

***Babesia bovis rap-1* 및 *B equi ema-1* intergenic 뉴클레오타이드에서 프로모터로 추정되는 위치 분석**

곽동미

워싱턴주립대학교 수의과대학
(접수 2004. 2. 2, 게재승인 2004. 3. 17)

Analysis of putative promoter sites in *Babesia bovis rap-1* and *B equi ema-1* intergenic nucleotides

Dong-Mi Kwak

Department of Veterinary Microbiology and Pathology, College of Veterinary Medicine,
Washington State University, Pullman, WA 99164-7040, USA
(Received 2 February 2004, accepted in revised form 17 March 2004)

Abstract

Babesia bovis rap-1 and *B equi ema-1* intergenic(IG) nucleotides were analyzed and compared for identifying putative promoter sites using computer programs. The reason to initiate this research was to determine if IG nucleotides of *Babesia* genes that are predicted to be involved in erythrocyte invasion have functions regulating gene transcription and translation, which can be applied to functional gene knockout. Four IG sequences used included BbIG5(*B bovis rap-1* 5' IG), BbIG3(*B bovis rap-1* 3' IG), BeIG5(*B equi ema-1* 5' IG) and BeIG3(*B equi ema-1* 3' IG). BbIG5 contained a putative promoter at nucleotide 197-246 with a predicted TATA-box and a transcription start site. BbIG3 had a putative promoter at nucleotide 270-320 with two predicted TATA-boxes and a transcription start site. BeIG3 had a putative promoter at nucleotide 155-205 with a predicted TATA-box and a transcription start site. Putative promoter sites in these three sequences mentioned above were identified with score cutoff 0.8, which means detection of about 40% recognized promoters with 0.1-0.4% false positives. In contrast, BeIG5 had a putative promoter at nucleotide 163-213 with score cutoff 0.8, but neither TATA-box nor transcription start site were recognized. However, BeIG5 had a putative promoter at nucleotide 388-438 with a predicted TATA-box

¹Corresponding author

Phone : +82-1-509-335-6332, Fax : +82-1-509-335-8529

E-mail : dmkwak@vetmed.wsu.edu

and a transcription start site when score cutoff was decreased to 0.18, which means detection of about 70% recognized promoters with 2.2-5.3% false positives. These sequences with putative promoters can be tested if they have functions regulating gene transcription and translation.

Key words : *Babesia* spp, Intergenic nucleotide, Putative promoter, TATA-box

서 론

바베시아 속의 기생충은 진드기에 의해 매개되는 적혈구내에 기생하는 원충으로 동물과 사람에서 용혈성 빈혈을 동반하는 질병을 일으킨다¹⁾. 현재로서는 바베시아증을 치료하기 위한 효과적인 방법은 없는 실정이다. 일부 국가에선 혈액유래의 생백신을 사용하고 있지만 혈액에서 기인할 수 있는 다른 병인체의 추가감염이 우려²⁻⁴⁾되며 다른 국가는 질병 매개체인 진드기를 통제^{3,4)}하는 방법을 쓰기도 하지만 여전히 치료는 어려운 상황이다. 또 다른 방법은 화학 약제를 사용하는 것인데 최근 바베시아가 약제 내성을 나타내고 있다는 보고는 이 기생충의 치료를 더욱 어렵게 만들고 있다^{5,6)}. 바베시아는 진드기와 숙주를 거치는 생활사를 갖고 있기 때문에 숙주와 진드기에서 기생충의 전파를 차단할 수 있는 항원을 찾는 것은 하나의 좋은 예방과 치료의 방법이 될 것으로 추측된다.

바베시아가 숙주 적혈구를 침입할 때 특정의 단백질을 분비하거나 기생충 표면의 단백질이 그 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 이 가운데 *Babesia bovis*에서 분비되는 rhoptry associated protein-1(RAP-1) 혹은 *B equi*의 세포 표면에 분포하는 equi merozoite antigen-1 (EMA-1)이 숙주 적혈구의 침입과 전파에 관여할 것으로 가정되어 왔다^{7,8)}. 그러나, 이 단백질의 기능은 아직까지 밝혀지지 않고 있다. 기생충체내에서 이들 단백질의 기능을 밝히기 위해서는 이들 유전자가 어떻게 전사, 발현되고 조절되는지를 밝히는 것이 우선 과제이다.

