

Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze

Katedra fyziologie rostlin

Dimitrij Tyč

Využití IRES sekvencí při expresi proteinů v rostlinách



Bakalářská práce

Praha, 2009

Školitel: RNDr. Karel J. Angelis, CSc.

Konzultant: RNDr. Lukáš Fischer, PhD.

Poděkování

Chtěl bych poděkovat zejména vedoucímu své bakalářské práce RNDr. Karlovi J. Angelisovi, CSc. za odborné vedení. Velký dík patří také konzultantovi RNDr. Lukáši Fischerovi, PhD. za podnětné připomínky.

Dále děkuji svým rodičům za podporu při studiu a také své sestře za mnohé konzultace.

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracoval samostatně, s použitím všech uvedených literárních zdrojů a souhlasím s jejím zveřejněním.

V Praze dne 5. srpna 2009

.....

Dimitrij Tyč *m.p.*

Seznam použitých zkratek

A	Adenin
AMK	Aminokyselina
BiP	Imunoglobulin heavy chain Binding Protein (protein vážící se k těžkému řetězci imunoglobulinu)
C	Cytosin
5'-cap	5'-cap struktura na 5'-konci většiny eukaryotických mRNA (7-methylguanosenová čepička)
CAT	Chloramfenikolacetyltransferáza (rezistence k chloramfenikolu)
CP	Coat Protein (obalový protein viru)
crTMV	Crucifer-infecting Tobamovirus (<i>Tobamovirus</i> infikující brukvovité)
EFy	Elongační Faktor γ
eIFx	Eukaryotický Iniciační Faktor x
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (metoda imunologické detekce proteinů pomocí protilátek)
EMCV	Encephalomyocarditis Virus (virus encefalomyocarditidy)
FGF-2	Fibroblast Growth Factor 2 (růstový faktor 2 fibroblastů)
FMDV	Foot-and-Mouth Disease Virus (virus slintavky a kulhavky)
G	Guanin
GFP	Green Fluorescent Protein (reportérový zelený fluorescenční protein)
GTP	Guanosintrifosfát
GUS	β -glukuronidáza
HAV	Hepatitis A Virus (virus hepatitidy A)
HCV	Hepatitis C Virus (virus hepatitidy C)
HSP	Heat-shock Protein (protein teplotního šoku)
HSP101	Heat-shock Protein 101 (protein teplotního šoku 101)
HTLV-1	Human T-cell Leukemia Virus (virus lidské T-leukémie)
IRES	Internal Ribosome Entry Site (vnitřní místo pro vstup ribosomu)
IRP	Iron Responsive element binding Protein (protein vážící elementy responzivní na železo)
ITAFs	IRES <i>trans</i> -Acting Factors (proteiny modulující IRES)
LUC	Luciferase (reportérový gen)
Met	Methionin
MMLV	Moloney Murine Leukemia Virus (virus myší leukemie)
mRNA	Messenger RNA (mediátorová ribonukleová kyselina)
ORF	Open Reading Frame (otevřený čtecí rámec)
PTB	Pyrimidine Tract Binding protein (protein vážící se k pyrimidinovému úseku)
PVX	Potato Virus X (virus X bramboru)
rRNA	Ribosomal RNA (ribosomální ribonukleová kyselina)
SV40	Simian Virus 40 (opičí virus 40)
T	Tymin
tRNA	Transfer RNA (transferová ribonukleová kyselina)
U	Uracil
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor (vaskulární endotelový růstový faktor)
5'-UTR	5'-Untranslated Region (nepřekládaná oblast na 5'-konci mRNA)

OBSAH

1. Abstrakt a klíčová slova	4
2. Abstract and key words	5
3. Úvod	6-7
4. Literární přehled	8
4.1. Translace	8
4.1.1. Iniciační translace	8
4.1.1.1. Translační mechanismus.....	9
4.1.1.1.1. Model iniciační translace skenováním.....	9-10
4.1.1.1.2. Model iniciační translace nezávislý na 5'-cap.....	11
4.2. Hledání IRES sekvence	11-12
4.3. Charakteristika IRES sekvencí	12-14
4.3.1. Přítomnost IRES sekvencí ve virových mRNA	14
4.3.2. Přítomnost IRES sekvencí v buněčných mRNA	14
4.4. Srovnání vybraných IRES sekvencí a jejich praktické vlastnosti	15
4.5. Využití IRES sekvencí v expresních vektorech	15-16
4.5.1. Translace monocistronních vektorů s využitím IRES sekvencí	16
4.5.2. Translace bicistronních vektorů s využitím IRES sekvencí	16-17
4.5.2.1. Rostlinné vektory s vloženou virovou IRES sekvencí	17-18
4.5.2.1.1. Využití IRES sekvencí rostlinných virů	18
4.5.2.1.2. Využití IRES sekvencí živočišných virů	19
4.5.2.2. Vlastní rostlinné IRES sekvence a jejich studium	20
5. Souhrn	21-22
6. Seznam použité literatury	23-27

1. Abstrakt

Překlad proteinů nejčastěji zahajuje asociace preiniciačního komplexu s *cap* strukturou na 5'-konci mRNA. Vlákno mRNA je následně pročitáno (skenováno) malou ribozomální podjednotkou (40S), až k iniciačnímu AUG.

Při studiu picornavirů byl objeven alternativní způsob iniciace translace, nezávislý na 5'-*cap* struktuře. Mechanismus nevyžaduje eIF4G iniciační faktor, ale specifickou vnitřní sekvenci místa nasednutí – IRES. Viry využívají 5'-*cap* nezávislý mechanismus iniciace k vyřazení hostitelského translačního aparátu. Proteolyticky štěpí iniciační faktor eIF4G a znemožňují tím nasednutí preiniciačního komplexu na mRNA. Virové mRNA obsahující IRES v 5'-UTR oblastech jsou úspěšně translatovány.

Hledání IRES sekvencí v jiných organismech než virech bylo iniciováno jak vlastnostmi IRES sekvencí, tak strategií virů využívající hostitelské buňky. Buněčné IRES byly objeveny převážně v živočišných mRNA kódujících proteiny důležité při různých stresových stavech. Méně IRES sekvencí pak bylo nalezeno v octomilce, kvasinkách a nejméně pak v rostlinách.

Výzkum IRES sekvencí se soustředil na tvorbu bicistronních konstruktů exprimujících reportérové proteiny v různých expresních systémech. Převážně se jednalo o IRES živočichů nebo virů, exprimovaných ve tkáňových kulturách či myších. Byly porovnávány účinnosti různých expresních kazet a vytvářela se představa o jejich fungování a vlivu na iniciaci translace.

V rostlinách byla hledána optimalizace 5'-*cap* nezávislé iniciace translace za účelem zvýšení účinnosti exprimovaných proteinů. Nebylo však dosaženo předpokládané účinnosti v porovnání s expresními konstrukty se samostatnými řídicími sekvencemi (promotory a terminátory). Výhoda IRES tkví v možnosti vyhnout se konstruktům s duplicitními promotory, u kterých může docházet k rekombinacím, a tím k vyřazení expresní kazety.

Cílem práce bylo shrnout dosavadní znalosti o IRES sekvencích, porovnat model fungování 5'-*cap* nezávislé iniciace translace se standardním, na 5'-*cap* závislým modelem. Dále nastínit charakter IRES, představit několik konkrétních zástupců z řad IRES sekvencí a na několika studiích přiblížit současný systém jejich testování, s důrazem na rostliny.

Klíčová slova: bicistronní translace, 5'-*cap*-nezávislá iniciace translace, vnitřní iniciace, IRES sekvence, reportérové geny

2. Abstract

Initialization of protein translation most often starts by association of preinitiation complex with *cap* structure at the 5'-end of mRNA. mRNA is then scanned by a small ribosomal subunit (40S), in 5' – 3' direction until start codon AUG is reached.

The alternative way of translation initiation that is independent on the 5'-*cap* was discovered during studies of picornaviruses. In picornaviruses translation initiation require instead of eIF4G factor specific sequence for internal entry of ribosome – IRES (Internal Ribosome Entry Site). In 5'-*cap* independent mechanism viruses cleave eIF4G initiatory factor and thereby they make impossible preinitiation complex to scan mRNA with host translational apparatus and viral mRNAs containing IRES in their 5'-UTR regions are efficiently translated.

Search for IRESs in other organisms was initiated by interest in features of IRESs sequences as well as by strategy of viruses making use host cells. Cellular IRESs were mainly discovered in animal mRNAs, which encode proteins of stress response. Less frequently IRES sequences were discovered in *Drosophila*, yeast and least frequent were in plants.

Research of IRES sequences concentrated on testing of expression of reporter proteins in bicistronic expression cassettes in different systems. Mainly were used IRES sequences from animals or viruses for expression in tissue cultures or in mice. Efficiency of different expression cassettes was compared to reveal concept of their function and effect on initiation of translation.

The optimization of the 5'-*cap* independent initiation of translation was also explored in plants to increase the efficiency of protein expression. However the efficiency did not achieved that of constructs with multiple promoters. Thought advantage of IRES based expression cassettes relays in possibility to avoid constructs with multiple promoters for parallel expression of proteins, because frequent recombination between duplicated promoters cease expression.

The aim of this work is to summarized present knowledge on IRES sequences, compare the 5'-*cap* independent and 5'-*cap* dependent model, to present character of IRESs and describe several IRESs chosen for testing and using IRESs in plants.

