

I PROKARYOTA SI CHRÁNÍ SVOJI RNA – NOVÉ TYPY 5'-RNA ČEPIČEK

HANA CAHOVÁ*

Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, v.v.i.,
Flemingovo náměstí 542/2, 166 10 Praha 6
cahova@uochb.cas.cz

Došlo 24.1.17, přijato 21.2.17.

Klíčová slova: 5'-RNA čepička, NAD-RNA, chemické modifikace RNA

Obsah

1. Úvod
2. Eukaryotické RNA čepičky
 - 2.1. Klasické kanonické čepičky
 - 2.2. Méně časté varianty kanonických čepiček
3. Prokaryotické RNA čepičky
 - 3.1. 5'-Terminální trifosfát
 - 3.2. Kofaktorové čepičky
4. Závěr

1. Úvod

Hlavním nositelem genetické informace a tedy dědičných vlastností živých organismů je DNA. Ta je minimálně z 80 % přepisována do RNA (v závislosti na organismu). Nicméně jen kolem 5 % představuje kódující RNA (RNA nesoucí informaci přepsatelnou do řeči proteinů). Zbytek RNA jsou tzv. nekódující RNA, jako jsou ribozomální, transférové nebo regulační RNA¹. O funkci RNA rozhoduje její primární sekvence a sekundární struktura. Stále více se ale ukazuje, že za změnu vlastností RNA molekul jsou zodpovědné chemické modifikace. Přestože jsme schopni díky sekvenování a především tzv. Next-Generation sequencing (NGS, sekvenování nové generace)² určit sekvence až několika milionů různých molekul nukleových kyselin současně přítomných v jednom vzorku, tyto metody stále opomíjejí jakékoliv modifikace přítomné jak na DNA, tak na RNA. V případě DNA se jedná o podstatně menší skupinu chemických modifikací klasických kanonických nukleotidů. Studium methylací 5. pozice deoxy-

cytosinu³ nebo 6. pozice deoxyadenosinu⁴ je součástí oboru zvaného epigenetika. Je také známo okolo dvanácti hypermodifikací DNA, které vyžadují více než jeden editační enzym. Funkce většiny těchto hypermodifikací není známa, ale některé z nich jsou součástí obranného systému, který používají bakterie při ochraně svého genomu⁵. Chemické modifikace RNA jsou rozšířeny mnohem hojněji. V tuto chvíli je známo více než 100 RNA modifikací⁶ a pravděpodobně můžeme na tomto poli očekávat nové objevy v několika následujících letech. Repertoár chemických modifikací RNA je poměrně široký počínaje klasickými methylacemi nukleobáze nebo ribosy, přes kovalentně vázané aminokyselinové zbytky⁷, lipidové zbytky jako nedávno objevený geranyl⁸ a konče kovalentně vázanými proteinovými kofaktory jako, jsou koenzym A (CoA)⁹ nebo nikotinamidadenin nukleotid (NAD)¹⁰.

2. Eukaryotické RNA čepičky

2.1. Klasické kanonické čepičky

Asi nejhojněji rozšířenou mRNA modifikací objevenou již v 70. letech je kanonická RNA čepička¹¹. Tvrdilo se, že všechny eukaryotické mRNA obsahují *N*-7-methylovaný guanosin připojený 5'-5' trifosfátovou vazbou k mRNA (Schéma 1a). Hlavní roli 5'-mRNA čepičky je kromě ochrany RNA před exonukleasami, především rozpoznávání proteinovými faktory pro splicing, polyadenylaci a nukleární transport, souhrnně řečeno tzv. zrání pre-mRNA. Dále je čepička rozpoznávána iniciačními faktory proteinové syntézy a hraje roli při iniciaci translace. Typy čepiček se rozlišují tři podle počtu methylací. Tzv. čepička typu 0 je esenciální např. pro buněčný růst *Saccharomyces cerevisiae*¹² a přežití lidských buněk¹³. Kromě methylace *N*-7 pozice guaninu bývá čepička často methylována v pozici 2' na nukleotidu +1, jedná se pak o tzv. čepičku typu 1 (Schéma 1b). Nedávné studie ukázaly, že methylace atomu kyslíku v pozici 2' je esenciální právě pro rozpoznání vlastní RNA imunitním systémem¹⁴. Také byly objeveny lidské enzymy schopné methylovat pozici 2'-kyslíku na nukleotidu +2 (Schéma 1c)¹⁵. V roce 2016 byly nalezeny prekurzory tRNA v *Saccharomyces cerevisiae* obsahující 5'-čepičku. V tomto případě je úloha čepičky chránit tzv. pre-tRNA před degradací v průběhu jejího vyžívání¹⁶. 2,7-Dimethylguanidin byl

* Autorka článku byla v r. 2016 oceněna Českou společností chemickou Cenou Alfreda Badera II za bioorganickou a bioanorganickou chemii.