바베시아와 유사한 주혈원충인 *Plasmodium falciparum*의 연구에서 5' 및 3' intergenic (IG) 뉴클레오타이드에서 유전자 발현과 관련

된 조절기능이 있는지를 확인한 결과 IG 뉴클레오타이드에서 프로모터 기능을 지니고 있음이 보고되었다⁹⁻¹¹⁾. 따라서, 5' 및 3' IG 뉴클레오타이드에서 프로모터 기능이 밝혀졌으므로, 이 연구는 기생충의 적혈구 침입에 관련이 있을 것으로 가정되는 *rap-1*과 *ema-1* 유전자의 5' 및 3' IG 뉴클레오타이드를 이용하여 프로모터로 추정되는 위치와 프로모터에서의 중요한 부분인 TATA-box와 전사시작위¹²⁾로 추정되는 위치를 밝혀 이에 보고한다. 프로모터 부분을 포함하는 DNA는 앞으로의 연구에서 *rap-1*과 *ema-1* 유전자가 어떻게 전사, 번역되는지를 밝히는 것과 이들 유전자의 기능을 밝히는데 이용될 수 있을 것으로 추정된다.

재료 및 방법

기생충 유전자

이 연구에서 사용된 *B bovis rap-1* 5' IG(BbIG5)와 3' IG(BbIG3) 뉴클레오타이드는 미국의 National Institute of Health에 있는 National Center for Biotechnology Center (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)의 GenBank data base에서 선택하였다(accession no. 2731569). *B equi*의 *ema-1* 5' IG(BeIG5)와 3' IG(BeIG3) 뉴클레오타이드는 실험실에서 genomic DNA library를 구축하는 중 *ema-1*을 포함하는 10 kb 유전자를 sequencing하면서 밝혀졌다.

유전자 분석

유전자 분석은 다음의 웹사이트 프로그램을 이용하였다. 전체적인 sequence 배열은 San Diego

Supercomputer Center Biology WorkBench (<http://workbench.sdsc.edu/>)의 CLUSTALW를 사용하였으며 밝혀진 뉴클레오타이드 배열은 EMBnet의 BOXSHADE 3.21(http://www.ch.embnet.org/software/BOX_form.html)을 사용하였다. 예상되는 프로모터의 확인은 Neural Network Promoter Prediction(http://www.fruitfly.org/seq_tools/promoter.html) 프로그램을 사용하였으며 이 프로그램은 프로모터의 중요한 부분인 TATA-box와 전사시작위치에 근거하여 만들어 졌다. 마지막으로, TATA-box의 확인은 Institute for Biomedical Technology의 Hamming-Clustering Method for TATA Signal Prediction in Eukaryotic Genes(http://125.itba.mi.cnr.it/%7Ewebgene/wwwHC_tata.html)을 이용하였다.

결 과

Babesia spp IG 뉴클레오타이드 배열

BbIG5, BbIG3, BeIG5 및 BeIG3 뉴클레오타이드 sequence를 배열한 결과는 Fig 1에서 나타내었다. 4종의 sequences를 배열한 결과 6% 정도의 낮은 동일성을 보였다. 그러나, 특이한

것은 BbIG5와 BbIG3를 배열하였을 때 74%의 높은 동일성을 보였다. Fig 1에서 나타난 것처럼 BbIG5와 BbIG3의 상당히 많은 부분에서 동일한 뉴클레오타이드임을 나타내는 검은색으로 표시되어 있다. BeIG5와 BeIG3의 배열은 비교적 낮은 22%의 동일성을 보였다.

Babesia spp IG 뉴클레오타이드에서 프로모터 확인

프로모터로 추정되는 위치를 찾기 위하여 Neural Network Promoter Prediction 프로그램을 이용하였으며 프로모터의 중요한 부분인 TATA-box와 전사시작위치를 확인하였다 (Table 1). 추정되는 뉴클레오타이드의 확인은 먼저 score 범위를 0.8 이상으로 하였다(score 범위는 0.0-1.0). Score 0.8은 0.1-0.4%의 false positive 범위에서 약 40%의 알려진 프로모터를 확인한 값이었다. Score 범위를 0.8 이상으로 하였을 때 BbIG5, BbIG3, BeIG5 및 BeIG3에서 각각 하나의 프로모터가 확인되었다. 전사시작위치로 추정되는 뉴클레오타이드는 굵은 글씨로 표시하였다.

