

**Univerzita Karlova**  
**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Molekulární biologie a biochemie organismů



**Eva Lemberková**

Interakce virů s buněčnými mechanismy oprav poškozené DNA  
Virus interaction with the cellular DNA damage response

Bakalářská práce

Školitel: Mgr. Vojtěch Šroller, Ph.D.

Praha, 2024

Tato práce vznikla za podpory projektu Národní institut virologie a bakteriologie (Program EXCELES, ID: LX22NPO5103), financovaného Evropskou Unií – Next Generation EU.

**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, 28.4.2024

Eva Lemberková

**Poděkování:**

Ráda bych poděkovala vedoucímu své bakalářské práce panu Mgr. Vojtěchu Šrollerovi, Ph.D. za konzultace, přínosné rady a všechen čas, který mi při přípravě práce věnoval.

## Abstrakt

Pro každou buňku je zásadní zachovávat si integritu své genomové DNA. Integrita genomu je narušována vnějšími a vnitřními vlivy, které působí na buňku a poškozují její genetickou informaci. Porušení struktury nebo sekvence DNA pak zásadně ovlivňují vznikající proteiny nebo správnou segregaci chromozomů do dceřiných buněk, proto je pro buňku důležité je co nejefektivněji opravovat. Existuje mnoho mechanismů oprav DNA pro různé typy poškození. Tato práce se zaměřuje na eukaryotický MRN komplex, který je významný pro detekci a opravu dvouvláknových zlomů DNA.

Mnoho čeledí virů se snaží o blokování těchto opravných mechanismů, protože jsou často v buňce aktivovány bezprostředně po infekci virem. Důvodem může být například dvouvláknový DNA genom některých virů připomínající hostitelskou DNA obsahující dvouvláknové zlomy. Buňka tedy zahájením opravných mechanismů virové DNA mnohdy inhibuje životní cyklus viru. Některé viry ale naopak využívají interakcí s jednotlivými komponentami opravných systémů ve vlastní replikaci, a přítomnost těchto proteinů je proto nezbytná k jejich rozmnožení.

**Klíčová slova:** odpověď na poškození DNA, homologní rekombinace, nehomologní spojování konců, MRN komplex, *Adenoviridae*, *Papillomaviridae*, *Herpesviridae*

## Abstract

Maintenance of genomic integrity is an essential mechanism for every cell. Genomic integrity is disturbed by diverse exogenous or endogenous effects influencing the cell and causing damage of its DNA. Cellular mechanisms capable of fixing these disturbances in structure or sequence are indispensable because damaged genetic information can later cause expression of damaged proteins or inaccurate segregation of chromosomes to daughter cells. Therefore, many effective mechanisms for fixing wide range of types of DNA damage have evolved. This thesis focuses mainly on the eucaryotic MRN complex, which plays an important role in detection and repair of double strand breaks.

Many viral families try to block these cellular repair mechanisms because they are activated soon after viral infection. One of the reasons for their activation is the resemblance of some viral genomes to the cellular DNA with double strand breaks. Thus, in many cases, the cell ends up inhibiting the life cycle of the virus by attempting to repair viral genomes. However, there are viruses that use cellular repair mechanisms for the replication of their genome, making these mechanisms essential for their own growth.

**Key words:** DNA damage response, homologous recombination, non-homologous end-joining, MRN complex, *Adenoviridae*, *Papillomaviridae*, *Herpesviridae*

## Seznam použitých zkratek

53BP1	p53-binding protein 1	p53-vazebný protein 1
AdV	<i>Adenoviridae</i>	<i>Adenoviridae</i>
AdV Pol	polymerase of family <i>Adenoviridae</i>	polymeráza virů z čeledi <i>Adenoviridae</i>
APL	acute promyelocytic leukemia	akutní promyelocytická leukemie
ATM kinase	ataxia-telangiectasia mutated kinase	kináza asociovaná s onemocněním ataxia telangiectasia
ATR kinase	ataxia-telangiectasia mutated and Rad-3-related kinase	kináza asociovaná s onemocněním ataxia telangiectasia a příbuzná Rad-3
ATRIP	ATR-interacting protein	protein interagující s ATR
BARD1	BRCA1-associated RING domain 1	RING doména 1 asociovaná s BRCA1
BIR	break-induced replication	zlomem indukovaná replikace
BLM	Bloom syndrome	Bloomův syndrom
BRCA1/2	breast cancer associated 1/2	gen 1/2 asociovaný s rakovinou prsu
BRCT	BRCA1 C-terminal domain	C-terminální doména proteinu BRCA1
CARD9	caspase recruitment domain-containing protein 9	protein 9 obsahující doménu interagující s kaspázou
cGAMP	cyclic GMP-AMP	cyklické GMP-AMP
cGAS	cyclic GMP-AMP synthase	syntáza cyklického GMP-AMP
CDKs	cyclin dependent kinases	cyklin dependentní kinázy
CHK1/2	checkpoint kinase 1/2	checkpoint kináza 1/2
CTBP	C-terminal binding protein	C-terminální vazebný protein
CTIP	CTBP-interacting protein	protein interagující s CTBP
DBD	DNA-binding domain	DNA-vazebná doména
DBP	DNA-binding protein	DNA-vazebný protein
D-loop	displacement loop	D-smyčka
DNA2	DNA replication helicase/nuclease 2	replikační DNA helikáza/nukleáza 2
DNA-PK	DNA-dependent protein kinase	DNA-dependentní protein kináza
DNA-PKcs	catalytic subunit of DNA-PK	katalytická subjednotka DNA-PK
DSBs	double-strand breaks	dvouvláknové zlomy

dsDNA	double-strand DNA	dvouvláknová DNA
EBV	Epstein-Barr virus	virus Epstein-Barrové
EXO1	exonuclease 1	exonukleáza 1
FHA	fork-head-associated domain	doména rozeznávající fosforylované motivy na signálních proteinech
HHV	human herpesvirus	lidský herpesvirus
HPV	human papillomavirus	lidský papilomavirus
HR	homologous recombination	homologní rekombinace
HSV-1	herpes simplex virus 1	virus herpes simplex 1
IR	ionizing radiation	ionizující záření
KSHV	Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus	herpesvirus Kaposiho sarkomu
MDC1	mediator of DNA damage checkpoint protein 1	mediátor checkpointu poškození DNA 1
MDM2	mouse double minute 2 homolog	ubiquitin ligáza proteinu p53
MHC I/II	major histocompatibility complex I/II	hlavní histokompatibilní komplex I/II
MMEJ	microhomology-mediated end-joining	mikrohomologií zprostředkované spojování konců
MRE11	meiotic recombination 11	meiotická rekombinace 11
MRN	MRE11-RAD50-NBS1	MRE11-RAD50-NBS1
NBS	Nijmegen breakage syndrome	Nijmegen breakage syndrom
ND10	nuclear domains 10	jaderná doména 10
NF- $\kappa$ B	nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells	jaderný transkripční faktor regulující imunitní odpověď
NHEJ	non-homologous end-joining	nehomologní spojování konců
ORF	open reading frame	otevřený čtecí rámeček
LANA	latency associated nuclear antigen	jaderný antigen asociovaný s latencí
PALB2	partner and localizer of BRCA2	kolokalizační partner proteinu BRCA2
PAXX	paralogue of XRCC4 and XLF	paralog XRCC4 a XLF
PIKKs	phosphatidylinositol-3-OH-kinase-like kinases	kinázy příbuzné fosfatidylinositol-3-OH kinázám
PML NBs	PML nuclear bodies	PML jaderná tělíčka

PML protein	promyelocytic leukemia protein	promyelocytický leukemický protein
PODs	PML oncogenic domains	PML onkogenní domény
pRB	retinoblastoma protein	retinoblastomový protein
pTP	terminal protein precursor	prekurzor terminálního proteinu
RAP80	receptor-associated protein 80	protein 80 asociovaný s receptorem
RAR $\alpha$	retinoic acid receptor $\alpha$	receptor $\alpha$ kyseliny retinové
RING finger	really interesting new gene	doména nacházející se u ubiquitin ligáz
RINT1	RAD50-interacting protein 1	protein 1 interagující s RAD50
RNF168	RING finger protein 168	protein 168 obsahující RING finger doménu
RNF8	RING finger protein 8	protein 8 obsahující RING finger doménu
ROS	reactive oxygen species	reaktivní kyslíkové radikály
RPA	replication protein A	replikační protein A
SDSA	synthesis-dependent strand annealing	nasedání vlákna závislé na syntéze
SMC	structural maintenance of chromosome	udržování struktury chromozomu
ssDNA	single-strand DNA	jednovláknová DNA
STING	stimulator of interferon genes	stimulátor interferonových genů
TP	terminal protein	terminální protein
t-SNARE	target-SNAP receptor	cílový SNAP receptor
U <sub>L</sub>	long unique sequences	dlouhé jedinečné sekvence
U <sub>s</sub>	short unique sequences	krátké jedinečné sekvence
UV	ultraviolet	ultrafialové
VZV	varicella-zoster virus	virus varicella-zoster
XLF	XRCC4-like factor	faktor příbuzný XRCC4
XRCC4	X-ray repair cross-complementing protein 4	protein 4 účastnící se oprav poškozené DNA pomocí NHEJ
ZW10	Zeste-White 10	Zeste-White 10

## Obsah

1	Úvod.....	1
1.1	Cíl práce .....	1
2	Příčiny vzniku DSBs.....	2
3	Mechanismus DDR.....	2
3.1	Rozeznání DSBs .....	2
3.2	MRN komplex .....	3
3.2.1	Struktura MRN komplexu.....	3
3.3	Signalizační kaskáda DDR.....	5
4	Mechanismy oprav DSBs .....	8
4.1	Nehomologní spojování konců.....	8
4.2	Homologní rekombinace .....	9
5	Interakce virů s buněčnými mechanismy oprav DNA.....	12
5.1	<i>Adenoviridae</i> .....	12
5.1.1	Interakce adenovirů s proteiny DDR .....	12
5.1.1.1	Role proteinu E4 ORF3 .....	13
5.1.1.2	Role proteinu E4 ORF6 .....	14
5.2	<i>Papillomaviridae</i> .....	16
5.2.1	Interakce papilomavirů s proteiny DDR.....	16
5.2.2	Funkce komponent MRN komplexu při papilomavirové infekci .....	18
5.3	<i>Herpesviridae</i> .....	20
5.3.1	Interakce herpesvirů s proteiny DDR.....	20
5.3.1.1	Virus herpes simplex (HSV).....	21
5.3.1.2	Virus Epstein-Barrové (EBV) .....	22
5.3.1.3	Virus Kaposiho sarkomu (KSHV).....	22
6	Závěr .....	24
7	Seznam použité literatury.....	25



# 1 Úvod

Odpověď na poškození DNA (DNA damage response, DDR) je esenciální součástí buněčných signálních drah udržujících integritu vlastního genomu. Existuje mnoho typů poškození DNA včetně chemických modifikací bází nebo vzniku jednovláknových a dvouvláknových zlomů v pentózofofosátové kostře. Ačkoli všechny tyto defekty vznikají poměrně běžně, nejvíce ohrožujícími jsou pro buňku dvouvláknové zlomy, protože mimo jiné postrádají druhé nepoškozené vlákno jako předlohu pro svoji opravu. Jejich neopravení může mít závažné následky při replikaci genomu a přenosu chybné genetické informace do dceřiné buňky. Zabránění šíření poškozené DNA do dalších generací zajišťuje buňka signalizací pozastavení buněčného cyklu za účelem získání požadovaného času na zprostředkování oprav. V případě, že jsou poškození příliš rozsáhlá a nelze je opravit, je nevyhnutelně indukována programovaná buněčná smrt.

Genomy virů replikujících se v jádře často buňce nutně připomínají vlastní poškozenou DNA, a v návaznosti na to jsou aktivovány buněčné opravné mechanismy indukující některý z kontrolních bodů buněčného cyklu nebo apoptózu. Pro virovou replikaci má ale pozastavení buněčného cyklu většinou negativní efekt, protože viry v mnoha případech využívají buněčné faktory produkované pouze v S fázi. Různé DNA viry si tak vyvinuly mnoho mechanismů, jak těmto buněčným signalizacím zabraňovat nebo je využívat ve vlastní prospěch. Deregulace opravných mechanismů pomocí virové infekce často zvyšuje riziko nádorové transformace buněk. Porozumění virovým strategiím způsobujícím tuto deregulaci tak má potenciál pro efektivnější vývoj specifických antivirotik nebo protirakovinných léčiv.

I přesto, že s hostitelskou opravnou odpovědí interagují pravděpodobně téměř všechny virové čeledi, tato bakalářská práce se zaměřuje pouze na tři vybrané čeledi DNA virů – *Adenoviridae*, *Papillomaviridae* a *Herpesviridae*. Jelikož je téma a množství proteinových interakcí i tak opravdu rozsáhlé, práce obecněji shrnuje virové regulace hostitelské odpovědi na poškození DNA a poté se konkrétněji zaměřuje pouze na několik vybraných interakcí týkajících se asociace s komponentami MRN komplexu a jeho využití při virové replikaci.

## 1.1 Cíl práce

Cílem práce je porozumět mechanismům oprav dvouvláknových zlomů DNA u eukaryotické buňky a získané poznatky pak využít při popisu interakcí virových proteinů s hostitelskou kaskádou odpovědi na poškození DNA. V práci budou mimo jiné také porovnány rozdílné strategie virů z již zmiňovaných čeledí při interakci s opravnými mechanismy.

## 2 Příčiny vzniku DSBs

Dvouvláknové zlomy DNA (double-strand breaks, DSBs) mohou být způsobeny mnoha vnitřními i vnějšími vlivy. Endogenní příčiny často vznikají jako vedlejší produkt přirozených buněčných procesů, a proto není možné se jim nijak vyvarovat. Mezi tyto příčiny patří například poškození reaktivními kyslíkovými radikály (reactive oxygen species, ROS), které jsou produkovány v buňce převážně v mitochondriích při neefektivní oxidativní fosforylaci (shrnutí v Jackson and Bartek, 2009). U některých typů buněk mohou kyslíkové radikály také aktivovat enzymy, které mají nukleázovou aktivitu a štěpí oba řetězce (Ueda and Shah, 1992). DSBs také mohou být způsobeny zaseknutými replikačními vidlicemi při replikaci genomu. Existují ale i případy, kdy dvouvláknové zlomy v buňce vznikají fyziologicky, a to například při VDJ rekombinaci při maturaci imunitních buněk, při meióze anebo působením topoizomeráz typu II (Van Gent *et al.*, 1995; Usui *et al.*, 1998; Hoa *et al.*, 2016).

Exogenně dvouřetězcové zlomy způsobuje převážně ionizující záření (ionizing radiation, IR). Nejčastěji je působí nepřímo, protože jeho vlivem vznikají ROS, které poté poškozují pentózo-fosfátovou kostru DNA (shrnutí v Reginato and Cejka, 2020). Dalším důležitým faktorem pro vznik DSBs mohou být různé karcinogenní chemikálie (Zhou *et al.*, 2006).

## 3 Mechanismus DDR

Eukaryotní buňka reaguje na poškození DNA různými způsoby. Prioritou je zastavit buněčný cyklus, aby nedošlo k šíření poškozené genetické informace do dalších generací, proto je neporušenost genomu kontrolována v kontrolních bodech cyklu před každou replikací a dělením.

Dále je potřeba signalizovat změnu transkripce, aby byl transkribován dostatek proteinů, které jsou součástí opravných komplexů a následně jsou aktivovány samotné opravné mechanismy. Pokud jsou poškození příliš rozsáhlá, je buňka nucena signalizovat programovanou buněčnou smrt (shrnutí v Bian *et al.*, 2019).

### 3.1 Rozeznání DSBs

Rychlé rozpoznání DSBs je důležité proto, aby se zamezilo separaci dvou částí původního chromozomu. Rozpoznávání zajišťují u různých mechanismů oprav různé proteiny. Při mechanismu nehomologního spojování konců (non-homologous end-joining, NHEJ) zprostředkovává rozpoznání zlomů heterodimer proteinů KU70/80 a u homologní rekombinace (homologous recombination, HR) je to převážně MRN komplex (Usui *et al.*, 1998; Walker, Corpina and Goldberg, 2001).

## 3.2 MRN komplex

MRN (MRE11-RAD50-NBS1) komplex u savců má v DDR mnoho funkcí a skládá se z velmi různorodých proteinů (Usui *et al.*, 1998). Je tedy hlavním senzorem dvouvláknových zlomů DNA při homologní rekombinaci, dále zastává funkci flexibilní kostry, která přidrží konce DNA u sebe, dokud nejsou opraveny a v neposlední řadě také signalizuje informaci o poškození dalším proteinům účastnících se opravných mechanismů (De Jager *et al.*, 2001; Williams *et al.*, 2008).