Key words: bicistronic translation, 5'-*cap*-independent initiation translation, internal initiation, IRES sequences, reporter genes

3. Úvod

IRES sekvence byly objeveny před více než dvaceti lety při studiu 5'-UTR oblastí picornavirů (Pelletier *et* Sonenberg, 1988). Zjistilo se, že vysoce strukturovaná 5'-UTR brání klasickému skenování preiniciačního komplexu. Následně došlo k návrhu jiného mechanismu iniciace translace, nezávislého na struktuře 5'-*cap*. Pozdější studie picornavirů ukázaly, jakým způsobem IRES pomáhají virům při napadení hostitele. Jakmile virus napadne buňku, dochází ke štěpení hostitelského iniciačního faktoru eIF4G virovou proteázou 2A (Sonenberg *et al.*, 1994). Rozštěpený iniciační faktor se stává nefunkční a jeho role v 5'-*cap* závislé iniciaci translace je eliminována a translace hostitelských mRNA je pozastavena na úkor mRNA virových.

IRES sekvence byly také objeveny v 5'-UTR oblastech buněčných mRNA. Proteiny kódované těmito mRNA jsou pro daný organismus velice důležité, zejména za stresových či jiných, fyziologicky nestandardních podmínek. Iniciace translace 5'-*cap* nezávislým způsobem umožňuje organismům exprimovat tyto důležité proteiny, i když dochází k pozastavení klasického skenovacího mechanismu.

První výzkumníci shledávali v IRES sekvencích možný snadný prostředek k vysoké expresi proteinů. To se později ukázalo jako mylná představa neúspěšnými pokusy s bicistronními vektory.

Bicistronní vektor se obvykle skládá ze dvou kódujících sekvencí. Nejčastěji se jedná o sekvenci kódující reportérové geny, jejichž exprese je zkoumána. Existuje několik možných přístupů. Nejvíce používaným je bicistronní vektor s vloženou IRES sekvencí mezi oba cistrony, nahrazující činnost odstraněného promotoru 3'-proximálního cistronu. Vliv IRES sekvence na účinnost exprese je porovnáván s kontrolními vektory, které jsou obvykle monocistronní nebo bicistronní, s řídicími sekvencemi (promotorem a terminátorem) pro každý cistron.

Většinou dochází k vyšší účinnosti exprese u 3'-proximálního proteinu pod promotorovou sekvencí, než pod vlivem IRES. Mohlo by to být způsobeno částečnou nekompatibilitou IRES pocházející z jiného organismu než je použitý translační systém, nebo charakter 5'-*cap* nezávislé iniciace translace by mohl být takový, že exprimované množství proteinů *in vivo*, např. za teplotního šoku, je dostatečné. Celá řada otázek zůstává nezodpovězena i po dvaceti letech od objevu IRES.

Vyskytly se také kontroverzní studie, které zpochybňují zásadní význam IRES sekvencí a přiřazují jim pouze stimulační roli (Attal *et al.*, 1999). Jiné sporné výzkumy zpochybňují

celou řadu IRES na základě nedostatečně provedených statistických vyhodnocení účinnosti translací (Kozak, 2001).

Hledání IRES sekvencí v rostlinách či studium expresních vektorů s virovými IRES vpravenými do rostlin se začíná objevovat teprve v posledních letech, jako např. objev IRES v 5'-UTR oblasti mRNA alkohol dehydrogenázy kukuřice (Mardanová *et al.*, 2008). Tato oblast výzkumu získává na oblibě zejména v moderním biotechnologickém odvětví.

4. Literární přehled

4.1. Translace

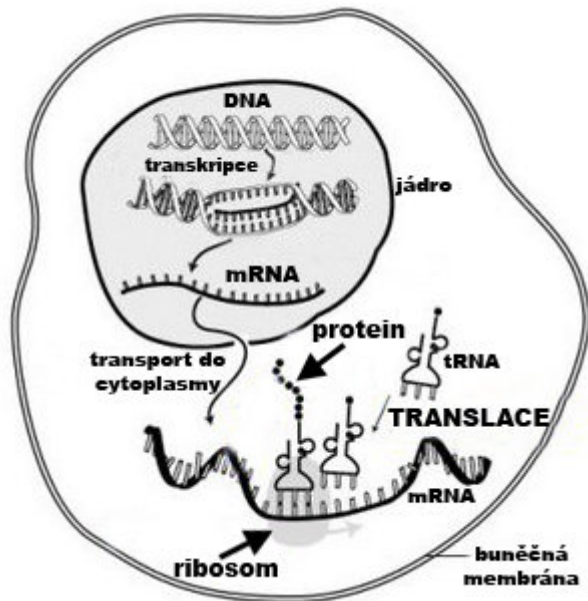
Translace je buněčný proces, během něhož dochází k překladu genetické informace kódované tripletů nukleotidů v molekule mRNA do polypeptidového řetězce. Translaci může předcházet transkripce mRNA z DNA, existují však např. RNA viry, u nichž transkripce není zapotřebí. Spřažení těchto dějů je znázorněno na **Obr. 1**. Translace vyžaduje účast komplexu složeného zejména z ribozomů, tRNA a dalších faktorů, včetně aminoacyl-tRNA syntetázy.

Ribozomy jsou ribonukleoproteinové partikule tvořené ribozomovými RNA, ke kterým jsou vázány ribozomové proteiny, jejichž funkcí je stabilizovat celou strukturu ribozomu. Ribozom poskytuje kostru pro řádné shromáždění mRNA, tRNA a proteinových faktorů. Jeho P místo zajišťuje peptidyl-transferázovou aktivitu pro tvorbu peptidů (**Obr. 2**). Obsahuje malou a velkou ribozomální podjednotku. Sekvence a struktura komponentů potřebných při translaci je u všech známých organismů značně konzervována.

Translace probíhá v několika dílčích fázích: iniciace, elongace, terminace a recyklace (Marintchev *et* Wagner, 2004).

4.1.1. Iniciace translace

Proces iniciace je ze všech čtyř fází translace nejkomplexnější a nejvíce se liší v rámci různých říší organismů. V posledních letech se však shromáždilo velké množství strukturních, biochemických a genetických informací, které potvrdily značné zachování základních mechanismů během evoluce (Nakamoto, 2008).



Obr. 1 Transkripce a translace (upraveno podle Radboud University Nijmegen, 2008).

4.1.1.1. Translační mechanismus

Většina eukaryotních mRNA je translatována skenovacím mechanismem, při kterém se komplex 40S ribozomální podjednotky, iniciační tRNA s navázaným methioninem a iniciačních faktorů váže na 5'-*cap* strukturu. Tento komplex pročítá (skenuje) nukleotidovou sekvenci ve směru 5' k 3'-poly A konci, až dosáhne translačního iniciačního kodónu AUG (Kozak, 1989 *et* 1991).

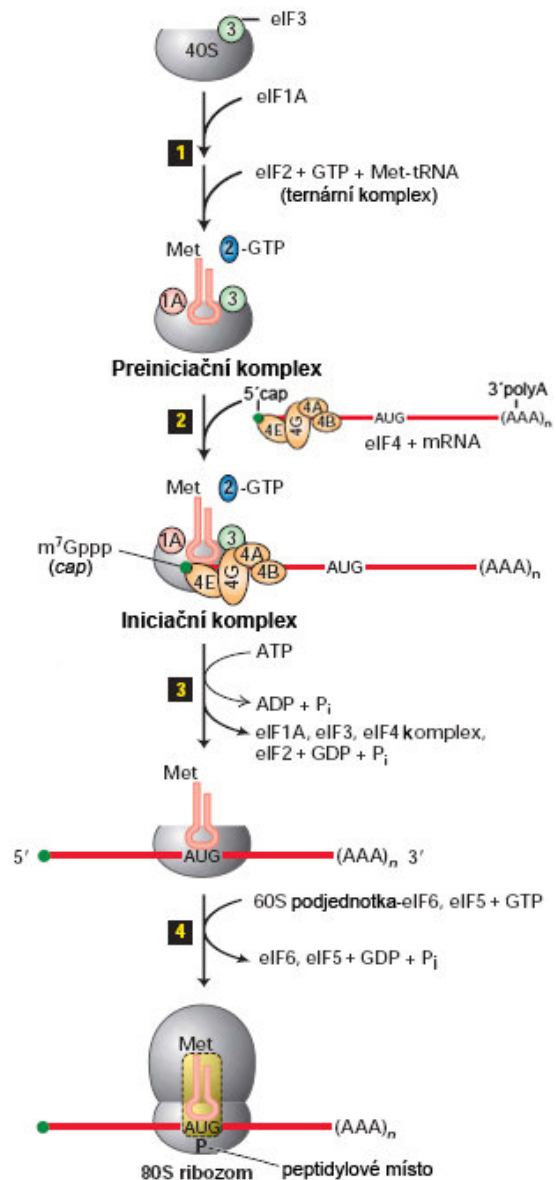
Malé množství mRNA je však také účinně translatováno, přestože neobsahuje funkční 5'-*cap* strukturu, popř. 5'-*cap* struktura zcela chybí. To vedlo k vytvoření konceptu, kde ribozomy dosahují iniciačního kodónu jiným procesem než skenováním od 5'-*cap* (Houdebine *et* Attal, 1999). Tím byl odhalen alternativní, na 5'-*cap* nezávislý, mechanismus iniciace translace. Realizuje se přímou schopností malé ribozomální podjednotky vázat specifickou sekvenci mRNA, která byla nalezena u některých virových a buněčných mRNA. Jde o sekvenci ležící v 5'-UTR oblasti mRNA od iniciačního AUG kodónu, která byla později nazvána IRES. Dosud však není mechanismus této iniciace detailně pochopen (Houdebine *et* Attal, 1999).