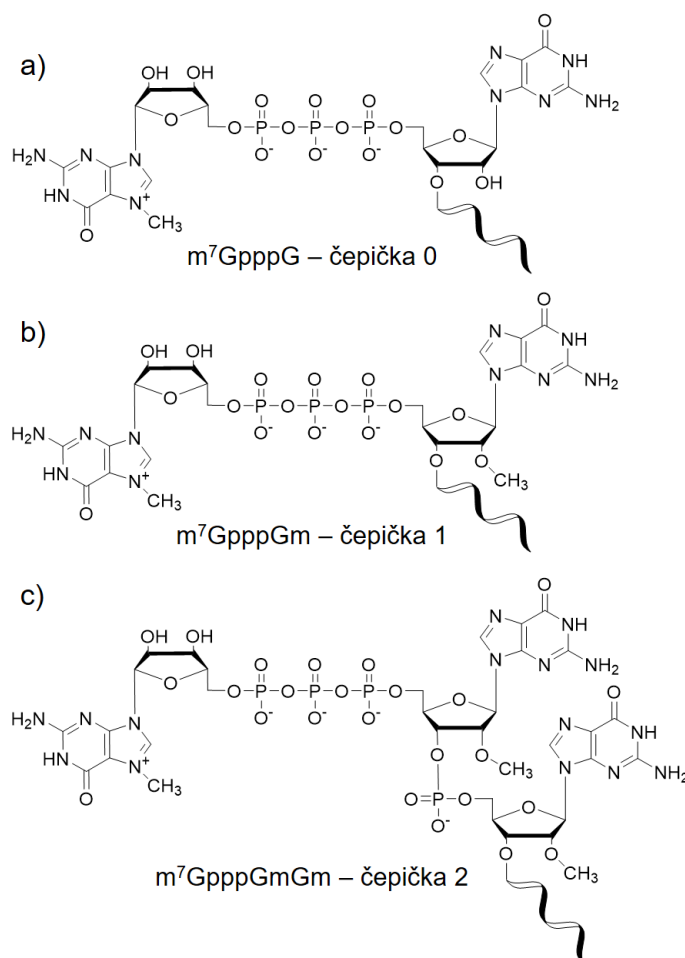


Schéma 1. Struktura mRNA čepičky typu 0–2

nalezen jako součást čepičky v lidských krátkých RNA (sRNA) a stejně tak různé varianty čepičky 0 jako m^7GpppC , $GpppG$, $GpppA$ a m^7GpppA u RNA kratších než 50 nukleotidů¹⁷.

K navázání čepičky většinou dochází v jádře, ko-transkripčně, jakmile polymerasa II přepíše prvních 25–30 nukleotidů. Kanonická mRNA čepička je vytvářena ve 4 (resp. 5 krocích). V prvním kroku dochází k odštěpení terminálního fosfátu z trifosfátové RNA za vzniku difosfátové RNA pomocí RNA trifosfátasy (TPasa). RNA guanyltransferasa (GTasa) v druhém kroku navazuje GMP na 5'-konec difosfátové RNA. A následně dochází k methylačním reakcím pomocí guanin-N7 methyltransferasy (guanin-N7 MTasa) a 2'-O-methylaci pomocí 2'-O-methyltransferasy (2'-O MTasa) na nukleotidu 1+ případně i 2+ (Schéma 2).

Za první tři výše zmíněné enzymové aktivity jsou zodpovědné nezávislé peptidy nebo kombinované bi- či tri-funkční multidoménové proteiny. Ke vkládání čepičky a jejímu odštěpování může docházet i v cytoplasmě. Euka-

ryotické buňky si udržují zásobu mRNA bez čepiček ve formě messenger ribonukleoproteinů (mRNP) v P-bodies (samostatné cytoplasmatické domény, kde dochází k uchování a degradaci mRNA)¹⁸, kde běžně dochází k odštěpení polyadenylového konce stejně jako k odštěpení 5'-čepičky. Tento vratný proces probíhající v P-bodies pravděpodobně představuje aktivační-deaktivační mechanismus, který pomáhá regulovat proteinovou syntézu^{19,20}. Miliony let evoluce a interakce virů s hostitelskými buňkami donutily i eukaryotické viry používat čepičkovanou mRNA. Tato RNA modifikace jim pomáhá využívat buněčné translační mechanismy a samozřejmě pomáhá viru uniknout před rozpoznáním imunitním systémem. Je nemožné shrnout způsoby čepičkování virální mRNA do jednoho odstavce. Tak jak jsou viry rozmanité, jsou rozmanité i jejich způsoby vkládání čepiček na virální mRNA. Jednou možností, jak si virus může připravit vlastní čepičkovanou mRNA, je využití vlastních virem kódovaných proteinů. Například Vaccinia virus (dsDNA) má svůj vlastní multifunkční protein, který doká-

