

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Speciální chemicko-biologické obory
Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organismů



Tereza Zosinčuková

Vlastnosti a funkce agnoproteinu polyomavirů
Properties and functions of agnoprotein of polyomaviruses

Bakalářská práce

Školitel: doc. RNDr. Jitka Forstová, CSc.

Praha, 2019

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 14. 8. 2019

Podpis:

Chtěla bych velmi poděkovat své školitelce, doc. RNDr. Jitce Forstové, CSc., za ochotu a trpělivost, se kterou vedla mou bakalářkou práci. Také bych jí ráda poděkovala za cenné rady, připomínky a konstruktivní kritiku, bez které bych se neposunula dále.

Abstrakt

Čeď *Polyomaviridae* zahrnuje malé DNA viry s jednoduchou stavbou a malým genomem kódujícím pouze několik málo proteinů. Mezi tyto proteiny patří velký a malý T antigen a dále 2 až 3 strukturální proteiny označované jako VP1, VP2 a VP3. Někteří zástupci čeďi *Polyomaviridae* navíc kódují ve svém genomu malý nestrukturní protein zvaný agnoprotein. Z lidských polyomavirů je agnoprotein přítomen u BK polyomaviru a JC polyomaviru, což jsou původci některých vážných onemocnění u lidí s oslabeným imunitním systémem, kvůli čemuž jsou předmětem intenzivních výzkumů. Dále jej kóduje opičí virus SV40. Agnoprotein dokáže manipulovat hostitelskou buňkou, narušovat váčkový transport a také je klíčový pro virovou replikaci a transkripci. Hraje zřejmě důležitou roli při morfogenezi virionů, popřípadě při jejich uvolňování z buňky. Práce shrnuje nejnovější poznatky z oblasti vlastností a funkcí agnoproteinu BK polyomaviru, JC polyomaviru a viru SV40, se zaměřením na produkci tohoto proteinu během infekce, na jeho strukturu, posttranslační modifikace, lokalizaci v buňce, interakční partnery a celkový význam tohoto enigmatického proteinu v replikačním cyklu viru.

Klíčová slova: agnogen, agnoprotein, struktura, funkce, polyomavirus, *Polyomaviridae*, JC polyomavirus, BK polyomavirus, virus SV40

Abstract

Polyomaviridae family includes small DNA viruses with simple structure and a small genome encoding only a few proteins. These proteins include large T and small T antigens, as well as 2 to 3 structural proteins known as VP1, VP2 and VP3. In addition, some members of the *Polyomaviridae* family encode in their genome a small non-structural protein called agnoprotein. Among human polyomaviruses, agnoprotein is present in BK polyomavirus and JC polyomavirus. These viruses are the causative agents of some serious diseases in immunocompromised humans and therefore, they are the subject of intensive research. Simian vacuolating virus 40 is another example of a virus which encodes the agnoprotein. Agnoprotein is capable to manipulate its host cell, disrupt vesicle transport and is also crucial for viral replication and transcription. It appears to play an important role in the morphogenesis of virions and/or in their release from the cell. This paper comprehensively summarizes the latest insights into the properties and functions of the agnoprotein BK polyomavirus, JC polyomavirus and SV40 virus, focusing on the production of this protein during infection, its structure, posttranslational modifications, cell localization, interaction partners and the overall importance of this enigmatic protein for the virus replication cycle.

Key words: agnogene, agnoprotein, structure, function, polyomavirus, *Polyomaviridae*, JC polyomavirus, BK polyomavirus, SV40 virus

Seznam použitých zkratek

aa	amino acid	aminokyselina
ALTO	Alternate frame of the Large T ORF	alternativní čtecí rámeček velkého T antigenu
AP-3	adaptor protein complex 3	adaptorový proteinový komplex 3
BKPyV	BK polyomavirus	BK polyomavirus
bp	base pair	páry bází
CNS	central nervous system	centrální nervový systém
ds	double strand	dvouvláknová
ER	endoplasmatic reticulum	endoplasmatické retikulum
ERAD	ER-associated degradation	ER asociovaná degradace
FEZ1	fasciculation and elongation protein zeta 1	fascikulační a elongační protein zeta 1
HP1α	heterochromatin protein 1	heterochromatinový protein 1 α
HPyV	human polyomavirus	lidský polyomavirus
ICTV	International Committee on Taxonomy of Viruses	Mezinárodní výbor pro taxonomii virů
JCPyV	JC polyomavirus	JC polyomavirus
LBR	lamin B receptor	lamin B receptor
LT	large tumor (antigen)	velký nádorový (antigen)
MCPyV	Merkel cell polyomavirus	polyomavirus Merkelových buněk
MPyV	Murine polyomavirue	myší polyomavirus
MT	middle tumor (antigen)	střední nádorový (antigen)
NCCR	non-coding control region	nekódující regulační oblast
NES	nuclear egress signal	jaderný exportní signál
NLS	nuclear localisation signal	jaderný lokalizační signál
NMR	nuclear magnetic resonance	jaderná magnetická rezonance
NSF	N-ethylmaleinide-sensitive factor	N-ethylmaleimid-senzitivní faktor

nt	nucleotides	nukleotidy
OBD	origin-binding domain	doména vázající počátek replikace
Obr.	figure	obrázek
ORF	open reading frame	otevřený čtecí rámeček
Ori	origin of replication	počátek replikace
PCNA	proliferating cell nuclear antigen	proliferační jaderný antigen
pI	isoelectric point	isoelektrický bod
PKA	protein kinase A	protein kináza A
PKC	protein kinase C	protein kináza C
PKD	protein kinase D	protein kináza D
PML	progressive multifocal leukoencephalopathy	progresivní multifokální leukoencefalopatie
PP2A	protein phosphatase 2A	proteinová fosfatáza 2A
PVAN	polyomavirus-associated nephropathy	s polyomavirem-asociovaná nefropatie
PyV	polyomavirus	polyomavirus
SNARE	SNAP receptor	SNAP receptor
ST	small tumor (antigen)	malý nádorový (antigen)
SV40	Simian vacuolating virus 40	Simian vacuolating virus 40
Tab.	table	tabulka
TEF-1	transcription-enhancer factor 1	transkripci podporující faktor 1
TEM	transmission electron microscopy	transmisní elektronová mikroskopie
VLPs	virus-like particles	viru podobné částice
VP	viral protein	virový protein
wt	wild type	divoký (původní) typ
YB-1	Y-box binding transcription factor 1	Y-box vazebný transkripční faktor 1
α-SNAP	α -soluble N-ethylmaleimide-sensitive fusion attachment protein	α -solubilní N-ethylmaleimid-senzitivní fúzní připojovací protein

Obsah

1. Úvod	1
2. Polyomaviry	2
2.1. Organizace genomu	3
2.2. Charakterizace hlavních polyomavirových proteinů	5
2.3. Životní cyklus	6
2.4. Spektrum hostitelů	7
2.4.1. Lidské polyomaviry a s nimi spojené nemoci	8
2.5. Polyomaviry kódující agnoprotein	9
2.5.1. Domnělý agnoprotein u ptačích polyomavirů	11
3. Gen pro agnoprotein	12
3.1. Sekvence genu pro agnoprotein	12
3.2. Transkripce a translace genu pro agnoprotein	13
4. Agnoprotein	16
4.1. Posttranslační modifikace agnoproteinů a jejich vliv na funkci agnoproteinů	17
4.2. Struktura agnoproteinů	18
4.2.1. Dimerizace a oligomerizace agnoproteinů	20
4.3. Lokalizace agnoproteinů v buňce	22
4.4. Funkce agnoproteinů	24
4.4.1. Interakční partneři agnoproteinů	24
4.4.2. Uvolňování virionů z buňky pomocí agnoproteinů	29
4.4.3. Sekrece agnoproteinů z buňky	31
5. Závěr	32
6. Seznam použité literatury	34

1. Úvod

Agnoprotein je malý, nestrukturní protein, který kódují některé viry z čeledi *Polyomaviridae*. Jedná se o malé DNA viry, jejichž genom je velmi úsporný a kóduje pouze několik proteinů, které ale mají o to rozmanitější funkce. Na první pohled působí tyto viry poměrně jednoduše, ale ukazuje se, že funkce, které u jiných virů plní hned několik proteinů, zde dokáže zastat protein jediný. Platí to jak o velkém a malém T antigenu, tak o agnoproteinu a kapsidových proteinech.

Já jsem si zvolila za předmět své práce agnoprotein, neb navzdory své malé velikosti dokáže plnit řadu funkcí, které jsou klíčové pro úspěšný replikační cyklus virů, jež ho kódují. Tento protein pozdní fáze infekce dokáže, mimo jiné, manipulovat infikovanou buňkou, umí ovlivňovat váčkový transport, brzdit buněčný cyklus, ovlivňovat virovou i buněčnou replikaci. Pro virus je důležitý především při morfogenezi a uvolňování virionů, pro regulaci virové replikace a transkripce a v konečném důsledku pro celkové načasování a optimální průběh virové infekce.

Pozornost si agnoprotein jistě zaslouží také z důvodu, že některé z polyomavirů, které ho kódují ve svém genomu, jsou lidské patogeny, jež mohou způsobit vážná onemocnění. Mezi ně patří JC polyomavirus, který je původcem progresivní multifokální leukoencefalopatie u lidí se sníženou funkcí imunitního systému. Stejně tak BK polyomavirus, který způsobuje u pacientů po transplantaci ledviny s polyomavirem-spojenou nefropatii. Proto je třeba plně porozumět replikačnímu cyklu polyomavirů a rolím, které v něm hrají jednotlivé virové proteiny.

Agnoprotein však kóduje genom pouze malé části polyomavirů, a tudíž se v práci nebudu podrobněji zmiňovat o ostatních, avšak bezesporu též zajímavých, polyomavirech. Stejně tak nebudu rozebírat ptáčí polyomaviry, neboť žádný z nich agnoprotein nekóduje.

Cílem mé práce je uceleně a přehledně shrnout poznatky o funkcích agnoproteinu jednotlivých polyomavirů v replikačním cyklu těchto virů a v deregulaci biologických procesů hostitelské buňky. V práci se zaměřím také na vlastnosti agnoproteinu, které mu umožňují plnit jeho funkce, jako je například jeho sekundární struktura, jeho posttranslační modifikace, jeho lokalizace v buňce a také to, kdy a jak je gen pro agnoprotein transkribován. Pro pochopení a propojení rolí agnoproteinu s ostatními polyomavirovými proteiny se budu krátce věnovat také samotné čeledi *Polyomaviridae*, průběhu replikačního cyklu těchto virů i jednotlivým virovým proteinům.

2. Polyomaviry

Polyomaviry jsou skupinou malých neobalených virů, které napadají ptáky a savce, včetně člověka. Tyto viry mají genom tvořený ds (dvouvláknovou) DNA uspořádanou do uzavřené cirkulární molekuly DNA o velikosti přibližně 5 000 bp, přičemž největší ze známých polyomavirových genomů obsahuje 5722 bp (African elephant polyomavirus 1) a nejmenší známý obsahuje 4697 bp (Bovine polyomavirus 1) (Gräfe et al., 2017; Stevens et al., 2013). Pokud bychom zahrnuli i polyomavirus-like sekvence izolované z ryb a bezobratlých, pak rozpětí velikostí genomů této skupiny by se pohybovalo mezi 3962 – 7369 bp (Buck et al., 2016).

Polyomaviry mají obecně velmi jednoduchou stavbu. Jejich kapsida se skládá minimálně ze dvou strukturních proteinů VP1 a VP2, přičemž ale u většiny zástupců je kapsida složena ze tří strukturních proteinů, a to VP1, VP2 a VP3. Jako majoritní kapsidový protein je označován VP1, neboť tvoří celou vnější část kapsidy. Naopak minoritní proteiny VP2 a VP3 se nacházejí pouze uvnitř virionu. VP1 se ihned po translaci v cytoplasmě uspořádává do pentamer, které jsou stabilizovány dočasnými disulfidickými vazbami a transportovány do jádra, kde dochází ke skládání virové částice (Li et al., 2002). Virovou částici tvoří celkem 72 pentamer proteinu VP1, přičemž 60 pentamer je hexavalentních a 12 pentamer je pentavalentních, díky čemuž vzniká ikosahedrální uspořádání kapsidy. Kapsida má průměr do 50 nm.

Jako první zástupce této virové čeledi byl objeven myší polyomavirus (Murine polyomavirus; MPyV) v polovině padesátých let minulého století (Gross, 1953). Tento virus byl popsán jako filtrovatelné agens získané z extraktu jater, sleziny a lymfatických uzlin myši trpících leukémií a způsobující u čerstvě narozených myši vznik nádorů slinných žláz. Stejně výsledky byly získány, i pokud byly izoláty z nádorů myších slinných žláz a z myši trpících leukémií pěstovány v tkáňových kulturách a supernatantem z těchto kultur byly následně očkovány čerstvě narozené myši. Ty pak vyvinuly mnohačetné nádory (Stewart et al., 1957). Právě název celé skupiny polyomaviridae je odvozen od schopnosti těchto virů indukovat různé typy nádorů (z řeckého slova poly – mnoho, oma – nádor). Jako první primátí polyomavirus byl objeven virus SV40 (Simian vacuolating virus 40) (Sweet and Hilleman, 1960) a následně došlo k objevu i prvních dvou lidských polyomavirů, a to BKPyV (BK polyomavirus) a JCPyV (JC polyomavirus) (Gardner et al., 1971; Padgett et al., 1971).

Dle Mezinárodního výboru pro taxonomii virů (International Committee on Taxonomy of Viruses; ICTV) je dnes známo 98 druhů virů patřících do čeledi *Polyomaviridae*. Tato čeleď se dělí na 4 rody: *Alphapolyomavirus*, *Betapolyomavirus*, *Gammapolyomavirus* a *Deltapolyomavirus*, přičemž nejvíce zástupců je řazeno právě do rodu *Alphapolyomavirus* a *Betapolyomavirus*, pár jich je řazeno k zbývajícím dvěma rodům a devět druhů není zatím zařazeno. Čeleď *Polyomaviridae* byla zavedena (dle ICTV) v roce 1999 a to díky rozdělení čeledi *Papovaviridae* na čeleď *Papillomaviridae*

a *Polyomaviridae*. Současné dělení rodů této čeledi máme od roku 2015, kdy se původní a jediný rod *Polyomavirus* rozdělil na čtyři stávající rody. Avšak proti tomuto uspořádání se někteří autoři vymezují.

Přibližně od roku 2010 byla snaha zavést ustálenou taxonomii pro čeleď *Polyomaviridae* a navrhnout rody dané čeledi tak, aby odpovídaly skutečným fylogenetickým vztahům. V roce 2011 byla uveřejněna studie podporující zavedení tří rodů: *Wukupolyomavirus*, *Orthopolyomavirus* a *Avipolyomavirus*, a to na základě analýz biologických vlastností jednotlivých zástupců a na základě srovnání celogenomových sekvencí a sekvencí pozdní oblasti virového genomu (Johns et al., 2011). Později se však ukázalo, že užití této oblasti k sestavení fylogenetického stromu neodráží věrně evoluci dané čeledi, neboť se zjistilo, že mezi polyomaviry došlo v minulosti k rekombinačním událostem v některých genech, včetně těch transkribovaných v pozdní fázi infekce (Calvignac-Spencer et al., 2016). Proto autoři tohoto článku užívali sekvenci genu pro produkt časné exprese, LT antigen (large T; velký T) pro sestavení fylogeneze dané čeledi, neboť předpokládají, že v této oblasti k rekombinaci nedošlo. Výsledkem bylo zavedení čtyř rodů v čeledi *Polyomaviridae*: *Alphapolyomavirus*, *Betapolyomavirus*, *Gammapolyomavirus* a *Deltapolyomavirus*. Přesto se některé polyomaviry nepodařilo přiřadit ani k jednomu z rodů. Jiný názor na uspořádání taxonomie polyomavirů má Buck a jeho skupina (Buck et al., 2016). V práci věnující se dávné evoluční historii polyomavirů dokázali srovnáním sekvencí známých polyomavirů a sekvencí možných polyomavirů nalezených u ryb a bezobratlých odhalit dávné rekombinační události napříč různými skupinami polyomavirů. Proto zastávají názor, že nynější dělení čeledi *Polyomaviridae* na čtyři rody je sice jednoduché a přehledné, avšak nebere v potaz tyto, nově odhalené, dávné rekombinace, díky nimž jsou některé ze skupin polyomavirů chimérami na genomové úrovni. Proto, podle nich, nemůže fylogeneze založená jen na srovnání LT antigenu fungovat. Navrhují řešit taxonomii polyomavirů nezávislou klasifikací hlavních genových produktů, konkrétně užít LT antigen a hlavní kapsidový protein VP1, stejně jako je hemaglutinin (H) a neuraminidáza (N) u virů chřipky. Všechny polyomaviry by pak náležely do jediného rodu *Polyomavirus* a odlišovaly by se pouze pomocí výše navrhovaného dělení.

2.1. Organizace genomu

Genomová DNA polyomavirů, se nachází v kapsidě v nadšroubovicové formě a je stabilizována histony, které si virus bere z hostitelské buňky (Lake et al., 1973). Konkrétně jde o histony H2A, H2B, H3 a H4, které společně v oktameru tvoří nukleozomy a které virus získává v jádře buňky při replikaci svého genomu.

Organizace genomu polyomavirů je jednoduchá a u všech zástupců podobná. Rozeznáváme tři hlavní oblasti: oblast časné transkripce (early region), oblast pozdní transkripce (late region) a nekódující regulační oblast (NCCR; non-coding control region). V časné a pozdní oblasti jsou proteiny kódovány v opačném směru vůči sobě, tedy na opačných vláknech.

NCCR se nachází mezi oběma zmíněnými oblastmi, řídí časnou i pozdní transkripci genů a také replikaci celého virového genomu, neboť v této oblasti leží transkripční regulační sekvence a počátek replikace (Ehlers and Moens, 2014, review). Ehlers a Moens porovnali NCCR primátích polyomavirů a prokázali, že v oblasti počátku replikace leží sekvence bohatá na AT a sekvence obsahující vazebné motivy pro LT protein. U lidských polyomavirů má promotor pro časně transkribované geny TATA box sekvenci, kterou naopak promotor genů pozdní transkripce nemá (Lednický et al., 2014; Moens et al., 2017, review).

Časná oblast všech polyomavirů, pokud nezahrneme polyomaviry ryb a „polyomavirus-like“ sekvence v bezobratlých, kóduje minimálně dva proteiny – LT antigen a ST antigen (small T; malýT) (Buck et al., 2016). Avšak z časně oblasti mnohých polyomavirů se produkuje více různých proteinů, než jen dva zmíněné, a to díky alternativnímu sestřihu mRNA. Kromě LT a ST antigenu je tedy možné u některých zástupců detekovat také střední T antigen (middle T; MT) nebo protein ALTO (Alternative to Large T Open reading frame) a další různě zkrácené formy LT antigenu (van der Meijden et al., 2015). V závislosti na druhu polyomaviru můžeme v časně oblasti najít 2 až 3 ORF (otevřený čtecí rámec; open reading frame), které se obvykle značí ORF1, ORF2 a ORF5. ORF1 a 2 mají všechny polyomaviry, neboť jsou třeba k produkci LT a ST antigenu a dalších T antigenů vznikajících alternativním sestřihem. ORF5 se nachází pouze u virů, které produkují ALTO protein nebo MT antigen, jehož součástí je právě ORF1 a ORF5 (van der Meijden et al., 2015).

Při srovnání genomových sekvencí různých zástupců polyomavirů zjistíme, že obvyklá délka ORF1 se pohybuje okolo 550 nukleotidů (nt) a průměrná délka ORF2 je asi 1800 nt. Oba otevřené čtecí rámce na sebe obvykle těsně navazují. Délka ORF5 je variabilní. NCCR má obvyklou délku přibližně 400 nt.

Pozdní oblast transkripce kóduje vždy minimálně dva strukturální proteiny, avšak obvykle je zde proteinů kódováno více. Jedná se o hlavní (majoritní) kapsidový protein VP1 a minoritní kapsidový protein VP2. Každý z těchto dvou proteinů je produkován z odlišného ORF. Druhým minoritním kapsidovým proteinem některých polyomavirů je VP3, který je produkován ze stejného čtecího rámce, jako VP2, ale využívá jiného dalšího AUG kodónu mRNA (např. u viru SV40) nebo vlastní, alternativně sestřižené RNA (u myšího polyomaviru). Viry, které nekódují VP3, mají obecně kratší ORF pro minoritní kapsidový protein (Ehlers and Moens, 2014, review). U viru SV40 byla navíc prokázána produkce dalšího proteinu, který byl pojmenován VP4 a který není součástí virové kapsidy na rozdíl od předchozích VP (Daniels et al., 2007). VP4 je produkován ze stejné mRNA a ve stejném čtecím rámci jako VP2 a VP3 a sdílí s těmito dvěma proteiny C-koncovou část. Očekává se, že VP4 budou mít i další polyomaviry, a to na základě genomových analýz jednotlivých zástupců, avšak zatím nebyla produkce VP4 u ostatních polyomavirů experimentálně prokázána. Výsledky některých studií naznačují, že by VP4 viru SV40 měl mít funkci viroporinu (Giorda et al., 2012), avšak jsou i studie, které existenci VP4 popírají (Henriksen et al., 2016). Henriksenovi a jeho skupině se nepodařilo

detekovat VP4 viru SV40 v jaderném extraktu infikovaných buněk pomocí hmotnostní spektrometrie a navíc prokázali, že množství uvolněného wt (wild type) viru SV40 z buněčných kultur do média je stejné, jako uvolněné množství viru SV40 mutovaného v teoretickém iniciačním kodonu pro VP4. Tudíž usuzují, že VP4 neplní úlohu viroporinu a navíc vyvstala otázka, zda je tento protein při infekci virem SV40 vůbec produkován.