다음으로, 위에서 밝혀진 프로모터에서 TATA-box를 검정하기 위하여 Institute for

Table 1. Promoter predictions for *Babesia bovis* and *B. equi* intergenic(IG) nucleotides

DNA ¹	Start ²	End ³	Score ⁴	Promoter Sequence ⁵
BbIG5	197	246	0.84	TGCGCAGATGAAGA ATATATAT TTCTACGTGAAAACATATTTGGATTTC
BbIG3	270	320	0.84	TTCCAATCAATATATATACACTCTAATACGAATCTCGGGTGATGAACAAA
BeIG5	163	213	0.96	AGCTCCAGGGCAAAAATGGCGACTAAATGATGCGTAGAAAATTCCGCGCA
	388	438	0.18	TGTGGTGTGTCACTATACATTTATCGCTCAAATCGCCTTGAAGTTTATAGG
BeIG3	155	205	0.91	GGTACCATAGTATAATAGGAGGAAAACCAATCTGTAACCAACCCTGAAA

1. BbIG5, *Babesia bovis rap-1* 5 IG nucleotides; BbIG3, *B. bovis rap-1* 3 IG nucleotides; BeIG5, *B. equi ema-1* 5 IG nucleotides; BeIG3, *B. equi ema-1* 3 IG nucleotides.
2. Site of starting nucleotide of putative promoter.
3. Site of ending nucleotide of putative promoter.
4. Score means score cutoff, which ranges 0.0-1.0. The lower the score cutoff, the more potential promoters are shown(see result).
5. Putative promoter sequences(50 nucleotides). Putative TATA-box sites are underlined; putative transcription start sites are in bold.

```

BbIG5      1  -----TGGCTGTTATATAAATTATCTTCATATAGTAA-A
BbIG3      1  ---CAACTAACAAATGTTGTGTGGCATTGG-ATCCATGGTTTTCATATTGTAT-T
BeIG5      1  -----CGGTAGTGGCCAAAGCTATTGGATTCCGCTTACTC
BeIG3      1  CATAAATACCTCTCTGAAACCCAAATGATSCCA---ATTAAACCGTGTTCAC-
consensus  1  . . . . . * . . . . . * . . . . . * . . . . .

BbIG5      37  AAGGTCCTCTAGTGTATACAAATGAAATTTTCAAAATGATG-----TATTTTGG
BbIG3      56  GATTCAATATCTGA-ATGGATSTGATCCACAAATTTTATCAATCGGTCTCCGAATGGT
BeIG5      39  TCAATCTTCGGGACCAAGCCGCTCTTCTTACGGATCCAC-ACCTTACCTTACT
BeIG3      58  GAAATACCGTCCAAAGAGTGTCTATATAGTTTGGAAATATAAAGCCTCAGC
consensus  61  . . . . . * . . . . . * . . . . . * . . . . .

BbIG5      91  TATA-----ACACATTTTACTTATGTAAATACTATCTATGTT-ATGGTITTTCT
BbIG3      115  ATTTGTA-ATACACATTTTACTTATGTAAACTAGTATCTATGTT-ATGGTITTTCT
BeIG5      98  CACTGGAAAGCGGTCCAAAGATGGGCCCGTGGCCATCAGAGCCCAAAAGGAGCGGC
BeIG3      118  TCTTAAATCTCTGATCAAGATTTGACAAAGTCTCGTACCCTATATAAAGCAAGC