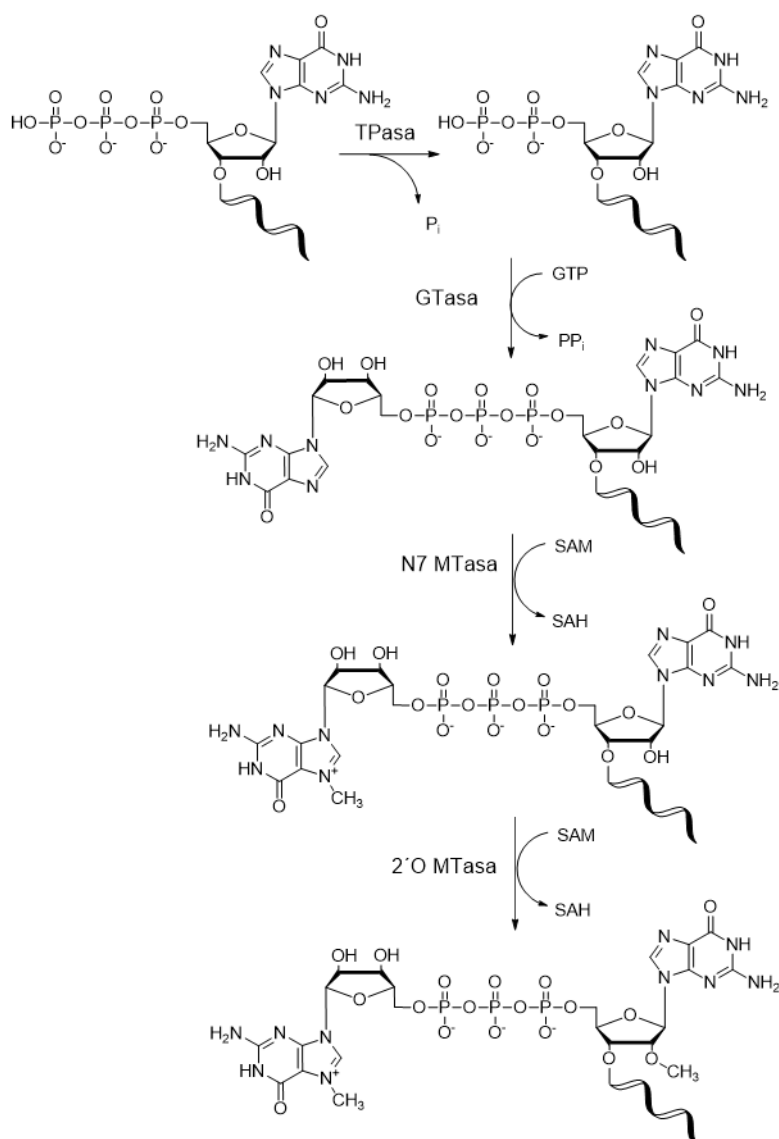


Schéma 2. Enzymová syntéza mRNA čepičky 0,1 v eukaryotických buňkách

že generovat čepičku typu 0 i 1. Alphavirus ((+)ssRNA) má obrácené pořadí kroků při čepičkování RNA. GTP je nejdříve methylován a až pak transferován na ppRNA. Oproti tomu Rhabdovirus ((-)ssRNA) transferuje 5'-monofosfátovou RNA na GDP. Tzv. odtrhávání RNA čepičky (angl. cap snatching) je druhou možností viru, jak dosáhnout vlastní čepičkované RNA. Tento proces je typický např. pro virus chřipky ((-)ssRNA). RNA dependentní RNA polymerasa je schopna odštěpit prvních 10–15 nukleotidů čepičkované hostitelské RNA a následně takový krátký úsek RNA použít jako primer při virální mRNA transkripci. Oproti tomu *Saccharomyces cerevisiae* totivirus štěpí přímo m⁷GMP z hostitelské mRNA a transferuje jej na difosfátové virální transkripty ko-transkripčně.

2.2. Méně časté varianty kanonických čepiček

V posledních letech se podařilo objevit nové varianty čepiček RNA molekul v eukaryotických organismech. Mezi ně patří také 2,2,7-trimethylguanosiновая (TMG) čepička (Schéma 3a)²¹. Ta byla velmi detailně studována např. u *Saccharomyces cerevisiae*²², u hlístic (*Caenorhabditis elegans*)²³ nebo i u savců²⁴. Hypermethylovaná TMG čepička je charakteristická pro malé jaderné RNA (snRNA) U1, U2, U4 a U5, které programují sestřihování (splicing) mRNA. Za vznik TMG čepičky je zodpovědná methyltransferasa Tgs1, která katalyzuje dvě po sobě následující methyltransferační reakce z S-adenosylmethioninu (SAM) na N2 atom klasické kanonické čepičky

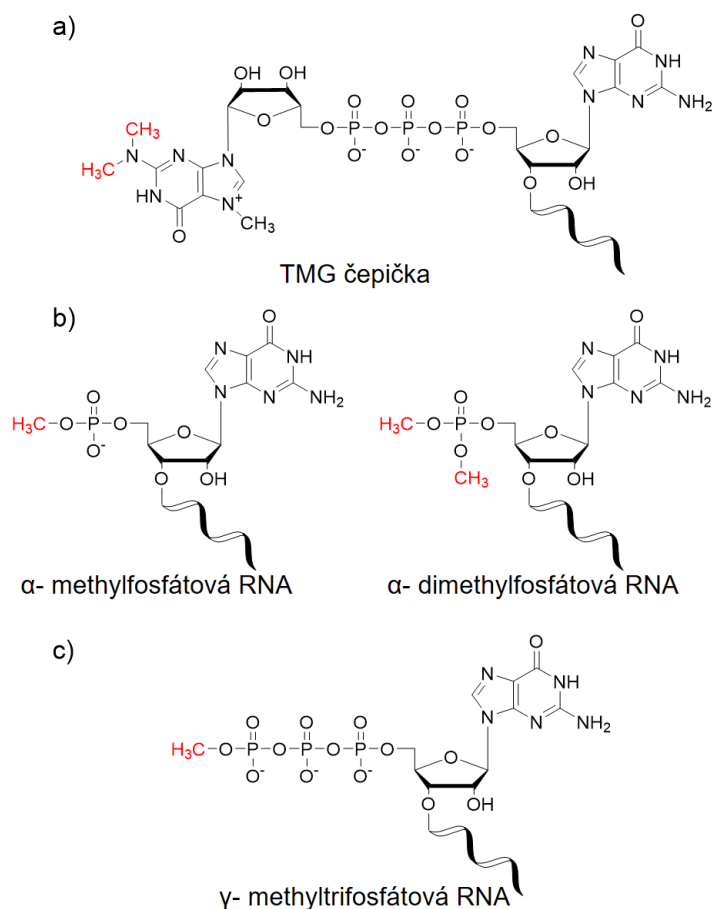


Schéma 3. Struktury netradičních eukaryotických čepiček

ky. Zatímco klasické kanonické čepičky jsou nepostradatelné pro všechna eukaryota, TMG čepička tak významná není. Pokusy s *tgs1* mutanty *Schizosaccharomyces pombe* ukázaly, že takové organismy rostou normálně²⁵. Stejně tak Tgs1 deplece pomocí RNAi v HeLa buňkách neměla žádný vliv na růst buněk²⁶. Nicméně jeho role se ukázala jako esenciální při meioze *Saccharomyces cerevisiae*²² a mutace aktivního místa Tgs1 byla letální v rané fázi kulek *Drosophila*²⁷.

V roce 2012 byla objevena nová lidská RNA-methyltransferasa BCDIN3D²⁸, která methyluje mikro RNA (miRNA). Mikro RNA jsou krátké jednovláčkové RNA molekuly (18–24 nukleotidů), které posttranskripčně ovlivňují genovou expresi v eukaryotických buňkách. BCDIN3D methyluje nebo dimethyluje atomy kyslíku fosfátu na 5'-monofosfátovém konci miRNA (Schéma 3b) a negativně tak reguluje zrání miRNA.