4.1.1.1.1. Model iniciace translace skenováním

Velké (60S) a malé (40S) ribozomální podjednotky eukaryot jsou drženy odděleně v důsledku navázání iniciačních faktorů eIF3 na 40S podjednotku a eIF6 na 60S podjednotku. Preiniciační translační komplex je formován spojením komplexu 40S–eIF3 a ternárního komplexu (Met-tRNA, eIF2 a GTP) prostřednictvím eIF1A (Benne *et* Hershey, 1978). Na 5'-*cap* strukturu mRNA, jenž má být translatována, se váže eIF4F (formovaný asociací iniciačních faktorů eIF4A, eIF4B, eIF4G a eIF4E) (Gallie *et al.*, 1998). Posléze dochází k navázání preiniciačního komplexu na mRNA–eIF4 komplex prostřednictvím eIF4G (**Obr. 2-(2)**). Iniciační komplex následně skenuje mRNA pomocí eIF4A s helikázovou aktivitou, využívající energie hydrolýzy ATP potřebné k rozvolnění sekundární struktury mRNA. Rozpoznáním iniciačního kodónu AUG se skenování zastavuje a vede k hydrolýze GTP asociovaného s eIF2. Jde o nevratný krok (**Obr. 2-(3)**) (Merrick, 1992). Nalezení AUG je usnadněno specifickou obklopující sekvencí zvanou Kozakova (3'-GCCAGCCAUGG-5') (Kozak, 1989 *et* 1991). Přidání Kozakovy sekvence do okolí iniciačního kodónu AUG vede ke zvýšení účinnosti translace mRNA (Houdebine *et* Attal, 1999). Pokusy s přidáváním *stem-loop*¹ struktury do 5'-UTR oblasti bicistronních vektorů prokázaly inhibiční efekt na translaci následujícího cistronu. Naproti tomu vložení *stem-loop* struktury za iniciační kodón vede ke zpomalení skenování 40S ribozomální podjednotkou a tím k její lepší vazbě na iniciační

kodón (Sonenberg *et al.*, 1994). Na závěr dochází k nasednutí zbylé 60S podjednotky díky vazbě eIF5-GTP. Následná hydrolyza GTP vede k vazbě obou podjednotek za vzniku funkčního 80S ribozomu (**Obr. 2**) (Lodish *et al.*, 2005).

Tento mechanismus byl dlouhou dobu pokládán za jediný možný způsob iniciovat translaci. Nicméně s rostoucím počtem zkoumaných mRNA docházelo k nálezům mRNA, které tento mechanismus nerespektovaly, jako např. některé mRNA čeledi *Picornaviridae* (Sonenberg *et al.*, 1994).



Obr. 2 Model iniciace translace skenováním u eukaryot: (1) formování preiniciačního komplexu z komplexu 40S–eIF3 a ternárního komplexu, (2) vazba preiniciačního komplexu na *cap* strukturu, (3) skenování mRNA, (4) vazba velké ribozomální podjednotky (upraveno podle Lodish *et al.*, 2005).

¹ *Stem-loop* struktura je oblast dvoušroubovice, např. RNA, která vznikne ohnutím jednoduchého řetězce do tvaru vlásenky, udržované interakcemi mezi bázemi téhož řetězce.

4.1.1.1.2. Model iniciace translace nezávislý na 5'-cap

Byly nacházeny další a další mRNA, které nerespektují model skenování 5'-UTR a pro iniciaci translace nevyžadují 5'-cap strukturu. Nejvíce těchto mRNA je prozkoumáno u virů. Např. virus dětské obrny (*Poliovirus*) či FMDV blokují záhy po infekci buňky mechanismus iniciace translace proteolytickým štěpením iniciačního faktoru eIF4G proteázou 2A kódovanou virem a tím brání jeho nasednutí na 5'-cap strukturu, což vyřadí hostitelský translační aparát. Poslední výzkumy naznačují, že virové proteázy štěpí i jiné buněčné proteiny zapojené do translace (Baird *et al.*, 2006).

Virové mRNA neobsahují 5'-cap strukturu, ale relativně dlouhou a vysoce strukturovanou 5'-UTR, která není rozpoznána 40S ribozomálním komplexem (Houdebine *et Attal*, 1999). Jde o vnitřní (internal) sekvenci místa (site) nasednutí (entry) ribozomu (IRES), která specificky přitahuje preiniciační komplex. Virová mRNA je tak translatována na úkor mRNA hostitelské (Sonenberg *et al.*, 1994).

IRES sekvence dovoluje také účinnou translaci mRNA za nevhodných fyziologických podmínek, kdy je obvyklé skenování vyřazeno, jako např. při nedostatku kyslíku, při teplotním šoku, nebo při programované buněčné smrti a pod. (shrnuto v Kazadi *et al.*, 2008; Gan *et al.*, 1996; Macejak *et al.*, 1991).

4.2. Hledání IRES sekvence

Kozak (1991b) systematickým srovnáváním 5'-UTR oblastí několika set mRNA obratlovců odhalil, že většina mRNA má 5'-UTR oblast 20-100 nukleotidů dlouhou. Kratší a málo strukturovanou 5'-UTR oblast má mRNA, která je přirozeně vysoce translatovaná. Naopak proteiny, přítomné v buňkách ve velmi nízkých koncentracích, jako např. onkoproteiny, růstové faktory, transkripční faktory a jiné regulační proteiny, mají často dlouhou a vysoce strukturovanou 5'-UTR oblast (Kozak, 1991b). Extrémně krátkou 5'-UTR oblast (pod 20 nukleotidů) nemohou ribozomy řádně skenovat (Kozak, 1991a).

První zprávy o vlivu 5'-UTR oblasti na účinnost translace se vynořily na počátku 90. let, kdy se spekulovalo o interakci 18S rRNA s 5'-UTR (Matveeva *et Shabaliva*, 1993; Ganoza *et al.*, 1992). Např. při zkoumání ferritinové mRNA se zjistilo, že její 5'-UTR obsahuje *stem-loop* strukturu, která má vliv na translaci mRNA. Při nízké koncentraci železa se protein IRP váže na *stem-loop* strukturu s vysokou afinitou a zabráňuje translaci ferritinové mRNA. Při vysoké koncentraci železa je IRP uvolněn ze *stem-loop* struktury a mRNA pro ferritin je translatována (Day *et Tuite*, 1998).

Pozdější studie 5'-UTR oblasti EMCV zjistily přítomnost 11 AUG iniciačních kodónů. Pouze poslední z nich je však použit na iniciaci translace (Jackson *et al.*, 1990; Hermann, 1989). Tyto objevy iniciovaly další výzkum 5'-UTR oblastí mRNA picornavirů.

Picornavirová 5'-UTR oblast je obvykle dlouhá, GC bohatá a vysoce strukturovaná. Kvůli těmto vlastnostem, které znemožňují ribozomům skenovat vlákno mRNA, byly hledány jiné možnosti, jak by mohly ribozomy interagovat s mRNA. Na základě dalších pozorování byl vytvořen koncept přímé, na 5'-cap struktury nezávislé, iniciace translace za pomoci specifických sekvencí obsažených v 5'-UTR oblastech. Tyto sekvence byly nazvány IRES (Internal Ribosome Entry Site) (Jackson *et al.*, 1990; Herman, 1989).

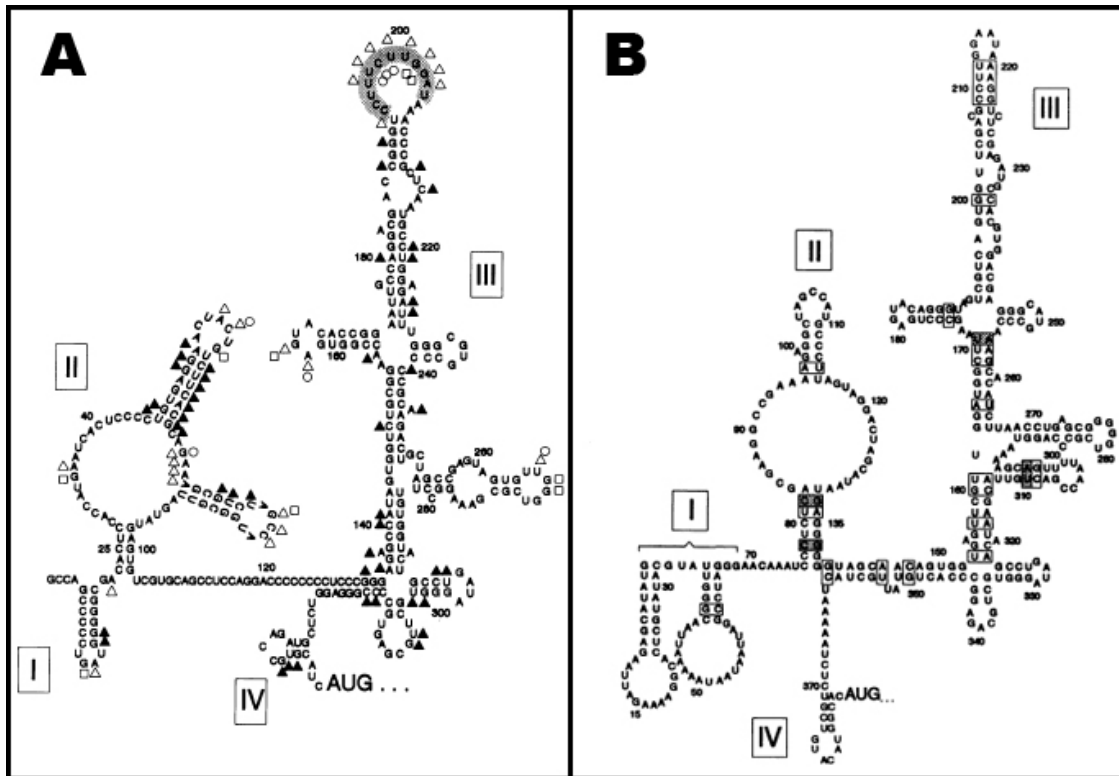
Pro vazbu ribozomů *de novo* hovoří i fakt, že cirkulární mRNA obsahující IRES sekvenci je relativně snadno translatovatelná v bezbuněčném systému, ovšem bez této sekvence nikoliv (Chen *et Sarnow*, 1995). Houdebine *et Attal* (1999) proto odvodili, že ribozomy musí být rekrutovány přímo, a právě koncepce IRES sekvencí splňuje podmínky iniciace translace bez potřeby 5'-cap, virových proteinů nebo skenovacího mechanismu.