Po vazbě na DNA indukuje MRN komplex relokizaci ostatních proteinů, které jsou součástí opravných mechanismů, do místa poškození. Místa na chromozomu, kde se tyto proteiny shromažďují, se označují jako jaderná ohniska a lze je detekovat například díky fosforylovanému histonu H2AX (Paull *et al.*, 2000; Olive, 2004).

### 3.2.1 Struktura MRN komplexu

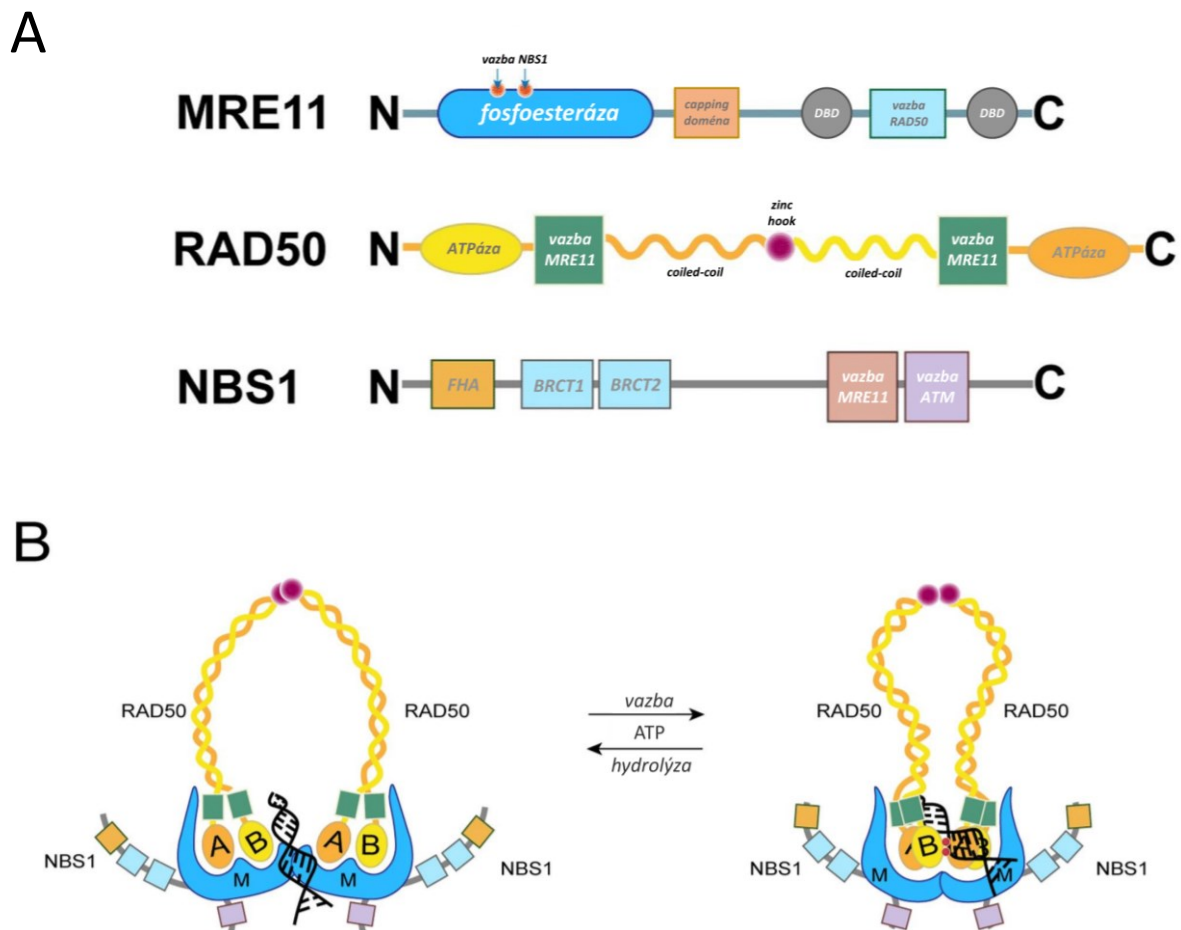
MRN komplex se v buňkách vyskytuje v podobě dimeru třech proteinů MRE11, RAD50 a NBS1 (shrnutí v Bian *et al.*, 2019). Struktura tohoto komplexu a významné domény, které se nacházejí v jednotlivých proteinech, jsou zobrazeny na *obrázku 1*. Prvním proteinem MRN komplexu je nukleáza MRE11, která obsahuje na svém C konci dvě DNA vazebné domény, jimiž interaguje s oboustranným zlomem DNA. Pro toto navázání na chromatin je nezbytná jeho dimerizace (Williams *et al.*, 2008). MRE11 je také prostředníkem pro vazbu ostatních proteinů RAD50 a NBS1, které spolu přímo neinteragují (shrnutí v Bian *et al.*, 2019).

Interakce MRE11 s dalším členem komplexu RAD50 je konzervována ve všech třech doménách života, což značí, že je velice důležitá (Möckel *et al.*, 2012). Vazba ATP na RAD50 totiž ovlivňuje například nukleázovou aktivitu MRE11 a také zprostředkovává lokální rozpletení dsDNA (Cannon *et al.*, 2013). Nukleázová aktivita MRE11 je esenciální při úpravě konců DNA ve zlomu při zahájení homologní rekombinace, kdy je potřeba, aby vznikl 3' přesahující konec. MRE11 má současně exonukleázovou i endonukleázovou aktivitu, ale jeho 3' – 5' exonukleázová aktivita u dsDNA je kontrolována právě vazbou ATP na RAD50 (Hopfner *et al.*, 2001).

RAD50 je tedy dalším a největším členem komplexu. Je homologický k proteinům z rodiny SMC (structural maintenance chromosome), kam patří například i kohesiny a kondensiny (Neuwald and Hirano, 2000; Haering *et al.*, 2002). Společná funkce těchto proteinů je zajišťovat změny struktury a dynamiky chromatinu. Proteiny z této rodiny dimerizují a obsahují ATPázovou doménu příbuznou ABC transportérům (Neuwald and Hirano, 2000). Jak už bylo zmíněno, RAD50 je schopný díky aktivitě ATPázové domény ovlivňovat endonukleázovou aktivitu MRE11 a také měnit jeho konformaci (Liu *et al.*, 2016). Ovlivnění aktivity MRE11 pomocí RAD50 je též zobrazeno na *obrázku 1*. Jednou z nejdůležitějších funkcí RAD50 je ale přidržení sesterské

chromatidy pomocí jeho strukturního motivu „zinc-hook“ v blízkosti opravovaného vlákna DNA při homologní rekombinaci (Hopfner *et al.*, 2002).

Posledním členem komplexu je dimer proteinů NBS1. Gen pro NBS1 je významný i tím, že jeho mutace byla identifikována u pacientů s Nijmegen breakage syndromem (NBS), což je vzácné genetické autozomálně recesivní onemocnění (Varon *et al.*, 1998). Obsahuje důležitou FHA a dvě BRCT domény, obě vázající specifický fosforylovaný motiv, který obsahují převážně proteiny opravných mechanismů fosforylované ATM a ATR kinázami (viz kapitola 3.3). Jednou z jeho nejpodstatnějších funkcí je tedy zprostředkovat interakce s těmito proteiny. Mutace ve zmíněných doménách nejčastěji způsobují příznaky onemocnění NBS, protože blokují důležité interakce a navazující signální dráhy (Zhao, Renthal and Lee, 2002; Manke *et al.*, 2003; Lloyd *et al.*, 2009).



*Obrázek 1: Struktura MRN komplexu*

**A:** Důležité strukturní motivy proteinů MRN komplexu. Nukleázovou aktivitu MRE11 zajišťuje fosfoesterázová doména schopná štěpení řetězce DNA. MRE11 zprostředkovává vazbu obou dalších proteinů komplexu, proto obsahuje domény vázající NBS1 a RAD50. Rad50 obsahuje dvě ATP-vazebné domény a flexibilní „zinc-hook“ motiv umožňující vznik „coiled-coil“ dimeru N-koncové a C-koncové části. (DBD: DNA binding domain, FHA: fork-head associated domain, BRCT: breast cancer associated domain). **B:** Model dimeru MRN komplexu vázajícího se na DNA. Hydrolyzou ATP pomocí RAD50 se MRN komplex dostává do otevřené konformace, kdy je odhalena fosfoesterázová doména MRE11. Převzato a upraveno z Bian *et al.*, 2019.

### 3.3 Signalizační kaskáda DDR

Další signální dráhy DDR jsou zprostředkované převážně fosforylačními kaskádami, jejichž součástí jsou ataxia-telangiectasia mutated kináza (ATM), ataxia-telangiectasia and Rad-3-related kináza (ATR) nebo DNA-dependentní protein kináza (DNA-PK) z rodiny phosphatidylinositol-3-OH-kinase-like kináz (PIKKs), které sdílí na C konci katalytickou kinázovou doménu (shrnutí v Xu, Bradley and He, 2023). Signalizace všemi jmenovanými kinázami vede různými způsoby k inhibici aktivity cyklin-dependentních kináz (CDKs). Nejčastěji je tato inhibice zprostředkována pomocí transkripčního faktoru p53 a vede k pozastavení progresu v buněčném cyklu, anebo přímo k aktivaci některého z kontrolních bodů (G1/S, intra-S nebo G2/M) (shrnutí v Jackson and Bartek, 2009).

Kinázy z rodiny PIKKs mají částečně překrývající se funkce, ale při signalizaci odpovědi na dvouvláknové zlomy DNA jsou nejpodstatnější ATM kináza společně s DNA-PK (Gatei *et al.*, 2001). ATR kináza je narozdíl od nich důležitá u více druhů poškození DNA. Nejvýznamnější roli hraje při překonávání zaseknutých replikačních vidlic nebo při zlomech způsobených UV zářením (Brown and Baltimore, 2000; Hanasoge and Ljungman, 2007). Pro její aktivaci je potřeba jednovláknový úsek DNA obalený RPA proteinem v blízkosti zlomu, na který se váže ATR-interagující protein (ATRIP) společně s ATR kinázou. Hlavním cílem pro fosforylaci pomocí ATR kinázy je checkpoint kináza 1 (CHK1) nebo faktor p53 zajišťující inhibici cyklin dependentních kináz indukci některého z kontrolních bodů buněčného cyklu (Tibbetts *et al.*, 1999; Xiao *et al.*, 2003; Zou and Elledge, 2003). DNA-PK pak působí nejvýrazněji při mechanismu oprav pomocí nehomologního spojování konců (Goodarzi *et al.*, 2006).

ATM kináza se v inaktivním stavu může vyskytovat jako dimer nebo multimer. V návaznosti na detekci zlomu DNA MRN komplexem autofosforyluje dimer ATM kinázy svoji doménu, kterou protomery asociují, a tím disociují na jednotlivé aktivní monomery (Bakkenist and Kastan, 2003; Lee and Paull, 2004). Jiný způsob její aktivace může být ale zprostředkován i v nezávislosti na MRN komplexu. Lze ji totiž aktivovat přímo vlivy indukujícími vznik DSBs, například oxidativním stresem. Oxidativní podmínky způsobují drobnou rotaci subjednotek dimeru ATM kinázy vůči sobě, což umožní vznik disulfidického můstku. Takto aktivovaný dimer je též schopný fosforylace některých faktorů DDR jako například proteinu p53 (Howes, Perisic and Williams, 2023).

Aktivovaná ATM kináza je schopna fosforylace mnoha různých substrátů. Jejím hlavním substrátem pro fosforylaci je checkpoint kináza 2 (CHK2), kterou fosforylací aktivuje a tím se může prostřednictvím regulace dalších proteinů podílet na inhibici buněčného cyklu (Ahn *et al.*, 2000; Matsuoka *et al.*, 2000; shrnutí v Zhou and Elledge, 2000). V neposlední řadě fosforyluje ATM také členy MRN komplexu, jejichž fosforylace může regulovat například jejich enzymatickou

aktivitu, nebo ovlivňovat další signalizaci v reakci na poškození DNA (Zhao *et al.*, 2000; Gatei *et al.*, 2011; Kijas *et al.*, 2015).

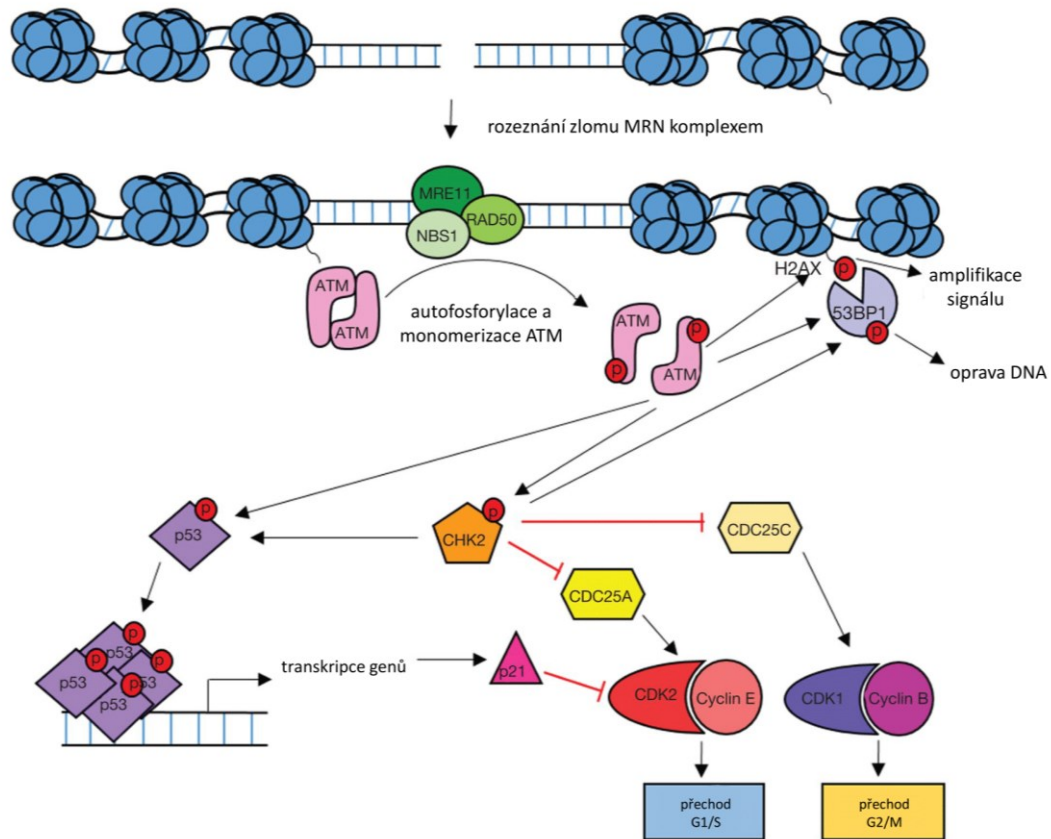
V těsném okolí DSBs značí ATM kináza fosfátem histon H2AX (jedna z forem histonu H2A), který je součástí nukleozomů na chromatinu. Fosforylovaná forma tohoto histonu se nazývá  $\gamma$ -H2AX (Rogakou *et al.*, 1998; Bakkenist and Kastan, 2003). Takto modifikovaný histon může být důležitý pro vazbu dalších proteinů účastnících se oprav DNA nebo navazující signalizace. Tím, že proteiny DDR rozeznávají pouze úsek DNA obsahující histon  $\gamma$ -H2AX, lze efektivně upřesnit lokalizaci DSBs na chromatinu. Mezi tyto proteiny rozeznávající fosfátem značený chromatin patří například MDC1 (Stucki *et al.*, 2005).

Po označení blízkého okolí zlomu DNA fosfátem následuje navázání zmíněného proteinu MDC1 na histon  $\gamma$ -H2AX. Tato interakce je důležitá pro přesun dalších signálních proteinů DDR do místa poškození a také ke zpomalení defosforylace histonu  $\gamma$ -H2AX (Stucki *et al.*, 2005). Po fosforylaci MDC1 pomocí ATM kinázy se na něj váže ubiquitin ligáza RNF8, která zavěšuje ubiquitin na  $\gamma$ -H2AX. Ubiquitinylovaný histon zprostředkovává interakci s další ubiquitin ligázou RNF168 a s proteiny 53BP1 a RAP80. RAP80 pak umožňuje asociaci s důležitým regulátorem BRCA1 (Huen *et al.*, 2007; Kolas *et al.*, 2007; Doil *et al.*, 2009).