Kromě již výše zmíněných proteinů kóduje pozdní oblast u některých virů i další, nestrukturní proteiny. Především jde o tzv. agnoprotein, jehož ORF je označováno jako agnogen a leží v 5' oblasti transkriptu produkovaného z late regionu. Agnoprotein kódují pouze dva lidské polyomaviry (BKPyV a JCPyV) a několik dalších savčích polyomavirů, například: SV40 virus, ChPyV1 (šimpanzí PyV1; Chimpanzee PyV1) a polyomavirus kočkodana červenonosého (CeryPyV1; Cercopithecus erythrotis PyV1), jak je dále rozvedeno v části 2.5. „Polyomaviry kódující agnoprotein“. Agnogen kóduje poměrně krátký protein, u JCPyV, BKPyV a SV40 viru se pohybuje jeho velikost mezi 62-71 aa (amino acid; aminokyselina). Jako agnogeny bývaly označovány i některé ORF ptačích polyomavirů, které leží ve stejné oblasti jako agnogen savčích polyomavirů, avšak ukázalo se, že tyto domnělé agnoproteiny nemají sekvenční homologii se savčími agnoproteiny, takže nyní se tyto ptačí ORF v pozdní oblasti označují buď jako VP4 nebo ORF-X (Johns et al., 2006).

2.2 Charakterizace hlavních polyomavirových proteinů

LT antigen je největší polyomavirový protein, který má řadu důležitých funkcí. Jeho velikost se u lidských polyomavirů pohybuje mezi 641 až 817 aa (Moens et al., 2017, review) a stejně tak primátí polyomaviry vykazují přibližně podobné rozpětí velikosti LT antigenu. N-koncová část tohoto proteinu je stejná, jako N-koncová část ST antigenu, protože součástí obou těchto proteinů je ORF1, avšak pro tvorbu LT antigenu je užit jen krátký úsek a větší část LT antigenu kóduje ORF2. LT antigen se podílí na regulaci virové genové exprese, reguluje přepnutí z časně do pozdní fáze transkripce, podílí se na replikaci virové DNA, brání buňce v apoptóze a indukuje vstup hostitelské buňky do S fáze buněčného cyklu (An et al., 2012, review; Harris et al., 1996; Brady and Khoury, 1985). Celý protein je rozdělen na několik, dobře konzervovaných, domén, které plní specifické funkce. Konkrétně jde (ve směru od N-konce k C-konci proteinu) o tyto domény: chaperonová DnaJ doména, Ori vazebná doména (OBD), Zn-finger vazebná doména (Zn-vazebná doména) a ATPasová doména (An et al., 2012, review). Mezi prvními dvěma doménami je oblast, která nemá pevně danou sekundární strukturu (disordered region) a kde se nachází řada vazebných motivů pro buněčné proteiny a také jaderný lokalizační signál (An et al., 2012, review). Jeden z nejdůležitějších vazebných motivů je LXCXE, díky kterému dokáže LT antigen interagovat s rodinou retinoblastomových proteinů (pRb) (Harris et al., 1996) a indukovat vstup buňky do S fáze (Bollag et al., 2000). Dále dokáže LT antigen vázat p53, díky čemuž inhibuje některé signalizační dráhy zajišťované tímto proteinem (Imai et al., 1994). LT antigen váže DNA v Ori místě (origin of replication; počátek

replikace) a také má helikázovou aktivitu nutnou pro zahájení replikace virového genomu (Valle et al., 2006).

ST antigen je produkován z celé délky ORF1 a jeho velikost u lidských polyomavirů se pohybuje mezi 172 až 199 aa (Moens et al., 2017, review). Primátí polyomaviry mají též podobné rozpětí velikostí ST antigenu. ST antigen podporuje a posiluje řadu procesů, které primárně zajišťuje LT protein, jako je například přepnutí časné transkripce na pozdní transkripci nebo napomáhá replikaci virového genomu (Berger and Wintersberger, 1986; Bikel' and Loeken, 1992). Stejně jako LT antigen má ST také DnaJ doménu na N-konci, neboť je to část společná oběma proteinům. Naopak část sekvence unikátní pro ST protein interaguje s protein fosfatázou 2A (PP2A), čímž ovlivňuje další proteiny zapojené do regulace buněčného cyklu a díky tomu ovlivňuje buněčný cyklus a napomáhá transformaci buněk (Skoczylas et al., 2005).

Hlavní kapsidový protein VP1, jak bude blíže popsáno v části věnující se životnímu cyklu polyomavirů, slouží k rozpoznání cílové buňky a zprostředkovává přichycení a vstup do buňky. Velikost tohoto proteinu se pohybuje přibližně mezi 352 – 503 aa u primátích polyomavirů, avšak většina je kratší než 400 aa (Ehlers and Moens, 2014, review). VP2 je menší protein než VP1 a je produkován z odlišně sestřižené pozdní mRNA. Spolu s VP1 (a popřípadě VP3) tvoří kapsidu polyomaviru. VP2 zřejmě hraje roli při vstupu viru do buňky, alespoň u SV40 a MCPyV (polyomavirus Merkelových buněk; Merckell cell polyomavirus) to vyplývá z experimentů (Schowalter and Buck, 2013), avšak přesná role VP2 v životním cyklu většiny polyomavirů zatím není známá. VP3, pokud je u daného polyomaviru přítomný, nese obvykle v N-koncové části MALXX ϕ motiv (kde ϕ =W, F nebo Y), díky čemuž je možné existenci VP3 u řady polyomavirů predikovat (Ehlers and Moens, 2014, review). VP3 je součástí virové kapsidy, avšak jeho funkce není zatím přesně známa. U polyomavirů SV40 a MPyV byly prokázány viroporinové vlastnosti obou minoritních kapsidových proteinů (Giorda et al., 2013).

2.3. Životní cyklus

Polyomaviry rozpoznávají cílové buňky díky receptorům na buněčném povrchu a to pomocí strukturních a sekvenčních specifit svého kapsidového proteinu VP1. Bylo prokázáno, že většina lidských polyomavirů využívá gangliosidy jako svůj receptor (Low et al., 2006; Neu et al., 2012). Výjimkou v tomto směru je lidský polyomavirus 6 a lidský polyomavirus 7 (human polyomavirus; HPyV6 a HPyV7). Ty totiž využívají jiné, než gangliosidové receptory, a to proto, že žlábek v proteinu VP1 sloužící k vazbě sialové kyseliny u ostatních zástupců polyomavirů je u VP1 proteinu HPyV6 a HPyV7 překryt prodlouženou smyčkou proteinového řetězce, což znemožňuje vazbu gangliosidů do specifického místa (Stroh et al., 2014). Kromě receptorů lidských polyomavirů jsou ještě známé gangliosidové receptory využívané MPyV a SV40 virus (Tsai et al., 2003), ale primární receptory či ko-receptory dalších polyomavirů jsou velmi málo prozkoumány.

Vstup do buňky probíhá u většiny polyomavirů zřejmě endocytosou v oblasti lipidových raftů. Odlišný v tomto směru je pouze JCPyV, u kterého byl prokázán vstup do buněk přes klatrinové váčky (Pho et al., 2000). Po internalizaci se virus nachází v časném endosomu, který přechází v pozdní endosom až endolysosom a postupně dochází k okyselení váčku, což je důležité pro zdárnou infekci (Engel et al., 2011; Liebl et al., 2006). Následně se virus zatím neznámou dráhou dostává do ER (endoplasmatické retikulum), kde dochází k částečnému rozvolnění kapsidy (Schelhaas et al., 2007). Virus je pak uvolněn do cytoplasmy a to pomocí proteinů ERAD dráhy (ER-associated degradation) a součinností VP2/VP3 proteinů (Schelhaas et al., 2007). V cytoplasmě dojde k uvolnění virové DNA, která je transportována do jádra, zřejmě za pomoci VP3 (Nakanishi et al., 2007). Nejnovější práce však neznačuje, že roli v transportu virové DNA do jádra hraje VP1 společně s VP2/3, neboť je-li mutován jaderný lokalizační signál pouze u VP1 nebo pouze u VP2, dokáží se navzájem zastoupit a virus se dostane do jádra. Pouze mutace jaderných lokalizačních signálů u všech kapsidových proteinů vede k selhání vstupu viru do jádra (Soldatova et al., 2018).

V jádře je zahájena časná transkripce z promotoru, který leží v NCCR a vzniká tak jedna prekurzorová mRNA, která následně prochází alternativním sestřihem. V promotorové oblasti v NCCR se nachází možné vazebné motivy pro buněčné transkripční faktory a nasedá zde buněčná RNA polymeráza II (Gallo et al., 1990; Lednický et al. 2014). Po translaci v cytoplasmě se LT antigen vrací zpět do jádra díky svému jadernému lokalizačnímu signálu (Houben et al., 2015). Zde interaguje s GAGGC vazebným motivem v blízkosti Ori a zároveň interaguje s buněčnými transkripčními faktory, což je důležité pro iniciaci replikace virového genomu a dále napomáhá replikaci virové DNA svou helikázovou aktivitou, jak bylo zmíněno výše. ST antigen napomáhá virové replikaci tak, že stabilizuje LT antigen (Kwun et al., 2013). Také dochází k přepnutí z časně na pozdní fázi transkripce díky tomu, že se LT váže i na nízkoafinní motivy v oblasti promotoru časně oblasti a blokuje transkripci (Moens et al., 2017, review). Virové proteiny produkované z late regionu (VP1/2/3) jsou v cytoplasmě translatovány a díky svým jaderným lokalizačním signálům se vrací zpět do jádra (Clever and Kasamatsu, 1991; Ishii et al., 1996).

V jádře dochází k sestavení virové částice (Erickson et al., 2012). Jak probíhá uvolnění virionů z buňky, není zatím u většiny polyomavirů zcela jasné. Některé polyomaviry způsobují lyzi napadených buněk (Norikin and Ouellette, 1976) a některé naopak mohou být z buňky vylučovány, aniž by buňka byla poškozena (Clayson et al., 1989; Evans et al., 2015). Některé polyomaviry navíc zřejmě využívají agnoproteinu, jakožto viroporinu, při uvolnění z buňky (Suzuki et al., 2010).

2.4. Spektrum hostitelů

Naprostá většina dnes známých polyomavirů napadá savce a ptáky (Calvignac-Spencer et al., 2016). Nové studie však ukazují, že hostitelské spektrum polyomavirů může být mnohem širší a že mohou napadat také ryby či plazy (Buck et al., 2016; Dill et al., 2016). Při prohledávání genomových databází je možné identifikovat sekvence pocházející z hmyzu nebo pavoukovců, které jsou podobné

sekvencím VP1 nebo LT antigenu a dokonce se podařilo identifikovat téměř celý polyomavirový genom u štíra *Centruroides exilicauda* (Buck et al., 2016). To naznačuje, že polyomaviry mají bohatou evoluční historii.

Infekce ptáků způsobené polyomaviry vedou buď k ustanovení chronické infekce (obvykle u dospělých jedinců) nebo k závažným poruchám orgánů a rychlé smrti (obvykle u velmi mladých, často imunitně naivních, jedinců) (Johns and Muller, 2007, review). Zatím nebylo potvrzeno, že by některý z ptačích polyomavirů způsoboval nádory u zdravých hostitelů.

Infekce savců způsobené polyomaviry mají různou podobu. Některé druhy polyomavirů napadající savce mohou způsobit nádorová onemocnění, jiné druhy způsobují léze nebo poškození některých orgánů a jiné ustanovují chronické infekce u zdravých jedinců (Moens et al., 2017, review).

2.4.1. Lidské polyomaviry a s nimi spojené nemoci

Celkem 8, z dnes známých 13 lidských polyomavirů, je spojováno s nějakým konkrétním onemocněním. Infekce většinou lidských polyomavirů vede u zdravých jedinců ke vzniku bezpříznakové chronické infekce, kterou má člověk po celý život. Problém nastává u imunosuprimovaných jedinců, ať už z důvodu nemoci nebo podávání imunosupresivních léků, kdy může dojít k reaktivaci viru a propuknutí nemoci (Hirsch and Snyderman, 2005; van der Meijden et al., 2010). HPyV1 až HPyV8 tedy mohou způsobit určitá onemocnění nebo patologie u člověka, z čehož pouze MCPyV je spojován se vznikem nádorového onemocnění – karcinomu Merkelových buněk (Feng et al., 2008; Prado et al., 2018, review). Z těchto osmi lidských polyomavirů se zde zaměříme především na BKPyV a JCPyV, neboť pouze tyto lidské polyomaviry kódují agnoprotein, kterému se budeme věnovat dále.

V běžné populaci, napříč různými státy, má BKPyV poměrně vysokou séroprevalenci (55 % až 85 %) a to již od dětského věku (Knowles, 2006). Předpokládá se, že virus se do těla dostává přes dýchací cesty, ale není ani vyloučena urino-orální nebo fekal-orální cesta přenosu. Následně dochází k primární infekci, která je ovšem bezpříznaková, popřípadě se může projevit jako respirační onemocnění (Goudsmit et al., 1982). Virus se dále šíří do ledvin, kde ustanovuje persistentní infekci po zbytek života člověka. U pacientů po transplantaci ledvin nebo po transplantaci kostní dřeně, kteří mají následně imunosupresivní léčbu, může dojít k reaktivaci viru, což může vést ke vzniku hemoragické cystitidy nebo s polyomavirem-spojené nefropatie (PVAN) (Bennett et al., 2012, review). PVAN obvykle vede k odmítnutí transplantátu. Dnes jsou známy některé rizikové faktory, které mohou šanci vzniku PVAN a tedy i odmítnutí transplantátu zvyšovat, ale zdaleka se nedá předpovědět, jestli daný pacient onemocní PVAN či nikoliv (Bennett et al., 2012, review).

JCPyV je původcem progresivní multifokální leukoencefalopatie (PML), což je smrtelné onemocnění projevující se demyelinizací neuronálních axonů v CNS. Demyelinizace je způsobena lyzí oligodendrocytů, kterou způsobuje produktivní infekce JC polyomaviru (Dang et al., 2012; Merabova

et al., 2008). PML postihuje imunosuprimované jedince, kteří buď mají AIDS bez antiretrovirové léčby nebo ty, kterým jsou v rámci léčby jiného onemocnění podávány léky potlačující činnost imunitního systému (Saylor and Venkatesan, 2016, review). Při porovnání studií z různých zemí bylo zjištěno, že séroprevalence JCPyV v populaci je mezi 33 % až 91 % (Wollebo et al., 2015, review). Za místo primární infekce JCPyV je považován respirační systém, konkrétně tedy krční mandle, kde se podařilo detekovat sekvence patřící danému polyomaviru (Kato et al., 2004). Následně virus perzistuje v ledvinách a jeho bazální replikační aktivitu je možné v některých případech detekovat v moči. Také se ukázalo, že je možné detekovat JCPyV v kostní dřeni nebo slezině imunosuprimovaných jedinců, odkud se zřejmě může šířit krví prostřednictvím leukocytů do CNS (Houff et al., 1988). Na druhou stranu, je možné detekovat JCPyV v jádrech leukocytů i u zdravých jedinců, takže objasnění role kostní dřene a leukocytů ve vývoji PML bude ještě třeba objasnit (Dörries et al., 1994). Také se stále neví, kde a kdy přesně vzniká neurotropní forma JCPyV, která následně způsobuje patogenezi v CNS.

2.5. Polyomaviry kódující agnoprotein

Všechny dnes známé polyomaviry, které ve svém genomu kódují agnoprotein, využívají jako své hostitele savce (Gerits and Moens, 2012, review). Seznam savčích polyomavirů, které mají ORF pro agnoprotein, se nachází v tabulce 1. (Tab. 1.) Domnělý agnoprotein byl predikován také u polyomavirů napadajících ryby či dokonce bezobratlé (Buck et al., 2016), avšak jde pouze o dohad.

Vyvstává zde otázka, jak vlastně definovat gen pro agnoprotein. Můžeme uvažovat, že je to jakýkoliv ORF ležící v pozdní oblasti „up stream“ od genu pro VP2, a díky tomu pak můžeme jako agnoprotein označit všechny takové ORF savčích i jiných polyomavirů. Pokud však budeme brát jako agnoproteiny pouze ty proteiny, které jsou homologní k sekvencím pro agnoproteiny BKPyV, JCPyV a SV40, tak zůžeme počet polyomavirů, které kódují ORF pro agnoprotein, na osm (Tab. 2.). Ukázalo se totiž, že pouze agnoproteiny kódované BKPyV, JCPyV, SV40 a některými dalšími primáty polyomaviry (Tab. 2.) jsou si navzájem homologní, ale ORF označované též jako agnogeny u jiných savčích polyomavirů mají výrazně odlišné sekvence. Navíc ani není možné porovnat struktury a funkce jednotlivých agnoproteinů u různých savčích polyomavirů, neboť pouze u BKPyV, JCPyV a SV40 byla exprese agnoproteinu v infikovaných buňkách experimentálně potvrzena (Jay et al., 1981; Okada et al., 2001; Rinaldo et al., 1998). U ostatních savčích polyomavirů, které by teoreticky agnoprotein kódovat mohly, byla existence agnoproteinu pouze predikována *in silico*, a to na základě známých genomových sekvencí jednotlivých polyomavirů umístěných v databázi NCBI (National Center for Biotechnology Information, 2019). Tudíž o těchto údajných proteinech nic nevíme, ani to, zda jsou vůbec při infekci buněk danými viry produkovány či nikoliv.

Název viru	Délka v aa*	Kód**
BKPyV	66	NC_001538.1
JCPyV	71	NC_001699.1
SV40	62	NC_001669.1
Pan troglodytes verus PyV 8	63	NC_028635.1
Pan troglodytes troglodytes PyV 1	62	NC_027532.1
Baboon PyV 1	68	NC_007611.1
Chlorocebus pygerythrus PyV 2	68	NC_025896.1
Cercopithecus erythrotis PyV 1	70	NC_025892.1
Saimiri sciureus PyV 1	86	NC_038559.1
Squirrel monkey PyV 1	70	NC_009951.1
Bos taurus PyV 1	118	NC_001442.1
Califormia sea lion PyV 1	50	NC_013796.1
Mastomys natalensis PyV 1	154	NC_025895.1
Myotis PyV VM-2008	30	NC_011310.1
Sea otter PyV 1	69	NC_025259.1

Tab. 1.: Seznam polyomavirů, které ve svém genomu kódují gen pro agnoprotein (BKPyV, JCPyV a SV40) a polyomavirů, které mají predikovan ORF pro agnoprotein ve svém genomu, avšak nebyl u nich experimentálně prokázán (všechny mimo tři výše zmíněných). Seznam je doplněn velikostí jednotlivých agnoproteinů. *aminokyseliny; **kód sloužící k vyhledávání v databázi NCBI

Tab. 2.: Primátí polyomaviry jejichž agnoproteiny jsou navzájem homologické. *aminokyseliny; **kód sloužící k vyhledávání v databázi NCBI

Název viru	Délka v aa*	Kód**	Kód** proteinové sekvence užitá pro srovnávání
BKPyV	66	NC_001538.1	ARE72387.1
JCPyV	71	NC_001699.1	ASV51889.1
SV40	62	NC_001669.1	ABU86093.1
Pan troglodytes verus PyV 8	63	NC_028635.1	AMQ22769.1
Pan troglodytes troglodytes PyV 1	62	NC_027532.1	YP_009158871.1
Baboon PyV 1	68	NC_007611.1	YP_009158871.1
Chlorocebus pygerythrus PyV 2	68	NC_025896.1	YP_009111360.1
Cercopithecus erythrotis PyV 1	70	NC_025892.1	YP_009111341.1

Pokud provedeme porovnání sekvencí osmi primátích polyomavirů z Tab. 2. (Obr. 1.), zjistíme, že všechny mají vysokou sekvenční identitu, mají zachované sekvenční motivy typické například pro agnoproteiny JCPyV a BKPyV a tudíž můžeme usuzovat, že sdílejí i podobné vlastnosti a funkce.

