

Svoluji k zapůjčení své diplomové práce ke studijním účelům a prosím, aby byla vedena přesná evidence vypůjčovatelů. Převzaté údaje je vypůjčovatel povinen řádně ocitovat.

**Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Genetika, molekulární biologie a virologie

Studijní specializace: Virologie



Bc. Jana Bártová

Interakce myšího polyomaviru s jadernými proteiny
Interactions of mouse polyomavirus with nuclear proteins

Diplomová práce

Školitel: Mgr. Vojtěch Šroller, Ph.D.

Praha, 2024

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, 11.12.2024

Podpis

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

Poděkování

Tímto bych ráda poděkovala svému školiteli Mgr. Vojtěchu Šrollerovi, Ph.D. za veškerou pomoc, velkou trpělivost a ochotu při vedení mé diplomové práce. Mgr. Borisi Rjabčenkovi, Ph.D. děkuji za pomoc s konfokální mikroskopií. Děkuji také zakladatelce Laboratoře virologie doc. RNDr. Jitce Forstové, CSc. a vedoucí laboratoře Sandře Huerfano Meneses, Ph.D. za přijetí do laboratoře, a celému kolektivu laboratoře za vytvoření příjemného pracovního prostředí a cenné rady. V neposlední řadě děkuji své rodině za podporu během celého studia.

Abstrakt

Průběh polyomavírové infekce může být v jádře regulován řadou buněčných proteinů. K replikaci myšího polyomaviru (MPyV) v buněčném jádře dochází v těsné blízkosti jaderných tělísek PML, jejichž součástí je i protein DAXX. DAXX je restričním faktorem mnoha virů, byl však popsán také jeho pozitivní vliv na replikaci některých herpesvirů a papilomavirů. První část této práce se soustředila na vliv proteinu DAXX na replikační cyklus MPyV. V buňkách s potlačenou expresí DAXX byl pozorován pokles replikace virové DNA a nižší hladiny časných i pozdních virových transkriptů. Výsledky naznačují pozitivní vliv proteinu DAXX na replikaci MPyV. Dalším cílem bylo připravit buněčnou linii *DAXX*KO pro studium vlivu DAXX na infekci BK polyomavirem. Modifikace byla provedena systémem CRISPR/Cas9, byly izolovány potenciální *DAXX* KO buněčné klony, u kterých bude dále ověřena delece genu *DAXX*.

Druhá část diplomové práce byla zaměřena na interakce velkého T antigenu (LT) MPyV s buněčnými proteiny. V návaznosti na data získaná studiem interaktomu LT antigenu MPyV (experimenty provedené Mgr. Karolínou Štaflovou, Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, skupina Ing. Ivy Pichové, CSc.) byla sledována vzájemná lokalizace LT a vybraných buněčných proteinů. Byla pozorována kolokalizace LT s proteiny BAF57, BAG2, PRC1, WDR48 a MKK3. V případě proteinů NONO a SMC4 ke kolokalizaci nedocházelo. Z uvedených interakčních partnerů LT jsme se dále zaměřili na kinázu MKK3, která je součástí MAP kinázové dráhy p38. MKK3 kolokalizovala s LT v infikovaných buňkách i v neinfikovaných buňkách exprimujících LT. V infikovaných buňkách bylo detekováno snížené množství proteinu MKK3, a naopak zvýšení aktivity kinázy p38. Snížení exprese MKK3 pomocí siRNA nemělo vliv na počet buněk infikovaných MPyV ani na množství produkovaných infekčních virionů. Výsledky naznačují, že kináza MKK3 nemá významný vliv na infekci MPyV.

Klíčová slova: myší polyomavirus, DAXX, velký T antigen, MKK3, MAP kináza, p38

Abstract

The course of polyomavirus infection can be regulated in the nucleus by a number of cellular proteins. Replication of mouse polyomavirus (MPyV) in the cell nucleus occurs in close proximity to PML nuclear bodies, which also contain the DAXX protein. DAXX is a restriction factor for many viruses, but its positive effect on the replication of some herpesviruses and papillomaviruses has also been described. The first part of this work focused on the influence of DAXX protein on MPyV replication cycle. A decrease in viral DNA replication and lower levels of both early and late viral transcripts were observed in cells with suppressed DAXX expression. The results indicate a positive effect of DAXX protein on MPyV replication. Another goal was to prepare a *DAXX* KO cell line to study the effect of DAXX on BK polyomavirus infection. The modification was carried out using the CRISPR/Cas9 system, and potential *DAXX* KO cell clones were isolated, in which the deletion of the *DAXX* gene will be further verified.

The second part of this thesis was focused on the interactions of MPyV large T antigen (LT) with cellular proteins. Based on the data obtained from the study of MPyV LT antigen interactome (experiments performed by Mgr. Karolína Štaflová, Institute of Organic Chemistry and Biochemistry of the Academy of Sciences of the Czech Republic, group of Ing. Iva Pichová, CSc.) the mutual localization of LT and selected cellular proteins was examined. Colocalization of LT with BAF57, BAG2, PRC1, WDR48 and MKK3 proteins was observed. In the case of NONO and SMC4 proteins, colocalization did not occur. From the listed interaction partners of LT, we further focused on the MKK3 kinase, which is part of the p38 MAP kinase pathway. MKK3 colocalized with LT in both infected and uninfected cells expressing LT. A reduced amount of MKK3 protein and, conversely, an increased activation of p38 kinase were detected in infected cells. Knockdown of MKK3 expression by siRNA did not affect the number of cells infected with MPyV or the amount of infectious virions produced. The results suggest that MKK3 kinase does not have a significant effect on MPyV infection.

Keywords: mouse polyomavirus, DAXX, large T antigen, MKK3, MAP kinase, p38

Seznam zkratek

Ad2/5/7	lidský adenovirus 2/5/7
AP-1	aktivátorový protein 1 (activator protein 1)
ASK1	kináza regulující apoptotické signály (apoptosis signal-regulating kinase 1)
ATF-1/2	aktivační transkripční faktor 1/2 (activating transcription factor 1/2)
ATRX	protein syndromu alfa talasémie a mentální retardace vázaného na chromozom X (alpha-thalassemia/mental retardation, X-linked protein)
BAF57	faktor 57 asociovaný s BRG-1 (Brahma-related gene-1-Associated Factor 57)
BAG2	regulátor molekulárních chaperonů z rodiny BAG (Bcl2-associated athanogene 2)
Bcl-2	regulátor apoptózy B-cell lymphoma-2
BKPyV	BK polyomavirus
Cas9	endonukleáza asociovaná s CRISPR (CRISPR-associated protein 9)
CBP	CREB-vazebný protein (CREB-binding protein)
cGAS	syntáza cyklického GMP-AMP (cyclic GMP-AMP synthase)
CREB	protein vázající cAMP responzivní element (cAMP-response element binding protein)
CRISPR	segmenty nahromaděných pravidelně rozmístěných krátkých palindromických repetitiv (clustered regularly interspaced short palindromic repeats)
DAPI	4',6-diamidin-2-fenylindol
DAXX	protein asociovaný s doménou smrti (death domain-associated protein 6)
ddH ₂ O	dvakrát destilovaná voda
DDR	odpověď na poškození DNA (DNA damage response)
DHB	helikální doména proteinu DAXX (DAXX helix bundle)
DMEM	Dulbeccovo modifikované Eaglovo médium (Dulbecco's Modified Eagle's medium)
EBV	virus Epstein-Barrové
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
EGFP, GFP	zelený fluorescenční protein (enhanced green fluorescent protein, green fluorescent protein)
ER	endoplazmatické retikulum
ERK	kináza regulovaná extracelulárními signály (extracellular signal-regulated kinase)
ERV	endogenní retroviry
FACS	fluorescenčně aktivované třídění buněk pomocí průtokové cytometrie (fluorescence-activated cell sorting)
FAK	fokální adhezivní kináza (focal adhesion kinase)
FBS	fetální bovinní sérum
GAPDH	glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenáza
H3K9me3	trimethylace lysinu 9 histonu H3
HBD	histon-vazebná doména proteinu DAXX (histone-binding domain)
HBV	virus hepatitidy B
HCMV	lidský cytomegalovirus
HDAC	histon deacetyláza
HIPK1	proteinkináza 1 interagující s homeodoménou (homeodomain-interacting protein kinase 1)
HIRA	histon chaperonový komplex histone cell cycle regulator
HP1	heterochromatinový protein 1 (heterochromatin protein 1)
HPV	lidský papilomavirus
hpi	hodiny po infekci
hpt	hodiny po transfekci
HRP	křenová peroxidáza (horseradish peroxidase)
Hsc70	chaperon příbuzný proteinům teplotního šoku 70 (heat shock cognate protein 70)
HSP27	protein teplotního šoku 27 (heat shock protein 27)
Hsp70	protein teplotního šoku 70 (heat shock protein 70)
HSV-1	herpes simplex virus 1
ICP0/27	infected cell protein 0/27, bezprostředně časné proteiny viru HSV-1
IE	bezprostředně časné (immediate-early) virové geny/proteiny
IF	imunofluorescence
IFN	interferon
IL	interleukin
IRF	interferonový regulační faktor (interferon regulatory factor)
JCPyV	JC polyomavirus
JNK	c-Jun N-terminální kináza
KO	knockout

KAP1	protein 1 asociovaný s doménou Krüppel associated box (KRAB-associated protein 1)
LDH	laktát dehydrogenáza
LT	velký T (tumorogenní) antigen
MAPK	mitogenem aktivovaná proteinkináza
MAPKAPK	proteinkináza aktivovaná MAP kinázou
MAPKK	kináza mitogenem aktivované proteinkinázy
MAPKKK	kináza kinázy mitogenem aktivované proteinkinázy
MCPyV	polyomavirus Merkelových buněk
Mdm2	ubikvitin ligáza mouse double minute 2 homolog
MIEP	hlavní bezprostředně časný promotor HCMV (major immediate early promoter)
MK2/3	proteinkináza 2/3 aktivovaná MAP kinázou (MAPKAPK2/3)
MKK3/4/6	kinázy 3/4/6 mitogenem aktivovaných protein kináz
MKP	fosfatázy MAP kináz
MOI	multiplacita infekce
MPyV	myší polyomavirus
MRN	komplex Mre11-Rad50-Nbs1
MSK1/2	mitogenem a stresem aktivovaná kináza 1/2
MT	střední T (tumorogenní) antigen
NCCR	nekódující kontrolní oblast genomu polyomavirů
NF-κB	jaderný faktor κ B
NLS	jaderný lokalizační signál
NONO	oktamer-vazebný protein neobsahující doménu POU (non-POU domain-containing octamer-binding protein)
OBD	ori-vazebná doména (ori binding domain)
PBS	fosfátem pufovaný fyziologický roztok (phosphate-buffered saline)
PBST	PBS s přísadkou Tween 20
PCAF	faktor asociovaný s P300/CBP (P300/CBP-associated factor)
PCR	polymerázová řetězová reakce
PCR H ₂ O	voda v PCR kvalitě
PI3K	fosfatidylinositol-3-kináza
PML	protein promyelocytární leukémie
PML-NBs	jaderná tělíska PML (PML nuclear bodies)
PP1A	proteinfosfatáza 1A
PP2A	proteinfosfatáza 2A
pRb	retinoblastomový protein
PRC1	proteinový regulátor cytokineze 1 (protein regulator of cytokinesis 1)
qPCR	kvantitativní polymerázová řetězová reakce
RASSF1C	izoforma C proteinu 1 obsahujícího doménu asociující s Ras (Ras association domain family protein 1 isoform C)
RIPA	radioimmunoprecipitační pufr (radioimmunoprecipitation assay buffer)
RPA	replikační protein A
SDS	dodecylsírán sodný
SDS-PAGE	elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti SDS (SDS polyacrylamide gel electrophoresis)
SETDB1	histon methyltransferáza SET Domain, Bifurcated 1
sgRNA	single guide RNA
SIM	SUMO interakční motiv (SUMO-interacting motif)
siRNA	krátká interferující RNA
SMC4	protein strukturní údržby chromozomů 4 (structural maintenance of chromosomes protein 4)
Sp100	jaderný antigen speckled 100 kDa protein
Src	protoonkogen tyrosin kináza Src
ST	malý T (tumorogenní) antigen
StUbL	ubikvitin ligáza cílená na SUMO (SUMO-targeted ubiquitin ligase)
SUMO	malý modifikátor podobný ubikvitinu (small ubiquitin-like modifier)
SV40	opičí vakuolizující polyomavirus 40 (simian vacuolating virus 40)
TAB1	TAK1-vazebný protein 1 (TGF-β activated kinase 1 binding protein 1)
TAK1	kináza 1 aktivovaná TGF-β (TGF-β activated kinase 1)
TBE	pufr Tris-borát-EDTA
TCR	T-buněčný receptor (T-cell receptor)
TGF-β	transformující růstový faktor β (transforming growth factor β)

TLR	Toll-like receptor
TNF α	tumor nekrotizující faktor α (tumor necrosis factor α)
TT	„tiny“ T (tumorogenní) antigen
UBC9	SUMO konjugační enzym (ubiquitin carrier protein 9)
USP1/7/21	ubikvitin specifické peptidázy (ubiquitin specific peptidase)1/7/21
VP1	hlavní kapsidový protein polyomavirů
VP2/3	minoritní kapsidové proteiny polyomavirů
WB	western blot
WDR48	protein 48 obsahující WD repetice (WD repeat-containing protein 48)
WT	divoký typ (wild type)
ZAP70	protein kináza 70 asociovaná se zeta řetězcem TCR (Zeta chain of T-cell receptor-associated protein kinase 70)