Gen pro BRCA1 kóduje významný tumor supresor, který je mutovaný až u 50 % pacientů s dědičnou rakovinou prsu (Couch *et al.*, 1997; Ford *et al.*, 1998). Doména na jeho N konci vykazuje E3 ubiquitin ligázovou aktivitu (Hashizume *et al.*, 2001). BRCA1 je spojen s iniciací všech kontrolních bodů v buněčném cyklu. Při iniciaci checkpointu G1/S například funguje fosforylovaná forma BRCA1 v komplexu společně s proteinem BARD1. Tento komplex slouží jako scaffold protein pro zprostředkování fosforylace faktoru p53 pomocí ATM kinázy. Fosforylovaný protein p53 může pak další signalizací kontrolní bod G1/S indukovat (Fabbro *et al.*, 2004; shrnuto v Wu, Lu and Yu, 2010).

Jedním z dalších důležitých cílů pro fosforylaci pomocí ATM kinázy je tedy již zmíněný protein p53 působící také jako významný tumor supresor. Jeho funkce spočívá v kontrole progresu do dalších fází buněčného cyklu a při větším poškození DNA může indukovat i apoptózu (Canman *et al.*, 1998; shrnuto v Smith *et al.*, 2020). V neaktivním stavu interaguje s proteinem MDM2, který inhibuje jeho aktivitu tím, že funguje jako E3 ubiquitin ligáza a připojováním polyubiquitinových řetězců na p53 ho směřuje k degradaci v proteazomu (Finlay, 1993; Haupt *et al.*, 1997; Honda, Tanaka and Yasuda, 1997; Mayo, Turchi and Berberich, 1997). Při poškození DNA jsou ale oba tyto proteiny fosforylovány kinázami z rodiny PIKKs, což zabraňuje zachování jejich dosavadní interakce (Tibbetts *et al.*, 1999; Maya *et al.*, 2001). Tím je p53 stabilizován a může tvořit tetramery v jádře vázající se na DNA, indukující transkripci dalšího regulátoru p21. Protein p21

pak působí jako inhibitor cyklin dependentních kináz (CDKs), jejichž inhibicí je dosaženo pozastavení progresu buněčného cyklu a buňka tím získá požadovaný čas na opravu DNA a zamezí šíření poškozené genetické informace do dalších generací (Hengst *et al.*, 1998; shrnuto v Jackson and Bartek, 2009 a v England, 2022). Kaskádu DDR popisuje schematicky *obrázek 2*.



*Obrázek 2: Schéma signální kaskády DDR*

Obrázek zobrazuje pro přehlednost kaskádu DDR pouze zjednodušeně, není zde znázorněn například ubiquitinylovaný histon H2AX. Rozeznání DSB MRN komplexem indukuje autofosforylaci a monomerizaci ATM kinázy, která fosforyluje histon H2AX a další signální proteiny včetně 53BP1, p53 a CHK2. Fosforylovaný p53 je stabilizovaný, tetramerizuje a indukuje transkripci p21 inhibující CDK2, a tedy i přechod do S fáze. Fosforylovaná CHK2 inhibuje pomocí faktoru CDC25A/C cyklin-dependentní kinázy 1/2 a tím i přechod do S fáze/mitózy. Převzato a upraveno ze Smith *et al.*, 2020.

## 4 Mechanismy oprav DSBs

Signalizační dráhy DDR vedou kromě pozastavení buněčného cyklu i k samotné opravě poškozené genetické informace. Nejpřesnějším typem opravy dvouřetězcových zlomů je homologní rekombinace, protože je při tomto mechanismu DNA opravována podle templátu, dle kterého může být doplněna chybějící sekvence. Jelikož je tímto templátem nejčastěji sesterská chromatida, je zřejmé, že probíhá v S nebo G2 fázi buněčného cyklu, kde je genom replikovaný. V jiných fázích buněčného cyklu lze sice využít jako templát i homologní chromozom, ale při syntéze podle něj může dojít ke ztrátě heterozygocity. Existují však i méně přesné mechanismy jako nehomologní spojování konců nebo mikrohomologií zprostředkované spojování konců (microhomology-mediated end-joining, MMEJ), které nepotřebují templát a pouze zlom spojují. Těmito způsoby ale snadno mohou vznikat posunové mutace nebo delece (shrnuto v Ranjha, Howard and Cejka, 2018).

Který mechanismus buňka zvolí pro opravu, záleží hlavně na fázi buněčného cyklu, ale také zde hraje roli dostupnost NHEJ proteinů (převážně proteinu KU) (Pierce *et al.*, 2001). Vysoká afinita KU ke koncům DNA a jeho abundance v buňce může také způsobit interferenci s navázáním dalších proteinů, které by vedlo k zahájení HR (Mimitou and Symington, 2010). V savčích buňkách jsou dvouvláknové zlomy v ostatních fázích cyklu obecně opravovány častěji NHEJ než HR, protože mechanismus pomocí NHEJ nevyžaduje homologní úsek a je podstatně rychlejší (Beucher *et al.*, 2009; shrnuto v Ranjha, Howard and Cejka, 2018).

### 4.1 Nehomologní spojování konců

Hlavním senzorem zlomu při NHEJ je heterodimer proteinů KU70/80, který má k dvouvláknovým zlomům vysokou afinitu a při poškození DNA je okamžitě přemístěn do místa jejich vzniku, kde se na ně váže (Mari *et al.*, 2006). Navázání KU proteinů pomáhá držet konce DNA blízko u sebe a umožní přesun katalytické subjednotky DNA-PK do místa poškození a její autofosforylaci (Ramsden and Gellert, 1998; Goodarzi *et al.*, 2006). Pokud nejsou konce kompatibilní nebo obsahují nežádoucí sekundární strukturu nebo navázaný protein, je potřeba je upravit, aby byly vhodné k ligaci. Toto upravení konců zajišťuje nukleáza Artemis, která formuje komplex s autofosforylovanou katalytickou subjednotkou DNA-PK. Artemis má sama o sobě 5' – 3' exonukleázovou aktivitu na jednovláknové DNA, ale interakcí a fosforylací pomocí DNA-PKcs je ovlivňována její aktivita, proto pak může působit jako endonukleáza na dvouvláknové DNA v obou směrech (Ma *et al.*, 2002; Goodarzi *et al.*, 2006).

K již vytvořenému komplexu KU proteinů, DNA-PKcs a Artemis se váží polymerázy  $\lambda$  nebo  $\mu$ , které jsou zodpovědné za další úpravy konců a případné dosyntetizování chybějících nukleotidů. Obě tyto polymerázy jsou schopné syntetizovat DNA i nezávisle na templátu, což umožňuje vznik



mutací (Ramsden and Gellert, 1998; Domínguez *et al.*, 2000; Ma *et al.*, 2004; Mari *et al.*, 2006). Finálně jsou konce většinou upraveny tak, aby obsahovaly maximálně 1 až 4 páry bází dlouhé homologické přesahy (shrnutí v Chang *et al.*, 2017).

Nakonec jsou zlomy spojeny pomocí komplexu ligázy IV a pomocného faktoru XRCC4 (Grawunder *et al.*, 1997). Nejrychleji a nejstabilněji se ligují přesahy alespoň s minimální homologií, ale díky KU proteinům lze s menší efektivitou spojovat i tupé konce (Gu *et al.*, 2007). Dalšími pomocnými proteiny při ligaci jsou faktory XLF a PAXX, oba příbuzné proteinu XRCC4 (Xing *et al.*, 2015). XLF v komplexu s XRCC4 pravděpodobně tvoří strukturu kolem DNA, která je schopna držet fragmenty pohromadě a tím zprostředkovat efektivnější ligaci pomocí ligázy IV. Tato struktura je ale zároveň schopna se pohybovat po DNA, což umožní ponechat konce přístupné ostatním opravným proteinům (Brouwer *et al.*, 2016).

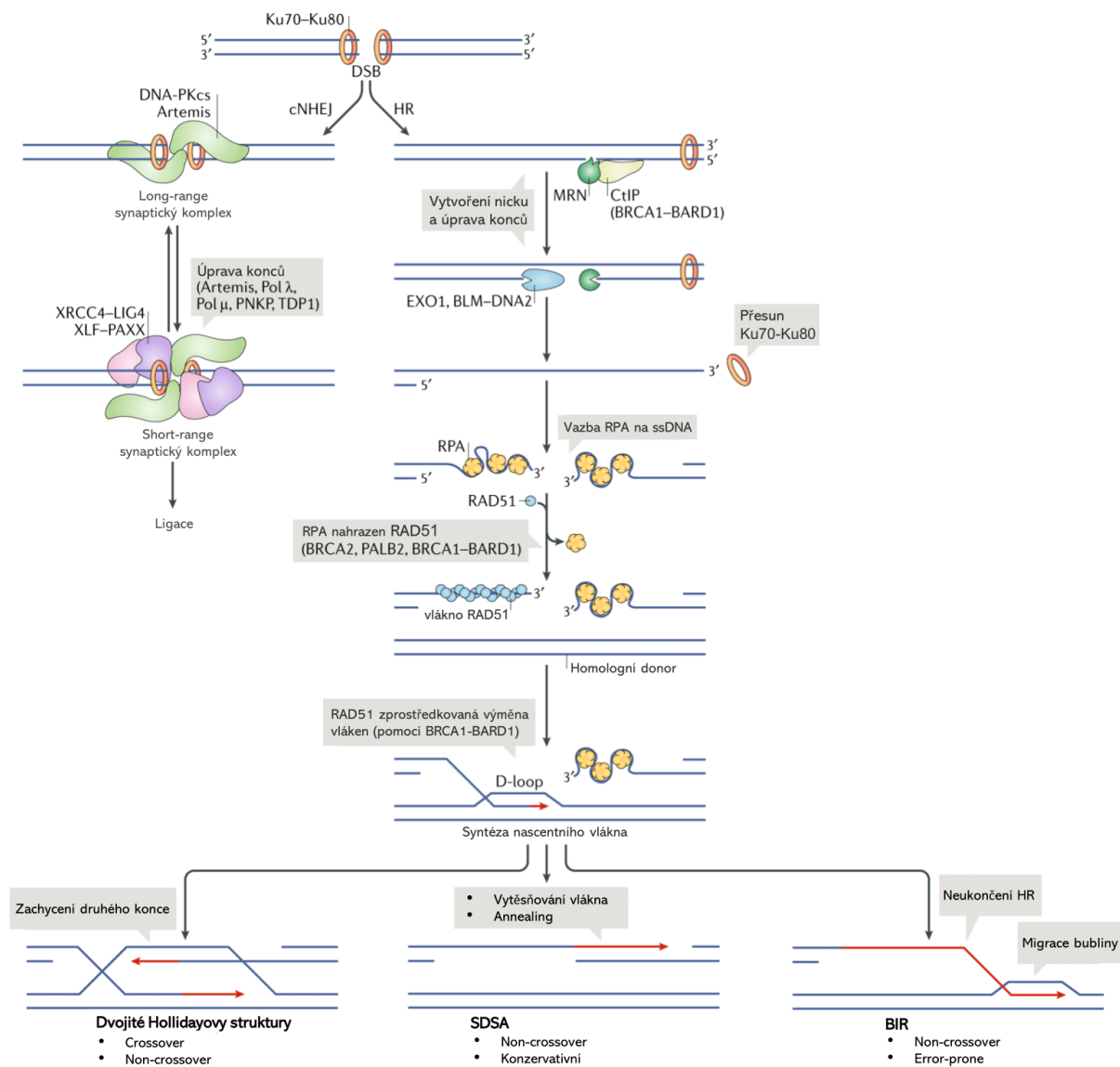
## 4.2 Homologní rekombinace

K homologní rekombinaci je vždy potřeba templátové vlákno, kterým je nejčastěji sesterská chromatida vznikající po replikaci genomu. Aby mohla HR probíhat, je tedy většinou zapotřebí, aby se buňka nacházela v S nebo G2 fázi buněčného cyklu. V těchto fázích probíhá po rozeznání zlomu preferenčně homologní rekombinace. Dokončení HR poté může pokračovat mnoha různými mechanismy – nasedáním vlákna závislým na syntéze (synthesis-dependent strand annealing, SDSA), zlomem indukovanou replikací (break-induced replication, BIR) nebo kanonickou homologní rekombinací (shrnutí v Ranjha, Howard and Cejka, 2018).

Aby mohl být templát využit a mohla být zahájena rekombinace, je potřeba vytvořit jednořetězcový přesah na 3' konci v okolí zlomu, který umožní invazi vlákna do homologického úseku. V zahájení úpravy konců a také v aktivaci HR na úkor NHEJ hraje roli fosforylovaný protein CTIP, který je relokalizován do místa poškození ve větším množství v S a G2 fázi. Váže se na MRN komplex a stimuluje jeho endonukleázovou aktivitu (Sartori *et al.*, 2007). První resekci vlákna od 5' konce, tzv. short-range, tedy zahajuje MRN komplex, jakmile je fosforylován ATM kinázou a je na něm navázaný CTIP. Nukleáza MRE11 vytvoří jednořetězcový zlom upstream od DSB a část DNA poté degraduje svou 3' – 5' exonukleázovou aktivitou tak, že vznikne krátký přesah. Jelikož je ale potřeba delších přesahů pro dostatečné párování s homologickými úseky na sesterské chromatidě, je zahájena long-range resekce pomocí 5' – 3' exonukleázy EXO1, helicázy BLM a nukleázy DNA2, čímž vznikne 3' OH přesah dostatečné délky (Nimonkar *et al.*, 2011; Shibata *et al.*, 2014; Kijas *et al.*, 2015). Odhalený úsek jednovláknové DNA je okamžitě obalen proteiny RPA, aby bylo zabráněno vzniku sekundárních struktur, degradaci vlákna nebo nevyžádanému párování s jinými úseky (Nimonkar *et al.*, 2011). Tyto proteiny musí být následně nahrazeny rekombinázou RAD51. Protože mají ale proteiny RPA k DNA vyšší afinitu, je tento proces u člověka katalyzován proteinem BRCA2 (Yang *et al.*, 2005; Jensen, Carreira and Kowalczykowski, 2010).

Jednořetězcové vlákno DNA obalené proteinem RAD51 (tzv. pre-synaptické vlákno) zprostředkovává párování s homologním úsekem na sesterské chromatidě pomocí komplexu proteinů BRCA1-BARD1. Komplex BRCA1-BARD1 katalyzuje invazi vlákna (strand invasion) do dvouvláknového DNA templátu (sesterské chromatidy) a vznik tzv. D-smyčky (displacement loop) (Zhao *et al.*, 2017). Tato interakce je umožněna převážně díky ATPázové aktivitě rekombinázy RAD51 a její schopností vázat jak jednovláknovou, tak dvouvláknovou DNA (Baumann, Benson and West, 1996; Zaitseva, Zaitsev and Kowalczykowski, 1999). Proteiny účastníci se této interakce dohromady tvoří synaptický komplex (shrnutí v Ranjha, Howard and Cejka, 2018). Vytěsněné vlákno původního duplexu je obalováno proteiny RPA, což zabraňuje zpětnému párování templátových vláken sesterské chromatidy mezi sebou (Egglar, Inman and Cox, 2002). Poté je RAD51 odstraňován z heteroduplexové dvoušroubovice DNA pomocí ATPázy RAD54 (Solinger, Kiianitsa and Heyer, 2002). Konečně pak probíhá prodlužování invadovaného vlákna podle nepoškozeného homologního úseku převážně pomocí polymeráz  $\delta$  nebo  $\epsilon$  (Li *et al.*, 2009).

Posledním krokem opravy je výběr způsobu závěrečného spojení konců. Prvním možným mechanismem je zlomem indukovaná replikace (BIR), při které je invadované vlákno prodlouženo v celé délce podle sesterské chromatidy a není tedy vůbec spojováno s původním druhým fragmentem. Tohoto mechanismu se využívá pouze zřídka, nejčastěji při výskytu vysoké mutagenese, kdy není druhá část fragmentu k dispozici. Při volbě dalšího mechanismu záleží na stabilitě D-smyčky. Pokud není D-smyčka dostatečně stabilní, probíhá přednostně nasedání vlákna závislé na syntéze (SDSA). Při SDSA je invadované vlákno po prodloužení odděleno od templátu a následně je spojeno s koncem druhého fragmentu. Tento mechanismus tedy nevede ke crossoveru. Při vyšší stabilitě D-smyčky probíhá kanonická homologní rekombinace, kdy je zachycen i druhý konec poškozené molekuly, který je následně prodlužován podle zbývajících templátového vlákna. Typická překřížení vláken vznikající při kanonické homologní rekombinaci se nazývají dvojité Hollidayovy struktury a směr jejich rozrušení poté určuje možnost vzniku crossoveru (Bzymek *et al.*, 2010; shrnutí v Ranjha, Howard and Cejka, 2018). Shrnutí zmíněných mechanismů je znázorněno na *obrázku 3*.