Obr. 1.: Porovnání proteinových sekvencí agnoproteinů polyomavirů z Tab. 2. Srovnání bylo provedeno pomocí programu Clustal Omega (Madeira et al., 2019). Kódy použitých sekvencí jsou uvedeny v Tab.2., kde jsou přiřazeny jednotlivých polyomavirům.

```

ABU86093.1      MVLRRLSRQASVKVRRSWTESKKAQRLFVVFVLELLLQFCEGEDTVDGKRKKPERLTEKP      60
ASV51889.1      MVLRQLSRKASVKVSKTWSGKTKRAQRILIFLLEFLDFCTGEDSVDGKKRQRHSGLTEQ      60
YP_009111341.1  MVLRQLSRQASVKVGKTWTGTKRRRAQRILIFLLELLLEFCRGEDSIDGKKKKDSLDTTE      60
YP_009111360.1  MVLRQLSRQASVKVGKTWTGTKRRRAQRILIFILEILLDFCRGEDSVDGKKKKDSLDTNTE      60
ABD92873.1      MVLRQLSRQASVKVGKTWTGTKRRRAQRIFIFILELLDFCRGEDSVDGKKKKDSLDTKTE      60
ARE72387.1      MVLRQLSRQASVKVGKTWTGTKRRRAQRIFIFILELLLEFCRGEDSVDGKKNKSTTALPAVK      60
AMQ22769.1      MVLRQLSRQASVKVGKTWTGTKRRRAQRIFIFILEILLLEFCRGEDSVDGKQKKRESTLTDK      60
YP_009158871.1  MVFRQLSRQASVKVGKTWTGTKRRRAQRIFIFILELLLEFCRGEDSVDGKQKKTESTLTKDK      60
**:*:***:***** :*: *: **::*:**:*:* **::***:..

ABU86093.1      ES----- 62
ASV51889.1      TYSALPEPKAT 71
YP_009111341.1  LLSETEKKES- 70
YP_009111360.1  TLTEKKES--- 68
ABD92873.1      TVTEKKES--- 68
ARE72387.1      DSVKDS----- 66
AMQ22769.1      TGY----- 63
YP_009158871.1  GY----- 62

```

2.5.1. Domnělý agnoprotein u ptačích polyomavirů

Ve starší literatuře je nezdědko uváděno, že některé polyomaviry, které napadají ptáky, kódují agnoprotein ve svém genomu (Johne et al., 2000, p. 1; Liu and Hobom, 1999). Toto tvrzení však bylo postupem času vyvráceno a ORF, který může kódovat jeden nebo několik proteinů, byl přejmenován na ORF pro VP4, popřípadě na ORF-X (Johne et al., 2006; Müller and Johne, 2001). Původně byl produkt genu, který leží v oblasti pozdní transkripce, pojmenován jako agnoprotein proto, že lokalizace v genomu odpovídala umístění genu pro agnoprotein u savčích polyomavirů. Později se však zjistilo, že domnělý agnoprotein ptačích polyomavirů není homologický s žádnými proteiny kódovanými savčími polyomaviry. Navíc se domnělý agnoprotein ptačích polyomavirů nachází v kapsidě a tudíž se jedná o strukturní protein, což neodpovídá funkci savčích agnoproteinů, které jsou nestrukturní proteiny (Jackson and Chalkley, 1981).

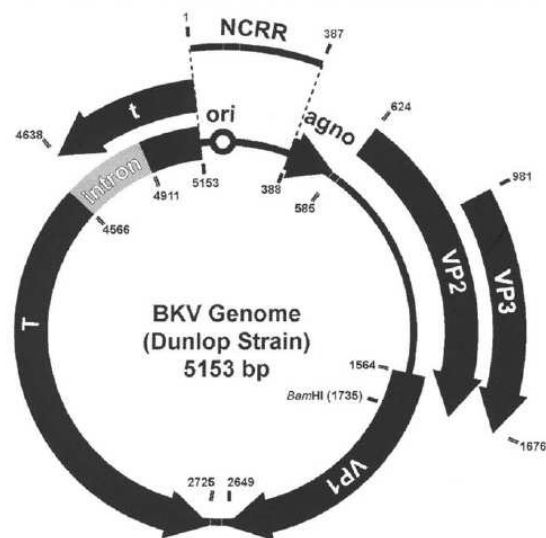
Jak již bylo zmíněno výše, pouze agnoproteiny BKPyV, JCPyV a viru SV40 byly experimentálně potvrzeny v infikovaných buňkách a jsou dostatečně prozkoumány, aby bylo možné srovnat a zhodnotit jejich vlastnosti, funkce a význam pro polyomaviry, jenž je kódují. Ostatním agnoproteinům, které jsou popsány pouze na základě existence ORF u jiných polyomavirů, se dále věnovat nebudeme. Stejně tak se nebudeme věnovat domnělým agnoproteinům u ptačích polyomavirů, neboť bylo ukázáno, že se o agnoproteiny nejedná.

3. Gen pro agnoprotein

Možná existence zatím neznámého polyomavirového proteinu byla poprvé popsána u viru SV40 (Reddy et al., 1978). Po získání celogenomové sekvence viru SV40 byl v pozdní oblasti, mezi NCCR a ORF pro VP2, objeven ORF jež by mohl kódovat zatím neznámý protein o délce 62 aminokyselin. Tento ORF byl následně pojmenován jako agnogen a jeho putativní produkt jako agnoprotein. Až roku 1981 byla existence tohoto neznámého proteinu poprvé prokázána (Jay et al., 1981). Tehdy byl v buňkách infikovaných virem SV40 detekován neznámý protein o molekulové hmotnosti 7,9 kDa, který se v neinfikovaných buňkách nevyskytoval. Stejně tak se nevyskytoval v buňkách, které byly infikovány mutovaným SV40 v oblasti ORF pro agnoprotein. Později byl popsán agnoprotein také u BKPyV i JCPyV (Okada et al., 2001; Rinaldo et al., 1998) a bylo ukázáno, že agnoprotein je produkován v buňkách infikovaných těmito polyomaviry.

Gen pro agnoprotein leží v místě, kde končí NCCR a začíná oblast genů transkribovaných v pozdní fázi infekce viz Obr.2. Promotor pro pozdní fázi transkripce se nachází těsně před genem pro agnoprotein a naopak těsně za ním navazuje gen pro VP2.

Obr. 2.: Organizace genomu BK polyomaviru. Směr šipek naznačuje směr transkripce. Použité zkratky: agno = agnoprotein, NCCR = non-coding regulatory region tj. NCCR, t = malý t-antigen, T = velký T-antigen, ori = počátek replikace. Šedý obdélníček označuje intron. Převzato z (Cubitt, 2006).



3.1. Sekvence genu pro agnoprotein

Délka sekvence agnogenu u BKPyV je 201 nukleotidů (nt), JCPyV 216 nt a gen pro agnoprotein viru SV40 má délku 189 nt (Obr. 3). Do těchto hodnot byly započítány i nukleotidy iniciačního a stop kodonu. Všechny výše zmíněné sekvence jsou bohaté na AT, s několika úseky za sebou se opakujících adeninů nebo thyminů, viz Obr. 3. Všechny geny začínají klasickým iniciačním kodonem ATG. Jako stop kodon agnogenu BKPyV a JCPyV slouží TAG triplet, stop kodonem agnogenu viru SV40 je triplet TAA. Všechny sekvence si jsou na začátku a v centrální oblasti velmi podobné, avšak koncové části se liší, čemuž odpovídá i následné aminokyselinové složení výsledných proteinů.

Obr. 3.: Sekvence genů pro agnoproteiny BKPyV, JCPyV a SV40. Zdrojem sekvencí je databáze NCBI (National Center for Biotechnology Information, 2019).

BKPyV agnogene sequence (gene ID: 29031013)

```
1 atggttctgc gccagctgtc acgacaagct tcagtgaaag ttggtaaaac ctggactgga
61 acaaaaaaaaa gagctcagag gatttttatt tttatttttag agcttttgct ggaattttgc
121 agaggtgaag acagtgtaga cgggaaaaaac aaaagtacca ctgctttacc tgctgtaaaa
181 gactctgtaa aagactccta g
```

JCPyV agnogene sequence (gene ID: 1489519)

```
1 atggttcttc gccagctgtc acgtaaggct tctgtgaaag ttagtaaaac ctggagtgga
61 actaaaaaaaa gagctcaaaag gattttaatt tttttgtag aatttttgct ggacttttgc
121 acaggtgaag acagtgtaga cgggaaaaaaa agacagagac acagtgggtt gactgagcag
181 acatacagtg ctttgctga accaaaagct acatag
```

SV40 agnogene sequence (gene ID: 29031015)

```
1 atggtgctgc gccggctgtc acgccaggcc tccgttaagg ttcgtagtgc atggactgaa
61 agtaaaaaaaaa cagctcaacg cctttttgtg tttgttttag agcttttgct gcaattttgc
121 gaaggggaag atactgttga cgggaaacgc aaaaaaccag aaagggttaac tgaaaaacca
181 gaaagttaa
```

3.2. Transkripce a translace genu pro agnoprotein

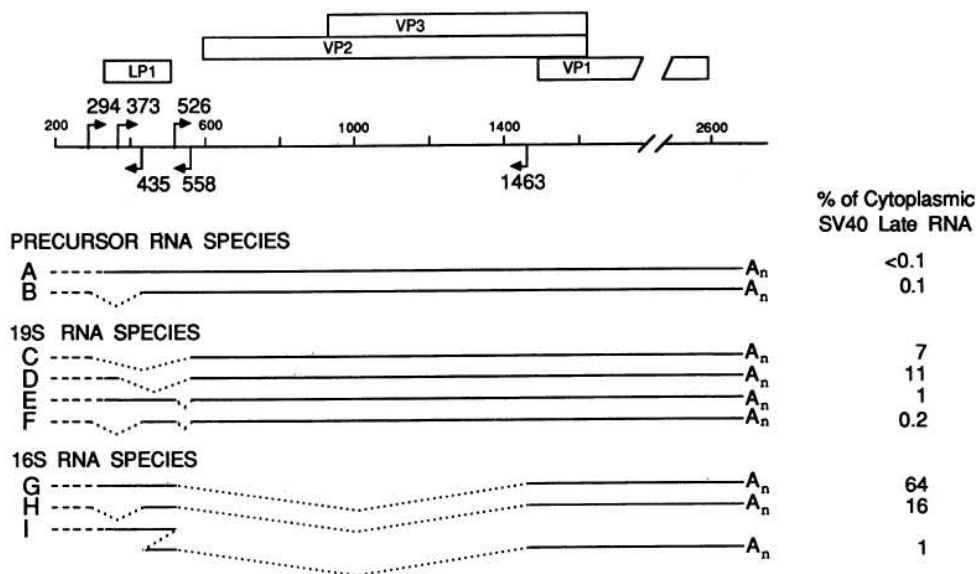
Transkripce je zahajována z pozdního promotoru, který leží v NCCR, před genem pro agnoprotein. Zahájení transkripce z pozdního promotoru napomáhá LT antigen trans-aktivací (Brady and Khoury, 1985; Gallo et al., 1988). LT antigen se neváže přímo do oblasti pozdního promotoru, ale tím, že interaguje nebo jinak modifikuje buněčné transkripční faktory, umožňuje, aby se tyto buněčné transkripční faktory navázaly do specifických oblastí pozdního promotoru a zahájily transkripci (Gallo et al., 1988). Navíc LT antigen zahajuje replikaci virového genomu, čímž zároveň favorizuje transkripci z pozdního promotoru. LT antigen také interaguje s TEF-1 (transcriptional enhancer factor 1; transkripční podporující faktor 1), který by jinak bránil zahájení transkripce z pozdního promotoru (Berger et al., 1996). Bylo prokázáno, že se malý t antigen nepřímo podílí na trans-aktivaci a to tak, že napomáhá zvýšit koncentraci LT antigenu podporou transkripce časného promotoru (Bikel' and Loeken, 1992).

Polyomaviry nekódují DNA dependentní RNA polymerázu, takže transkripci zajišťuje buněčná DNA dependentní RNA polymeráza II a buněčné transkripční faktory, jako jsou: Sp1, AP-1, OBP100 a možná další, které se váží do specifických oblastí pozdního promotoru (Gallo et al., 1990; Saffer et al., 1990; Sturm et al., 1987).

Vzniká primární transkript, který pokrývá všechny pozdní geny, včetně genů pro agnoprotein, VP1, VP2, VP3. Tato pre-mRNA je následně posttranskripčně modifikována a podléhá alternativnímu sestřihu. Alternativním sestřihem vznikají dvě odlišné skupiny mRNAs, konkrétně 19S mRNA a 16S mRNA (Good et al., 1988; Shishido-Hara et al., 2000). První skupina několika mRNA, které jsou si velmi podobné a které se souhrnně označují jako 19S mRNA, slouží k syntéze minoritních

kapsidových proteinů VP2 a VP3. Druhá skupina několika si navzájem podobných mRNA, které spadají do skupiny 16S mRNA, slouží k syntéze majoritního kapsidového proteinu VP1 a agnoproteinu (Good et al., 1988). Toto rozdělení funkcí dvou skupin mRNA platí pouze u viru SV40. Na Obr. 4. jsou zobrazeny jednotlivé mRNA viru SV40 a také jejich procentuální zastoupení v cytoplasmě infikovaných buněk. Díky tomu víme, že naprostá většina agnoproteinu, jež je v buňkách infikovaných virem SV40 translatována, pochází z 16S mRNA, která celkem tvoří 64% všech virových mRNA (Good et al., 1988). Na Obr. 4. je označena písmenem G. Pouze malá část agnoproteinu je translatována z 19S mRNA, která nemá vystřiženou sekvenci kódující gen pro agnoprotein a která tvoří přibližně jedno procento celkové virové mRNA, viz Obr. 4E.

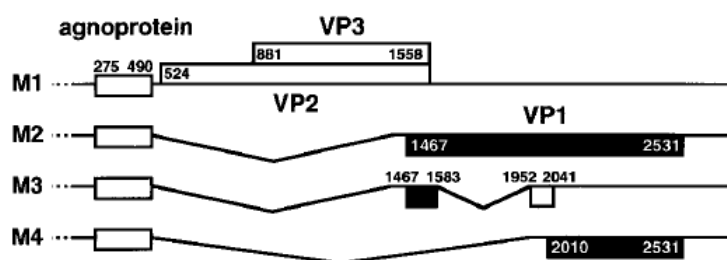
Obr. 4.: Přehled všech virových mRNA, které jsou produkovány v buňkách infikovaných virem SV40 (spodní část obrázku), doplněný o mapu celého late regionu viru SV40 a genových produktů, které jsou zde kódovány (horní část obrázku). LP1 = agnoprotein. Vpravo mířící šipky popsané 294, 373 a 526 označují 5'sestřihová místa. Vlevo mířící šipky popsané 435, 558 a 1463 označují 3'sestřihová místa. Napravo od jednotlivých mRNA je zaznamenáno jejich procentuální zastoupení v buňkách infikovaných virem SV40. Upraveno podle (Good et al., 1988).



Také u JCPyV byly popsány různé typy pozdních mRNA, avšak způsob sestřihu a sestřihová místa jsou odlišná a také výsledné mRNA se liší od těch produkovaných virem SV40. Yukiko Shishido-Hara a její kolegové prokázali, že naprostá většina pozdních mRNA JCPyV obsahuje tzv. leader sekvenci, jejíž součástí je i ORF pro agnoprotein (Shishido-Hara et al., 2000). Tudíž se ukázalo, že JCPyV nevyužívá potenciálně sestřihová místa ležící v leader sekvenci a ORF pro agnoprotein je, díky tomu, součástí téměř všech pozdních mRNA produkovaných JCPyV. Na Obr. 5. jsou vyznačeny pozdní mRNA produkované buňkami infikovanými JCPyV. mRNA označená jako M1 je nesestřižená a dává vznik agnoproteinu a minoritním kapsidovým proteinům VP2 a VP3. ORF pro VP1 je u mRNA

M1 také zachován, avšak předpokládá se, že majoritní kapsidový protein není z této mRNA syntetizován, neboť před ORF, který jej kóduje je 13 jiných AUG a tudíž ribosomy nerozeznávají AUG kodón genu pro VP1 jako iniciační kodon (Shishido-Hara et al., 2000). Naopak mRNA M2 (Obr. 5.) slouží k expresi agnoproteinu i VP1 díky vystřížení oblasti s ORF pro VP2 a VP3. Zbylé M3 a M4 mRNA obsahují ORF kódující zatím nepopsané proteiny, avšak kromě toho, že mají v 5' oblasti ORF pro agnoprotein, nejsou pro naši problematiku dále zajímavé.

Obr. 5.: Přehled virových mRNAs, které jsou produkovány v buňkách infikovaných JCPyV. Obdélníky jsou zde naznačeny ORFs pro jednotlivé proteiny. Ve všech uvedených mRNA je přítomen ORF pro agnoprotein. Převzato z (Shishido-Hara et al., 2000).



Z výše uvedených informací vyplývá, že hlavní rozdíl v produkci pozdních mRNA u SV40 a JCPyV je v tom, že genom SV40 má sestřihová místa vložená v sekvenci pro agnoprotein a tedy jen některé formy mRNA vzniklé alternativním sestřihem nesou ORF pro agnoprotein, zatímco JCPyV genom sestřihová místa v sekvenci pro agnoprotein nemá, a tudíž všechny pozdní mRNA nesou ORF pro agnoprotein.

Pozdní mRNA produkované v buňkách infikovaných JCPyV i virem SV40 jsou polycistronní, jak je patrné z výše uvedených charakteristik jednotlivých mRNA.

Virové mRNA jsou po transportu do cytoplasmy translatovány na cytosolických ribozomech. Pokud je ORF pro agnoprotein v dané polycistronní mRNA přítomen, tak je vždy translatován jako první, neboť leží v 5' oblasti pozdních mRNA (viz Obr.4. a Obr.5.). U buněk infikovaných BKPyV se agnoprotein objevuje v cytoplasmě přibližně 24 až 36 hodin od počátku infekce (Rinaldo et al., 1998). U viru SV40 se může agnoprotein v cytoplasmě infikovaných buněk objevit ještě později. Dle práce Jay a spolupracovníků nebylo možné agnoprotein v době 24 hodin po infekci ještě detekovat. Podařilo se jej spolehlivě detekovat až 48 hodin po infekci (Jay et al., 1981).

4. Agnoprotein

Agnoprotein je malý nestrukturní protein, který plní řadu funkcí potřebných pro zdárný průběh polyomavirové infekce. Jak je shrnuto v Tab. 2., agnoprotein BKPyV má délku 66 aa, agnoprotein JCPyV 71 aa a agnoprotein viru SV40 je dlouhý 62 aa. Jedná se o bazický protein, neboť v jeho proteinové sekvenci jsou hojně zastoupeny bazické aminokyseliny arginin (R) a lysin (K), jak je patrné z Obr. 6. V review (Gerits and Moens, 2012, review) byly spočítány isoelektrické body těchto třech zkoumaných agnoproteinů, čímž se potvrdily jejich bazické vlastnosti. Isoelektrický bod (pI) agnoproteinů JCPyV a SV40 je 10,1 a pI agnoproteinu BKPyV je 10. Bazické aminokyseliny jsou umístěny především v N-koncové a C-koncové části agnoproteinu, jak je možno vidět na Obr. 6. Ze srovnání sekvencí na Obr. 6. je také dobře patrné, že u všech třech agnoproteinů je zachována oblast hydrofobních aminokyselin od 28 do 39 pozice. V této centrální oblasti jsou na pozicích 34 a 38 zachovány kyselé aa napříč všemi sekvencemi, konkrétně glutamová kyselina na pozici 34 a asparagová nebo glutamová kyselina na pozici 38, kde pouze u SV40 je glutamin. Tyto konzervované oblasti jsou zřejmě důležité pro určité funkce agnoproteinů, když jsou zachovány v agnoproteinech všech třech polyomavirů. Při srovnání celých proteinových sekvencí je patrné, že N-koncové a centrální oblasti všech agnoproteinů jsou si navzájem sekvencně velmi podobné a že zřejmě došlo k zachování funkčních motivů v těchto oblastech agnoproteinů (pozice 1 až 52).

Obr. 6.: Alignment proteinových sekvencí agnoproteinů SV40 (ABU86093.1), BKPyV (ARE72387.1) a JCPyV (ASV51889.1). Růžovou barvou jsou označeny bazické aa (R, K), červeně jsou označeny hydrofobní aa (V, L, I, M, A, F, W, P), modře jsou označeny kyselé aa (D, E) a zeleně jsou označeny aa s hydroxi skupinou a/nebo obecně hydrofilní aa (S, Q, T, G, H, C, N, Y). Alignment byl proveden pomocí programu Clustal Omega (Madeira et al., 2019). Zdrojem sekvencí je databáze NCBI (National Center for Biotechnology Information, 2019).

```
ABU86093.1  MVLRRLSRQASVKVRRSWTESKKTARLRFVFLLELLQFCGEDTVDGKRKKPER-LTEK  59
ARE72387.1  MVLRLQLSRQASVKGKTWTGTGKRAQRIFIFILELLLEFCRGEDSVDGKNSTTA-----  55
ASV51889.1  MVLRLQLSRKASVKVSKTWSGTGKRAQRILIFLLEFLLDFFCTGEDSVDGKKRQRHSGLTEQ  60
****:*:*:***** :*: :** *:::***:**:** **:*:*****:..

ABU86093.1  PES----- 62
ARE72387.1  ----LPAVKDSVKDS 66
ASV51889.1  TYSALPEPKAT---- 71
```

Ač jsou v sekvencích agnoproteinů některé aminokyseliny hojně zastoupeny (například R, K, L, V, S, a další), jiné se téměř v sekvencích nevyskytují. Methionin se u všech třech agnoproteinů nachází pouze na první pozici, avšak při posttranslačních úpravách je zřejmě odstraňován a ve výsledném proteinu se nevyskytuje (Jackson and Chalkley, 1981). V sekvenci agnoproteinu viru SV40 se také nenachází isoleucin a tyrosin, což bylo již kdysi experimentálně potvrzeno (Jackson and Chalkley, 1981). U agnoproteinu BKPyV se tyrosin také nenachází, avšak isoleucin je zde zastoupen.