4.3. Charakteristika IRES

Srovnáním 5'-UTR sekvencí mající IRES funkci bylo odhaleno, že neexistuje žádná výrazná homologie. Určité homologie v sekundární struktuře byly sice objeveny u některých virových IRES – např. mezi HCV, pestivirem a picornavirem (**Obr. 3**) (upraveno podle Le *et al.*, 1996; Brown *et al.*, 1992). Podobné konzervované terciární strukturní elementy existují v 5'-UTR oblasti cardioviru, aftoviru a HAV (Le *et al.*, 1993). I u picornavirů jsou některé strukturní domény konzervovány (Le *et Maizel*, 1998).

IRES sekvence jsou různě dlouhé, vysoce strukturované a bohaté na GC. Poprvé byly nalezeny v roce 1988 v 5'-UTR polioviru a EMCV (Macejak *et al.*, 1991; Jackson, 1988; Pelletier *et Sonenberg*, 1988).

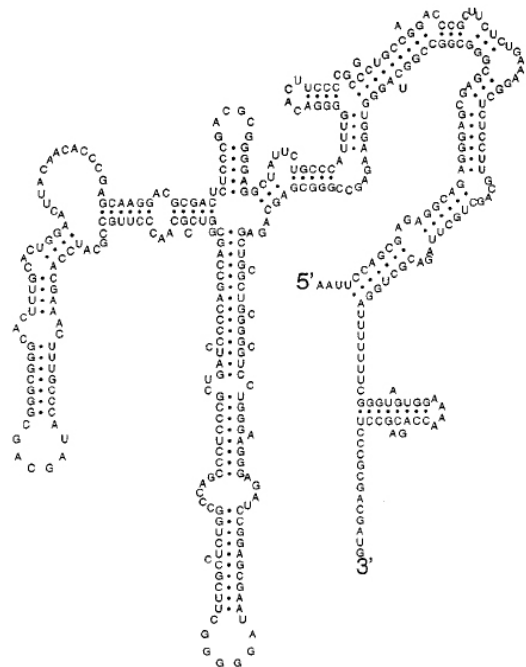
Významnou roli ve vlastnostech IRES sekvencí hraje jejich sekundární struktura (**Obr. 4**) (Martínez-Salas *et al.*, 2002; Le *et Maizel*, 1997). Ta pomáhá vázat IRES sekvenci do blízkosti E místa ribozomu, čímž umísťuje start kodón do vhodné pozice v blízkosti P místa ribozomu. Tímto způsobem sekundární struktura IRES významně zvyšuje pravděpodobnost iniciace translace.



Obr. 3 Srovnání homologií sekundárních struktur IRES sekvencí HCV (A) a pestiviru (B). Římská čísla značí srovnávané *loop* domény (převzato a upraveno z Brown *et al.*, 1992).

IRES sekvence jsou nacházeny téměř vždy na 5'-koncích monocistronních transkriptů u virových a buněčných mRNA, které buď obsahují nebo neobsahují 5'-*cap* (Attal *et al.*, 1999; Jackson *et al.*, 1995).

Přítomnost *stem-loop* struktur v IRES sekvencích je překvapujícím fenoménem a signalizuje, že rozpoznání těchto specifických struktur buněčnými proteiny by mohlo hrát daleko závažnější roli než vlastní primární sekvence. Tuto teorii potvrzují studie o vlivu řady proteinů na 5'-*cap*-nezávislou translaci (Baird *et al.*, 2006). Jedná se o tzv. IRES *trans-acting* faktory (ITAFs) (Vagner *et al.*, 2001). Jako příklad ITAFs lze uvést protein PTB, jenž se váže na specifické polypyrimidinové úseky IRES picornavirů či



Obr. 4 Příklad sekundární struktury IRES sekvence, konkrétně IRES protoonkogenu *c-myc* (Stoneley *et al.*, 1998)

retrovirů a udržuje tak jejich správnou konformaci (Kaminski *et al.*, 1998). Nejnovější studie nasvědčují, že právě polypyrimidinové úseky hrají u řady IRES důležitou regulační úlohu spolu s dalšími proteiny (shrnutí v Baird *et al.*, 2006).

4.3.1. Přítomnost IRES sekvencí ve virových mRNA

Houdebine *et al.* (1999) naznačují, že IRES sekvence mohou být neobvykle dlouhé a vysoce strukturované 5'-UTR oblasti schopné iniciace translace bez přítomnosti 5'-cap struktury. Takové sekvence byly nalezeny ve většině studovaných picornavirových mRNA, opatřených i neopatřených 5'-cap strukturou (Jackson *et al.*, 1990). Byly ale také nalezeny v HCV (Rijnbrnad *et al.*, 1995), ve viru myši hepatitidy (Thiel *et al.*, 1994), v HAV (Brown *et al.*, 1994), v MMLV (Vagner *et al.*, 1995), v pestiviru (Poole *et al.*, 1995) a mnohých dalších.

4.3.2. Přítomnost IRES sekvencí v buněčných mRNA

Jak se předpokládalo, IRES sekvence byly nalezeny také v buněčných mRNA. První z nich byla nalezena v proteinu vážícím se k těžkému řetězci imunoglobulinu (BiP) (Sarnow, 1989; Macejak *et al.*, 1991). Podobně byla IRES objevena v mRNA pro homeotické geny *Antenapedia* a *Ultrabithorax* octomilky (Ye *et al.*, 1997; Oh *et al.*, 1992), v mRNA lidského FGF-2 (Vagner *et al.*, 1995), β -kinesinu (Chernajovsky, 1995), eIF4G (Gan *et al.*, 1996) a mnohých dalších. Proto se zdají IRES sekvence být široce rozšířeny a přítomny v mRNA, kde mají nejrůznější funkce (Houdebine *et al.*, 1999).

Význam IRES sekvencí v mRNA proteinů zastávajících důležité fyziologické funkce při stresových situacích je nejlépe patrný z příkladu IRES v mRNA pro HSP. Aktivita IRES dovoluje účinnou translaci HSP i za situací, při kterých jsou ostatní translace pozastaveny. Nejčastěji se jedná o již zmíněné stresové situace, ve kterých hrají HSP důležitou roli (Joshi-Barve *et al.*, 1992).

Některé eukaryotní organismy mohou obsahovat dokonce vyšší počet IRES sekvencí v jediné mRNA, jako např. dvě zřetelné IRES v oblasti 5'-UTR VEGF mRNA (Huez *et al.*, 1998).

4.4. Srovnání vybraných IRES sekvencí a jejich praktické vlastnosti

Všechny *loop* struktury v HCV IRES jsou nezbytné pro správné fungování interní translace, s výjimkou poslední (Honda *et al.*, 1996). Na základě pokusů s přidáváním *stem-loop* struktur před AUG iniciační kodón poliovirové IRES se zdá, že ribozomy dosahují UAG přímo, po přemostění sekundární struktury IRES (Hellen *et al.*, 1994).

V mnoha případech se jeví oblast na 5'-konci IRES nepostradatelná, avšak např. při delecí 5'-konce HAV IRES se zvyšuje 5'-*cap*-nezávislá translace (Schultz *et al.*, 1996). Vliv delecí na funkci IRES studovali Borman *et al.*, 1994 a ukázali, že tří-nukleotidové delece na pozici 500 u IRES polioviru ovlivňují translaci. Delece v rozmezí 70-381 v nukleotidové sekvenci IRES polioviru na 5'-konci naopak translaci posílí, ovšem pouze při *in vitro* translaci v lyzátu z králičích retikulocytů nebo extraktu z pšeničných klíčků. Dokonce i jedno-nukleotidová mutace v IRES FMDV zvyšuje translační účinnost (Martínez-Salas *et al.*, 1993). Gromeier *et al.* (1996) zjistili, že výměnou IRES polioviru za IRES lidského rhinoviru-2 se odstraní poliovirová neuropatogenita.

