, 1994). Během většiny analýz CsCl frakcí po separaci viru v gradientu CsCl (nebo také v případě chromatografické separace) byla většinou detekována jen 4,3 kbp dsRNA případně 3,0 a 1,8 kbp dsRNA.

K dalšímu pokusu o kvalitní dělení v gradientu CsCl bylo použito 5 vzorků (čísla 1,2,4,5,6) rozpuštěných ve VPB pufru obsahujícím standardní 1 mM koncentraci EDTA (viz **Obrázek 54, 53**):

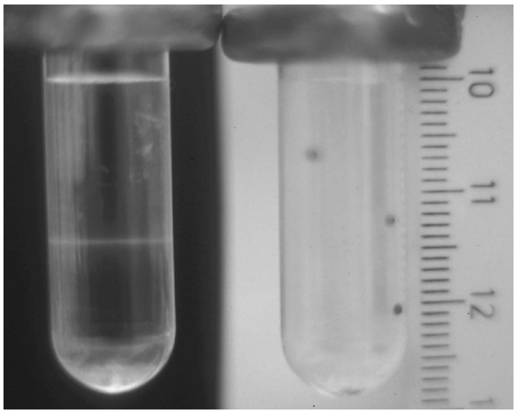
1. frakce 7 z chromatografické separace, viz kapitola 4.4.3
2. frakce 11 z chromatografické separace, viz kapitola 4.4.3
3. kuličky s definovanou vznášivou hustotou
4. 54,2 μL frakce označená B11 z interzonální oblasti gradientu CsCl se vznášivou hustotou 1,22–1,21 g/cm^3 z gradientu frakcionovaného zdola a obsahující velké množství 4,3 kbp dsRNA než okolní frakce (data nejsou zobrazena)
5. 54,3 μL frakce označená A9 odebraná z oblasti konce první zóny a části druhé zóny, odpovídající rozsahu hustot 1,22–1,20 g/cm^3 z gradientu CsCl frakcionovaného shora a obsahující překvapivě znatelně méně 4,3 kbp dsRNA než okolní frakce, ale obsahujícího navíc 3,0 1,8, 0,8 kbp dsRNA (viz **Obrázek 50, 51**).
6. byl znovu purifikován virus z 8 mL supernatantu čerstvě izolovaného viru, ostatní alikvotní objemy lyzátu byly zmrazeny.

Výsledná analýza ukázala, že vzorky:

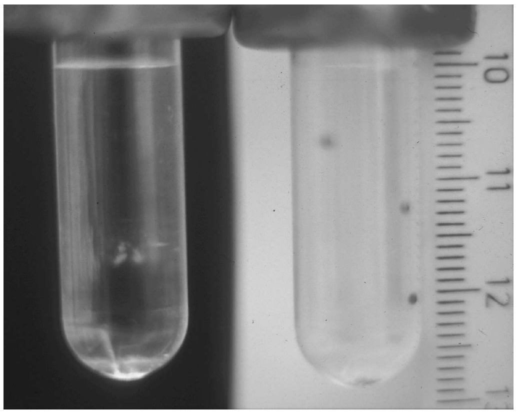
1. Obsah 7. frakce z chromatografické separace tvořil jedinou detekovatelnou zónu složenou z volných proteinů ve vznášivé hustotě 1,20–1,18 g/cm^3 (viz **Obrázek 53(a)**). Virová dsRNA nebyla elektroforézou v agarózovém gelu detekována. Z výsledku vyplývá, že první maximum detekované dsRNA obsažené v 7. frakci eluované VPB pufrem (obsahujícím 1 mM EDTA) je volná dsRNA, která byla během centrifugace v CsCl degradována (data nejsou zobrazena).
2. Vzorek 11. frakce z chromatografické separace vytvořil silnou zónu o hustotě 1,33–1,31 g/cm^3 (viz **Obrázek 53(b)**) obsahující virovou 4,3 kbp velikou dsRNA. Agarózová elektroforéza prokazuje nejvyšší koncentraci viru v 6. frakci (viz **Obrázek 55**). Proteinová elektroforéza prokázala přítomnost několika proteinů, viz **Obrázek 57**.
3. vzorek obsahoval kuličky s definovanou vznášivou hustotou, centrifugační kyveta je na obrázcích vedle vzorků. Obsahovala kuličky se vznášivou hustotou 1,2, 1,3, 1,5 g/cm^3.
4. Původní vzorek B11 při nové centrifugaci v CsCl vytvořil zónu v rozsahu 1,42–1,32 g/cm^3 (viz **Obrázek 53(c)**). 4,3 kbp dsRNA byla ale přítomna ve frakcích pod touto zónou, přibližně v rozsahu 1,45–1,43 g/cm^3 (v oblasti mezi vpichem a viditelným počátkem zóny). Ve vlastní oblasti zóny bylo velmi málo 4,3 kbp dsRNA, kratší molekuly nebyly na agarózovém gelu patrny vůbec (obrázek agarózové ani proteinové elektroforézy není zobrazen).
5. Původní vzorek A9 se rozdělil na 3 zóny: 1,24–1,20 g/cm^3 (slabá), 1,30 g/cm^3 (silná), 1,36–1,31 g/cm^3 (slabá) (viz **Obrázek 53(d)**). Ze vzniku 3. zón vyplývá, že frakce A9 obsahovala ještě méně vyčištěný virus než frakce B11. Vznik zón v mnohem vyšších hustotách, než ze kterých byly frakce po první centrifugaci odebrány, dokazuje nedokonalost prvního dělení (viz **Obrázek 51, 50**). Předpokládaná virová dsRNA byla obsažena ve vznášivých hustotách pod vpichem (přesná pozice nebyla zaznamenána) v oblasti hustot $\approx$1,4 g/cm^3. Znamená to, že vzorek A9 byl nejen směsí molekul z 1., 2., a 3. zóny (prokázal že jsou nevirové), ale že obsahoval virovou kontaminaci z ještě vyšších hustot vlivem přetížení gradientu na **Obrázku 50**. Dokazuje to, že skutečná oblast vznášivé hustoty viru je (tak jak by bylo očekáváno s literaturou) v oblasti 1,4 g/cm^3 (a hustší). To vysvětluje, proč byla virová 4,3 kbp dsRNA detekována během první centrifugace v tak velkém rozsahu vznášivých hustot. Dále to dokládá pravděpodobnou přítomnost agregátů viru s proteiny, jejichž hustota se blíží vznášivé hustotě volných proteinů nebo je prostě dalším důkazem špatného dělení v gradientu CsCl, například vlivem přetížení (obrázek agarózové ani proteinové elektroforézy není zobrazen).
6. Nová purifikace viru ve **vzorku 6** vedla k rozdělení 20 000 g supernatantu do následujících 4 zón: 1,15 g/cm^3, 1,21 g/cm^3 (pravděpodobné volné proteiny), 1,285 g/cm^3, 1,32–1,30 g/cm^3 a difůzní oblasti pod touto zónou 1,37–1,34 g/cm^3 (viz **Obrázek 54(a) a 54(b)**). Předpokládaná virová dsRNA o hmotnostech 4,3, 3,0, 1,5 a 0,8 kbp byla přítomna ve frakcích rozsahu 1,37–1,29 g/cm^3, s maximem koncentrace okolo 1,32–1,30 g/cm^3 (viz **Obrázek 56**). Proteinová SDS–PAGE elektroforéza je na **Obrázku 58**.



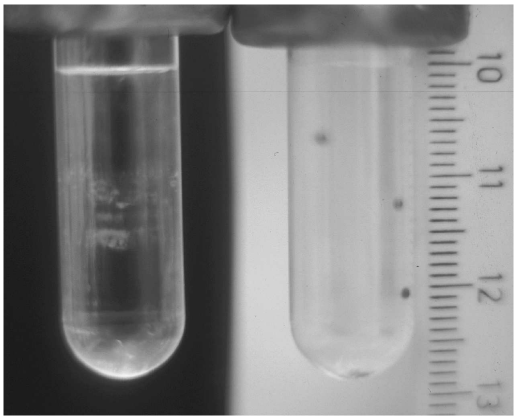
(a) Vzorek 1: Izopyknická centrifugace 7. frakce získané chromatografickým dělením v prostředí VPB pufru s 1 mM EDTA (viz **Obrázek 46**). Vzorek 1 neobsahoval virus vůbec (jen před RNázami nechráněnou RNA), zóna na obrázku odpovídá vznášivé hustotě volných proteinů.



(b) Vzorek 2: Izopyknická centrifugace 11. frakce získané chromatografickým dělením v prostředí VPB pufru s 1 mM EDTA (viz **Obrázek 46**). Zóna na obrázku odpovídá viru, ale proteinové složení částečně purifikovaného viru neodpovídá literatuře. SDS–PAGE dělení proteinů viz **Obrázek 57**.

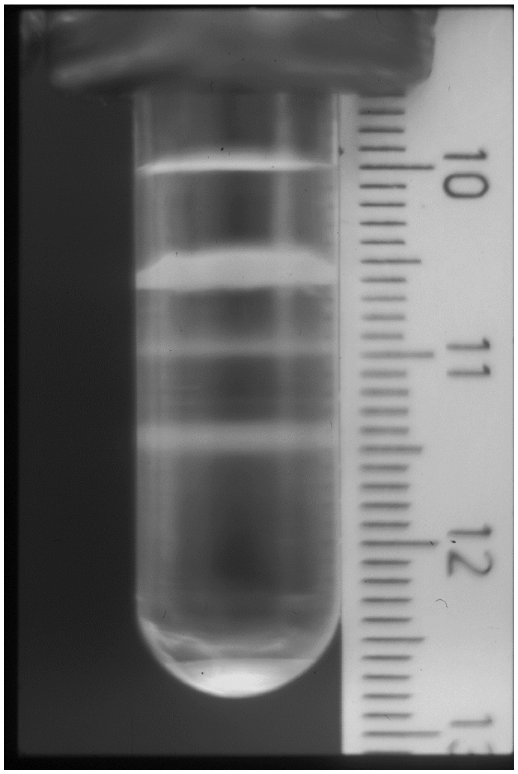


(c) Vzorek 4: Druhá izopyknická centrifugace frakce B11 z gradientu CsCl (viz **Obrázek 50**). Vzorek 4 obsahoval virovou dsRNA asociovanou s proteiny (a možná i virus), jeho dělení (zde) neprokázalo jasnou oblast obsahující virus. Virová RNA byla detekována v peletě (odpovídající obrázky agarózových/SDS–PAGE elektroforéz nejsou vyobrazeny).

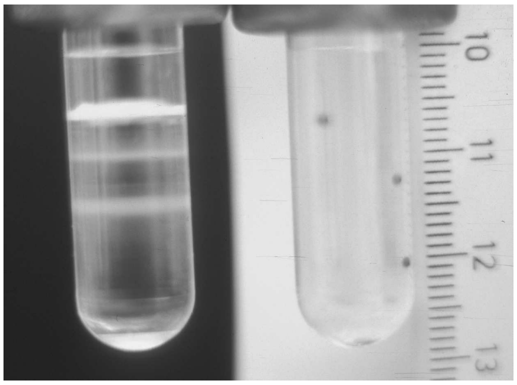


(d) Vzorek 5: Druhá izopyknická centrifugace frakce A9 z gradientu CsCl (viz **Obrázek 50**). Vzorek 5 obsahoval virovou dsRNA asociovanou s proteiny (a možná i virus), jeho dělení (zde) poskytlo několik frakcí s virem ve vznášivé hustotě pod nejníže viditelnou zónou (1,31–1,36 g/cm^3). Virus byl v oblasti hustot 1,4 g/cm^3 (odpovídající obrázky agarózových/SDS–PAGE elektroforéz nejsou vyobrazeny).

Obrázek 53: Vzorky 1, 2, 4, 5: Purifikace různě předčištěného dsRNA viru v gradientu CsCl v prostředí 1 mM EDTA. Na **Obrázcích 53(a), 53(b), 53(c), 53(d)** je navíc vedle přiloženého měřidla (nejmenší jednotky jsou milimetry) centrifugační zkumavka s identickým CsCl gradientem a s kuličkami se vznášivou hustotou 1,2, 1,3, 1,5 g/cm^3. Bližší vysvětlení je v textu. Fázové rozhraní olej/voda je v úrovni 10 cm. Srovnej s **Obrázkem 54**.

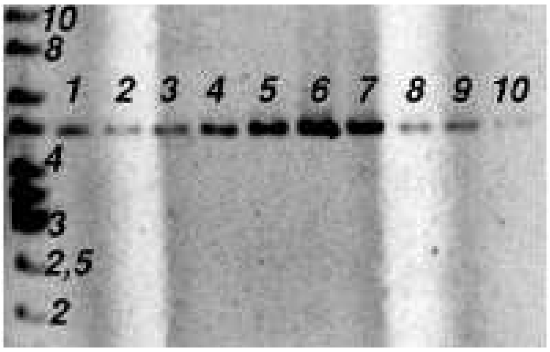


(b) Vzorek 6: Izopyknická centrifugace virových částic obsažených v supernatantu 20 000 g, viz **Obrázek 54(a)** (zvětšeno).

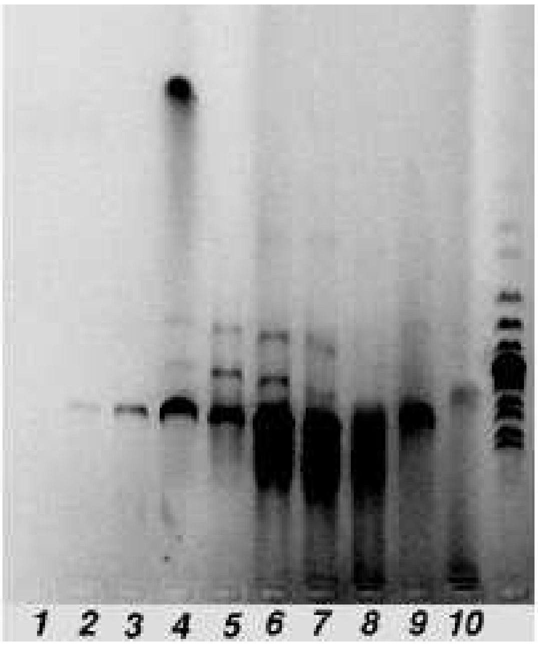


(a) Vzorek 6: Izopyknická centrifugace virových částic obsažených v supernatantu 20 000 g. Na obrázku je vidět 1. zóna v hustotě 1,15 g/cm^3, 2. zóna v hustotě 1,21 g/cm^3, 3. zóna v hustotě 1,285 g/cm^3 není vidět (asi ve vzdálenosti 11,25 cm přiloženého měřidla), 4. zóna obsahující virus v hustotě 1,34–1,30 g/cm^3 (na **Obrázku 54(b)** je zvětšený pohled). SDS–PAGE dělení proteinů je na **Obrázku 58**. Nukleové kyseliny obsažené v těchto frakcích jsou zachyceny na **Obrázku 56**.

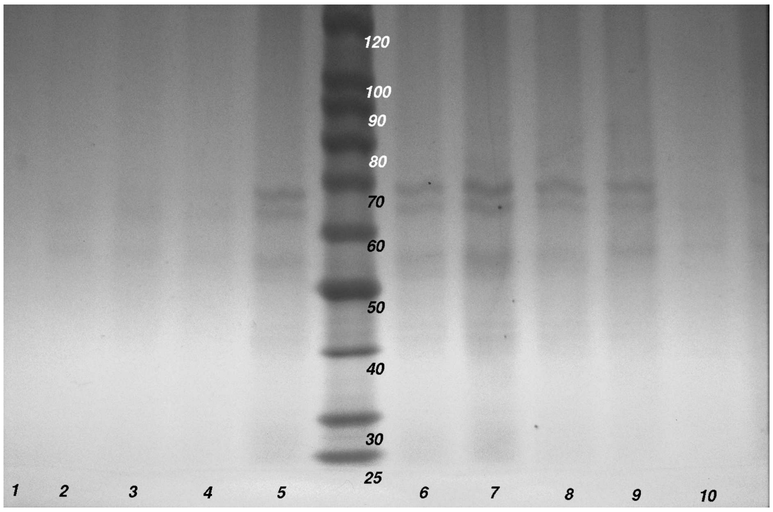
Obrázek 54: Vzorek 6: Purifikace dsRNA viru v gradientu CsCl v prostředí 1 mM EDTA ze supernatantu 20 000 g. Srovnej s **Obrázky 53(a), 53(b), 53(c), 53(d)**. Na přiloženém měřidle jsou nejmenšími jednotkami milimetry. Centrifugační zkumavka (vpravo na **Obrázku 54(a)**) obsahuje referenční CsCl gradient s kuličkami ve vznášivých hustotách 1,2, 1,3, 1,5 g/cm^3. Bližší vysvětlení je v textu. Fázové rozhraní olej/voda je v úrovni 10 cm.



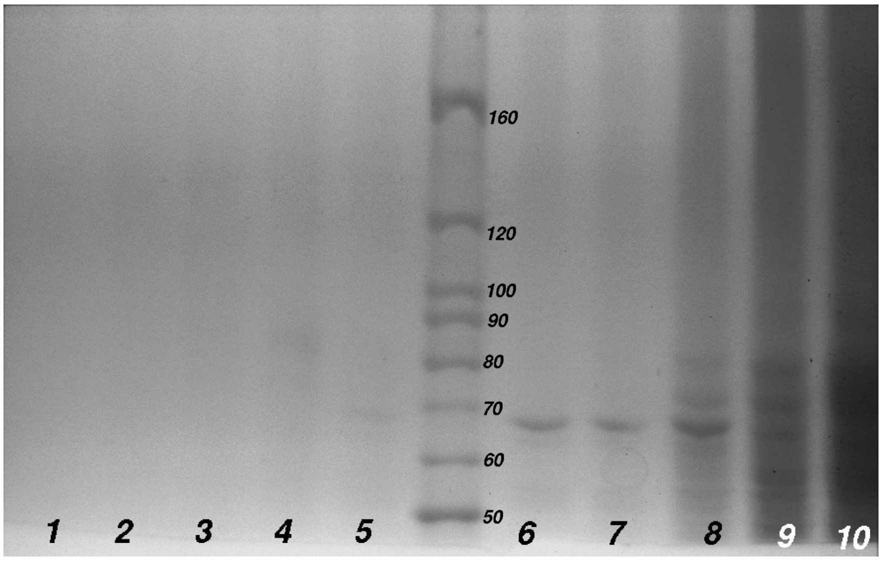
Obrázek 55: Vzorek 2: Agarózová elektroforéza vzorku 2. Jedná se centrifugovanou 11. frakci v prostředí CsCl/1 mM EDTA izolovanou z chromatografické kolonky, viz **Kapitola: 4.4.3**. Na gelu jsou zleva: frakce 10–1, 1 kb DNA ladder (viz legenda k **Obrázku: 46**). Maximum viru je ve frakci 6. **Obrázek 53(b)** zachycuje vzhled CsCl gradientu, ve kterém byla 11. frakce rozdělena. **Obrázek 57** zachycuje vzhled SDS–PAGE elektroforézy. Virové frakce obsahují virus asociovaný s jinými proteiny, než uvádí literatura (Nosek *et al.*, 1993). Čísla frakcí na jednotlivých obrázcích si navzájem odpovídají.



Obrázek 56: Vzorek 6: Agarózová elektroforéza vzorku 6 (frakcí získaných první centrifugací 20 000 g supernatantu obsahujícího virus v gradientu CsCl v prostředí 1 mM EDTA). Na obrázku jsou zleva: frakce 1–10, 1 kb DNA ladder (viz legenda k **Obrázku: 46**). Nejvíce 4,3 kbp dsRNA bylo ve frakcích 6–8. SDS–PAGE frakcí je na **Obrázku 58**, agarózová elektroforéza je na **Obrázku 56**. Celkový pohled na gradient je na **Obrázku 54(a)** a **54(b)**. Čísla frakcí na jednotlivých obrázcích si navzájem odpovídají.



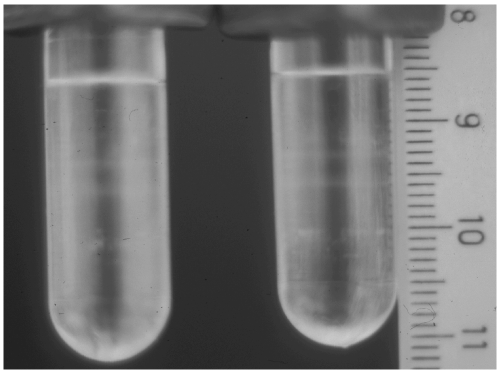
Obrázek 57: SDS–PAGE elektroforéza frakcí získaných centrifugací vzorku 2 (11. frakce eluované z chromatografické kolonky v prostředí 1 mM EDTA, viz **Kapitola: 4.4.3**). Na gelu jsou zleva vzorky: 1–5, standard (Gibco) (viz legenda k **Obrázku: 61**, zde na obrázku začíná od 25 kDa), dále frakce 6–10. Ve frakcích 6 a 7 jsou vidět majoritní proteiny o přibližných velikostech 52, 55, 64, 68 kDa. Maximum 4,3 kbp dsRNA bylo ve frakcích 6 a 7 (viz **Obrázek 55**). **Obrázek 53(b)** zachycuje vzhled CsCl gradientu, ve kterém byla 11. frakce rozdělena. Čísla frakcí na jednotlivých obrázcích si navzájem odpovídají.



Obrázek 58: SDS–PAGE elektroforéza frakcí získaných centrifugací vzorku 6 v gradientu CsCl v prostředí 1 mM EDTA (ve skutečnosti jednostupňová gradientová separace dsRNA viru z 20 000 g supernatantu). Na dráhy byly zleva nanášeny frakce: 1–5, standard (Gibco) (viz legenda k **Obrázku: 61**, zde na obrázku začíná od 50 kDa), dále frakce 6–10. 4,3 kbp byla obsažena ve frakcích 3–11, s maximem v 6.–8. **Obrázek 56** zachycuje rozložení nukleových kyselin v jednotlivých frakcích. Čísla frakcí na jednotlivých obrázcích si navzájem odpovídají.