V sekvenci agnoproteinů JCPyV se sice nachází jak isoleucin, tak tyrosin, avšak tento jediný tyrosin se nachází jen v C-koncové oblasti proteinu, která není homologická zbylým dvěma agnoproteinům. Cystein se nachází u všech třech agnoproteinů pouze jednou, a to na specifické pozici (40), což naznačuje, že tento jediný cysteinový zbytek zřejmě plní u všech třech proteinů stejnou konzervovanou funkci. Ze studie Hidaka a kolegů (Hidaka et al., 2015) vyplývá, že Cys v pozici 40 je zodpovědný za dimerizaci agnoproteinu, avšak jiné studie toto zjištění vyvracejí (Coric et al., 2014; Saribas et al., 2013, 2011). Více viz podkapitola 4.2.1. „Dimerizace a oligomerizace agnoproteinů“.

4.1 Posttranslační modifikace agnoproteinů a jejich vliv na funkci agnoproteinů

Jednou z nejčastějších posttranslačních modifikací, které podléhá i agnoprotein, je fosforylace. Bylo prokázáno, že agnoproteiny všech tří polyomavirů (BKPyV, JCPyV a SV40) jsou fosfoproteiny (Jackson and Chalkley, 1981; Johannessen et al., 2008; Sariyer et al., 2006).

U BKPyV bylo predikováno hned několik možných fosfoakceptorových míst, avšak experimentálně bylo prokázáno, že pouze Ser-7, Ser-11 a Thr-21 jsou *in vitro* skutečně fosforylovány (Johannessen et al., 2008). BKPyV agnoprotein je fosforylován protein kinázou A (PAK) na Ser-11. Protein kináza C (PKC) fosforyluje všechny tři fosfoakceptorová místa a rovněž tak proteinkináza D (PKD) (Johannessen et al., 2008). Je však nutno zdůraznit, že všechny experimenty pro určení kináz, které agnoprotein BKPyV fosforylují, byly provedeny v podmínkách *in vitro*. Tudíž není zcela jisté, které z kináz se doopravdy podílí na fosforylaci agnoproteinu *in vivo*. Dále bylo stejnou skupinou provedeno i několik experimentů *in vivo*, které potvrdily, že Ser-11 je fosforylován některými isoformami PKC během infekce BKPyV, avšak fosforylace PKD *in vivo* prokázána nebyla. Mutací fosfoakceptorového serinu 11 dojde ke změně exprese některých virových proteinů a také tato mutace ovlivní životní cyklus a úspěšné šíření BKPyV (Johannessen et al., 2008). Dalším zajímavým zjištěním, které přinesla tato studie, bylo, že mutace Ser-11 na alanin, který nelze fosforylovat, zvyšuje stabilitu agnoproteinu. Naopak mutace Ser-11 na asparagovou kyselinu mimikující fosforylaci nebo ponechání Ser-11 vedlo k vyšší míře degradace agnoproteinu v infikovaných buňkách.

U JCPyV byla popsána stejná fosfoakceptorová místa, tedy Ser-7, Ser-11 a Thr-21 (Sariyer et al., 2006), což zřejmě souvisí s faktem, že tato místa jsou konzervovaná jak u agnoproteinu BKPyV, tak i částečně u SV40 (viz Obr.6.). Fosforylace agnoproteinu JCPyV *in vitro* prostřednictvím PKC byla prokázána a stejně tak se podařilo prokázat i fosforylaci *in vivo*, avšak v experimentu nebylo zjišťováno, která kinasa se na reakci podílí, a předpokládá se, že se jedná o PKC (Sariyer et al., 2006). Stejná skupina porovnávala vliv mutace/mutací ve fosfoakceptorových místech na replikační cyklus viru a zjistili, že ani jeden z mutovaných virů nedokázal dokončit replikační cyklus. Konkrétně byly studovány tři mutanty: v první byl Thr-21 mutován na Ala, u druhé byly Ser-7 a Ser-11 mutovány na Ala a třetí mutanta měla změněny všechny tři fosfoakceptorové pozice na alanin. Toto zjištění je o to více překvapující, že když byly provedeny experimenty s JCPyV, který neexprimoval agnoprotein vůbec, neboť měl mutovaný iniciační kodon pro tento protein, tak tento mutovaný virus dokázal, byť

méně efektivně než nemutovaný (wt) virus, dokončit replikační cyklus a propagovat se dále (Sariyer et al., 2006). V práci Sariyerse a kolegů bylo zjišťováno, zda mutace fosfoakceptorových míst agnoproteinu JCPyV ovlivní uvolňování virových částic z infikovaných buněk nebo jestli mutace ovlivní spíše obsah virové DNA ve virových částicích. Ukázalo se, že virus je z buněk efektivně uvolňován, avšak tyto virové částice téměř vůbec neobsahují virovou DNA (Sariyer et al., 2006). V návaznosti na toto zjištění byl stejnou skupinou připraven agnoprotein mutovaný v Ser-7, Ser-11 a Ser-21, kde byly tyto pozice nahrazeny kyselinou asparagovou, což mělo mimikovat navázané fosfátové skupiny agnoproteinu. JCPyV s takto mutovaným agnoproteinem byl schopný dokončit replikační cyklus a dále se propagovat, avšak s menší účinností než wt JCPyV.

U viru SV40 jsou zachovány pozice Ser-7 a Ser-11, u kterých se předpokládá, že jsou též *in vivo* fosforylovány, stejně jako je tomu u BKPyV a JCPyV. Thr-21 je v agnoproteinu viru SV40 nahrazen Ser-21, který může být rovněž fosforylován, avšak zatím tato možnost nebyla experimentálně potvrzena.

Souhrně lze říci, že agnoprotein BKPyV, JCPyV a SV40 je *in vivo* posttranslačně modifikován fosforylací. Fosfoakceptorová místa jsou napříč všemi třemi agnoproteiny konzervovaná a zřejmě plní stejné či velmi podobné funkce. Fosforylace těchto míst je důležitá pro úspěšnou propagaci daných polyomavirů, je zřejmě důležitá pro správnou regulaci exprese virových proteinů, fosforylace může ovlivnit buněčnou lokalizaci agnoproteinu a také ovlivňuje optimální stabilitu agnoproteinu v infikovaných buňkách (Johannessen et al., 2008; Okada et al., 2001; Sariyer et al., 2006).

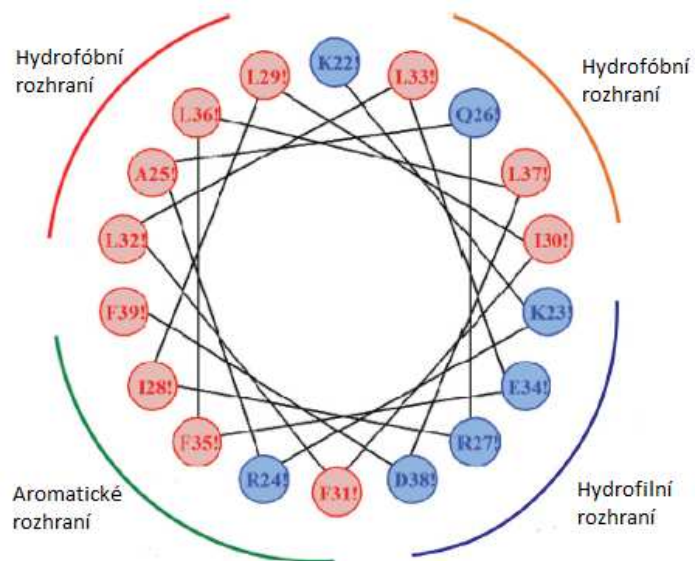
Ostatní posttranslační modifikace agnoproteinu zatím nebyly *in vivo* prokázány a veškeré informace ohledně této problematiky zůstávají u počítačových predikcí a dohadů. Dle review (Saribas et al., 2016) agnoprotein obsahuje možná akceptorová místa pro ubiquitinaci, metylaci, sumoylaci a acetylaci (Kiemer et al., 2005; Radivojac et al., 2010; Shao et al., 2009; Xue et al., 2006).

4.2. Struktura agnoproteinu

Zjistit sekundární strukturu agnoproteinu pomocí NMR (nukleární magnetické rezonance) bylo dlouhou dobu nemožné a veškeré poznatky vycházely pouze z předpovědí *in silico*. V těch obvykle vycházelo, že agnoprotein tvoří dva alfa helixy, z toho majoritní alfa helix se nachází v centrální části proteinu (přibližně mezi aminokyselinami 20 - 40) a druhý, minoritní alfa helix, který se nachází v N-koncové oblasti agnoproteinu (mezi aminokyselinami 2 - 10) (Coric et al., 2014; Saribas et al., 2011). Oblast, kde byl předpokládán majoritní alfa helix, byla často studována, neboť se zde nachází doména bohatá na Leu/Ile/Phe, jež je konzervovaná napříč všemi třemi agnoproteiny, a dále tato oblast obsahuje některé zajímavé sekvenční motivy (viz dále). Sekvence mimo oba predikované alfa helixy (aa 11 – 19, 41 – 71) byly považovány za oblasti bez sekundární struktury, neboť obsahují velké množství hydrofilních, včetně kladně nabitých, aminokyselin a nebylo pro ně možno úspěšně předpovědět žádnou sekundární strukturu.

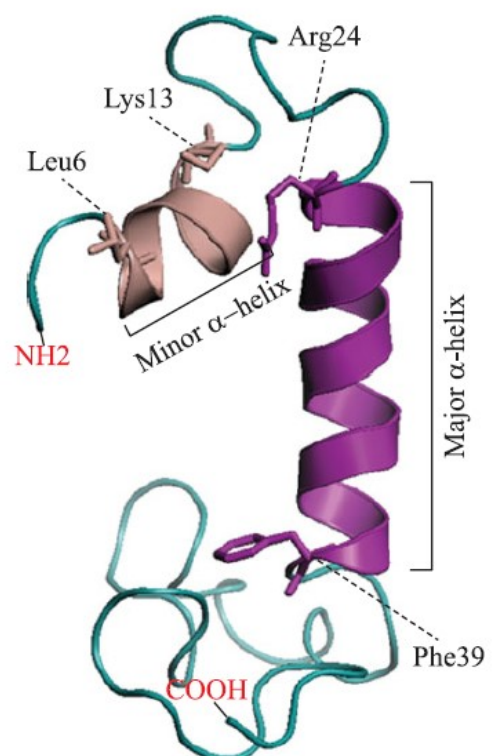
Poprvé se podařilo zjistit 3D strukturu pouze u menšího peptidového fragmentu agnoproteinu JCPyV, který zahrnoval aminokyseliny od pozice 17 (Thr) do pozice 52 (Gln) (Coric et al., 2014). V této práci byl majoritní alfa helix agnoproteinu zmapován v pozicích od aa 23 (Lys) do aa 39 (Phe). Také zde Coric a kolegové naznačili, že tento alfa helix má na svém povrchu utvořeny 4 odlišná rozhraní, která se liší svými vlastnostmi a zřejmě i funkcemi, jež plní. Jak je vidět na Obr. 7., jedná se o hydrofilní rozhraní, aromatické rozhraní a dvě oddělená hydrofobní rozhraní. Hydrofilní rozhraní tvoří aminokyseliny Lys-23, Arg-27, Glu-34 a Asp-38, aromatické rozhraní tvoří Ile-28, Phe-31, Phe-35 a Phe-39, hydrofobní rozhraní I tvoří Ala-25, Leu-29, Leu-32 a Leu-36 a hydrofobní rozhraní II tvoří Ile-30, Leu-33 a Leu-37 (vše znázorněno na Obr. 7.).

Obr. 7.: Příčný pohled na majoritní alfa helix agnoproteinu. Červená kolečka označují hydrofobní aa, modrá kolečka označují hydrofilní aa. Čísla u jednotlivých aa udávají jejich pořadí v proteinové sekvenci agnoproteinu. Horní polovinu tvoří dvě hydrofobní rozhraní, spodní polovinu tvoří hydrofilní a aromatické rozhraní. Upraveno podle (Coric et al., 2014).



Obr. 8.: 3D struktura agnoproteinu JCPyV získaná pomocí NMR. Tmavě fialově je označen majoritní alfa helix a růžově je označen minoritní alfa helix. N-konec a C-konec agnoproteinu je též označen. Zapsané aa označují začátky a konce jednotlivých alfa helixů. Převzato z (Saribas et al., 2019, review).

Coric a kolegové také jako první popsali 3D strukturu celého agnoproteinu JCPyV (viz Obr. 8.), kde kromě majoritního alfa helixu zmapovali, již dříve predikovaný, minoritní alfa helix v N-koncové oblasti (Coric et al., 2017). Výsledky této studie korespondují se zjištěními z předchozí práce (Coric et al., 2014) a přidávají některé nové poznatky. Majoritní alfa helix byl zkrácen o jednu aa, tedy začíná Arg-24 a končí Phe-39. Minoritní alfa



helix je, oproti předpovědi, posunut dále od N-konce proteinu a leží mezi aa 6 (Leu) a 13 (Lys). Oblasti mezi těmito dvěma helixy netvoří žádné sekundární struktury. Tyto oblasti jsou zřejmě prospěšné při protein-proteinových interakcích, kdy může díky nim agnoprotein zaujmout různá postavení.

4.2.1 Dimerizace a oligomerizace agnoproteinu

Dimerizaci či oligomerizaci agnoproteinu poprvé popsal Saribas a jeho kolegové s využitím agnoproteinu fúzaného s MBP (maltose binding protein) (Saribas et al., 2011), avšak již dříve byly pozorovány proužky o vyšších molekulových hmotnostech při různých elektroforézách s izolovaným agnoproteinem (Del Valle et al., 2002; Sariyer et al., 2006). Bylo zjištěno, že pro dimerizaci a oligomerizaci agnoproteinu je nezbytná oblast proteinu mezi aa 17 a 42, což bylo ověřeno produkcí mutovaného agnoproteinu, jenž měl deletovanou tuto oblast (Saribas et al., 2011). Navíc se ukázalo, že takto mutovaný agnoprotein je velmi nestabilní a snadno se při izolaci degraduje. Deletovaná oblast agnoproteinu je zřejmě klíčová pro úspěšnou replikaci JCPyV, neboť je-li deletován úsek mezi aa 17 a 42 agnoproteinu, tak virus není schopen dokončit replikační cyklus (Saribas et al., 2011). Při srovnání produkce VP1 v buňkách infikovaných wt virem a deleční mutantou viru bylo zjištěno, že 5 dní po infekci bylo množství VP1 produkované mutantním virem dokonce větší než množství VP1 u buněk infikovaných wt virem, avšak 15 dní po infekci bylo už VP1 u mutantního viru nedetekovatelné, zatímco u wt viru, dle očekávání, vzrostlo. JCPyV s agnoproteinem s delecí (17 – 42 aa) nebyl schopen zřejmě dokončit úspěšně replikační cyklus. Z toho lze vyvodit důležitost této oblasti agnoproteinu, a zřejmě i schopnosti tvorby dimerů či oligomerů, pro zajištění důležité funkce agnoproteinu. Podrobnější studie dále ukázala, že za dimerizaci/oligomerizaci je konkrétně zodpovědné tzv. Leu/Ile/Phe-bohatá doména, jež se rozkládá mezi aa 28 a 39 (Saribas et al., 2013). Mutace této oblasti má vliv na virovou replikaci a na produkci pozdních virových mRNA (Saribas et al., 2013).

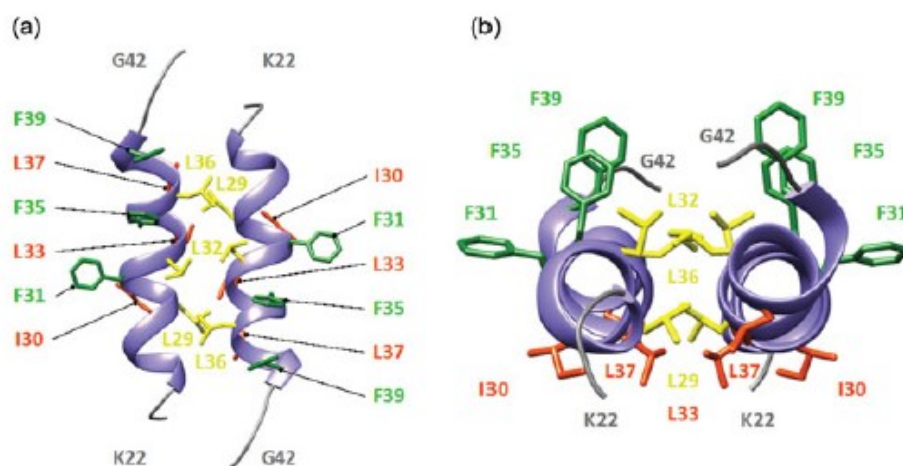
Původně se předpokládalo, že agnoprotein dimerizuje díky cysteinu v pozici 40, jenž je konzervovaný napříč všemi třemi agnoproteiny a který by mohl tvořit S-S můstek mezi dvěma monomery agnoproteinů a tak je dimerizovat (Hidaka et al., 2015). Tyto závěry byly získány prostřednictvím experimentů s neúplným agnoproteinem, kdy byl použit pouze peptid obsahující 23 aminokyselin agnoproteinu, jež by měly být zodpovědné za dimerizaci (pozice aa 22 – 44) (Hidaka et al., 2015). Jiné studie provedené s kompletním agnoproteinem však roli Cys v pozici 40 na dimerizaci agnoproteinu nepotvrdily a naopak předpokládají spíše roli hydrofobních interakcí (Saribas et al., 2013, 2011). Již dříve bylo popsáno, že dimery i vyšší oligomery agnoproteinu jsou velmi stabilní a dokážou odolat běžným denaturačním podmínkám, například nejsou denaturovány během elektroforézy za přítomnosti SDS (sodium dodecyl sulphate), a dokonce částečně či úplně odolají podmínkám 8M močoviny, koncentracím 4% až 20% SDS a také zahřátí na teplotu 95°C (Saribas et al., 2011). Při zahřívání na teplotu 95°C po dobu 5 až 60 minut byla velká část oligomerů a více než polovina dimerů

agnoproteinů denaturována, což vede k předpokladu, že interakce mezi monomery agnoproteinů je dána hydrofobními a iontovými interakcemi spíše, než tvorbou kovalentních vazeb.

Stejně výsledky jako studie (Saribas et al., 2013, 2011) přinesla i další práce, kde autoři porovnávali výsledky experimentů s nově zjištěnou 3D strukturou majoritního alfa helixu agnoproteinů (Coric et al., 2014). Zde potvrdili, že za dimerizaci/oligomerizaci agnoproteinů je zodpovědná Leu/Ile/Phe oblast, konkrétně jedno ze dvou hydrofobních rozhraní popsané na Obr. 7. a také potvrdili, že protein-proteinová interakce dvou agnoproteinů vzniká na základě hydrofobních a iontových interakcí a ne na základě tvorby kovalentní vazby. Hydrofobní oblast I je tvořena aminokyselinami Leu-29, Leu-32 a Leu-36, zatímco hydrofobní oblast II aminokyselinami Ile-30 a Leu-33. Pro zjištění, která ze dvou hydrofobních oblastí na povrchu majoritního alfa helixu agnoproteinů se zapojuje do tvorby dimerů, byly připraveny mutanty JCPyV, které měly v sekvenci pro agnoprotein mutované buď Leu-29, Leu-32 a Leu-36 na Ala, nebo byly mutované Ile-30 a Leu-33 na Ala. Z výsledků je patrné, že změna Ile-30 a Leu-33 na Ala neměla příliš velký vliv na tvorbu dimerů/oligomerů agnoproteinů. Naopak, změna Leu-29, Leu-32 a Leu-36 na Ala vedla k degradaci agnoproteinů a zvýšení množství monomerního agnoproteinů ve výsledném vzorku. Autoři zároveň ukázali, že úbytek agnoproteinů nespočívá ve snížení hladiny mRNA nesoucí ORF pro agnoprotein (Coric et al., 2014). Výsledek vede k závěru, že residua Leu-29, Leu-32 a Leu-36 jsou důležitá pro stabilitu proteinu a jeho dimerizaci/oligomerizaci. Autoři dále prokázali, že mutace některých aa v Leu/Ile/Phe oblasti na Ala vedou k různě interními poruchám virové replikace a zmapovali aa klíčové pro tento proces.

Teoretický model dimerizace agnoproteinů je zobrazen na Obr. 9. Oba monomery spolu interagují v opačných směrech.

Obr. 9.: Předpokládané uspořádání dvou agnoproteinů při tvorbě dimeru. Žluže jsou označeny aa podílející se na tvorbě dimeru (Leu-29, Leu-32, Leu-36). Červeně jsou označeny aa hydrofobního rozhraní II (Ile-30, Leu-33, Leu-37). Zeleně jsou označeny Phe. Helixy tvořící dimer jsou navzájem v opačných orientacích. (a) znázorňuje boční pohled na dimer agnoproteinů. (b) zobrazuje příčný pohled na dimer agnoproteinů. Převzato z (Saribas et al., 2019).



4.3. Lokalizace agnoproteinů v buňce

Většina agnoproteinů v buňkách infikovaných SV40, JCPyV či BKPyV je lokalizována v perinukleárním prostoru (Johannessen et al., 2008; Nomura et al., 1983; Okada et al., 2002, 2001; Sariyer et al., 2006), avšak menší část agnoproteinů se dostává i do jadra buňky (Johannessen et al., 2008; Nomura et al., 1983; Okada et al., 2001).