4.5. Využití IRES sekvencí v expresních vektorech

Před iniciačním AUG kodónem prokaryot se nachází signální Shine-Dalgarnova sekvence, se kterou specificky interaguje malá ribozomální podjednotka (30S) (Dalgarno *et al.*, 1973). Její přítomnost umožňuje ribozomům nasedat bez problémů i uprostřed mRNA, nachází-li se před kodónem AUG iniciační signální sekvence. Prokaryotní mRNA mohou proto být přirozeně polycistronní. Terminace translace je způsobena přítomností specifických terminačních kodonů neboli stop-kodonů – UAA, UAG, UGA. Tyto kodóny nejsou rozpoznány žádnou tRNA, s jedinou výjimkou kodónu UGA, který za určitých podmínek může kódovat selenocystein. Po jejich dosažení ribozomem dochází k vazbě specifických proteinů, tzv. terminačních faktorů, které ukončují translaci (Alberts *et al.*, 1998).

IRES sekvence mohou být využity při konstrukci expresních vektorů pro řízení translace určitého cistronu. Může se tak dít v různých translačních systémech, za účelem studia mechanismu fungování IRES nebo produkce proteinů kódovaných cistrony. Konstrukty s expresními kazetami obsahujícími IRES sekvence jsou poté vpraveny do buněk pro stabilní nebo tranzientní expresi. V různých buněčných typech jsou následně cistrony translatovány s účinností závislou na použité IRES sekvenci (shrnuto v Borman *et al.*, 1997). To napovídá, že rozdílné buněčné proteiny rozeznávají různé IRES sekvence.

IRES sekvence tak mohou být použity pro různé účely, např. k expresi proteinů z monocistronních či bicistronních vektorů, zvyšování účinnosti exprese (Kazadi *et al.*, 2008), popřípadě i pro genovou terapii (Chinnasamy *et al.*, 2009; Scheidemann *et al.*, 2008).

Kozak (1987) zjistil, že na účinnost translace druhého z cistronů má vliv velikost intercistronní sekvence. Dospěl k závěrům, že optimální velikost intercistronní sekvence, z hlediska účinnosti translace, je v rozmezí 79-147 nukleotidů.

4.5.1. Translace monocistronních vektorů s využitím IRES sekvencí

IRES sekvence byly nalezeny velmi zřídka v bicistronních mRNA určených k přímé translaci druhého z cistronů (viz následující kapitola). Místo toho jsou IRES sekvence obvykle umístěny před cistron v monocistronních mRNA. Zde řídí translaci specifických proteinů za zvláštních fyziologických podmínek uvedených v kapitolách 4.1.1.1.2. a 4.3.2., kdy je standardní translační mechanismus využívající 5'-cap strukturu vyřazen z provozu.

Některé z IRES sekvencí nemají pouze schopnost iniciovat translaci mRNA bez funkční 5'-cap struktury nebo bicistronních mRNA, ale mají skutečnou schopnost zvyšovat translaci asociovaných cistronů za standardních fyziologických podmínek. Tak je tomu u mRNA lidského β -kateninu (Chernajovsky *et al.*, 1995). IRES nalezená v HTLV-1 spolu s částí 5'-UTR oblasti časných genů viru SV40 tvoří velice silný translační stimulant pro expresi monocistronních genů (Attal *et al.*, 1996). V některých případech je IRES sekvence schopna silně stimulovat i translaci proteinů, které jsou běžně translatovány jen s velmi malou účinností. Příkladem může být interleukin-2 (Takebe *et al.*, 1988).

4.5.2. Translace bicistronních vektorů s využitím IRES sekvencí

Koexistence dvou nezávislých cistronů v jedné molekule mRNA může být cestou jak regulovat syntézu dvou proteinů. Tento fenomén byl často pozorován u bakterií a bakteriofágů. U eukaryotních organismů se však vyskytuje zřídka. Přirozené bicistronní mRNA byly doposud nalezeny např. v mRNA pro alkoholdehydrogenázu octomilky (Brognia *et al.*, 1997) nebo v mRNA pro savčí dentin (Ritchie *et al.*, 1997). Evoluce ale šla cestou syntézy polyproteinových prekurzorů, které jsou následně štěpeny na rozmanité proteiny. Eukaryota, ale i viry používají také mechanismus, při kterém dochází při translaci k posunu čtecího rámce (Arad *et al.*, 1995; Lee *et al.*, 1995).

U virů není ničím výjimečným translace několika cistronů z jedné mRNA (Samuel, 1989). Nicméně následná translace dvou nezávislých cistronů z dané mRNA byla popsána pouze

v několika případech, jako např. u rostlinného pararetroviru (Edskes *et al.*, 1996) nebo lidského papillomaviru typu 16 (Tan *et al.*, 1994).

Od konce 80. let nabývaly postupně na významu experimentálně zkonstruované bicistronní mRNA. Zpočátku šlo o studie zaměřené na pochopení vlastních mechanismů translace. Z těchto experimentů bylo vyvozeno, že ribozomy uvolněné po přeložení prvního cistronu mohou přeložit posléze cistron druhý, ovšem s velice nízkou efektivitou. Později se výzkum soustředil na konstrukci bicistronních vektorů s IRES sekvencemi, jejich fungování a vliv na účinnost exprese důležitých proteinů (Kaufman *et al.*, 1987; Peabody *et Berg*, 1986).

Obecně u bicistronních translací dochází k nižší expresi druhého z cistronů (Dorokhov *et al.*, 2006). Na základě četných studií bylo zjištěno, že IRES sekvence vložená mezi oba cistrony je schopna rekrutovat ribozomy a dovoluje translaci druhého cistronu. Z dosud neznámých příčin však IRES nefunguje ve všech genových konstruktech (Attal *et al.*, 1999). Nezávislost tohoto děje na 5'-cap struktuře potvrzuje výzkum s přidáváním *stem-loop* struktury na různá místa v bicistronních kazetách a následná analýza množství exprimovaných proteinů z prvního, respektive druhého cistronu (Sonenberg *et al.*, 1994).

Attal *et al.* (1999) poukazují na četné problémy spojené s translací bicistronních vektorů. Zejména při práci s bicistronními vektory bez i s vloženou IRES sekvencí dochází k limitaci translace na základě velikosti nukleotidové sekvence mezi oběma cistrony (Kozak *et al.*, 1987). Kozak *et al.* (1987) dále uvádějí funkční rozmezí délky intercistronní sekvence v rozmezí 79-147 nukleotidů. Toto zjištění je v rozporu s předpokládaným mechanismem fungování na 5'-cap struktuře nezávislé iniciace translace za pomoci IRES. Délka intercistronní sekvence by neměla ovlivňovat expresi druhého z cistronů.

Bicistronní vektory jsou často konstruovány z genů kódující reportérové proteiny, jejichž přítomnost je následně snadno detegovatelná i ve velmi malých množstvích. Příkladem může být gen *CAT*, kódující enzym chloramfenikolacetyltransferázu, *GUS*, kódující β -glukuronidázu nebo *LUC*, kódující luciferázu (Kozak, 2001).

4.5.2.1. Rostlinné vektory s vloženou virovou IRES sekvencí

IRES sekvence působí *in vivo* na přímou expresi 3'-proximálního (bližšího) ORF v bicistronní mRNA. Nabízí se tudíž jejich využití pro expresi cizích proteinů z rostlinných vektorů založených na virové IRES (dále jen „rostlinné virus-based“ vektory) (Toth *et al.*, 2001).

Rostlinné virus-based vektory mají velké množství výhod. Zejména vyniká jejich schopnost přímé, rychlé a velmi vysoké exprese cizorodého proteinu ve zralých

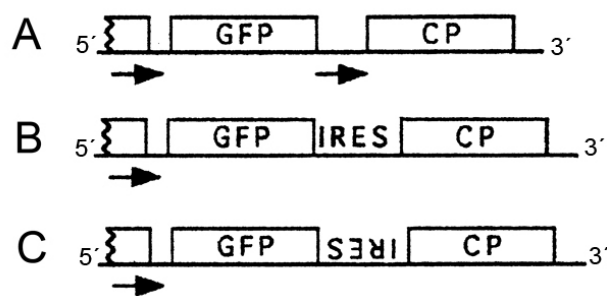
diferencovaných rostlinných pletivech (Toth *et al.*, 2001; Chapman *et al.*, 1992). Existují dva možné přístupy pro expresi cizích proteinů – syntéza polyproteinu, který je následně proteolyticky štěpen na námi požadovaný cizorodý protein (Gopinath *et al.*, 2000; Hamamoto *et al.*, 1993) nebo přímá exprese cizího genu závislá na promotoru či IRES (Donson *et al.*, 1991).

Užívání IRES sekvencí k přímé genové expresi obchází potřebu násobných promotorových sekvencí, které v případě stejného promotoru zvyšují riziko homologní rekombinace.

4.5.2.1.1. Využití IRES sekvencí rostlinných virů

Během několika let po objevení 5'-*cap*-nezávislé iniciace translace bylo známo již značné množství virových i buněčných IRES sekvencí. Rostlinné IRES sekvence zůstávaly však dlouho mimo zorné pole experimentátorů. První práce zaměřené na studium 5'-*cap*-nezávislé iniciace translace u rostlin se týkaly tvorby bicistronních konstruktů s IRES rostlinných virů (Ivanov *et al.*, 1997). Posléze šlo o potvrzení funkčnosti 5'-*cap*-nezávislé iniciace translace v rostlinách, s využitím v té době známých IRES. Studie prokázaly *in vitro* translaci virového obalového proteinu (CP), respektive transportního (movement proteinu) z bicistronních konstruktů za použití IRES sekvencí (Ivanov *et al.*, 1997), či náhodných sekvencí umístěných v 5'-UTR oblasti crTMV a viru tabákové mozaiky (Skulachev *et al.*, 1999).