consensus  121  . . . . . * . . . . . * . . . . . * . . . . .

BbIG5      145  AATGAAATGTTTDEAGCTACAGGAAGGAAAC-----TCTCTAGAAGTATTCATTTGGC
BbIG3      173  AATGAAATGTTTDEAGCTACAGGAAGGAAAC-----TCTCTAGAAGTATTCATTTGGC
BeIG5      158  GAGGGCTCCAGGCAAAATGCGCACTAATGATCCGTAGAAATTCGGCGCATAACTC
BeIG3      178  AATCCCAATCTCTACCAACCTCAAAATGTAAGGCAATGTACAAATAC---TTGCT
consensus  181  . * . . . . * . . . . . * . . . . . * . . . . .

BbIG5      201  CGATGAAGAAATATATATTCTACGTTAAACATATTTGATTTCTATCAATATATATAC
BbIG3      229  CGATGAAGAAATATATATTCTACGTTAAACATATTTGATTTCTATCAATATATATAC
BeIG5      218  GGT---ATTTTTCCTACTATTGGGGTCTTTTCTT---CCTTTCACCGCATGACAGC
BeIG3      236  GCA-BAATCTCTTCCATACGTCCGATATATCCCTCTGATATGAAATGASTRA
consensus  241  . * . . . . * . . . . . * . . . . . * . . . . .

BbIG5      261  ACTCTAATAGCAATCTGGGATGATACAAATTAATTCATTAATAATCAACCTAGTA
BbIG3      289  ACTCTAATAGCAATCTGGGATGATACAAATTAATTCATTAATAATAAATCAACCTAGTA
BeIG5      273  CAAAGCGCGGACAGTTTCCATGTTTTCCCTCATGTTCCATCCGTGGCCTATCAC
BeIG3      294  GCG---GAGATCTTTTACCTTTCC-ACCAGGCGCACTCTATCTTTTATA
consensus  301  . . . . . * . . . . . * . . . . . * . . . . .

BbIG5      321  GTT-CAATTGTCAATTACCTATAATATGTATAATTT-CTATAAATATGCTG-TA
BbIG3      349  GTT-CAATTGTCAATTACCTATAATATGTATAATTT-CTATAAATATGCTG-TA
BeIG5      333  ACACCACATATGCAGTTG---AGGGCGGTTCGCTCCGCGTGTCTATGCATGTGT
BeIG3      350  TAGGAATTTAATATCAATATCTGCACGAGGCTC-GT-TGGATCCCTCT-TT
consensus  361  . . . . . * . . . . . * . . . . . * . . . . .

BbIG5      378  TTTTCTATCATTATATGGAATTAATTTATAATGGC-CAAGGTGGATACCTTTAT
BbIG3      406  TTTTCTATCATTATATGGAATTAATTTATAATGGC-CAAC-----
BeIG5      390  GGTGTGTCACATAC-----ATTTTCGCCCAATCCCTTCAATTTTGGGTGACAAA
BeIG3      407  CCAACTATACCTATCCCAATCCGCTCCATAATCTTGTACATTTTCTCCCTC
consensus  421  . . . . . * . . . . . * . . . . . * . . . . .

BbIG5      437  ATAAATATATAAATATTACGAAACAAG
BbIG3      -----
BeIG5      446  TTTCTGT-CAGC-----
BeIG3      467  CCAATTCAGAAA-----
consensus  481  . . . . .