Bylo prokázáno, že agnoprotein JCPyV interaguje s tubulinem, což ovlivňuje jeho subcelulární lokalizaci (Endo et al., 2003). Podrobnější experimenty ukázaly, že se opravdu jedná o přímou interakci agnoproteinů a mikrotubulů a že zároveň agnoprotein ovlivňuje vazbu FEZ1 proteinu (fasciculation and elongation protein zeta 1) na mikrotubuly, konkrétně interakce agnoproteinů a FEZ1 způsobuje disociaci FEZ1 proteinu z mikrotubulů (Suzuki et al., 2005). To následně brání správnému růstu a prodlužování axonu u nervových buněk, neboť za standardních podmínek se FEZ1 podílí na signalizaci podporující růst a fascikulaci axonu (Bloom and Horvitz, 1997). Autoři zmiňují, že disociace FEZ1 proteinu z mikrotubulů by mohla napomáhat následnému uvolňování virionů z buňky.

V práci Unterstaba a kolegů bylo testováno hned několik možných ko-lokalizací agnoproteinů BKPyV s buněčnými strukturami. Pomocí markerů calnexinu a p63 bylo testována lokalizace agnoproteinů do ER, která se však nepotvrdila (Unterstab et al., 2010). Stejně tak se nepotvrdila přítomnost agnoproteinů v Golgiho aparátu při užití beta-COP a giantinu jako markerů, ani ko-lokalizace s COP II vřetky či časnými endosomy. Nepodařilo se detekovat ani ko-lokalizaci agnoproteinů BKPyV s laminem A či HP1 α (heterochromatinový protein 1 α) a ani s tubulinem, což je rozdíl oproti výše zmíněné interakci agnoproteinů JCPyV s tubulinem (Suzuki et al., 2005; Unterstab et al., 2010). Na druhou stranu se podařilo prokázat, že agnoprotein BKPyV interaguje přímo s povrchem lipidových kapének (Unterstab et al., 2010). Pro tuto interakci je důležitá oblast majoritního afly helixu agnoproteinů a pokud jsou v této oblasti mutovány některé aa zodpovědné za tvorbu amfipatických vlastností alfa helixu, tak dochází k poruše cílení agnoproteinů do lipidových kapének. Stále se však přesně neví, k čemu by mohla interakce agnoproteinů a lipidových kapének viru sloužit.

Na rozdíl od BKPyV, agnoprotein JCPyV byl prokázán v ER (Suzuki et al., 2010). K určení lokalizace agnoproteinů JCPyV do ER byly užity calreticulin a BiP, jakožto markery pro ER. Pro lokalizaci do ER jsou důležité bazické aa v N-koncové oblasti agnoproteinů, konkrétně se zřejmě jedná o aa 22-24. Navíc se ukázalo, že v pozdější fázi infekce přestává být agnoprotein přítomen pouze v ER, ale dochází k jeho rozmístění ve větším množství v cytoplasmě (Suzuki et al., 2010). Ve stejné práci také potvrdili, že agnoprotein JCPyV může být součástí plasmatické membrány a to díky svému majoritnímu alfa helixu, který je tvořen převážně hydrofobními aminokyselinami a který by v určité konformaci mohl fungovat jako transmembránový alfa helix. Agnoprotein JCPyV může být tedy zřejmě ko-translačně vložen do membrány ER a v pozdější fázi infekce dopraven na cytoplasmatickou membránu infikované buňky.

U agnoproteinů JCPyV se předpokládalo, že jeho fosforylace může vyvolat přemístění z cytoplasmy do jádra (Okada et al., 2001), avšak další podrobnější experimenty provedeny nebyly.

Fosforylace agnoproteinů BKPyV na Ser-11 neovlivňuje jeho lokalizaci v buňce (Johannessen et al., 2008). Byly připraveny mutanty agnoproteinů BKPyV, kdy byl Ser v pozici 11 nahrazen Ala nebo fosfomimikující Asp. Permisivní buňky byly následně infikovány wt virem nebo těmito dvěma mutantními viry, dva dny po infekci byly fixovány a agnoprotein byl v buňkách detekován pomocí specifických protilátek. Bylo tak zjištěno, že agnoprotein se v jádře infikovaných buněk vyskytuje málo, byl zjištěn přibližně u 10% vyšetřovaných buněk, přičemž se výsledky získané s mutantními viry nelišily u mutantních virů od výsledků pozorovaných u wt viru (Johannessen et al., 2008).

Mutace některých aa v doméně bohaté na Leu/Ile/Phe agnoproteinů JCPyV může ovlivnit buněčnou lokalizaci agnoproteinů (Coric et al., 2014). Pokud je mutována pouze jedna aa (Leu-32 nebo Leu-33 nebo Leu-36) na Ala, nedochází ke změně distribuce agnoproteinů v buňce oproti wt agnoproteinu. Jsou-li mutovány dvě aa zároveň (Ile-30 a Leu-33) na Ala, nedochází ke změně distribuce agnoproteinů v buňce, ale vzor výskytu se poněkud liší od wt agnoproteinů. Naopak jsou-li zároveň mutovány aa Leu-32 a Leu-36 na Ala, dojde k redistribuci agnoproteinů pouze do perinukleární oblasti, ale v jádře se agnoprotein nenachází. Trojitý mutant (Leu-29, Leu-32 a Leu-36 na Ala) byl pod úrovní detekce, takže jeho distribuce nemohla být ověřena. Jak bylo prokázáno, dvojnásobná mutace Leu-32 a Leu-36 na Ala vede k destabilizaci agnoproteinů a jeho urychlené degradaci (stejně je tomu i u mutantů s trojnásobnou mutací) (Coric et al., 2014). Jak bylo popsáno výše, wt agnoprotein se nachází v jádře pouze v malém množství, a proto si lze představit, že mutantní agnoprotein, jenž má velmi krátkou dobu života, se do jádra buňky, kde plní své funkce, dostane s menší pravděpodobností. Následně může docházet k poruše virové replikace.

Nečekané bylo, že mutace jediné aminokyseliny Leu-29 na Ala způsobila, že agnoprotein byl detekován pouze v jádře (Coric et al., 2014). Toto zjištění je možno vysvětlit tak, že Leu-29 je zřejmě součástí NES (nuclear egress signal; jaderný exportní signál) a proto, je-li mutován, nedochází k zpětnému transportu agnoproteinů do cytoplasmy a agnoprotein se hromadí v jádře.

V celkovém důsledku by výše zmíněné okolnosti mohly vést k tomu, že by agnoprotein nemohl plnit své funkce v různých místech buňky, a proto by docházelo k pozorovanému snížení virové replikace, ať už z důvodu mutace pouze Leu-29 nebo Leu-36 nebo mutace Leu-29, Leu-32 a Leu-36 zároveň (Coric et al., 2014).

Existence NLS (nuclear localisation signal; jaderný lokalizační signál) nebyla u agnoproteinů zatím podrobně zkoumána. Obecně se ví, že NLS tvoří krátké sekvence bohaté na bazické aa, tedy především lysin a arginin. Takovéto Lys a Arg bohaté sekvence se nachází v N-koncové části agnoproteinů a mohly by tedy zajišťovat lokalizaci tohoto proteinu do jádra buňky. Určitý důkaz role N-koncové části agnoproteinů v jeho zacílení do jádra je zobrazen v práci (Suzuki et al., 2010), kde při

zjišťování lokalizace určitých mutant agnoproteinů bylo vyzorováno, že fragment agnoproteinů obsahující aa residua 1-24 je lokalizován pouze v jádře buňky. Autoři článku se k tomuto zjištění nevyjadřují, avšak je patrné z přiložených výsledků experimentu.

Předpokládá se, že agnoprotein má také NES, díky kterému se může přesouvat mezi jádrem a cytoplasmou, jak bylo naznačeno v práci (Okada et al., 2001). Jaderný exportní signál je tvořen oblastí bohatou na leucin (Fu et al., 2011), která se u agnoproteinů nachází v jeho centrální oblasti, a mutace některých hydrofobních aa v daném místě mohou narušit správné fungování agnoproteinů. Mohlo by to také vysvětlovat výše zmíněnou lokalizaci fragmentu agnoproteinů obsahující pouze aa residua 1-24 výlučně v jádře, neboť tento fragment postrádá centrální část agnoproteinů obsahující Leu residua.

4.4. Funkce agnoproteinů

V této podkapitole bych ráda ukázala různé funkce, které agnoprotein plní, a jak tento protein ovlivňuje virový replikační cyklus a hostitelskou buňku.

4.4.1. Interakční partneři agnoproteinů

Agnoprotein interaguje s ostatními polyomavírovými proteiny a moduluje jejich funkce. Konkrétně se jedná o LT antigen, ST antigen a VP1 (Safak et al., 2001; Sariyer et al., 2008; Suzuki et al., 2012).

Bylo prokázáno, že LT antigen JCPyV interaguje přímo s agnoproteinem JCPyV, což ovlivňuje jak transkripci z pozdního promotoru, tak replikaci virového genomu (Safak et al., 2001). Pokud byl v buňce produkován LT antigen v nepřítomnosti agnoproteinů, pak byla naměřena zvýšená míra transkripce z pozdního promotoru JCPyV. Toto zjištění vedlo Safaka a kolegy k závěru, že agnoprotein reguluje, respektive snižuje, transkripci pozdní oblasti v pozdní fázi infekce. Obdobně bylo zjištěno, že přítomnost agnoproteinů negativně ovlivňuje replikaci genomu JCPyV řízenou LT antigenem (Safak et al., 2001). Stejně závěry byly prezentovány v nedávné studii provedené s BKPyV, kde delece agnoproteinů vedla ke zvýšení transkripce časných i pozdních proteinů a ke zvýšení virové replikace (Panou et al., 2018). Jiná práce však zmíněný vliv agnoproteinů vyvrací a naopak ukazují, že agnoprotein má pozitivní vliv na virovou replikaci (Saribas et al., 2012). Ve stejné práci bylo zkoumáno, jak agnoprotein ovlivňuje replikaci JCPyV prostřednictvím interakce s LT antigenem a ukázalo se, že agnoprotein zvyšuje vazbu LT antigenů do Ori místa virového genomu (Saribas et al., 2012). Přidání agnoproteinů do vazebné studie zahrnující LT antigen a úsek virového genomu s Ori místem vedlo ke zvýšení tvorby komplexů LT antigenů a Ori sekvence. Agnoprotein však nebyl součástí těchto komplexů, což vedlo k závěru, že interakce agnoproteinů a LT antigenů zřejmě způsobí změnu konformace LT antigenů a ten se následně váže na Ori sekvenci (Saribas et al., 2012). Tvorbou mutantních variant agnoproteinů a LT antigenů a zkoumáním jejich schopnosti spolu interagovat bylo zjištěno, že pro spojení obou proteinů je potřebná centrální část agnoproteinů a oblast mezi 250 – 450 aminokyselinou u LT antigenů (Safak et al., 2001). Ve zmíněném úseku LT antigenů se nachází mimo

jiné i oblast s helikázovou aktivitou a Zn-vazebná doména, které jsou důležité pro navázání LT antigenu do Ori místa a pro zahájení replikace virového genomu (An et al., 2012, review). V centrální části agnoproteinu byly zmapovány aa zbytky, které jsou zodpovědné za interakci s LT antigenem. Jedná se o Phe-31, Phe-35 a Phe-39 a jednobodové či kombinované mutace těchto aminokyselin na Ala vedou ke snížení replikace virové DNA a navíc takto mutované agnoproteiny nejsou schopny aktivovat vazbu LT antigenu do Ori místa (Saribas et al., 2012).

ST antigen je další virový protein, který interaguje s agnoproteinem JCPyV (Sariyer et al., 2008). Ve zmíněné práci bylo prokázáno, že ST antigen je schopen pomocí své C-koncové části specificky vázat agnoprotein. Zajímavější však je, že svou C-koncovou oblastí je ST antigen schopen také interagovat s PP2A, což je enzym, který zároveň provádí defosforylaci agnoproteinu (Sariyer et al., 2008). Z experimentů vyplývá, že ST antigen je schopen, díky své interakci s PP2A, bránit defosforylaci agnoproteinu a napomáhá tak jeho optimální funkci. Mutace C-koncové části ST antigenu vede téměř k inhibici virové replikace, stejně jako mutace fosfoakceptorových míst agnoproteinu (Sariyer et al., 2008, 2006). Avšak, je-li nefunkční PP2A a nedochází k defosforylaci agnoproteinu, neplní ani tehdy agnoprotein svou funkci správně a virová replikace je snížena (Sariyer et al., 2008). Z výše uvedených pozorování můžeme soudit, že pro úspěšnou replikaci JCPyV je potřeba všech tří výše zmíněných proteinů, a to v optimálním poměru. Jelikož agnoprotein nefunguje optimálně, když je trvale defosforylován a ani když je trvale fosforylován, může právě ST antigen sloužit k řízení správného načasování defosforylace agnoproteinu a tím napomáhat k úspěšné replikaci viru. ST antigen by mohl při přechodu z časné do pozdní fáze infekce vázat PP2A a tím bránit defosforylaci nově syntetizovaných agnoproteinů při zahájení produkce proteinů pozdní oblasti. Následně by vzrostla koncentrace agnoproteinu v pozdní fázi infekce a ten by začal konkurovat vazbě ST antigenu na PP2A. Vyvázání ST antigenu nadbytkem agnoproteinu by vedlo k uvolnění PP2A a k defosforylaci zbývajících agnoproteinů, které by pak mohly plnit nové funkce, které jsou zapotřebí až ve velmi pozdní fázi infekce.

Ukázalo se, že agnoprotein přítomný v jádře infikované buňky je schopen vázat VP1 a tím ovlivňovat formování virionů (Suzuki et al., 2012). Z buněk infikovaných JCPyV s deletovaným agnoproteinem byly izolovány virové částice, které se při sedimentaci v sacharózovém gradientu nacházely i v odlišných frakcích, než v jakých se nacházely virové částice wt viru. Rozptyl mutovaných částic ve frakcích byl mnohem širší. Z toho plyne, že delece agnoproteinu vede k tvorbě nepravidelných či jinak deformovaných virových částic (Suzuki et al., 2012). Stejně výsledky byly získány i pomocí TEM (transmisní elektronová mikroskopie) a analýzou formování viru podobných částic složených pouze z proteinu VP1 (VP1-VLP; virus-like particles). Interakce agnoproteinu a monomerů VP1 zřejmě zesiluje multimerizaci VP1 do pentamer, ze kterých je následně vystavena virová částice (Suzuki et al., 2012). Jelikož delece agnoproteinu u JCPyV a SV40 vede k produkci virionů, které téměř neobsahují virovou DNA (Sariyer et al., 2011), je možné, že pozorovaná interakce agnoproteinu a VP1 napomáhá kromě formování virové kapsidy také umístění virového genomu do virionu.

Kromě již zmíněných interakcí s buněčnými proteiny PP2A a FEZ1 (Sariyer et al., 2008; Suzuki et al., 2005) interaguje agnoprotein s řadou dalších buněčných proteinů - YB-1 (Y-box vazebný transkripční faktor 1), α -SNAP (α -solubilní N-ethylmaleimid-senzitivní fúzní připojovací protein), p53, Ku70, HP1 α (heterochromatinový protein 1 α), PCNA (proliferační jaderný antigen), AP-3 (adaptorový proteinový komplex 3) (Darbinyan et al., 2004, 2002; Gerits et al., 2015; Johannessen et al., 2011; Okada et al., 2005; Safak et al., 2002; Suzuki et al., 2013).

Transkripční faktor YB-1 napomáhá u JCPyV spuštění transkripce z časného i pozdního virového promotoru (Chen and Khalili, 1995). V práci Safaka a kolegů bylo prokázáno, že agnoprotein JCPyV je schopen vázat YB-1 pomocí oblasti mezi 18-36 aminokyselinou a k interakci těchto dvou proteinů není potřeba DNA (Safak et al., 2002). Tato interakce zřejmě vede ke snížení aktivace transkripce z časného i pozdního promotoru JCPyV, neboť v přítomnosti agnoproteinu v buňkách glií dojde ke snížení transkripce z virových promotorů na vneseném konstrukt, zatímco v nepřítomnosti agnoproteinu není YB-1 ovlivňován a transkripce z virových promotorů je vyšší (Safak et al., 2002).

PCNA je protein důležitý pro replikaci chromozomální DNA v eukaryotických buňkách, neboť je součástí replikační vidličky a umožňuje nasazení DNA polymerázy δ (Waga et al., 1994). Proteiny potřebné k replikaci jaderného genomu jsou využívány také k replikaci polyomavirového genomu, jak bylo ukázáno v práci Waga a kolegů (Waga et al., 1994). V práci Geritsově a kolegů prokázali autoři *in vivo* a *in vitro* interakci BKPyV agnoproteinu s PCNA, přičemž však nebyla zmapována oblast, která agnoproteinu umožňují vazbu na PCNA a tudíž se soudí, že pro zdárnou interakci obou proteinů je potřeba hned několik oblastí rozložených po celé délce agnoproteinu (Gerits et al., 2015). Dále bylo zjištěno, že interakce agnoproteinu a PCNA nenarušuje interakci PCNA s DNA polymerázou δ , ale i přesto dokáže agnoprotein specificky inhibovat replikaci buněčné/virové DNA zajišťovanou právě polymerázou δ a za účasti PCNA (Gerits et al., 2015). Inhibice syntézy DNA tedy zřejmě nastává v důsledku vyvazování PCNA agnoproteinem a znemožnění interakce PCNA s polymerázou δ , ale uplatňuje se zde jiný, prozatím neznámý, mechanismus. Pro virus může být užitečné snížit, popřípadě zcela zastavit, replikaci svého genomu v pozdní fázi infekce, aby bylo možné virové genomy enkapsidovat, a právě tuto funkci zde může agnoprotein plnit.

Interakce α -SNAP a agnoproteinu BKPyV byla poprvé popsána *in vivo*, kde byla pozorována ko-lokalizace obou těchto proteinů (Johannessen et al., 2011). Následné experimenty prokázaly, že jde o přímou interakci obou proteinů, která nastává jak *in vitro*, tak *in vivo*, a nedochází ke zprostředkování interakce přes jiné proteiny (Johannessen et al., 2011). Prokázáním interakce agnoproteinu BKPyV a α -SNAB je v souladu s výše popsanou ko-lokalizací agnoproteinu BKPyV s lipidovými kapénkami (Unterstab et al., 2010). Pro zprostředkování vazby agnoproteinu a α -SNAP je zapotřebí N-koncových aa agnoproteinu, konkrétně aa 1-15 (Johannessen et al., 2011). Stejná skupina dále prokázala, že interakce agnoproteinu a α -SNAP zřejmě vede ke zpomalení, až téměř

k inhibici sekretorické dráhy v buňce, neboť α -SNAP je zapotřebí k recyklaci SNARE po splnutí váčků, a tedy k optimálnímu fungování sekretorické dráhy (Cho et al., 2002). Vazba agnoproteinu na α -SNAP může vést ke snížení jeho dostupnosti pro NSF (N-ethylmaleimid-senzitivní faktor) a nedochází k rozvolnění cis-SNARE komplexů, což může vést k inhibici sekretorické dráhy. K čemu viru zastavení sekretorické dráhy slouží, není zcela jasné. Může to bránit sekreci cytokinů z infikované buňky či vystavování komplexů MHC I na povrchu infikované buňky. Mohlo by to též vést k destabilizaci cytoplasmatické membrány a snazšímu uvolňování virionů z buňky.

Bylo prokázáno, že agnoprotein JCPyV interaguje s HP1 α díky C-koncové oblasti HP1 α , která však zároveň zajišťuje vazbu HP1 α na LBR (lamin B receptor), což vede k vyvazování HP1 α z jeho vazby na LBR a může tak dojít ke změně uspořádání jaderného obalu (Okada et al., 2005). Vyvázání HP1 α způsobí zvýšenou laterální pohyblivost LBR ve vnitřní jaderné membráně a byly pozorovány vchlípeniny a jiné znaky přestavby jaderného obalu u buněk, ve kterých byla stimulována produkce agnoproteinu (Okada et al., 2005). Pro ověření, zda interakce agnoproteinu a HP1 α může napomáhat uvolňování virionů z jádra, byly provedeny experimenty využívající VLPs, které byly fluorescenčně značeny a byly injikovány do jádra buněk, které buď produkovaly agnoprotein nebo nikoliv. Výsledek naznačoval, že v buňkách s agnoproteinem došlo k přemístění VLPs do cytoplasmy, zatímco v buňkách bez agnoproteinu zůstávaly částice v jádře (Okada et al., 2005). Autoři této studie proto soudí, že by agnoprotein mohl sloužit k uvolňování virových částic z jádra buňky, avšak podrobněji se této problematice budu věnovat dále.