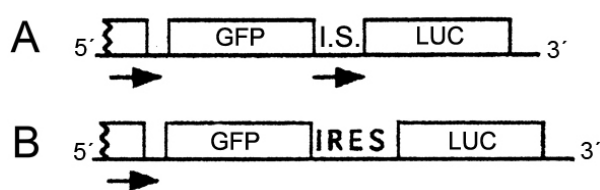
Jiné bicistronní studie byly založeny na skutečnosti, že pohyb viru z buňky do buňky je zcela závislý na přítomnosti virového CP (Dolja *et al.*, 1992; Chapman *et al.*, 1992). K testování IRES funkce v PVX byl použit bicistronní konstrukt obsahující GFP před a CP za IRES sekvencí (**Obr. 5B**). Tímto konstruktem byly transientně transformovány listy *Nicotiana benthamiana* L.. Jako kontroly sloužily bicistronní konstrukty obsahující duplikátní promotory (**Obr. 5A**). Vliv IRES sekvencí na translaci byl sledován pod fluorescenčním mikroskopem a kvantifikován na základě velikosti infikovaných ploch listů. Bylo zjištěno, že u bicistronních konstruktů s duplikátními promotory je dosahováno mnohem vyšších proteinových výtěžků cistronu kódujícího CP než z cistronu řízeného IRES sekvencí (Toth *et al.*, 2001). Současně byl testován vliv orientace IRES sekvence, přičemž se zjistilo, že konstrukt obsahující IRES sekvenci v *sense* orientaci (**Obr. 5B**) vede k větším výtěžkům než konstrukt s IRES v *antisense* orientaci (**Obr. 5C**). Exprese CP a GFP byla měřena metodou ELISA.



Obr. 5 Bicistronní expresní kazety použité při testování vlivu IRES na expresi 3'proximálního cistronu: (A) kontrola s duplikátními promotory, (B) standardní konstrukt s vloženou IRES z PVX, (C) konstrukt s IRES vloženou v *antisense* orientaci; šipka značí promotor (upraveno podle Toth *et al.*, 2001).

4.5.2.1.2. Využití IRES sekvencí živočišných virů

Pro testování účinnosti translace bicistronních expresních vektorů s IRES sekvencemi živočišných virů, např. viru encefalomyocarditidy (EMCV), byly zkonstruovány bicistronní expresní vektory se dvěma reportérovými geny – GFP a LUC, mezi které byla vložena testovaná IRES sekvence (**Obr. 6B**). Jako kontrola byl použit bicistronní konstrukt obsahující tytéž reportérové geny, oddělené však intercistronní sekvencí (IS) o délce 680 bází (**Obr. 6A**). IS sekvence obsahovala několik terminačních kodónů ve všech třech čtecích rámcích. Rostliny *Nicotiana tabacum* L. varieta Xanthi byly transformovány pomocí *Agrobacterium tumefaciens* Smit. *et* Town. vektory s expresními kazetami a byla sledována míra exprese obou genů u obou konstruktů. Výsledky prokázaly, že inserce EMCV IRES mezi oba geny zvyšuje translační účinnost oproti konstrukt s vloženou intercistronní sekvencí (Urwin *et al.*, 2000). Ze studie vyplývá, že IRES sekvence z EMCV přitahuje translační aparát a umožňuje tak na 5'-cap struktuře nezávislou iniciaci translace.



Obr. 6 Bicistronní expresní kazety použité při testování vlivu IRES na expresi 3'proximálního cistronu: (A) kontrola s duplikátními promotory a intercistronní sekvencí dlouhou 680 bází, (B) standardní konstrukt s vloženou IRES; šipka značí promotor (upraveno podle Toth *et al.*, 2001).

IRES z EMCV je velice populární pro svou vysokou účinnost. Poprvé byla modifikována v roce 1990 a použita ke komerčním účelům jako pCITE®-1 vektor, dovolující snadné začlenění cistronů a jejich následnou vysokou účinnost exprese (Bochkov *et al.*, 2006).

4.5.2.2. Vlastní rostlinné IRES a jejich studium

Jak bylo uvedeno v předchozích kapitolách, v současné době je známo velké, postupně se zvyšující množství IRES sekvencí virových i buněčných. Z buněčných IRES je naprostá většina živočišného původu (IRES lidské, psí, myší, kuřecí, muší aj.), několik z kvasinek. Rostlinných IRES bylo doposud objeveno velice málo (Baird *et al.*, 2006). Z těchto důvodů jsou studie častěji zaměřeny na tvorbu konstruktů obsahující IRES virového původu, zejména z virů přirozeně infikující rostliny (Toth *et al.*, 2001).

Výzkum předpokládal výskyt těchto sekvencí v 5'-UTR oblastech některých mRNA. Zejména těch, které kódují proteiny exprimované při stresu, kdy je standardní skenovací model vyřazen z funkce (kapitola 4.1.1.1.2. a 4.3.2) (Dorokhov *et al.*, 2002). Stresem u rostlin může být např. teplotní šok či hypoxický stav. Objev IRES u kukuřice byl učiněn Dinkovou *et al.* (2005) v 5'-UTR mRNA proteinu HSP101, důležitého při teplotním šoku.

Domnělá IRES sekvence byla vložena do bicistronního vektoru obsahujícího geny LUC a CAT a exprimována *in vitro* v bezbuněčném extraktu z pšeničných klíčků, předem zbavených faktorů eIF4G a eIF4E. Jako kontrola byl použit identický konstrukt obsahující IRES sekvenci viru slintavky a kulhavky (FMDV). Účinnost translace řízená hypotetickou rostlinnou IRES sekvencí z HSP101 byla srovnatelná s účinností IRES pocházející z FMDV. Z toho lze tedy odvodit, že se jedná vskutku o IRES sekvenci. Budoucí studie by se podle Dinkove *et al.* (2005) měly soustředit na charakterizaci IRES z mRNA HSP101 a její další testování v expresních vektorech.

5. Souhrn

Objev IRES sekvencí byl učiněn již před více než dvaceti lety a přesto je v současné době nemožné z dosud získaných dat sestavit ucelený model vysvětlující mechanismus fungování IRES.

Během dlouhé řady let bylo podniknuto nespočet studií zkoumajících mechanismus 5'-*cap*-nezávislé iniciace translace. V průběhu experimentů se stala velice oblíbenou metodou bicistronní translace, kdy je možno získat z jedné expresní kazety dva proteiny. Houdebine *et Attal* (1999) uvádějí, že teoreticky je možné exprimovat až šest různých kódujících sekvencí za použití dvou IRES sekvencí.

Studium IRES sekvencí přispívá k identifikaci faktorů zapojených do iniciace 5'-*cap*-závislých i nezávislých buněčných mRNA. S dalšími objevenými IRES se ukazuje, že na 5'-*cap* strukturu nezávislá iniciace translace je široce využívána všemi říšemi. Viry ji používají k přelstění translačního aparátu hostitele a ke svému maximálnímu množení. Rostliny, živočichové nebo i kvasinky 5'-*cap*-nezávislou iniciací využívají za abnormálních fyziologických podmínek – při nedostatku potravy, hypoxii či teplotním šoku, kdy dochází ke zpomalení nebo dokonce k zastavení standardního skenovacího mechanismu iniciace translace.

IRES sekvence jsou uplatňovány v biotechnologiích, při expresi nejrůznějších proteinů. Zde však dochází k rozporupným výsledkům týkajících se nízké účinnosti translace 3'-proximálního cistronu v různých expresních systémech.

Při práci s IRES je pro co nejefektivnější expresi proteinů potřeba dodržet řadu pravidel, jako např. optimální délku intercistronní sekvence či správnou volbu IRES vzhledem ke zvolenému expresnímu systému či velikosti vektoru.

Je těžké pochopit, proč IRES sekvence nemohou rekrutovat ribosomy při dlouhé intercistronní sekvenci v bicistronní mRNA nebo po vložení *stem-loop* struktury do monocistronní mRNA. IRES sekvence jsou příliš strukturované na to, aby mohly být skenovány ribosomy (Houdebine *et Attal*, 1999).

Objevila se i velice kontroverzní studie, ve které Kozak (2001) porovnává 26 vybraných savčích IRES, z nichž posléze 25 navrhuje jako IRES sekvence, pro nedostatek statistických vyhodnocení či špatně zvolené kontrolní testovací kazety.

Jiná sporná studie Nakamota (2008) srovnává jednotlivé translační strategie prokaryot a eukaryot mezi sebou. Poukazuje nejen na podobnost mezi translací eukaryotní a prokaryotní, ale i shodu mezi skenovacím a IRES mechanismem. Výsledky odhalily, že prokaryotní

mechanismus translace je značně konzervován i v organismech eukaryotních. To vedlo k představě, že 5'-cap-nezávislá iniciace translace bez rozpoznání IRES je zachovaný prokaryotní proces iniciace a je pravým primárním iniciačním mechanismem u eukaryot. Iniciace translace skenováním je ve skutečnosti IRES mechanismus s iniciačními faktory, které interagují s cap strukturou, dělají IRES přístupnou a umožňují iniciaci konzervovaným prokaryotním mechanismem.