Během postupující práce na purifikaci viru pomocí gradientu CsCl vyplynulo z výsledků s chromatografickou purifikací, že virus je dostatečně stabilní v prostředí 10 mM EDTA. Proto jsem přistoupil k purifikaci viru ze zmrazeného alikvótu z předchozí izolace viru (viz **Obrázek 54(a)**) uloženého v -20 °C (rozpuštěného v pufru s 1 mM EDTA). Rozmrazený lyzát samovolně sedimentoval a proto byl znovu předčištěn sedimentací při 20 000 g. Po následné peletaci viru při 200 000 g byla peleta rozpuštěna v VPB pufru s přídavkem CsCl (VPB pufr se zvýšenou, 10 mM EDTA). Celkem bylo děleno v gradientu CsCl 6 identických vzorků po 2 mL, všechny byly po izopyknické centrifugaci rozděleny do frakcí a ihned analyzovány na přítomnost dsRNA o velikosti 4,3 kbp (data nejsou zobrazena). Vzorky byly během té doby uchovávány při teplotě $+4$ °C.

Vybrané frakce obsahující virovou dsRNA o velikosti 4,3 kbp byly smíchány a relativně rovnoměrně rozděleny do 2 centrifugačních zkumavek a znovu centrifugovány v CsCl (opět v prostředí 10 mM EDTA). Výsledný gradient CsCl obsahoval 4 zóny: první zóna shora byla ve vznášivé hustotě 1,18 g/cm^3, druhá byla v hustotě 1,19 g/cm^3 (obě obsahovaly volný protein), třetí zóna ve vznášivé hustotě 1,23 g/cm^3 a čtvrtá ve vznášivé hustotě 1,40 g/cm^3 (viz **Obrázek 59, 60, 61**).

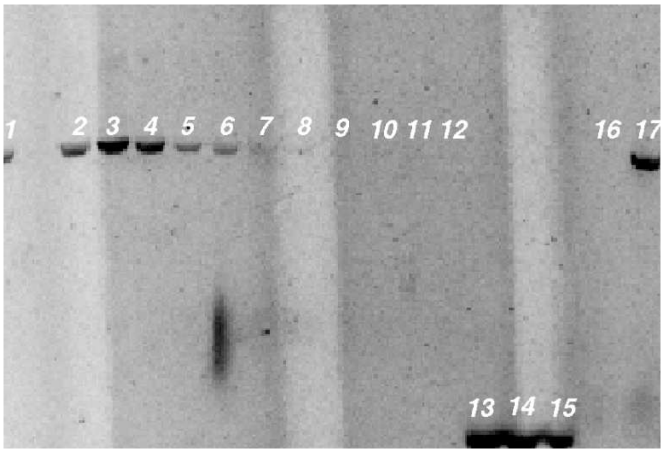


Obrázek 59: Dvojnásobná purifikace viru v pufru obsahujícím 10 mM EDTA. Virus byl purifikován z bunečného lyzátu obsaženého v pufru s 1 mM EDTA. Virus byl po peletaci převeden do stejného pufru s 10 mM EDTA a centrifugován v gradientu CsCl (není vyobrazeno). Nejlepší frakce obsahující virus byly smíseny a znovu centrifugovány ve stejném pufru s 10 mM EDTA. Výsledné rozdělení vzorku na 4 zóny je zobrazeno vedle měřítka (nejmenší zobrazené jednotky jsou milimetry). Byly pozorovány následující zóny (uvádím je shora) včetně jejich pozice podle měřidla: 1,18 g/cm^3 $\approx$ 9,2 cm, 1,21 g/cm^3 $\approx$ 9,35 cm, 1,24–1,27 g/cm^3 $\approx$ 9,5–9,6 cm, 1,40 g/cm^3 $\approx$ 10,5 cm. Virová 4,3 kbp dsRNA byla prokázána s maximem koncentrace v zóně se vznášivou hustotou 1,40 g/cm^3 (viz **Obrázek 60**). Srovnej s SDS–PAGE analýzou proteinů ve frakcích na **Obrázku 61**.

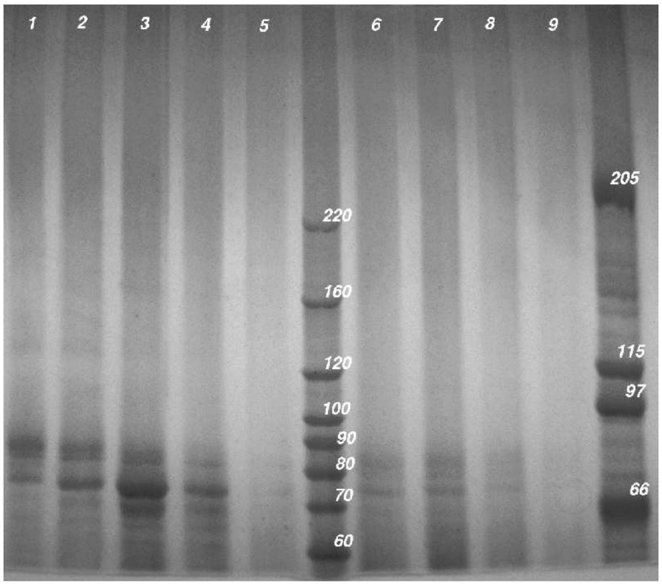
Ačkoli bylo použito několik různých postupů, nepodařilo se virus úplně purifikovat. Z **Obrázku 61** vyplývá, že ve virových frakcích je jako majoritní protein obsažen protein o velikosti $\approx$75 kDa. Hmotnost tohoto proteinu odpovídá nalezenému kapsidovému proteinu (Nosek *et al.*, 1993).

Z výsledků dále plyne, že virus je dostatečně stabilní v supernatantu buněčného lyzátu (20 000 g) zmrazeném při teplotě -20 °C a také v roztoku CsCl zmrazeném při teplotě -20 °C[3] .

[3]Dřívější výsledky například naznačují, že nedializované virové částice přímo z CsCl gradientu měly menší průměr, než tytéž částice po dialýze ve směsi VPB pufru (obsahujícím 1 mM EDTA) a 20 % glycerolu (Pospíšek *et al.*, 1994). dsRNA virus kvasinkovitého organizmu *D. magnusii* je na rozdíl od L-A viru *S. cerevisiae* nestabilní ve zmrazeném roztoku CsCl (Pospíšek, ústní sdělení).



Obrázek 60: Agarózová elektroforéza CsCl frakcí po dvojnásobné centrifugaci v pufru obsahujícím 10 mM EDTA (viz **Obrázek 59**). Zobrazené dráhy zleva odpovídají frakcím: **1**, prázdná dráha, **2, 3, 4, 5, 6, 7** (tučné písmo zdůrazňuje frakce s virem), 8–16, 17 (odpovídá peletě RNA), hmotnostní standard (hmotnosti zdola: 10, 8, 6, 5, 4, 3,5, 3, 2,5, 2, 1,5, 1, 0,75). Čísla frakcí na tomto gelu korespondují s čísly frakcí na SDS–PAGE gelu, viz **Obrázek 61**.

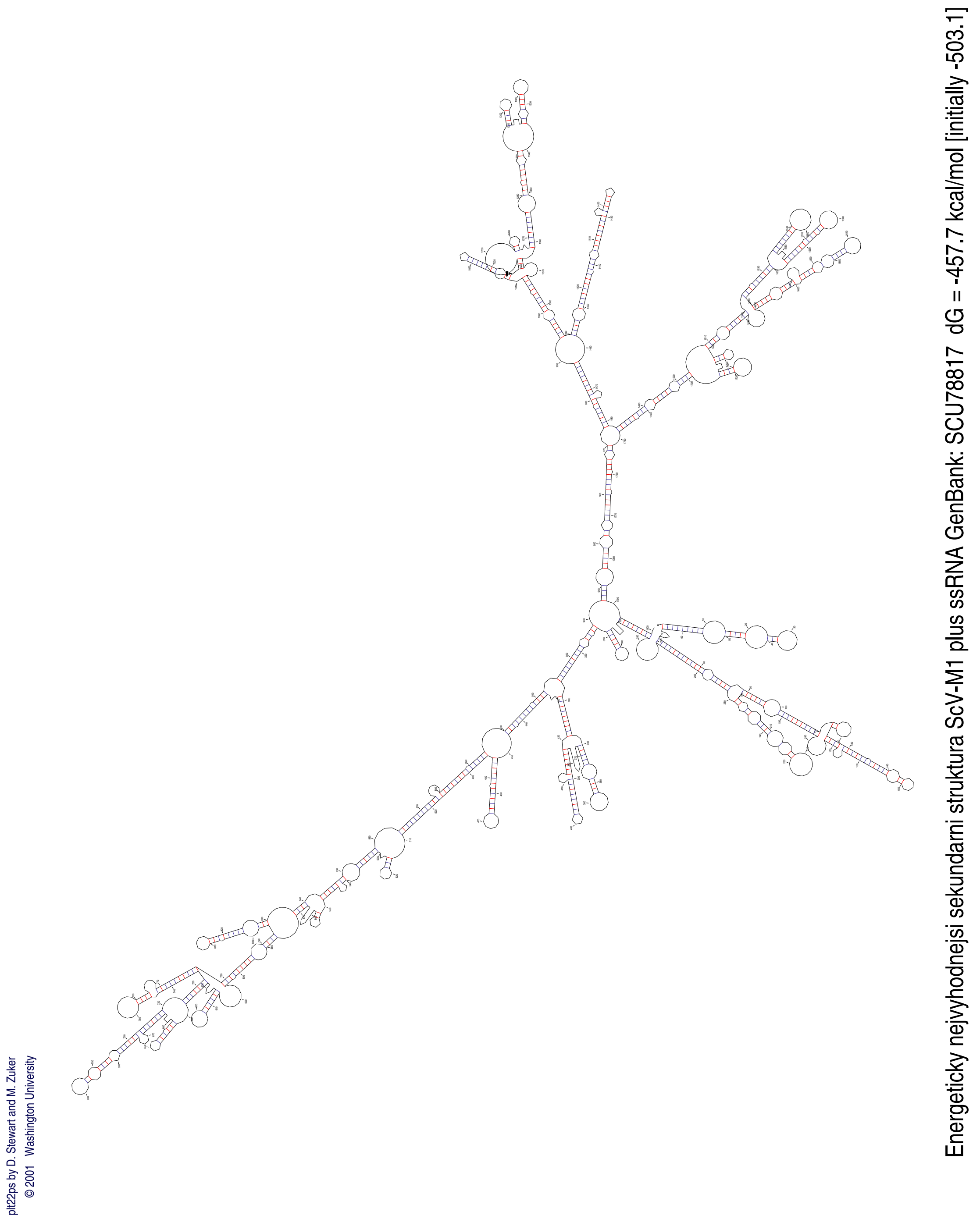


Obrázek 61: SDS-PAGE elektroforéza proteinů obsažených v CsCl frakcích po dvojnásobné centrifugaci v pufru obsahujícím 10 mM EDTA (viz **Obrázek 59**). Na gelu jsou zleva: dvě prázdné dráhy, dále umístěny vzorky **1, 2, 3, 4, 5**, hmotnostní standard (Gibco), **6, 7**, 8, 9, hmotnostní standard SDS-6H, dvě prázdné dráhy (frakce zvýrazněné tučným písmem obsahovaly 4,3 kbp dsRNA, viz **Obrázek 60**). Gel byl obarven Coomassie Brilliant Blue G–250 a dobarven stříbrem. Čísla frakcí korespondují s čísly frakcí na **Obrázku 60**. Ve frakcích 1–5 byla obsažena 4,3 kbp dsRNA s maximem ve 3. frakci (viz agarózová elektroforéza na **Obrázku 60**). Majoritní protein obsažený ve frakci 3 má hmotnost $\approx$75 kDa a odpovídá hmotnosti kapsidového proteinu publikovaného v literatuře (Nosek *et al.*, 1993). Standard Benchmark Protein ladder (Gibco) obsahuje proteiny o hmotnostech (shora): 220, 160, 120, 100, 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 25, 20, 15, 10 kDa (na obrázku jsou vidět zdola proteiny o hmotnosti 60–220). Molekulové hmotnosti proteinů ve standardu SDS-6H jsou vyznačeny v kDa.

4.6 Modelování sekundárních struktur dsRNA virů

Program Mfold verze 3.1 byl instalován na počítači s operačním systémem Linux (Intel Pentium III/450 MHz). K demonstračnímu výpočtu sekundární struktury M1 $(+)$ ssRNA byly použity standardní parametry programu.

```
totivirus> mfold
Usage is mfold SEQ='file_name' with optional parameters:
   [ AUX='auxfile_name' ] [ RUN_TYPE=text (default) or html ]
   [ NA=RNA (default) or DNA ] [ LC=sequence type (default = linear) ]
   [ T=temperature (default = 37°) ] [ P=percent (default = 5) ]
   [ NA_CONC=Na+ molar concentration (default = 1.0) ]
   [ MG_CONC=Mg++ molar concentration (default = 0.0) ]
   [ W=window parameter (default - set by sequence length) ]
   [ MAXBP=max base pair distance (default - no limit) ]
   [ MAX=maximum number of foldings to be computed (default 100) ]
   [ ANN=structure annotation type: none (default), p-num or ss-count ]
   [ MODE=structure display mode: auto (default), bases or lines ]
   [ LAB_FR=base numbering frequency ] [ ROT_ANG=structure rotation angle ]
   [ START=5' base # (default = 1)] [ STOP=3' base # (default = end) ]
   [ REUSE=NO/YES (default=NO) reuse existing .sav file ]
totivirus>
totivirus> mfold SEQ=SCU78817
totivirus>
```



Obrázek 62: Sekundární struktura ScV-M1 (+) ssRNA vypočtená pomocí programu mfold-3.1.

Kapitola 5

Diskuse

5.1 Mikrobiologická charakterizace používaného kmene *Dipodascus magnusii*

Produkce inhibitoru je závislá na způsobu kultivace, při kultivaci na reciproční třepačce je maximum aktivity inhibitoru v médiu během 3.–4. dne. Inhibitor je produkován do média zejména v pozdní, stacionární fázi růstu (viz **Tabulka 4**). Výsledky naznačují, ze inhibitor je vysoce stabilní molekula, což by mohlo zlepšit šance na jeho purifikaci. Podařilo se zlepšit podmínky pro produkci inhibitoru *D. magnusii* do média, které jsou uváděny v jediné dostupné práci zabývající se detekcí toxinu *D. magnusii* (Pospíšek *et al.*, 1994). Tato zlepšení zahrnují prodloužení kultivace buněk k zajištění vyšší aktivity inhibitoru v médiu, jiné kultivační teploty a jiná živná média.

5.2 Výběr vhodných kmenů *Hansenula* sp. citlivých na přítomnost inhibitoru

Zjistil jsem v souladu s předchozími výsledky, že nejcitlivější kmen *Pichia* resp. *Hansenula* sp. je *Pichia anomala* CCY38-1-1 vhodným citlivým kmenem k působení inhibitoru produkovaného *D. magnusii* do média.

5.3 Výběr vhodných testovacích postupů pro vyhledávání kmenů *D. magnusii* (ne)produkujících inhibitor

Z výsledků s optimalizací čárkového a komínkového testu vyplynulo, že při nižších teplotách rostou buňky *Pichia anomala* pomaleji. Zatímco při kultivační teplotě 28 °C má *P. anomala* generační dobu asi 54 minut, při teplotě 18 °C je to již 72 minut. Při kultivační teplotě pod 20 °C dochází k dalšímu zpomalení růstu buněk *P. anomala* (viz **Obrázek 30, 31**). Naopak, *Dipodascus magnusii* špatně roste nebo dokonce nepřežívá při vysokých teplotách. V teplotě 28 °C dosahují buňky generační doby 120 minut, v teplotě 30 °C je to již 287 minut (viz růstové křivky *Dipodascus magnusii* na **Obrázku 24, 25, 26**). Díky zpomalení růstu buněk citlivého kmene dosahuji zvýšení relativní koncentrace inhibitoru vůči počtu rostoucích buněk citlivého kmene (nebo zcitlivěním buněk vůči působení inhibitoru, viz dále). Předpokládám, že růst *Dipodascus magnusii* nebude tolik ovlivněn snížením kultivační teploty, protože musí mít teplotní optimum růstu položené nejvýše okolo 28 °C (viz **Obrázek 24, 25**). Navíc byl kvasinkovitý organizmus *Dipodascus magnusii* poprvé izolován z vyšších bazidiomycetů rostoucích v mírném klimatickém pásmu (Pospíšek, osobní sdělení). Určitého zvýšení koncentrace inhibitoru v médiu lze dosáhnout také inokulací většího množství biomasy *D. magnusii*. Ukázalo se, že ze známých faktorů je vliv teploty největším limitujícím faktorem růstu buněk *P. anomala* a že není nutné používat chudé růstové médium (jako je např. cibulový agar). Chudé živné médium je ale jednoznačně potřeba k udržení alespoň nějaké citlivosti čárkového (příp. také komínkového) testu při teplotách nad 20 °C. V laboratořích rutinně používané **YPDA médium proto plně vyhovuje požadavkům maximální citlivosti těchto testů a navíc svým zabarvením zvýrazňuje obrys inhibiční zóny** (za předpokladu kultivační teploty v rozsahu 15–18(příp. 20) °C). Nepřesnosti měření poloměrů/průměrů inhibičních zón lze sice snížit použitím posuvného měřiče používaného v technických oborech, ale nelze ovlivnit různě pokřivené tvary zón (zóny nemusí mít vždy kruhový průřez) a možná ani fakt, že okraje zón občas nejsou dostatečně zřetelné (viz **Obrázky 28, 29, 27(a), 27(b)**).

5.4 Test přítomnosti inhibitoru v médiu v mikrotitrační destičce

Z pokusů v mikrotitrační destičce v 28 °C (viz Obrázky **42, 43, 44**) vyplývá, že:

- Na rychle rostoucí buňky je inhibitor méně účinný, protože růstové rychlosti buněk inkubovaných v různých koncentracích postkultivačního média měly zhruba stejnou růstovou rychlost (viz **Obrázek 43**).
- Vzhledem k vyššímu nárůstu buněk v teplotě 28 °C než při teplotě 18 °C se domnívám, že postkultivační médium nelimituje růst kultury alespoň při kultivaci v 18 °C, kde dochází k nižšímu nárůstu vlivem teploty, včetně kontroly neobsahující inhibitor.

Z pokusů v mikrotitrační destičce v 18 °C (viz **Obrázky 35, 36, 37, 40, 41**) vyplývá, že:

- Zhruba v 50. hodině kultivace nastupuje kultura v jamkách obsahujících vysoké koncentrace inhibitoru ($>$ 60 %) do exponenciální fáze růstu.
- Okolo 72. hodiny kultivace jsou kultury v jamkách obsahujících vysoké koncentrace inhibitoru ($>$ 60 %) v exponenciální fázi růstu.
- Okolo 92. hodiny přechází buňky do stacionární fáze růstu.
- Průběh křivek je pozvolnější než při kultivační teplotě 28 °C a jednotlivé křivky reprezentující různé koncentrace jsou od sebe lépe separovány, což umožňuje lepší odečtení rozdílů optické denzity.

Z obou pokusů vyplývá, že růst buněk *P. anomala* je limitován koncentrací inhibitoru. Závislost začíná mít v pozdních měřeních růstu kultur téměř lineární průběh, v případě 18 °C již asi od 92. hodiny, s optimem kolem 200.–213. hodiny (viz **Obrázek 41**). V případě inhibovaného růstu ve 28 °C asi od 37. hodiny (průběh se do 213. hodiny dále nezlepšuje, viz **Obrázek 44**) [1] . Ke kvantifikaci inhibitoru

[1] Průběh růstu kultur v 18 a 28 °C byl sledován dále po 213. hodině. V obou teplotách kultury dosáhly maxima růstu nejpozději ve 213. hodině (poslední hodnota zobrazená ve všech grafech), dále již OD(660nm) jen velice pozvolna klesá dolů. Pořadí křivek v rozmezí koncentrací 0–2 % postkultivačního média, kde jsou křivky při kultivační teplotě 18 °C moc blízko sebe, neodpovídá koncentracím inhibitoru. Obdobně, při kultivační teplotě 28 °C v rozsahu 0–12 % jsou pořadí křivek přeskupena. Výsledné pořadí křivek v ostatních rozmezích koncentrací přesně odpovídá vzrůstající resp. klesající koncentraci inhibitoru. Pro kultury testované v rozsahu teplot 18 °C je naprosto dostačující/optimální časové rozpětí vyhodnocení pokusu 92–213 hodin. V případě 28 °C stačí 37–213 h. Měření v čase 466 hodin není na křivkách v žádném z vyobrazených grafů zaznamenáno.

v médiu lze použít obě uvedené teploty s dostatečnou přesností a průkazností. V časovém intervalu 68–92 h a kultivační teplotě 18 °C lze rozlišit koncentrace v rozsahu 92–44 %. V rozsahu 92–2 % to je možné až během 166–213 h. V případě inkubační teploty 28 °C lze kvantifikovat aktivitu toxinu již kolem 37. hodiny, ale jen v rozsahu 92–12 %, přičemž se citlivost v tomto rozsahu zvyšuje s narůstajícím časem kultivace, ale již se nerozšiřuje rozsah.

Popsaný systém umožňuje během 1(nejvýše 2) dnů v teplotě 18 °C jednoznačně prokázat přítomnost nebo nepřítomnost inhibitoru v médiu (v případě použití inokula asi 10^5–10^7 buněk/jamku) (viz **Obrázek 34, 32**, další data nejsou vyobrazena).