AP-3 je heteromerní komplex proteinů podílející se na vzniku klatrinových váčků a zajišťující cílení váčků z trans-Golgiho aparátu do pozdních endozomů/lyzozomů (Dell'Angelica et al., 1998). AP-3 se váže na specifické sekvenční signály cytosolických částí transmembránových proteinů v trans-Golgi aparátu či v časném endosomu a navádí váčky s těmito proteiny do pozdních endosomů a lyzozomů (Ihrke et al., 2004). Cílení proteinů do pozdních endosomů může tedy probíhat buď přímou cestou, kdy je váček z trans-Golgi aparátu přímo zacílen do pozdního endosomu, nebo nepřímou cestou, kdy jde náklad váčku z trans-Golgi aparátu na cytoplasmatickou membránu a následně do časného endosomu, odkud jsou proteiny nesoucí sekvenci rozpoznávanou AP-3 směřovány do pozdního endosomu (Ihrke et al., 2004). Suzuki a kolegové ukázali, že agnoprotein JCPyV dokáže interagovat s delta podjednotkou AP-3 a že pro tuto interakci jsou třeba Lys a Arg v N-koncové oblasti agnoproteinu, konkrétně mezi aa 6-17 (Suzuki et al., 2013). Zajímavé je, že u agnoproteinu BKPyV nebyla interakce s AP-3 prokázána, což je zřejmě důsledek existence Gln-9 u agnoproteinu BKPyV, zatímco u agnoproteinu JCPyV je na stejné pozici Lys, který se značnou měrou podílí na interakci agnoproteinu JCPyV s AP-3 (Suzuki et al., 2013). Experimenty ukázaly, že produkce agnoproteinu v buňkách vede k inhibici přímé i nepřímé cesty proteinů do pozdních endosomů/lyzozomů a že interakce agnoproteinu vedoucí k inhibici AP-3 je klíčová pro viroporinovou aktivitu agnoproteinu

vedoucí k permeabilizaci cytoplasmatické membrány (Suzuki et al., 2013). Bylo pozorováno, že k permeabilizaci membrány dochází i v buňkách, kde je produkován mutantní agnoprotein neschopný vázat AP-3, avšak exprese AP-3 byla v buňkách inhibována jinak (pomocí siRNA), z čehož vyplývá, že inhibice funkce AP-3 je pro viroporinovou aktivitu důležitější než samotná interakce agnoproteinu a AP-3. Je-li v buňce exprimován wt agnoprotein JCPyV, dochází k inhibici váčkového transportu do pozdních endosomů/lysozomů a tedy i k inhibici transportu agnoproteinu do lysozomů a naopak je agnoprotein ve větší míře přítomen v cytoplasmatické membráně buňky, kde může zajišťovat svou viroporinovou funkci (Suzuki et al., 2013).

U linie myších fibroblastů NIH3T3, kde byla zajištěna produkce agnoproteinu JCPyV z vneseného vektoru, byla pozorována deregulace buněčného cyklu a zastavení většiny buněk v G2/M fázi buněčného cyklu (Darbinyan et al., 2002). Při bližším zkoumání se zjistilo, že v buňkách produkujících agnoprotein je zvýšená exprese p21, jehož funkcí je právě zastavení buněčného cyklu v G2 fázi (Niculescu et al., 1998). Jak bylo v práci Darbinyana a kolegů ukázáno, p53 podporuje expresi p21, avšak ko-exprese genů p53 a agnoproteinu vede ještě k dalšímu navýšení promotorové aktivity u p21 (Darbinyan et al., 2002). Díky tomu bylo následně testováno a také potvrzeno, že agnoprotein dokáže vázat p53 a tím zřejmě ovlivňovat jeho funkci. Tato studie však musí být brána s rezervou, neboť v buňkách byl přítomen pouze agnoprotein, navíc v nadprodukci, a nikoliv další polyomavirové proteiny, které by mohly do regulace buněčného cyklu také zasahovat. Není ani vyloučeno, že interakce agnoproteinu a p53 není zodpovědná za pozorovanou zvýšenou expresi p21, ale mohlo k tomu dojít na této interakci nezávislým mechanismem, který zatím nebyl odhalen, a bude třeba podrobnějšího zkoumání pro objasnění této problematiky.

Na předchozí studii navazuje práce zabývající se vlivem agnoproteinu na opravu poškozené chromozomální DNA, neboť p53 zajišťuje mimo jiné i zahájení oprav poškozené DNA a zastavení buněčného cyklu (Clair et al., 2004). Bylo zjištěno, že buňky NIH3T3 linie, které produkují agnoprotein, jsou mnohem náchylnější k cytotoxickým účinkům cisplatinu, který způsobuje poškození DNA v buňkách (Darbinyan et al., 2004). Chromozomální DNA v buňkách produkujících agnoprotein a ošetřených cisplatinou byla poškozena především dvouvláknovými zlomy, jejichž opravu zajišťují především proteiny Ku70 a Ku80 prostřednictvím nehomologních spojů konců dvojevláknových zlomů DNA (Walker et al., 2001). V buňkách negativních na agnoprotein je Ku70 lokalizován v jádře, zatímco v buňkách, kde je agnoprotein přítomen, je Ku70 lokalizován především v perinukleárním prostoru, stejně jako agnoprotein (Darbinyan et al., 2004). Další experimenty ukázaly, že agnoprotein JCPyV váže Ku70 prostřednictvím aa 18-36 a tato interakce vede k inhibici oprav dvouvláknových DNA zlomů prostřednictvím nehomologních spojů konců DNA (Darbinyan et al., 2004). Z obou studií (Darbinyan et al., 2004, 2002) vyplývá, že agnoprotein JCPyV je důležitý pro deregulaci buněčného cyklu a zastavení buněk v G2 fázi pomocí zvýšení exprese p21 nebo indukce poškození DNA. V čem

tato deregulace napomáhá replikačnímu cyklu polyomaviru není zcela jasné, ale mohla by být důležitá například pro lytické uvolnění viru z buňky.

4.4.2. Uvolňování virionů z buňky pomocí agnoproteinu

Jak bylo naznačeno v předchozích oddílech, hned několik prací se věnuje vlivu agnoproteinu na uvolňování virionů z buňky, popřípadě uvolnění virionů z jádra. Je však nutné poznamenat, že některé z prací se v názoru na funkci agnoproteinu v tomto procesu poněkud rozcházejí.

U JCPyV byl nejčastěji zkoumán vliv agnoproteinu na uvolňování virionů z buňky. Některé studie ukázaly, že SV40 a JCPyV s mutovaným iniciačním kodonem pro agnoprotein dokáží i přesto úspěšně uvolňovat virové částice z buňky (Sariyer et al., 2011, 2006). Snížená schopnost propagace takto mutovaných virů byla z důvodu absence virové DNA v naprosté většině uvolněných virionů, a proto autoři soudí, že agnoprotein ovlivňuje spíše morfogenezi virionů, než jejich uvolnění z buňky.

Jiný názor má skupina Suzukiho a kolegů, kteří přišli s myšlenkou, že agnoprotein JCPyV slouží jako viroporin a je tedy klíčový pro uvolnění virionů z infikovaných buněk (Suzuki et al., 2010). Jak již bylo zmíněno v kapitole 4.3. „Lokalizace agnoproteinu“, agnoprotein může být součástí cytoplasmatické membrány v podobě transmembránového proteinu, což může naznačovat jeho roli jakožto viroporinu. Suzuki a kolegové pozorovali snížení virové propagace u JCPyV neexprimujícího agnoprotein a také snížení koncentrace VP1 v supernatantu buněčných kultur infikovaných tímto mutovaným virem. Na základě předchozích dvou zjištění bylo zkoumáno, zda agnoprotein dokáže zvýšit propustnost cytoplasmatické membrány, je-li v buňce produkován. Výsledky naznačují, že agnoprotein zvyšuje permeabilitu buněčné membrány, jak pro malé molekuly (například Hygromycin B), tak pro ionty (například Ca^{2+}), avšak viriony jsou poměrně velké struktury a zřejmě by nemohly takto procházet buněčnou membránou (Suzuki et al., 2010). Proto autoři soudí, že viroporinová aktivita agnoproteinu slouží nepřímo k uvolnění virionů z buňky, například lyzí. Nebylo však následně potvrzeno, že by přítomnost agnoproteinu v buňkách vedla k jejich lyzi, byť tento experiment byl proveden na bakteriálních a nikoli na savčích buňkách a tudíž není zcela průkazný.

Pokud by viroporinová aktivita agnoproteinu nevedla k lyzi buňky, musí pak podporovat uvolňování virových částic jiným mechanismem. V pozdější práci se proto Suzuki a kolegové zaměřili na ovlivnění váčkového transportu buňky agnoproteinem. Jak již bylo řečeno v části 4.4.1. „Interakční partneři agnoproteinu“, agnoprotein může vázat AP-3, tím inhibovat jeho funkci a změnit směřování váčků nesoucích jak samotný agnoprotein, tak různé buněčné proteiny (Suzuki et al., 2013). Inhibice funkce AP-3 je evidentně klíčová pro viroporinovou aktivitu agnoproteinu. Bude proto žádoucí provést další experimenty, které by odhalily, jak přesně viroporinová aktivita agnoproteinu zajišťuje uvolňování virionů z buňky, popřípadě jakou roli v tomto procesu hrají další buněčné proteiny, které jsou inhibicí AP-3 směřovány místo do lysozomů na cytoplasmatickou membránu, kde mohou plnit odlišné funkce.

Pro ucelení je nutno zmínit, že obě práce se shodují, že za viroporinovou aktivitu agnoproteinu i za vazbu agnoproteinu na AP-3 jsou zodpovědné aa Arg-8 a Lys-9, což může dokazovat propojení obou procesů (Suzuki et al., 2013, 2010). Navíc není Lys-9 u agnoproteinů BKPyV a SV40 konzervován, kvůli čemuž, podle autorů, tyto agnoproteiny patrně nehrají roli viroporinů a uvolňování virových částic těchto polyomavirů probíhá jiným mechanismem.

Možnost, že by agnoprotein dokázal oligomerizovat v hydrofobním prostředí membrány, což je vlastnost potřebná pro viroporinovou aktivitu, byla zkoumána v práci Hidaka a kolegů, kde prováděli oligomerizaci fragmentů agnoproteinu obsahujících aa 22-44 v různých detergentech (Hidaka et al., 2015). Autoři uvádějí, že zvolené fragmenty agnoproteinu jsou schopné tvořit trimery v prostředí mírných detergentů, což naznačuje, že by agnoprotein mohl oligomerizovat i v prostředí cytoplasmatické membrány, avšak bylo by třeba výsledky ověřit i s celým agnoproteinem a nikoliv pouze s fragmenty.

U BKPyV bylo prokázáno, že jeho agnoprotein dokáže vázat α -SNAP, což vede k zastavení sekretorické dráhy v infikované buňce (Johannessen et al., 2011). Do nedávna se soudilo, že díky tomu by mohlo docházet k destabilizaci buněčné membrány a k usnadnění uvolňování virových částic z buňky, avšak nejnovější práce přišla s odlišným vysvětlením.

V nedávné práci byl poprvé zkoumán vliv agnoproteinu na uvolnění BKPyV z infikovaných buněk a ukázalo se, že bez agnoproteinu není schopen BKPyV opustit buňku a úspěšně se propagovat (Panou et al., 2018). Oproti JCPyV, kde delece agnoproteinu podle některých studií vede k poruše morfogeneze virionů (Sariyer et al., 2011), u BKPyV nebyla porucha morfogeneze virionů či snížení jejich infekivity při deleci agnoproteinu zaznamenána, a proto lze usuzovat, že snížení schopnosti BKPyV neprodukcujícího agnoprotein se replikovat plyne z neschopnosti uvolnit viriony z buňky (Panou et al., 2018). Ukázalo se, že viriony BKPyV neprodukcujícího agnoprotein jsou uvězněny v jádře infikované buňky. Ačkoliv u JCPyV bylo popsáno, že k uvolnění z jádra může napomáhat interakce agnoproteinu a HP1 α (Okada et al., 2005), u agnoproteinu BKPyV nebyla interakce s HP1 α potvrzena (Unterstab et al., 2010) a ani tato nejnovější studie nepotvrdila jakékoliv rozdíly ve změnách struktury vnitřní jaderné membrány nebo lokalizaci laminu B mezi wt BKPyV a BKPyV defektním v produkci agnoproteinu. Proto byl následně zkoumán vliv buněčných proteinů na uvolnění virionů z jádra a bylo zjištěno, že při potlačení exprese α -SNAP pomocí siRNA v buňkách infikovaných wt BKPyV dochází k zadržování virových částic v jádře, stejně jako je tomu při deleci agnoproteinu (Panou et al., 2018). Takto bylo potvrzeno, že α -SNAP hraje klíčovou roli při uvolnění BKPyV částic z jádra buňky a to zřejmě ve spolupráci s agnoproteinem. Do budoucna bude zapotřebí podrobnějšího studia procesu, kterým interakce α -SNAP a agnoproteinu zajišťuje uvolňování virových částic z infikovaných buněk.

4.4.3. Sekrece agnoproteinů z buňky

Teprve v nedávné době vyšly první dvě práce, které se věnují sekreci agnoproteinů do extracelulárního prostoru a také důsledkům tohoto děje. Otlů a kolegové poprvé prokázali, že agnoprotein je sekretován do media buněčných kultur infikovaných JCPyV (Otlů et al., 2014). Sekrece agnoproteinů byla pozorována 4. den po infekci. Důležité však je, že virové částice se do media uvolňují teprve 6. nebo 7. den po infekci, tudíž sekrece agnoproteinů do extracelulárního prostoru nezávisí na uvolňování virionů z buňky. Agnoprotein je uvolňován do media i v buněčných kulturách, do kterých byl vnesen pouze konstrukt pro expresi agnoproteinů, bez ostatních polyomavirových proteinů. Tím se potvrdilo, že k tomuto procesu není třeba replikačního cyklu viru ani virové proteiny (Otlů et al., 2014). Stejná skupina také zjistila, že agnoprotein není sekretován prostřednictvím exosomů, ale k jeho uvolnění slouží spíše sekretorická dráha ER - Golgiho aparát. Bylo testováno, zda může sekrece agnoproteinů ovlivnit okolní buňky, a zjistilo se, že agnoprotein může z media vstupovat do virem neinfikovaných buněk a zůstat v jejich cytoplasmě (Otlů et al., 2014). Jiný závěr v tomto ohledu však měla druhá práce, věnující se též sekreci agnoproteinů z buňky. Saribas a kolegové pozorovali, že sekretovaný agnoprotein se zadržuje především na povrchu buněk, zatímco v cytoplasmě jej konfokálním mikroskopem nedetekovali (Saribas et al., 2018). K vyřešení, zda agnoprotein do buněk vstupuje, či zůstává pouze na povrchu, bude potřeba dalšího studia.

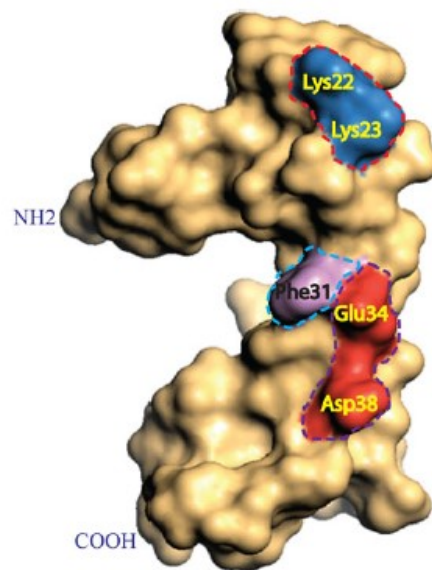
K čemu sekrece agnoproteinů a jeho interakce s buněčným povrchem, popřípadě internalizace okolními buňkami, viru slouží, není zatím příliš jasné. Mohlo by se jednat o snahu JCPyV narušit funkci imunitního systému, popřípadě by mohl agnoprotein deregulovat zatím neinfikované buňky a usnadnit šíření JCPyV tkání. Také je možno uvažovat, že by agnoprotein mohl snižovat přežívání neuronů a způsobovat apoptózu oligodendrocytů, jak bylo popsáno v pracích (Merabova et al., 2012, 2008), čímž by zvyšoval poškození mozku pacientů s PML.

Na základě popsání 3D struktury celého agnoproteinů bylo zkoumáno, jaké aa jsou zodpovědné za sekreci agnoproteinů do extracelulárního prostoru (Saribas et al., 2018). Byla analyzována schopnost různých delečních mutantů agnoproteinů uvolňovat se do media a ukázalo se, že pouze fragmenty obsahující hlavní alfa helix agnoproteinů byly sekretovány, což naznačuje klíčovou roli majoritního alfa helixu v tomto procesu. Jak bylo zmíněno v části 4.2., majoritní alfa helix nese na svém povrchu 4 rozhraní, dvě hydrofobní, jedno aromatické a jedno hydrofilní. Byl zkoumán vliv všech 4 rozhraní na sekreci agnoproteinů z buňky. Ani u jedné z hydrofobních oblastí se vliv na sekreci nepotvrdil. Z aromatické oblasti bylo pozorováno snížení sekrece agnoproteinů do media pouze u agnoproteinů mutovaného v aa Phe-31, což naznačuje roli této aa v daném procesu (Saribas et al., 2018). Z hydrofilních aminokyselin byl vliv na sekreci agnoproteinů zkoumán u Lys-22, Lys-23, Arg-27, Glu-34 a Asp-38. Všechny zmíněné aa byly jednotlivě mutovány na Ala a u všech takto mutovaných agnoproteinů byla zjišťována míra jejich uvolňování do extracelulárního prostoru. Potvrdilo se, že mutace Lys-22 nebo Lys-23 nebo Glu-34 nebo Asp-38 na Ala vede k významnému snížení sekrece takto mutovaného agnoproteinů, což potvrzuje klíčovou roli aa hydrofilního rozhraní v uvolňování

agnoproteinů z buněk (Saribas et al., 2018). Jedině u Arg-27, byl-li mutován na Ala, nebyla pozorována změna v sekreci agnoproteinů z buňky. Při zobrazení všech aa zbytků zodpovědných za uvolňování agnoproteinů na jeho 3D modelu, jak je tomu na Obr. 10., je patrné, proč právě aromatická aa Phe-31 je společně s hydrofilními aa zapojen do řízení sekrece agnoproteinů z buňky.

Většina aa residuí zodpovědných za uvolňování agnoproteinů JCPyV z buňky je přítomna i u agnoproteinů BKPyV a SV40, což může naznačovat, že také u těchto polyomavirů dochází k sekreci agnoproteinů z buňky.

Obr. 10.: 3D model agnoproteinů zvýrazňující aa zbytky zodpovědné za sekreci agnoproteinů JCPyV do extracelulárního prostoru. Převzato z (Saribas et al., 2019).



5. Závěr

Ve všech ohledech je agnoprotein JCPyV, BKPyV a viru SV40 nesmírně zajímavým a multifunkčním proteinem, který plní řadu důležitých funkcí zajišťujících úspěšný replikační cyklus těchto polyomavirů.

To, že delece agnoproteinů vede ke snížení až úplné inhibici replikace daného polyomaviru, je zmíněno v řadě prací věnující se funkci agnoproteinů. Avšak zdá se být problém jednoznačně rozhodnout, zda se virus s chybějícím agnoproteinem dokáže replikovat, či nikoliv, neboť různé práce prezentují v tomto ohledu odlišné závěry. Důvodů, proč neexistuje jednotný fenotyp delece agnoproteinů, může být hned několik. Za prvé, agnoprotein BKPyV, JCPyV a viru SV40 může plnit u jednotlivých zástupců odlišné funkce, a pak i delece agnoproteinů u jednotlivých polyomavirů se projeví jinak. Pokud se liší výsledky delece agnoproteinů u jednoho konkrétního polyomaviru, mohlo dojít k užití různých buněčných linií k provedení experimentů a virus se může chovat odlišně v různých typech buněk (Johannessen et al., 2008; Sariyer et al., 2011; Suzuki et al., 2010). Může se také lišit doba trvání a způsob vyhodnocování experimentu. V neposlední řadě může výsledek ovlivnit i to, jakým způsobem byla delece agnoproteinů provedena, zda byl pouze mutován iniciační kodon v genu pro agnoprotein nebo zda byl celý agnogen vyštěpen, což by mohlo ovlivnit správnou regulaci virového cyklu, neboť společně s agnogenem mohly být vyštěpeny i některé potřebné regulační sekvence ležící v dané oblasti (Akan et al., 2006; Ellis et al., 2013; Ellis and Koralnik, 2015).

V celkovém důsledku však všechny práce potvrzují, že je agnoprotein důležitým proteinem pro každý polyomavirus, který jej kóduje.

Agnoprotein řídí mnoho kroků napříč celým replikačním cyklem polyomavirů a to prostřednictvím interakcí, které má jak s virovými, tak s hostitelskými proteiny. Agnoprotein ovlivňuje replikaci virového genomu a transkripci z časného i pozdního promotoru (Panou et al., 2018; Safak et al., 2001), zajišťuje správnou morfogenezi virionů (Suzuki et al., 2012), umožňuje uvolňování virových částic z buňky (Suzuki et al., 2010), popřípadě z jádra (Panou et al., 2018), dereguluje buněčný cyklus hostitelské buňky (Darbinyan et al., 2004, 2002), ovlivňuje negativně váčkový transport v buňce (Johannessen et al., 2011; Suzuki et al., 2013) a možná má i další, zatím nepopsané funkce. Tato rozmanitost interakčních partnerů agnoproteinu je zřejmě dána tím, že jeho sekundární strukturu tvoří pouze majoritní a minoritní alfa helix a celý zbytek proteinu nemá definovanou sekundární strukturu (Coric et al., 2017), díky čemu může zaujímat mnoho různých konformací s mnoha různými proteiny. Za specifickou vazbu s ostatními proteiny pak nejčastěji zodpovídá majoritní alfa helix a to díky svému rozdělení na 4 rozhraní, která mohou plnit odlišné funkce díky svým rozdílným vlastnostem. V rámci majoritního alfa helixu se nachází tzv. Ile/Leu/Phe-bohatá oblast, která je zodpovědná za dimerizaci či oligomerizaci agnoproteinu a která se jeví jako nepostradatelná pro správné fungování agnoproteinu (Saribas et al., 2013).