Některé starší studie přisuzovaly IRES sekvencím spíše charakter stimulantů iniciace translace, než aby specifickým mechanismem rekrutovaly ribozomy *de novo* (Attal *et al.*, 1999).

Výzkum IRES sekvencí u rostlin není tak rozšířen jako výzkum IRES u živočichů. Jsou studovány hlavně IRES sekvence rostlinných virů při tranzientní expresi. Přesto však i u rostlin byly odhaleny některé mRNA obsahující ve svých 5'-UTR oblastech IRES sekvence – např. mRNA pro HSP101 či mRNA pro alkoholdehydrogenázu – obě u kukuřice (Mardanova *et al.*, 2008; Dinkova *et al.*, 2005).

IRES sekvence mají do budoucna velký potenciál pro expresi cizorodých proteinů v moderních směrech biotechnologií, jako je např. produkce bioaktivních proteinů s farmaceutickým využitím. Optimalizace exprese z multicistronní RNA pomocí IRES však bude vyžadovat lepší pochopení mechanismu 5'-cap-nezávislé iniciace translace a nutnost zvýšení účinnosti exprese 3'-proximálního cistronu v porovnání s multicistronní translací pomocí samostatných promotorů.

6. Seznam použité literatury

- Alberts B., Bray D., Johnson A. (2005): Základy buněčné biologie. Ústí nad Labem: *Espero Publishing* 2.vyd. 231-232. ISBN80-902906-2-0
- Arad G., Bar-Meir R., Kotler M. (1995): Ribosomal frameshifting at the *Gag-Pol* junction in avian leukemia sarcoma virus forms a novel cleavage site. *FEBS Letters* 364: 1–4.
- Attal J., Théron M-C., Houdebine L. M. (1999): The optimal use of IRES (internal ribosome entry site) in expression vectors. *Genetic Analysis: Biomolecular Engineering* 15: 161–165.
- Attal J., Théron M-C., Taboit F. *et al.* (1996): The RU5 ('R') region from human leukaemia viruses (HTLV-1) contains an internal ribosome entry site (IRES)-like sequence. *FEBS Letters* 392: 220–224.
- Baird S. D., Turcotte M., Korneluk R. G., Holcik M. (2006): Searching for IRES. *RNA* 12: 1755–1785
- Benne R., Hershey J. W. (1978): The mechanism of action of protein synthesis initiation factors from rabbit reticulocytes. *The Journal of biological chemistry* 253 (9): 3078–3087.
- Bochkov Y. A., Palmenberg A. C. (2006): Translational efficiency of EMCV IRES in bicistronic vectors is dependent upon IRES sequence and gene location. *BioTechniques* 41: 283–292
- Borman A. M., Deliat F. G., Kean K. M. (1994): Sequences within the poliovirus internal ribosome entry segment control viral RNA synthesis. *EMBO J.* 13: 3149–3157.
- Borman A. M., Le Mercier P., Girard M., Kean K. M. (1997): Comparison of picornaviral IRES-driven internal initiation of translation in cultured cells of different origins. *Nucleic Acids Research.* 25: 925–932.
- Brogna S., Ashburner M. (1997): The Adh-related gene of *Drosophila melanogaster* is expressed as a functional dicistronic messenger RNA: multigenic transcription in higher organisms. *The EMBO journal* 16 (8): 2023–2031.
- Brown E. A., Zajac A. J., Lemon S. M. (1994): *In vitro* characterization of an internal ribosomal entry site (IRES) present within the 5' nontranslated region of hepatitis A virus RNA: comparison with the IRES of encephalomyocarditis virus. *Journal of virology* 68 (2): 1066–1074.
- Brown E. A., Zhang H., Ping L. H., Lemon S. M. (1992): Secondary structure of the 50 nontranslated regions of hepatitis C virus and pestivirus genomic RNAs. *Nucleic acids research* 20: 5041–5045.
- Dalgarno L., Shine J. (1973): Conserved terminal sequence in 18SrRNA may represent terminator anticodons. *Nature: New biology* 245 (148): 261–262.
- Day D. A., Tuite M. F. (1998): Post-transcriptional gene regulatory mechanisms in eukaryotes: An overview. *The Journal of endocrinology* 157: 361–371.
- Dinkova T. D., Zepeda H., Martínez-Salas E. *et al.* (2005): Cap-independent translation of maize *HSP101*. *The Plant journal* 41 (5): 722–731.
- Dolja V. V., McBride H. J., Carrington J. C. (1992): Tagging of plant potyvirus replication and movement by insertion of beta-glucuronidase into the viral polyprotein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89 (21): 10208–10212.
- Donson J., Kearney C. M., Hilf M. E., Dawson W. O. (1991): Systemic expression of a bacterial gene by a tobacco mosaic virus-based vector. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (88): 7204–7208.

- Dorokhov Y. L., Ivanov P. A., Komarova T. V., Skulachev M. V., Atabekov J. G. (2006): An internal ribosome entry site located upstream of the crucifer-infecting tobamovirus coat protein (CP) gene can be used for CP synthesis *in vivo*. *Journal of General Virology* 87 (Pt 9): 2693–7.
- Dorokhov Y. L., Skulachev M. V., Ivanov P. A. *et al.* (2002): Polypurine (A)-rich sequences promote cross-kingdom conservation of internal ribosome entry. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99 (8): 5301–6.
- Edskes H. K., Kiernan J. M., Shepherd R. J. (1996): Efficient translation of distal cistrons of a polycistronic mRNA of a plant pararetrovirus requires a compatible interaction between the mRNA 3' end and the proteinaceous trans-activator. *Virology* 224: 564–567.
- Gallie D. R. (1998): A tale of two termini: A functional interaction between the termini of an mRNA is a prerequisite for efficient translation initiation. *Gene* 216: 1–11.
- Gan W., Rhoads R. E. (1996): Internal initiation of translation directed by the 5'-untranslated region of the mRNA for eIF4G, a factor involved in the picornavirus-induced switch from cap-dependent to internal initiation. *The Journal of biological chemistry* 271 (2): 623–626.
- Ganoza M. C., Farrow N. A., An G. (1992): Effect of deletions 5' to the translation initiation sequence on the expression of an mRNA in animal cells. *Molecular biology reports* 16 (4): 277–284.
- Gopinath K., Wellink J., Porta C. *et al.* (2000): Engineering cowpea mosaic virus RNA-2 into a vector to express heterologous proteins in plants. *Virology* 267 (2): 159–73.
- Gromeier M., Alexander L., Wimmer E. (1996): Internal ribosomal entry site substitution eliminates neurovirulence in intergeneric poliovirus recombinants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93 (6): 2370–2375.
- Hamamoto H., Sugiyama Y., Nakagawa N. *et al.* (1993): A new tobacco mosaic virus vector and its use for the systemic production of angiotensin-I-converting enzyme inhibitor in transgenic tobacco and tomato. *BioTechnology* 11 (8): 930–2.
- Hellen C. U., Pestova T. V., Wimmer E. (1994): Effect of mutations downstream of the internal ribosome entry site on initiation of poliovirus protein synthesis. *Journal of virology* 68 (10): 6312–6322
- Herman R. C. (1989): Alternatives for the initiation of translation. *Trends in biochemical sciences* 14 (6): 219–222.
- Honda M., Brown E. A., Lemon S. M. (1996): Stability of a stem-loop involving the initiator AUG controls the efficiency of internal initiation of translation on hepatitis C virus RNA. *RNA* 2 (10): 955–968.
- Houdebine L. M., Attal J. (1999): Internal ribosome entry sites (IRESs): reality and use. *Transgenic Research* 8: 157–77.
- Huez I., Créancier L., Audigier S. *et al.* (1998): Two independent internal ribosome entry sites are involved in translation initiation of vascular endothelial growth factor mRNA. *Molecular and cellular biology* 18 (11): 6178–7190.
- Chapman S. N., Kavanagh T., Baulcombe D.C. (1992): Potato virus X as a vector for gene expression in plants. *The Plant journal: for cell and molecular biology* 2 (4): 549–57.
- Chen C. Y., Sarnow P. (1995): Initiation of protein synthesis by the eukaryotic translational apparatus on circular mRNAs. *Science* 268: 415–7.
- Chernajovsky Y. L. A. (1995): Translational enhancer DNA from light chain of kinesin. US Patent Application, US 5723332.