Výsledky jsou vysoce reproducibilní, je možné sestavit experiment v triplikátech koncentrací resp. kontrol v rámci jedné mikrotitrační destičky (96 jamek). Záření alespoň v rozsahu 600–660 nm nezpůsobuje změny v růstu buněk. Mikrotitrační destičky je nutno velmi důkladně třepat alespoň 3 minuty před každým měřením [2] . Odhaduji, že vyšší citlivosti testu lze dosáhnout jen snížením teploty až na 15 °C (srovnej s výsledky v **Kapitole: 4.3.2**) a za cenu prodloužení inkubačního času. Měření optických denzit je velmi snadné. Určité problémy způsobuje zamlžení víčka mikrotitrační destičky při teplotě 18 °C. Uspokojivých výsledků nebylo dosaženo centrifugací destiček těsně před měřením ve snaze sedimentovat drobné kapičky vody do jamek (z víčka sedimentují jen velké kapky). Přesto je nutné kvůli zachování konstantního objemu média v jamkách použít občasnou centrifugaci a pravidelně těsně před každým měřením vyměnit víčko za sterilní (stačí jedno rezervní na celý pokus) a s použitím tohoto víčka provést pouze vlastní měření. Vlivem nestejného prostředí v jamkách dochází u krajních 2 řad jamek k jejich ochlazování/oteplování (podle kultivační teploty *versus* pracovní) díky manipulaci s nimi. V těchto 2 řadách buněk dochází k menšímu mlžení víčka díky jasně patrnému proudu vzduchu (díky tomu dochází zejména při teplotě 28 °C k postupnému odpařování vody z média, které bylo zřejmé kolem 200. hodiny). Z uvedených důvodů doporučuji naplnit krajní 2 řady jamek sterilním médiem, aby bylo prostředí v destičce co nejlépe tepelně vyrovnané (tyto jamky nepoužívat k experimentu). V případě dlouhodobého experimentu vhodným způsobem zabránit odpařování.

Skutečně neovlivňuje inhibitor produkovaný D. magnusii růstové rychlosti buněk v exponenciální fázi růstu a jedná se vůbec o inhibitor? Ačkoli hodnoty růstových rychlostí nebyly pro jednotlivé exponenciální úseky křivek v **Obrázku 43** vypočteny, zdá se že kultury buněk rostoucí ve všech testovaných koncentracích postkultivačního média mají přibližně stejné růstové rychlosti. **Exponenciální fáze růstu kultur se zdá být nezávislá na koncentraci inhibitoru.** Křivky růstu buněčných kultur ve stejném pokusném schematu, akorát při teplotě 18 °C, vypadají velmi podobně s výjimkou křivky reprezentující kulturu v 93 %-ním postkultivačním médiu (viz graf na **Obrázku 40**). Překvapivě, lze tento odlišný průběh křivky reprezentující kulturu při kultivaci v teplotě 18 °C v 93 %-ním postkultivačním médiu vysvětlit také **zcitlivěním buněk** *P. anomala* **vůči působení inhibitoru** (aktivita inhibitoru není ovlivněna snížením teploty, viz experimenty optimalizací čárkového a komínkového testu v **Kapitole: 4.3**). Pokud by měly být buňky kultivované v různých koncentracích postkultivačního média stejně citlivé, pak by měly být také růstové rychlosti všech buněčných kultur v exponenciální fázi shodné stejně tak, jako je tomu v případě teploty 28 °C (viz graf na **Obrázku 43**). Podle průběhu křivek buňky kultivované v 93 %-ním (příp. také v 85 %-ním postkultivačním médiu, viz graf na **Obrázku 40**), nastupují jen do velmi krátké exponenciální fáze. Proto je zřejmé, že buňky jsou již v 72. hodině ovlivněny přítomností inhibitoru v médiu a rostou pomaleji. **Vliv teploty na zcitlivění testu byl také dokumentován během optimalizace čárkového a komínkového testu** (viz **Kapitola: 4.3**), ačkoli se zdálo, že se jedná hlavně o problém s malým množstvím inhibitoru produkovaného do média pomalu rostoucími buňkami

[2] V případě nedokonalého protřepání dochází u suspenzí s vysokou optickou denzitou ke snížení naměřené hodnoty (díky přítomnosti blanky na povrchu která odráží paprsek) a u nízce opticky denzních kultur dochází naopak k naměření vyšších hodnot, než kdyby byly dobře protřepány. Některé časové body, kdy nebyla destička dokonale protřepána, lze najít i v zobrazených grafech (např. viz **Obrázek 34**).

D. magnusii. Proto byla snížena kultivační teplota, omezující více rychlost růstu *P. anomala* než *D. magnusii*, což mohlo umožnit buňkám *D. magnusii* vyrůst a naprodukovat do média inhibitor.

V experimentu na **Obrázku 34** je zaznamenám průběh růstu různě inokulovaných kultur v 92 %-ním postkultivačním médiu. Ze vzdáleností mezi křivkou reprezentující růst kultury inokulované dávkou 2,4x10^5 buněk a kulturou inokulovanou 2,4x10^4 buněk se zdá, že k inhibici růstu buněk je nutná určitá koncentrace inhibitoru. Tento výsledek by mohl naznačovat, že v populaci buněk obsažených v kultuře mohou být některé zablokovány v dělení a pouze část buněk je schopna se nadále dělit.

Ačkoli tento systém nebyl testován pro jiné kombinace kvasinek a kmenů citlivých k jimi produkovanému toxinu (např. pro "killer" systém u *S. cerevisiae*), domnívám se, že je použitelný i v jiných případech. Test v mikrotitrační destičce byl použit již dříve, např. při studiu toxinu kódovaného plazmidy *Kluyveromyces lactis* (Burtler *et al.*, 1991), ačkoli se jednalo pouze o krátkodobé použití tohoto testu a samotné měření optických denzit nebylo prováděno v mikrotitrační destičce.

Aby bylo možné vyloučit podezření, že snížení celkového nárůstu buněk v postkultivačním médiu je dáno nedostatkem živin nebo přítomností odpadních látek po kultivaci *D. magnusii*, budou v budoucích experimentech použita různě naředěná postkultivační média (také čerstvým YPD) pro charakterizaci růstu nějakých kvasinek, které nejsou citlivé vůči inhibitoru produkovanému *D. magnusii*.

Aby bylo možné vyloučit možnost, že studovaný inhibitor je ve skutečnosti toxin, bude na základě schopnosti tvorby kolonií na YPDA médiu testována viabilita buněk *P. anomala*, které předtím byly vystaveny působení inhibitoru *D. magnusii*.

Další pokusy budou zaměřeny na studium vlivu inhibitoru na růst kultury, přidávaného do kultury v různých fázích růstu.

Metoda detekce inhibitoru v mikrotitrační destičcce umožňuje nejen detekovat a kvantifikovat inhibitor v médiu, ale dokonce studovat mechanizmus jeho účinku. Metoda byla publikována formou přednášky na konferenci Tomáškovy dny v Brně, viz Příloha.

5.5 Odléčování od dsRNA nebo produkce inhibitoru

Z počtu vyrostlých kolonií v **Tabulce 5** je vidět, že buňky nebyly přesně zpočítány v počítací komůrce, nebo byly počítány i buňky, které nebyly životaschopné. Odléčení pomocí UV iradiace nevedlo ke ztrátě produkce inhibitoru buňkami *D. magnusii*. V době provádění tohoto experimentu nebyla dostupná spolehlivá metoda detekce inhibitoru (provedeno čárkovým testem na OA miskách). Nelze tedy vyloučit možnost, že některé buňky byly zbaveny produkce inhibitoru, a že nebyly detekovány. S podobnými problémy jsem se potýkal i v případě odléčování pomocí 5–fluorouracilu. To byl důvod ke snaze vypracovat spolehlivější metodiku.

Na miskách s nízkým obsahem 5–fluorouracilu (1,5–20 μg/mL) měly kolonie velký průměr a nebylo možné je přesně zpočítat, proto má křivka na **Obrázku 45** v tomto rozsahu koncentrací malý spád. Velikost kolonií na miskách s vyšší koncentrací 5–fluorouracilu byla mnohem menší a přesnost počítání se zvýšila. Pozoroval jsem negativní vliv UV záření na toxicitu 5–fluorouracilu (data nejsou zobrazena). Proto jsem čerstvě nalité misky s 5–fluorouracilem chránil před UV zářením (viz **Kapitola: 3.3.3.2**). Ačkoli bylo analyzováno 1656 kmenů ze širokého rozmezí koncentrací, některé kolonie vykazovaly výraznou změnu morfologie nebo vzrůstu a 5–fluorouracil se měl preferenčně zabudovávat do RNA (a tím co nejvíce přímo ovlivnit replikaci a transkripci virové dsRNA), přesto se buňky *D. magnusii* nepodařilo odléčit minimálně od 4,3 kbp dsRNA (jejíž přítomnost byla spolehlivě detekována). Oba problémy s detekcí inhibitoru (resp. RNA nižších molekulových hmotností – 3,0, 1,8, 0,8 kbp) spočívají už jen teoreticky v tom, že je nutno prokázat **nepřítomnost určitého znaku**, což je obecně těžší než prokázat jeho přítomnost.

Vzhledem k předchozím neúspěšným pokusům zbavit *Dipodascus magnusii* dsRNA nebo produkce inhibitoru (kapitola 2.1.1.1.7) (Pospíšek *et al.*, 1994) a současným dalším neúspěchům se zdá, že to není možné. *Dipodascus magnusii* je vícejaderný organizmus (Adamíková *et al.*, 1998). Pokud by se jednalo o jaderně kódovaný inhibitor/toxin, bylo by téměř nemožné mutovat všechny alely současně. Zdá se, že dávky léčiv, kterými se podařilo vyléčit jiné kvasinky od dsRNA virů, jako jsou cykloheximid (Fink a Styles, 1972; Bevan *et al.*, 1973; Wingfield *et al.*, 1990; Wickner *et al.*, 1991; Schmitt a Tipper, 1992; Radler *et al.*, 1993), 5–fluorouracil (Mitchell *et al.*, 1973; Bevan *et al.*, 1973), ale také třeba zvýšená teplota (Wickner, 1974a; Sommer a Wickner, 1981, 1982a), jsou pro *Dipodascus magnusii* smrtelné (to může mít také souvislost s přítomností několika jader v buňce) nebo nejsou účinné [3] . Lepší vyhlídky v tomto směru ukazují inhibitory posunu ribozomální čtecí fáze (Dinman *et al.*, 1997), které by mohly ovlivnit translaci virové RNA (pokud se vůbec posun čtecí fáze v tomto případě uplatňuje, viz kap. 2.1.1.1.5). Inhibitor anisomycin jsem sice zkoušel použít, ale v kombinaci se zvýšenou teplotou a proto žádné buňky nepřežily. navíc se v poslední době ukázalo, že ani v případě ScV-L-A nemusí vést působení látek modulujících -1 posun ribozomální čtecí fáze ke ztrátě viru z buňky (Pospíšek, osobní sdělení).

Ačkoli není známo nic ze sekvence dsRNA viru ani není úplně vyčištěn produkovaný inhibitor, některé nejnovější výsledky naznačují, že inhibitor je vysoce stabilní vysokomolekulární látka odolná vůči krátkodobému zvýšení teploty a vůči změnám pH (Pospíšek a Zikánová, ústní sdělení).

5.6 Izolace a charakterizace viru

5.6.1 Mrazová izolace viru s následnou centrifugací v izopyknickém gradientu CsCl

Ačkoli jsem mrazovou izolaci několikrát opakoval s použitím různých vzorků a odlišných podmínek, výsledky nejsou jednoznačné. Centrifugace vzorků v CsCl gradientu v rotoru Beckman NVT90 nevedla k očekávanému výsledku, protože volné proteiny vytváří ve vznášivé hustotě asi 1,2 g/cm^3 tlakem upěchovanou hmotu, která po převrácení gradientu během brzdění centrifugy rozmyje gradient a pravděpodobně ho kontaminuje uvolněnými molekulami proteinů. Lepších výsledků jsem dosáhl centrifugací ve výkyvném rotoru.

Analýza dvou vzorků odebraných z gradientu ve vznášivé hustotě 1,22 g/cm^3 prokázala (viz vzorky 4 a 5 (původem frakce A9 a B11) na **Obrázku 53(c), 53(d)**), že v podmínkách 1 mM EDTA nedochází k dostatečnému oddělení virových částic od buněčných proteinů, patrně zejména ribozómů. Pravděpodobně vlivem toho dochází k nekovalentní asociaci virových partikulí s buněčnými proteiny a výsledné izolaci virových částic z oblastí gradientu, kde se volný virus nenachází. Opětovnou gradientovou těchto frakcí se ukázalo, že virus v nich obsažený byl intaktní a že se po uvolnění z komplexů koncentroval v oblastech okolo 1,4 g/cm^3 (která odpovídá vznášivé hustotě totivirů). Tímto bylo vysvětleno, proč je virová dsRNA nacházena v tak širokém rozmezí vznášivých hustot, včetně hustot blízkých vznášivé hustotě volného proteinu (viz **Obrázky 53(c), 53(d)**).

Pomocí dvojnásobné gradientové centrifugace v pufru s 10 mM EDTA bylo dosaženo mnohem lepších výsledků dělení (viz **Obrázek 59**). Nicméně, analýza proteinů obsažených ve frakcích s virem ukázala, že se patrně nejedná o absolutně čistý virus (viz **Obrázky 60, 61**). Hlavní majoritní protein obsažených ve virových frakcích měl hmotnost asi 75 kDa (viz **Obrázek 61**) (toto zjištění je v souladu s publikovanou hodnotou v práci Nosek *et al.*, 1993).

Z celkových 5 purifikací viru pomocí CsCl gradientu, kdy byly v některých případech frakce obsahující virus centrifugovány v CsCl podruhé, kdy byly testovány dvě rozdílné koncentrace EDTA

[3] Adamíková *et al.* (1998) rovněž zmiňuje, že *D. magnusii* špatně roste při teplotách nad 30 °C a nepřežívá teploty nad 35 °C.

v používaném pufru a kdy byl použit částečně purifikovaný virus pomocí chromatografie vyplývá, že s virem se asociuje mnoho pravděpodobných buněčných proteinů a jsou s ním také kopurifikovány. Ačkoli gradientová centrifugace viru purifikovaného chromatografií poskytla frakce obsahující virus a jen asi dobře detekovatelné 4 proteiny (viz **Obrázek 57**), stále není jasné, zda jsou tyto všechny proteiny virové, protože jejich hmotnosti vůbec neodpovídají hmotnosti jediného majoritního proteinu (Nosek *et al.*, 1993) ani výsledkům s dvojnásobnou centrifugací v gradientu CsCl (viz výše). Toto zjištění je překvapivé, protože dvojnásobná purifikace viru v gradientu CsCl vede k nějaké purifikaci viru a přítomnosti proteinu o velikosti 75 kDa, korespondujícího s literaturou. Rovněž eluované frakce z chromatografické kolonky obsahují tento 75 kDa velký protein jako majoritní (viz dále a **Obrázek 47(a), 47(b)**).

5.6.2 Chromatografická separace virových částic

Vzhledem k přítomnosti většího množství dsRNA ve frakcích 7, 8 a zároveň druhého maxima ve frakcích 11 a 12 (viz **Obrázek 46**) se zdá, že se na kolonce dělí dsRNA a virové částice nebo agregáty virových částic a samotné částice (viz **Obrázek 46**). Protože ale následná purifikace 7. frakce z kolony v gradientu CsCl neposkytla žádnou frakci obsahující 4,3 kbp dsRNA, jedná se pravděpodobně v 7. frakci o volnou dsRNA případně jednořetězcovou formu, která by mohla být ještě snadněji degradována (viz **Obrázek 53(a)**). Naopak 11. frakce prokazatelně obsahuje virus (viz **Obrázek 53(b)**). Následná purifikace této 11. frakce v gradientu CsCl ale vedla k získání frakcí viru, které obsahovaly jiné proteiny, než které se kopurifikují s virem při dvojnásobné purifikaci v CsCl (tedy neobsahovala předpokládaný kapsidový protein o velikosti 75 kDa) (Nosek *et al.*, 1993). Jedinou snadnou odpovědí by bylo, že ani samotná chromatografická purifikace ani samotná (byť dvojnásobná) gradientová centrifugace nevedou k dostatečně purifikovanému viru, ale dokonce vedou k získání viru asociovaného s proteinem o hmotnosti 75 kDa. Tyto frakce získané samotnou chromatografií nebo dvojnásobnou purifikací v gradientu CsCl obsahovaly, byť v menší míře, i další proteiny. Není jisté, zda se jedná právě o proteiny kopurifikované s virem pomocí sytému chromatografie+CsCl. V budoucnu bude věnována pozornost jiným způsobům purifikace viru tak, aby bylo možné tyto různé postupy vzájemně zkombinovat a použít je k sériové vícestupňové purifikaci viru. Už samotné použití CsCl purifikace viru po předchozím čištění chromatografií ukazuje dramatické změny v čistotě výsledných virových frakcí (srovnej **Obrázky 53(b) a 54(a), 59**).

5.7 Modelování sekundárních struktur dsRNA virů

Program Mfold verze 3.0 byl instalován na počítači s operačním systémem Linux. Předchozí verze programu jsem použil k ověření známých sekundárních struktur ScV-L-A, X a M1 dsRNA ve své seminární práci.

Kapitola 6

Závěr

- Byly stanoveny růstové křivky kvasinkovitého organizmu *Dipodascus magnusii* v teplotách 28 a 30 °C a růstové křivky kvasinky *Pichia anomala* v teplotách 18 a 28 °C. Byla stanovena křivka hynutí buněk *Dipodascus magnusii* při teplotě 35 °C.

- Byly stanoveny změny aktivity inhibitoru produkovaného kvasinkovitým organizmem *D. magnusii* do média v čase. Maximální aktivita inhibitoru v médiu je okolo 91. hodiny kultivace. Byla prokázána vysoká dlouhodobá stabilita tohoto inhibitoru v různých podmínkách skladování.

- Byl nalezen nejcitlivější sbírkový kmen vhodný pro stanovení aktivity inhibitoru.

- Byly definovány optimální podmínky pro provedení čárkových a komínkových testů s maximální citlivostí. Byl charakterizován lineární rozsah citlivosti komínkového testu při různých ředěních inhibitoru (obsaženého v postkultivačním médiu *D. magnusii*). Byla zhodnocena reprodukovatelnost obou testů.

- Byly testovány a srovnávány různé metody detekce inhibitoru produkovaného buňkami *D. magnusii* do média. Nejcitlivější byla metoda stanovení inhibitoru v mikrotitrační destičce, která byla v této práci vyvinuta a optimalizována. Pokud jsou buňky citlivého kmene ponechány dorůst až do stacionární fáze, je dosaženo lineární závislosti a maximální citlivosti. Test je citlivější v kultivační teplotě 18 °C než v kultivační teplotě 28 °C. Lze detekovat a kvantifikovat ředění postkultivačního média *D. magnusii* v rozsahu 92–2 %. Metoda umožnuje nejen prokázat spolehlivě přítomnost inhibitoru v kultivačním médiu a kvantifikovat jeho aktivitu, ale také umožňuje studovat mechanizmus jeho účinků na buňky.

- Pokusil jsem se zbavit buňky *D. magnusii* dsRNA viru nebo produkce inhibitoru (případně obou znaků současně) pomocí ozáření UV světlem, ošetření 5–fluorouracilem, anisomycinem a teplotním šokem. Byla izolována a analyzována dsRNA ze 1656 nezávislých kmenů pomocí horizontální agarózové elektroforézy. Zhruba 1700 kmenů bylo testováno na produkci inhibitoru (některé opakovaně). Buňky *D. magnusii* se nepodařilo zbavit žádného z těchto znaků.

- Dvojnásobnou purifikací v gradientu CsCl v pufru obsahujícím 10x zvýšenou koncentrací EDTA se podařilo částečně purifikovat virus. Majoritní protein o velikosti 75 kDa odpovídá hodnotě uváděné v literatuře. Alternativní chromatografickou separací se ale podařilo částečně purifikovat virus, asociovaný s majoritním proteinem o velikosti asi 67 kDa. Je zřejmé, že s virem se kopurifikuje velké množství proteinů, které ztěžují jeho absolutní purifikaci.

- Metoda stanovení aktivity inhibitoru v mikrotitrační destičce vyvinutá v průběhu mé diplomové práce byla přednesena na konferenci Tomáškovy dny v Brně.