Obsah

1	Úvod.....	11
2	Přehled literatury	12
2.1	Myší polyomavirus	12
2.1.1	Čeď Polyomaviridae	12
2.1.2	Stavba virionu MPyV	13
2.1.3	Organizace genomu MPyV.....	13
2.1.4	Replikační cyklus MPyV	14
2.1.5	LT antigen MPyV	17
2.2	MAP kinázová dráha p38 a její role při virové infekci	20
2.2.1	MAP kinázové signální kaskády.....	20
2.2.2	Dráha p38	21
2.2.3	Role p38 při virové infekci.....	26
2.3	Protein DAXX a jeho role při virové infekci	29
2.3.1	Protein DAXX a jaderná tělíska PML.....	29
2.3.2	Struktura DAXX a posttranslační modifikace	31
2.3.3	Funkce DAXX.....	34
2.3.4	Role proteinu DAXX a PML tělísek při virové infekci	40
3	Cíle práce.....	47
4	Materiál a metody.....	48
4.1	Materiál	48
4.1.1	Buněčné linie	48
4.1.2	Bakteriální kmen.....	48
4.1.3	Virus.....	48
4.1.4	Média pro savčí buněčné kultury.....	48
4.1.5	Média pro bakteriální kultury	49
4.1.6	Chemikálie a roztoky.....	49
4.1.7	Antibiotika	50
4.1.8	Enzymy.....	51

4.1.9	Reakční pufry	51
4.1.10	Transfekční činidla	51
4.1.11	Komerční soupravy	51
4.1.12	Plazmidy.....	52
4.1.13	siRNA, primery a další oligonukleotidy.....	52
4.1.14	Protilátky	53
4.1.15	Markery molekulových hmotností	55
4.2	Metody	55
4.2.1	Sterilizace	55
4.2.2	Práce s buněčnými kulturami.....	56
4.2.3	Práce s viry	61
4.2.4	Práce s bakteriemi.....	63
4.2.5	Práce s DNA	64
4.2.6	Práce s RNA	68
4.2.7	Práce s proteiny	69
5	Výsledky.....	72
5.1	Příprava inokula MPyV	72
5.2	Vliv proteinu DAXX na polyomavirovou infekci	73
5.2.1	Role proteinu DAXX v replikačním cyklu MPyV	73
5.2.2	Role proteinu DAXX v replikačním cyklu BKPyV	77
5.3	Interakce LT antigenu MPyV s buněčnými proteiny	85
5.3.1	Interakce LT s BAF57.....	85
5.3.2	Interakce LT s BAG2.....	86
5.3.3	Interakce LT s NONO.....	87
5.3.4	Interakce LT s PRC1	88
5.3.5	Interakce LT s SMC4.....	89
5.3.6	Interakce LT s WDR48	90
5.3.7	Interakce LT s MKK3	92
6	Diskuze.....	106

6.1	Vliv proteinu DAXX na polyomavirovou infekci	106
6.1.1	Role proteinu DAXX v replikačním cyklu MPyV	106
6.1.2	Role proteinu DAXX v replikačním cyklu BKPyV	108
6.2	Interakce LT antigenu MPyV s buněčnými proteiny	109
6.2.1	Interakce LT s MKK3	109
7	Souhrn	113
8	Seznam použité literatury	114

1 Úvod

Polyomaviry jsou malé neobalené DNA viry, které se replikují v jádře hostitelských buněk. Již od objevu prvního polyomaviru, kterým byl myší polyomavirus (MPyV), je intenzivně zkoumán jejich vliv na nádorovou transformaci. Studium polyomavirů poskytlo mnoho důležitých poznatků o molekulárních mechanismech buněčných procesů. Řada poznatků o eukaryotické transkripci a replikaci byla získána studiem replikačního cyklu modelových polyomavirů SV40 (simian vacuolating virus 40) a MPyV.

Charakteristickou vlastností polyomavirů je schopnost navodit perzistentní infekci. Infekce zdravých hostitelů je často asymptomatická, k rozvoj onemocnění způsobených polyomaviry je obvykle spojen s imunosupresí. Mnoho polyomavirů má onkogenní potenciál, infekce lidským polyomavirem Merkelových buněk (MCPyV) je spojena s rozvojem karcinomu Merkelových buněk.

Polyomaviry kódují regulační proteiny, zvané T (tumorogenní) antigeny. Tyto proteiny jsou exprimovány v časně fázi infekčního cyklu a jsou kritické pro nastolení vhodných podmínek pro virovou replikaci. Velký T antigen (LT) se přímo účastní replikace virového genomu a může přispívat k buněčné transformaci. Funkce LT jsou zprostředkovány interakcí s mnoha buněčnými proteiny. LT antigen viru SV40 interaguje např. s nádorovými supresory p53 a pRb (retinoblastomový protein) a inaktivuje je. Pro replikaci polyomavirů je důležité navození S fáze buněčného cyklu a interakce se složkami buněčného replikačního aparátu a také proteiny zúčastněnými v opravách poškozené DNA. Funkce mnoha interakcí mezi LT a buněčnými proteiny dosud nebyla objasněna.

Polyomavirové T antigeny regulují aktivaci důležitých buněčných signálních drah, aktivují mimo jiné mitogenem aktivované protein kinázy (MAPK). Jedna část této diplomové práce je zaměřena na interakci LT antigenu MPyV s kinázou MKK3 (mitogenem aktivovaná proteinkináza 3, jinými názvy také MEK3 nebo MAP2K3), která je součástí MAP kinázové dráhy p38. Aktivace signálních drah v průběhu polyomavirové infekce může být součástí buněčné obrany, viry však mohou také využívat buněčnou signalizaci pro podporu různých kroků replikačního cyklu.

Replikace mnoha virů je v buněčném jádře regulována jadernými tělísky PML. Základní složkou těchto tělísek je stejnojmenný protein PML (protein promyelocytární leukémie), v různých podmínkách se zde vyskytuje mnoho dalších proteinů, mezi nimi také protein DAXX (death domain-associated protein 6), na který je zaměřena další část této práce. Protein DAXX je zpravidla považován za restriční faktor virové infekce, v některých případech ale může podporovat replikaci viru. Funkce proteinu DAXX je nejlépe charakterizována v kontextu herpesvirové infekce, kdy se DAXX díky své funkci histonového chaperonu podílí na transkripční represi virových genů. Jedním z cílů této práce je přispět k pochopení významu proteinu DAXX pro infekci myším polyomavirem.

2 Přehled literatury

2.1 Myší polyomavirus

2.1.1 Čeleď Polyomaviridae

Myší polyomavirus (MPyV) patří do čeledi *Polyomaviridae*, tvořené malými neobalenými viry s dvouvláknovým DNA genomem o přibližné velikosti 5 kb, jejichž replikace probíhá v buněčném jádře. Taxonomie polyomavirů je založena na sekvenci LT antigenu. Celkem bylo identifikováno 117 druhů polyomavirů, z nichž 112 je zařazeno do 6 rodů: *Alphapolyomavirus*, do něhož spadá např. MPyV nebo MCPyV, *Betapolyomavirus*, zahrnující např. modelový virus SV40 a lidské viry BKPyV (BK polyomavirus) a JCPyV (JC polyomavirus), *Gammapolyomavirus*, *Deltapolyomavirus*, *Epsilonpolyomavirus* a *Zetapolyomavirus*. S výjimkou rodu *Gammapolyomavirus*, jehož zástupci infikují ptáky, se jedná o savčí viry (shrnutí v Moens, Calvignac-Spencer, et al., 2017). Kromě savců a ptáků byly polyomavirové genomy nebo jejich fragmenty nalezeny také u ryb, plazů a členovců (Buck et al., 2016).

První popsany zástupce čeledi *Polyomaviridae*, myší polyomavirus, byl objeven v 50. letech minulého století v extraktech z tkání leukemických myší jako nebuněčné infekční agens způsobující nádory po inokulaci novorozeneých myší (Gross, 1953). Právě schopnost indukovat mnoho („poly“) nádorů („oma“) stála za pojmenováním této virové čeledi. Dalším objeveným polyomavirem byl virus SV40, který způsoboval vakuolizaci v opičích buněčných kulturách a byl detekován jako kontaminace Sabinovy živé atenuované vakcíny proti polioviru (Sweet & Hilleman, 1960). Polyomaviry SV40 a MPyV se staly důležitými modely pro studium buněčných procesů včetně metabolismu DNA a RNA a také signalizace vedoucí k nádorové transformaci (shrnutí v Cheng et al., 2009). MPyV je po inokulaci novorozeneých myší schopen infikovat více než 30 různých buněčných typů (Dawe et al., 1987).

První lidské polyomaviry, BK polyomavirus a JC polyomavirus, byly objeveny roku 1971. JCPyV byl izolovaný z mozku pacienta s progresivní multifokální leukoencefalopatií (Padgett et al., 1971), BKPyV byl objeven v moči pacienta s komplikacemi po transplantaci ledvin (Gardner et al., 1971). Z dalších lidských polyomavirů je významný MCPyV, který byl identifikován ve vzorcích karcinomu Merkelových buněk, agresivního typu rakoviny kůže. Virová DNA se vyskytovala integrovaná do genomu nádorových buněk. MCPyV je dosud jediným lidským polyomavirem, u kterého byla prokázána přímá souvislost mezi přítomností viru a vznikem nádorů. MCPyV byl přítomen v 80 % případů karcinomu Merkelových buněk (Feng et al., 2008).

Polyomaviry se vyznačují schopností navodit perzistentní infekci. Infekce lidskými polyomaviry je u imunokompetentních jedinců zpravidla asymptomatická, komplikace nastávají při imunosupresi. BKPyV je původcem především nefropatie po transplantaci ledvin, JCPyV vyvolává u imunokompromitovaných pacientů progresivní multifokální leukoencefalopatii. U obou virů

se předpokládá tumorogenní potenciál, který však nebyl potvrzen (shrnuto v Moens, Krumbholz, et al., 2017).

2.1.2 Stavba virionu MPyV

Kapsida MPyV o průměru 40–45 nm má ikosahedrální symetrii a je složena z celkem 360 molekul hlavního kapsidového proteinu VP1 uspořádaných do 72 kapsomer obsahujících pentamer VP1, z nichž 60 je hexavalentních a 12 pentavalentních (Rayment et al., 1982). Každý pentamer VP1 váže jeden minoritní kapsidový protein VP2 nebo VP3 (Barouch & Harrison, 1994). C-konec kapsidového proteinu VP2 nebo VP3 je v podobě vlásenkové struktury vnořen do dutiny pentameru VP1. Na udržování této struktury se podílejí hydrofobní interakce (X. S. Chen et al., 1998). Kapsomery jsou propojeny pomocí C-konců VP1. Struktura kapsidy je stabilizována prostřednictvím vápenatých kationtů a disulfidických vazeb (shrnuto v Moens, Krumbholz, et al., 2017).

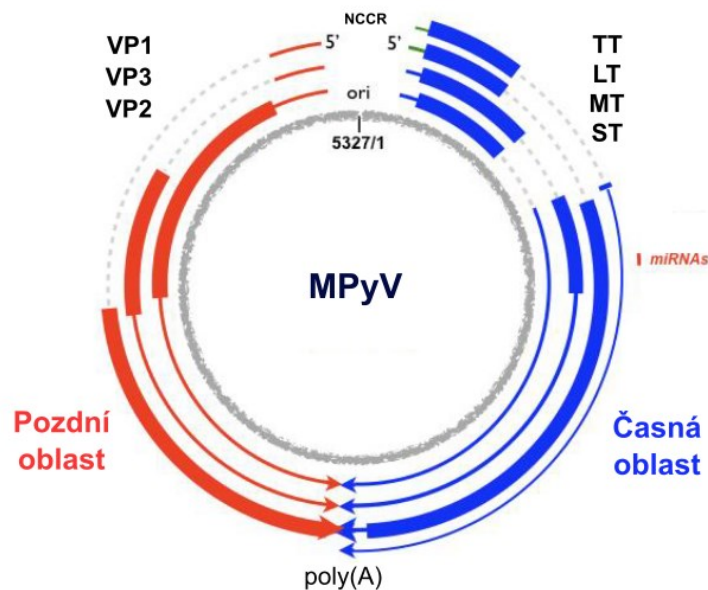
V kapsidě je uzavřen virový genom v podobě minichromozomu asociovaného s buněčnými histony s výjimkou histonu H1. Majoritní kapsidový protein VP1 interaguje N-koncem s regulační oblastí virového genomu (Carbone et al., 2004), minoritní proteiny VP2 a VP3 mohou interagovat s histony (X. Cai et al., 1994).

2.1.3 Organizace genomu MPyV

Genom MPyV je tvořen cirkulární dvouvláknovou DNA, jeho velikost je přibližně 5,3 kb. Genom lze rozdělit na časnou a pozdní oblast (viz Obr. 1), jejichž exprese je regulována odděleně. Mezi časnou a pozdní oblastí se nachází nekódující kontrolní oblast (NCCR), obsahující obousměrný počátek replikace a regulační oblasti (promotory a enhancery) časně a pozdní transkripční jednotky.