Další netradiční čepičkou je methylovaný 5'- γ -fosfát terminálně kódovaného guanosinu (Schéma 3c)^{29,30}. Takto čepičkovaná RNA je většinou produkována RNA polymerasou III a za methylaci je zodpovědný tzv.

methylfosfát čepičkovací enzym (angl. methyl phosphate capping enzyme, MePCE nebo Bin3). MePCE je evolučně zachovaná RNA methyltransferasa nalezená v širokém spektru organismů od kvasinek až po člověka a využívá SAM k transferu methylu na γ -fosfát RNA³¹. Tato čepička neumožňuje translaci a vyskytuje se pouze na malých nekódujících RNA, jako jsou U6snRNA nebo 7SK RNA, myší RNA B2 nebo rostlinné U3snRNA.

3. Prokaryotické RNA čepičky

3.1. 5'-Terminální trifosfát

Ve všech třech případech netradičních RNA čepiček se jedná o methylaci většinou nekódující RNA v eukaryotech. Jest otázkou, kolik ještě jiných modifikací kromě methylací lze odhalit na 5'-konicích eukaryotických RNA. Při hledání takových nových struktur se můžeme nechat inspirovat světem prokaryot.

Až do nedávna se věřilo, že chránění RNA pomocí

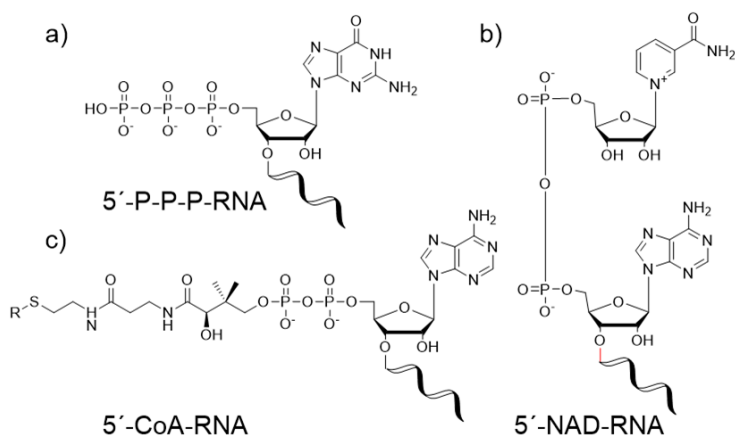


Schéma 4. Prozatím odhalené struktury na 5'-konech prokaryotických RNA

čepičky je typickým znakem eukaryot a u prokaryot nebyly žádné takové případy známy. Degradace mRNA je důležitým regulačním mechanismem, který přímo ovlivňuje genovou expresi, a tedy to, kolikrát bude informace translatována. Právě poločas rozpadu mRNA je rozhodující při výrobě jakéhokoliv proteinu v buňce. Například u *Escherichie coli* je průměrný poločas rozpadu mRNA 5 minut. Jednotlivé RNA mohou přežít několik sekund až několik hodin³². *Escherichie coli* pravděpodobně nemá žádné 5'-exonukleasy, které by mohly spustit degradaci mRNA a 5'-konce mRNA jsou většinou skryty v tzv. stem-loop struktuře. Původně se věřilo, že degradace je spuštěna endonukleotickým štěpením pomocí RNasy E. Ale v roce 2007 bylo zjištěno, že degradaci pomocí RNasy E předchází ještě jeden enzymový krok, a to rozštěpení terminálního trifosfátu na difosfát a monofosfátovou RNA, která je pak dostupná pro degradaci právě RNasou E (cit.³³). O rok později pak byl objeven enzym zodpovědný za tento proces³⁴. Bakteriální enzym RppH (dříve známý jako NudH nebo YgdP) patří do skupiny Nudix hydrolas,

u nichž byla prokázána mononukleotid pyrofosfolydrolasová aktivita *in vitro*³⁵. RppH byl schopen urychlit degradaci stovek *E. coli* transkriptů *in vitro* tím, že konvertoval jejich 5'-trifosfátový konec na 5'-monofosfátový a umožnil tak následné štěpení RNA. Nejzajímavější na objevu tohoto enzymu je především to, že vykazuje evoluční podobnost s eukaryotickým enzymem Dcp2, který je zodpovědný za odštěpování mRNA čepiček. Můžeme tedy tvrdit, že již v roce 2008 byl objeven první typ prokaryotických čepiček – trifosfát (Schéma 4a).

3.2. Kofaktorové čepičky

Při hledání nových RNA modifikací Liu a jeho skupina objevila CoA (Schéma 4b)⁹ a NAD (Schéma 4c)¹⁰ kovalentně vázané na 5'-konci krátkých RNA v totální RNA *Escherichie coli* a *Streptomyces venezuelae*.

Vzorky RNA byly rozděleny do 2 paralelních experimentů. V jednom byla RNA naštěpena nukleasou P1 do formy nukleotidů a v druhém byla užitá teplotně inaktivo-