Kapitola 7

Seznam použité literatury

Abel P.P., Nelson R.S., De B., Hoffmann N., Rogers S.G., Fraley R.T., Beachy R.N. (1986) Delay of disease developments in transgenic plants that express the tobacco mosaic virus coat protein gene. Science 232, 738-743

Adamíková L., Griač P., Tomáška L., Nosek J. (1998) Development of a transformation system for the multilinear yeast *Dipodascus* (*Endomyces*) *magnusii*. Yeast 14, 805-812

Agabian N. (1990) *trans*–splicing of nuclear pre–mRNAs. Cell 61, 1157-1160

Arnold R.J., Polevoda B., Reilly J.P., Sherman F. (1999) The action of N–terminal acetyltransferases on yeast ribosomal proteins. J. Biol. Chem. 274, 37035-37040

Atkins J.F., Weiss R.B., Thompson S., Gesteland R.F. (1991) Towards a genetic dissection of the basis of triplet decoding, and its natural subversion: programmed reading frame shifts and hops. Annu. Rev. Genet. 25, 201-228

Ausubel F.M., Brent R., Kingston R.E., Moore D.D., Seidman J.G., Smith J.A., Struhl K. (1998) Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York

Ball S.G., Tirtiaux C., Wickner R.B. (1984) Genetic control of L-A and L-BC dsRNA copy number in killer systems of Saccharomyces cerevisiae. Genetics 107, 199-217

Banks G.T., Buck K.W., Chain E.B., Darbyshire J.E., Himmelweit F. (1969a) Virus-like particles in penicillin producing strains of *Penicillium chrysogenum*. Nature 221, 89-90

Banks G.T., Buck A.W., Chain E.B., Darbyshire J.E., Himmelweit F. (1969b) *Penicillium cyaneo-fulvum* virus and interferon stimulation. Nature 223, 155-158

Banks G.T., Buck K.W., Chain E.B., Darbyshire J.E., Himmelweit F., Ratti G., Sharpe T.J., Planterose D.N. (1970) Antiviral activity of double stranded RNA from a virus isolated from *Aspergillus foetidus*. Nature Biol. 227, 505-507

Barroso G., Labarere J. (1990) Evidence for viral and naked double-stranded RNAs in the basidio-mycete *Agrocybe aegerita*. Curr. Genet. 18, 231-237

Barroso G., Labarere J. (1990) Transcription of naked double-stranded RNA molecules in a fraction containing large vesicles plus mitochondria from basidiomycete *Agrocybe aegerita*. J. Gen. Microbiol. 139, 287-293

Barton A.B., Kaback D.B. (1994) Molecular-cloning of chromosome-I DNA from *Saccharomyces cerevisiae* – analysis of the genes in the FUN38–MAK16–SP07 region. J. Bacteriol. 176, 1872-1880

Batten J.S., Scholthof K.-B.G., Miller M.E., Martyn R.D. (2000) cDNA probes for detection of specific dsRNAs from the fungal pathogen, *Monosporascus cannoballus*. J. Virol. Met. 84, 209-215

Beckett D., Wu H.N., Uhlenbeck O.C. (1988) Roles of operator and non-operator RNA sequences in bacteriophage R17 capsid assembly. J. Mol. Biol. 204, 939-947

Bell J. C., Prevec L. (1985) Phosphorylation sites on phosphoprotein NS of vesicular stomatitis virus. J. Virol. 54, 697-702

Benard L., Carroll K., Valle R., Masison D.C., Wickner R.B. (1999) The Ski7 antiviral protein is an EF1-alpha homolog that blocks expression of non-poly(A) mRNA in Saccharomyces cerevisiae. J. Virol. 73, 2893-2900

Benard L., Carroll K., Valle R., Wickner R.B. (1998) Ski6p is a homolog of RNA-processing enzymes that affects translation of non-poly(A) mRNAs and 60S ribosomal subunit biogenesis. Mol. Cell. Biol. 18, 2688-2900

Berry E.A., Bevan E.A. (1972) A new species of double-stranded RNA from yeast. Nature New Biol. 239, 279-280

Bessarab I.N., Liu H.-W., Ip C.-F., Tai J.-H. (2000) The complete cDNA sequence of a type II *Trichomonas vaginalis* virus. Virology 267, 350-359

Bevan E.A., Herring A.J., Mitchell D.J. (1973) Preliminary characterization of two species of dsRNA in yeast and their relationship to the killer character. Nature 245, 81-86

Bevan E.A., Makower M. (1963) The physiological basis of the killer character in yeast. *In* Proc. XI^{t}h Int. Congr. Genet., vol. 1, Pergamon Press, The Netherlands, p. 202

Bishop D.H.L., Gay M.E., Matsuoko Y. (1983) Nonviral heterogenous sequences are present at the 5' ends of one species of snowshoe hare bunyavirus S compementary RNA. Nucl. Acids Res. 11, 6409-6418

Bjorn S.P., Soltyk A., Beggs J.D., Friesen J.D. (1989) *PRP4*(*RNA4*) from Saccharomyces cerevisiae: its gene product is associated with the U4/U6 small nuclear ribonucleoprotein particle. Mol. Cell. Biol. 9, 3698-3709

Blanc A., Goyer C., Sonenberg N. (1992) The coat protein of teh yeast double-stranded RNA virus L-A attaches covalently to the cap structure of eukaryotic mRNA. Mol. Cell. Biol. 12, 3390-3398

Blanc A., Ribas J.C., Wickner R.B., Sonenberg N. (1994) 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 essesntial for M1 satellite virus expression. Mol. Cell. Biol. 14, 2664-2674

Boone C., Bussey H., Greene D., Thomas D.Y., Vernet T. (1986) Yeast killer toxin: site-directed mutations implicate the precursor protein as the immunity component. Cell 46, 105-113

Boone C., Sommer S.S., Hensel A., Bussey H. (1990) Yeast *KRE* genes provide evidence for a pathway of cell wall β–glucan assembly. J. Cell Biol. 110, 1883-1843

Bostian K.A., Hopper J.E., Rogers D.T., Tipper D.J. (1980a) Translational analysis of the killer-associated virus-like particle dsRNA genome of Saccharomyces cerevisiae: M dsRNA encodes toxin. Cell 19, 403-414

Bostian K.A., Sturgeon J.A., Tipper D.J. (1980b) Encapsidation of yeast killer double-stranded ribonucleic acids: dependence of M on L. J. Bacteriol. 143, 463-470

Bostian K.A., Burn V.E., Jayachandran S., Tipper D.J. (1983a) Yeast killer dsRNA plasmids are transcribed *in vivo* to produce full and partial-length plus-stranded RNAs. Nucleic Acids Res. 11, 1077-1097

Bostian K.A., Jaychandran S., Tipper D.J. (1983b) A glycosylated protoxin in killer yeast: models for its structure and maturation. Cell 32, 169-180

Bostian K.A., Elliot Q., Bussey H., Burn V., Smith A., Tipper D.J. (1984) Sequence of the preprotoxin dsRNA gene of type I killer yeast: multiple processing events produce a two–component toxin. Cell 36, 741-751

Bouloy M., Plotch S.J., Krug R.M. (1978) Globin mRNAs are primers for the transcription of influenza viral RNA in vitro. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 4886-4890

Bourbonnais Y., Danahoff A., Thomas D.Y., Shields D. (1991) Heterologous expression of peptide hormone precursors in the yeast Saccharomyces cerevisiae. Evidence for a novel prohormone endoprotease with specificity for monobasic amino acids. J. Biol. Chem. 266, 13203-13209

Bozarth R.F., Koltin Y., Weissman M.B., Parker R.L., Dalton R.E., Steinlauf R. (1981) The molecular weight and packaging of dsRNAs in the mycovirus from Ustilago maydis killer strains. Virology 113, 492-502

Braun C.J., Hemenway C.L. (1992) Expression of amino–terminal protions or full–length viral replicase genes in transgenic plant confers resistance to potato virus X infection. Plant Cell 4, 735-744

Brennan V.E., Field L., Cidziel P., Bruenn J.A. (1981) Sequences at the 3' ends of yeast viral dsRNAs: proposed transcriptase and replicase initiation sites. Nucleic Acids Res. 9, 4007-4021

Brierley I., Dingard P., Inglis S.C. (1989) Characterization of an efficient coronavirus ribosomal frameshifting signal: requirement for an RNA pseudoknot. Cell 57, 537-547

Brierley I., Rolley N.J., Jenner A.J., Inglis S.C. (1991) Mutational analysis of the RNA pseudoknot component of a coronavirus ribosomal frameshifting signal. J. Mol. Biol. 220, 889-902

Brown J.L., Bussey H. (1993) The yeast *KRE9* gene encodes an O–glycoprotein involved in cell surface β–glucan assembly. Mol. Cell. Biol. 13, 6346-6356

Brown J.L., Kossaczka Z., Jiang B., Bussey H. (1993) A!mutational analysis of killer toxin resistance in *Saccharomyces cerevisiae* identifies new genes involved in cell wall 1→6–β–glucan synthesis. Genetics 133, 837-849

Brown J.L., Roemer T., Lussier M., Sdicu A.-M., Bussey H. (1994) The K1 killer toxin: molecular and genetic applications to secretion and cell surface assembly. *In* Molecular genetics of yeast: a practical approach (Johnston J.R., ed.), IRL Press, Oxford University Press, Oxford, pp. 217-232

Brown J.T., Xinxue B., Johnson A.W. (2000) The yeast antiviral proteins Ski2p, Ski3p, and Ski8p exist as a complex in vivo. RNA 6, 449-457

Bruenn J.A., Kane W. (1978) Relatedness of the double-stranded RNAs present in yeast virus-like particles. J. Virol. 26, 762-772

Bruenn J.A. (1980) Virus-like particle of yeast. Ann. Rev. Microbiol. 34, 49-68

Bruenn J.A. (1986) *In* Fungal Virology (Buck K.W., ed.), CRC Press, Boca Raton, Florida, pp. 85-108

Bruenn J.A. (1983) A closely related group of RNA-dependent RNA polymerases from double-stranded RNA viruses. Nucleic Acids Res. 21, 5667-5669

Bruenn J.A., Brennan V.E. (1980) Yeast viral double-stranded RNAs have heterogenous 3' termini. Cell 19, 923-933

Bruenn J., Kane W. (1978) Relatedness of the double-stranded RNAs present in yeast virus-like particles. J. Virol. 26, 762-772

Bruenn J.A, Nemeroff M.E., Lee M., Pietras D.F., Dowhanick J.J., Field L.J. (1988) Structure, transcription and replication of killer virus dsRNAs. *In* Viruses of funghi and simple eukaryotes (Koltin Y., Leibowitz M.J., eds.), Marcel Dekker, New York-Basel, 117-132

Buck K. (1975) Replication of double–stranded RNA in particles of *Penicillium stoloniferum* virus S. Nucleic Acids res. 2, 1889-1902

Buck K.W., Girvan R.F. (1977) Comparison of the biophysical and biochemical properties of *Penicillium cyaneo-fulvum* virus and *Penicillium chrysogenum* virus. J. Gen. Virol. 34, 145-154

Buck K.W., Ratti G. (1975) Biophysical and biochemical properties of two viruses isolated from *Aspergillus foetidus*. J. Gen. Virol. 27, 211-224

Buck K.W., Ratti G. (1977) Molecular weight of double-stranded RNA: a reexamination of *Aspergillus foetidus* virus S RNA components. J. Gen. Virol. 37, 215-219

Burroughs J.N., Grimes J.M., Mertens P.P.C., Stuart D.I. (1995) Crystallization and preliminary X–ray analysis of the core particle of Bluetongue virus. Virology 210, 217-220

Burtler A.R., White J.H., Stark M.J.R. (1991) Analysis of the response of *Saccharomyces cerevisiae* cells to *Kluyveromyces lactis* toxin. J. Gen. Microbiol. 137, 1749-1757

Bussey H. (1981) Physiology of killer factor in yeast. Adv. Microb. Phys. 22, 93-121

Bussey H. (1988) Proteases and the processing of precursors to secreted proteins in yeast. Yeast 4, 17-26

Bussey H., Saville D., Greene D., Tipper D.J., Bostian K.A. (1983) Secretion of *Saccharomyces cerevisiae* killer toxin: processing of the glycosylated precursor. Mol. Cell. Biol. 3, 1362-1370

Bussey H., Saville D., Hutchins K., Palfree R.G.E. (1979) Binding of yeast killer toxin to a cell wall receptor of sensitive *Saccharomyces cerevisiae*. J. Bacteriol. 140, 888-892

Bussey H., Boone C., Zhu H., Vernett T., Whiteway M., Thomas D.Y. (1990) Genetic and molecular approaches to synthesis and action of the yeast killer toxin. Experientia 46, 193-200

Bussey H. (1991) K1 killer toxin, a pore–forming protein from yeast. Mol. Microbiol. 5, 2339-2343

Bussey H., Boone C., Brown J., Cooper A., Hill K., Roemer T., Sdicu A.M., Zhu H. (1994) Molecular genetics and applications to biotechnology and medicine. *In* Viruses of simple eukaryotes (Leibowitz M.J., Koltin Y., Rubio V., eds.). The University of Delaware Press, Newark, Delaware

Cabib E., Kang M.S. (1987) Fungal 1,3–β–glucan synthase. Methods Enzymol. 138, 637-642

Cadd T.L., Patterson J.L. (1994) Synthesis of viruslike particles by expression of the putative capsid protein of *Leishmania* RNA virus in a recombinant baculovirus expression system. J. Virol. 68, 358-365

Cansado J., Velázquez J.B., Siero C., Gacto M., Villa T.G. (1999) Presence of non-supressive, M2-related dsRNAs molecules in *Saccharomyces cerevisiae* strains isolated from spontaneous fermentations. FEMS Microbiol. Lett. 181, 211-215

Carpousis A.J., Vanzo N.F., Raynal L.C. (1999) mRNA degradation. A tale of poly(A) and multi-protein machines. Trends Genet. 15, 24-28

Carrol K., Wickner R.B. (1995) Translation and M1 dsRNA propagation: *MAK18 = RPL41B* and cykloheximide curing. J. Bacteriol. 177, 2887-2891

Castillo A., Cifuentes V. (1994) Presence of double-stranded RNA and virus-like particles in *Phaffia rhodozyma*. Curr. Genet. 26, 364-368

Castón J.R., Trus B.L., Booy F.P., Wickner R.B., Wall J.S. (1997) Structure of L-A virus: A specialized compartment for the transcription and replication of double-stranded RNA. J. Cell Biol. 138, 975-985

Cleveland D.R., Zarbl H., Millward S. (1986) Reovirus guanylyltransferase is L2 gene product lambda 2. J. Virol. 60, 307-311

Coburn G.A., Mackie G.A. (1999) Degradation of mRNA in *Escherichia coli*: An old problem with some new twists. Prog. Nucleic Acid. Res. Mol. Biol. 62, 55-108

Cohn M.S., Tabor C.W., Tabor H. (1978a) Isolation and characterization of *Saccharomyces cerevisiae* mutants deficient in S-adenosylmethionine decarboxylase, spermidine and spermine. J. Bacteriol. 134, 208-213

Cohn M.S., Tabor C.W., Tabor H., Wickner R.B. (1978b) Spermidine or spermine requirement for killer double-stranded RNA plasmid replication in yeast. J. Biol. Chem. 253, 5225-5227

Cole T.E, Hong Y., Brasier C.M., Buck K.W. (2000) Detection of an RNA-dependent RNA polymerase in mitochondria from a mitovirus-infected isolate of the Dutch Elm disease fungus, *Ophiostoma novo-ulmi*. Virology 268, 239-243

Coligan J.E., Dunn B.M., Ploegh H.L., Speicher D.W., Wingfield P.T. (1998) Current protocols in protein science. John Wiley & Sons, New York

Comay E., Nussinov R., Comay O. (1984) An accelerated algorithm for calculating secondary structure of single stranded RNA. Nucleic Acids Res. 12, 53-66

Compel P., Papp I., Bibó M., Fekete C., Hornok L. (1998) Genetic interrelationships and genome organization of double-stranded RNA elements of *Fusarium poae*. Virus Genes 18, 49-56

Cooper A., Bussey H. (1989) Characterization of the yeast KEX1 gene product: a carboxypeptidase involved in processing secreted precursor proteins. Mol. Cell. Biol. 9, 2706-2714

Dalrymple M.A., Petersen-Bjorn S., Friesen J.D., Beggs J.D. (1989) The product of the *PRP4* gene of *S. cerevisiae* shows homology to β–subunits of G proteins. Cell 58, 811-812

Dam E., Pleij K., Draper D. (1992) Structural and functional aspects of RNA pseudoknots. Biochemistry 31, 11665-11676

Dangel A.W., Shen L., Mendoza A.R., Wu L.-C., Yu C.Y. (1995) Human helicase gene *SKI2W* in the HLA class III region exhibits striking structural similarities to the yeast antiviral gene *SKI2* and to the human gene KIAA0052: emergence of a new gene family. Nucleic Acids Res. 23, 2120-2126

de la Peña P., Barros F., Gascón S., Lazo P.S., Ramos S. (1981) The effect of yeast killer toxin on sensitive cells of *Saccharomyces cerevisiae*. J. Biol. Chem. 256, 10420-10425

de la Peña P., Barros F., Gascón S., Ramos S., Lazo S. (1980) Primary effects of yeast killer toxin. Biochem. Biophys. Res. Com. 96, 544-550

de Silva T.M., Ursitti J.A., Speicher D.W. (1995) Protein detection in gels using fixation. *In* Current protocols in protein science (Coligan J.E., Dunn B.M., Ploegh H.L., Speicher D.W., Wingfield P.T., eds.), John Wiley & Sons, pp. 10.5.1-10.5.12

Diamond M.E., Dowhanick J.J., Nemeroff M.E., Pietras D.F., Tu C., Bruenn J.A., (1989) Overlapping genes in a yeast dsRNA virus. J. Virol. 63, 3983-3990

Dignard D., Whiteway M., Germain D., Tessier D., Thomas D.Y. (1991) Expression in yeast of a cDNA copy of the K2 killer toxin gene. Mol. Gen. Genet. 227, 127-136

Dihanich M., Van Tuinen E., Lambris J.D., Marshallsay B. (1989) Accumulation of virus-like particles in a yeast mutant lacking a mitochondrial pore protein. Mol. Cell. Biol. 9, 1100-1108

Dinman J.D. (1995) Ribosomal frameshifting in viruses of yeast. Yeast 11, 1115-1127

Dinman J.D., Echevarria M.J.R.-E., Czaplinski K., Peltz S.W. (1997) Peptidyl-transferase inhibitors have antiviral properties by altering programmed -1 ribosomal frameshifting efficiencies: development of model systems. Proc. natl. Acad. Sci. USA 94, 6606-6611

Dinman J.D., Icho T., Wickner R.B. (1991) A -1 ribosomal frameshift in a double-stranded RNA virus of yeast forms a gag-pol fusion protein. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88, 174-178

Dinman J.D., Wickner R.B. (1992) Ribosomal frameshifting efficiency and gag/gag-pol ration are critical for yeast M1 double-stranded RNA virus propagation. J. Virol. 66, 3669-3676

Dinman J.D., Wickner R.B. (1994) Translational maintenance of frame: mutants of *Saccharomyces cerevisiae* with altered -1 ribosomal frameshifting efficiencies. Genetics 136, 75-86

Dinman J.D., Wickner R.B. (1995) 5S rRNA is involved in fidelity of translational reading frame. Genetics 141, 95-105

Dmochowska A., Dignard D., Henning D., Thomas D.Y., Bussey H. (1987) Yeast *KEX1* gene encodes a putative protease with carboxypeptidase B-like function involved in killer toxin and alpha factor precursor processing. Cell 50, 573-584

Douglas C.M., Foor F., Marrinan J.A., Morin N., Nielsen J.B., Dahl A.M., Mazur P., Baginsky W., Li W., El-Sherbeini M., Clemas J.A., Mandala S.M., Frommer B.R., Kurtz M.B. (1994) The *Saccharomyces cerevisiae FKS1 ETG1* gene encodes an integral membrane protein which is a subunit of 1,3–β–D–glucan synthase. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 12907-12911

Dryden K.A., Wang G., Yeager M., Nibert M.L., Coombs K.M., Furlong D.B., Fields B.N., Baker T.S. (1993) Early steps in reovirus infection are associated with dramatic changes in supramolecular structure and protein conformation: analysis of virions and subviral particles by cryoelectron microscopy and image reconstruction. J. Cell Biol. 122, 1023-1041

Duronio R.J., Gordon J.I., Boguski M.S. (1994) Comparative-analysis of the beta-transducin family with identification of several new members including *PWP1*, a nonesential gene of *Saccharomyces cerevisiae* that is divergently transcribed from *NMT1*. Proteins-Structure function and genetics 13, 41-56

Dziembowski A., Malewicz M., Minczuk M., Golik P., Dmochowska A., Stepien P.P. (1998) The yeast nuclear gene *DSS1* which encodes for a putative RNase II, is a necessary for the function of the mitochondrial degradosome in processing and turnover of RNA. Mol. Gen. Genet. 260, 108-114

Eddy S., Durbin R. (1994) RNA Sequence Analysis Using Covariance Models. Nucleic Acids Res. 22, 2079-2088

Egel-Mitani M., Flygering H.P., Hansen M.T. (1990) A novel aspartyl protease allowing *KEX2*–independent MFα propheromone processing in yeast. Yeast 6, 127-137

Ellis L.F., Kleinschmidt W.J. (1967) Virus-like particles of a fraction of statolon, a mould product. Nature 215, 649-650

El-Sherbeini M., Bostian K.A., LeVitre J., Mitchell D.S. (1987) Gene-protein assignments within the yeast *Yarrowia lipolytica* dsRNA viral genome. Curr. Genet. 11, 483-490

El-Sherbeini M., Tipper D.J., Mitchell D.J., Bostian K.A. (1984) Virus-like particle capsid proteins encoded by different L-dsRNAs of *S. cerevisiae*: Their roles in maintenance of M-dsRNA killer plasmids. Mol. Cell. Biol. 4, 2818-2827

Esteban R., Fujimura T., García–Cuéllar M.P., Esteban R. (1994) Association of yeast viral 23S RNA with its putative RNA–dependent RNA polymerase. J. Biol. Chem. 269, 29771-29777

Esteban R., Fujimura T., Wickner R.B. (1988) Site-specific binding of viral plus single-stranded RNA to replicase-containing open virus-like particles of yeast. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 4411-4415

Esteban R., Fujimura T., Wickner R.B. (1989) Internal and terminal *cis*-acting sites are necessary for in vitro replication of the L-A double-stranded RNA virus of yeast. EMBO J. 8, 947-954

Esteban L.M., Rodríguez-Cousiño N., Esteban R. (1992) T double-stranded RNA (dsRNA) sequence reveals that T and W dsRNAs form a new RNA family in *Saccharomyces cerevisiae*. J. Biol. Chem. 267, 10874-10881

Esteban R., Wickner R.B. (1986) Three different M1 RNA-containing virus-like particle types in *Saccharomyces cerevisiae*: In vitro M1 double-stranded RNA synthesis. Mol. Cell. Biol 6, 1552-1561

Esteban R., Wickner R.B. (1987) A new non-Mendelian genetic element of yeast that increases cytopathology produced by M1 double-stranded RNA in ski strains. Genetics 117, 399-408

Esteban R., Wickner R.B. (1988) A deletion mutant of L-A double-stranded RNA replicates like M1 dsRNA. J. Virol. 62, 1278-1285

Estes M.K. (1996) Rotavirus and their replication. *In* Virology (Fields B.N., Knipe D.M., Howley P.M., eds.). Lippincott-Raven publishers, Philadelphia, pp. 1625-1655

Evers D., Giegerich R. (1999) RNA movies: visualizing RNA secondary structure spaces. Bioinformatics 15, 32-37

Fahima T., Wu Y., Zhang L., van Alfen N.K. (1994) Identification of the putative RNA polymerase of *Cryphonectria* hypovirus in a solubilized replication complex. J. Virol. 68, 6116-6119