```

Fig 1. Alignment of *Babesia spp* Intergenic(IG) nucleotides. *B. bovis* rap-1 5 IG(BbIG5) and 3 IG(BbIG3) nucleotides were aligned with *B. equi* ema-1 5 IG(BeIG5) and 3 IG(BeIG3) nucleotides. Asterisks in consensus denote nucleotide identity, and dots denote similarity.

Biomedical Technology의 Hamming-Clustering Method for TATA Signal Prediction in Eukaryotic Genes 프로그램을 이용하였다. Table 1에서 나타난 것처럼 각 프로모터에서 하나 또는 두 개의 TATA-box로 추정되는 부분들이 확인되었다. 그러나, BeIG5 163-213 뉴클레오타이드에서는 TATA-box로 추정되는 부분들이 확인되지 않았다. 좀더 많은 프로모터를 확인하기 위하여 score 범위를 0.18까지 낮추었을 때 BeIG5 388-438 뉴클레오타이드에서 TATA-box와 전사시작위치로 추정되는 부분들이 확인되었다. Score 0.18은 2.2-5.3%의 false positive 범위에서 약 70%의 알려진 프로모터를 확인한 수치이었다.

Table 2. Alignment of putative TATA-box sites in recognized promoters in *Babesia* spp Intergenic(IG) nucleotides

DNA ¹	Position ²	Pattern ³
BbIG5	210	AATATATATT
BbIG3	280	AATATATATA
	291	ACTCTAATAC
BbIG5	399	ACTATACATT
BbIG3	163	AGTATAATAG

1. BbIG5, *Babesia bovis rap-1* 5 IG nucleotides; BbIG3, *B. bovis rap-1* 3 IG nucleotides; BeIG5, *B. equi ema-1* 5 IG nucleotides; BeIG3, *B. equi ema-1* 3 IG nucleotides.
2. Site of starting nucleotide of putative promoter.
3. Site of ending nucleotide of putative promoter.
4. Score means score cutoff, which ranges 0.0-1.0. The lower the score cutoff, the more potential promoters are shown(see result).
5. Putative promoter sequences(50 nucleotides). Putative TATA-box sites are underlined; putative transcription start sites are in bold.

Babesia spp IG 뉴클레오타이드에서 확인된 TATA-box 배열

BbIG5, BbIG3, BeIG5 및 BeIG3의 프로모터에서 확인된 TATA-box의 sequence를 자세히 분석하기 위하여 염기서열을 Table 2에서 배열하여 비교하였다. TATA-box의 중요한 TATA 뉴클레오타이드는 굵은 글씨로 표시되었는데, BbIG3 291을 제외한 모든 염기서열에서 TATA 뉴클레오타이드가 확인되었다. BbIG3 291에서는 이와 유사한 TCTA로 확인되었다.

고 찰

Babesia spp에서 숙주 적혈구의 침입에 관여할 것으로 가정되어온 *B. bovis* RAP-1과 *B. equi* EMA-1의 역할을 밝히기 위한 장기적 목표 하에서 이 연구를 진행하였다. RAP-1과 EMA-1의 역할을 밝히기 위한 전 단계로 이들 유전자들의 전사와 발현을 조절하는 프로모터로 예상되는 위치를 찾는 것이 이 연구의 목적이었다. 프로모터를 찾음으로 나아가 각각의 유전자를 기능적으로 knockout함으로써 그 유전자의 기능을 밝힐 수 있을 것이다. 이 방법은 malaria 기생충에서 이미 사용되고 있다⁹⁻¹¹⁾.

*B. bovis rap-1*과 *B. equi ema-1*의 IG 뉴클레오타이드를 비교 분석하였던 바 BbIG5, BbIG3, BeIG5 및 BeIG3에서 프로모터로 추정되는 sequence들이 하나 또는 두 개가 확인되었다. 확인된 각 프로모터에서 프로모터의 중요한 부분인 TATA-box와 전사시작위치도 확인되었다. 여기서 밝혀진 프로모터 부위를 포함한 뉴클레오타이드가 프로모터 기능을 갖고 있는지를 밝히게 되면 이 sequence를 사용하여 *rap-1*과 *ema-1* 유전자의 전사와 발현을 조절할 수 있을 것이고 마침내는 이들 유전자를 기능적으로 knockout함으로써 이들의 기능을 밝힐 수 있을 것으로 추정된다.

프로모터로 추정되는 위치를 찾기 위하여 우선 score 범위를 비교적 높은 수치인 0.8이상으로 하였다. 이것은 score 범위를 낮게 하였을

때 여러 sequence가 확인될 것을 예상하여 보다 높은 가능성을 나타내는 하나의 프로모터를 선택하기 위한 목적이었다. 이렇게 한 결과 모든 BbIG5, BbIG3, BeIG5 및 BeIG3에서 각각 하나의 프로모터로 추정되는 부위가 확인되었다. 또한, 이들 sequence는 각각 TATA-box와 전사시작위치로 예측되는 부위를 지니고 있었다. 이들 sequence들은 엄격한 조건에서 프로모터의 필수요소들을 갖추고 있기 때문에 실제로 프로모터의 기능을 감당할 가능성이 높아 보인다. 그러나, 한가지 특이한 것은 score 범위가 0.96을 나타낸 BeIG5 163-213 뉴클레오타이드에서 전사시작위치로 예측되는 위치는 확인되었지만 TATA-box로 예측되는 위치는 확인되지 않았다. 아마도 이것은 사용된 프로그램이 진핵생물을 포괄적으로 포함한 것이긴 하지만 원충에서는 다른 특성의 프로모터를 지니고 있을 수 있을 것으로 추측된다. 또는, 이 위치가 score 범위 0.96에서 일어날 수 있는 0.0-0.2%의 false positive에 해당될 수 있을 것이다. 그러나, BeIG5에서 TATA-box와 전사시작위치 모두를 갖고 있는 프로모터를 찾기 위하여 score 범위를 0.18까지 낮추었을 때 388-438 뉴클레오타이드가 확인되었다. 이 두 sequence 가운데 어느 것이 실제로 프로모터 역할을 하는지를 밝히는 것은 서로 다른 범위의 뉴클레오타이드를 설정하여 클로닝, 형질전환 혹은 transfection을 함으로써 밝힐 수 있을 것이다.