Časný promotor je typickým promotorem buněčné RNA polymerázy II s TATA boxem. Alternativní sestřih primárního transkriptu časně oblasti dává vznik celkem čtyřem proteinům se společným N-koncem. Časně proteiny jsou označovány jako tumorogenní (T) antigeny. Jedná se o LT antigen o molekulové hmotnosti 100 kDa, střední T antigen (middle T antigen, MT) o molekulové hmotnosti 56 kDa, malý T antigen (small T antigen, ST) o molekulové hmotnosti 22 kDa a „tiny“ T antigen (TT) o molekulové hmotnosti 10 kDa (shrnuto v Carmichael, 2016; Moens, Calvignac-Spencer, et al., 2017). Časná oblast genomu MPyV také kóduje 2 miRNA, které indukují štěpení časných transkriptů (Sullivan et al., 2009).

Pozdní promotor neobsahuje TATA box. Pozdní oblast genomu je transkribována v opačném směru než časná oblast z komplementárního vlákna DNA. Alternativním sestřihem transkriptu vznikají pozdní mRNA, které se liší svými 5' konci. Pozdní oblast kóduje celkem tři strukturální proteiny – VP1, VP2, VP3. Proteiny VP2 a VP3 jsou translatovány ze stejného čtecího rámce s využitím odlišných start kodonů. VP3 je kratší verzi proteinu VP2 se shodným C-koncem (shrnuto v Carmichael, 2016; Moens, Calvignac-Spencer, et al., 2017).



Obr. 1: Organizace genomu myšího polyomaviru. Genom o přibližné velikosti 5,3 kb lze rozdělit na časnou a pozdní kódující oblast a nekódující regulační oblast (NCCR) s počátkem replikace (ori). Časná oblast kóduje tumorogenní (T) antigeny: velký T antigen (LT), střední T antigen (MT), malý T antigen (ST) a „tiny“ T antigen (TT), a dále miRNA. Pozdní oblast kóduje majoritní kapsidový protein VP1 a minoritní kapsidové proteiny VP2 a VP3. Polyadenylační (poly(A)) místa časných a pozdních transkriptů se částečně překrývají. Převzato z Carmichael, 2016, upraveno.

2.1.4 Replikační cyklus MPyV

Vstup do buňky a transport do jádra

Infekční cyklus MPyV je zahájen vstupem viru do buňky v důsledku vazby na gangliosidové receptory GD1a, GT1b, GT1a nebo GD1b. Interakce je zprostředkována vazbou kyseliny sialové na těchto glykolipidech kapsidovým proteinem VP1 (Buch et al., 2015; B. Tsai et al., 2003; You et al., 2015). Vstupu MPyV do buňky dále napomáhá interakce s koreceptorem, kterým je integrin $\alpha\beta 1$ (Caruso et al., 2003). Kromě glykolipidů může VP1 vázat také kyselinu sialovou přítomnou na glykoproteinech. Vazba na glykoproteiny umožňuje vstup MPyV do buňky, ale zatímco vazba na gangliosidy vede k transportu do endoplazmatického retikula (ER) a umožňuje další kroky infekce, po vazbě na glykoproteiny MPyV nevstupuje do ER a nedochází k produktivní infekci (M. Qian & Tsai, 2010).

Po vazbě na receptor dochází k endocytóze viru, která může být zprostředkována kaveolami, nebo může probíhat způsobem nezávislým na kaveolinu i klathrinu (Liebl et al., 2006; Richterová et al., 2001). Od membrány je virus transportován směrem k jádru za účasti mikrotubulární sítě a molekulárního motoru dyneinu (Richterová et al., 2001; Zila et al., 2014). Virus putuje přes časný a pozdní endozom do endoplazmatického retikula. Pokles pH v endolyzozomálních kompartmentech je nezbytný pro produktivní infekci. Vyvolává konformační změnu VP1 a umožňuje uvolnění viru z ER (Liebl et al., 2006; M. Qian et al., 2009). Na rozvolnění kapsidy se podílejí enzymy a chaperony v ER.

Působením enzymů protein disulfid izomeráz (PDI) dochází k narušení disulfidických vazeb VP1 a konformační změně VP1 vedoucí k odhalení hydrofobních domén minoritních kapsidových proteinů. Proteiny VP2 a VP3 jsou integrovány do membrány ER, která je následně perforována vlivem VP2 (Huérfano et al., 2017; Magnuson et al., 2005; Rainey-Barger et al., 2007; Walczak & Tsai, 2011). Na uvolnění MPyV z ER se může podílet také protein Derlin-2, který je součástí dráhy ERAD (endoplasmic-reticulum-associated protein degradation), jejíž význam spočívá v exportu špatně sbalených proteinů určených k degradaci v cytosolu (Lilley et al., 2006).

V cytosolu může být kapsida dále rozvolněna působením chaperonu Hsp70 (heat shock protein 70) (Chromy et al., 2006). Interakce jaderných lokalizačních signálů kapsidových proteinů s importiny vede k transportu MPyV skrze jaderný pór do jádra (Soldatova et al., 2018).

Časná transkripce a translace

V buněčném jádře je genom uvolněn od kapsidových proteinů interakcí VP1 s poly(ADP-ribóza)polymerázou 1 (PARP-1) (Carbone et al., 2006). Bezprostředně po uvolnění genomu je zahájena transkripce z časného promotoru buněčnou RNA polymerázou II. Sestříhem primárního transkriptu jsou generovány mRNA jednotlivých T antigenů (shrnuto v Carmichael, 2016). Mezi časnými transkripty je nejvíce zastoupena varianta kódující LT antigen. Protein LT je detekován 8 hodin po infekci (hpi) (L. Chen & Fluck, 2001).

Exprese T antigenů je nezbytná pro replikaci virové DNA. Navozují S fázi buněčného cyklu, aktivují mechanismy oprav DNA, regulují buněčné signální dráhy a vyvolávají transformaci buněk. LT je jaderný protein, ST převážně cytoplazmatický a MT je zakotvený do membrány (shrnuto v Cheng et al., 2009).

LT antigen je zásadní pro navození S fáze buněčného cyklu, replikaci virové DNA a podílí se na aktivaci transkripce pozdních genů. Funkce LT je podrobněji popsána v kapitole 2.1.5.

MT antigen je hlavním tumorogenním proteinem MPyV. Aktivuje buněčné tyrosin kinázy, mezi které patří např. protoonkogen Src (Courtneidge & Smith, 1983). Pro funkci MT v aktivaci tyrosin kináz a buněčné transformaci je nezbytná vazba na membránu prostřednictvím C-konce (Carmichael et al., 1982). Fosforylace MT kinázou Src vede např. k aktivaci kinázy PI3K (fosfatidylinositol-3-kináza), inhibici p53 a buněčné transformaci (W. Qian & Wiman, 2000; Talmage et al., 1989).

ST antigen interaguje s proteinfosfatázou 2A (PP2A) a reguluje fosforylaci proteinů, čímž ovlivňuje buněčné signální dráhy. Tato interakce reguluje např. fosforylaci kinázy Akt (proteinkináza B) a mitogenem aktivovaných proteinkináz ERK (extracellular signal-regulated kinase) a p38. ST inhibuje funkci p53, podílí se na indukci S fáze buněčného cyklu, regulaci apoptózy a nádorové transformaci (Andrabi et al., 2007; W. Qian & Wiman, 2000; Schüchner & Wintersberger, 1999).

TT antigen je tvořen N-terminální doménou společnou pro všechny T antigeny. Stimuluje ATPázovou aktivitu chaperonu Hsc70 (heat shock cognate protein 70). Je produkován pouze v malém množství a jeho životnost je omezená (Riley et al., 1997).

Replikace DNA, pozdní transkripce a morfogeneze virionů

Po vstupu buněk do S fáze je zahájena replikace virové DNA (cca 16–18 hpi) a současně dochází k přepnutí z časné transkripce na pozdní (L. Chen & Fluck, 2001). Replikace vyžaduje helikázovou aktivitu LT a probíhá za účasti buněčné replikační mašinerie (shrnutí v Topalis et al., 2013). Po zahájení v oblasti NCCR probíhá replikace v obou směrech (Crawford et al., 1973).

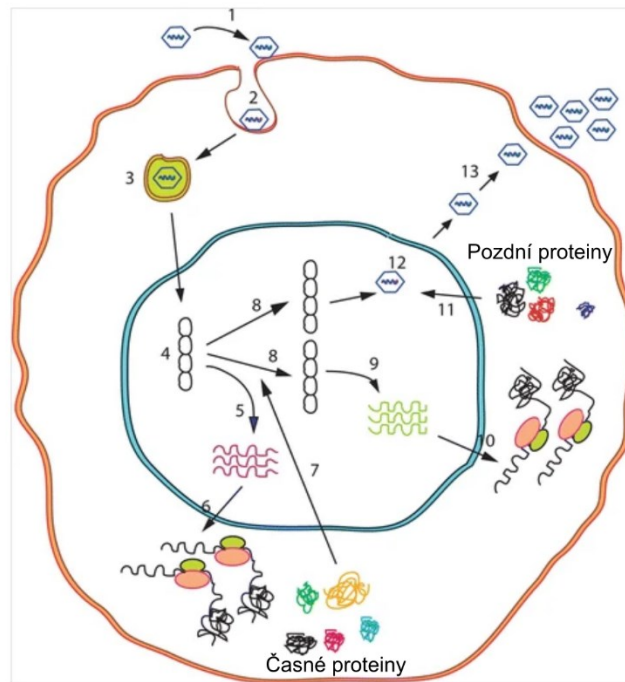
Transkripce z pozdního promotoru probíhá již v časné fázi, vzniklé transkripty jsou však nestabilní, ke zvýšené akumulaci pozdních transkriptů dochází až po zahájení replikace virové DNA. Tato změna je spojena se sníženou akumulací časných mRNA a proteinů. Na přepnutí z časné transkripce na pozdní se může podílet LT antigen represí časného promotoru a transaktivací pozdního promotoru (shrnutí v Carmichael, 2016).

Další možný mechanismus přepnutí z časné transkripce na pozdní spočívá ve snížené terminaci transkripce. Zatímco v časné fázi infekce jsou produkovány nestabilní polyadenylované pozdní transkripty, po zahájení replikace virového genomu je terminace transkripce a polyadenylace pozdních transkriptů snížena, dochází k pročení polyadenylačního signálu a vznikají dlouhé molekuly RNA obsahující tandemové repetice sekvence celého virového genomu (Acheson, 1978; Carmichael, 2016). Pozdní mRNA obsahují na 5' konci tandemové repetice 57nukleotidové „leader“ sekvence. Tato sekvence je v genomu přítomna pouze jednou, při vzniku pozdních mRNA se uplatňuje sestřih mezi jednotlivými leader sekvencemi opakujícími se v multigenomickém primárním transkriptu (Treisman, 1980). Vznik multigenomických transkriptů a sestřih mezi leader sekvencemi je důležitý pro efektivitu sestřihu a vznik stabilních pozdních mRNA. Nefunkční sestřih mezi leader sekvencemi způsobuje degradaci mRNA (Adami et al., 1989). Množství transkriptů časného vlákna může být negativně regulováno prostřednictvím antisense RNA pozdního vlákna. Vznik dvouvláknové RNA podporuje editaci bází. Modifikované transkripty jsou zadrženy v jádře a degradovány (Kumar & Carmichael, 1997). Pro přechod z časné do pozdní fáze transkripce tak může být důležitý fakt, že polyadenylační (poly(A)) signály časného a pozdního vlákna se částečně překrývají. Spolu s editací RNA by tento překryv mohl podporovat pročení poly(A) signálu a umožňovat RNA polymeráze II pokračovat v transkripci podél celého genomu za vzniku dlouhých multigenomických transkriptů. Zatímco v případě pozdního vlákna je zajištěn efektivní sestřih přítomností opakujících se leader sekvencí, hladina časných RNA by mohla být snižována prostřednictvím antisense RNA a editace bází adenosin deaminázami ADAR (adenosine deaminases acting on RNA) (Garren et al., 2015; R. Gu et al., 2009).

Po sestřihu pozdních transkriptů a translaci VP1, VP2 a VP3 se v cytoplazmě tvoří pentamery VP1 asociované s minoritním proteinem VP2 nebo VP3. Kapsomery jsou transportovány do jádra, interakce s importiny pravděpodobně brání předčasnému skládání kapsid v cytoplazmě (Barouch & Harrison, 1994; Bird et al., 2008). V jádře probíhá morfogeneze virionů za účasti buněčných chaperonů (Chromy et al., 2003). V myších fibroblastech byly v místech replikace virové DNA pomocí elektronové mikroskopie nalezeny tubulární struktury, ze kterých se oddělují nově vznikající viriony.

Tyto struktury jsou označovány jako „virové továrny“ a představují meziprodukt při sestavování virionů (Erickson et al., 2012).

Replikační cyklus MPyV trvá přibližně 48 h (L. Chen & Fluck, 2001), ve většině případů jsou nově vzniklé viriony uvolněny z buňky v důsledku nekrózy, replikační cyklus však může končit také apoptózou (K. An et al., 2000). K apoptóze mohou přispívat mimo jiné minoritní kapsidové proteiny VP2 a VP3 díky schopnosti perforovat buněčné membrány (Huerfano et al., 2010; Rainey-Barger et al., 2007). Fáze replikačního cyklu MPyV jsou shrnuty na Obr. 2.