Obrázek 3: Mechanismy oprav DSBs

Na volné konce v DNA zlomu se váže KU70/80 umožňující vazbu dalších proteinů a vznik long-range synaptonického komplexu, který může reverzibilně přecházet v short-range synaptonický komplex a umožnit ligaci rozrušených vláken mechanismem NHEJ. Zahájení kanonického NHEJ může být ale přerušeno resekcí konců pomocí MRN komplexu s navázaným CtIP faktorem. Při homologní rekombinaci MRN komplex vytvoří zlom v jednom z vláken a poté degraduje jeho 5' konec, čímž je odstraněn i KU70/80. Druhým směrem je totéž vlákno degradováno komplexem proteinů EXO1, BLM-DNA2 a vzniká 3' koncový přesah. Přesah řetězce je obalen proteinem RPA, který je nahrazen RAD51 pomocí BRCA2, PALB2 a komplexu BRCA1-BARD1. Komplex BRCA1-BARD1 také katalyzuje invazi 3' přesahujícího řetězce do homologního donoru a vznik D-loopu. Jeden z možných způsobů dokončení opravy je vznik dvojitých Hollidayových struktur, umožňující vznik crossoveru a probíhající nejčastěji při meióze. Pokud není zachycen druhý konec probíhá v buňkách defaultně SDSA, při kterém nevzniká crossover. Pokud nedojde k terminaci HR, probíhá syntéza podle kompletního homologního vlákna mechanismem BIR. Červené šipky označují nově syntetizované vlákno. Převzato a upraveno ze Scully *et al.*, 2019.

## 5 Interakce virů s buněčnými mechanismy oprav DNA

### 5.1 *Adenoviridae*

Viry z čeledi *Adenoviridae* (AdV) jsou neobalené viry s ikosahedrální kapsidou, jejichž genom tvoří dvouvláknová DNA. Ačkoli způsobují většinou mírné infekce respiračního nebo gastrointestinálního traktu, pro pacienty se sníženou funkcí imunitního systému mohou být ohrožující. Adenoviry jsou mimo jiné v posledních letech hojně využívány jako vektory při vývoji vakcín nebo v genové terapii (shrnuto v Hoeben and Uil, 2013).

Genom adenovirů je tvořen lineární dvouvláknovou DNA obsahující na koncích invertované terminální repetice s replikačním počátkem a kovalentně navázaným terminálním proteinem (TP) na 5' koncích. Obě vlákna genomu jsou kódující, přičemž kódují jak časné geny, které jsou významné pro replikaci, regulaci imunitní odpovědi nebo DDR, tak pozdní geny nutné k enkapsidaci genomu a maturaci virionu (Ullman, Reich and Hearing, 2007; shrnuto v Hoeben and Uil, 2013).

Replikace adenovirového genomu probíhá v jádře v oblastech virových replikačních center, které sdružují virové proteiny pohromadě. Mechanismus replikace adenovirů se nazývá vytěsňování vlákn (strand-displacement). Nejprve je prekurzor terminálního proteinu (pTP) připojen pomocí virové polymerázy (AdV Pol) k prvnímu nukleotidu nascentního řetězce. Tento komplex nasedá na invertované repetice na templátovém vlákně, AdV Pol disociuje od pTP a začíná prodlužovat nascentní řetězec, který postupně vytěsňuje netemplátové vlákno. Následně probíhá replikace druhého vlákna stejným způsobem a vznikne tak kompletně replikovaný genom s navázanými pTP na koncích, které jsou později při maturaci virionu štěpeny na terminální protein (shrnuto v Hoeben and Uil, 2013 a v Charman, Herrmann and Weitzman, 2019).

#### 5.1.1 Interakce adenovirů s proteiny DDR

Jakmile se adenovirus dostane do jádra infikované buňky a zahájí svoji replikaci, specifická lineární dvouvláknová organizace adenovirového genomu může buněčným sensorům nápadně připomínat vlastní genomovou DNA obsahující dvouřetězcové zlomy. Bylo experimentálně zjištěno, že pokud by adenoviry neměly vyvinuté proteiny inhibující hostitelské opravné mechanismy, spojovala by buňka adenovirové genomy do konkatemerů. Tyto konkatemery obsahovaly různý počet adenovirových DNA za sebou ve všech možných orientacích (head-to-head, tail-to-tail i head-to-tail) a virus nebyl schopen je efektivně replikovat ani enkapsidovat (Weiden and Ginsberg, 1994). Předpokládá se, že vznik těchto konkatemerů je zajišťován mechanismem NHEJ spolupracujícím s MRN komplexem, jehož nukleázová aktivita umožňuje mimo jiné odstraňovat terminální protein na 5' koncích adenovirového genomu

a poskytovat tak volné konce přístupné ke spojení (Boyer, Rohleder and Ketner, 1999; Stracker, Carson and Weitzman, 2002).

Ukázalo se, že při adenovirové inhibici opravných mechanismů hrají nejvýznamnější roli proteiny E4 ORF3 a E4 ORF6 vznikající přepisem z časného genu E4. Některé z jejich funkcí mohou být redundantní a většina jich primárně zprostředkovává replikaci právě díky inhibici, degradaci nebo relokizaci hostitelských opravných proteinů a reorganizaci proteinových struktur v jádře (Huang and Hearing, 1989; Doucas *et al.*, 1996; Stracker, Carson and Weitzman, 2002). Předcházení konkatemericizaci genomu umožňují tyto proteiny například díky asociaci s DNA-PKcs, jedním z hlavních členů signalizační kaskády při opravách dvouřetězcových zlomů, jejíž vazba vede k inhibici celé dráhy mechanismu NHEJ (Boyer, Rohleder and Ketner, 1999).

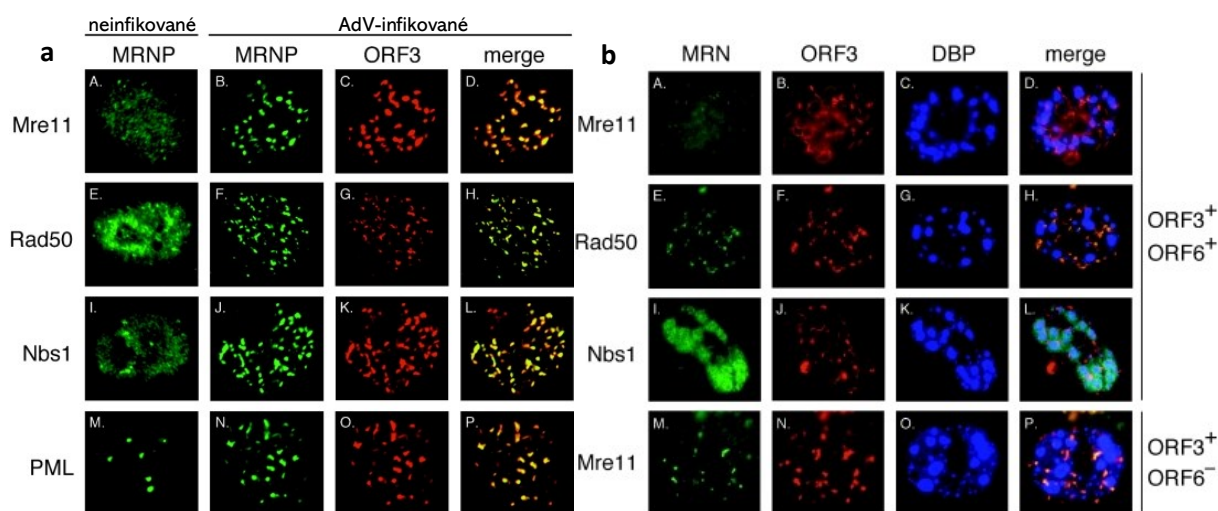
#### 5.1.1.1 Role proteinu E4 ORF3

Předmětem zájmu experimentů bylo zjištění, že virový protein E4 ORF3 přesouvá členy MRN komplexu dovnitř nebo na okraj svých replikačních center. Tato relokizace probíhala navíc v podobné dynamice jako změna organizace jaderných tělísek promyelocytického leukemického proteinu (promyelocytic leukemia protein nuclear bodies, PML NBs) také známých jako onkogenní domény PML (PML oncogenic domains, PODs) nebo jaderné domény 10 (nuclear domains 10, ND10) (Stracker, Carson and Weitzman, 2002). PML NBs jsou bezmembránové sférické struktury, rozmístěné po celé ploše jádra, s ne zcela objasněnou funkcí. Obecně ale shromažďují proteiny účastníci se oprav DNA, úprav telomer, odpovědi na virovou infekci nebo apoptózy. Nejzastoupenější komponentou PML NBs je tumor-supresorový protein PML, důležitý pro samotnou formaci tělísek. Při spojení proteinu PML s receptorem kyseliny retinové (retinoic acid receptor, RAR- $\alpha$ ), které je způsobeno translokací na chromozomu, vzniká jeho poškozená fúzní forma způsobující akutní promyelocytickou leukémií (APL) (Dyck *et al.*, 1994; shrnuto v Chang *et al.*, 2018).

V časně fázi adenovirové infekce interaguje protein E4 ORF3 s komponenty PML jaderných tělísek a indukuje jejich reorganizaci ze sférických do specifických filamentárních struktur. Při pokročení infekce do pozdějších fází jsou některé z těchto proteinů pomocí téhož virového regulátoru přemístěny do virových replikačních center. Bylo zjištěno, že pokud tato změna struktury nebo relokizace neproběhne, nemůže probíhat ani virová replikace. Předpokládá se tedy, že adenovirová replikace je spřažena s některými proteiny pocházejícími z PML NBs (Doucas *et al.*, 1996).

Podobný efekt lze pozorovat i u interakce E4 ORF3 se členy MRN komplexu, jejichž reorganizace je též esenciální pro efektivní adenovirovou replikaci. Ve virem neinfikovaných buňkách jsou proteiny MRN komplexu rozptýleny po celé ploše jádra. V časně fázi infekce indukuje virový faktor

E4 ORF3 jejich přemístění do filamentárních struktur podobných jako v případě PML NBs (zobrazeno na *obrázku 4*). Nicméně v pokročilejším stádiu infekce dochází k rozdělení MRN komplexu na jednotlivé komponenty, z nichž každá je virem regulována jiným způsobem (Evans and Hearing, 2005). Nukleáza MRE11 je směřována k proteazomální degradaci pomocí druhého virového regulátoru E4 ORF6 v komplexu s virovým proteinem E1B (Stracker, Carson and Weitzman, 2002). RAD50 zůstává společně s E4 ORF3 ve filamentárních strukturách a NBS1 je přemístěn na okraj nebo přímo do virových replikačních center. Předpokládá se tedy, že tato disociace členů komplexu brání jeho funkci jako senzoru dvouřetězcových zlomů DNA a virus tím předchází rozpoznání konců svého genomu a jeho konkatemizaci. Kromě jiného bylo také ukázáno, že díky rozrušení MRN komplexu je inhibována celá dráha aktivovaná ATR kinázou (Stracker, Carson and Weitzman, 2002; Evans and Hearing, 2005; Carson *et al.*, 2009).



*Obrázek 4: Rozmístění komponent MRN komplexu a PML proteinu v neinfikovaných a AdV infikovaných buňkách*

**a:** V neinfikovaných buňkách jsou proteiny MRN komplexu rozptýleny po celém jádře, PML je lokalizován v kompaktních PML NBs a všechny zmíněné proteiny jsou vizualizovány specifickými protilátkami MRNP (obrázky A, E, I, M). V infikovaných buňkách byly tyto proteiny několik hodin po infekci AdV také označeny specifickými protilátkami (B, F, J, N) stejně jako protein E4 ORF3 (C, G, K, O). Po prolnutí kanálů je zřejmé, že komponenty MRN komplexu a protein PML se kolokalizovali společně s virovým proteinem E4 ORF3 do specifických filamentárních struktur, které byly podobné u MRN komplexu i proteinu PML (D, H, L, P). **b:** V druhé části obrázku je přidán kanál znázorňující virová replikační centra označená pomocí virového DNA-vazebného proteinu (DNA-binding protein, DBP) (obrázky C, G, K, O). Je zřejmé, že pokud byl exprimován protein E4 ORF6, docházelo ke značnému úbytku MRE11 (A). RAD50 se i v pozdní fázi infekce kolokalizoval s E4 ORF3, ale nebyl však součástí virových replikačních center (H) a naopak protein NBS1 byl přemístěn přímo do virových replikačních center (L). Převzato a upraveno z Evans and Hearing, 2005.

### 5.1.1.2 Role proteinu E4 ORF6

Časný adenovirový protein E4 ORF6 funguje v hostitelské buňce společně s virovým proteinem E1B (Bridge and Ketner, 1990). Oba asociují s několika buněčnými proteiny, s nimiž tvoří multiproteinový komplex vykazující E3 ubiquitin ligázovou aktivitu a schopný navádění proteinů opravných mechanismů (včetně MRE11, RAD50 a NBS1 nebo ligázy IV a helikázy BLM)

k proteazomální degradaci. Tato degradace ale není sama o sobě dostatečně efektivní k inhibici opravných mechanismů a konkatemerizaci virových genomů, té je potřeba předcházet vždy ještě s pomocí proteinu E4 ORF3 (Harada *et al.*, 2002; Stracker, Carson and Weitzman, 2002; Baker *et al.*, 2007; Orazio *et al.*, 2011).

Jednou z dalších funkcí tohoto komplexu může být zprostředkování vyšší rezistence k apoptóze. Přestože je předcházení apoptóze zajištěno především virovým proteinem E1A a jeho signalizací zahrnující retinoblastomový protein (pRB) a p53, existuje i alternativní mechanismus právě pomocí ubiquitin ligázového komplexu obsahující E4 ORF6 a E1B (Stanchina *et al.*, 1998). Pokud totiž tento komplex asociuje s tumor supresorem p53, katalyzuje jeho polyubiquitylaci a degradaci v proteazomu, čímž je snížena jeho hladina v buňce a klesá její schopnost indukovat programovanou buněčnou smrt, která by bránila šíření viru do okolních buněk (Querido *et al.*, 2001; Harada *et al.*, 2002).

## 5.2 Papillomaviridae

Viry z čeledi *Papillomaviridae* infikující člověka (human papillomaviruses, HPV) jsou poměrně běžnými viry v lidské populaci. Jejich infekce může být bezpříznaková, ale infekce některými typy papilomavirů způsobuje vznik bradavic a vysoko-rizikové typy (HPV 16 a HPV 18) jsou příčinou většiny případů rakoviny děložního hrdla (Walboomers *et al.*, 1999; shrnuto v Turnell and Grand, 2012).

Papilomaviry infikují stratifikované epitelu a jejich životní cyklus je závislý na diferenciaci epitelálních buněk. Počátek infekce probíhá v nejspodnějších nediferenciovaných buňkách bazální vrstvy epitelu, do které virus proniká přes poranění. V buňkách bazální vrstvy se virový genom vyskytuje ve formě episomu a replikuje se pouze minimálně, aby zůstal co nejvíce skrytý imunitnímu systému. Jakmile dceřiné buňky bazálních vrstev diferencují a postupují do vyšších vrstev epitelu, dochází zde k tzv. vegetativní replikaci, při níž vzniká mnoho kopií virové DNA, která je následně přepisována a balena do vznikajících virových partikulí (shrnutu v McBride, 2017).

Genom papilomavirů tvoří cirkulární dvouvláknová DNA, jejíž replikaci zajišťují časně exprimované proteiny E1 a E2. Protein E2 pomáhá vazbě proteinu E1 na replikační počátek, za účelem vzniku iniciačního komplexu. Po vzniku tohoto komplexu E2 disociuje a dochází k hexamerizaci proteinu E1, který následně funguje jako helikáza a pomáhá rozvíjení DNA, aby na ni mohly nasednout buněčné faktory a zprostředkovat její replikaci (Berg and Stenlund, 1997; shrnuto v McBride, 2017). Předpokládá se, že mechanismem replikace v časných fázích infekce, tedy ve spodní oblasti epitelu, je klasická obousměrná theta replikace, která je ale v pokročilejší fázi nahrazena syntézou DNA pomocí mechanismu valivé kružnice (rolling circle) (Flores and Lambert, 1997). Nicméně některé pozdější studie ukazují, že by se ve vegetativní replikaci mohl určitým způsobem využívat i mechanismus replikace závislý na rekombinaci (Anacker *et al.*, 2014; Liblekas *et al.*, 2021).