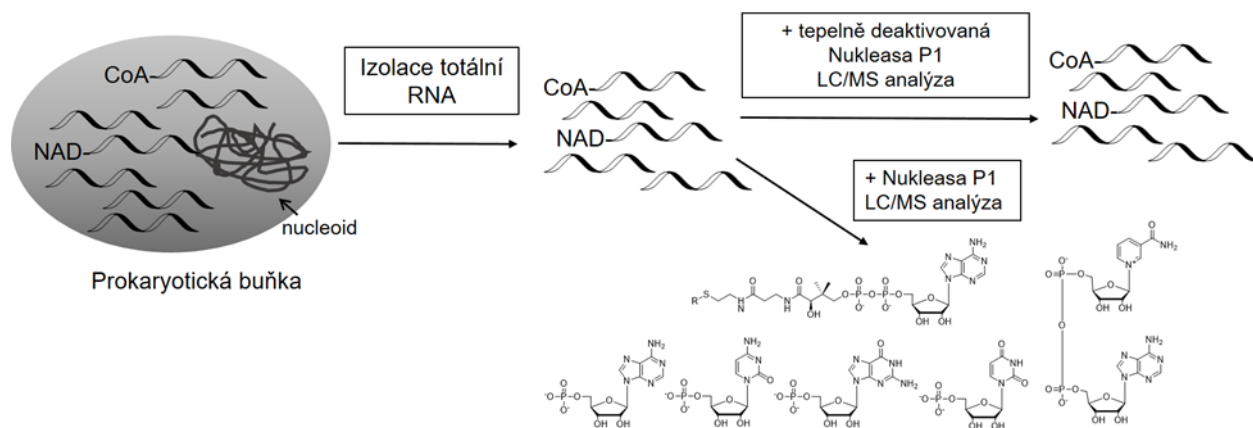


Schéma 5. Uspořádání experimentu, které umožnilo odhalit přítomnost kovalentně vázaných kofaktorů v totální prokaryotické RNA

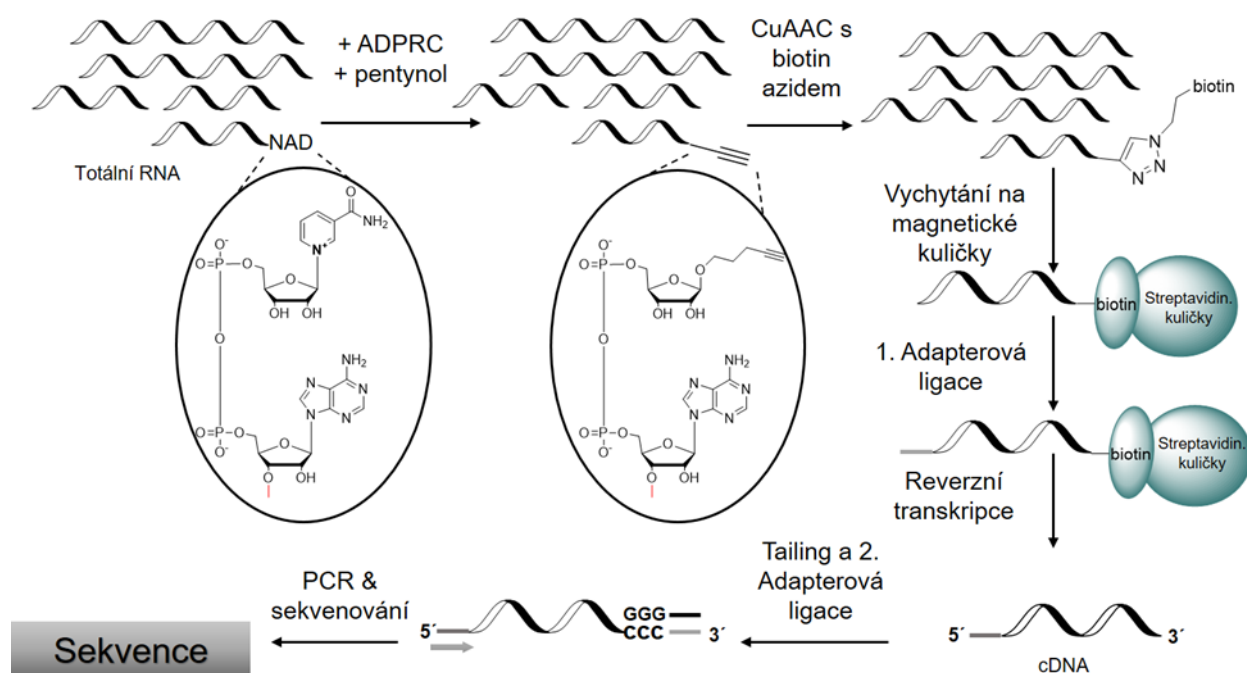
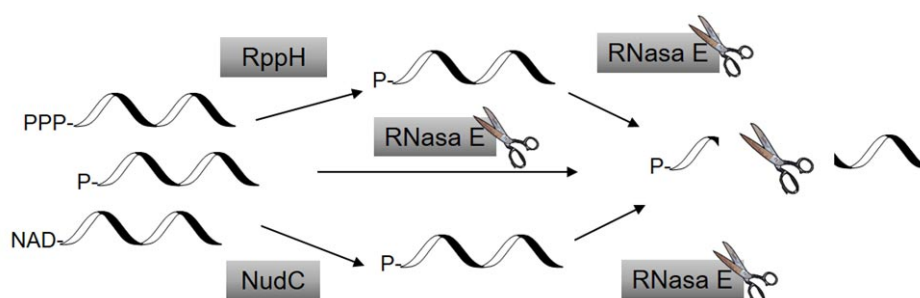