Obr. 2: Replikační cyklus myšního polyomaviru. Po vazbě na gangliosidy na buněčném povrchu (1) vstupuje virus do buňky receptorem zprostředkovanou endocytózou (2). Následně je virus transportován skrze časný a pozdní endozom do endoplazmatického retikula, odkud je uvolněn do cytoplazmy a následně transportován do buněčného jádra (3). V jádře je virový genom uvolněn z kapsidy (4) a je zahájena transkripce časně kódující oblasti pomocí buněčné RNA polymerázy II (5). Translací časných mRNA jsou produkovány časně regulační proteiny – T antigeny (6). Velký T antigen je transportován do jádra (7), kde se spolu s buněčným replikačním aparátem podílí na replikaci virové DNA (8). Po zahájení replikace genomu dochází k transkripci pozdní kódující oblasti (9). Translací pozdních mRNA vznikají pozdní proteiny – kapsidové proteiny VP1, VP2 a VP3 (10). Kapsidové proteiny jsou transportovány do jádra (11), kde probíhá morfogeneze virionů (12). Vzniklé viriony jsou uvolněny z buňky v důsledku buněčné lyze (13). Převzato z White & Safak, 2016, upraveno.

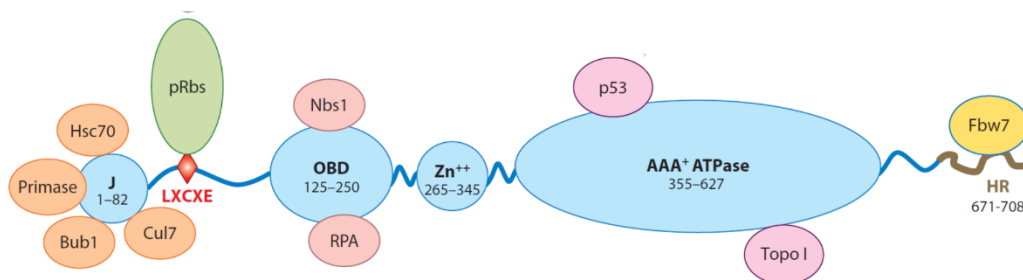
2.1.5 LT antigen MPyV

LT antigen polyomavirů je nezbytný pro průběh infekčního cyklu a účastní se jeho regulace v různých fázích. Na počátku infekce navozuje vstup buňky do S fáze a indukuje buněčné mechanismy oprav poškození DNA. Pro replikaci virového genomu je zásadní jeho helikázová aktivita a interakce se složkami buněčného aparátu pro replikaci DNA. Po zahájení replikace virové DNA může také podporovat transkripci z pozdního promotoru.

Klíčové struktury LT spojené s replikací virové DNA jsou konzervované napříč čeledí *Polyomaviridae*. LT antigeny jednotlivých polyomavirů se mohou lišit ve funkcích přispívajících k regulaci exprese buněčných genů, proliferace a apoptózy. (shrnuto v P. An et al., 2012)

LT antigeny polyomavirů mohou podporovat vznik nádorů. Při infekci virem SV40 za buněčnou transformaci zodpovídá zejména LT, zatímco v případě MPyV je význam LT pro transformaci menší (shrnuto v Cheng et al., 2009), může doplňovat tumorogenní funkci MT, ke které přispívá také ST antigen (Asselin et al., 1983). Mnoho funkcí LT závisí na jeho interakci s nádorovými supresory z rodiny Rb (retinoblastomových proteinů). Regulací Rb proteinů LT např. immortalizuje primární buňky, brání diferenciaci nebo podporuje apoptózu (Maione et al., 1994; Rassoulzadegan et al., 1983; Sheng et al., 2000).

Mezi společné znaky polyomavirových LT antigenů patří přítomnost J-domény, OBD (ori binding domain), domény vázající zinečnaté kationty a helikázové/ATPázové domény (viz Obr. 3). Pro funkci LT v buněčném jádře je zásadní přítomnost jaderného lokalizačního signálu (NLS), který se v sekvenci LT nachází před OBD (shrnuto v Pipas, 1992).



Obr. 3: Doménová struktura velkého T antigenu (LT) polyomaviru SV40. Polyomavirové LT antigeny obsahují doménu J, díky níž podporují aktivitu chaperonu Hsc70, motiv LXCXE důležitý pro vazbu proteinů rodiny pRb, DNA-vazebnou doménu OBD (ori binding domain), doménu pro vazbu iontů zinku, která je důležitá pro hexamerizaci LT a ATPázovou doménu s helikázovou funkcí. Čísla značí pořadí aminokyselin, dále jsou znázorněny buněčné proteiny interagující s danou doménou. Oproti LT antigenu MPyV má LT SV40 kratší oblast mezi doménami J a OBD, na rozdíl od MPyV váže p53 a obsahuje navíc nestrukturovanou C-koncovou oblast, která určuje schopnost replikace SV40 v různých typech buněk (HR, host range) a váže ubikvitin ligázu Fbw7. Převzato z P. An et al., 2012.

LT je nezbytný pro iniciaci replikace polyomavirové DNA (Francke & Eckhart, 1973). Pro replikaci DNA je důležitá helikázová aktivita LT (Seki et al., 1990). Replikační počátek je rozpoznán DNA vazebnou doménou OBD. Po vazbě zinečnatých kationtů dochází k tvorbě hexameru LT, hydrolyza ATP helikázovou doménou podmiňuje rozvolnění dvouvláknové DNA v místě počátku replikace a umožňuje zahájení replikace virové DNA buněčným replikačním aparátem (shrnuto v Topalis et al., 2013). LT rozvolňuje DNA v oblasti replikačního počátku v kooperaci se složkami transkripčního faktoru AP-1 (aktivátorový protein 1), Fos a Jun (Guo et al., 1996), dále je replikace zajištěna interakcí LT s DNA polymerázou α -primázou a proteinem RPA (replikační protein A) (Kautz et al., 2001). Uplatňuje také interakce LT s acetyltransferázami PCAF (P300/CBP-associated factor)

a GCN5 (Xie et al., 2002). LT se může dále podílet na transaktivaci transkripce pozdní oblasti genomu. Aktivace zahrnuje vazbu LT do regulační oblasti, možnou interakci s transkripčními faktory a snížení exprese časných genů (Kern et al., 1986).

Díky přítomnosti J-domény na N-konci funguje LT jako chaperon DnaJ. Chaperony ze skupiny DnaJ regulují funkci chaperonů, jako je např. Hsc70. LT interaguje s chaperonem Hsc70 a podporuje jeho ATPázovou aktivitu, tato interakce je důležitá pro regulaci funkce proteinů rodiny Rb. V blízkosti J-domény se nachází doména LXCXE, pomocí které LT antigen MPyV váže proteiny z rodiny Rb, konkrétně pRb, p107 a p103. Stimulace ATPázové aktivity Hsc70 podporuje uvolnění transkripčních faktorů E2F z komplexu s Rb proteiny, aktivaci transkripce jimi regulovaných genů, vstup do S fáze buněčného cyklu a imortalizaci buněk (Desjardins et al., 1997; Pilon et al., 1996; Sheng et al., 1997; Sullivan et al., 2000). K vazbě proteinů z rodiny Rb LT antigenem a aktivaci transkripce prostřednictvím E2F však může docházet i nezávisle na J-doméně LT (Sheng et al., 2000). LT také reguluje transkripci nezávisle na pRb, interaguje s transkripčním faktorem CREB (cAMP-response element binding protein) prostřednictvím OBD (Love et al., 2005). Aktivace transkripce z promotorů regulovaných E2F je podporována také interakcí LT s histon acetyltransferázovým komplexem složeným z CBP (CREB-vazebný protein)/p300 a PCAF, která ústí v acetylaci histonů v promotorové oblasti (Nemethova et al., 2004).

Mezi J-doménou a OBD se nachází variabilní oblast, jejíž délka se mezi polyomavírovými LT antigeny liší. Rozdíly v sekvenci této oblasti i dalších částí LT mohou vést k rozdílným interakcím s buněčnými proteiny a podmiňovat odlišné funkce polyomavírových LT antigenů. LT MPyV oproti LT SV40 obsahuje delší sekvenci v N-terminální části mezi J doménou a OBD, a naopak postrádá C-terminální úsek LT SV40 (Pipas, 1992). LT MPyV se od LT SV40 také liší ve schopnosti vázat protein p53. LT antigeny polyomavirů mohou prostřednictvím ATPázové domény vázat p53 a inhibovat jeho funkce. Např. vazba p53 LT antigenem SV40 přispívá podobně jako vazba Rb k nádorové transformaci (shrnuto v Cheng et al., 2009). Tato funkce však v případě LT MPyV nebyla popsána. V nádorech vyvolaných MPyV nebyla pozorována inaktivace p53, byla zachována funkce p53 v odpovědi na poškození DNA (Dey et al., 2000). Další výzkum naznačil možnou přímou či nepřímou interakci LT MPyV s fosforylovaným p53, která by mohla přispívat k regulaci funkcí p53 při infekci MPyV (Dey et al., 2002).

LT antigen může různým způsobem regulovat mechanismy oprav poškození DNA. Vazbou proteinu RPA prostřednictvím OBD domény může LT bránit lokalizaci RPA v místech poškození DNA a inhibovat tak opravy DNA. Nedochozí k asociaci proteinů Rad51 a Rad9 s poškozenou DNA, LT tak negativně reguluje opravu dvouřetězcových zlomů DNA pomocí homologní rekombinace (Banerjee et al., 2013). Zároveň však byla popsána aktivace odpovědi na poškození DNA (DDR) při infekci MPyV. LT v tomto případě rekrutoval složky DDR do virových replikačních center. MPyV může prostřednictvím LT manipulovat signalizaci DDR a využívat některé proteiny DDR pro zajištění úspěšné replikace (Heiser et al., 2016).

Další funkcí LT je regulace interferonové (IFN) odpovědi. LT inhibuje aktivitu IRF3 (interferonového regulačního faktoru 3) a expresi interferonem stimulovaných genů. Interaguje s kinázou JAK1 (Janus kináza 1) a inaktivuje signalizaci zprostředkovanou receptory IFN- β (Weihua et al., 1998).

LT antigeny polyomavirů mohou interagovat s řadou buněčných proteinů účastnících se mnoha různých procesů. Byly detekovány interakce polyomavirových LT antigenů s proteiny spojenými s transkripcí, posttranskripčními úpravami RNA, regulací translace, posttranslačních modifikací a stability proteinů, s chaperony, proteiny regulujícími intracelulární transport, cytoskeletálními proteiny, regulátory buněčného cyklu a apoptózy a složkami různých signálních drah (shrnuto v Moens, Krumbholz, et al., 2017). Funkční význam těchto interakcí často není známý a vyžaduje další výzkum.

2.2 MAP kinázová dráha p38 a její role při virové infekci

Jedním z potenciálních interakčních partnerů LT antigenu MPyV je kináza MKK3, která je součástí signální dráhy vedoucí k aktivaci MAP kinázy p38.

2.2.1 MAP kinázové signální kaskády

MAP kinázy jsou skupinou Ser/Thr kináz exprimovaných všemi eukaryotickými buňkami, zapojených do drah signální transdukce, které regulují zásadní buněčné procesy. K jejich aktivaci dochází prostřednictvím fosforylační kaskády vyvolané velkým množstvím možných podnětů. Aktivované MAP kinázy regulují mnoho buněčných funkcí, mezi které patří regulace genové exprese, buněčný metabolismus, buněčná proliferace, diferenciace nebo apoptóza.

Mezi základní a nejlépe charakterizované MAPK v savčích buňkách patří kromě p38 také kinázy ERK a JNK (c-Jun N-terminální kináza). Celkem bylo identifikováno 14 savčích MAPK, které jsou rozděleny do 7 podskupin. Patří sem konvenční MAPK ERK1/2, JNK1/2/3, p38 $\alpha/\beta/\gamma/\delta$ a ERK5, a dále atypické MAPK ERK3/4, ERK7 a NLK (Nemo-like kinase). Atypické MAPK se od typických liší zejména způsobem aktivace signální dráhy, která není uspořádaná do třístupňové kinázové kaskády, jako je tomu v případě typických MAPK (viz níže). (shrnuto v Cargnello & Roux, 2011)

Při aktivaci MAPK je signál přenášen kaskádou proteinkináz. Přenos zahrnuje postupnou aktivaci MAPKKK (kinázy kinázy MAP kinázy), MAPKK (kinázy MAP kinázy) a MAPK. MAPKK (označované také jako MAP2K) jsou kinázy s dvojitou specificitou (Tyr i Ser/Thr), po aktivaci fosforylaci jednou z několika MAPKKK (označovaných také jako MAP3K) aktivovaných v reakci na různé extracelulární i intracelulární stimuly katalyzují fosforylaci MAPK na tyrosinovém a threoninovém zbytku. Aktivní MAPK mohou dále fosforylovat velké množství různých jaderných, cytoplazmatických i membránových proteinů. Mezi substráty MAPK patří mimo jiné další proteinkinázy a transkripční faktory. Uspořádání těchto signálních drah do podoby fosforylační kaskády umožňuje amplifikaci a integraci signálu. Dochází k interakcím mezi komponentami různých MAPK drah, některé MAPKKK

a MAPKK mohou aktivovat více než jednu MAPK dráhu. Substrátová specificita jednotlivých MAPK se částečně překrývá, k regulaci některých buněčných procesů tak může přispívat více MAPK drah. (shrnuto v Pearson et al., 2001)

Specificita a efektivita MAPK signalizace je regulována tvorbou komplexů MAPK s jejich aktivátory (MAPKK), substráty a regulačními proteiny. MAPK interagují se specifickými sekvenčními motivy těchto proteinů, nejlépe charakterizovanými motivy jsou D domény (docking domains). D doména umožňuje např. rozpoznání transkripčních faktorů z rodiny MEF2 (myocyte enhancer factor 2) MAP kinázami p38 (S.-H. Yang et al., 1999). Interakci s D doménou zajišťuje konzervovaná doména MAP kináz, označovaná jako CD doména (common docking domain). CD doména identifikovaná v kinázách ERK, JNK i p38 umožňuje interakci těchto MAPK se specifickými MAPKK, substráty, k nimž kromě transkripčních faktorů patří také např. MAPKAPK (proteinkinázy aktivované MAP kinázami), a fosfatázami (Tanoue et al., 2000). Funkce MAPK drah je regulována rovnováhou mezi aktivačními signály a inaktivačními mechanismy. Inaktivace MAPK je zprostředkována činností fosfatáz, mezi které patří fosfatázy s dvojitou specificitou označované jako fosfatázy MAP kináz (MKP) (Sun et al., 1993). Na ukončení signalizace MAPK se podílí negativní zpětnovazebné smyčky, aktivita některých fosfatáz je regulována vazbou MAPK, fosforylací pomocí MAPK nebo zvýšením jejich exprese vlivem MAPK. MKP defosforylují MAPK v buněčném jádře i v cytosolu. Jaderné MKP jsou zpravidla kódovány geny indukovanými stresem nebo růstovými faktory (shrnuto v Pearson et al., 2001).