- Chinnasamy N., Schaffer J., Chinnasamy D. (2009): Production of multicistronic HIV-1 based lentiviral vectors. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 515: 137–150.
- Ivanov P. A., Karpova O. V., Skulachev M. V. *et al.* (1997): A tobamovirus genome that contains an internal ribosome entry site functional in vitro. *Virology* 232 (1): 32–43.
- Jackson R. J. (1988): RNA translation. Picornaviruses break the rules. *Nature* 334 (6180): 292–293.
- Jackson R. J., Howell M. T., Kaminski A. (1990): The novel mechanism of initiation of picornavirus RNA translation. *Trends in biochemical sciences* 15 (12): 477–483.
- Jackson R. J., Kaminski A. (1995): Internal initiation of translation in eukaryotes: the picornavirus paradigm and beyond. *RNA* 1: 985–1000.
- Joshi-Barve S., De Benedetti A., Rhoads R. E. (1992): Preferential translation of heat shock mRNAs in HeLa cells deficient in protein synthesis initiation factors eIF-4E and eIF-4 gamma. *The Journal of biological chemistry* 267 (29): 21038–21043.
- Kaminski A., Jackson R. J. (1998): The polypyrimidine tract binding protein (PTB) requirement for internal initiation of translation of cardiovirus RNAs is conditional rather than absolute. *RNA* 4 (6): 626–638.
- Kaufman R. J., Murtha P., Davies M. V. (1987): Translational efficiency of polycistronic mRNAs and their utilization to express heterologous genes in mammalian cells. *The EMBO journal* 6 (1): 187–193.
- Kazadi K., Loeuillet C., Deutsch S. *et al.* (2008): Genomics determinants of the efficiency of internal ribosomal entry sites of viral nad cellular origin. *Nucleic acids research* 36 (21): 6918–6925.
- Kozak M. (1989): Circumstances and mechanisms of inhibition of translation by secondary structure in eucaryotic mRNAs. *Journal of molecular cell biology* 9 (11): 5134–42.
- Kozak M. (1991a): An analysis of vertebrate mRNA sequences: intimations of translational control. *The Journal of cell biology* 115: 887–903.
- Kozak M. (1991b): Structural features in eukaryotic mRNAs that modulate the initiation of translation. *The Journal of biological chemistry* 266 (30): 19867–19870.
- Kozak M. (2001): New ways of initiating Translation in eukaryotes? *Molecular and Cellular Biology* 21 (6): 1899–1907.
- Kozak M., (1987): At least six nucleotides preceding the AUG initiator codon enhance translation in mammalian cells. *Journal of molecular biology* 196 (4): 947–50.
- Le S. Y., Chen J. H., Sonenberg N., Maizel J. V. (1993): Conserved tertiary structural elements in the 5' nontranslated region of cardiovirus, aphthovirus and hepatitis A virus RNAs. *Nucleic acids research* 21 (10): 2445–2451.
- Le S. Y., Maizel J. V. (1997): A common RNA structural motif involved in the internal initiation of translation of cellular mRNAs. *Nucleic acids research* 25 (2): 362–369.
- Le S. Y., Maizel J. V. (1998): Evolution of a common structural core in the internal ribosome entry sites of picornavirus. *Virus genes* 16 (1): 25–38.
- Le S. Y., Siddiqui A., Maizel J. V. (1996): A common structural core in the internal ribosome entry sites of picornavirus, hepatitis C virus, and pestivirus. *Virus genes* 12 (2): 135–147.

- Lee S. I., Umen J. G., Varmus H. E. (1995): A genetic screen identifies cellular factors involved in retroviral -1 frameshifting. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92 (14): 6587–6591.
- Lodish H., Berk A., Matsudaira P. *et al.* (2005): *Molecular Cell Biology*. New York (USA): *W. H. Freeman and Company* 5th ed. 125–128. ISBN 0-7167-4366-3
- Macejak D. G., Sarnow P. (1991): Internal initiation of translation mediated by the 5' leader of a cellular mRNA. *Nature* 353 (6339): 90–94.
- Mardanov E. S., Zamchuk L. A., Skulachev M. V., Ravin N. V. (2008): The 5' untranslated region of the maize alcohol dehydrogenase gene contains an internal ribosome entry site. *Gene* 420: 11-16.
- Marintchev A., Wagner G. (2004): Translation initiation: structures, mechanisms and evolution. *Quarterly reviews of biophysics* 37 (3-4): 197–284.
- Martínez-Salas E., López de Quinto S., Ramos R., Fernández-Miragall O. (2002): IRES elements: features of the RNA structure contributing to their activity. *Biochimie* 84 (8): 755–763.
- Martínez-Salas E., Saiz J. C., Davila M., Belsham G. J., Domingo E. (1993): A single nucleotide substitution in the internal ribosome entry site of foot-and-mouth disease virus leads to enhanced cap-independent translation in vivo. *Journal of virology* 67 (7): 3748–3755.
- Matveeva O. V., Shabalina S. A. (1993): Intermolecular mRNA-rRNA hybridization and the distribution of potential interaction regions in murine 18S rRNA. *Nucleic Acids Res* 21 (4): 1007–1011.
- Merrick W. C. (1992): Mechanism and regulation of eukaryotic protein synthesis. *Microbiological reviews* 56 (2): 291–315.
- Nakamoto T. (2008): Evolution and the universality of the mechanism of initiation of protein synthesis. *Gene* 432: 1–6.
- Oh S. K., Scott M. P., Sarnow P. (1992): Homeotic gene Antennapedia mRNA contains 5'-noncoding sequences that confer translational initiation by internal ribosome binding. *Genes & development* 6 (9): 1643–1653.
- Peabody D. S., Berg P. (1986): Termination-reinitiation occurs in the translation of mammalian cell mRNAs. *Molecular and cellular biology* 6 (7): 2695–2703.
- Pelletier J., Sonenberg N. (1988): Internal initiation of translation of eukaryotic mRNA directed by a sequence derived from poliovirus RNA. *Nature* 334 (6180): 320–325.
- Poole T. L., Wang C., Popp R. A. *et al.* (1995): Pestivirus translation initiation occurs by internal ribosome entry. *Virology* 206 (1): 750–754.
- Rijnbrand R., Bredenbeek P., van der Straaten T. *et al.* (1995): Almost the entire 5' non-translated region of hepatitis C virus is required for cap-independent translation. *FEBS Letters* 365 (2-3): 115–119.
- Ritchie H., Wang L.H. (1997): A mammalian bicistronic transcript encoding two dentin-specific proteins. *Biochemical and biophysical research communications* 231 (2): 425–428.
- Samuel C. E. (1989): Polycistronic animal virus mRNAs. *Progress in nucleic acid research and molecular biology* 37: 127–153.
- Sarnow P. (1989): Translation of glucose-regulated protein 78/immunoglobulin heavy-chain binding protein mRNA is increased in poliovirus-infected cells at a time when cap-dependent translation of cellular mRNAs is inhibited. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86 (15): 5795–5799.

- Scheidemann F., Therrien J. P., Pfützner W. (2008): Selectable bicistronic vectors in skin gene therapy. *Archives of dermatological research* 300 (8): 415–423.
- Schultz D. E., Honda M., Whetter L. E., McKnight K. L., Lemon S. M. (1996) Mutations within the 5' nontranslated RNA of cell culture-adapted hepatitis A virus which enhance cap-independent translation in cultured African green monkey kidney cells. *Journal of virology* 70 (2): 1041–1049.
- Skulachev M. V., Ivanov P. A., Karpova O. V. et al. (1999): Internal initiation of translation directed by the 5'-untranslated region of the tobamovirus subgenomic RNA I(2). *Virology* 263 (1): 139–154.
- Skulachev, M. V., Ivanov, P. A., Karpova, O. V. et al. (1999): Internal initiation of translation directed by the 5'-untranslated region of the tobamovirus subgenomic RNA I₂. *Virology* 263: 139–154.
- Sonenberg N. (1994): mRNA translation: influence of the 5' and 3' untranslated region. *Current opinion in genetics & development*. 4 (2): 310–5.
- Stoneley M., Paulin F. E., Le Quesne J. P., Chappel S. A., Willis A. E. (1998): C-Myc 5' untranslated region contains an internal ribosome entry segment. *Oncogene* 16 (3): 423–428.
- Takebe Y., Seiki M., Fujisawa J. et al. (1988): SR alpha promoter: an efficient and versatile mammalian cDNA expression system composed of the simian virus 40 early promoter and the R-U5 segment of human T-cell leukemia virus type 1 long terminal repeat. *Molecular and cellular biology* 8(1): 466-472
- Tan T. M., Gloss B., Bernard H. U., Ting R. C. (1994): Mechanism of translation of the bicistronic mRNA encoding human papillomavirus type 16 E6-E7 genes. *The Journal of general virology* (Pt 10): 2663–2670.
- Thiel V., Siddell S. G. (1994): Internal ribosome entry in the coding region of murine hepatitis virus mRNA 5. *The Journal of general virology* (Pt 11): 3041–3046.
- Toth R. L., Chapman S., Carr F., Santa Cruz S. (2001): A novel strategy for the expression of foreign genes from plant virus vectors. *FEBS letters* 489: 215–9.
- Urwin P., Yi L., Martin H., Atkinson H., Gilmartin P. M. (2000): Functional characterization of the EMCV IRES in plants. *Plant Journal: for cell and molecular biology* 24: 583–589.
- Vagner S., Galy B., Pyronnet S. (2001): Irresistible IRES. Attracting the translation machinery to internal ribosome entry sites. *EMBO reports* 2 (10): 893–8.
- Vagner S., Waysbort A., Marena M. et al. (1995): Alternative translation initiation of the Moloney murine leukemia virus mRNA controlled by internal ribosome entry involving the p57/PTB splicing factor. *The Journal of biological chemistry* 270 (35): 20376–20383.
- Vagner S., Waysbort A., Marena M. et al. (1995): Alternative translation initiation of the Moloney murine leukemia virus mRNA controlled by internal ribosome entry involving the p57/PTB splicing factor. *The Journal of biological chemistry* 270 (35): 20376–20383.
- Ye X., Fong P., Iizuka N., Choate D., Cavener D. R. (1997): Ultrabithorax and Antennapedia 5' untranslated regions promote developmentally regulated internal translation initiation. *Molecular and cellular biology* 17 (3): 1714–1721.