Farabaugh P.J. (1993) Alternative readings of the genetic code. Cell 74, 591-596

Farabaugh P.J. (1996) Programmed translational frameshifting. Microbiol. Rev. 60, 103-134

Fekete C., Giczey G., Papp I., Szabó L., Hornok L. (1995) High-frequency occurence of virus-like particles with double-stranded RNA genome in *Fusarium poae*. FEMS Microbiol. Lett. 131, 295-299

Filipp D., Filipp P., Nosek J., Hladká M. (1995) Electrophoretic karyotype of *Dipodascus* (*Endomyces*) *magnusii*: two main intraspecific chromosomal polymorphisms associated with the differences in total genome size. Curr. Genet. 29, 81-87

Fink G.R., Styles C.A. (1972) Curing of a killer factor in *Saccharomyces cerevisiae*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69, 2846-2849

Fleet G.H. (1991) Cell walls. *In* The yeasts – Yeast organelles (Rose A.H., Harrison J.S., eds.), vol 4, Academic Press, London, pp. 199-277

Fong H.K.W., Hurley J.B., Hopkins R.S., Miake-Lye R., Johnson M.S., Doolittle R.F., Simon M.I. (1986) Repetitive segmental structure of the transducin beta subunit: homology with the *CDC4* gene and identification of related mRNAs. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 2162-2166

Fried H.M., Fink G.R. (1978) Electron microscopic heteroduplex analysis of killer double-stranded RNA species from yeast. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 4224-4228

Fried H.M., Warner J.R. (1981) Cloning of yeast gene for trichodermin resistance and ribosomal protein L3. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, 238-242

Fujimura T., Esteban R., Wickner R.B. (1986) In vitro L-A double-stranded RNA synthesis in virus-like particles from *Saccharomyces cerevisiae*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 4433-4437

Fujimura T., Wickner R.B. (1986) Thermolabile L-A virus-like particles from *pet18* mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. Mol. Cell. Biol. 6, 404-410

Fujimura T., Wickner R.B. (1987) L-A double-stranded-RNA virus-like particle replication cycle in *Saccharomyces cerevisiae* – particle maturation *in vitro* and effects of *mak10* and *pet18* mutations. Mol. Cell. Biol. 7, 420-426

Fujimura T., Wickner R.B. (1988a) Replicase of L-A virus-like particles of *Saccharomyces cerevisiae*. In vitro conversion of exogenous L-A and M1 single-stranded RNAs to double-stranded form. J. Biol. Chem. 263, 454-460

Fujimura T., Wickner R.B. (1988b) Gene overlap results in a viral protein having an RNA binding domain and a major coat protein domain. Cell 55, 663-671

Fujimura T., Esteban R., Esteban L.M., Wickner R.B. (1990) Portable encapsidation signal of the L-A double-stranded RNA virus *S. cerevisiae*. Cell 62, 819-828

Fujimura T., Wickner R.B. (1992) Interaction of two *cis* sites with the RNA replicase of the yeast L-A Virus. J. Biol. Chem. 267, 2708-2713

Fujimura T., Ribas J.C., Makhov A.M., Wickner R.B. (1992) Pol of gag-pol fusion protein required for encapsidation of viral RNA of yeast L-A virus. Nature 359, 746-749

Fuller R.S., Sterne R.E., Thorner J. (1988) Enzymes required for yeast prohormone processing. Ann. Rev. Physiol. 50, 345-362

Fuller R.S., Brenner C., Gluschankof P., Wilcox C.A. (1991) The yeast prohormone–processing *KEX2* protease, an enzyme with specifity for paired basic residues. *In* Methods of protein sequence analysis (Jörnvall *et al.*, eds.), Birkhäuser Verlag, Basel, pp. 205-214

Furuichi Y., Muthukrishnan S., Tomasz S., Shatkin A.J. (1976) Mechanism of formation of reovirus mRNA 5'-terminal blocked and methylated sequence m7GpppGmpC. J. Biol. Chem. 251, 5043-5053

Ganesa C., Chang Y., Flurkey W.H., Randhawa Z.I., Bozarth R.F. (1989) Purification and molecular properties of teh toxin coded by *Ustilago maydis* virus P4. Biochem. Biophys. res. Commun. 162, 651-657

Ganesa C., Flurkey W.H., Randhawa Z.I., Bozarth R.F. (1991) *Ustilago maydis* virus P4 killer toxin: characterization, partial amino termino sequence, and evidence for glycosylation. Arch. Biochem. Biophys. 286, 195-200

García–Cuéllar M.P., Esteban L.M., Fujimura T., Rodríguez–Cousiño N. (1995) Yeast viral 20S RNA is associated with it's cognate RNA–dependent RNA polymerase. J. Biol. Chem. 270, 20084-20089

Garvik B., Haber J.E. (1978) New cytoplasmic element that controls 20S RNA synthesis during sporulation in yeast. J. Bacteriol. 134, 261-269

Gallagher S.R. (1998) Electrophoretic separation of proteins. *In* Current protocols in molecular biology (Ausubel F.M., Brent R., Kingston R.E., Moore D.D., Seidman J.G., Smith J.A., Struhl K., eds.), John Wiley & Sons, New York, 10.2.1-10.2.35

Ghabrial S.A. (1994) New developments in fungal virology. Adv. Virus Res. 43, 303-388

Ghabrial S.A., Bibb J.A., Price K.H., Havens W.M., Lesnaw J.A. (1987) The capsid polypeptides of the 190S virus of *Helmintosporium victoriae*. J. Gen. Virol. 68, 1791-1800

Ghabrial S.A., Sanderlin R.S., Calvert L.A. (1979) Phytopathology 69, 312-315

Ghabrial S.A, Bruenn J.A., Buck K.W., Wickner R.B., Patterson J.L., Stuart K.D., Wang A.L., Wang C.C. (1995a) Totiviridae. *In* Virus Taxonomy. Sixth report of the International Committee on taxonomy of Viruses (Murphy F.A., Fauquet C.M., Bishop D.H.L., Ghabrial S.A., Jarwis A.W., Martelli G.P., Mayo M.A., Summers M.D., eds.), Archives of Virology, Suppl. 10, Springer-Verlag, Wien, New York, pp. 245-252

Ghabrial S.A., Bozarth R.F., Buck K.W., Yamashita S., Martelli G.P., Milne R.G. (1995b) Partitiviridae. *In* Virus Taxonomy. Sixth report of the International Committee on taxonomy of viruses (Murphy F.A., Fauquet C.M., Bishop D.H.L., Ghabrial S.A., Jarwis A.W., Martelli G.P., Mayo M.A., Summers M.D., eds.), Archives of Virology, Suppl. 10, Springer-Verlag, Wien, New York, pp. 253-260

Ghabrial S.A., Havens W.M. (1989) Conservative transcription of *Helmintosporium victoriae* 190S virus double-stranded RNA *in vitro*. J. Gen. Virol. 70, 1025-1035

Ghabrial S.A., Havens W.M. (1992) The *Helmintosporium victoriae* 190S mycovirus has two forms distinguishable by capsid protein composition and phosphorylation state. Virology 188, 657-665

Goebl M., Yanagida M. (1991) The TPR snap helix: A novel protein repeat motif from mitosis to transcription. Trends Biochem. Sci. 16, 173-177

Golemboski D.B., Lomonossoff G.P., Zaitlin M. (1990) Plants transformed with a tobacco mosaic virus nonstructural gene sequence are resistant to the virus. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 6311-6315

Goodin M.M., Schlagnhaufer B., Weir T., Romaine C.P. (1997) Characterization of an RNA-dependent RNA polymerase activity associated with La France Isometric Virus. J. Virol. 71, 2264-2269

Griač P., Nosek J. (1993) Mitochondrial DNA of *Endomyces* (*Dipodascus*) *magnusii*. Curr. Genet. 23, 549-552

Groves D.P., Clare J.J., Oliver S.G. (1983) Isolation and characterisation of a double-stranded RNA virus-like particle from yeast *Yarrowia lipolytica*. Curr. genet. 7, 185-190

Gu F., Khimani A., Rane S., Flurkey W.H., Bozarth R.F., Smith T.J. (1995) Structure and function of a virally encoded fungal toxin from *Ustilago maydis*: a fungal and mammalian Ca^{2+} channel inhibitor. Structure 3, 805-814

Guild G., Stollar V. (1977) Defective interfering particles of Sindbis virus. V. Sequence relationships between $SV_{(SPD)}$ 42S RNA and intracellular defective viral RNAs. Virology 77, 175-188

Hammell A.B., Taylor R.C., Peltz S.W., Dinman J.D. (1999) Identification of putative programmed -1 ribosomal frameshift signals in large DNA databases. Genome Res. 9, 417-427

Hanes S.D., Burn V.E., Sturley S.L., Tipper D.J., Bostian K.A. (1986) Expression of a cDNA derived from the yeast killer preprotoxin gene: implications for processing and immunity. Proc. Natl. Acad. Sci USA 83, 1675-1679

Hannig E.M., Thiele D.J., Leibowitz M.J. (1984) Yeast killer virus transcripts contain template coded polyadenylate tracts. Mol. Cell. Biol. 4, 101-109

Hannig E.M., Leibowitz M.J. (1985) Structure and expression of the M2 genomic segment of a type 2 killer virus of yeast. Nucleic Acids Res. 13, 4379-4400

Hannig E.M., Leibowitz M.J., Wickner R.B. (1985) The mechanism of exclusion of M2 double-stranded RNA by L-A-E double-stranded RNA. Yeast 1, 57-65

Hannig E.M., Williams T.L., Leibowitz M.J. (1986) The internal polyadenylate tract of yeast killer virus M1 double-stranded RNA is variable in length. Virology 152, 149-158

Harmsen M.C., Tolner B., Kram A., Go S.J., de Haan A., Wessels J.G.H. (1991) Sequences of three dsRNAs associated with La France disease of the cultivated mushroom (*Agaricus bisporus*). Curr. Genet. 20, 137-144

Harris M.S. (1978) Virus-like particles and double-stranded RNA from killer and non-killer strains of *Saccharomyces cerevisiae*. Microbios 21, 161-176

Hartley D.A., Preiss A., Artavanis-Tsakonas S. (1988) A deduced gene product from the *Drosophila* neurogenic locus, Enhancer of split, shows homology to mammalian G-protein beta subunit. Cell 55, 785-795

Hatfield D., Levin J.G., Rein A., Oroszlan S. (1992) Translational suppression in retroviral gene expression. Adv. Virus. Res. 41, 193-239

Hillman B.I., Halpern B.T., Brown M.P. (1994) A viral dsRNA element of the chestnut blight fungus with a distinct genetic organization. Virology 201, 241-250

Hofacker I.L., Fekete M., Flamm C., Huynen M.A., Rauscher S., stolorz P.E., Stadler P.F. (1998) Automatic Detection of Conserved RNA Structure Elements in Complete RNA Virus Genomes. Nucl.Acids Res. 26, 3825-3836

Hofacker I.L., Stadler P.F. (1999) Automatic Detection of Conserved Base Pairing Patterns in RNA Virus Genomes. Comp. Chem. 23, 401-414

Holland J., Grabau E., Jones C., Semler B. (1979) Evolution of multiple genomic mutations during long-term persistent infection by vesicular stomatitis virus. Cell 16, 495-504

Hollings M. (1962) Viruses associated with dieback disease of cultivated mushrooms. Nature 196, 962-965

Hong Y., Cole T.E., Brasier C.M., Buck K.W. (1998a) Novel structures of two virus-like RNA elements from a diseased isolate of the Dutch elm disease fungus, *Ophiostoma novo-ulmi*. Virology 242, 80-89

Hong Y., Cole T.E., Brasier C.M., Buck K.W. (1998b) Evolutionary relationships among putative RNA-dependent RNA polymerases encoded by a mitochondrial virus-like RNAs and by the *Arabidopsis* mitochondrial genome. Virology 246, 158-169

Hong Y., Dover S.L., Cole T.E., Brasier C.M., Buck K.W. (1999) Multiple mitochondrial viruses in an isolate of the Dutch Elm Disease fungus *Ophiostoma novo-ulmi*. Virology 258, 118-127

Hopper J.E., Bostian K.A., Rowe L.B., Tipper D.J. (1977) Translation of the L species dsRNA genome of the killer-associated virus-like particles of *Saccharomyces cerevisiae*. J. Biol. Chem. 252, 9010-9017

Hsu C.H., Kingsbury D.W. (1985) Constitutively phosphorylated residues in the NS protein of vesicular stomatitis virus. J. Biol. Chem. 260, 8990-8995

Hsu C.L., Stevens A. (1993) Yeast cells lacking 5'$\rightarrow$3' exoribonuclease 1 contain mRNA species that are poly(A) deficient and partially lack the 5' cap structure. Mol. Cell. Biol. 13, 4826-4835

Huang S., Ghabrial S.A. (1996) Organization and expression of the double-stranded RNA genome of *Helmintosporium victoriae* 190S virus, a totivirus infecting a plant pathogenic filamentous fungus. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 93, 12541-12546

Huang S., Soldevila A.I., Webb B.A., Ghabrial S.A. (1997) Expression, assembly, and proteolytic processing of *Helmintosporium victoriae* 190S totivirus capsid protein in insect cells. Virology 234, 130-137

Hutchins K., Bussey H. (1983) Cell wall receptor for yeast killer toxins: involvement of (1$\rightarrow$6)-β-D-glucan. J. Bacteriol. 154, 161-169

Chen B., Choi G.H., Nuss D.L. (1994) Attenuation of fungal virulence by synthetic infectious hypovirus transcripts. Science 264, 1762-1764

Chen B., Craven M.G., Choi G.H., Nuss D.L. (1994) cDNA-derived hypovirus RNA in transformed chestnut blight fungus is spliced and trimmed of vector nucleotides. Virology 202, 441-448

Chen B., Nuss D.L. (1999) Infectious cDNA clone of hypovirus CHV1-Euro7: a comparative virology approach to investigate virus-mediated hypovirulence of the chestnut blight fungus *Cryphonectria parasitica*. J. Virol. 73, 985-992

Cheng R.H., Caston J.R., Wang G., Gu F., Smith T.J., Baker T.S., Bozarth R.F., Trus B.L., Cheng N., Wickner R.B., Steven A. (1994) Fungal virus capsids, cytoplasmic compartments for the replication of double-stranded RNA, formed as icosahedral shells of asymetric Gag dimers. J. Mol. Biol. 224, 255-258

Chetouani F., Monestié, P., Thébault P., Gaspin, C., Michot B. (1997) ESSA: An integrated and interactive computer tool for analysing RNA secondary structure. Nucleic Acids Res. 25, 3514-3522

Choi G.H., Nuss D.L. (1992) Hypovirulence of chestnut blight fungus conferred by an infectious viral cDNA. Science 257, 800-803

Chun S.J., Lee Y.-H. (1997) Inheritance of dsRNAs in the rice blast fungus, *Magnaporthe grisea*. FEMS Microbiol. Lett. 148, 159-162

Icho T., Wickner R.B. (1988) The MAK11 protein is essential for cell growth and replication of double-stranded RNA and is apparently a membrane-associated protein. J. Biol. Chem. 263, 1467-1475

Icho T., Wickner R.B. (1989) The double-stranded RNA genome of yeast virus L-A encodes its own putative RNA polymerase by fusing two open reading frames. J. Biol. Chem. 264, 6716-6723

Jacks T., Madhani H.D., Masiarz F.R., Varmus H.E. (1988) Signals for ribosomal frameshifting in the Rous sarcoma virus gag-pol region. Cell 55, 447-458

Jacks T. (1990) Translational suppression in gene expression in retroviruses and retrotransposons. Curr. Top. Microbiol. Immunol. 157, 93-124

Jacobs Anderson J.S., Parker R. (1998) The 3’ to 5’ degradation of yeast mRNA is a general mechanism for mRNA turnover that requires the SKI2 DEVH box protein and 3’ to 5’ exoribonucleases of the exosome complex. EMBO J. 17, 1497-1506

Jamil N., Buck K.W. (1986) Capsid polypeptides in a group III virus from *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* are related. J. Gen. Virol. 67, 1717-1720

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

Jiang B., Sheraton J., Ram A.F.J., Dijkgraaf G.J.P., Klis F.M., Bussey H. (1996) *CWH41* encodes a novel endoplasmic reticulum membrane N–glycoprotein involved in β–1,6–assembly. J. Bacteriol. 178, 1162-1171

Johnson A.W., Kolodner R.D. (1995) Synthetic lethality of sep1 (xrn1) ski2 and sep1 (xrn1) ski3 mutants of *Saccharomyces cerevisiae* is independent of killer virus and suggests a general role for these genes in translation control. Mol. Cell. Biol. 15, 2719-2727

Kane W.P., Pietras D.F., Bruenn J.A. (1979) Evolution of defective-interfering double-stranded RNAs of the yeast killer virus. J. Virol. 32, 692-696

Kawakami K., Shafer B.K., Garfinkel D.J., Strathern J.N., Nakamura Y. (1992) Ty element-induced temperature-sensitive mutations of *Saccharomyces cerevisiae*. Genetics 131, 821-832

Kennedy S.I.T. (1976) Sequence relationships between the genome and the intracellular RNA species of standard and defective interfering Semliki forest virus. J. Mol. Biol. 108, 491-511

Khoshnan A., Alderete J.F. (1993) Multiple double-stranded RNA segments are associated with virus particles infecting *Trichomonas vaginalis*. J. Virol. 67, 6950-6955

Khoshnan A., Alderete J.F. (1994) *Trichomonas vaginalis* with a double-stranded RNA virus has upregulated levels of phenotypically variable immunogen mRNA. J. Virol. 68, 4035-4038

Khoshnan A., Alderete J.F. (1995) Characterization of double-stranded RNA satellites associated with the *Trichomonas vaginalis* virus. J. Virol. 69, 6892-6897

Khoshnan A., Provenzano D., Alderete J.F. (1994) Unique double-stranded RNAs associated with the *Trichomonas vaginalis* virus are synthesized by viral RNA-dependent RNA polymerase. J. Virol. 68, 7108-7114

Khramtsov N.V., Woods K.M., Nesterenko M.V., Dykstra C.C., Upton S.J. (1997) Virus-like, double-stranded RNAs in the parasitic protozoan *Cryptosporidium parvum*. Mol. Microbiol. 26, 289-300

Khramtsov N.V., Upton S.J. (1998) High-temperature inducible cell-free transcription and replication of double-stranded RNAs within the parasitic protozoan *Cryptosporidium parvum*. Virology 245, 331-337

Khramtsov N.V., Upton S.J. (2000) Association of RNA polymerase complexes of the parasitic protozoan *Cryptosporidium parvum* with virus-like particles: heterogeneous system. J. Virol. 74, 5788-5795

Kim J., Ljungdahl P.O., Fink G.R. (1990) *kem* mutations affect nuclear fusion in *Saccharomyces cerevisiae*. Genetics 126, 799-812

Kimura Y., Takaoka M., Tanaka S., Sassa H., Tanaka K., Polevoda B., Sherman F., Hirano H. (2000) N–α–acetylation and proteolytic activity of the yeast 20S proteasome. J. Biol. Chem. 275, 4635-4639

Kinal H., Park C.-M., Berry J.O., Koltin Y., Bruenn J.A. (1995) Processing and secretion of a virally encoded antifungal toxin in transgenic plants: evidence for a Kex2p pathway in plants. Plant Cell 7, 677-688

Kingsbury D.W. (1990) *Orthomyxoviridae* and their replication. *In* Virology (Fields B.N., Knipe D.M., eds.), vol. 1, Raven Press, New York, pp. 1075-1089

Kipling D., Tambini C., Kearsey S.E. (1991) *rar* mutations which increase artificial chromosome stability in *Saccharomyces cerevisiae* identify transcription and recombination proteins. Nucleic Acids Res. 19, 1385-1391

Klaff P., Riesner D., Steger G. (1996) RNA structure and the regulation of gene expression. Plant. Mol. Biol. 32, 89-106

Klis F. (1994) Cell wall assembly in yeast. Yeast 10, 851-869

Koltin Y. (1986) *In* Fungal Virology (Buck K.W., ed.), CRC Press, Boca Raton, Florida, pp. 109-143

Koltin Y. (1988) The killer system of *Ustilago maydis*: secreted polypeptides encoded by viruses. *In* Viruses of funghi and simple eukaryotes (Koltin Y., Leibowitz M.J., eds.), Dekker, New York, pp. 209-243

Koonin E.V., Choi G.H., Nuss D.L., Shapira R., Carrington J.C. (1991) Evidence for common ancestry of a chestnut blight hypovirulence-associated double-stranded RNA and a group of positive RNA plant viruses. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88, 10647-10651

Kozak M. (1986) Selection of translational start sites in eukaryotic mRNAs. *In* Translational Control (Mathews M.B., ed.), Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, pp. 35-41

Kressler D., Linder P., de la Cruz J. (1999) Protein *trans*-acting factors involved in ribosome biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. Mol. Cell. Biol. 19, 7897-7912

Kulkarni M.S., Sherman F. (1994) *NAT2*, an essential gene encoding methionine N–α–acetyltransferase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. J. Biol. Chem. 269, 13141-13147

Kurzweilová H., Sigler K. (1994) Kinetic studies of killer toxin K1 binding to yeast cells indicate two receptor populations. Arch. Microbiol. 162, 211-214

Lakhsman D.K., Jian J., Tavantzis S.M. (1998) A double-stranded RNA element from a hypovirulent strain of *Rhizoctonia solani* occurs in DNA form and is genetically related to the pentafunctional AROM protein of the shikimate pathway. Proc. natl. Acad. Sci. USA 95, 6425-6429

Larimer F.W., Hsu C.L., Maupin M.K., Stevens A. (1992) Characterization of the *XRN1* gene encoding a 5'→3' exoribonuclease: sequence data and analysis of disparate protein and mRNA levels of gene-disrupted cells. Gene 120, 51-57