Schéma 7. NAD captureSeq metoda pro odhalení RNA s kovalentně vázaným NAD

hacené sekvenční RNA z důvodu původní vysoké koncentrace (jako např. 5S rRNA) nebo z důvodů nekovalentních interakcí v průběhu aplikace protokolu. RNAi a CopA krátké plasmidově kódované RNA byly nalezeny pouze ve vzorcích pocházejících z JM109, protože tyto buňky obsahovaly dva plasmidy. Dále jsme objevili nový typ 5'-fragmentů některých mRNA genů jako např. *gatY*, *pgk*, *hdeD* a také genů signálních peptidů jako např. *ilvL* a *hisL*. Všechny výsledky získané bioinformatickou analýzou jsem ověřila pomocí real time PCR analýzy cDNA. Po izolaci RNAi z totální RNA JM109 kmenu *E. coli* jsem vzorek naštěpila nukleasou P1 a analyzovala jsem vzorek metodou LC/MS. Ve vzorku připraveném z RNAi byl fragment NAD ($m/z = 540,05$ [M-H]⁻). Takový pík nebyl přítomen ve vzorku připraveném například z 5S rRNA. Poté, co jsme prokázali, že NAD je skutečně kovalentně vázán na 5'-konci krátkých regulačních RNA, začali jsme zvažovat, jakou roli může hrát právě na těchto RNA. Plasmidové RNA (RNAi a CopA) jsou regulační RNA replikace plasmidu. Ostatní krátké RNA kódované v chromosomu *E. coli* jsou podstatné při odpovědi buněk na stres, byť jejich přesná úloha známa není. Už z *in vitro* experimentů bylo patrné, že RNA nesoucí na 5'-konci NAD, je mnohem stabilnější především vůči selektivnímu působení exonukleasami. Napadlo nás, že by NAD mohl hrát podobnou roli jako 5'-trifosfát^{33,34}, tzn. stabilizovat RNA a chránit ji tak před degradací RNasou E. Nicméně v takovém případě by bylo třeba najít enzym, který bude schopen rozštěpit terminálně vázané NAD za vzniku mo-

nofosfátové RNA. V *E. coli* je popsáno celkově 13 NudiX pyrofosfohydrolas. Mezi tyto enzymy patří právě i RppH nebo Dcp2. Oba tyto proteiny degradují 5'-RNA čepičku (trifosfát u prokaryot a klasickou kanonickou čepičku u eukaryot). Dalším členem této skupiny enzymů je i NudC, o němž bylo známo, že *in vitro* hydrolyzuje NAD (H) na NMN(H) a AMP (cit.⁴⁰). Odhalili jsme, že právě tento enzym je schopen velmi aktivně odštěpit NMN (nikotinamidmononukleotid) z 5'-konce RNA za vzniku 5'-monofosfátové RNA, která je pak následně obnažena pro působení RNasy E a tedy pro degradaci. Navrhli jsme, že NAD může také hrát roli čepičky RNA stejně jako trifosfát. Buňka si může rozhodovat o délce působení určité RNA (ať už mRNA nebo regulační RNA) pomocí systému minimálně dvou NudiX enzymů (Schéma 8) RppH a NudC, které spustí v případě potřeby degradaci té dané RNA generací 5'-monofosfátového konce obnaženého pro degradaci pomocí RNasy E. Trifosfátová RNA je neštěpitelná pomocí RNasy E až do momentu, kdy je její konec degradován pomocí RppH za vzniku monofosfátové RNA. Stejně tak NAD-RNA je chráněna před štěpením pomocí RNasy E, až do momentu, kdy je odštěpen nikotinamidmononukleotid za vzniku monofosfátové RNA, která už může být v dalším kroku degradována právě RNasou E.

Krystalová struktura NudC enzymu z *E. coli* byla publikována dvěma skupinami zároveň a potvrdila silnou preferenci NudC vůči NAD-RNA oproti volnému NAD (cit.^{41,42}). NudC se váže k různým typům jednovláknové RNA a nevykazuje zvýšenou afinitu vůči žádné specifické

Schéma 8. Návrh, jak *E. coli* může selektivně degradovat jednotlivé RNA pomocí tří typů enzymů (RppH, NudC a RNasy E)

sekvenci RNA.

Bylo tedy jasné, jak je NAD-RNA degradována, ale netušilo se, který enzym je zodpovědný za vložení NAD čepičky na 5'-konec RNA. Liu a spol. publikovali, že inkorporace pomocí RNA polymerasy, byť fungující *in vitro*, *in vivo* nefunguje¹⁰. Až v roce 2016 bylo skutečně ověřeno, že za *in vivo* inkorporaci NAD do RNA v *E. coli* je zodpovědná RNA polymerasa⁴³. Bylo dokázáno, že nejen bakteriální, ale i eukaryotické polymerasy jsou schopny inkorporovat vedle NAD i NADH, nebo 3'-defosfo-CoA do RNA, jejichž sekvence začíná (+1 nukleotid) adenosinem. Prozatím nebyla identifikována žádná specifická sekvence promotoru, která by nám umožňovala předpovědět, zda bude daná RNA obsahovat NAD či ne. Proto se předpokládá, že rozhodující bude vedle relativní afinity vůči RNA polymerasovému komplexu také relativní buněčná koncentrace ATP a NAD (Schéma 9)⁴⁴. Relativní buněčná koncentrace NAD (pohybuje se v mM v závislosti na nutričním stavu buňky) a 3'-defosfo-CoA (15–50 % hladiny CoA: 20–600 μ M opět v závislosti na nutričním stavu buňky) odpovídá relativnímu množství nalezené NAD-RNA a CoA-RNA v prokaryotických buňkách (3000, resp. 100 kopií na buňku). Tento poměr naznačuje, že teorie inkorporace kofaktoru do RNA na základě jeho lokální koncentrace by mohla být správná.

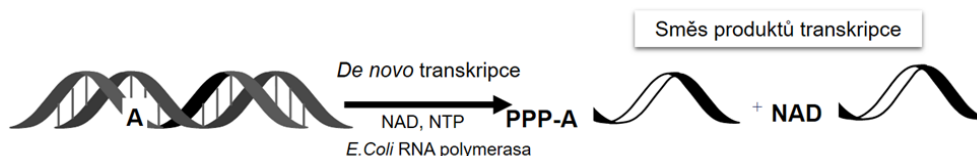
NAD-RNA byla potvrzena už i v *Saccharomyces cerevisiae*, a to na podmožně jaderných a mitochondriálních mRNA⁴⁵. Můžeme předpokládat, že NAD čepička bude nalezena v širokém spektru dalších eukaryotických organismů. Přestože bylo dokázáno, že NAD stabilizuje RNA, na níž je navázán, není jisté, zda je to jeho jediná úloha, zda např. nemá také lokalizační funkci nebo dokonce není s touto molekulou v RNA úzce svázaná něja-

ká metabolická reakce. Přece jen je NAD využíván v buňkách v oxidoredukčních procesech.