2.2.2 Dráha p38

Jednou ze základních MAPK drah v savčích buňkách je dráha p38. Na rozdíl od MAP kináz ERK1 a ERK2, které jsou aktivovány mitogeny, je aktivace kináz p38 obvykle vyvolána vnějším stresem nebo zánětlivou signalizací. K aktivaci p38 MAPK dochází také při infekci, tumorigenezi nebo buněčné diferenciaci (shrnuto v Canovas & Nebreda, 2021).

Existují čtyři formy kinázy p38 – p38 α , p38 β , p38 γ , p38 δ (viz Obr. 4a), které jsou kódovány čtyřmi geny a jejich exprese se liší mezi různými typy buněk a tkání. Kináza p38 α je zpravidla majoritní formou a stejně jako kináza p38 β je exprimována ve všech tkáních. Exprese p38 γ a p38 δ vykazuje vyšší tkáňovou specificitu (del Barco Barrantes et al., 2011). Nejlépe charakterizovaná je kináza p38 α , na kterou se zaměřuje většina literatury.

2.2.2.1 Aktivace p38 a regulace její aktivity

Dosud byly charakterizovány tři způsoby aktivace dráhy p38 MAPK (viz Obr. 4c).

Kanonická dráha aktivace p38 zahrnuje fosforylací p38 některou z MAPKK (viz Obr. 4b) v závislosti na buněčném typu a konkrétním stimulu. Bylo identifikováno 10 MAPKKK, které mohou přispívat k aktivaci p38 po stimulaci různými signály (shrnuto v Canovas & Nebreda, 2021).

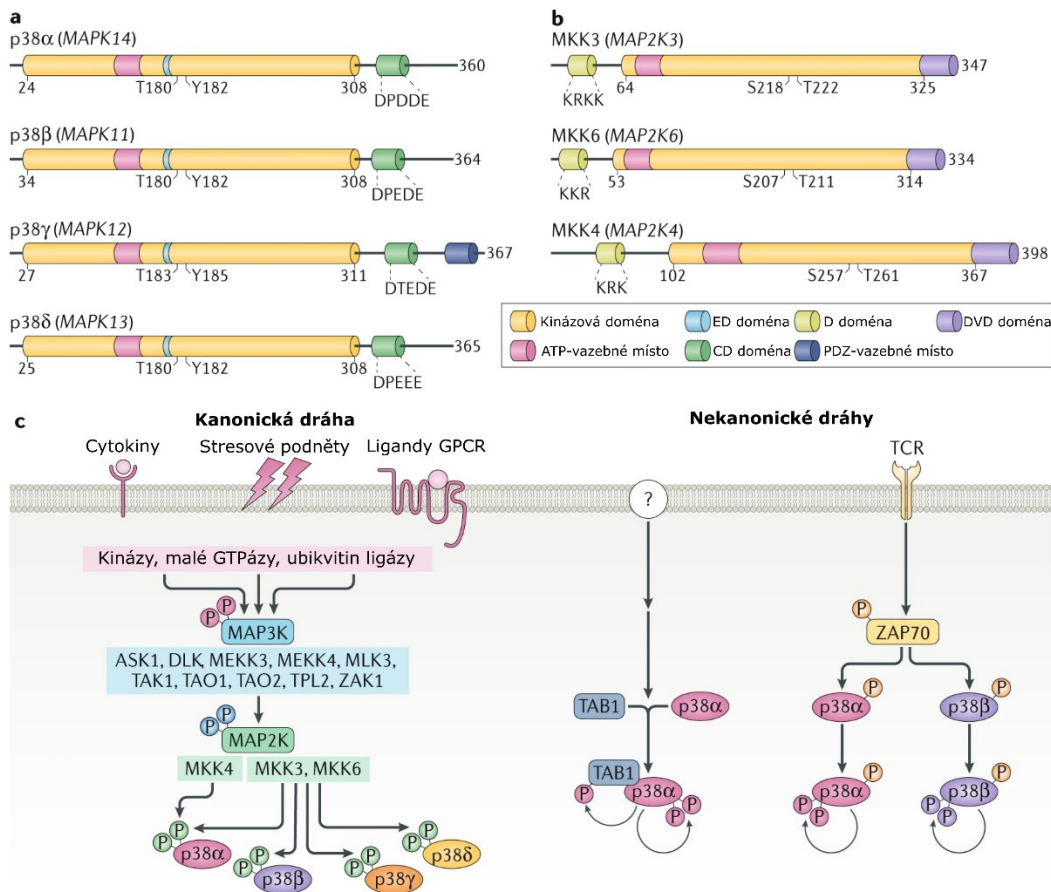
Aktivace p38 může být vyvolána např. oxidačním stresem, osmotickým stresem, teplotním šokem, UV zářením, poškozením DNA, cytokiny nebo infekcí. Většina z těchto signálů aktivuje také

dráhu JNK, mnoho MAPKKK je tak součástí jak p38, tak JNK MAPK kaskády. Prozánětlivé cytokiny, jako je TNF- α (tumor necrosis factor α) nebo interleukiny IL-6 a IL-1 β , spouští po vazbě na receptor na buněčném povrchu signální dráhy vedoucí k aktivaci p38. Signalizace TNF- α a IL-1 zahrnuje adaptorové proteiny TRAF (TNF receptor associated factor), které podporují aktivaci TAK1 (TGF- β activated kinase 1) a dalších MAPKKK dráhy p38. Kromě cytokinů zapojených do zánětlivé signalizace mohou dráhu p38 aktivovat také další cytokiny, které regulují mimo jiné buněčnou proliferaci a diferenciaci, např. TGF- β (transformující růstový faktor β). K aktivaci signální kaskády p38 MAPK dochází také při bakteriálních a virových infekcích. Aktivace může být zprostředkována Toll-like receptory (TLR), které jsou významnou součástí vrozené imunitní odpovědi. Virová infekce může spouštět kanonické i nekanonické dráhy aktivace p38, nebo také způsobovat inaktivaci fosfatáz (viz kapitola 2.2.3). Dráha p38 může být aktivována také receptory spřaženými s G proteinem (GPCR) nebo malými GTPázami z rodiny Rho – Rac a Cdc42, které regulují cytoskelet. (shrnuto v Canovas & Nebreda, 2021; Cargnello & Roux, 2011; Pearson et al., 2001)

Po aktivaci některou z MAPKKK katalyzují MAPKK fosforylaci threoninu 180 a tyrosinu 182 v sekvenčním motivu Thr-Gly-Tyr aktivační smyčky p38 α (Raingaud et al., 1995). Mezi MAPKK specifické pro signální dráhu p38 patří MKK3 a MKK6, p38 může být aktivována také kinázou MKK4, která je součástí dráhy JNK (Dérijard et al., 1995; Raingaud et al., 1996). MAPKK zapojené do aktivace p38 se mohou lišit v závislosti na druhu signálu. MKK3 a MKK6 jsou klíčové pro aktivaci p38 stimulovanou prozánětlivými cytokiny, jako je TNF- α , k aktivaci p38 vyvolané UV zářením přispívají kinázy MKK3, MKK6 i MKK4 (Brancho et al., 2003). MAPKK se liší svou schopností katalyzovat fosforylaci jednotlivých kináz z rodiny p38. Na rozdíl od MKK6, která fosforyluje všechny čtyři kinázy p38, kináza MKK3 fosforyluje pouze p38 α , p38 γ a p38 δ (Enslin et al., 1998). Kinázy p38 α , β , γ a δ zastávají různé funkce v důsledku fosforylace různých substrátů a specifické aktivaci odlišnými MAPKK. Ke specifitě aktivace přispívá selektivní formování funkčních komplexů mezi jednotlivými p38 MAPK a MAPKK dané interakcí p38 s D doménami na N-konci MKK3 a MKK6, a dále selektivní rozpoznání aktivační smyčky jednotlivých forem p38 (Enslin et al., 2000). Byl popsán např. rozdílný vliv MKK3 a MKK6 na indukci apoptózy (Y. Wang et al., 1998).

Kromě aktivace prostřednictvím klasické MAP kinázové kaskády existují dvě **nekanonické dráhy aktivace p38**. Prvním způsobem je autofosforylace p38 α vyvolaná vazbou proteinu **TAB1** (TGF- β activated kinase 1 binding protein 1) (Ge et al., 2002).

Druhý způsob nekanonické aktivace p38 je charakteristický pro T-lymfocyty. Stimulace T-buněčného receptoru (TCR) vede k fosforylaci p38 α a p38 β kinázou **ZAP70** (Zeta chain of T-cell receptor-associated protein kinase 70) na tyrosinu 323, a následné autofosforylaci p38 na threoninu 180 a tyrosinu 182 (Salvador et al., 2005). Na rozdíl od kanonické aktivace dochází k autofosforylaci přednostně na Tyr180, čímž je ovlivněna kinázová aktivita p38 a specifita fosforylace substrátů (Mittelstadt et al., 2009).



Obr. 4: MAP kinázy p38 a jejich aktivace. (a) Schematické znázornění 4 lidských kináz p38. V závorkách jsou uvedeny názvy genů. Vyznačena je kinázová doména, vazebné místo pro ATP, aminokyselinové zbytky (Thr a Tyr) v aktivační smyčce, jejichž fosforylací jsou kinázy p38 aktivovány, a dále domény účastnící se protein-proteinových interakcí (ED, CD, PDZ-vazebné místo). Čísla značí pořadí aminokyselin. CD (common docking) doména obsahuje záporně nabitě aminokyseliny a interaguje s D (docking) doménou aktivátorů, regulátorů a substrátů kináz p38. Ke specifické vazbě substrátů přispívá také ED doména. Kináza p38 δ má navíc na C-konci PDZ-vazebné místo umožňující vazbu proteinů obsahujících doménu PDZ [post synaptic density protein (PSD95), Drosophila disc large tumor suppressor (DlgA), zonula occludens-1 protein (zo-1)], které slouží jako platforma pro tvorbu proteinových komplexů regulujících různé signální dráhy. (b) Schematické znázornění 3 lidských kináz MAP kináz (MAP2K) aktivujících p38. V závorkách jsou uvedeny názvy genů. Znázorněna je kinázová doména, vazebné místo pro ATP, aminokyselinové zbytky (Ser a Thr) v aktivační smyčce, které jsou fosforylovány jednou z kináz kináz MAP kináz (MAP3K), D doména, která obsahuje kladně nabitě aminokyseliny a slouží k interakci s p38 a DVD doména (domain for versatile docking) umožňující interakci s MAP3K. Čísla značí pořadí aminokyselin. (c) Mechanismy aktivace p38. *Kanoničká dráha aktivace* může být vyvolána různými signály včetně vazby cytokinu na receptor, stresových podnětů a vazby ligandu (např. hormonu, cytokinu, metabolitu nebo neurotransmiteru) na receptor spážený s G proteinem (GPCR). Tyto signály aktivují MAP3K prostřednictvím mechanismů zahrnujících např. kinázy, malé GTPázy a ubikvitin ligázy. Mezi známé MAP3K dráhy p38 patří ASK1 (apoptosis signal-regulating kinase 1), DLK (dual leucine zipper kinase), MEKK3/4 (MAP3K3/4), MLK3 (mixed lineage kinase 3), TAK1 (transforming growth factor- β -activated kinase 1), TAO1/2 (thousand and one amino acid kinase 1/2), TPL2 (tumor progression locus 2) a ZAK1 (leucine-zipper and sterile- α -motif kinase 1). MAP2K jsou aktivovány fosforylací katalyzovanou MAP3K a následně fosforylují p38. *Nekanoničké dráhy aktivace* obnášejí autofosforylací p38 v důsledku vazby TAB1 (TAK1 binding protein 1) nebo fosforylace kinázou ZAP70 (zeta chain of T-cell receptor-associated protein kinase 70). Aktivace proteinem TAB1 může být vyvolána v různých typech buněk dosud neobjasněným mechanismem (?), k aktivaci prostřednictvím ZAP70 dochází v T-lymfocytech po aktivaci T-buněčného receptoru (TCR). Barva fosfátu (P) značí příslušnou kinázu, která fosforylací katalyzuje. Převzato z Canovas & Nebreda, 2021, upraveno.