LeCuyer K.A., Crothers D.M. (1993) The *Leptomonas collosoma* spliced leader RNA can switch between two alternate structural forms. Biochemistry 32, 5301-5311

Lee F.J.S., Lin L.W., Smith J.A. (1997) A N–α–acetyltransferase selectively transfers an acetyl group to NH2–terminal methionine residues: Purification and partial characterization. Biochim. Biophys. Acta-Protein Struct. Molec. Enzym. 1338, 244-252

Lee M., Pietras D.F., Nemeroff M.E., Corstanje B.J., Field L.J., Bruenn J.A. (1986) Conserved regions in defective interfering viral double-stranded RNAs from a yeast virus. J. Virol. 58, 402-407

Lee S.G., Lee I., Kang C., Song K. (1995) Identification and characterization of a human cDNA homologous to yeast *SKI2*. Genomics 25, 660-666

Lee Y.J., Wickner R.B. (1992) *MAK10*, a glucose-repressible gene necessary for replication of a dsRNA virus of *Saccharomyces cerevisiae*, has T cell receptor α–subunit motifs. Genetics 132, 87-96

Leibowitz M.J., Georgopoulus D.E. (1985) Abstract 362. *In* Molecular biology of yeast, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York

Leibowitz M.J., Hussain I., Williams T.L. (1988) Transcription and Translation of the Yeast Killer Virus Genome. *In* Viruses of Fungi and Simple Eukaryotes (Koltin Y., Leibowitz M. J., eds.), Marcel Dekker Inc., New York-Basel, pp. 133-160

Leibowitz M.J., Thiele D.J., Hannig E.M. (1983) Structure of separated strands of double-stranded RNA from killer virus of yeast: A translational model. *In* Double-Stranded RNA Viruses (Bishop D.H.L., Compans R.W., eds.), Elsevier, New York, pp. 457-462

Leibowitz M.J., Wickner R.B. (1978) PET18: a chromosomal gene required for cell growth and for the maintenance of mitochondrial DNA and the killer plasmid of yeast. Mol. Gen. Genet. 165, 115-121

Lhoas P. (1971) Transmission of double stranded RNA viruses to a strain of *Penicillium stoloniferum* through heterokaryosis. Nature 230, 248-249

Li N., Erman M., Pangborn W., Duax W.L., Park C.-M. (1999) Structure of *Ustilago maydis* killer toxin KP6 α–subunit. J. Biol. Chem. 274, 20425-20431

Lindberg G.D. (1959) Phytopathology 49, 29-31

Lindberg G.D. (1960) Phytopathology 50, 457-460

Liu D.X., Inglis S.C. (1992) Internal entry of ribosomes on a tricistronic mRNA encoded by infectious bronchitis virus. J. Virol. 66, 6143-6154

Liu H.-W., Chu Y.D., Tai J.-H. (1998) Characterization of *Trichomonas vaginalis* virus proteins in the pathogenic protozoan *T. vaginalis*. Arch. Virol. 143, 963-970

Lolle S.J., Bussey H. (1986) *In vivo* evidence for posttranslational translocation and signal cleavage of the killer preprotoxin of *Saccharomyces cerevisiae*. Mol. Cell. Biol. 6, 4274-4280

Lolle S., Skipper N., Bussey H., Thomas D. (1984) The expression of cDNA clones of yeast M1 double stranded RNA in yeast confers both killer and immunity phenotypes. EMBO J. 3, 1383-1387

MacFarlane S.A., Davies J.W. (1992) Plants transformed with a region of the 201-kilodalton replicase gene from pea early browning virus RNA1 are resistant to virus infection. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 5829-5833

Maga J.A., Widmer G., LeBowitz J.H. (1995) *Leishmania* RNA virus 1-mediated cap-independent translation. Mol. Cell. Biol. 15, 4884-4889

Magliani W., Conti S., Gerloni M., Bertolotti D., Polonelli L. (1997) Yeast killer systems. Clin. Microbiol. Rev. 10, 369-400

Manners D.J., Masson A.J., Patterson J.C. (1973a) The structure of a β–1,3–D–glucan from yeast cell walls. Biochem. J. 135, 19-30

Manners D.J., Masson A.J., Patterson J.C. (1973b) The structure of a β–1,6–D–glucan from yeast cell walls. Biochem. J. 135, 31-36

Marczinke B., Fisher R., Vidakovic A., Bloys A. J., Brierley I. (1998) Secondary structure and mutational analysis of the ribosomal frameshift signal of Rous Sarcoma Virus. J. Mol. Biol. 284, 205-225

Margossian S.P., Li H., Zassenhaus H.P., Butow R.A. (1996) The DExH box protein Suv3p is a component of a yeast mitochondrial 3' to 5' exoribonuclease that suppresses group I intron toxicity. Cell 84, 199-209

Marnell L.L., Summers D.F. (1984) Characterization of the phosphorylated small enzyme subunit, NS, of the vesicular stomatitis virus RNA polymerase. J. Biol. Chem. 259, 13518-13524

Martinac B., Zhu H., Kubalski A., Zhou X.L., Culbertson M., Bussey H., Kung C. (1990) Yeast K1 killer toxin forms ion channels in sensitive yeast spheroplasts and in artificial liposomes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 6228-6232

Martinez H.M. (1984) An RNA folding rule. Nucl. Acids Res. 12, 323-334

Masison D.C., Blanc A., Ribas J.C., Carrol K., Sonenberg N., Wickner R.B. (1995) Decoying the cap^{-} mRNA degradation system by a dsRNA virus and poly(A)$^{-}$ mRNA surveillance by a yeast antiviral system. Mol. Cell. Biol. 15, 2763-2771

Mathews D.H., Sabina J., Zuker M., Turner D.H. (1999) Expanded Sequence Dependence of Thermodynamic Parameters Improves Prediction of RNA Secondary Structure. J. Mol. Biol. 288, 911-940

Matte O., Chabalier C., Ratomahenina R., Bossy J.P., Galzy P. (1991) Isolation of a double-stranded RNA and virus-like particle from *Geotrichum candidum*. J. Basic. Microbiol. 31, 447-452

Matsumoto Y., Fishel R., Wickner R.B. (1990) Circular single–stranded RNA replicon in *Saccharomyces cerevisiae*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 7628-7632

Matsumoto Y., Sarkar G., Sommer S.S., Wickner R.B. (1993) A yeast antiviral protein, *SKI8*, shares a repeated amino acid sequence pattern with beta-subunits of G proteins and several other proteins. Yeast 9, 43-51

Matsumoto Y., Wickner R.B. (1991) Yeast 20S RNA replicon. J. Biol. Chem. 266, 12779-12783

Mayo M.A. (1995) Unassigned viruses. *In* Virus Taxonomy. Sixth report of the International Committee on taxonomy of Viruses (Murphy F.A. et al., Fauquet C.M., Bishop D.H.L., Ghabrial S.A., Jarwis A.W., Martelli G.P., Mayo M.A., Summers M.D., eds.) Archives of Virology, Suppl. 10, Springer-Verlag, Wien, New York, pp. 504-507

Meaden P., Hill K., Wagner J., Slipetz D., Sommer S.S., Bussey H. (1990) The yeast *KRE5* encodes a probable endoplasmic reticulum protein required for (1$\rightarrow$6)–β–D–glucan synthesis and normal cell growth. Mol. Cell Biol 10, 3013-3019

Meškaukas A. (1990) Nucleotide sequence of cDNA to yeast M2–1 dsRNA segment. Nucleic Acids Res. 18, 6270-6270

Meškaukas A., Čitavičius D. (1992) The K2-type killer toxin- and immunity-encoding region from *Saccharomyces cerevisisae*: structure and expression in yeast. Gene 111, 135-139

Milhon J.L., Albert T.J., van DeWaa E.A., O'Leary K.A., Jackson R.N., Kessler M.A., Schuler L.A., Tracy J.W. (2000) SmMAK16, the *Schistosoma mansoni* homologue of *MAK16* from yeast, targets protein transport to the nucleolus. Mol. Biochem. Parasitol. 108, 225-236

Mindich M., Bamford D.H. (1988) Lipid-containing bactriophages. *In* The bacteriophages (Calendar R., ed.), vol. 2., Plenum Publishing Corp., New York, pp. 475-520

Mindich L. (1999) Precise packaging of the three genomic segments of the double-stranded RNA bacteriophage ϕ6. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 63, 149-160

Mitchell D.J., Bevan E.A. (1983) ScV ”killer” viruses in yeast. *In* Yeast genetics, fundamental and applied aspects (Spencer J.F.T., Spencer D.M., Smith A.R.W., eds.), Springer-Verlag, New York-Berlin, pp. 371-419

Mitchell D.J., Bevan E.A., Herring A.J. (1973) The correlation between dsRNA in yeast and the “killer” character. (Abstract) Heredity 31, 133

Mitchell P., Petfalski E., Shevchenko A., Mann M., Tollervey D. (1997) The exosome: A conserved eukaryotic RNA processing complex containing multiple 3’$\rightarrow'$5’ exoribonucleases. Cell 91, 457-466

Mitchell P., Petfalski E., Tollervey D. (1996) The 3’ end of yeast 5.8S rRNA is generated by an exonuclease processing mechanism. Genes Dev. 10, 502-513

Mol P.C., Park H.M., Mullins J.T., Cabib E. (1994) A GTP–binding protein regulates the activity of 1$\rightarrow$3–β–glucan synthase, an enzyme directly involved in yeast cell wall morphogenesis. J. Biol. Chem. 269, 31267-31274

Morrissey J.H. (1981) Silver stain for proteins in polyacrylamide gels: A modified porocedure with enhanced uniform sensitivity. Anal. Biochem. 117, 307-310

Muhlrad D., Decker C.J., Parker R. (1994) Deadenylation of the unstable mRNA encoded by the yeast MFA2 gene leads to decapping followed by 5’$\rightarrow$3’ digestion of the transcript. Genes Dev. 8, 855-866

Muhlrad D., Decker C.J., Parker R. (1995) Turnover mechanisms of the stable yeast PGK1 mRNA. Mol. C ell. Biol. 15, 2145-2156

Mullen J.R., Kayne P.S., Moerschell R.P., Tsunasawa S., Gribskov M., Colavito-Shepanski M., Grunstein M., Sherman F., Sternglanz R. (1989) Identification and characterization of genes and mutants for an N-terminal acetyltransferase from yeast. EMBO J. 8, 2067-2075

Munroe D., Jacobson A. (1990) Tales of poly(A): a review. Gene 91, 151-158

Nash C.H., Douthart R.J., Ellis L.F., van Frank R.M., Burnett J.P., Lemke P.A. (1973) On the mycophage of *Penicillium chrysogenum*. Can. J. Microbiol. 19, 97-103

Naumov G.I., Naumova T.I. (1973a) Comparative genetics of yeast XII. Study of antagonistic interrelations in *Saccharomyces* yeast. Genetika 9, 85-90

Naumov G.I., Naumova T.I. (1973b) Comparative genetics of yeast XIII. Comparative study of killer strains of *Saccharomyces* from different collections. Genetika 9, 140-145

Neer E.J., Schmidt C.J., Nambudripad R., Smith T.F. (1994) The ancient regulatory-protein family of WD-repeat proteins. Nature 371, 297-300

Nemeroff M.E., Bruenn J.A. (1987) Initiation by the yeast viral transcriptase *in vitro*. J. Biol. Chem. 262, 6785-6787

Neville D.M., Hudson T.H. (1986) Transmembrane transport of diphteria toxin, related toxins and colicins. Annu. Rev. Biochem. 55, 195-224

Newman A.M., Elliot S.G., McLaughlin C.S., Sutherland P.A., Warner R.C. (1981) Replication of dsRNA of the virus-like particles in *Saccharomyces cerevisiae*. J. Virol. 38, 263-271

Nogawa M., Kageyama T., Nakatani A., Taguchi G., Shimosaka M., Okazaki M. (1996) Cloning and characterization of mycovirus double-stranded RNA from the plant pathogenic fungus *Fusarium solani* f. sp. *robiniae*. Biosci. Biotech. Biochem. 60, 784-788

Nomoto A., Jacobson A., Lee Y., Dunn J., Wimmer E. (1979) Defective interfering particles of polio virus. Mapping of the deletion and evidence that deletions in the genomes of DI (I), (II), and (III) are located in the same region. J. Mol. Biol. 128, 179-196

Nomura N., Miyajima N., Sazuka T., Tanaka A., Kawarabayashi Y., Sato S., Nagase T., Seki N., Ishikawa K., Tabata S. (1994) Prediction of the coding sequences of unidentified genes. II. The coding sequences of 40 new genes (KIAA 0041 - KIAA 0080) deduced by analysis of randomly sampled cDNA clones from human immature myeloid cell line KG1. DNA Res. 1, 27-35

Nosek J., Filipp D., Bederková K., Griač P. (1993) Isolation of a dsRNA virus from *Dipodascus* (*Endomyces*) *magnusii*. Curr. Genet. 23, 219-222

Novick P., Field C., Shekman R. (1980) Identification of 23 complementation groups required for post-translational events in the yeast secretory pathway. Cell 21, 461-469

Nuss D.L. (1992) Biological control of chestnut blight: an example of virus-mediated attenuation of fungal pathogenesis. Microbiol. Rev. 56, 561-576

Oh C.-S., Hillman B.I. (1995) Genome organization of a partitivirus from the filamentous ascomycete *Atkinsonella hypoxylon*. J. gen. Virol. 76, 1461-1470

O'Hara P., Nichol S., Horodyski F., Holland J. (1984) Vesicular stomatitis virus defective interfering particles can contain extensive genomic sequence rearrangements and base substitutions. Cell 36, 915-924

Ohtake Y., Wickner R.B. (1995a) Yeast virus propagation depends on free 60S ribosomal subunit concentration. Mol. Cell. Biol. 15, 2772-2781

Ohtake Y., Wickner R.B. (1995b) KRB1, a suppressor of mak7-1 (a mutant RPL4A), is RPL4B, a second ribosomal protein L4 gene, on a fragment of *Saccharomyces cerevisiae* chromosome XII. Genetics 140, 129-137

Oliver S.G., Mc.Cready S.J., Holm C., Sutherland P.A., McLaughlin C.S. (1977) Biochemical and physiological studies of the yeast virus-like particle. J. Bacteriol. 130, 1303-1309

Osterman L.A. (1981) Metody isledovanija belkov i nykleinovych kyslot: Elektroforez i ultracentrifugovanie (prakticeskoe posobie). Nauka, Moskva, 240-275

Palfree R.G.E., Bussey H. (1979) Yeast killer toxin: purification and characterisation of the protein toxin from *Saccharomyces cerevisiae*. Eur. J. Biochem. 93, 487-493

Park C.-M., Bruenn J.A., Ganesa C., Flurkey W.F., Bozarth R.F., Koltin Y. (1994) Structure and heterologous expression of the *Ustilago maydis* viral toxin KP4. Mol. Microbiol. 11, 155-164

Park C.-M., Lopinski J.D., Masuda J., Tzeng T.-H., Bruenn J.A. (1996a) A second double-stranded RNA virus from yeast. Virology 216, 451-454

Park C.-M., Berry J.O., Bruenn J.A. (1996b) High-level secretion of a virally encoded anti-fungal toxin in transgenic tobacco plants. Plant Mol. Biol. 30, 359-366

Park J., Morrow C.D. (1992) The nonmyristylated Pr160gag-pol polyprotein of human immunodeficiency virus type 1 interacts with Pr55gag and is incorporated into viruslike virus type 1 interacts with Pr55gag and is incorporated into viruslike particles. J. Virol. 66, 6304-6313

Parker C.G., Fessler L.I., Nelson R.E., Fessler J.H. (1995) *Drosophila* UDP–glucose:glycoprotein glucosyltransferase: sequence and characterization of an enzyme that distinguishes between denatured and native proteins. EMBO J. 14, 1294-1303

Patterson S.D. (1998) One-Dimensional SDS Gel Electrophoresis of Proteins. *In* Current protocols in protein science (Coligan J.E., Dunn B.M., Ploegh H.L., Speicher D.W., Wingfield P.T., eds.), John Wiley & Sons, New York, pp. 10.1.1-10.1.29

Patterson J.L., Holloway B., Kolakofsky D. (1984) La crosse virions contain a primer-stimulated RNA polymerase and a methylated cap-dependent endonuclease. J. Virol. 52, 215-222

Pattus F., Masotte D., Wilmsen H.U., Lakey J., Tsernoglou D., Tucker A., Parker M.W. (1990) Colicins: prokaryotic killer–pores. Experientia 46, 180-192

Pelletier J., Sonenberg N. (1988) Internal initiation of translation of eukaryotic mRNA directed by a sequence derived from poliovirus RNA. Nature 334, 320-325

Pesole G., Liuni S., Grillo G., Ippedico M., Larizza A., Makalowski W., Saccone C. (1999) UTRdb: a specialized database of 5' and 3' untranslated regions of eukaryotic mRNAs. Nucleic Acids Res. 27, 188-191

Pfeiffer I., Gyantár M., Kucsera J., Párducz Á. (1998) Isolation of dsRNA-associated VLPs from the strain *Cryptococcus hungaricus* CBS 6569. FEMS Microbiol. Lett. 162, 151-154

Pfeiffer I., Kucsera J., Varga J., Párducz Á., Ferenczy L. (1996) Variability and inheritance of double-stranded RNA viruses in *Phaffia rhodozyma*. Curr. Genet. 30, 294-297

Pfeiffer P., Radler F. (1984) Comparison of the killer toxin of several yeasts and the purification of a toxin of type K2. Arch. Microbiol. 137, 357-361

Plotch S.J., Bouloy M., Ulmanen I., Krug R.M. (1981) A unique cap(m7GpppXm)-dependent influenza virion endonuclease cleaves capped RNAs to generate the primers that initiate viral RNA transcription. Cell 23, 847-858

Polashock J.J., Bedker P.J., Hillman B.I. (1997) Movement of a small mitochondrial double-stranded RNA element of *Cryphonectria parasitica*: ascospore inheritance and implications for mitochondrial recombination. Mol. Gen. Genet. 256, 566-571

Polashock J.J., Hillman B.I. (1994) A small mitochondrial double-stranded (ds)RNA element associated with a hypovirulent strain of the chestnut blight fungus and ancestrally related to yeast cytoplasmic T and W dsRNAs. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 8680-8684

Pospíšek M. (1998a) Kvasinkové dsRNA viry I. Biologické listy 63, 81-113

Pospíšek M. (1998b) Kvasinkové dsRNA viry II. Biologické listy 63, 115-138

Pospíšek M., Palková Z. (1991) Microisolation of yeast nucleic acids on the microtitre plate without using lytic enzymes. Nucleic Acids Res. 19: 5083

Pospíšek M., Palková Z., Janderová B., Korb J. (1994) Isolation and characterization of the dsRNA virus from the yeast *Endomyces magnusii*. FEMS Microbiol. Lett. 116, 231-236

Pospíšek M., Palková Z., Korb J., Vaněk D. (1996) Isolation and characterization of a new dsRNA virus from *Wickerhamia fluorescens*. Folia Microbiol. 41, 223-227

Preisig O., Wingfield B.D., Wingfield M.J. (1998) Coinfection of a fungal pathogen by two distinct double-stranded RNA viruses. Virology 252, 399-406

Puhalla J.E. (1968) Compatibility reactions on solid medium and interstrain inhibition in *Ustilago maydis*. Genetics 60, 461-474

Py B., Higgins C.F., Krisch H.M., Carpousis A.J. (1996) A DEAD-box RNA helicase in the *Escherichia coli* RNA degradosome. Nature 381, 169-172

Quigley G.J., Gehrke L., Roth D.A., Auron P.E. (1984) Computer-aided nucleic acid secondary structure modelling incorporating enzymatic digestion data. Nucleic Acids Res. 12, 347-366

Radler F., Herzberger S., Schönig I., Schwarz P. (1993) Investigation of a killer strain of *Zygosaccharomyces bailii*. J. Gen. Microbiol. 139, 495-500

Radler F., Pfeiffer P., Dennert M. (1985) Killer toxins in new isolates of yeasts *Hanseniaspora uvarum* and *Pichia kluyveri*. FEMS Microbiol. Lett. 29, 269-272

Radler F., Schmitt M.J., Meyer B. (1990) Killer toxin of *Hanseniaspora uvarum*. Arch. Microbiol. 154, 175-178

Ram A.F., Brekelmans S.S.C., Oehlen L.J.W.M., Klis F.M. (1995) Identification of two cell cycle regulated genes affecting the β–1,3–glucan content of cell walls in *Saccharomyces cerevisiae*. FEBS Lett. 358, 165-170

Ratti G., Buck K.W. (1975) RNA polymerase activity in double-stranded ribonucleic acid virus particles from Aspergillus foetidus. Biochim. Biophys. Res. Commun. 66, 706-711

Ratti G., Buck K.W. (1978) Semi-conservative transcription in particles of a double-stranded RNA mycovirus. Nucleic Acids Res. 5, 3843-3854

Rees B., Samma J.P., Thierry J.C., Gilbert M., Fischer J., Schweitz H., Reilly J.D., Bruenn J., Held W. (1984) Biochem. Biophys. Res. Commun. 121, 619-625

Reilly J.D., Bruenn J., Held W. (1984) The capsid polypeptides of the yeast viruses. Biochem. Biophys. Res. Commun. 121, 619-625

Revill P.A., Davidson A.D., Wright P.J. (1998) Mushroom bacilliform virus RNA: the initiation of translation at the 5' end of the genome and identification of the VPg. Virology 249, 231-237

Revill P.A., Davidson A.D., Wright P.J. (1999) Identification of a subgenomic mRNA encoding the capsid protein of Mushroom Bacilliform Virus, a single-stranded RNA mycovirus. Virology 260, 273-276

Rhee S.K., Icho T., Wickner R.B. (1989) Structure and nuclear localization signal of SKI3 antiviral protein of *Saccharomyces cerevisiae*. Yeast 5, 149-158

Ribas J.C., Fujimura T., Wickner R.B. (1994) Essential RNA binding and packaging domains of the Gag-Pol fusion protein of the L-A double-stranded RNA virus of *Saccharomyces cerevisiae*. J. Biol. Chem. 269, 28420-28428