### 5.2.1 Interakce papilomavirů s proteiny DDR

Interakce papilomavirů s proteiny DDR nespočívá na rozdíl od adenovirů v blokaci opravných mechanismů, nýbrž v jejich aktivaci. Bylo zjištěno, že mnoho asociací s opravnými proteiny a aktivace DDR je nutná pro efektivní replikaci papilomavirové genetické informace. Aktivace DDR s sebou nese ale i určité komplikace pro virus, protože v neinfikovaných buňkách je při aktivované DDR obvykle pozastaven buněčný cyklus, aby mohly být dokončeny opravy DNA. Papilomaviry ale naopak vyžadují zachování jeho průběhu, protože potřebují buněčné replikační faktory k syntéze svého genomu. Z toho plyne, že je nutné, aby tomuto pozastavení cyklu předcházely, čehož dosahují pomocí svých onkogenů E6 a E7. Protein E6 konkrétně zajišťuje



progres buněčného cyklu a inhibici apoptózy, zatímco protein E7 indukuje v buňce S fázi. Díky těmto regulátorům mohou mít ale buňky infikované vysoko-rizikovými HPV, které exprimují obecně vyšší hladiny proteinů E6 a E7, potenciál k nádorové transformaci (Leverrier *et al.*, 2007; Banerjee *et al.*, 2011; shrnuto v Bristol, Das and Morgan, 2017).

Aktivování buněčné odpovědi na poškození DNA probíhá pravděpodobně díky pro buňku neobvyklým strukturám, které vznikají při replikaci mimo jiné pomocí virové helikázy E1. V časné fázi infekce, pokud je virový genom ve formě episomu nebo integrovaný do hostitelského chromozomu, může také při vysokých hladinách E1 a E2 probíhat replikace alternativním mechanismem generujícím lineární nebo open-circle intermediáty. Tyto meziprodukty obsahují volné konce DNA připomínající dvouvláknové zlomy, což indukuje relokizaci proteinů opravných mechanismů do virových replikačních center a vznikají zde jaderná ohniska, podobná jako u oprav buněčné DNA poškozené ionizujícím zářením. Vznik těchto jaderných ohnisek společně indukují mimo jiné i samotné virové proteiny E1 a E2 a shromažďují se zde senzory DSBs (MRN komplex pro HR a heterodimer proteinů KU70/80 pro NHEJ) (Männik *et al.*, 2002; Kadaja *et al.*, 2009; Sakakibara, Mitra and McBride, 2011).

Přesun senzorů DSBs do virových replikačních center společně s virovými proteiny také indukuje aktivaci celé ATM dráhy, tudíž zde lze pozorovat i aktivovanou ATM kinázu a její fosforylované substráty včetně CHK2, histonu  $\gamma$ -H2AX nebo p53. Bylo ale také zjištěno, že její aktivace je nutná pro replikaci pouze v diferenciovaných buňkách, z čehož vyplývá, že tato dráha je esenciální pravděpodobně jen pro vegetativní replikaci virové DNA. ATR naopak v diferenciovaných buňkách nebyla příliš aktivní a tato skutečnost značí, že by její aktivace mohla hrát výraznější roli při udržovací replikaci v časných fázích infekce (Moody and Laimins, 2009; Banerjee *et al.*, 2011; Sakakibara, Mitra and McBride, 2011; shrnuto v Hong and Laimins, 2013).

Kromě lokalizace již zmiňovaných buněčných faktorů do virových replikačních center, bylo ukázáno, že se do nich u diferenciovaných buněk dostávají i regulátory homologní rekombinace včetně RAD51, BRCA1 nebo RPA (Gillespie *et al.*, 2012). Díky těmto pozorováním se uvažuje o určitém využití mechanismu replikace závislého na rekombinaci v pozdějších fázích papilomavirové infekce kromě klasického mechanismu pomocí valivé kružnice. Nejvíce v úvahu připadá pravděpodobně rekombinace zakončená BIR, protože dokáže prodloužit dostatečně dlouhý úsek DNA a vznikají při ní konkatemery virového genomu podobně jako u mechanismu pomocí valivé kružnice, které se až později rozdělují na jednotlivé genomy a nepotřebují tedy po každém zkopírování jednoho genomu reiniciaci replikace (Anacker *et al.*, 2014; Liblekas *et al.*, 2021).

## 5.2.2 Funkce komponent MRN komplexu při papilomavirové infekci

Na rozdíl od adenovirů nedegradují viry z čeledi *Papillomaviridae* komponenty MRN komplexu, ale naopak je využívají při replikaci a přemísťují je do svých replikačních center. Bylo zjištěno, že exprese virového proteinu E7 v infikovaných buňkách dokonce indukuje vznik většího množství proteinů MRN komplexu než v buňkách neinfikovaných. Nejzřetelnější zvýšení množství transkriptu bylo pozorováno u MRE11, což je pravděpodobně způsobeno pouze tím, že MRE11 je esenciálním prostředníkem pro propojení RAD50 a NBS1, kteří bez něj nemohou interagovat. Proto je důležitý pro formování tohoto komplexu a je ho obecně exprimováno více (Moody and Laimins, 2009; Anacker *et al.*, 2014).

Kromě významu fungování celého MRN komplexu jako celek bylo ukázáno, že některé jeho komponenty mají přídatné funkce podstatné pro virovou vegetativní replikaci. Například protein NBS1 obsahující jaderný lokalizační signál zajišťuje přemístění celého komplexu z cytoplazmy do jádra. Pokud by v komplexu nebyl přítomen, zůstaly by proteiny MRE11 a RAD50 rozptýleny v cytoplazmě, kde probíhá proteosyntéza a komplex by se tím pádem nemohl dostat do virových replikačních center (Anacker *et al.*, 2014).

I když se jedná ještě o poměrně neprozkoumanou záležitost, zdá se být zajímavá i funkce proteinu RAD50 a RAD50-interagujícího proteinu 1 (RAD50-interacting protein 1, RINT1). Předpokládá se, že jejich asociace by mohla hrát roli ve zprostředkování interakce s virovým proteinem E2, díky níž by se celý MRN komplex přesouval do virových replikačních center (Campos-León *et al.*, 2017).

RINT1 je buněčný tumor supresor, který je esenciálním faktorem pro vývoj a přežití embryonálních buněk (Lin *et al.*, 2007). Jednou z jeho funkcí je regulace buněčného kontrolního bodu G2/M indukovaného ionizujícím zářením. V této regulaci se pravděpodobně uplatňuje i protein RAD50, neboť ačkoli jsou společně s RINT1 exprimovány po celou dobu cyklu, výrazně v průběhu kolísá jejich interakce, a interagují spolu prakticky pouze v pozdní S a v průběhu G2/M fáze (Xiao *et al.*, 2001). RINT1 se dále účastní váčkového transportu mezi Golgiho aparátem a endoplazmatickým retikulem díky zprostředkování kontaktu a lokalizace proteinů Zeste-White 10 (ZW10) a t-SNARE proteinu syntaxinu 18 (Hirose *et al.*, 2004; Arasaki *et al.*, 2006).

V jednom z poměrně nedávných článků bylo ukázáno, že buněčný faktor RINT1 interaguje v průběhu infekce HPV s virovým proteinem E2 (Campos-León *et al.*, 2017). Obvyklá lokalizace proteinu RINT1 je v endoplazmatickém retikulu s navázaným ZW10 (Lin *et al.*, 2007). Tato interakce je při papilomavirové infekci přerušena proteinem E2, který asociuje s RINT1 v oblasti domény vázající ZW10, ale daleko od domény vázající RAD50 a přesouvá ho z endoplazmatického retikula do jádra. Tato relokalizace signifikantně inhibuje váčkový transport mezi Golgiho aparátem a endoplazmatickým retikulem. Výhoda inhibice vezikulárního transportu pro virus

zatím není známá, ale uvažuje se o možnosti usměrnění antigenní prezentace na povrchu buněk a omezení tak detekce infikované buňky imunitním systémem (Campos-León *et al.*, 2017).

Dalším důvodem přesunu komplexu E2-RINT1 do jádra je zvýšení efektivity replikace. V S fázi buněčného cyklu je totiž tento komplex přemístěn do jaderných ohnisek, obsahujících virová replikační centra a proteiny opravných mechanismů. Z tohoto důvodu se uvažuje o tom, že právě tento komplex interagující s RAD50 by mohl do replikačních center přesouvat celý MRN komplex (Campos-León *et al.*, 2017). Tato spekulace ani přesná role komponent MRN komplexu ve virové replikaci zatím není prokázána, ale bude dozajista předmětem dalších experimentů.

## 5.3 Herpesviridae

Lidské viry z čeledi *Herpesviridae* (human herpesviruses, HHVs) lze podle tkáňového tropismu a podobných vlastností rozdělit na tři podčeledi *Alphaherpesvirinae*, *Betaherpesvirinae* a *Gammaherpesvirinae*. Všechny podčeledi tvoří viry s dvouvláknovým lineárním DNA genomem, podle jehož odlišné organizace se mohou dále členit. Většina herpesvirů se vyznačuje širokou škálou hostitelů, dále je jejich infekce charakteristická latentní fází a jsou asociovány s onemocněními jako například plané neštovice (způsobeno varicella-zoster virus, VZV), opary (způsobeno herpes simplex 1, HSV-1) nebo infekční mononukleózou (způsobeno virem Epstein-Barrové, EBV). Podčeleď *Gammaherpesvirinae* je také spojována s nádorovou transformací buněk hostitele, nejvýznamněji HHV-8 (jinak také herpesvirus Kaposiho sarkomu, KSHV) způsobující Kaposiho sarkom nebo již zmiňovaný virus Epstein-Barrové způsobující například Burkittův lymfom (shrnutí v Boehmer and Nimonkar, 2003).

Genom herpesvirů je poměrně dlouhý s vysokou kódující kapacitou a herpesviry jsou na rozdíl od ostatních DNA virů charakteristické svou komplexností a schopností kódování mnoha vlastních proteinů. Různé skupiny herpesvirů mají DNA odlišně rozčleněnou na oblasti repetice, krátké (short unique sequences, U<sub>S</sub>) a dlouhé kódující sekvence (long unique sequences, U<sub>L</sub>) (shrnutí v Boehmer and Nimonkar, 2003).

S vyšší komplexností se pojí i to, že replikace herpesvirů není na rozdíl od většiny DNA virů závislá na S fázi buněčného cyklu. Mechanismus replikace je nejpodrobněji prozkoumán u modelového viru HSV-1. Prvním krokem je cirkularizace jeho genomu zprostředkovaná pravděpodobně homologní rekombinací pomocí terminálních repetice katalyzovaná hostitelskými proteiny (Yao, Matecic and Elias, 1997). Během lytické infekce je replikace zahájena z ORI asociovaného s lytickou fází, kam nasedá protein UL9, který umožní vazbu single-strand vazebného proteinu ICP8. Dále následuje vazba komplexu primázy a helikázy umožňující syntézu RNA primeru a nasednutí virem kódované polymerázy. Průběh syntézy DNA je zatím nejasný, ale předpokládá se, že počáteční fáze probíhá mechanismem obousměrné theta replikace. Později je způsob replikace dosud neznámým mechanismem přepnut na syntézu pomocí valivé kružnice. Celý proces bude ale pravděpodobně ještě komplexnější, neboť existují důkazy o tom, že je mechanismus replikace výrazně závislý na rekombinaci (Dutch *et al.*, 1992). Replikace herpesvirů je také podobně jako u adenovirů lokalizována do hostitelských PML NBs, jejichž strukturu během syntézy rozrušují (shrnutí v Boehmer and Nimonkar, 2003 a v Weller and Coen, 2012).

### 5.3.1 Interakce herpesvirů s proteiny DDR

Obecně je u herpesvirové lytické infekce podobně jako i u výše zmíněných čeledí aktivována DDR v centrech virové replikace, kde vznikají pro hostitele abnormální DNA struktury nebo může

virový genom připomínat buněčnou DNA obsahující DSBs. V těchto ohniskách byly detekovány fosforylované substráty ATM (např. histon  $\gamma$ -H2AX, CHK2, NBS1 nebo p53), včetně její autofosforylované formy a MRN komplexu, což svědčí aktivní ATM signalizační kaskádě (Shirata *et al.*, 2005; Singh *et al.*, 2014). Naopak ATR kináza se nezdá být v HHV-pozitivních buňkách příliš aktivní podobně jako u adenovirů (Kudoh *et al.*, 2005; Mohni *et al.*, 2010).

Na rozdíl od adenovirů, které některé z komponent MRN komplexu degradují, si ale herpesviry zachovávají jejich hladinu v buňce shodnou s hladinou v buňkách neinfikovaných. To naznačuje určité využití komponent MRN komplexu v jejich životním cyklu (Kudoh *et al.*, 2005). Před replikací se podobně jako u papilomavirů do ohnisek kromě MRN komplexu přemísťují i jiné hostitelské proteiny účastníci se HR včetně NBS1, RPA a RAD51, s nimiž asociuje virová polymeráza a protein UL29, což podporuje model herpesvirové replikace závislé na rekombinaci. Tuto spekulaci potvrzuje také skutečnost, že při delecí některého z těchto proteinů dochází ke zpomalení syntézy virové DNA (Wilkinson and Weller, 2004; Kudoh *et al.*, 2009).

Analogii rekombinace nalezneme například u HSV-1, který si kóduje vlastní exonukleázu UL12 a společně s proteinem ICP8 formují rekombinázu katalyzující výměnu vláken. Jelikož je schopna vazby všech členů MRN komplexu, předpokládá se, že společně s ostatními buněčnými faktory umožňuje při replikaci vznik konkatemerů herpesvirového genomu díky stimulaci homologní rekombinace (Reuven *et al.*, 2003; Balasubramanian *et al.*, 2010).

### 5.3.1.1 Virus herpes simplex (HSV)

Důležitým regulátorem při přepnutí z latentní do lytické fáze u HSV-1 je bezprostředně časný gen ICP0, jehož E3 ubiquitin ligázová aktivita navádí k proteazomální degradaci protein PML a jeho izoformy, což může být jeden z mechanismů, jímž rozrušují herpesviry PML NBs (Cai and Schaffer, 1992; Everett *et al.*, 1998). ICP0 mimo jiné indukuje degradaci DNA-PKcs, čímž indukuje inhibici dráhy NHEJ, které by pravděpodobně mělo pro virus nežádoucí účinky (Parkinson, Lees-Miller and Everett, 1999).

Pro efektivnější růst pozastavuje HSV-1 v lytické fázi buněčný cyklus a indukuje některý z kontrolních bodů. Přerušením cyklu tak napodobuje čas, při kterém probíhají opravy DNA. Jedním ze způsobů virového využití ATM signalizační dráhy je tedy zprostředkování fosforylace CHK2 a navazující signalizace vedoucí k inhibici CDKs a pozastavení progresu cyklu. Aktivace CHK2 je také asociována s virovým proteinem ICP0, který ještě zvyšuje zmíněný efekt (Li *et al.*, 2008).

Fosforylační kaskáda indukovaná ATM kinázou není ale úplně shodná s kaskádou aktivovanou při poškození buňky ionizujícím zářením. Kompletní aktivaci ATM dráhy zabraňuje opět protein ICP0, jelikož umožňuje degradaci histon ubiquitin ligáz RNF8 a RNF168, které jsou součástí DDR

a po signalizaci ubiquitinylyují histony v okolí DSBs, čímž zprostředkovávají vazbu mnoha signálních proteinů hostitelské odpovědi na poškození DNA (viz kapitola 3.3) (Lilley *et al.*, 2010).