여기서 밝혀진 결과를 토대로 프로모터로 예측되는 sequence와 reporter 유전자인 luciferase 혹은 chloramphenicol acetyl transferase gene을 함께 복제하여 이들 효소의 활성을 확인함으로써 어느 sequence가 프로모터의 기능이 있는지를 밝힐 수 있을 것이다⁹⁾. 더 나아가, 강한 프로모터의 기능이 있는 것을 선발하여 바베시아 기생충을 transfection하는데 이용할 수 있을 것으로 예상된다.

결 론

*B. bovis rap-1*과 *B. equi ema-1*의 IG 뉴클

레오타이드에서 프로모터로 추정되는 위치는 BbIG5에서는 197-246 뉴클레오타이드에서, BbIG3에서는 270-320 뉴클레오타이드에서, BeIG5에서는 388-438 뉴클레오타이드에서, 그리고 BeIG3에서는 155-205 뉴클레오타이드에서 각각 프로모터로 추정되는 위치가 확인되었으며, 각각의 TATA-box와 전사시작위치로 예상되는 위치도 확인되었다. 이 결과를 토대로 실제로 이들의 뉴클레오타이드에서 프로모터의 기능이 있는 지를 밝힌 후 RAP-1과 EMA-1의 기생충체내에서의 역할도 밝힐 수 있을 것으로 생각된다.

참고문헌

1. Gray J, von Stedingk LV, Granstrom M. 2002. Zoonotic babesiosis. *Int J Med Microbiol* 291 Suppl 33 : 108-111.
2. Brown WC, Palmer GH. 1999. Designing blood-stage vaccines against *Babesia bovis* and *B. bigemina*. *Parasitol Today* 15 : 275-281.
3. Mattioli RC, Janneh L, Corr N, et al. 1997. Seasonal prevalence of ticks and tick-transmitted haemoparasites in traditionally managed N'Dama cattle with reference to strategic tick control in the Gambia. *Med Vet Entomol* 11 : 342-348.
4. Lawrence JA, de Vos AJ. 1990. Methods currently used for the control of anaplasmosis and babesiosis: their validity and proposals for future control strategies. *Parassitologia* 32 : 63-71.
5. Yeruham I, Pipano E, Davidson M. 1985. A field strain of *Babesia bovis* apparently resistant to amicarbalide isethionate. *Trop Anim Health Prod* 17 : 29-30.
6. Beveridge E. 1970. Drug resistance in *Babesia rodhaini*. *Br J Pharmacol* 39 : 239P-240P.

7. Mosqueda J, McElwain TF, Stiller D, et al. 2002. *Babesia bovis* merozoite surface antigen 1 and rhoptry-associated protein 1 are expressed in sporozoites, and specific antibodies inhibit sporozoite attachment to erythrocytes. *Infect Immun* 70 : 1599-1603.
8. Yokoyama N, Suthisak B, Hirata H, et al. 2002. Cellular localization of *Babesia bovis* merozoite rhoptry-associated protein 1 and its erythrocyte-binding activity. *Infect Immun* 70 : 5822-5826.
9. de Koning-Ward TF, Speranca MA, Waters AP, et al. 1999. Analysis of stage specificity of promoters in *Plasmodium berghei* using luciferase as a reporter. *Mol Biochem Parasitol* 100 : 141-146.
10. de Koning-Ward TF, Fidock DA, Thathy V, et al. 2000. The selectable marker human dihydrofolate reductase enables sequential genetic manipulation of the *Plasmodium berghei* genome. *Mol Biochem Parasitol* 106 : 199-212.
11. Militello KT, Wirth DF. 2003. A new reporter gene for transient transfection of *Plasmodium falciparum*. *Parasitol Res* 89 : 154-157.
12. Liston DR, Johnson PJ. 1999. Analysis of a ubiquitous promoter element in a primitive eukaryote: early evolution of the initiator element. *Mol Cell Biol* 19 : 2380-2388.