Ačkoliv se někteří interakční partneři agnoproteinů BKPyV, JCPyV a SV40 shodují, v některých ohledech se jejich funkce a vlastnosti liší. Je to dáno variabilitou některých aa residuí v sekvencích jednotlivých agnoproteinů, které mají navzájem vysokou sekvenční homologii, především v N-koncové a centrální oblasti, avšak shoda není úplná a záměny aa na některých pozicích mohou vést k získání nebo ztrátě určitých vlastností proteinu. Například agnoprotein BKPyV není schopen vázat AP-3, neboť má záměnu aa na pozici 9 oproti agnoproteinu JCPyV (Suzuki et al., 2013). Stejně tak agnoprotein BKPyV neváže HP1 α , zatímco agnoprotein JCPyV ano (Okada et al., 2005). Může se mírně lišit také lokalizace agnoproteinů jednotlivých polyomavirů, neboť agnoprotein JCPyV dokáže interagovat s tubulinem (Endo et al., 2003) a také byl detekován v ER (Suzuki et al., 2010), zatímco pro agnoprotein BKPyV toto neplatí (Unterstab et al., 2010). Ukazuje se, že pro uvolnění virionů BKPyV i JCPyV z buněk je zapotřebí, aby agnoprotein narušil váčkový transport buňky, avšak každý z agnoproteinů toho dosahuje jinou cestou. Agnoprotein BKPyV interaguje s α -SNAP (Johannessen et al., 2011), zatímco agnoprotein JCPyV váže AP-3 (Suzuki et al., 2013).

Jistě by, pro odhalení dalších vlastností agnoproteinu, bylo užitečné věnovat více pozornosti viru SV40, neboť pouze malá část poznatků o agnoproteinu byla získána na tomto viru a to z důvodu upřednostňování BKPyV a JCPyV, jež jsou klinicky významnější, neboť u člověka mohou způsobit závažná onemocnění.

Přesto, že se již podařilo zjistit řadu funkcí agnoproteinu u BKPyV, JCPyV a viru SV40, stále do budoucna zbývá zodpovědět spoustu otázek, abychom plně porozuměli vlastnostem agnoproteinů a mechanismům jejich funkcí. Za pozornost rozhodně stojí způsob, jakým je agnoprotein sekretován

z infikovaných buněk a k čemu tato aktivita viru přesně slouží, neboť zatím jsme pouze otevřeli toto, jistě zajímavé téma. Dále by bylo zajímavé zjistit, jak moc samotný agnoprotein JCPyV poškozuje hostitelské buňky *in vivo*, zda dokáže způsobit apoptózu lidských neuronů a oligodendrocytů a popřípadě se zaměřit na způsob, jak takové virové činnosti bránit u pacientů s PML. Bylo by třeba konečně rozhodnout, zda je agnoprotein JCPyV viroporinem, a pokud ano, jak je permeability cytoplasmatické membrány dosaženo a zdali a jak napomáhá k uvolňování virionů. Pokud je agnoprotein JCPyV transmembránovým proteinem, bylo by zajímavé zjistit, v jaké konformaci se v membráně nachází, zda tvoří například trimery či jinak uspořádané oligomery. Stále existuje možnost, že by agnoprotein nebyl transmembránovým proteinem a pouze interaguje s některým z buněčných proteinů cytoplasmatické membrány. Mohlo by být do budoucna užitečné zaměřit se na možné posttranslační modifikace agnoproteinu a ověřit, zda je agnoprotein *in vivo* modifikován nejen fosforylací, ale i jiným způsobem, a zda by tyto modifikace neovlivňovaly funkce agnoproteinu. Zde jsem navrhla některá zajímavá témata, která by mohla stát za pozornost a studium v budoucích pracích.

6. Seznam použité literatury

- Akan, I., Sariyer, I.K., Biffi, R., Palermo, V., Woolridge, S., White, M.K., Amini, S., Khalili, K., Safak, M., 2006. Human polyomavirus JCV late leader peptide region contains important regulatory elements. *Virology* 349, 66–78. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2006.01.025>
- An, P., Sáenz Robles, M.T., Pipas, J.M., 2012. Large T Antigens of Polyomaviruses: Amazing Molecular Machines. *Annu. Rev. Microbiol.* 66, 213–236. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-092611-150154>
- Bennett, S.M., Broekema, N.M., Imperiale, M.J., 2012. BK polyomavirus: emerging pathogen. *Microbes Infect.* 14, 672–683. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2012.02.002>
- Berger, H., Wintersberger, E., 1986. Polyomavirus Small T Antigen Enhances Replication of Viral Genomes in 3T6 Mouse Fibroblasts. *J VIROL* 60, 768–770.
- Berger, L.C., Smith, D.B., Davidson, I., Hwang, J.-J., Fanning, E., Wildeman, A.G., 1996. Interaction between T Antigen and TEA Domain of the Factor TEF-1 Derepresses Simian Virus 40 Late Promoter In Vitro: Identification of T-Antigen Domains Important for Transcription Control. *J VIROL* 70, 1203–1212.
- Bikel', I., Loeken, M.R., 1992. Involvement of Simian Virus 40 (SV40) Small t Antigen in trans Activation of SV40 Early and Late Promoters. *J VIROL* 66, 6.
- Bloom, L., Horvitz, H.R., 1997. The *Caenorhabditis elegans* gene *unc-76* and its human homologs define a new gene family involved in axonal outgrowth and fasciculation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94, 3414–3419. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.7.3414>
- Bollag, B., Prins, C., Snyder, E.L., Frisque, R.J., 2000. Purified JC Virus T and T' Proteins Differentially Interact with the Retinoblastoma Family of Tumor Suppressor Proteins. *Virology* 274, 165–178. <https://doi.org/10.1006/viro.2000.0451>
- Brady, J., Khoury, G., 1985. trans Activation of the simian virus 40 late transcription unit by T-antigen. *Mol. Cell. Biol.* 5, 1391–1399. <https://doi.org/10.1128/MCB.5.6.1391>
- Buck, C.B., Van Doorslaer, K., Peretti, A., Geoghegan, E.M., Tisza, M.J., An, P., Katz, J.P., Pipas, J.M., McBride, A.A., Camus, A.C., McDermott, A.J., Dill, J.A., Delwart, E., Ng, T.F.F., Farkas, K., Austin, C., Kraberger, S., Davison, W., Pastrana, D.V., Varsani, A., 2016. The Ancient Evolutionary History of Polyomaviruses. *PLOS Pathog.* 12, e1005574. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005574>
- Calvignac-Spencer, S., Feltkamp, M.C.W., Daugherty, M.D., Moens, U., Ramqvist, T., Johne, R., Ehlers, B., 2016. A taxonomy update for the family Polyomaviridae. *Arch. Virol.* 161, 1739–1750. <https://doi.org/10.1007/s00705-016-2794-y>

- Chen, N.N., Khalili, K., 1995. Transcriptional Regulation of Human JC Polyomavirus Promoters by Cellular Proteins YB-1 and Pur alpha in Glial Cells. *J VIROL* 69, 5843–5848.
- Cho, S.-J., Kelly, M., Rognlien, K.T., Cho, J.A., Heinrich Hörber, J.K., Jena, B.P., 2002. SNAREs in Opposing Bilayers Interact in a Circular Array to Form Conducting Pores. *Biophys. J.* 83, 2522–2527. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(02\)75263-6](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(02)75263-6)
- Clair, S.St., Giono, L., Varmeh-Ziaie, S., Resnick-Silverman, L., Liu, W., Padi, A., Dastidar, J., DaCosta, A., Mattia, M., Manfredi, J.J., 2004. DNA Damage-Induced Downregulation of Cdc25C Is Mediated by p53 via Two Independent Mechanisms: One Involves Direct Binding to the cdc25C Promoter. *Mol. Cell* 16, 725–736. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2004.11.002>
- Clayson, E.T., Brando, L.V.J., Compans, R.W., 1989. Release of Simian Virus 40 Virions from Epithelial Cells Is Polarized and Occurs without Cell Lysis. *J VIROL* 63, 2278–2288.
- Clever, J., Kasamatsu, H., 1991. Simian virus 40 Vp2/3 small structural proteins harbor their own nuclear transport signal. *Virology* 181, 78–90. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(91\)90472-N](https://doi.org/10.1016/0042-6822(91)90472-N)
- Coric, P., Saribas, A.S., Abou-Gharbia, M., Childers, W., Condra, J.H., White, M.K., Safak, M., Bouaziz, S., 2017. Nuclear Magnetic Resonance Structure of the Human Polyoma JC Virus Agnoprotein. *J. Cell. Biochem.* 118, 3268–3280. <https://doi.org/10.1002/jcb.25977>
- Coric, P., Saribas, A.S., Abou-Gharbia, M., Childers, W., White, M.K., Bouaziz, S., Safak, M., 2014. Nuclear Magnetic Resonance Structure Revealed that the Human Polyomavirus JC Virus Agnoprotein Contains an α -Helix Encompassing the Leu/Ile/Phe-Rich Domain. *J. Virol.* 88, 6556–6575. <https://doi.org/10.1128/JVI.00146-14>
- Cubitt, C.L., 2006. Molecular Genetics of the BK Virus, in: *Polyomaviruses and Human Diseases*. Springer, New York, pp. 85–95.
- Dang, X., Vidal, J.E., de Oliveira, A.C.P., Simpson, D.M., Morgello, S., Hecht, J.H., Ngo, L.H., Koralnik, I.J., 2012. JC virus granule cell neuronopathy is associated with VP1 C terminus mutants. *Journal of General Virology* 93, 175-183. <https://doi.org/10.1099/vir.0.037440-0>
- Daniels, R., Sadowicz, D., Hebert, D.N., 2007. A Very Late Viral Protein Triggers the Lytic Release of SV40. *PLoS Pathog.* 3, e98. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0030098>
- Darbinyan, A., Darbinian, N., Safak, M., Radhakrishnan, S., Giordano, A., Khalili, K., 2002. Evidence for dysregulation of cell cycle by human polyomavirus, JCV, late auxiliary protein. *Oncogene* 21, 5574–5581. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1205744>
- Darbinyan, A., Siddiqui, K.M., Slonina, D., Darbinian, N., Amini, S., White, M.K., Khalili, K., 2004. Role of JC Virus Agnoprotein in DNA Repair. *J. Virol.* 78, 8593–8600. <https://doi.org/10.1128/JVI.78.16.8593-8600.2004>
- Del Valle, L., Gordon, J., Enam, S., Delbue, S., Croul, S., Abraham, S., Radhakrishnan, S., Assimakopoulou, M., Katsetos, C.D., Khalili, K., 2002. Expression of Human Neurotropic Polyomavirus JCV Late Gene Product Agnoprotein in Human Medulloblastoma. *JNCI J. Natl. Cancer Inst.* 94, 267–273. <https://doi.org/10.1093/jnci/94.4.267>
- Dell'Angelica, E.C., Klumperman, J., Stoorvogel, W., Bonifacino, J.S., 1998. Association of the AP-3 Adaptor Complex with Clathrin. *Science* 280, 431–434. <https://doi.org/10.1126/science.280.5362.431>
- Dill, J.A., Ng, T.F.F., Camus, A.C., 2016. Complete Sequence of the Smallest Polyomavirus Genome, Giant Guitarfish (*Rhynchobatus djiddensis*) Polyomavirus 1. *Genome Announc.* 4, e00391-16. <https://doi.org/10.1128/genomeA.00391-16>
- Dörries, K., Vogel, E., Günther, S., Czub, S., 1994. Infection of human polyomaviruses JC and BK in peripheral blood leukocytes from immunocompetent individuals. *Virology* 198, 59–70. <https://doi.org/10.1006/viro.1994.1008>
- Ehlers, B., Moens, U., 2014. Genome analysis of non-human primate polyomaviruses. *Infect. Genet. Evol.* 26, 283–294. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2014.05.030>
- Ellis, L.C., Koralnik, I.J., 2015. JC virus nucleotides 376-396 are critical for VP1 capsid protein expression. *J. Neurovirol.* 21, 671–678. <https://doi.org/10.1007/s13365-014-0278-y>
- Ellis, L.C., Norton, E., Dang, X., Koralnik, I.J., 2013. Agnogene Deletion in a Novel Pathogenic JC Virus Isolate Impairs VP1 Expression and Virion Production. *PLoS ONE* 8, e80840. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0080840>
- Endo, S., Okada, Y., Orba, Y., Nishihara, H., Tanaka, S., Nagashima, K., Sawa, H., 2003. JC Virus Agnoprotein Colocalizes with Tubulin. *J. Neurovirol.* 9, 10–14. <https://doi.org/10.1080/13550280390195333>
- Engel, S., Heger, T., Mancini, R., Herzog, F., Kartenbeck, J., Hayer, A., Helenius, A., 2011. Role of Endosomes in Simian Virus 40 Entry and Infection. *J. Virol.* 85, 4198–4211. <https://doi.org/10.1128/JVI.02179-10>
- Erickson, K.D., Bouchet-Marquis, C., Heiser, K., Szomolanyi-Tsuda, E., Mishra, R., Lamothe, B., Hoenger, A., Garcea, R.L., 2012. Virion Assembly Factories in the Nucleus of Polyomavirus-Infected Cells. *PLoS Pathog.* 8, e1002630. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002630>

- Evans, G.L., Caller, L.G., Foster, V., Crump, C.M., 2015. Anion homeostasis is important for non-lytic release of BK polyomavirus from infected cells. *Open Biol.* 5, 150041. <https://doi.org/10.1098/rsob.150041>
- Feng, H., Shuda, M., Chang, Y., Moore, P.S., 2008. Clonal integration of a polyomavirus in human Merkel cell carcinoma. *Science* 319, 1096-1100. <https://doi.org/10.1126/science.1152586>
- Fu, S.-C., Imai, K., Horton, P., 2011. Prediction of leucine-rich nuclear export signal containing proteins with NESsential. *Nucleic Acids Res.* 39, e111. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr493>
- Gallo, G.J., Gilinger, G., Alwine, J.C., 1988. Simian virus 40 T antigen alters the binding characteristics of specific simian DNA-binding factors. *Mol. Cell. Biol.* 8, 1648–1656. <https://doi.org/10.1128/MCB.8.4.1648>
- Gallo, G.J., Gruda, M.C., Manuppello, J.R., Alwine, J.C., 1990. Activity of Simian DNA-Binding Factors Is Altered in the Presence of Simian Virus 40 (SV40) Early Proteins: Characterization of Factors Binding to Elements Involved in Activation of the SV40 Late Promoter. *J VIROL* 64, 173–184.
- Gardner, S.D., Field, A.M., Coleman, D.V., Hulme, B., 1971. New human papovavirus (B.K.) isolated from urine after renal transplantation. *Lancet* 297, 1253–57. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(71\)91776-4](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(71)91776-4)
- Gerits, N., Johannessen, M., Tümmeler, C., Walquist, M., Kostenko, S., Snapkov, I., van Loon, B., Ferrari, E., Hübscher, U., Moens, U., 2015. Agnoprotein of polyomavirus BK interacts with proliferating cell nuclear antigen and inhibits DNA replication. *Virol. J.* 12, 14. <https://doi.org/10.1186/s12985-014-0220-1>
- Gerits, N., Moens, U., 2012. Agnoprotein of mammalian polyomaviruses. *Virology* 432, 316–326. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2012.05.024>
- Giorda, K.M., Raghava, S., Hebert, D.N., 2012. The Simian Virus 40 Late Viral Protein VP4 Disrupts the Nuclear Envelope for Viral Release. *J. Virol.* 86, 3180–3192. <https://doi.org/10.1128/JVI.07047-11>
- Giorda, K.M., Raghava, S., Zhang, M.W., Hebert, D.N., 2013. The Viroporin Activity of the Minor Structural Proteins VP2 and VP3 Is Required for SV40 Propagation. *J. Biol. Chem.* 288, 2510–2520. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.428425>
- Good, P.J., Welch, R.C., Ryu, W.-S., Mertz, J.E., 1988. The Late Spliced 19S and 16S RNAs of Simian Virus 40 Can Be Synthesized from a Common Pool of Transcripts. *J VIROL* 62, 563–571.
- Goudsmit, J., Dillen, P.W., van Strien, A., van der Noordaa, J., 1982. The role of BK virus in acute respiratory tract disease and the presence of BKV DNA in tonsils. *J. Med. Virol.* 10, 91–99. <https://doi.org/10.1002/jmv.1890100203>
- Gräfe, D., Ehlers, B., Mäde, D., Ellerbroek, L., Seidler, T., John, R., 2017. Detection and genome characterization of bovine polyomaviruses in beef muscle and ground beef samples from Germany. *Int. J. Food Microbiol.* 241, 168–172. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.10.024>
- Gross, L., 1953. A Filterable Agent, Recovered from Ak Leukemic Extracts, Causing Salivary Gland Carcinomas in C3H Mice. *Exp. Biol. Med.* 83, 414–421. <https://doi.org/10.3181/00379727-83-20376>
- Harris, K.F., Christensen, J.B., Imperiale, M.J., 1996. BK Virus Large T Antigen: Interactions with the Retinoblastoma Family of Tumor Suppressor Proteins and Effects on Cellular Growth Control. *J VIROL* 70, 2378–2386.
- Henriksen, S., Hansen, T., Bruun, J.-A., Rinaldo, C.H., 2016. The Presumed Polyomavirus Viroporin VP4 of Simian Virus 40 or Human BK Polyomavirus Is Not Required for Viral Progeny Release. *J. Virol.* 90, 10398–10413. <https://doi.org/10.1128/JVI.01326-16>
- Hidaka, K., Hojo, K., Fujioka, S., Nukuzuma, S., Tsuda, Y., 2015. Oligomerization of neutral peptides derived from the JC virus agnoprotein through a cysteine residue. *Amino Acids* 47, 2205–2213. <https://doi.org/10.1007/s00726-015-2004-3>
- Hirsch, H.H., Snyderman, D.R., 2005. BK Virus: Opportunity Makes a Pathogen. *Clin. Infect. Dis.* 41, 354–360. <https://doi.org/10.1086/431488>
- Houben, R., Angermeyer, S., Haferkamp, S., Aue, A., Goebeler, M., Schrama, D., Hesbacher, S., 2015. Characterization of functional domains in the Merkel cell polyoma virus Large T antigen: MCPyV Large T Antigen. *Int. J. Cancer* 136, E290–E300. <https://doi.org/10.1002/ijc.29200>
- Houff, S.A., Major, E.O., Katz, D.A., Kufta, C.V., Sever, J.L., Pittaluga, S., Roberts, J.R., Gitt, J., Saini, N., Lux, W., 1988. Involvement of JC virus-infected mononuclear cells from the bone marrow and spleen in the pathogenesis of progressive multifocal leukoencephalopathy. *N. Engl. J. Medicine* 301–305. <https://doi.org/10.1056/NEJM198802043180507>
- Ihrke, G., Kytälä, A., Russell, M.R.G., Rous, B.A., Luzio, J.P., 2004. Differential Use of Two AP-3-mediated Pathways by Lysosomal Membrane Proteins: Two AP-3-mediated Lysosomal Pathways. *Traffic* 5, 946–962. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2004.00236.x>