Důležitou roli v regulaci aktivity p38 hrají fosfatázy. Ukončení signalizace p38 může být zprostředkováno serin/threonin fosfatázami, tyrosin fosfatázami a fosfatázami MKP s dvojitou specificitou (shrnuto v Canovas & Nebreda, 2021). Při regulaci aktivity p38 se uplatňují mechanismy negativní zpětné vazby. Působením p38 MAPK je zvýšena exprese fosfatázy MKP-1, která negativně reguluje aktivitu p38 a JNK a snižuje tak např. citlivost buněk na apoptózu indukovanou UV zářením (Staples et al., 2010). Aktivace MKP-1 představuje také efektivní mechanismus, který umožňuje buňkám reagovat na přetrvávající zánětlivé podněty, aniž by došlo k nadměrnému poškození. Při dlouhodobé stimulaci IL-1 β dochází ke kolísání aktivity p38 po její počáteční aktivaci, což je důsledkem negativní zpětné vazby zahrnující fosfatázu MKP-1. To umožňuje účinnou expresi prozánětlivých faktorů, jako jsou IL-6, IL-8 a cyklooxygenáza 2, při současném omezení rizika poškození buněk nebo apoptózy, která by mohla být způsobena dlouhotrvající aktivací p38 (Tomida et al., 2015).

Kromě aktivace fosfatáz může být p38 MAPK signalizace regulována také dalšími zpětnovazebnými smyčkami. Příkladem je negativní regulace exprese MKK6 způsobená snížením stability její mRNA vlivem p38 α (Ambrosino et al., 2003). Také fosforylace proteinu TAB1 kinázou p38 α omezuje další aktivaci p38. TAB1 se kromě výše zmíněné indukce autofosforylace p38 může podílet na aktivaci p38 kanonickou drahou prostřednictvím MAPKKK TAK1. Fosforylace TAB1 snižuje aktivaci kinázy TAK1, čímž negativně reguluje p38 MAPK signalizaci (Cheung et al., 2003). Dalším příkladem je aktivace p38 zprostředkovaná ZAP70 a následná fosforylace ZAP70 kinázou p38. Fosforylace kinázy ZAP70 brání její asociaci s TCR, čímž je omezena další signalizace prostřednictvím TCR (Giardino Torchia et al., 2018).

2.2.2.2 Substráty a funkce p38 MAPK

Podobně jako další MAPK, patří i p38 mezi Ser/Thr kinázy. Kináza p38 α fosforyluje více než 100 buněčných proteinů, mezi které patří proteinkinázy, transkripční faktory, další regulátory transkripce včetně epigenetických modifikátorů, regulátory buněčného cyklu, apoptózy, DNA a RNA vazebné proteiny, regulátory endocytózy, regulátory MAPK signalizace a dalších signálních drah, membránové proteiny a strukturální proteiny. Mnoho funkcí p38 je zprostředkováno přímou fosforylací transkripčních faktorů, která zpravidla vede k jejich aktivaci. Kromě toho může být transkripční regulace zprostředkovaná fosforylací transkripčních faktorů některou z kináz, které jsou substrátem p38. (shrnuto v Canovas & Nebreda, 2021; Han et al., 2020)

Proteinkinázy aktivované p38 fosforylují další proteiny a rozšiřují tak rozsah procesů regulovaných drahou p38. Mezi významné substráty p38 patří kinázy ze skupiny MAPKAPK, zejména MK2 (MAPKAPK2) a MK3. Jednou z možných funkcí MK2 po její aktivaci kinázou p38 je regulace transkripce fosforylací transkripčních faktorů CREB a ATF-1 (activating transcription factor 1) (Tan et al., 1996). MK2 se rovněž podílí na posttranskripční regulaci genové exprese. Fosforyluje např. RNA-vazebný protein tristetraprolin, který podporuje degradaci mRNA, tímto způsobem je regulována např. exprese TNF- α (Mahtani et al., 2001). Po aktivaci kinázou p38 fosforylují MK2 a MK3

také protein teplotního šoku HSP27 a mohou tak regulovat dynamiku aktinových filament (Larsen et al., 1997; McLaughlin et al., 1996). Dalšími kinázami aktivovanými p38 jsou MSK1 a MSK2 (mitogenem a stresem aktivované kinázy), které regulují genovou expresi fosforylací transkripčních faktorů, jako je CREB, nebo histonu H3 (Deak et al., 1998; Soloaga et al., 2003), a dále kinázy MNK1 a MNK2 (kinázy interagující s MAPK), zapojené do regulace translace prostřednictvím fosforylace iniciačního faktoru eIF4E (Waskiewicz et al., 1997).

S množstvím substrátů souvisí rozsah buněčných dějů regulovaných p38 MAPK signalizací. Patří mezi ně transkripce, remodelace chromatinu, regulace stability mRNA, translace, regulace degradace a lokalizace proteinů, buněčný cyklus, endocytóza, buněčný metabolismus, dynamika cytoskeletu, opravy poškození DNA, buněčná diferenciací, senescence, autofagie a buněčná smrt. Významná je také role p38 v regulaci odpovědi na buněčný stres a imunitní odpovědi. (shrnutí v Canovas & Nebreda, 2021; Han et al., 2020)

Aktivace kinázy p38 může vést k zastavení buněčného cyklu v důsledku přímé fosforylace nádorového supresoru pRb nebo inhibice transkripčních regulátorů CREB, YAP (Yes-associated protein) a MYC (Gubern et al., 2016; Muranen et al., 2016). Mutace MKK3 a MKK6 mohou způsobovat deregulaci buněčného cyklu a zvýšený vznik nádorů (Brancho et al., 2003). Regulace buněčného cyklu kinázou p38 se však může lišit v různých podmínkách, v závislosti na síle a délce trvání její aktivace. Zatímco aktivace p38 buněčným stresem vede k zastavení buněčného cyklu, slabší a přechodná aktivace p38 mitogenními podněty může podporovat zvýšení exprese cyklinu D1 a proliferaci buněk (Faust et al., 2012).

Kináza p38 vykazuje jak antiapoptotické, tak proapoptotické funkce. Může bránit apoptóze zvýšením hladiny antiapoptotických proteinů rodiny Bcl-2 (B-cell lymphoma-2) (Phong et al., 2010), nebo naopak podporovat apoptózu např. fosforylací proteinu p53 (Perfettini et al., 2005) nebo proapoptotických proteinů rodiny Bcl-2 (B. Cai et al., 2006; Kim et al., 2006).

Podstatnou úlohou p38 MAPK dráhy je regulace imunitní reakce, zejména zánětu. Aktivace p38 kinázou MKK3 podporuje produkci prozánětlivých cytokinů, mezi které patří TNF α , IL-1, IL-6, IL-8 a IL-12 (H. Lu et al., 1999; Winzen et al., 1999; Wysk et al., 1999). Dráha p38 se také účastní regulace interferonové odpovědi. Působení IFN typu I vyvolává aktivaci p38 a jejích substrátů MK2 a MK3, aktivace p38 podporuje transkripci stimulovanou interferony (Uddin et al., 1999). Jedním z transkripčních faktorů aktivovaných vlivem p38 je IRF3, který indukuje expresi IFN- α , IFN- β a interferonem stimulovaných genů (Navarro & David, 1999). Aktivace p38 v T-lymfocytech podporuje také expresi IFN- γ (Rincón et al., 1998). Exprese cytokinů může být signální drahou p38 regulována na úrovni transkripce prostřednictvím aktivace transkripčních faktorů, jako jsou NF- κ B (jaderný faktor κ B), IRF3, IRF7, ATF, CREB, cMyc, AP-1 a NF-AT (nuclear factor of activated T-cells). Dále se uplatňují mechanismy posttranskripční regulace mRNA a regulace translace. Transkripční faktory a další regulátory genové exprese mohou být aktivovány p38 přímo, nebo prostřednictvím dalších kináz,

jako je MK2 (shrnutí v Chander et al., 2021). Kináza p38 α podporuje prostřednictvím aktivace MK2 např. expresi cytokinů IL-6 a IL-8 stabilizací jejich mRNA (Winzen et al., 1999).

Kromě zvýšení produkce prozánětlivých cytokinů může p38 působit také protizánětlivě. Ke snížení produkce prozánětlivých cytokinů vlivem p38 přispívá aktivace kináz MSK1 a MSK2. Ty prostřednictvím fosforylace transkripčních faktorů CREB a ATF-1 zvyšují expresi protizánětlivého cytokinu IL-10 a fosfatázy MKP-1, která je součástí negativní zpětnovazebné regulace p38, a mohou tak bránit nekontrolované produkci prozánětlivých cytokinů vyvolané aktivací p38 skrze TLR (Ananieva et al., 2008). Dalším příkladem je negativní regulace stability mRNA pro TNF- α kinázou p38 prostřednictvím zvýšení exprese RNA-vazebného proteinu tristetraprolinu a jeho fosforylace kinázou MK2 (Mahtani et al., 2001).

Funkce p38 se mohou lišit v závislosti na druhu, intenzitě a délce trvání aktivačního signálu, buněčném typu nebo interakci s dalšími signálními drahami, mohou být ovlivněny také lokalizací p38 a dostupností jejích substrátů (shrnutí v Canovas & Nebreda, 2021). Kináza p38 může být podobně jako její aktivátory MKK3 a MKK6 přítomna jak v cytoplazmě, tak v buněčném jádře (Ben-Levy et al., 1998). Interakce p38 s velkým množstvím substrátů s různou buněčnou lokalizací mohou být regulovány dynamickým přesunem p38 mezi buněčným jádrem a cytoplazmou. Aktivace p38 kinázami MKK3/6 zvyšuje zastoupení p38 v buněčném jádře, zatímco atypická aktivace prostřednictvím TAB1 je spojena se zvýšenou aktivitou p38 v cytosolu a endosomech a sníženou aktivitou v jádře (Burton et al., 2023). TAB-1 váže kinázu p38 v cytosolu, brání její interakci s MKK3 a omezuje její translokaci do jádra, čímž může negativně regulovat signalizaci dráhy MKK3/p38 a funkce zprostředkované jadernými substráty p38 (G. Lu et al., 2006). Byl také popsán export p38 z jádra v komplexu s kinázou MK2, která je jedním z jaderných substrátů p38. Aktivace p38 prostřednictvím MKK3/MKK6 tak umožňuje fosforylaci MK2 v jádře a následný transport p38 společně s MK2 do cytoplazmy (Ben-Levy et al., 1998).

2.2.3 Role p38 při virové infekci

Jedním z faktorů vyvolávajících aktivaci signální dráhy p38 MAPK je virová infekce. Aktivita p38 MAPK může podporovat virovou infekci, nebo naopak přispívat k buněčným obranným mechanismům, jejichž překonání je nezbytné pro replikaci viru. Aktivace p38 MAPK ovlivňuje různé aspekty virové infekce. V rámci obrany proti virové infekci reguluje mimo jiné produkci prozánětlivých cytokinů a interferonů. Aktivace MAP kinázy p38 může také přispívat k nadměrné imunitní reakci na virovou infekci (cytokinové bouři), která vede k poškození tkání. Dále p38 reguluje replikaci virového genomu, virovou transkripci a translaci, apoptózu, buněčný cyklus, nebo také cytoskelet, endocytózu a intracelulární transport virů a virových proteinů (shrnutí v Chander et al., 2021).

Ačkoliv objasnění mechanismů regulace p38 MAPK dráhy při virové infekci vyžaduje další výzkum, je patrné, že aktivace p38 MAPK může být klíčovým faktorem rozhodujícím o průběhu infekce. Mnoho RNA i DNA virů využívá modulaci signalizace p38 a dalších MAPK drah jako součást

své strategie pro dosažení vhodných podmínek k replikaci, aktivita p38 často hraje zásadní roli ve virové patogenezi. Aktivace p38 MAPK je komplexní proces, který může být při virové infekci regulován na různých úrovních prostřednictvím interakcí virů se složkami signální kaskády. Kináza MKK3 tak může jakožto MAPKK fosforylující p38 významně ovlivňovat různé kroky virového replikačního cyklu a obranné mechanismy hostitele (shrnutí v L. Wang et al., 2022).

Význam p38 pro polyomavirovou infekci zůstává z velké části neobjasněný. Níže jsou shrnuty poznatky o aktivaci kinázy p38 při infekci viry s DNA genomem a vlivu p38 MAPK dráhy na replikaci těchto virů.