Jednou ze základních otázek, kterou si můžeme položit u NAD molekuly, je, proč proteinové enzymy využívají jako hlavní oxidoredukční kofaktor nukleovou kyselinu a nikoliv strukturu jim podobnou na bázi aminokyselin. Právě existence proteinových kofaktorů jako je NAD, NADP, FAD nebo CoA vede k teorii, že tzv. RNA svět evolučně předcházel dnešnímu uspořádání života na zemi (DNA, RNA a aminokyselinové proteiny)⁴⁶. V RNA světě byly molekuly RNA zodpovědné nejen za přenos genetické informace, ale také za vlastní metabolismus. V takovém případě potřebovaly katalyzovat i oxidačně redukční procesy a NAD mohlo získat svou funkci již v této době. NAD-RNA v dnešních organismech mohou představovat tzv. živoucí fosilie a mohly by nám ještě hodně napovědět o přechodu mezi RNA a proteinovým metabolismem.

4. Závěr

Je otázkou, jaké další RNA modifikace ještě čekají na objevení. Ukazuje se, že zvláště modifikace na 5'-konci RNA jsou velmi pestré a mohou to být právě ony, kdo rozhoduje nejen o poločasů rozpadu dané RNA, ale také o její přesné funkci. Většina RNA modifikací byla objevena pomocí LC/MS analýzy štěpené RNA ve formě nukleosidů, případně nukleotidů. Vyhledávání chemických RNA modifikací především v eukaryotickém transkriptomu stále naráží na limity dnes dostupných metod. Pokud izolujeme totální RNA z eukaryotických buněk, 95 % získané RNA je rRNA nebo tRNA. Tyto RNA jsou velmi dobře prozkoumané i z pohledu chemických modifikací. Zbylých

Schéma 9. *De novo* transkripce začínající ATP nebo nekanonickým iniciačním nukleotidem – NAD

5 % RNA, které nám zůstanou po depleci rRNA, je pak natolik malé množství velmi různorodých RNA (mRNA, regulační RNA), že je prakticky nemožné odhalit nějakou chemickou RNA modifikaci. Zvláště terminální RNA modifikace jako NAD je těžké odhalit, protože připadá vždy maximálně jedna chemická modifikace na celou RNA molekulu, která může mít až tisíce nukleotidů. Řešením může být využití velmi citlivých moderních nanoUPLC/MS systémů, které však nejsou dostupné každé laboratoři. Druhou možností je studium eukaryotických virů, které se vyvíjejí společně s eukaryotickými buňkami. Využívají velmi podobné biomolekuly a tak mohou, jako již několikrát v minulosti (například tzv. RNA čepička byla nejdříve objevena ve virech)⁴⁷, pomoci při objevu nových chemických RNA modifikací. Už teď je ovšem jisté, že studium chemických RNA modifikací nám může pomoci pochopit a ovládnout regulační mechanismy v buňkách.

Tato práce vznikla za finanční podpory Grantové agentury České republiky (grant 16-16358Y). Autorka si velmi váží podpory, kterou poskytuje Dr. Alfred Bader mladým českým organickým a bioorganickým chemikům.