Ribas J.C., Wickner R.B. (1996a) *Saccharomyces cerevisiae* L-BC double-stranded RNA virus replicase recognizes the L-A positive strand 3' end. J. Virol. 70, 292-297

Ribas J.C., Wickner R.B. (1996b) RNA–dependent RNA polymerase activity related to the 20S RNA replicon of *Saccharomyces cerevisiae*. Yeast 12, 1219-1228

Ribas J.C., Wickner R.B. (1998) The Gag domain of the Gag-Pol fusion protein directs incorporation into the L-A double-stranded RNA viral particles in *Saccharomyces cerevisiae*. J. Biol. Chem. 273, 9306-9311

Ridley S.P., Sommer S.S., Wickner R.B. (1984) Superkiller mutations in *Saccharomyces cerevisiae* suppress exclusion of M2 double-stranded RNA by L-A-HN and confer cold sensitivity in presence of M and L-A-HN. Mol. Cell. Biol. 4, 761-770

Ridley S.P., Wickner R.B. (1983) Defective interference in the killer system of *Saccharomyces cerevisiae*. J. Virol. 45, 800-812

Ro Y.-T., Patterson J.L. (2000) Identification of the minimal essential RNA sequences responsible for site-specific targeting of the *Leishmania* RNA virus 1-4 capsid endoribonuclease. J. Virol. 74, 130-138

Ro Y.-T., Scheffter S.M., Patterson J.L. (1997) Specific in vitro cleavage of a *Leishmania* virus capsid-RNA-dependent RNA polymerase polyprotein by a host cysteine-like protease. J. Virol. 71, 8983-8990

Rodríguez-Cousiño N., Esteban R. (1992) Both yeast W double-stranded RNA and its single-stranded form 20S RNA are linear. Nucleic Acids Res. 20, 2761-2766

Rodríguez-Cousiño N., Esteban L.M., Esteban R. (1991) Molecular cloning and characterization of W double-stranded RNA, a linear molecule present in *Saccharomyces cerevisiae*. J. Biol. Chem. 266, 12772-12778

Roemer T., Bussey H. (1991) Yeast β–glucan synthesis: *KRE6* encodes a predicted type II membrane protein required for glucan synthesis *in vivo* and for glucan synthase activity *in vitro*. Proc. natl. Acad. Sci. USA 88, 11295-11299

Roemer T., Delaney S., Bussey H. (1993) *SKN1* and *KRE6* define a pair of functional homologs encoding putative membrane proteins involved in β–glucan synthesis. Mol. Cell. Biol. 13, 4039-4048

Roemer T., Paravicini G., Payton M.A., Bussey H. (1994) Characterization of the yeast 1,6–β–glucan biosynthetic components, Kre6p and Skn1p; and genetic interactions between the *PKC1* pathway and extracellular matrix assembly. J. Cell Biol. 127, 567-579

Romaine C.P., Schlagnhaufer B. (1995) PCR analysis of the viral complex associated with La France disease of *Agaricus bisporus*. Appl. Env. Microbiol. 61, 2322-2325

Ruggieri R., Tanaka K., Nakafuku M., Kaziro Y., Toh-e A., Matsumoto K. (1989) MSI1, a negative regulator of the RAS-cAMP pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 8778-8782

Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. (1989) Molecular cloning: A laboratory manual, 2nd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York

Sanderlin R.S., Ghabrial S.A. (1978) Physicochemical properties of two distinct types of virus-like particles from *Helminthosporium victoriae*. Virology 87, 142-151

Sclafani R.A., Fangman W.L. (1984) Conservative replication of double-stranded RNA in *Saccharomyces cerevisiae* by displacement of progeny strands. Mol. Cell. Biol. 4, 1618-1626

Sepp T., Entzeroth R., Mertsching J., Hofschneider P.H., Kandolf R. (1991) Novel ribonucleic acid species in *Eimeria nieschulzi* are associated with RNA-dependent RNA polymerase activity. Parasitol. Res. 77, 581-584

Sethi N., Monteagudo M.C., Koshland D., Hogn E., Burke D.J. (1991) The CDC20 gene product of Saccharomyces cerevisiae, a beta-transducin homolog, is required for a subset of microtubule-dependent cellular processes. Mol. Cell. Biol. 11, 5592-5602

Shapira R., Choi G.H., Nuss D.L. (1991) Virus-like genetic organization and expression strategy for a double-stranded RNA genetic element associated with biological control of chestnut blight. EMBO J. 10, 731-739

Shaw D.R., Richter H., Giorda R., Ohmachi T., Ennis H.L. (1989) Nucleotide sequences of *Dictyostelium discoideum* developmentally regulated cDNAs rich in (AAC) imply proteins that contain clusters of asparagine, glutamine, or threonine. Mol. Gen. Genet. 218, 453-459

Sherman F., Moerschell R.P., Tsunasawa S., Sternglanz R. (1993) *In* Methods in Protein Sequence Analysis (Imahori K., Sakiyama F., eds.). Plenum Publishing Corp., New York, pp. 173-181

Scheidel L.M., Durbin R.K., Stollar V. (1989) SVLM21, a Sindbis virus mutant resistant to methionine deprivation, encodes an altered methyltransferase. Virology 173, 408-414

Scheffter S., Ro Y.T., Chung I.K., Patterson J.L. (1995) The complete sequence of *Leishmania* RNA virus LRV2-1, a virus of an Old World parasite strain. Virology 212, 84-90

Scheffter S., Widmer G., Patterson J.L. (1994) Complete sequence of *Leishmania* RNA virus 1 -4 and identification of conserved sequences. Virology 199, 479-483

Schiff L.A., Fields B.N. (1990) Reoviruses and their replication. *In* Virology. Fields B.N., Knipe D.M. (eds.), Raven Press, New York

Schmitt M.J. (1995) Cloning and expression of a cDNA copy of the viral K28 killer toxin gene in yeast. Mol. Gen. Genet. 246, 236-246

Schmitt M.J., Poravou O., Trenz K., Rehfeldt K. (1997) Unique double-stranded RNAs responsible for the nnti-candida activity of the yeast *Hanseniaspora uvarum*. J. Virol. 71, 8852-8855

Schmitt M.J., Radler F. (1987) Mannoprotein of the yeast cell wall as primary receptor for the killer toxin of *Saccharomyces cerevisiae* strain 28. J. Gen. Microbiol. 133, 3347-3354

Schmitt M.J., Tipper D.J. (1992) Genetic analysis of maintenance and expression of L and M double-stranded RNAs from yeast killer virus K28. Yeast 8, 373-384

Schmitt M.J., Tipper D.J. (1995) Sequence of the M28 dsRNA: preprotoxin is processed to an α/β heterodimeric protein toxin. Virology 213, 341-351

Shapiro B.A., Maizel J., Lipkin L.E., Currey K., Whitney C. (1984) Generating non-overlapping displays of nucleic acid secondary structure. Nucleic Acid Res. 12, 75-88

Shaw A.L., Samal S.K., Subramanian K., Prasad B.V.V. (1996) The structure of aquareovirus shows how the different geometries of the two layers of the capsid are reconciled to provide symmetrical interactions and stabilization. Structure (Lond.) 4, 957-967

Shen Y., Bruenn J.A. (1993) RNA structural requirements for RNA binding, replication and packaging in the yeast double-stranded RNA virus. Virology 195, 481-491

Sikorski R.S., Boguski M.S., Goebl M., Hieter P. (1990) A repeating amino acid motif in CDC23 defines a family of proteins and a new relationship among genes required for mitosis and RNA synthesis.

Cell 60, 307-317

Skipper N., Bussey H. (1977) Mode of action of yeast toxins: energy requirement for *Saccharomyces cerevisiae* killer toxin. J. Bacteriol. 129, 668-677

Skripkin E.A., Jacobson A.B. (1993) A two-dimensional model at the nucleotide level for the central-hairpin of coliphage Qβ RNA. J. Mol. Biol. 233, 245-260

Slavík J. (1983) Intracellular pH topography: determination by a fluorescent probe. FEBS Lett. 156, 227-230

Smart C.D., Yuan W., Foglia R., Nuss D.L., Fulbright D.W., Hillman B.I. (1999) *Cryphonectria hypovirus* 3, a virus species in the family *Hypoviridae* with a single open reading frame. Virology 265, 66-73

Smith A.J., Srinivasakumar N., Hammarskjold M.-L., Rekosh D. (1993) Requirements for incorporation of Pr160gag-pol from human immunodeficiency virus type 1 into virus-like particles. J. Virol. 67, 2266-2275

Smith T.F., Gaitatzes C., Saxena K., Neer E.J. (1999) The WD-repeat: A common architecture for diverse functions. Trends Biochem. Sci. 24, 181-185

Soldevila A.I., Huang S., Ghabrial S.A. (1998) Assembly of the Hv190S totivirus capsid is independent of posttranslational modification of the capsid protein. Virology 251, 327-333

Soldevila A.I., Ghabrial S.A. (2000) Expression of the Totivirus *Helmintosporium victoriae* 190S virus RNA-dependent RNA polymerase from its downstream open reading frame in dicistronic constructs. J. Virol. 74, 997-1003

Soldevila A.I., Havens W.M., Ghabrial S.A. (2000) A cellular protein with an RNA-Binding activity co–purifies with viral dsRNA from mycovirus–infected *Helmintosporium victoriae*. Virology 272, 183-190

Somogyi P., Jenner A.J., Brierley I., Inglis S.C. (1993) Ribosomal pausing during translation of an RNA pseudoknot. Mol. Cell. Biol. 13, 6931-6940

Sommer S.S., Wickner R.B. (1981) [HOK] and [NEX] are related plasmids and further evidence that M1 requires L. *In* The molecular biology of yeasts, Abstracts (Hicks J.B., Klar A., Nasmyth K., Strathern J.N., eds.), Cold Spring Harbor, New York, p. 200

Sommer S.S., Wickner R.B. (1982a) Yeast L dsRNA consists of at least three distcinct RNAs: evidence that the non-Mendelian genes [HOK], [NEX] and [EXL] are on one of these dsRNAs. Cell 31, 429-441

Sommer S.S., Wickner R.B. (1982b) Co-curing of plasmids affecting killer dsRNAs of *Saccharomyces cerevisiae*: [HOK], [NEX], and the abundance of L are related and further evidence that M1 requires L. J. Bacteriol. 150, 545-551

Sommer S.S., Wickner R.B. (1984) Double-stranded RNAs that encode killer toxins in *Saccharomyces cerevisiae*: Unstable size of M double-stranded RNA and inhibition of M2 replication by M1. Mol. Cell. Biol. 4, 1747-1753

Sommer S.S., Wickner R.B. (1987) Gene disruption indicates that the only essential function of the SKI8 gene is to protect *Saccharomyces cerevisiae* from viral cytopathology. Virology 157, 252-256

Somers J.M. (1973) Isolation of suppressive mutants from killer and neutral strains of *Saccharomyces cerevisiae*. Genetics 74, 571-579

Steiner D.F., Smeekens S.P., Ohagi S., Chan S.J. (1992) The new enzymology of precursor processing endoproteases. J. Biol. Chem. 267, 23435-23438

Stepien P.P., Margossian S.P., Landsman D., Butow R.A. (1992) The yeast nuclear gene suv3 affecting mitochondrial post-transcriptional processes encodes a putative ATP-dependent RNA helicase. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 6813-6817

Stevens A. (1980) Purification and characterization of a *Saccharomyces cerevisiae* exoribonuclease which yields 5' mononucleotides by a 5'$\rightarrow$3' mode of hydrolysis. J. Biol. Chem. 255, 3080-3085

Stratford M. (1994) Another brick in the wall? Recent developments concerning the yeast cell envelope. Yeast 10, 1741-1752

Strauss E.E., Lakhsman D.K., Tavantzis S.M. (2000) Molecular characterization of the genome of a partitivirus from the basidiomycete *Rhizoctonia solani*. J. Gen. Virol. 81, 549-555

Stuart K.D., Weeks R., Guilbride L., Myler P.J. (1992) Molecular organization of *Leishmania* RNA virus 1. Proc. natl. Acad. Sci. USA 89, 8596-8600

Sturley S.L., Elliot Q., Le Vitre J., Tipper D.J., Bostian K.A. (1986) Mapping of functional domains within the *Saccharomyces cerevisiae* type 1 killer preprotoxin. EMBO J. 5, 3381-3389

Sweeney T.K., Tate A., Fink G.R. (1976) A study of the transmission and structure of double-stranded RNAs associated with the killer phenomenon in *Saccharomyces cerevisiae*. Genetics 84, 27-42

Tai J., Ip C. (1995) The cDNA sequence of *Trichomonas* virus-T1 double-stranded RNA. Virology 206, 773-776

Tao J., Ginsberg I., Banerjee N., Held W., Koltin Y., Bruenn J.A. (1990) The *Ustilago maydis* killer toxin: structure, expression in *Saccharomyces cerevisiae* and relationship to other cellular toxins. Mol. Cell. Biol. 10, 1373-1381

Tercero J.C., Wickner R.B. (1992) *MAK3* encodes an N–acetyltransferase whose modification of the L-A gag N-terminus is necessary for virus particle assembly. J. Biol. Chem. 267, 20277-20281

Tercero J.C., Riles L.E., Wickner R.B. (1992) Localized mutagenesis and evidence for post-transcriptional regulation of *MAK3*, a putative N–acetyltransferase required for dsRNA virus propagation in *Saccharomyces cerevisiae*. J. Biol. Chem. 267, 20270-20276

Tercero J.C., Dinman J.D., Wickner R.B. (1993) Yeast *MAK3* N–acetyltransferase recognizes the N–terminal 4 aminoacids of the major coat protein (Gag) of the L-A double-stranded RNA virus. J. Bacteriol. 175, 3192-3194

Thiele D.J., Leibowitz M.J. (1982) Structural and functional analysis of separated strands of killer double-stranded RNA of yeast. Nucl. Acids Res. 10, 6903-6918

Thiele D.J., Wang R.W., Leibowitz M.J. (1982) Separationand sequence of the 3' termini of M double-stranded RNA from killer yeast. Nucl. Acids Res. 10, 1661-1678

Thiele D.J., Hannig E.M., Leibowitz M.J. (1984a) Multiple L double-stranded RNA species of *Saccharomyces cerevisiae*: Evidence for separate encapsidation. Mol. Cell. Biol. 4: 92-100

Thiele D.J., Hannig E.M., Leibowitz M.J. (1984b) Genome structure and expression of a defective mutant of the killer virus od yeast. Virology 137, 20-31

Thrash C., Voelkel K., DiNardo S., Sternglanz R. (1984) Identification of *Saccharomyces cerevisiae* mutants deficient in DNA topoisomerase I. J. Biol. Chem. 259, 1375-1379

Tipper D.J., Bostian K.A. (1984) Double-stranded ribonucleic acid killer systems in yeasts. Microb. Rev. 48, 125-156

Tipper D.J., Schmitt M.J. (1991) Yeast dsRNA viruses: replication and killer phenotypes. Mol. Microbiol. 5, 2331-2338

Tishkoff D.X., Johnson A.W., Kolodner R.D. (1991) Molecular and genetic analysis of the gene encoding the *Saccharomyces cerevisiae* strand exchange protein Sep1. Mol. Cell. Biol. 11, 2593-2608

Toh-e A., Guerry P., Wickner R.B. (1978) Chromosomal superkiller mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. J. Bacteriol. 136, 1002-1007

Toh-e A., Sahashi Y. (1985) The PET18 locus of *Saccharomyces cerevisiae*: a complex locus containing multiple genes. Yeast 1: 159-172

Toh-e A., Wickner R.B. (1979) A mutant killer plasmid whose replication depends on a chromosomal superkiller mutation. Genetics 91, 673-682

Toh-e A., Wickner R.B. (1980) Superkiller mutations suppress chromosomal mutations affecting double-stranded RNA killer plasmid replication in *Saccharomyces cerevisiae*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 527-530

Tréton B.Y., Le dall M.-T., Heslot H. (1985) Virus-like particles from the yeast *Yarrowia lipolytica*. Curr. genet. 9, 279-284

Tu C., Tzeng T.-H., Bruenn J.A. (1992) Ribosomal movement impeded at a pseudoknot required for ribosomal frameshifting. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 8636-8640

Tung J.S., Knight C.A. (1971) Effect of charge on the determination of molecular weight of proteins by gel electrophoresis in SDS. Biochem. Biophys. Res. Commun. 42, 1117-1121

Tyagi A., Wickner R.B., Tabor C.W., Tabor H. (1984) Specifity of polyamine requirements for the replication and maintenance of different double-stranded RNA plasmids in *Saccharomyces cerevisiae*. Proc. natl. Acad. Sci. USA 81, 1149-1153

Tzeng T., Tu C., Bruenn J. (1992) Ribosomal frameshifting requires a pseudoknot in the *Saccharomyces cerevisiae* double-stranded RNA virus. J. Virol. 66, 999-1006

Uemura H., Wickner R.B. (1988) Suppression of chromosomal mutations affecting M1 virus replication in *Saccharomyces cerevisiae* by a variant of a viral RNA segment (L-A) that encodes coat protein. Mol. Cell. Biol. 8, 938-944

Ushiyama R., Nakai Y., Ikegami M. (1977) Evidence for double-stranded RNA from polyhedral virus-like particles in *Lentinus edodes* (Berk.) Sing. Virology 77, 880-883

Valle R.P.C., Wickner R.B. (1993) Elimination of L-A double-stranded RNA virus of *Saccharomyces cerevisiae* by expression of gag and gag-pol from an L-A cDNA clone. J. Virol. 67, 2764-2771

van der Lende T.R., Duitman E.H., Gunnewijk M.G.W., Yu L., Wessels J.G.H. (1996) Functional analysis of dsRNAs (L1, L3, L5, and M2) associated with isometric 34-nm virions of *Agaricus bisporus* (White Button Mushroom). Virology 217, 88-96

van der Voorn L., Ploegh H.L. (1992) The WD-40 repeat. FEBS Lett. 307, 131-134

van Ness B.G., Howard J.B., Bodley J.W. (1980) ADP–ribosylation of elongation factor 2 by diphteria toxin. J. Biol. Chem. 255, 10710-10716

van Ryk D.I., Lee Y., Nazar R.N. (1990) Efficient expression and utilization of mutant 5S rRNA in *Saccharomyces cerevisiae*. J. Biol. Chem. 265, 8377-8381

Varga J., Kevei F., Vagvolgyi C., Vriesema A., Croft J.H. (1994) Double-stranded RNA mycoviruses in section Nigri of the *Aspergillus* genus. Can. J. Microbiol. 40, 325-329

Vilches S., Castillo A. (1997) A double-stranded RNA mycovirus in *Botrytis cinerea*. FEMS Microbiol. Lett. 155, 125-130

Vodkin M. (1977) Induction of yeast killer factor mutations. J. Bacteriol. 132, 346-348

Vodkin M., Katterman F., Fink G.R. (1974) Yeast killer mutants with altered double-stranded ribonucleic acids. J. Bacteriol. 117, 681-686

von Magnus P. (1954) Incomplete forms of influenza virus. Adv. Virus. Res. 2, 59-79

Wagner J.C., Wolf D.H. (1987) Hormone (pheromone) processing enzymes in yeast. The carboxy-terminal processing enzyme of the mating pheromone alpha-factor, carboxypeptidase ysc alpha, is absent in alpha-factor maturation-defective kex1 mutant cells. FEBS Lett. 221, 423-426

Wang A.L., Yang H.-M., Shen K.A., Wang C.C. (1993) Giardiavirus double-stranded RNA genome encodes a capsid polypeptide and a gag-pol–like fusion protein by a translation frameshift. Proc. natl. Acad. Sci. USA 90, 8595-8599

Wang A.L., Wang C.C. (1986) Discovery of a specific double-stranded RNA virus in *Giardia lamblia*. Mol. Biochem. Parasitol. 21, 269-276

Weinstein L.A., Capaldo-Kimbal F., Leibowitz M.J. (1993) Genetics of heat-curability of killer virus of yeast. Yeast 9, 411-418

Welsh J.D., Leibowitz J.M. (1982) Localization of genes for the double-stranded RNA killer virus. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 786-789

Wesolowsky M., Wickner R.B. (1984) Two new double-stranded RNA molecules showing non-mendelian inheritance and heat inducibility in *Saccharomyces cerevisiae*. Mol. Cell. Biol. 4, 181-187

Wessel D., Flugge U.I. (1984) A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids. Anal. Biochem. 138, 141-143

Whiteway M., Hougan L., Dignard D., Thomas D.Y., Bell L., Saari G.C., Grant F.J., O'Hara P., MacKay V.L. (1989) The STE4 and STE18 genes of yeast encode potential β and γ–subunits of the mating factor receptor-coupled G protein. Cell 56, 467-477

Whiteway M., Dignard D., Vernet T., Thomas D.Y. (1994) Molecular genetics and applications to biotechnology and medicine. *In* Viruses of simple eukaryotes (Leibowitz M.J., Koltin Y., Rubio V., eds.). The University of Delaware Press, Newark, Delaware

Wickner R.B. (1974a) "Killer character" of *Saccharomyces cerevisiae*: curing by growth at elevated temperature. J. Bacteriol. 117, 1356-1357

Wickner R.B. (1974b) Chromosomal and nonchromosomal mutations affecting the "killer" character of *Saccharomyces cerevisiae*. Genetics 76, 423-432

Wickner R.B. (1977a) Deletion of mitochondrial DNA bypassing a chromosomal gene needed for maintenance of the killer plasmid of yeast. Genetics 87, 441-452

Wickner R.B. (1977b) Twenty-six chromosomal genes needed to maintain the killer double-stranded RNA plasmid of *Saccharomyces cerevisiae*. Genetics 88, 419-425

Wickner R.B. (1979) The killer-double-stranded RNA plasmids of yeast. Plasmid 2, 303-322

Wickner R.B. (1980) Plasmids controlling exclusion of the K2 killer double-stranded RNA plasmid of yeast. Cell 21, 217-226