- Imai, Y., Chumakov, A.M., Miller, C.W., Said, J., Koeffler, H.P., 1994. T-antigen of SV40 blocks p53 transactivation but not p53 specific binding to DNA. *Int. J. Oncol.* 5, 945–953. <https://doi.org/10.3892/ijo.5.4.945>
- Ishii, N., Minami, N., Chen, E.Y., Medina, A.L., Chico, M.M., Kasamatsu, H., 1996. Analysis of a Nuclear Localization Signal of Simian Virus 40 Major Capsid Protein Vp. *J VIROL* 70, 1317–1322.
- Jackson, V., Chalkley, R., 1981. Use of Whole-Cell Fixation to Visualize Replicating and Maturing Simian Virus 40: Identification of New Viral Gene Product. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 78, 6081–6085.
- Jay, G., Nomura, S., Anderson, C.W., Khoury, G., 1981. Identification of the SV40 agnogene product: a DNA binding protein. *Nature* 291, 346–349. <https://doi.org/10.1038/291346a0>
- Johannessen, M., Myhre, M.R., Dragset, M., Tümmler, C., Moens, U., 2008. Phosphorylation of human polyomavirus BK agnoprotein at Ser-11 is mediated by PKC and has an important regulative function. *Virology* 379, 97–109. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2008.06.007>
- Johannessen, M., Walquist, M., Gerits, N., Dragset, M., Spang, A., Moens, U., 2011. BKV Agnoprotein Interacts with α -Soluble N-Ethylmaleimide-Sensitive Fusion Attachment Protein, and Negatively Influences Transport of VSVG-EGFP. *PLoS ONE* 6, e24489. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0024489>
- Johne, R., Buck, C.B., Allander, T., Atwood, W.J., Garcea, R.L., Imperiale, M.J., Major, E.O., Ramqvist, T., Norkin, L.C., 2011. Taxonomical developments in the family Polyomaviridae. *Arch. Virol.* 156, 1627–1634. <https://doi.org/10.1007/s00705-011-1008-x>
- Johne, R., Muller, H., 2007. Polyomaviruses of Birds: Etiologic Agents of Inflammatory Diseases in a Tumor Virus Family. *J. Virol.* 81, 11554–11559. <https://doi.org/10.1128/JVI.01178-07>
- Johne, R., Müller, H., Jungmann, A., 2000. Agnoprotein 1a and agnoprotein 1b of avian polyomavirus are apoptotic inducers. *J. Gen. Virol.* 81, 1183–1190. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-81-5-1183>
- Johne, R., Wittig, W., Fernandez-de-Luco, D., Hofle, U., Muller, H., 2006. Characterization of Two Novel Polyomaviruses of Birds by Using Multiply Primed Rolling-Circle Amplification of Their Genomes. *J. Virol.* 80, 3523–3531. <https://doi.org/10.1128/JVI.80.7.3523-3531.2006>
- Kato, A., Kitamura, T., Takasaka, T., Tominaga, T., Ishikawa, A., Zheng, H.-Y., Yogo, Y., 2004. Detection of the archetypal regulatory region of JC virus from the tonsil tissue of patients with tonsillitis and tonsillar hypertrophy. *J. Neurovirol.* 10, 244–249. <https://doi.org/10.1080/13550280490468663>
- Kiemer, L., Bendtsen, J.D., Blom, N., 2005. NetAcet: prediction of N-terminal acetylation sites. *Bioinformatics* 21, 1269–1270. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bti130>
- Knowles, W.A., 2006. Discovery and Epidemiology of die Human Polyomaviruses BK Virus (BKV) and JC Virus QCV, in: *Polyomaviruses and Human Diseases*. Springer, New York, pp. 19–45.
- Kwun, H.J., Shuda, M., Feng, H., Camacho, C.J., Moore, P.S., Chang, Y., 2013. Merkel Cell Polyomavirus Small T Antigen Controls Viral Replication and Oncoprotein Expression by Targeting the Cellular Ubiquitin Ligase SCFFbw7. *Cell Host Microbe* 14, 125–135. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2013.06.008>
- Lake, R.S., Barban, S., Salzman, N.P., 1973. Resolutions and identification of the core deoxynucleoproteins of the simian virus 40. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 54, 640–647. [https://doi.org/10.1016/0006-291X\(73\)91471-X](https://doi.org/10.1016/0006-291X(73)91471-X)
- Lednický, J.A., Butel, J.S., Luetke, M.C., Loeb, J.C., 2014. Complete genomic sequence of a new Human polyomavirus 9 strain with an altered noncoding control region. *Virus Genes* 49, 490–492. <https://doi.org/10.1007/s11262-014-1119-z>
- Li, P.P., Nakanishi, A., Clark, S.W., Kasamatsu, H., 2002. Formation of transitory intrachain and interchain disulfide bonds accompanies the folding and oligomerization of simian virus 40 Vp1 in the cytoplasm. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99, 1353–1358. <https://doi.org/10.1073/pnas.032668699>
- Liebl, D., Difato, F., Hornikova, L., Mannova, P., Stokrova, J., Forstova, J., 2006. Mouse Polyomavirus Enters Early Endosomes, Requires Their Acidic pH for Productive Infection, and Meets Transferrin Cargo in Rab11-Positive Endosomes. *J. Virol.* 80, 4610–4622. <https://doi.org/10.1128/JVI.80.9.4610-4622.2006>
- Liu, Q., Hobom, G., 1999. Recombinant Expression of Late Genes Agno-2a and Agno-2b of Avian Polyomavirus BFDV. *J. Virol.* 73, 183–187. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.1.183-187>
- Low, J.A., Magnuson, B., Tsai, B., Imperiale, M.J., 2006. Identification of Gangliosides GD1b and GT1b as Receptors for BK Virus. *J. Virol.* 80, 1361–1366. <https://doi.org/10.1128/JVI.80.3.1361-1366.2006>
- Madeira, F., Park, Y. mi, Lee, J., Buso, N., Gur, T., Madhusoodanan, N., Basutkar, P., Tivey, A.R.N., Potter, S.C., Finn, R.D., Lopez, R., 2019. The EMBL-EBI search and sequence analysis tools APIs in 2019. *Nucleic Acids Res.* 47, W636–W641. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz268>
- Merabova, N., Kaminski, R., Krynska, B., Amini, S., Khalili, K., Darbinyan, A., 2012. JCV agnoprotein-induced reduction in CXCL5/LIX secretion by oligodendrocytes is associated with activation of apoptotic signaling in neurons. *J. Cell. Physiol.* 227, 3119–3127. <https://doi.org/10.1002/jcp.23065>

- Merabova, N., Kaniowska, D., Kaminski, R., Deshmane, S.L., White, M.K., Amini, S., Darbinyan, A., Khalili, K., 2008. JC Virus Agnoprotein Inhibits In Vitro Differentiation of Oligodendrocytes and Promotes Apoptosis. *J. Virol.* 82, 1558–1569. <https://doi.org/10.1128/JVI.01680-07>
- Moens, U., Krumbholz, A., Ehlers, B., Zell, R., Johne, R., Calvignac-Spencer, S., Lauber, C., 2017. Biology, evolution, and medical importance of polyomaviruses: An update. *Infect. Genet. Evol.* 54, 18–38. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2017.06.011>
- Müller, H., Johne, R., 2001. Avian polyomavirus agnoprotein 1a is incorporated into the virus particle as a fourth structural protein, VP4. *J. Gen. Virol.* 82, 909–918. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-82-4-909>
- Nakanishi, A., Itoh, N., Li, P.P., Handa, H., Liddington, R.C., Kasamatsu, H., 2007. Minor Capsid Proteins of Simian Virus 40 Are Dispensable for Nucleocapsid Assembly and Cell Entry but Are Required for Nuclear Entry of the Viral Genome. *J. Virol.* 81, 3778–3785. <https://doi.org/10.1128/JVI.02664-06>
- National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine [online]. [cit. 14.7.2019]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>
- Neu, U., Hengel, H., Blaum, B.S., Schowalter, R.M., Macejak, D., Gilbert, M., Wakarchuk, W.W., Imamura, A., Ando, H., Kiso, M., Arnberg, N., Garcea, R.L., Peters, T., Buck, C.B., Stehle, T., 2012. Structures of Merkel Cell Polyomavirus VP1 Complexes Define a Sialic Acid Binding Site Required for Infection. *PLoS Pathog.* 8, e1002738. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002738>
- Niculescu, A.B., Chen, X., Smeets, M., Hengst, L., Prives, C., Reed, S.I., 1998. Effects of p21Cip1/Waf1 at Both the G1/S and the G2/M Cell Cycle Transitions: pRb Is a Critical Determinant in Blocking DNA Replication and in Preventing Endoreduplication. *MOL CELL BIOL* 18, 629–643. <https://doi.org/10.1128/mcb.18.1.629>
- Nomura, S., Houry, G., Jay, G., 1983. Subcellular Localization of the Simian Virus 40 Agnoprotein. *J VIROL* 45, 428–433.
- Norkin, L.C., Ouellette, J., 1976. Cell Killing by Simian Virus 40: Variation in the Pattern of Lysosomal Enzyme Release, Cellular Enzyme Release, and Cell Death During Productive Infection of Normal and Simian Virus 40-Transformed Simian Cell Lines. *J VIROL* 18, 48–57.
- Okada, Y., Endo, S., Takahashi, H., Sawa, H., Umemura, T., Nagashima, K., 2001. Distribution and function of JCV agnoprotein. *J. Neurovirol.* 7, 302–306. <https://doi.org/10.1080/13550280152537148>
- Okada, Y., Sawa, H., Endo, S., Orba, Y., Umemura, T., Nishihara, H., Stan, A.C., Tanaka, S., Takahashi, H., Nagashima, K., 2002. Expression of JC virus agnoprotein in progressive multifocal leukoencephalopathy brain. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 104, 130–136. <https://doi.org/10.1007/s00401-002-0526-8>
- Okada, Y., Suzuki, T., Sunden, Y., Orba, Y., Kose, S., Imamoto, N., Takahashi, H., Tanaka, S., Hall, W.W., Nagashima, K., Sawa, H., 2005. Dissociation of heterochromatin protein 1 from lamin B receptor induced by human polyomavirus agnoprotein: role in nuclear egress of viral particles. *EMBO Rep.* 6, 452–457. <https://doi.org/10.1038/sj.embor.7400406>
- Otlu, O., De Simone, F.I., Otalora, Y.-L., Khalili, K., Sariyer, I.K., 2014. The agnoprotein of polyomavirus JC is released by infected cells: Evidence for its cellular uptake by uninfected neighboring cells. *Virology* 88–95. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2014.07.054>
- Padgett, B.L., Walker, D.L., Zur Rhein, G.M., Eckroade, R.J., Dessel, B.H., 1971. Cultivation of papova-like virus from human brain with progressive multifocal leukoencephalopathy. *Lancet* 297, 1257–1260. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(71\)91777-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(71)91777-6)
- Panou, M.-M., Prescott, E., Hurdiss, D., Swinscoe, G., Hollinshead, M., Caller, L., Morgan, E., Carlisle, L., Müller, M., Antoni, M., Kealy, D., Ranson, N., Crump, C., Macdonald, A., 2018. Agnoprotein Is an Essential Egress Factor during BK Polyomavirus Infection. *Int. J. Mol. Sci.* 19, 16. <https://doi.org/10.3390/ijms19030902>
- Pho, M.T., Ashok, A., Atwood, W.J., 2000. JC Virus Enters Human Glial Cells by Clathrin-Dependent Receptor-Mediated Endocytosis. *J. Virol.* 74, 2288–2292. <https://doi.org/10.1128/JVI.74.5.2288-2292.2000>
- Prado, J.C.M., Monezi, T.A., Amorim, A.T., Lino, V., Paladino, A., Boccardo, E., 2018. Human polyomaviruses and cancer: an overview. *Clinics* 73. <https://doi.org/10.6061/clinics/2018/e558s>
- Radivojac, P., Vacic, V., Haynes, C., Cocklin, R.R., Mohan, A., Heyen, J.W., Goebel, M.G., Iakoucheva, L.M., 2010. Identification, analysis, and prediction of protein ubiquitination sites. *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* 78, 365–380. <https://doi.org/10.1002/prot.22555>
- Reddy, V.B., Thimmappaya, B., Dhar, R., Subramanian, K.N., Zain, S., Pan, J., Ghosh, P.K., Celma, M.L., Weissman, S.M., 1978. The Genome of Simian Virus 40. *Science* 260, 494–502. <https://doi.org/10.1126/science.205947>
- Rinaldo, C.H., Traavik, T., Hey, A., 1998. The Agnogene of the Human Polyomavirus BK Is Expressed. *J VIROL* 72, 6233–6236.

- Safak, M., Barrucco, R., Darbinyan, A., Okada, Y., Nagashima, K., Khalili, K., 2001. Interaction of JC Virus Agno Protein with T Antigen Modulates Transcription and Replication of the Viral Genome in Glial Cells. *J. Virol.* 75, 1476–1486. <https://doi.org/10.1128/JVI.75.3.1476-1486.2001>
- Safak, M., Sadowska, B., Barrucco, R., Khalili, K., 2002. Functional Interaction between JC Virus Late Regulatory Agnoprotein and Cellular Y-Box Binding Transcription Factor, YB-1. *J. Virol.* 76, 3828–3838. <https://doi.org/10.1128/JVI.76.8.3828-3838.2002>
- Saffer, J.D., Jackson, S.P., Thurston, S.J., 1990. SV40 stimulates expression of the trans-acting factor Spl at the mRNA level. *Genes Dev.* 4, 659–666. <https://doi.org/10.1101/gad.4.4.659>
- Saribas, A.S., Abou-Gharbia, M., Childers, W., Sariyer, I.K., White, M.K., Safak, M., 2013. Essential roles of Leu/Ile/Phe-rich domain of JC virus agnoprotein in dimer/oligomer formation, protein stability and splicing of viral transcripts. *Virology* 443, 161–176. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2013.05.003>
- Saribas, A.S., Arachea, B.T., White, M.K., Viola, R.E., Safak, M., 2011. Human polyomavirus JC small regulatory agnoprotein forms highly stable dimers and oligomers: Implications for their roles in agnoprotein function. *Virology* 420, 51–65. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2011.08.015>
- Saribas, A.S., Coric, P., Bouaziz, S., Safak, M., 2019. Expression of novel proteins by polyomaviruses and recent advances in the structural and functional features of agnoprotein of JC virus, BK virus, and simian virus 40. *J. Cell. Physiol.* 234, 8295–8315. <https://doi.org/10.1002/jcp.27715>
- Saribas, A.S., Coric, P., Hamzaspyan, A., Davis, W., Axman, R., White, M.K., Abou-Gharbia, M., Childers, W., Condra, J.H., Bouaziz, S., Safak, M., 2016. Emerging From the Unknown: Structural and Functional Features of Agnoprotein of Polyomaviruses: STRUCTURAL AND FUNCTIONAL FEATURES OF AGNOPROTEIN. *J. Cell. Physiol.* 231, 2115–2127. <https://doi.org/10.1002/jcp.25329>
- Saribas, A.S., White, M.K., Safak, M., 2018. Structure-based release analysis of the JC virus agnoprotein regions: A role for the hydrophilic surface of the major alpha helix domain in release. *J. Cell. Physiol.* 233, 2343–2359. <https://doi.org/10.1002/jcp.26106>
- Saribas, A.S., White, M.K., Safak, M., 2012. JC virus agnoprotein enhances large T antigen binding to the origin of viral DNA replication: Evidence for its involvement in viral DNA replication. *Virology* 433, 12–26. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2012.06.017>
- Sariyer, I.K., Akan, I., Palermo, V., Gordon, J., Khalili, K., Safak, M., 2006. Phosphorylation Mutants of JC Virus Agnoprotein Are Unable To Sustain the Viral Infection Cycle. *J. Virol.* 80, 3893–3903. <https://doi.org/10.1128/JVI.80.8.3893-3903.2006>
- Sariyer, I.K., Khalili, K., Safak, M., 2008. Dephosphorylation of JC virus agnoprotein by protein phosphatase 2A: Inhibition by small t antigen. *Virology* 375, 464–479. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2008.02.020>
- Sariyer, I.K., Saribas, A.S., White, M.K., Safak, M., 2011. Infection by agnoprotein-negative mutants of polyomavirus JC and SV40 results in the release of virions that are mostly deficient in DNA content. *Virol. J.* 8, 15. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-8-255>
- Saylor, D., Venkatesan, A., 2016. Progressive Multifocal Leukoencephalopathy in HIV-Uninfected Individuals. *Curr. Infect. Dis. Rep.* 18, 33. <https://doi.org/10.1007/s11908-016-0543-8>
- Schelhaas, M., Malmström, J., Pelkmans, L., Haugstetter, J., Ellgaard, L., Grunewald, K., Helenius, A., 2007. Simian Virus 40 Depends on ER Protein Folding and Quality Control Factors for Entry into Host Cells. *Cell* 131, 516–529. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.09.038>
- Schowalter, R.M., Buck, C.B., 2013. The Merkel Cell Polyomavirus Minor Capsid Protein. *PLoS Pathog.* 9, e1003558. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003558>
- Shao, J., Xu, D., Tsai, S.-N., Wang, Y., Ngai, S.-M., 2009. Computational Identification of Protein Methylation Sites through Bi-Profile Bayes Feature Extraction. *PLoS ONE* 4, e4920. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0004920>
- Shishido-Hara, Y., Hara, Y., Larson, T., Yasui, K., Nagashima, K., Stoner, G.L., 2000. Analysis of Capsid Formation of Human Polyomavirus JC (Tokyo-1 Strain) by a Eukaryotic Expression System: Splicing of Late RNAs, Translation and Nuclear Transport of Major Capsid Protein VP1, and Capsid Assembly. *J. Virol.* 74, 1840–1853. <https://doi.org/10.1128/JVI.74.4.1840-1853.2000>
- Skoczylas, C., Henglein, B., Rundell, K., 2005. PP2A-dependent transactivation of the cyclin A promoter by SV40 ST is mediated by a cell cycle-regulated E2F site. *Virology* 332, 596–601. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2004.12.017>
- Soldatova, I., Prilepskaja, T., Abrahamyan, L., Forstová, J., Huérfano, S., 2018. Interaction of the Mouse Polyomavirus Capsid Proteins with Importins Is Required for Efficient Import of Viral DNA into the Cell Nucleus. *Viruses* 10, 165. <https://doi.org/10.3390/v10040165>
- Stevens, H., Bertelsen, M.F., Sijmons, S., Van Ranst, M., Maes, P., 2013. Characterization of a Novel Polyomavirus Isolated from a Fibroma on the Trunk of an African Elephant (*Loxodonta africana*). *PLoS ONE* 8, e77884. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0077884>

- Stewart, S.E., Eddy, B.E., Gochenour, A.M., Borgese, N.G., Grubbs, G.E., 1957. The induction of neoplasms with a substance released from mouse tumors by tissue culture. *Virology* 3, 380–400. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(57\)90100-9](https://doi.org/10.1016/0042-6822(57)90100-9)
- Stroh, L.J., Neu, U., Blaum, B.S., Buch, M.H.C., Garcea, R.L., Stehle, T., 2014. Structure Analysis of the Major Capsid Proteins of Human Polyomaviruses 6 and 7 Reveals an Obstructed Sialic Acid Binding Site. *J. Virol.* 88, 10831–10839. <https://doi.org/10.1128/JVI.01084-14>
- Sturm, R., Baumruker, T., Franza Jr., B.R., Herr, W., 1987. A 100-kD HeLa cell octamer binding protein (OBPI00) interacts differently with two separate octamer-related sequences within the SV40 enhancer. *Genes Dev.* 1, 1147–1160. <https://doi.org/10.1101/gad.1.10.1147>
- Suzuki, T., Okada, Y., Semba, S., Orba, Y., Yamanouchi, S., Endo, S., Tanaka, S., Fujita, T., Kuroda, S., Nagashima, K., Sawa, H., 2005. Identification of FEZ1 as a Protein That Interacts with JC Virus Agnoprotein and Microtubules: ROLE OF AGNOPROTEIN-INDUCED DISSOCIATION OF FEZ1 FROM MICROTUBULES IN VIRAL PROPAGATION. *J. Biol. Chem.* 280, 24948–24956. <https://doi.org/10.1074/jbc.M411499200>
- Suzuki, T., Orba, Y., Makino, Y., Okada, Y., Sunden, Y., Hasegawa, H., Hall, W.W., Sawa, H., 2013. Viroporin activity of the JC polyomavirus is regulated by interactions with the adaptor protein complex 3. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 110, 18668–18673. <https://doi.org/10.1073/pnas.1311457110>
- Suzuki, T., Orba, Y., Okada, Y., Sunden, Y., Kimura, T., Tanaka, S., Nagashima, K., Hall, W.W., Sawa, H., 2010. The Human Polyoma JC Virus Agnoprotein Acts as a Viroporin. *PLoS Pathog.* 6, e1000801. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000801>
- Suzuki, T., Semba, S., Sunden, Y., Orba, Y., Kobayashi, S., Nagashima, K., Kimura, T., Hasegawa, H., Sawa, H., 2012. Role of JC virus agnoprotein in virion formation. *Microbiol. Immunol.* 56, 639–646. <https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.2012.00484.x>
- Sweet, B.H., Hilleman, M.R., 1960. The Vacuolating Virus, S.V.40. *Exp. Biol. Med.* 105, 420–427. <https://doi.org/10.3181/00379727-105-26128>
- Tsai, B., Gilbert, J.M., Stehle, T., Lencer, W., Benjamin, T.L., Rapoport, T.A., 2003. Gangliosides are receptors for murine polyoma virus and SV40. *EMBO J.* 22, 4346–4355. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdg439>
- Unterstab, G., Gosert, R., Leuenberger, D., Lorentz, P., Rinaldo, C.H., Hirsch, H.H., 2010. The polyomavirus BK agnoprotein co-localizes with lipid droplets. *Virology* 399, 322–331. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2010.01.011>
- Valle, M., Chen, X.S., Donate, L.E., Fanning, E., Carazo, J.M., 2006. Structural Basis for the Cooperative Assembly of Large T Antigen on the Origin of Replication. *J. Mol. Biol.* 357, 1295–1305. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2006.01.021>
- van der Meijden, E., Dargel, C.A., van Vuren, N., Hensbergen, P.J., Feltkamp, M.C.W., 2015. Characterization of T Antigens, Including Middle T and Alternative T, Expressed by the Human Polyomavirus Associated with Trichodysplasia Spinulosa. *J. Virol.* 89, 9427–9439. <https://doi.org/10.1128/JVI.00911-15>
- van der Meijden, E., Janssens, R.W.A., Lauber, C., Bouwes Bavinck, J.N., Gorbalenya, A.E., Feltkamp, M.C.W., 2010. Discovery of a New Human Polyomavirus Associated with Trichodysplasia Spinulosa in an Immunocompromized Patient. *PLoS Pathog.* 6, e1001024. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1001024>
- Waga, S., Bauer, G., Stillman, B., 1994. Reconstitution of Complete SV40 DNA Replication with Purified Replication Factors. *J. Biol. Chem.* 269, 10923–10934.
- Walker, J.R., Corpina, R.A., Goldberg, J., 2001. Structure of the Ku heterodimer bound to DNA and its implications for double-strand break repair. *Nature* 412, 607–614. <https://doi.org/10.1038/35088000>
- Wollebo, H.S., White, M.K., Gordon, J., Berger, J.R., Khalili, K., 2015. Persistence and pathogenesis of the neurotropic polyomavirus JC: JC Virus. *Ann. Neurol.* 77, 560–570. <https://doi.org/10.1002/ana.24371>
- Xue, Y., Zhou, F., Fu, C., Xu, Y., Yao, X., 2006. SUMOsp: a web server for sumoylation site prediction. *Nucleic Acids Res.* 34, W254–W257. <https://doi.org/10.1093/nar/gkl207>