LITERATURA

- Morris V. K., Mattick J. S.: *Nat. Rev. Genet.* 15, 423 (2014).
- Brenner S., Johnson M., Bridgham J., Golda G., Lloyd D. H., Johnson D., Luo S., McCurdy S., Foy M., Ewan M., Roth R., George D., Eletr S., Albrecht G., Vermaas E., Williams S. R., Moon K., Burcham T., Pallas M., DuBridgde R. B., Kirchner J., Fearon K., Mao J., Corcoran K.: *Nat. Biotechnol.* 18, 630 (2000).
- Plongthongkum N., Diep D. H., Zhang K.: *Nat. Rev. Genet.* 15, 647 (2014).
- Guan-Zheng L., Blanco M. A., Greer E. L., He C., Shi Y.: *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 16, 705 (2015).
- Thiavill J. J., Kellner S. M., Yuan Y., Hutinet G., Thiaville P. C., Jumpathong W., Mohapatra S., Brochier-Armanet C., Letarov A. V., Hillebrand R., Malik C. K., Rizzo C. J., Dedon P. C., Crécy-Lagard V.: *Proc. Natl. Acad. Sci.* 113, E1452 (2016).
- Dunin-Horkawicz S., Czerwoniec A., Gajda M. J., Feder M., Grosjean H., Bujnicki J. M.: *Nucleic Acids Res.* 34, Database Issue, D145 (2006).
- Mandal D., Köhrer C., Su D., Russell S. P., Krivos K., Castleberry C. M., Blum P., Limbach P. A., Söll D., RajBhandary U. L.: *Proc. Natl. Acad. Sci.* 107, 2872 (2010).
- Dumelin C. E., Chen Y., Leconte A. M., Chen Y. G., Liu D. R.: *Nat. Chem. Biol.* 8, 913 (2012).
- Kowtoniuk W., Shen Y., Heemstra J., Agarwal I., Liu D. R.: *Proc. Natl. Acad. Sci.* 106, 7768 (2009).
- Chen Y., Kowtoniuk W., Agarwal I., Shen Y., Liu, D. R.: *Nat. Chem. Biol.* 5, 879 (2009).
- Ramanathan A., Robb G. B., Chan S.-H.: *Nucleic Acids Res.*, doi: 10.1093/nar/gkw551 (2016).
- Tsukamoto T., Shibagaki Y., Imajoh-Ohmi S., Murakoshi T., Suzuki M., Nakamura A., Gotoh H., Mizumoto K.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 239, 1416 (1997).
- Chu C., Shatkin A. J.: *Mol. Cell. Biol.* 28, 5829 (2008).
- Daffis S., Szretter K. J., Schriever J., Li J., Zoun S., Erret J., Lin T.-Y., Schneller S., Zust R., Dong H., Thiel V., Sen G. C., Fensterl V., Klimstra W. B., Pierson T. C., Buller R. M., Gale M. Jr, Shi P. Y., Diamond M. S.: *Nature* 468, 452 (2010).
- Werner M., Purta E., Kaminska K. H., Cymerman I. A., Campbell D. A., Mitra B., Zamudio J. R., Sturm N. R., Jaworski J., Bujnicki J. M.: *Nucleic Acids Res.* 39, 4756 (2011).
- Ohira T., Suzuki T.: *Nat. Chem. Biol.* 12, 648 (2016).
- Abdelhamid R. F., Plessy C., Yamauchi Y., Taoko M., de Hoon M., Gingeras T. R., Isobe T., Carninci P.: *PLoS One* 9, e102895 (2014).
- Eulalio A., Behm-Ansmant I., Izaurralde E.: *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8, 9 (2007).
- Mukherjee C., Patil D. P., Kennedy B. A., Bakthavachalu B., Bundschuh R., Schoenberg D. R.: *Cell Rep.* 2, 674 (2012).
- Ignatochkina A. V., Takagi Y., Liu Y., Nagata K., Ho C. K.: *Proc. Natl. Acad. Sci.* 112, 6967 (2015).
- Ro-Choi T. S.: *Crit. Rev. Eukaryotic Gene Exp.* 9, 107 (1999).
- Qiu Z. R., Shuman S., Schwer B.: *Nucleic Acids Res.* 39, 5633 (2011).
- Jia D., Cai L., He H., Skogerbo G., Li T., Aftab M. N., Chen R.: *BMC Mol. Biol.* 8, 86 (2007).
- Plessel G., Fischer U., Luhrmann R.: *Mol. Cell Biol.* 14, 4160 (1994).
- Hausmann S., Ramirez A., Schneider S., Schwer B., Shuman S.: *Nucleic Acids Res.* 35, 1411 (2007).
- Lemm I., Girard C., Kuhn A. N., Watkins N. J., Schneider M., Bordonne R., Luhrmann R.: *Mol. Cell Biol.* 17, 3221 (2006).
- Komonyi O., Papai G., Enunlu I., Muratoglu S., Pantoktai T., Kopitova D., Maroy P., Udvarthy A., Boros I.: *J. Biol. Chem.* 280, 12397 (2005).
- Xhemalce B., Robson S. C., Kouzarides T.: *Cell* 151, 278 (2012).
- Shumyatsky G. P., Tillib S. V., Kramerov D. A.: *Nucleic Acids Res.* 18, 6347 (1990).
- Singh R., Gupta S., Reddy R.: *Mol. Cell Biol.* 10, 939 (1990).
- Cosgrove M., Ding Y., Rennie W. A., Lane M. J., Hanes S. D.: *Wiley Interdiscip. Rev. RNA* 3,633 (2012).
- Bernstein J. A., Khodursky A. B., Lin P. H., Lin-Chao S., Cohen S. N.: *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99, 9697 (2002).
- Celesnik H., Deana A., Belasco J. G.: *Mol. Cell* 27, 79 (2007).

34. Deana A., Celesnik H., Belasco J. G.: *Nature* 451, 355 (2008).
35. McLennan A. G.: *Cell. Mol. Life Sci.* 63, 123 (2006).
36. Cahová H., Winz M.-L., Höfer K., Nübel G., Jäschke A.: *Nature* 519, 374 (2015).
37. Preugschat F., Tomberlin G. H., Porter D. J.: *Arch. Biochem. Biophys.* 479, 114 (2008).
38. Huang F.: *Nucleic Acids Res.* 31, e8 (2003).
39. Winz M.-L., Cahová H., Nübel G., Frindert J., Höfer K., Jäschke A.: *Nat. Protocols* 12, 122 (2017).
40. Frick D. N., Bessman M. J.: *J. Biol. Chem.* 270, 1529 (1995).
41. Höfer K., Li S., Abele F., Frindert J., Schlotthauer J., Grawenhoff J., Du J., Patel D. J., Jäschke A.: *Nat. Chem. Biol.* 12, 730 (2016).
42. Zhang D., Liu Y., Wang Q., Guan Z., Wang J., Liu J., Zou T., Yin P.: *Cell Res.* 26, 1062 (2016).
43. Bird J. G., Zhang Y., Tian Y., Panova N., Barvík I., Greene L., Liu M., Buckley B., Krásný L., Lee J. K., Kaplan C. D., Ebright R. H., Nickels B. E.: *Nature* 535, 444 (2016).
44. Barvík I., Rejman D., Panova N., Šanderová H., Krásný L.: *FEMS Microbiol. Rev.* 41, 131 (2017).
45. Walters R. W., Matheny T., Mizoue L. S., Rao B. S., Muhlrud D., Parker R.: *Proc. Natl. Acad. Sci.* 114, 480 (2017).
46. Atkins J. F.; Gesteland R. F., Cech T. R.: *RNA Worlds – From Life's Origins to Diversity in Gene Regulation*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (2011).
47. Wei C. M., Moos B.: *Proc. Natl. Acad. Sci.* 72, 318 (1975).

H. Cahová (*Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague*): **Prokaryotes also Protect their RNAs – New Types of 5' RNA Caps**

It was long time presumed that only eukaryotes protect their RNA by 5'-RNA cap. Recently, it was shown that also prokaryotes employ some kind of protection of their RNA in the form of 5'-triphosphate or NAD covalently attached to 5'-terminus. This review discusses the state of art of 5'-RNA cap in eukaryotes and prokaryotes.