Herpesviry

HSV-1 (herpes simplex virus 1) způsobuje aktivaci p38 MAPK dráhy, která může mít různý dopad na průběh infekce. Indukuje fosforylaci p38 prostřednictvím MKK4, kináza p38 dále aktivuje transkripční faktor AP-1. Studie ukázaly, že aktivita p38 nemá vliv na transkripci HSV-1, podporuje však replikaci viru (Karaca et al., 2004; Zachos et al., 1999). Po aktivaci bezprostředně časným virovým proteinem ICP27 (infected cell protein 27) může p38 indukovat apoptózu (Gillis et al., 2009). Infekce HSV-1 také stimuluje vznik reaktivních forem kyslíku prostřednictvím NADPH oxidázy, aktivuje tak p38, a podporuje produkci prozánětlivých cytokinů (TNF- α a IL-1 β) a chemokinů (CCL2 a CXCL10) (Hu et al., 2011). Signální dráha p38 dále reguluje vrozenou imunitní odpověď na virovou infekci. Fosforylace deubikvitinačního enzymu USP21 (ubikvitin specifická peptidáza 21) kinázou p38 v pozdní fázi infekce HSV-1 podporuje interakci USP21 s adaptorovým proteinem STING (stimulátor interferonových genů). Ten je součástí signální dráhy, která ústí v produkci IFN po rozpoznání virové DNA buněčnými senzory, jako je cGAS (syntáza cyklického GMP-AMP). Výsledkem interakce je deubikvitinace a inaktivace STING, čímž je omezena aktivace transkripčního faktoru IRF3 a produkce IFN typu I. Aktivace dráhy p38/USP21 tak představuje mechanismus úniku DNA virů před vrozenou imunitou hostitele (Y. Chen et al., 2017).

Aktivace p38 MAPK dráhy v buňkách infikovaných virem Epstein-Barrové (**EBV**) přispívá ke změnám v buněčné signalizaci, které usnadňují virovou replikaci a umožňují reaktivaci latentního viru. Tegumentový protein BGLF2 viru EBV aktivuje p38 a podporuje tak reaktivaci EBV v latentně infikovaných buňkách. Tento proces zahrnuje aktivaci transkripčního faktoru AP-1 a zvýšení exprese virového proteinu BZLF1 spojené s přechodem EBV do lytického cyklu (X. Liu & Cohen, 2015). K reaktivaci EBV významně přispívá aktivace p38 bezprostředně časnými virovými proteiny BZLF1 a BRLF1 a následná aktivace transkripčních faktorů, jako je ATF-2 a c-Jun (Adamson et al., 2000). Kináza p38 také podporuje reaktivaci EBV z latence prostřednictvím autofagie. Indukce autofagie je závislá na aktivaci p38 proteinkinázou C θ (PKC θ) (Gonnella et al., 2015).

K aktivaci p38 dochází také v časné i pozdní fázi infekce lidským cytomegalovirem (**HCMV**). Byly popsány dva odlišné mechanismy aktivace – kanonická aktivace MAPK kaskády a inhibice fosfatáz. V časné fázi infekce nebyla detekována zvýšená fosforylace MKK3, MKK6 ani MKK4,

HCMV v tomto případě podporuje aktivitu p38 inhibicí její defosforylace. V pozdějších fázích infekce je zvýšena aktivita MKK3/MKK6. Aktivace p38 je klíčová pro modulaci buněčných procesů v průběhu infekce prostřednictvím fosforylace proteinů, jako je pRb nebo HSP27 (Johnson et al., 2000). Infekce HCMV vede k akumulaci reaktivních forem kyslíku, která podporuje replikaci viru aktivací p38 a indukcí transkripce regulované hlavním bezprostředně časným promotorem (MIEP) (Xiao et al., 2015).

Adenoviry

V buňkách infikovaných lidským adenovirem 2 (Ad2) podporuje aktivace p38 kinázou MKK6 transport virových částic pomocí mikrotubulů a vstup viru do buněčného jádra. Důležitou roli v transportu viru do jádra regulovaném drahou p38 hraje kináza MK2 a její substrát HSP27 (Suomalainen et al., 2001). Signalizace p38 může ovlivňovat různé kroky adenovirové infekce. Aktivace dráhy p38 prostřednictvím MKK3/6 způsobuje akumulaci hnRNP A1 (heterogenního jaderného ribonukleoproteinu A1) v cytoplazmě. Tento RNA-vazebný protein reguluje mnoho aspektů metabolismu RNA, jeho akumulace v cytoplazmě ovlivňuje mimo jiné alternativní sestřih časného adenovirového transkriptu E1A (van der Houven van Oordt et al., 2000). Infekce buněk epitelu dýchacích cest virem Ad7 spouští expresi prozánětlivých cytokinů, ke které přispívá dráha p38/NF- κ B. V infikovaných buňkách je zvýšena fosforylace kinázy p38, která aktivuje transkripční faktor NF- κ B a podporuje tak expresi IL-6 (Qi et al., 2020).

HBV

Virus hepatitidy typu B (HBV) vyvolává fosforylaci p38, která podporuje syntézu virové DNA, RNA a proteinů (W.-W. Chang et al., 2008). Signální dráha p38 může přispívat k patogenezi HBV zvýšením produkce prozánětlivých cytokinů. Virové proteiny HBcAg (core antigen) a HBx aktivují MAP kinázy p38, ERK1/2 a transkripční faktor NF- κ B, a zvyšují tak produkci IL-6 v hepatocytech. Produkce IL-6 vyvolaná HBx je závislá na adaptorovém proteinu MyD88 (myeloid differentiation primary response protein 88), který se účastní přenosu signálu z TLR (Z. Chen et al., 2017; Xiang et al., 2011). Aktivace p38 proteinem HBx také zvyšuje expresi transkripčního regulátoru SATB1 (special AT-rich sequence binding protein 1) a podporuje tak metastatický potenciál hepatocelulárního karcinomu vyvolaného HBV (Tu et al., 2019).

Polyomaviry

Polyomavirová infekce vyvolává aktivaci různých signálních drah, mezi které patří i MAP kinázové dráhy. Již při vazbě MPyV na receptor na buněčném povrchu jsou aktivovány kinázové dráhy PI3K, FAK (focal adhesion kinase)/Src, ERK a JNK (O'Hara & Garcea, 2016). Významným aktivátorem signální transdukce je MT antigen MPyV, který interaguje s fosfatázou PP2A a kinázami z rodiny Src, což vede k jeho fosforylaci. MT pak může asociovat s buněčnými proteiny Grb2 (growth factor receptor bound protein 2), SOS (son of sevenless), PI3K nebo fosfolipázou C- γ 1 (shrnuto v Fluck

& Schaffhausen, 2009; Rouleau et al., 2016). V buňkách exprimujících ST antigen MPyV byla detekována zvýšená fosforylace kináz MKK3/6 a p38 (Andrabi et al., 2007).

ST antigen **MCPyV** aktivuje p38 prostřednictvím MKK4 a zvyšuje tak migraci buněk, aktivace p38 má význam pro rozvoj karcinomu Merkelových buněk. ST indukuje fosforylaci p38 a jejích cílových proteinů, mezi které patří ATF-2, MSK1 a MK2. Pro aktivaci p38 je klíčová interakce ST s katalytickou podjednotkou protein fosfatázy 4 (PP4C) (Dobson et al., 2020).

Při infekci **SV40** jsou již v časně fázi aktivovány MAP kinázy p38, ERK a JNK. V pozdní fázi infekce je aktivace signálních drah zahrnujících proteiny, jako je protoonkogen Ras, Rac1 (Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1), MKK4 a JNK nezbytná pro vakuolizaci buněk a uvolnění viru v důsledku lyze buněk (Motamedi et al., 2020).

2.3 Protein DAXX a jeho role při virové infekci

2.3.1 Protein DAXX a jaderná tělíska PML

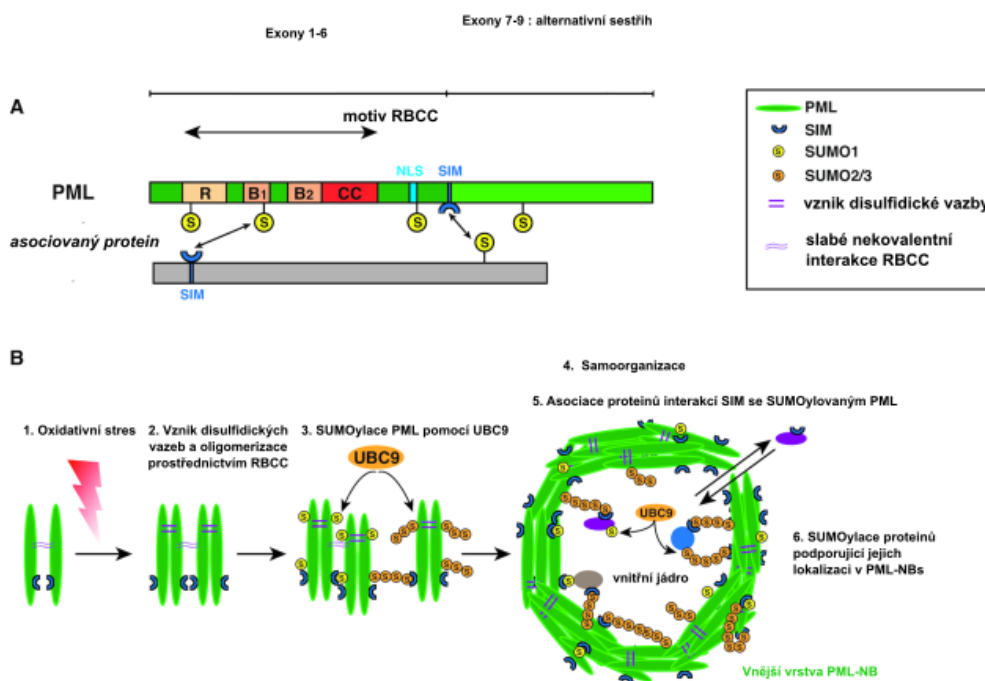
Objev proteinu DAXX souvisel s jeho funkcí v indukci apoptózy (X. Yang et al., 1997). Později byly charakterizovány další funkce DAXX zprostředkované interakcemi s množstvím různých proteinů. Významné funkce DAXX, spojené s regulací transkripce, a především rolí DAXX jako histonového chaperonu, jsou popsány v kapitole 2.3.3.

Délka sekvence lidského proteinu DAXX, kódovaného na chromozomu 6, stejně jako myšího homologu DAXX, jehož gen je lokalizován na chromozomu č. 17, činí 740 aminokyselin, teoretická molekulová hmotnost je 81,4 kDa. Aminokyselinová sekvence lidského DAXX je přibližně ze 70 % identická s myším DAXX, více konzervovaná je N-terminální část proteinu. Protein DAXX je exprimován velkým množstvím lidských i myších tkání. Je lokalizován převážně v buněčném jádře, v menší míře se vyskytuje také v cytoplazmě (Kiriakidou et al., 1997; Michaelson et al., 1999; Pluta et al., 1998; X. Yang et al., 1997). V jádře je protein DAXX součástí PML tělísek (viz níže). Exprese DAXX je indukována působením IFN typu I i II (Maillet et al., 2020). Působením IFN typu I se spolu se zvýšenou expresí DAXX zvyšuje jeho zastoupení v jaderných tělískách (Gongora et al., 2001).

PML-NBs

Jaderná tělíska PML (PML-NBs, známá také jako PML onkogenní domény – PODs, nebo jaderné domény 10 – ND10) jsou kulovité struktury o průměru 0,3–1 µm ohraničené vrstvou proteinu PML (Lang et al., 2010). Protein PML je zásadní pro integritu PML-NBs a akumulaci dalších proteinů v těchto strukturách. V nepřítomnosti PML se ostatní složky PML tělísek vyskytují rozptýlené v jádře (Ishov et al., 1999). PML tělíska se vyskytují v jádře většiny savčích buněk v počtu 5–30 v závislosti na fázi buněčného cyklu, buněčném typu a fyziologickém stavu (shrnuto v Corpet et al., 2020). Počet PML-NBs se zvyšuje v G2 fázi buněčného cyklu, nebo také např. působením IFN- α a teplotního šoku (Everett et al., 1999). Během mitózy se PML-NBs rozpadají, PML se vyskytuje v podobě agregátů a další složky PML-NBs jsou rozptýleny (Lang et al., 2010).

Tloušťka vnější vrstvy tvořené proteinem PML se pohybuje v rozmezí 50–100 nm. Vnější vrstva umožňuje přesun proteinů mezi PML-NBs a nukleoplazmou, mimo PML se v ní vyskytuje protein Sp100 (speckled 100 kDa protein) a izoformy SUMO (small ubiquitin-like modifier) -1, -2 a -3. V PML tělískách jsou v různých podmínkách akumulovány další proteiny (Lang et al., 2010). Mezi konstitutivní proteiny PML tělísek se řadí proteiny Sp100, DAXX nebo SUMO. Celkem bylo identifikováno více než 270 proteinů, které mohou být asociovány s PML-NBs (shrnuto v Ryabchenko et al., 2023). Struktura a proces utváření PML tělísek jsou znázorněny na Obr. 5.



Obr. 5: Struktura a vznik jaderných tělísek PML. (A) Základem struktury tělísek je protein PML (promyelocytární leukémie). Lidský protein PML má 7 izoforem vzniklých alternativním sestřihem exonu 7–9. Obsahuje motiv RBCC (RING finger/B-box/coiled coil) důležitý pro oligomerizaci PML, jaderný lokalizační signál (NLS), motiv interagující se SUMO (SIM). Vyznačeny jsou 4 lysinové zbytky, na nichž může být PML modifikován kovalentní vazbou SUMO (small ubiquitin-like modifier). Při biogenezi PML tělísek a asociaci dalších proteinů se uplatňují interakce SUMO-SIM. (B) Schéma vzniku PML tělísek. Oxidativní stres vyvolává vznik disulfidických vazeb, což spolu s nekovalentními interakcemi zprostředkovanými motivem RBCC podporuje oligomerizaci PML. SUMOylace PML za účasti enzymu UBC9 (ubiquitin carrier protein 9) a následné interakce SUMO-SIM podporují uspořádání PML do struktury vnější kostry tělísek. Prostřednictvím SUMO-SIM interakcí dochází také k asociaci dalších proteinů, které mohou být součástí vnější vrstvy spolu s PML (např. protein Sp100), nebo se mohou nacházet ve vnitřní části PML tělísek. Dále probíhá SUMOylace těchto proteinů, která podporuje jejich zadržení v PML tělískách. Přeřazeno z Corpet et al., 2020, upraveno.