### 5.3.1.2 Virus Epstein-Barrové (EBV)

Pokud virus EBV perzistuje v buňce v latentní fázi, nachází se v jádře ve formě episomu, a dokáže iniciovat replikaci pouze zároveň s hostitelskou buňkou (Yates and Guan, 1991). Při přepnutí replikace do lytické fáze dochází k aktivaci ATM dráhy, která by ale mohla indukovat apoptózu nebo zástavu buněčného cyklu. EBV je ale schopen i přes její aktivaci navozovat S fázi a zprostředkovat tak svou replikaci. Jeho strategie v navození S fáze nespočívá v inhibici celé ATM dráhy nebo v předcházení její aktivace, nýbrž pouze v konečné části dráhy zahrnující protein p53. I proto lze v replikačních centrech detekovat některé z ATM fosforylovaných intermediátů. Ačkoli zůstává hladina proteinu p53 podobná v infikovaných i neinfikovaných buňkách, je inhibována jeho další signalizace. V EBV infikovaných buňkách byla totiž zaznamenána velice nízká hladina faktoru p21. Nízká hladina p21 a virem indukovaná další aktivace cyklin dependentních kináz je jedním z možných mechanismů zachování progresu buněčného cyklu i přes aktivovanou dráhu ATM (Kudoh *et al.*, 2005).

Stejná studie, která informovala o úbytku faktoru p21, detekovala také značný úbytek E3 ubiquitin ligázy MDM2, která degraduje p53. Je ale zajímavé, že přes degradaci MDM2 nedocházelo k nahromadění p53. Předpokládá se tedy, že je MDM2 nahrazován jiným enzymem s ubiquitin ligázovou aktivitou, který umožňuje regulaci množství p53 (Kudoh *et al.*, 2005; Sato *et al.*, 2009).

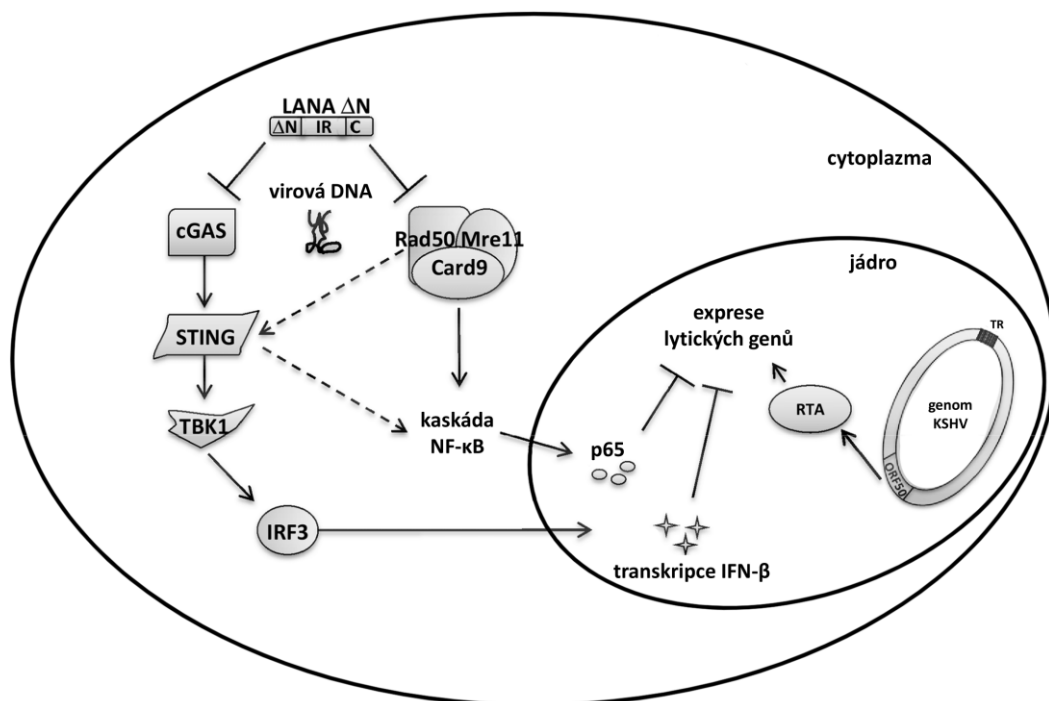
### 5.3.1.3 Virus Kaposiho sarkomu (KSHV)

Při latentní fázi perzistuje KSHV v jádře jako episom, z něž je exprimován pouze minimální počet genů. Jedním z hlavních regulátorů latence u KSHV je protein LANA (latency associated nuclear antigen), který hraje v roli v navození a udržení latence, optimální replikaci a následné správné segregaci episomálních forem do dceřiných buněk (Ballestas, Chatis and Kaye, 1999). Jednou z dalších důležitých funkcí proteinu LANA je například blokáce antigenní prezentace MHC I i MHC II molekul na povrchu buňky, což zajišťuje lepší obranu proti imunitnímu systému hostitele (Kwun *et al.*, 2011; Cai *et al.*, 2013). LANA se také může vyskytovat ve více izoformách. Ačkoli byl dříve protein LANA asociován pouze s jádrem, později bylo zjištěno, že se jeho N-terminálně zkrácená izoforma, postrádající jaderný lokalizační signál, vyskytuje i v cytoplazmě (Toptan *et al.*, 2013).

Zkrácená forma LANA se v cytoplazmě váže na senzor vrozené imunity cGAS (syntáza cyklického GMP-AMP). cGAS za normálních podmínek rozpoznává cizorodou dvouvláknovou DNA vyskytující se v cytoplazmě, která by mohla indikovat virovou infekci. Jakmile je DNA rozeznána, aktivuje se enzymatická aktivita senzoru cGAS a je jím tvořena signální molekula cGAMP vázající se

na receptor STING (stimulátor interferonových genů), což stimuluje expresi interferonových genů typu I umožňující buňce reakci na nebezpečí a signalizaci téhož i okolním buňkám. Vazbou LANA na receptor cGAS inhibuje virus tuto interferonovou dráhu, čímž si zajišťuje vhodnější podmínky pro reaktivaci z latentního do lytického cyklu (Sun *et al.*, 2013; Toptan *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2016).

Bylo zjištěno, že podobným senzorem dvouvláknové DNA v cytoplazmě mohou být i dva členové MRN komplexu MRE11 a RAD50, kteří se zde společně v komplexu s CARD9 váží na cizorodé dvouvláknové DNA a spouští podobnou signalizaci přes receptor STING expresi interferonových genů, a mimo to umožňují i aktivaci NF-κB dráhy (Kondo *et al.*, 2013; Mariggio *et al.*, 2017). Zkrácená forma proteinu LANA je v cytoplazmě schopna využívat interakce s oběma zmíněnými proteiny MRE11 a RAD50 k blokadě funkce senzoru cizorodé DNA MRE11-RAD50-CARD9, a umožnit tak inhibici exprese interferonů i NF-κB dráhy. Inhibice obou drah vede k utlumení hostitelské vrozené imunity, což zprostředkuje viru KSHV lytickou reaktivaci. (Mariggio *et al.*, 2017). Schematicky je popisovaný mechanismus znázorněn na obrázku 5.



Obrázek 5: Funkce cytoplazmatické formy virového proteinu LANA v reaktivaci z latentní do lytické fáze infekce

Zkrácená forma proteinu LANA, vyskytující se v cytoplazmě, interaguje s receptorem cGAS, čímž inhibuje jeho schopnost rozeznávat virovou DNA a signalizovat expresi interferonů typu I. Vazba téhož proteinu LANA na komplex MRE11-RAD50-CARD9 inhibuje rozeznání virové DNA tímž navazujícím mechanismem. Stejná interakce také blokuje aktivaci NF-κB dráhy. Inhibice obou těchto drah indukuje vhodnější prostředí pro lytickou reaktivaci. Převzato a upraveno z Mariggio *et al.*, 2017.

## 6 Závěr

Po rozeznání dvouvláknového zlomu DNA senzorem poškození dochází k signalizaci DDR a zlom je následně buňkou opraven jedním z dvou hlavních mechanismů, NHEJ nebo HR. Výběr opravného mechanismu závisí na fázi buněčného cyklu a dostupných proteinech. Při vstupu virů do jádra a zahájení jejich replikace často vznikají pro buňku neobvyklé struktury, které též indukují aktivaci hostitelské DDR. S buněčnými signalizačními proteiny DDR interagují všechny popisované virové čeledi, ale jejich strategie ovlivnění těchto drah jsou velice různorodé.

Viry z čeledi *Adenoviridae* potřebují pro zprostředkování svého životního cyklu předcházet aktivaci DDR. Z tohoto důvodu indukují rozdělení a přemístění členů MRN komplexu, což brání jeho funkci jako senzoru DSBs. Adenovirový protein E4 ORF6 navíc umožňuje degradaci těchto komponent MRN komplexu společně s dalšími proteiny opravných mechanismů.

Papilomaviry i herpesviry naopak vyžadují alespoň částečnou aktivaci hostitelských opravných mechanismů, protože byla detekována určitá závislost jejich replikace na rekombinaci. Pravděpodobně z tohoto důvodu jsou přesouvány hostitelské proteiny HR, včetně MRN komplexu, do virových replikačních center a u papilomavirů je dokonce zvyšováno jejich množství v buňce. U obou těchto čeledí byla detekovaná aktivovaná ATM dráha a její fosforylované intermediáty. Přesto se ukazuje, že DDR zde ve většině případů není aktivovaná kompletně, nýbrž je v určitém kroku deregulována nebo inhibována, aby bylo zabráněno zastavení buněčného cyklu nebo indukci apoptózy. Virová interakce s MRN komplexem má mimo jiné u herpesvirů využití v inhibici signálních drah vrozené imunity umožňující reaktivaci z latentní do lytické fáze infekce.

Obecně lze tedy konstatovat, že strategie virových regulací hostitelské odpovědi na poškozenou DNA se značně liší mezi jednotlivými čeleděmi a stále zůstává mnoho nejasností jak ve virových replikačních mechanismech, tak v přesném využití MRN komplexu nebo jiných komponent DDR v jejich životních cyklech.



## 7 Seznam použité literatury

\*značí sekundární zdroj

Ahn, J. *et al.* (2000) 'Threonine 68 phosphorylation by ataxia telangiectasia mutated is required for efficient activation of Chk2 in response to ionizing radiation', *Cancer research*, 60, pp. 5934–5936. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.M200822200>.

Anacker, D.C. *et al.* (2014) 'Productive Replication of Human Papillomavirus 31 Requires DNA Repair Factor Nbs1', *Journal of Virology*, 88(15), pp. 8528–8544. Available at: <https://doi.org/10.1128/JVI.00517-14>.

Arasaki, K. *et al.* (2006) 'RINT-1 Regulates the Localization and Entry of ZW10 to the Syntaxin 18 Complex', *Molecular Biology of the Cell*, 17(6), pp. 2780–2788. Available at: <https://doi.org/10.1091/mbc.e05-10-0973>.

Baker, A. *et al.* (2007) 'Adenovirus E4 34k and E1b 55k oncoproteins target host DNA ligase IV for proteasomal degradation', *Journal of Virology*, 81(13), pp. 7034–7040. Available at: <https://doi.org/10.1128/JVI.00029-07>.

Bakkenist, C.J. and Kastan, M.B. (2003) 'DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation', *Nature*, 421(6922), pp. 499–506. Available at: <https://doi.org/10.1038/nature01368>.

Balasubramanian, N. *et al.* (2010) 'Physical Interaction between the Herpes Simplex Virus Type 1 Exonuclease, UL12, and the DNA Double-Strand Break-Sensing MRN Complex', *Journal of Virology*, 84(24), pp. 12504–12514. Available at: <https://doi.org/10.1128/JVI.01506-10>.

Ballestas, M.E., Chatis, P.A. and Kaye, K.M. (1999) 'Efficient persistence of extrachromosomal KSHV DNA mediated by latency-associated nuclear antigen', *Science (New York, N.Y.)*, 284(5414), pp. 641–644. Available at: <https://doi.org/10.1126/science.284.5414.641>.

Banerjee, N.S. *et al.* (2011) 'Human Papillomavirus (HPV) E7 Induces Prolonged G2 following S Phase Reentry in Differentiated Human Keratinocytes', *The Journal of Biological Chemistry*, 286(17), pp. 15473–15482. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.197574>.

Baumann, P., Benson, F.E. and West, S.C. (1996) 'Human Rad51 Protein Promotes ATP-Dependent Homologous Pairing and Strand Transfer Reactions In Vitro', *Cell*, 87(4), pp. 757–766. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81394-X](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81394-X).

Berg, M. and Stenlund, A. (1997) 'Functional interactions between papillomavirus E1 and E2 proteins.', *Journal of Virology*, 71(5), pp. 3853–3863. Available at: <https://doi.org/10.1128/jvi.71.5.3853-3863.1997>.

Beucher, A. *et al.* (2009) 'ATM and Artemis promote homologous recombination of radiation-induced DNA double-strand breaks in G2', *The EMBO Journal*, 28(21), pp. 3413–3427. Available at: <https://doi.org/10.1038/emboj.2009.276>.

\*Bian, L. *et al.* (2019) 'MRE11-RAD50-NBS1 complex alterations and DNA damage response: implications for cancer treatment', *Molecular Cancer*, 18(1), pp. 169–182. Available at: <https://doi.org/10.1186/s12943-019-1100-5>.

\*Boehmer, P. and Nimonkar, A. (2003) 'Herpes Virus Replication', *IUBMB Life*, 55(1), pp. 13–22. Available at: <https://doi.org/10.1080/1521654031000070645>.

Boyer, J., Rohleder, K. and Ketner, G. (1999) 'Adenovirus E4 34k and E4 11k Inhibit Double Strand Break Repair and Are Physically Associated with the Cellular DNA-Dependent Protein Kinase', *Virology*, 263(2), pp. 307–312. Available at: <https://doi.org/10.1006/viro.1999.9866>.

Bridge, E. and Ketner, G. (1990) 'Interaction of adenoviral E4 and E1b products in late gene expression', *Virology*, 174(2), pp. 345–353. Available at: [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(90\)90088-9](https://doi.org/10.1016/0042-6822(90)90088-9).

\*Bristol, M.L., Das, D. and Morgan, I.M. (2017) 'Why Human Papillomaviruses Activate the DNA Damage Response (DDR) and How Cellular and Viral Replication Persists in the Presence of DDR Signaling', *Viruses*, 9(10), pp. 268–283. Available at: <https://doi.org/10.3390/v9100268>.

Brouwer, I. *et al.* (2016) 'Sliding sleeves of XRCC4-XLF bridge DNA and connect fragments of broken DNA', *Nature*, 535(7613), pp. 566–569. Available at: <https://doi.org/10.1038/nature18643>.

Brown, E.J. and Baltimore, D. (2000) 'ATR disruption leads to chromosomal fragmentation and early embryonic lethality', *Genes & Development*, 14(4), pp. 397–402. Available at: <https://doi.org/10.1101/gad.14.4.397>.

Bzymek, M. *et al.* (2010) 'Double Holliday junctions are intermediates of DNA break repair', *Nature*, 464(7290), pp. 937–941. Available at: <https://doi.org/10.1038/nature08868>.

Cai, Q. *et al.* (2013) 'IRF-4-Mediated CIITA Transcription Is Blocked by KSHV Encoded LANA to Inhibit MHC II Presentation', *PLOS Pathogens*, 9(10), p. e1003751. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003751>.

Cai, W. and Schaffer, P.A. (1992) 'Herpes simplex virus type 1 ICP0 regulates expression of immediate-early, early, and late genes in productively infected cells.', *Journal of Virology*, 66(5), pp. 2904–2915. Available at: <https://doi.org/10.1128/jvi.66.5.2904-2915.1992>.

Campos-León, K. *et al.* (2017) 'Association of Human Papillomavirus 16 E2 with Rad50-Interacting Protein 1 Enhances Viral DNA Replication', *Journal of Virology*, 91(5), p. 10.1128/jvi.02305-16. Available at: <https://doi.org/10.1128/jvi.02305-16>.

Canman, C.E. *et al.* (1998) 'Activation of the ATM Kinase by Ionizing Radiation and Phosphorylation of p53', *Science*, 281(5383), pp. 1677–1679. Available at: <https://doi.org/10.1126/science.281.5383.1677>.

Cannon, B. *et al.* (2013) 'Visualization of local DNA unwinding by Mre11/Rad50/Nbs1 using single-molecule FRET', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(47), pp. 18868–18873. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.1309816110>.

Carson, C.T. *et al.* (2009) 'Mislocalization of the MRN complex prevents ATR signaling during adenovirus infection', *The EMBO Journal*, 28(6), pp. 652–662. Available at: <https://doi.org/10.1038/emboj.2009.15>.

\*Chang, H.H.Y. *et al.* (2017) 'Non-homologous DNA end joining and alternative pathways to double-strand break repair', *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 18(8), pp. 495–506. Available at: <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.48>.

\*Chang, H.R. *et al.* (2018) 'The functional roles of PML nuclear bodies in genome maintenance', *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 809, pp. 99–107. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2017.05.002>.