Wickner R.B. (1981) Killer systems in *Saccharomyces cerevisiae*. *In* The molecular biology of the yeast *Saccharomyces* (Stratherm J.N., Jones E.W., Broach J.R., eds.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, pp. 415-444

Wickner R.B. (1983a) Killer systems in *Saccharomyces cerevisiae*: three distinct modes of exclusion of M2 double-stranded RNA by three species of double-stranded RNA, M1, L-A-E and L-A-HN. Mol. Cell. Biol. 3, 654-661

Wickner R.B. (1983b) Genetic control of replication of the double-stranded RNA segments of the killer systems in *Saccharomyces cerevisiae*. Arch. Biochem. Biophys. 222, 1-11

Wickner R.B. (1986) Double-stranded RNA replication in yeast: the killer system. Annu. Rev. Biochem. 55, 373-395

Wickner R.B. (1987) MKT1, a nonesential *Saccharomyces cerevisiae* gene with a temperature-dependent effect on replication of M2 double-stranded RNA. J. Bacteriol. 169, 4941-4945

Wickner R.B. (1988) Host function of MAK16: G1 arrest by a *mak16* mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 6007-6011

Wickner (1990) Yeast RNA virology: the killer system. *In* The molecular and cellular biology of the yeast *Saccharomyces* (Jones E.W., Broach J.R., Pringle J.R., eds.), Cold Spring Harbor, New York

Wickner R.B. (1991) Yeast RNA virology: The killer systems. *In* The molecular and cellular biology of the yeast Saccharomyces – Genome dynamics, protein synthesis and energetics (Broach J.R., Pringle J.R., Jones E.W., eds.), vol. 1, Cold Spring Harbor Laboratory Press, pp. 263-296

Wickner R.B. (1992) Double-stranded and single-stranded RNA viruses of *Saccharomyces cerevisiae*. Annu. Rev. Microbiol. 46, 347-375

Wickner R.B. (1995) Non-mendelian genetics elements in *Saccharomyces cerevisiae*. RNA viruses, 2 μm DNA, ψ, [URE3], 20S RNA and other wonders of nature. *In* The yeasts (Wheals A.E., Rose A.H., Harrison J.S., eds.), vol. 6, Academic Press, London, San Diego, New York, pp. 309-356

Wickner R.B. (1996) Double-stranded RNA viruses of *Saccharomyces cerevisiae*. Microbiol. Rev. 60, 250-265

Wickner R.B., Leibowitz M.J. (1979) *mak* mutants of yeast: mapping and characterization. J. Bacteriol. 140, 154-160

Wickner R.B., Toh-e A. (1982) [HOK], a new yeast non-Mendelian trait, enables a replication-defective killer plasmid to be maintained. Genetics 100, 159-174

Wickner R.B, Koh T.J, Crowley J.C, O'Neil J., Kaback D.B. (1987) Molecular cloning of chromosome I DNA from *Saccharomyces cerevisiae*: isolation of the *MAK16* gene and analysis of an adjacent gene essential for growth at low temperatures. Yeast 3, 51-57

Wickner R.B., Ridley S.P., Fried H.M., Ball S.G. (1982) Ribosomal protein L3 is involved in replication or maintenance of the killer double-stranded RNA genome of *Saccharomyces cerevisiae*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 4706-4708

Wickner R.B., Icho T., Fujimura T., Widner W.R. (1991) Expression of yeast L-A double-stranded RNA virus proteins produces derepressed replication: a ski^{-} phenocopy. J. Virol. 65, 155-161

Wickner R.B., Toh-e A. (1982) [HOK], a new yeast non-Mendelian trait, enables a replication-defective killer plasmid to be maintained. Genetics 100, 159-174

Widmer G. (1993) RNA circularization reveals terminal sequence heterogeneity in a double-stranded RNA virus. Virology 193, 11-15

Widner W.R., Matsumoto Y., Wickner R.B. (1991) Is 20S RNA naked? Mol. Cell. Biol. 11, 2905-2908

Widner W.R., Wickner R.B. (1993) Evidence that the SKI antiviral system of *Saccharomyces cerevisiae* acts by blocking expression of viral mRNA. Mol. Cell. Biol. 13, 4331-4341

Williams T.L., Leibowitz M.J. (1987) Conservative mechanism of the in vitro transcription of killer virus of yeast. Virology 158, 231-234

Williams F.E., Trumbly R.J. (1990) Characterization of TUP1, a mediator of glucose repression in *Saccharomyces cerevisiae*. Mol. Cell. Biol. 10, 6500-6511

Wingfield B.D., van Vuuren H.J.J., Pretorius I.S. (1989) Size differentiation of M2 genomes among K2 killer yeasts. Mycol. Res. 92, 364-367

Wingfield B.D., Southgate V.J., Pretorius I.S., van Vuuren H.J.J. (1990) A K2 neutral *Saccharomyces cerevisiae* strain contains a variant K2 M genome. Yeast 6, 159-169

Woods D.R., Bevan E.A. (1968) Studies on the nature of the killer factor produced by *Saccharomyces cerevisiae*. J. Gen. Microbiol. 51, 115-126

Woolford J.L., Warner J.R. (1991) The ribosome and its synthesis. *In* The molecular and cellular biology of the yeast *Saccharomyces* – Genome dynamics, protein synthesis and energetics (Broach J.R., Pringle J.R., Jones E.W., eds.), vol. 1, Cold Spring Harbor laboratory Press, pp. 587-626

Wu C.-H., Wang C.C., Yang H.-M., Wang A.L. (1995) Sequences at four termini of the giardiavirus double-stranded RNA. Gene 158, 129-131

Xie W.S., Antoniw J.F., White R.F. (1993) Nucleotide sequence of beet cryptic virus 3 dsRNA2 which encodes a putative RNA-dependent RNA polymerase. J. Gen. Virol. 74, 1467-1470

Yao J.M., Tainter F.H. (1996) Virus-like particles from *Discula destructiva*. Can. J. Plant. Pathol. 18, 433-438

Young T.W. (1987) Killer yeasts. *In* The yeasts (Rose A.H., Harisson J.S., eds.), New York, Academic Press, pp. 131-164

Yu D., Wang C.C., Wang A.L. (1995a) Maturation of *Giardiavirus* capsid protein involves post-translational proteolytic processing by a cysteine protease. J. Virol. 69, 2825-2830

Yu D.-C., Wang A.L., Wu C.-H., Wang C.C. (1995b) Virus-mediated expression of firefly luciferase in the parasitic protozoan *Giardia lamblia*. Mol. cell. Biol. 15, 4867-4872

Zabalgogeazcoa I., Petrunak D., Christ B.J., Gildow F.E. (1997) Unencapsidated double-stranded RNA associated with membrane vesicles in isolates of *Alternaria solani*. Mycol. res. 101, 604-608

Zakian V.A., Wagner D.W., Fangman W.L. (1981) Yeast L double–stranded ribonucleic acid is synthesized during the G1 phase but not the S phase of the cell cycle. Mol. Cell. Biol. 1, 673-679

Zanchin N.I., Goldfarb D.S. (1999) The exosome subunit Rrp43p is required for the efficient maturation of 5.8S, 18S and 25S rRNA. Nucleic Acids Res. 27, 1283-1288

Zhu H., Bussey H. (1991) Mutational analysis of the functional domains of yeast K1 killer toxin. Mol. Cell. Biol. 11, 175-181

Zhu Y.-S., Zhang X.-Y., Cartwright C.P., Tipper D.J. (1992) *KEX2*–dependent processing of yeast K1 killer preprotoxin includes cleavage at ProArg–44. Mol. Microbiol. 6, 511-520

Zhu H., Bussey H., Thomas D.Y., Gagnon J., Bell A.W. (1987) Determination of the carboxyl termini of the α and β subunits of yeast K1 killer toxin. J. Biol. Chem. 262, 10728-10732

Zhu Y.-S., Kane J., Zhang X.-Y., Zhang M., Tipper D.J. (1993) Role of the γ component of preprotoxin in expression of the yeast K1 killer phenotype. Yeast 9, 251-266

Zorg J., Kilian S., Radler F. (1988) Killer toxin producing strains of the yeasts *Hanseniaspora uvarum* and *Pichia kluyveri*. Arch. Microbiol. 149, 261-267

Zuker M. (1998) On finding all suboptimal foldings of an RNA molecule. Science 244, 48-52

Zuker M. (1994) Prediction of RNA secondary structure by energy minimization. *In* Copmputer analysis of sequence data. Meth. Mol. Biol. 25, 267-294

Zuker M., Jacobson B. (1998) Using reliability information to annotate RNA secondary structures. RNA 4, 669-679

Zuker M., Jaeger J.A., Turner D.H. (1991) A comparison of optimal and suboptimal RNA secondary structures predicted by free energy minimization with structures determined by phylogenetic comparison. Nucleic Acids Res. 19, 2707-2714

Zuker M., Mathews D.H., Turner D.H. (1999) Algorithms and Thermodynamics for RNA Secondary Structure Prediction: a practical guide in RNA biochemistry and biotechnology (Barciszewski J., Clark B.F.C., eds.), NATO ASI Series, Kluwer Academic Publishers

Kapitola 8

Seznam použitých zkratek

7mGMP — 7-metyl-guanosinmonofosfát
AbV — virus *Agaricus bisporus*
AsV — virus *Atkinsonela hypoxilon*
BcV3 — "beet cryptic virus 3"
CP — kapsidový protein
CpV — virus *Cryphonectria parasitica*
dsRNA — dvouřetězcová RNA
EnV — virus *Eimeria nieschulzi*
FupoV — virus *Fusarium poae*
FusoV — virus *Fusarium solani*
GlV — virus *Giardia lamblia*
HvV — virus *Helmintosporium victoriae*
kb — kilobáze
kbp — páry kilobází
kDa — kilo Dalton = 1000 Daltonů, 1 Da odpovídá hmotnosti atomu vodíku
LRV1 — RNA virus 1 *Leishmania*
LRV2 — RNA virus 2 *Leishmania*
DMSO — dimetylsulfoxid používaný k denaturaci nukleových kyselin
MLRF — proteinová sekvence Met–Leu–Arg–Phe
PAA — polyakrylamid používaný při elektroforetickém dělení proteinů
PMSF — inhibitor proteáz
PvV — virus *Phaseolus vulgaris*
RDRP — RNA dependentní RNA polymeráza
rpm — počet otáček za minutu (angl. rotation per minute)
ScV-L-A — L-A virus kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*
ScV-M — M "virus" kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*, jedná se přesněji jen o M dsRNA molekuly zabalené v kapsidě proteinů kódovaných ScV-L-A
SDS — detergent sodiumdodecylsulfát, laurylsulfát sodný
SDS-PAGE — eletroforéza proteinů v diskontinuálním prostředí obsahujícím detergent SDS
ssRNA — jednořetězcová RNA
TAE — pufr pro agarózovou elektroforézeu obsahující chemikálie Tris, Acetát, EDTA
TPCK — inhibitor proteáz
TVV1 — virus *Trichomonas vaginalis*
UmV-L — L virus *Ustilago maydis*
UmV-M1 — M1 virus *Ustilago maydis*

Seznam tabulek

1 Chromozomální geny nutné k propagaci totivirů *Saccharomyces cerevisiae* a jejich satelitní dsRNA. 29
2 Vzájemné vztahy mezi (KIL-b) a některými *mak* a *ski* mutacemi. 34
3 Tabulka *mof* mutací ovlivňujících přítomnost M1 dsRNA a růst buněk. 37
4 Orientační stanovení produkce inhibitoru *Dipodascus magnusii* do média a jeho stabilita v čase. 77
5 Léčení *Dipodascus magnusii* UV zářením. 98

Seznam obrázků

1 Schéma genomové struktury L-A viru 13
2 Schéma replikačního cyklu L-A viru a jeho satelitních dsRNA 17
3 Srovnání sekundárních struktur 3' konců $(+)$ L-A, M1 a M28 ssRNA 19
4 Sekundární struktura 3' konce $(+)$ L-A ssRNA mapovaná S1 nukleázou 21
5 Mapování 5' konce genomové $(+)$ L-A ssRNA pomocí S1 nukleázy 21
6 Sekundární struktura 5' konce $(+)$ M1 dsRNA 23
7 Sekundární struktura 3' konce $(-)$ M1 dsRNA 23
8 Mapování 5' konce genomové $(+)$ M1 ssRNA pomocí S1 nukleázy 24
9 Sekundární struktura 5' konce $(+)$ M1 dsRNA mapovaná S1 nukleázou 24
10 Sekundární struktura 5' konce $(+)$ M2 ssRNA mapovaná S1 a T1 nukleázou 26
11 Funkce *SKI2*, *SKI3*, *SKI8* genů v translaci 32
12 Schéma pseudouzlové struktury 36
13 Schéma struktury K1 (prepro)toxinu 39
14 Srovnání struktury K1 a K28 (prepro)toxinů 45
15 Proměnlivost sekundárních struktur RNA colifága Qβ 58
16 Proměnlivost sekundárních struktur 60
17 Různá zobrazení pseudouzlové struktury 60
18 Trojúhelníkový záznam 1 (Dot Plot 1). 61
19 Trojúhelníkový záznam 2. (Dot Plot 2) 61
20 Zobrazení možných uzlových struktur (Dot Plot 3) 62
21 Kruhová reprezentace sekundárních struktur 62
22 Kruhová reprezentace sekundárních struktur 2 63
23 Porovnání některých pseudouzlových struktur obsažených v genech více organizmů . . 67
24 Růstová křivka *Dipodascus magnusii* při teplotě 28 °C. 76
25 Růstová křivka *Dipodascus magnusii* při teplotě 30 °C. 76
26 Křivka přežití *Dipodascus magnusii* při teplotě 35 °C. 82
27 Komínkový test: inhibiční zóna na OA a YPDA misce. 83
28 Citlivost komínkového testu při teplotě 18 °C – lepší provedení. 83
29 Citlivost komínkového testu při teplotě 18 °C – horší provedení. 84
30 Růstová křivka *Pichia anomala* při teplotě 18 °C. 85
31 Růstová křivka *Pichia anomala* při teplotě 28 °C. 85
32 Růstová křivka *Pichia anomala* při teplotě 18 °C. 86
33 Semilogaritmické vynesení růstové křivky na **Obrázku 32**. 86
34 Růst *Pichia anomala* při teplotě 18 °C v 92 %-ním postkultivačním médiu *D. magnusii*. 87
35 Růst *Pichia anomala* při teplotě 18 °C v různě koncentrovaném postkultivačním médiu *D. magnusii*. 88

36 Časový průřez grafem na **Obrázku 35** zobrazujícím růstové křivky *Pichia anomala* při teplotě 18 °C v YPD médiu obsahujícím 92–0 % postkultivačního média. 89
37 Růst *Pichia anomala* při teplotě 18 °C v YPD médiu obsahujícím 93–0 % postkultivačního média *D. magnusii*. 90
38 Zvětšení spodní části grafu na **Obrázku 37**: Růst *Pichia anomala* při teplotě 18 °C v YPD médiu obsahujícím 93–0 % postkultivačního média *D. magnusii*. 91
39 Zvětšení horní části grafu na **Obrázku 37**: Růst *Pichia anomala* při teplotě 18 °C v YPD médiu obsahujícím 93–0 % postkultivačního média *D. magnusii*. 92
40 Semilogaritmické vynesení grafu na **Obrázku 37** zobrazujícího růst *Pichia anomala* při teplotě 18 °C v YPD médiu obsahujícím 93–0 % postkultivačního média *D. magnusii*. 93
41 Časový průřez grafem na **Obrázku 37** obsahujícím růstové křivky *Pichia anomala* při teplotě 18 °C v YPD médiu obsahujícím 93–0 % postkultivačního média *D. magnusii*. 94
42 Růst *Pichia anomala* při teplotě 28 °C v YPD médiu obsahujícím 93–0 % postkultivačního média *D. magnusii*. 95
43 Semilogaritmické vynesení grafu na **Obrázku 42** zobrazujícího růst *Pichia anomala* při teplotě 28 °C v YPD médiu obsahujícím 93–0 % postkultivačního média *D. magnusii*. 96
44 Časový průřez grafem na **Obrázku 42** obsahujícím růstové křivky *Pichia anomala* při teplotě 28 °C v YPD médiu obsahujícím 93–0 % postkultivačního média *D. magnusii*. 97
45 Křivka přežití *Dipodascus magnusii* po léčení 5–fluorouracilem. 99
46 Chromatografická separace virových částic v prostředí 1 mM EDTA: agarózová elektroforéza frakcí. 101
47 Chromatografická separace virových částic v prostředí 1 nebo 10 mM EDTA: SDS–PAGE. 102
48 Chromatografická separace virových částic v prostředí 1 resp. 10 mM EDTA: agarózová elektroforéza frakcí. 103
49 Profil absorbancí frakcí sbíraných z kolonky promývané pufrem VPB obsahujícím 1 nebo 10 mM EDTA. 104
50 Centrifugace virových částic v gradientu CsCl obsažených po předchozí mrazové izolaci v supernatantu 20 000 g (VPB/1 mM EDTA). 105
51 Agarózová elektroforéza CsCl frakcí rozdělených gradientovou centrifugací v prostředí 1 mM EDTA. 106
52 Virová dsRNA na izolačním gelu. 106
53 Vzorky 1, 2, 4, 5: Purifikace různě předčištěného dsRNA viru v gradientu CsCl v prostředí 1 mM EDTA. 108
54 Vzorek 6: Purifikace dsRNA viru v gradientu CsCl v prostředí 1 mM EDTA. 109
55 Vzorek 2: Agarózová elektroforéza vzorku 2 (frakcí získaných centrifugací 11. frakce v prostředí 1 mM EDTA). 110
56 Vzorek 6: Agarózová elektroforéza vzorku 6 (frakcí získaných první centrifugací 20 000 g supernatantu obsahujícího virus v gradientu CsCl v prostředí 1 mM EDTA). 110
57 SDS–PAGE elektroforéza frakcí získaných centrifugací vzorku 2. 111
58 SDS–PAGE elektroforéza frakcí získaných centrifugací vzorku 6. 111
59 Dvojnásobná purifikace viru v pufru obsahujícím 10 mM EDTA. Obrázek gradientu CsCl. 112
60 Agarózová elektroforéza CsCl frakcí po dvojnásobné centrifugaci v pufru obsahujícím 10 mM EDTA. 114
61 SDS-PAGE elektroforéza proteinů obsažených v CsCl frakcích po dvojnásobné centrifugaci v pufru obsahujícím 10 mM EDTA. 114
62 Sekundární struktura ScV-M1 (+) ssRNA 116

Příloha A

Abstrakt přednášky na konferenci Tomáškovy dny

Metodu stanovení aktivity inhibitoru v mikrotitrační destičce jsem prezentoval formou přednášky na konferenci Tomáškovy dny 2000, 7.–9. června 2000 v Brně. Přikládám abstrakt publikovaný ve sborníku konference.

Příloha B

Sekvence dsRNA virů a jejich satelitních dsRNA v databázi GenBank

- virus *Agaricus bisporus* (AbV): U62640 (503 b), U62643 (1101 b), X94361 (3396 b), X94362 (2455 b)
- virus *Atkinsonela hypoxilon* (AsV): L39127 (1790 b), L39126 (2135 b), L39125 (2180 b)
- “beet cryptic virus 3” (BcV): S63913 (1607 b)
- virus *Cryphonectria parasitica* (CpV): M57938 (12734 b), L29010 (12507 b), S86978 (760 b), S86972 (500 b), X04989 (157 b), X14524 (2799 b), X14525 (853 b), AF188514, AF188515
- virus *Eimeria nieschulzi* (EnV): L25869 (126 b)
- virus *Fusarium solani* (FusoV): D55668 (1645 b), D55669 (1445 b)
- virus *Fusarium poae* (FupoV): AF015924 (2185 b), AF047013 (2203 b)
- virus *Giardia lamblia* (GlV): L13218 (6277 b)
- RNA virus 1 *Leishmania* (LRV1): M92355 (5284 b), U23810 (218 b), L39069 (214 b), U01899 (5283 b), S55314 (74 b), S56484 (223 b)
- RNA virus 2 *Leishmania* (LRV2): L41164 (484 b), U32108 (5241 b), L39070 (218 b)
- virus *Phaseolus vulgaris* (PvV): X16637 (630 b)
- L-A virus *Saccharomyces cerevisiae* (ScV-L-A): M24336 (819 b), X02232=M24336 (819 b), J04692 (4579 b), M28353=X13426 (4580 b)
- X dsRNA: J03234 (530 b)
- L-BC virus *Saccharomyces cerevisiae* (ScV-L-BC=ScV-La): SCU01060 (4615 b), X54405 (737 b)
- M1 dsRNA: SCU78817=U78817=NC001782 (1801 b), X00285 (1080 b), M35150 (612 b), K02042 (1010 b), M12522 (67 b), J01338=M10999 (291 b), J01337=M10998 (262 b)

- S3 dsRNA: M10762 (313 b)
- S14 dsRNA: M12718 (793 b)
- M2 dsRNA: X03535 (209 b), X54154 (1163 b), X56604 (1131 b), S88081 (1163 b)
- M28 dsRNA: X78054 (50 b), X78053 (50 b)
- virus 1 *Trichomonas vaginalis* (TVV1): U30166 (616 b), U30167 (688 b), U57898 (4648 b), U15991 (497 b), U08999 (4647 b), S62744 (382 b)
- L virus *Ustilago maydis* (UmV-L): U01059 (6099 b)
- M virus *Ustilago maydis* (UmV-M): L12226 (1006 b), U25179 (576 b), A22743 (288 b), A22745 (337 b)
- M1 virus *Ustilago maydis* (UmV-M1): M63149=M27419 (1504 b), L76358 (1034 b)
- M2 virus *Ustilago maydis* (UmV-M2): M27418 (1234 b), S59590 (1234 b), M59589 (1234 b)

Některé další sekvence jsou zmíněny v kapitolách věnovaných danému viru, případně dsRNA (např. W a T dsRNA).