\*Charman, M., Herrmann, C. and Weitzman, M.D. (2019) 'Viral and Cellular Interactions During Adenovirus DNA Replication', *FEBS letters*, 593(24), pp. 3531–3550. Available at: <https://doi.org/10.1002/1873-3468.13695>.

Couch, F.J. *et al.* (1997) 'BRCA1 Mutations in Women Attending Clinics That Evaluate the Risk of Breast Cancer', *New England Journal of Medicine*, 336(20), pp. 1409–1415. Available at: <https://doi.org/10.1056/NEJM199705153362002>.

De Jager, M. *et al.* (2001) 'Human Rad50/Mre11 Is a Flexible Complex that Can Tether DNA Ends', *Molecular Cell*, 8(5), pp. 1129–1135. Available at: [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(01\)00381-1](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(01)00381-1).

Doil, C. *et al.* (2009) 'RNF168 Binds and Amplifies Ubiquitin Conjugates on Damaged Chromosomes to Allow Accumulation of Repair Proteins', *Cell*, 136(3), pp. 435–446. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.12.041>.

Domínguez, O. *et al.* (2000) 'DNA polymerase mu (Pol  $\mu$ ), homologous to TdT, could act as a DNA mutator in eukaryotic cells', *The EMBO Journal*, 19(7), pp. 1731–1742. Available at: <https://doi.org/10.1093/emboj/19.7.1731>.

Doucas, V. *et al.* (1996) 'Adenovirus replication is coupled with the dynamic properties of the PML nuclear structure.', *Genes & Development*, 10(2), pp. 196–207. Available at: <https://doi.org/10.1101/gad.10.2.196>.

Dutch, R.E. *et al.* (1992) 'Herpes simplex virus type 1 recombination: role of DNA replication and viral a sequences.', *Journal of Virology*, 66(1), pp. 277–285. Available at: <https://doi.org/10.1128/jvi.66.1.277-285.1992>.

Dyck, J.A. *et al.* (1994) 'A novel macromolecular structure is a target of the promyelocyte-retinoic acid receptor oncoprotein', *Cell*, 76(2), pp. 333–343. Available at: [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(94\)90340-9](https://doi.org/10.1016/0092-8674(94)90340-9).

Egglar, A.L., Inman, R.B. and Cox, M.M. (2002) 'The Rad51-dependent Pairing of Long DNA Substrates Is Stabilized by Replication Protein A\*', *Journal of Biological Chemistry*, 277(42), pp. 39280–39288. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.M204328200>.

\*Engeland, K. (2022) 'Cell cycle regulation: p53-p21-RB signaling', *Cell Death & Differentiation*, 29(5), pp. 946–960. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41418-022-00988-z>.

Evans, J.D. and Hearing, P. (2005) 'Relocalization of the Mre11-Rad50-Nbs1 Complex by the Adenovirus E4 ORF3 Protein Is Required for Viral Replication', *Journal of Virology*, 79(10), pp. 6207–6215. Available at: <https://doi.org/10.1128/jvi.79.10.6207-6215.2005>.

Everett, R.D. *et al.* (1998) 'The Disruption of ND10 during Herpes Simplex Virus Infection Correlates with the Vmw110- and Proteasome-Dependent Loss of Several PML Isoforms', *Journal of Virology*, 72(8), pp. 6581–6591. Available at: <https://doi.org/10.1128/jvi.72.8.6581-6591.1998>.

Fabbro, M. *et al.* (2004) 'BRCA1-BARD1 Complexes Are Required for p53Ser-15 Phosphorylation and a G1/S Arrest following Ionizing Radiation-induced DNA Damage \*', *Journal of Biological Chemistry*, 279(30), pp. 31251–31258. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.M405372200>.

Finlay, C.A. (1993) 'The mdm-2 oncogene can overcome wild-type p53 suppression of transformed cell growth.', *Molecular and Cellular Biology*, 13(1), pp. 301–306. Available at: <https://doi.org/10.1128/mcb.13.1.301-306.1993>.

- Flores, E.R. and Lambert, P.F. (1997) 'Evidence for a switch in the mode of human papillomavirus type 16 DNA replication during the viral life cycle.', *Journal of Virology*, 71(10), pp. 7167–7179.
- Ford, D. *et al.* (1998) 'Genetic heterogeneity and penetrance analysis of the BRCA1 and BRCA2 genes in breast cancer families. The Breast Cancer Linkage Consortium.', *American Journal of Human Genetics*, 62(3), pp. 676–689. Available at: <https://doi.org/10.1086/301749>.
- Gatei, M. *et al.* (2001) 'Ataxia Telangiectasia Mutated (ATM) Kinase and ATM and Rad3 Related Kinase Mediate Phosphorylation of Brca1 at Distinct and Overlapping Sites', *Journal of Biological Chemistry*, 276(20), pp. 17276–17280. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.M011681200>.
- Gatei, M. *et al.* (2011) 'ATM Protein-dependent Phosphorylation of Rad50 Protein Regulates DNA Repair and Cell Cycle Control \*', *Journal of Biological Chemistry*, 286(36), pp. 31542–31556. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.258152>.
- Gillespie, K.A. *et al.* (2012) 'Human Papillomaviruses Recruit Cellular DNA Repair and Homologous Recombination Factors to Viral Replication Centers', *Journal of Virology*, 86(17), pp. 9520–9526. Available at: <https://doi.org/10.1128/JVI.00247-12>.
- Goodarzi, A.A. *et al.* (2006) 'DNA-PK autophosphorylation facilitates Artemis endonuclease activity', *The EMBO Journal*, 25(16), pp. 3880–3889. Available at: <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601255>.
- Grawunder, U. *et al.* (1997) 'Activity of DNA ligase IV stimulated by complex formation with XRCC4 protein in mammalian cells', *Nature*, 388(6641), pp. 492–495. Available at: <https://doi.org/10.1038/41358>.
- Gu, J. *et al.* (2007) 'XRCC4:DNA ligase IV can ligate incompatible DNA ends and can ligate across gaps', *The EMBO Journal*, 26(4), pp. 1010–1023. Available at: <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601559>.
- Haering, C.H. *et al.* (2002) 'Molecular Architecture of SMC Proteins and the Yeast Cohesin Complex', *Molecular Cell*, 9(4), pp. 773–788. Available at: [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(02\)00515-4](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(02)00515-4).
- Hanasoge, S. and Ljungman, M. (2007) 'H2AX phosphorylation after UV irradiation is triggered by DNA repair intermediates and is mediated by the ATR kinase', *Carcinogenesis*, 28(11), pp. 2298–2304. Available at: <https://doi.org/10.1093/carcin/bgm157>.
- Harada, J.N. *et al.* (2002) 'Analysis of the Adenovirus E1B-55K-Anchored Proteome Reveals Its Link to Ubiquitination Machinery', *Journal of Virology*, 76(18), pp. 9194–9206. Available at: <https://doi.org/10.1128/JVI.76.18.9194-9206.2002>.
- Hashizume, R. *et al.* (2001) 'The RING Heterodimer BRCA1-BARD1 Is a Ubiquitin Ligase Inactivated by a Breast Cancer-derived Mutation\*', *Journal of Biological Chemistry*, 276(18), pp. 14537–14540. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.C000881200>.
- Haupt, Y. *et al.* (1997) 'Mdm2 promotes the rapid degradation of p53', *Nature*, 387(6630), pp. 296–299. Available at: <https://doi.org/10.1038/387296a0>.
- Hengst, L. *et al.* (1998) 'Complete inhibition of Cdk/cyclin by one molecule of p21Cip1', *Genes & Development*, 12(24), pp. 3882–3888. Available at: <https://doi.org/10.1101/gad.12.24.3882>.

Hirose, H. *et al.* (2004) 'Implication of ZW10 in membrane trafficking between the endoplasmic reticulum and Golgi', *The EMBO Journal*, 23(6), pp. 1267–1278. Available at: <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600135>.

Hoja, N.N. *et al.* (2016) 'Mre11 Is Essential for the Removal of Lethal Topoisomerase 2 Covalent Cleavage Complexes', *Molecular Cell*, 64(3), pp. 580–592. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.10.011>.

\*Hoeben, R.C. and Uil, T.G. (2013) 'Adenovirus DNA Replication', *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 5(3), p. a013003. Available at: <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a013003>.

Honda, R., Tanaka, H. and Yasuda, H. (1997) 'Oncoprotein MDM2 is a ubiquitin ligase E3 for tumor suppressor p53', *FEBS Letters*, 420(1), pp. 25–27. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(97\)01480-4](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(97)01480-4).

\*Hong, S. and Laimins, L.A. (2013) 'Regulation of the life cycle of HPVs by differentiation and the DNA damage response', *Future microbiology*, 8, pp. 1547–1557. Available at: <https://doi.org/10.2217/fmb.13.127>.

Hopfner, K.-P. *et al.* (2001) 'Structural Biochemistry and Interaction Architecture of the DNA Double-Strand Break Repair Mre11 Nuclease and Rad50-ATPase', *Cell*, 105(4), pp. 473–485. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(01\)00335-X](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(01)00335-X).

Hopfner, K.-P. *et al.* (2002) 'The Rad50 zinc-hook is a structure joining Mre11 complexes in DNA recombination and repair', *Nature*, 418(6897), pp. 562–566. Available at: <https://doi.org/10.1038/nature00922>.

Howes, A.C., Perisic, O. and Williams, R.L. (2023) 'Structural insights into the activation of ataxia-telangiectasia mutated by oxidative stress', *Science Advances*, 9(39), p. eadi8291. Available at: <https://doi.org/10.1126/sciadv.adi8291>.

Huang, M.M. and Hearing, P. (1989) 'Adenovirus early region 4 encodes two gene products with redundant effects in lytic infection.', *Journal of Virology*, 63(6), pp. 2605–2615. Available at: <https://doi.org/10.1128/jvi.63.6.2605-2615.1989>.

Huen, M.S.Y. *et al.* (2007) 'RNF8 Transduces the DNA-Damage Signal via Histone Ubiquitylation and Checkpoint Protein Assembly', *Cell*, 131(5), pp. 901–914. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.09.041>.

\*Jackson, S.P. and Bartek, J. (2009) 'The DNA-damage response in human biology and disease', *Nature*, 461(7267), pp. 1071–1078. Available at: <https://doi.org/10.1038/nature08467>.

Jensen, R.B., Carreira, A. and Kowalczykowski, S.C. (2010) 'Purified human BRCA2 stimulates RAD51-mediated recombination', *Nature*, 467(7316), pp. 678–683. Available at: <https://doi.org/10.1038/nature09399>.

Kadaja, M. *et al.* (2009) 'Mechanism of Genomic Instability in Cells Infected with the High-Risk Human Papillomaviruses', *PLoS Pathogens*, 5(4), p. e1000397. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000397>.

Kijas, A.W. *et al.* (2015) 'ATM-dependent phosphorylation of MRE11 controls extent of resection during homology directed repair by signalling through Exonuclease 1', *Nucleic Acids Research*, 43(17), pp. 8352–8367. Available at: <https://doi.org/10.1093/nar/gkv754>.

Kolas, N.K. *et al.* (2007) 'Orchestration of the DNA-Damage Response by the RNF8 Ubiquitin Ligase', *Science*, 318(5856), pp. 1637–1640. Available at: <https://doi.org/10.1126/science.1150034>.

Kondo, T. *et al.* (2013) 'DNA damage sensor MRE11 recognizes cytosolic double-stranded DNA and induces type I interferon by regulating STING trafficking', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(8), pp. 2969–2974. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.1222694110>.

Kudoh, A. *et al.* (2005) 'Epstein-Barr Virus Lytic Replication Elicits ATM Checkpoint Signal Transduction While Providing an S-phase-like Cellular Environment\*', *Journal of Biological Chemistry*, 280(9), pp. 8156–8163. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.M411405200>.

Kudoh, A. *et al.* (2009) 'Homologous Recombinational Repair Factors Are Recruited and Loaded onto the Viral DNA Genome in Epstein-Barr Virus Replication Compartments', *Journal of Virology*, 83(13), pp. 6641–6651. Available at: <https://doi.org/10.1128/JVI.00049-09>.

Kwun, H.J. *et al.* (2011) 'The central repeat domain 1 of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (KSHV) latency associated-nuclear antigen 1 (LANA1) prevents cis MHC class I peptide presentation', *Virology*, 412(2), pp. 357–365. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.virol.2011.01.026>.

Lee, J.-H. and Paull, T.T. (2004) 'Direct Activation of the ATM Protein Kinase by the Mre11/Rad50/Nbs1 Complex', *Science*, 304(5667), pp. 93–96. Available at: <https://doi.org/10.1126/science.1091496>.

Leverrier, S. *et al.* (2007) 'Role of HPV E6 proteins in preventing UVB-induced release of pro-apoptotic factors from the mitochondria', *Apoptosis*, 12(3), pp. 549–560. Available at: <https://doi.org/10.1007/s10495-006-0004-1>.

Li, H. *et al.* (2008) 'Chk2 is required for HSV-1 ICP0-mediated G2/M arrest and enhancement of virus growth', *Virology*, 375(1), pp. 13–23. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.virol.2008.01.038>.

Li, X. *et al.* (2009) 'PCNA is required for initiation of recombination-associated DNA synthesis by DNA polymerase  $\delta$ ', *Molecular cell*, 36(4), pp. 704–713. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2009.09.036>.

Liblekas, L. *et al.* (2021) 'Analysis of the Replication Mechanisms of the Human Papillomavirus Genomes', *Frontiers in Microbiology*, 12. Available at: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.738125>.

Lilley, C.E. *et al.* (2010) 'A viral E3 ligase targets RNF8 and RNF168 to control histone ubiquitination and DNA damage responses', *The EMBO Journal*, 29(5), pp. 943–955. Available at: <https://doi.org/10.1038/emboj.2009.400>.

Lin, X. *et al.* (2007) 'RINT-1 Serves as a Tumor Suppressor and Maintains Golgi Dynamics and Centrosome Integrity for Cell Survival', *Molecular and Cellular Biology*, 27(13), pp. 4905–4916. Available at: <https://doi.org/10.1128/MCB.02396-06>.

Liu, Y. *et al.* (2016) 'ATP-dependent DNA binding, unwinding, and resection by the Mre11/Rad50 complex', *The EMBO Journal*, 35(7), pp. 743–758. Available at: <https://doi.org/10.15252/emboj.201592462>.

- Lloyd, J. *et al.* (2009) 'A Supramodular FHA/BRCT-Repeat Architecture Mediates Nbs1 Adaptor Function in Response to DNA Damage', *Cell*, 139(1), pp. 100–111. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.07.043>.
- Ma, Y. *et al.* (2002) 'Hairpin Opening and Overhang Processing by an Artemis/DNA-Dependent Protein Kinase Complex in Nonhomologous End Joining and V(D)J Recombination', *Cell*, 108(6), pp. 781–794. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)00671-2](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)00671-2).
- Ma, Y. *et al.* (2004) 'A Biochemically Defined System for Mammalian Nonhomologous DNA End Joining', *Molecular Cell*, 16(5), pp. 701–713. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2004.11.017>.
- Manke, I.A. *et al.* (2003) 'BRCT Repeats As Phosphopeptide-Binding Modules Involved in Protein Targeting', *Science*, 302(5645), pp. 636–639. Available at: <https://doi.org/10.1126/science.1088877>.
- Männik, A. *et al.* (2002) 'Induction of the Bovine Papillomavirus Origin "Onion Skin"-Type DNA Replication at High E1 Protein Concentrations In Vivo', *Journal of Virology*, 76(11), pp. 5835–5845. Available at: <https://doi.org/10.1128/jvi.76.11.5835-5845.2002>.
- Mari, P.-O. *et al.* (2006) 'Dynamic assembly of end-joining complexes requires interaction between Ku70/80 and XRCC4', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(49), pp. 18597–18602. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.0609061103>.
- Mariggio, G. *et al.* (2017) 'Kaposi Sarcoma Herpesvirus (KSHV) Latency-Associated Nuclear Antigen (LANA) recruits components of the MRN (Mre11-Rad50-NBS1) repair complex to modulate an innate immune signaling pathway and viral latency', *PLOS Pathogens*, 13(4), p. e1006335. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006335>.
- Matsuoka, S. *et al.* (2000) 'Ataxia telangiectasia-mutated phosphorylates Chk2 in vivo and in vitro', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(19), pp. 10389–10394. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.190030497>.
- Maya, R. *et al.* (2001) 'ATM-dependent phosphorylation of Mdm2 on serine 395: role in p53 activation by DNA damage', *Genes & Development*, 15(9), pp. 1067–1077. Available at: <https://doi.org/10.1101/gad.886901>.
- Mayo, L.D., Turchi, J.J. and Berberich, S.J. (1997) 'Mdm-2 phosphorylation by DNA-dependent protein kinase prevents interaction with p53', *Cancer Research*, 57(22), pp. 5013–5016.
- \*McBride, A.A. (2017) 'Mechanisms and strategies of papillomavirus replication', *Biological Chemistry*, 398(8), pp. 919–927. Available at: <https://doi.org/10.1515/hsz-2017-0113>.
- Mimitou, E.P. and Symington, L.S. (2010) 'Ku prevents Exo1 and Sgs1-dependent resection of DNA ends in the absence of a functional MRX complex or Sae2', *The EMBO journal*, 29(19), pp. 3358–3369. Available at: <https://doi.org/10.1038/emboj.2010.193>.
- Möckel, C. *et al.* (2012) 'ATP driven structural changes of the bacterial Mre11:Rad50 catalytic head complex', *Nucleic Acids Research*, 40(2), pp. 914–927. Available at: <https://doi.org/10.1093/nar/gkr749>.
- Mohni, K.N. *et al.* (2010) 'ATR and ATRIP Are Recruited to Herpes Simplex Virus Type 1 Replication Compartments Even though ATR Signaling Is Disabled', *Journal of Virology*, 84(23), pp. 12152–12164. Available at: <https://doi.org/10.1128/JVI.01643-10>.

- Moody, C.A. and Laimins, L.A. (2009) 'Human Papillomaviruses Activate the ATM DNA Damage Pathway for Viral Genome Amplification upon Differentiation', *PLoS Pathogens*, 5(10), p. e1000605. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000605>.
- Neuwald, A.F. and Hirano, T. (2000) 'HEAT Repeats Associated with Condensins, Cohesins, and Other Complexes Involved in Chromosome-Related Functions', *Genome Research*, 10(10), pp. 1445–1452. Available at: <https://doi.org/10.1101/gr.147400>.
- Nimonkar, A.V. *et al.* (2011) 'BLM–DNA2–RPA–MRN and EXO1–BLM–RPA–MRN constitute two DNA end resection machineries for human DNA break repair', *Genes & Development*, 25(4), pp. 350–362. Available at: <https://doi.org/10.1101/gad.2003811>.
- Olive, P.L. (2004) 'Detection of DNA Damage in Individual Cells by Analysis of Histone H2AX Phosphorylation', in *Methods in Cell Biology*. Academic Press (Cytometry, 4th Edition: New Developments), pp. 355–373. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0091-679X\(04\)75014-1](https://doi.org/10.1016/S0091-679X(04)75014-1).
- Orazio, N.I. *et al.* (2011) 'The Adenovirus E1b55K/E4orf6 Complex Induces Degradation of the Bloom Helicase during Infection', *Journal of Virology*, 85(4), pp. 1887–1892. Available at: <https://doi.org/10.1128/jvi.02134-10>.
- Parkinson, J., Lees-Miller, S.P. and Everett, R.D. (1999) 'Herpes Simplex Virus Type 1 Immediate-Early Protein Vmw110 Induces the Proteasome-Dependent Degradation of the Catalytic Subunit of DNA-Dependent Protein Kinase', *Journal of Virology*, 73(1), pp. 650–657. Available at: <https://doi.org/10.1128/jvi.73.1.650-657.1999>.
- Paull, T.T. *et al.* (2000) 'A critical role for histone H2AX in recruitment of repair factors to nuclear foci after DNA damage', *Current Biology*, 10(15), pp. 886–895. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(00\)00610-2](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(00)00610-2).
- Pierce, A.J. *et al.* (2001) 'Ku DNA end-binding protein modulates homologous repair of double-strand breaks in mammalian cells', *Genes & Development*, 15(24), pp. 3237–3242. Available at: <https://doi.org/10.1101/gad.946401>.
- Querido, E. *et al.* (2001) 'Identification of Three Functions of the Adenovirus E4orf6 Protein That Mediate p53 Degradation by the E4orf6-E1B55K Complex', *Journal of Virology*, 75(2), pp. 699–709. Available at: <https://doi.org/10.1128/jvi.75.2.699-709.2001>.
- Ramsden, D.A. and Gellert, M. (1998) 'Ku protein stimulates DNA end joining by mammalian DNA ligases: a direct role for Ku in repair of DNA double-strand breaks', *The EMBO Journal*, 17(2), pp. 609–614. Available at: <https://doi.org/10.1093/emboj/17.2.609>.
- \*Ranjha, L., Howard, S.M. and Cejka, P. (2018) 'Main steps in DNA double-strand break repair: an introduction to homologous recombination and related processes', *Chromosoma*, 127(2), pp. 187–214. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00412-017-0658-1>.
- \*Reginato, G. and Cejka, P. (2020) 'The MRE11 complex: A versatile toolkit for the repair of broken DNA', *DNA Repair*, 91–92, pp. 102869–102881. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2020.102869>.
- Reuven, N.B. *et al.* (2003) 'The Herpes Simplex Virus Type 1 Alkaline Nuclease and Single-Stranded DNA Binding Protein Mediate Strand Exchange In Vitro', *Journal of Virology*, 77(13), pp. 7425–7433. Available at: <https://doi.org/10.1128/JVI.77.13.7425-7433.2003>.



Rogakou, E.P. *et al.* (1998) 'DNA Double-stranded Breaks Induce Histone H2AX Phosphorylation on Serine 139 \*', *Journal of Biological Chemistry*, 273(10), pp. 5858–5868. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.273.10.5858>.

Sakakibara, N., Mitra, R. and McBride, A.A. (2011) 'The Papillomavirus E1 Helicase Activates a Cellular DNA Damage Response in Viral Replication Foci †', *Journal of Virology*, 85(17), pp. 8981–8995. Available at: <https://doi.org/10.1128/JVI.00541-11>.

Sartori, A.A. *et al.* (2007) 'Human CtIP promotes DNA end resection', *Nature*, 450(7169), pp. 509–514. Available at: <https://doi.org/10.1038/nature06337>.

Sato, Y. *et al.* (2009) 'Degradation of Phosphorylated p53 by Viral Protein-ECS E3 Ligase Complex', *PLoS Pathogens*, 5(7), p. e1000530. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000530>.

Scully, R. *et al.* (2019) 'DNA double-strand break repair-pathway choice in somatic mammalian cells', *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 20(11), pp. 698–714. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41580-019-0152-0>.

Shibata, A. *et al.* (2014) 'DNA Double Strand Break Repair Pathway Choice Is Directed by Distinct MRE11 Nuclease Activities', *Molecular cell*, 53(1), pp. 7–18. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2013.11.003>.

Shirata, N. *et al.* (2005) 'Activation of Ataxia Telangiectasia-mutated DNA Damage Checkpoint Signal Transduction Elicited by Herpes Simplex Virus Infection \*', *Journal of Biological Chemistry*, 280(34), pp. 30336–30341. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.M500976200>.

Singh, V.V. *et al.* (2014) 'Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus Induces the ATM and H2AX DNA Damage Response Early during De Novo Infection of Primary Endothelial Cells, Which Play Roles in Latency Establishment', *Journal of Virology*, 88(5), pp. 2821–2834. Available at: <https://doi.org/10.1128/JVI.03126-13>.

\*Smith, H.L. *et al.* (2020) 'DNA damage checkpoint kinases in cancer', *Expert Reviews in Molecular Medicine*, 22, p. e2. Available at: <https://doi.org/10.1017/erm.2020.3>.

Solinger, J.A., Kiianitsa, K. and Heyer, W.-D. (2002) 'Rad54, a Swi2/Snf2-like Recombinational Repair Protein, Disassembles Rad51:dsDNA Filaments', *Molecular Cell*, 10(5), pp. 1175–1188. Available at: [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(02\)00743-8](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(02)00743-8).

Stanchina, E. de *et al.* (1998) 'E1A signaling to p53 involves the p19ARF tumor suppressor', *Genes & Development*, 12(15), pp. 2434–2442. Available at: <https://doi.org/10.1101/gad.12.15.2434>.

Stracker, T.H., Carson, C.T. and Weitzman, M.D. (2002) 'Adenovirus oncoproteins inactivate the Mre11–Rad50–NBS1 DNA repair complex', *Nature*, 418(6895), pp. 348–352. Available at: <https://doi.org/10.1038/nature00863>.

Stucki, M. *et al.* (2005) 'MDC1 Directly Binds Phosphorylated Histone H2AX to Regulate Cellular Responses to DNA Double-Strand Breaks', *Cell*, 123(7), pp. 1213–1226. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.09.038>.

Sun, L. *et al.* (2013) 'Cyclic GMP-AMP Synthase is a Cytosolic DNA Sensor that Activates the Type-I Interferon Pathway', *Science (New York, N.Y.)*, 339(6121), p. 10.1126/science.1232458. Available at: <https://doi.org/10.1126/science.1232458>.

Tibbetts, R.S. *et al.* (1999) 'A role for ATR in the DNA damage-induced phosphorylation of p53', *Genes & Development*, 13(2), pp. 152–157. Available at: <http://dx.doi.org/10.1101/gad.13.2.152>.

Toptan, T. *et al.* (2013) 'Complex Alternative Cytoplasmic Protein Isoforms of the Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus Latency-Associated Nuclear Antigen 1 Generated through Noncanonical Translation Initiation', *Journal of Virology*, 87(5), pp. 2744–2755. Available at: <https://doi.org/10.1128/JVI.03061-12>.

\*Turnell, A.S. and Grand, R.J. (2012) 'DNA viruses and the cellular DNA-damage response', *Journal of General Virology*, 93(10), pp. 2076–2097. Available at: <https://doi.org/10.1099/vir.0.044412-0>.

Ueda, N. and Shah, S.V. (1992) *Endonuclease-induced DNA damage and cell death in oxidant injury to renal tubular epithelial cells*. American Society for Clinical Investigation. pp. 2593-2597 Available at: <https://doi.org/10.1172/JCI116154>.

Ullman, A.J., Reich, N.C. and Hearing, P. (2007) 'Adenovirus E4 ORF3 Protein Inhibits the Interferon-Mediated Antiviral Response', *Journal of Virology*, 81(9), pp. 4744–4752. Available at: <https://doi.org/10.1128/jvi.02385-06>.

Usui, T. *et al.* (1998) 'Complex Formation and Functional Versatility of Mre11 of Budding Yeast in Recombination', *Cell*, 95(5), pp. 705–716. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81640-2](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81640-2).

Van Gent, D.C. *et al.* (1995) 'Initiation of V(D)J recombination in a cell-free system', *Cell*, 81(6), pp. 925–934. Available at: [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90012-8](https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90012-8).

Varon, R. *et al.* (1998) 'Nibrin, a Novel DNA Double-Strand Break Repair Protein, Is Mutated in Nijmegen Breakage Syndrome', *Cell*, 93(3), pp. 467–476. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81174-5](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81174-5).

Walboomers, J.M. *et al.* (1999) 'Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide', *The Journal of Pathology*, 189(1), pp. 12–19. Available at: [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9896\(199909\)189:1<12::AID-PATH431>3.0.CO;2-F](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9896(199909)189:1<12::AID-PATH431>3.0.CO;2-F).

Walker, J.R., Corpina, R.A. and Goldberg, J. (2001) 'Structure of the Ku heterodimer bound to DNA and its implications for double-strand break repair', *Nature*, 412(6847), pp. 607–614. Available at: <https://doi.org/10.1038/35088000>.

Weiden, M.D. and Ginsberg, H.S. (1994) 'Deletion of the E4 region of the genome produces adenovirus DNA concatemers.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(1), pp. 153–157. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.91.1.153>.

\*Weller, S.K. and Coen, D.M. (2012) 'Herpes Simplex Viruses: Mechanisms of DNA Replication', *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 4(9), p. a013011. Available at: <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a013011>.

Wilkinson, D.E. and Weller, S.K. (2004) 'Recruitment of Cellular Recombination and Repair Proteins to Sites of Herpes Simplex Virus Type 1 DNA Replication Is Dependent on the Composition of Viral Proteins within Prereplicative Sites and Correlates with the Induction of the DNA Damage Response', *Journal of Virology*, 78(9), pp. 4783–4796. Available at: <https://doi.org/10.1128/JVI.78.9.4783-4796.2004>.

Williams, R.S. *et al.* (2008) 'Mre11 Dimers Coordinate DNA End Bridging and Nuclease Processing in Double-Strand-Break Repair', *Cell*, 135(1), pp. 97–109. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.08.017>.

\*Wu, J., Lu, L.-Y. and Yu, X. (2010) 'The role of BRCA1 in DNA damage response', *Protein & Cell*, 1(2), pp. 117–123. Available at: <https://doi.org/10.1007/s13238-010-0010-5>.

Xiao, J. *et al.* (2001) 'RINT-1, a Novel Rad50-interacting Protein, Participates in Radiation-induced G2/M Checkpoint Control \*', *Journal of Biological Chemistry*, 276(9), pp. 6105–6111. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.M008893200>.

Xiao, Z. *et al.* (2003) 'Chk1 Mediates S and G2 Arrests through Cdc25A Degradation in Response to DNA-damaging Agents \*', *Journal of Biological Chemistry*, 278(24), pp. 21767–21773. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.M300229200>.

Xing, M. *et al.* (2015) 'Interactome analysis identifies a new paralogue of XRCC4 in non-homologous end joining DNA repair pathway', *Nature Communications*, 6, pp. 6233–6244. Available at: <https://doi.org/10.1038/ncomms7233>.

\*Xu, J., Bradley, N. and He, Y. (2023) 'Structure and function of the apical PIKKs in double-strand break repair', *Current Opinion in Structural Biology*, 82, p. 102651. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2023.102651>.

Yang, H. *et al.* (2005) 'The BRCA2 homologue Brh2 nucleates RAD51 filament formation at a dsDNA–ssDNA junction', *Nature*, 433(7026), pp. 653–657. Available at: <https://doi.org/10.1038/nature03234>.

Yao, X.D., Matecic, M. and Elias, P. (1997) 'Direct repeats of the herpes simplex virus a sequence promote nonconservative homologous recombination that is not dependent on XPF/ERCC4.', *Journal of Virology*, 71(9), pp. 6842–6849. Available at: <https://doi.org/10.1128/jvi.71.9.6842-6849.1997>.

Yates, J.L. and Guan, N. (1991) 'Epstein-Barr virus-derived plasmids replicate only once per cell cycle and are not amplified after entry into cells.', *Journal of Virology*, 65(1), pp. 483–488. Available at: <https://doi.org/10.1128/jvi.65.1.483-488.1991>.

Zaitseva, E.M., Zaitsev, E.N. and Kowalczykowski, S.C. (1999) 'The DNA Binding Properties of *Saccharomyces cerevisiae* Rad51 Protein\*', *Journal of Biological Chemistry*, 274(5), pp. 2907–2915. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.274.5.2907>.

Zhang, G. *et al.* (2016) 'Cytoplasmic isoforms of Kaposi sarcoma herpesvirus LANA recruit and antagonize the innate immune DNA sensor cGAS', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(8), pp. E1034–E1043. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.1516812113>.

Zhao, S. *et al.* (2000) 'Functional link between ataxia-telangiectasia and Nijmegen breakage syndrome gene products', *Nature*, 405(6785), pp. 473–477. Available at: <https://doi.org/10.1038/35013083>.

Zhao, S., Renthal, W. and Lee, E.Y. -H. P. (2002) 'Functional analysis of FHA and BRCT domains of NBS1 in chromatin association and DNA damage responses', *Nucleic Acids Research*, 30(22), pp. 4815–4822. Available at: <https://doi.org/10.1093/nar/gkf612>.

Zhao, W. *et al.* (2017) 'Promotion of RAD51-mediated homologous DNA pairing by BRCA1-BARD1', *Nature*, 550(7676), pp. 360–365. Available at: <https://doi.org/10.1038/nature24060>.

\*Zhou, B.-B.S. and Elledge, S.J. (2000) 'The DNA damage response: putting checkpoints in perspective', *Nature*, 408(6811), pp. 433–439. Available at: <https://doi.org/10.1038/35044005>.

Zhou, C. *et al.* (2006) 'DNA damage evaluated by  $\gamma$ H2AX foci formation by a selective group of chemical/physical stressors', *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 604(1), pp. 8–18. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2005.12.004>.

Zou, L. and Elledge, S.J. (2003) 'Sensing DNA Damage Through ATRIP Recognition of RPA-ssDNA Complexes', *Science*, 300(5625), pp. 1542–1548. Available at: <https://doi.org/10.1126/science.1083430>.