Pro funkci PML tělísek má zásadní význam SUMOylace, posttranslační modifikace proteinů kovalentní vazbou SUMO. SUMOylace, podobně jako ubiquitinace, zahrnuje tři enzymatické kroky katalyzované SUMO aktivačním enzymem E1, SUMO konjugačním enzymem E2 (UBC9, ubiquitin carrier protein 9) a SUMO ligázou E3. Protein PML vykazuje funkci SUMO E3 ligázy, je tedy schopen katalyzovat SUMOylaci proteinů v PML-NBs (Chu & Yang, 2011). Ke konjugaci jednotlivých izoforem SUMO dochází v různých podmínkách. Isoforma SUMO-1 se v buňkách nachází převážně konjugovaná s proteiny, na rozdíl od SUMO-2/3, které se vyskytují převážně ve volné formě a jejich vazba

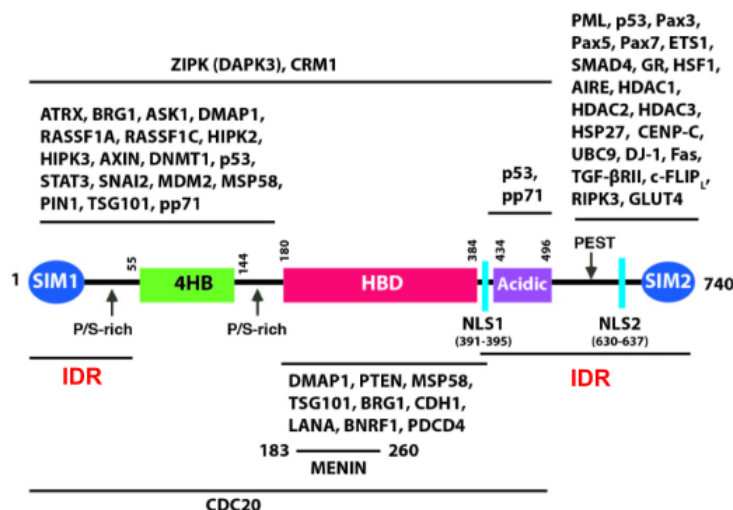
na substráty se zvyšuje v reakci na vnější stres (Saitoh & Hinchey, 2000). Kovalentní modifikace SUMO umožňuje interakci s proteiny obsahujícími motiv SIM (SUMO interakční motiv), mezi které patří také PML (Shen et al., 2006). Interakce SUMO-SIM mohou být regulovány posttranslačními modifikacemi, např. fosforylací SIM nebo acetylací SUMO. Fosforylace SIM proteinů PML a DAXX podporuje vazbu SUMO-1 (Cappadocia et al., 2015), acetylace SUMO-1 na různých lysinových zbytcích inhibuje vazbu k SIM proteinů PML nebo DAXX (Mascle et al., 2020).

Vzhledem k jejich rozmanitému složení se PML-NBs účastní mnoha buněčných funkcí, mezi které patří např. remodelace chromatinu, opravy poškození DNA, regulace genové exprese, buněčného cyklu, apoptózy nebo senescence (shrnuto v Ryabchenko et al., 2023). Proteiny PML-NBs jsou restričními faktory mnoha DNA i RNA virů, k obraně proti virové infekci přispívají také svou rolí ve vrozené imunitě. Podporují mimo jiné interferonovou signalizaci při virové infekci. Mnoho virů vyvinulo mechanismy k překonání obranné funkce PML-NBs, způsobují rozpad struktury PML-NBs nebo degradaci některých jejich složek (shrnuto v Scherer & Stamminger, 2016). Vliv PML-NBs na virovou infekci však nemusí být pouze negativní, viry mohou po narušení struktury PML-NBs využívat některé jejich složky k usnadnění replikace (P. Xu et al., 2016).

2.3.2 Struktura DAXX a posttranslační modifikace

Doménové uspořádání proteinu DAXX je znázorněno na Obr. 6. V N-terminální části DAXX se nachází doména DHB (DAXX helix bundle) tvořená svazkem čtyř helixů. Tato doména umožňuje interakci s dalšími proteiny včetně onkogenu RASSF1C (Ras association domain family protein 1 isoform C), p53 nebo ubikvitin ligázy Mdm2 (mouse double minute 2 homolog) (Escobar-Cabrera et al., 2010). Další helikální doména v N-koncové polovině DAXX byla identifikována jako histon-vazebná doména (HBD), díky níž DAXX váže nekanonickou histonovou variantu H3.3 (Lewis et al., 2010). Část N-terminální a většina C-terminální části DAXX představují vnitřně neuspořádané oblasti. Nestrukturovaná C-terminální oblast obsahuje acidickou doménu s vysokým obsahem aminokyselinových zbytků Glu/Asp a úseky SPE a SPT s vysokým zastoupením Ser/Pro/Glu a Ser/Pro/Thr (Escobar-Cabrera et al., 2010). Pomocí C-koncové oblasti interaguje DAXX s mnoha proteiny, zároveň je tato oblast cílem posttranslačních modifikací. Prostřednictvím acidické domény v C-terminální oblasti váže DAXX např. pozitivně nabitě aminokyseliny C-terminální domény p53 (L. Y. Zhao et al., 2004), SPT oblast je důležitá např. pro vazbu histon deacetylázy 2 (HDAC2) (Hollenbach et al., 2002). Za lokalizaci DAXX v jádře zodpovídají dva NLS, z nichž jeden se nachází v centrální oblasti (NLS1) a další v C-terminální oblasti (NLS2). Oba NLS mohou nezávisle na sobě zprostředkovat transport DAXX do jádra prostřednictvím vazby importinu $\alpha 3$ (Yeung et al., 2008). Na obou koncích proteinu se nachází SIM, které mohou nezávisle na sobě interagovat se SUMO (Santiago et al., 2009). Motivy SIM jsou důležité pro SUMOylaci proteinu DAXX a jeho lokalizaci v PML-NBs prostřednictvím interakce se SUMOylovaným PML. V nepřítomnosti PML je DAXX namísto s PML-NBs asociován s kondenzovaným heterochromatinem, tato lokalizace je také

zprostředkována interakcí SIM proteinu DAXX se SUMO. Přítomnost alespoň jednoho funkčního SIM je zásadní pro interakci s UBC9, jediným E2 konjugčním enzymem SUMOylační kaskády (Lin et al., 2006; Santiago et al., 2009). Intramolekulární interakcí N-koncového SIM s DHB může být inhibována vazba SUMO. Tato interakce, případně její narušení, představuje možný autoregulační mechanismus DAXX, kterým je regulována vazba SUMOylovaných proteinů pomocí SIM a vazba dalších interakčních partnerů pomocí DHB (Escobar-Cabrera et al., 2011).



Obr. 6: Struktura lidského proteinu DAXX a vybrané interagující proteiny. N-terminální část obsahuje domény 4HB (doména tvořená čtyřmi α -helixy, známá také jako DHB, DAXX helix bundle) a HBD (histon-vazebná doména). Na obou koncích proteinu se nachází motiv pro interakci se SUMO (SIM1, SIM2). Protein obsahuje 2 jaderné lokalizační signály (NLS1, NLS2). Na N- a C-konci se vyskytují vnitřně neuspořádané oblasti (IDR), C-terminální oblast obsahuje acidickou doménu a oblasti s vysokým zastoupením aminokyselin Pro, Glu, Ser, Thr (PEST). Čísla značí pořadí aminokyselin v sekvenci. Uvedeny jsou významné proteiny interagující s vyznačenými oblastmi proteinu DAXX. Převzato z Mahmud & Liao, 2019, upraveno.

Izoformy

Kromě nejlépe charakterizované izoformy byly popsány 2 další izoformy lidského proteinu DAXX vzniklé alternativním sestřihem v oblasti exonu 6, DAXX- β a DAXX- γ . Alternativní sestřih vede k posunu čtecího rámce a zkrácení C-terminální oblasti. Zatímco majoritní izoforma DAXX má 740 aminokyselin a molekulovou hmotnost 81,4 kDa, DAXX- β je tvořen 688 aminokyselinami (molekulová hmotnost 76,3 kDa) a DAXX- γ 682 aminokyselinami (75,6 kDa) (Wethkamp et al., 2011). Dle databáze NCBI Gene existují také další varianty lidského transkriptu DAXX a další možné izoformy proteinu, které však dosud nebyly blíže charakterizovány.

Změny v C-terminální oblasti ovlivňují interakci s dalšími proteiny. Izoformy DAXX- β a DAXX- γ se vyznačují sníženou afinitou k PML, s níž souvisí rozdílná lokalizace těchto izoform proti hlavní izoformě DAXX. Při alternativním sestřihu jsou zachovány oba NLS, vzniklé izoformy jsou tak lokalizovány v jádře, jejich distribuce se ale liší od DAXX asociovaného převážně s PML-NBs. Lokalizace DAXX- β a DAXX- γ se podobá lokalizaci DAXX v nepřítomnosti PML, pravděpodobně představující akumulaci v místech heterochromatinu. Zkrácená C-terminální oblast také způsobuje sníženou afinitu k p53. Izoformy DAXX- β a DAXX- γ nejsou na rozdíl od majoritní izoformy schopné

rekrutovat p53 do PML-NBs a ztrácí schopnost repress transkripce regulované proteinem p53. Kromě toho izoformy DAXX- β a DAXX- γ postrádají schopnost indukce apoptózy interakcí s receptorem Fas (Wethkamp et al., 2011).

Posttranslační modifikace

Protein DAXX podléhá posttranslačním modifikacím, které mají význam pro regulaci jeho lokalizace a funkcí. Patří mezi ně fosforylace, SUMOylace a ubikvitinace.

Fosforylace DAXX v C-terminální oblasti významně ovlivňuje jeho interakce s proteiny. S HDAC2 pravděpodobně interaguje nefosforylovaný DAXX, pro interakci s PML je naopak důležitá fosforylace DAXX (Hollenbach et al., 2002). Fosforylací mohou být regulovány interakce DAXX se SUMOylovanými proteiny. Následkem fosforylace C-koncového SIM kinázou CK2 (casein kinase 2) na 2 serinových zbytcích je přednostní vazba SUMO-1 oproti SUMO-2/3. Fosforylace SIM zvyšuje SUMOylaci DAXX a interakci se SUMOylovanými proteiny a představuje významný mechanismus regulace funkcí DAXX. Podporuje interakci DAXX s PML spojenou s akumulací v PML-NBs a represi antiapoptotických genů. Zvyšuje citlivost buněk k apoptóze indukované Fas nebo osmotickým stresem (C.-C. Chang et al., 2011). Myší protein DAXX také interaguje s kinázou HIPK1 (homeodomain-interacting protein kinase 1), která ho fosforyluje na Ser 669 a omezuje tak jeho funkci v represi transkripce (Ecsedy et al., 2003). Fosforylace 2 serinových zbytků v N-koncové části DAXX kinázou ASK1 (apoptosis signal-regulating kinase 1) brání degradaci proteinu DAXX (Kitamura et al., 2009).

DAXX může být **SUMOylován** na několika lysinových zbytcích převážně v C-terminální oblasti (Lin et al., 2006). SUMOylace podporuje transport DAXX z cytoplazmy do jádra, k němuž přispívá také interakce DAXX se SUMO prostřednictvím SIM (A. Chen et al., 2006). SUMOylace DAXX je zvýšena např. při buněčném stresu. V důsledku teplotního šoku dochází k tvorbě poly-SUMO řetězců a rozsáhlé konjugaci SUMO-2/3 s mnoha proteiny zúčastněnými v regulaci buněčného cyklu, apoptóze, transportu, skládání a degradaci proteinů, transkripci, translaci a replikaci, rekombinaci a opravách DNA (Golebiowski et al., 2009).

DAXX může podléhat **ubikvitinaci** např. vlivem poškození DNA, ubikvitinace vede k degradaci DAXX proteazomem. Tímto způsobem je ovlivněna mimo jiné funkce DAXX v regulaci MAP kinázové dráhy JNK. Protein RASSF1C je lokalizován v PML-NBs v důsledku interakce s N-terminální oblastí DAXX. Degradace DAXX indukovaná poškozením DNA vede k relokizaci RASSF1C do cytoplazmy a aktivaci signální dráhy JNK (Kitagawa et al., 2006). Ubikvitinace DAXX je regulována jeho fosforylací. Peptidyl-prolyl izomeráza Pin1 rozpoznává fosforylovaný motiv Ser178-Pro lidského proteinu DAXX a vyvolává ubikvitinaci DAXX s následnou proteazomální degradací. Tímto způsobem je negativně regulována např. funkce DAXX v indukci apoptózy aktivací signální kaskády ASK1/JNK v reakci na oxidační stres (Ryo et al., 2007).

Regulace lokalizace a funkcí DAXX

Funkce proteinu DAXX souvisí s regulací jeho transportu mezi jádrem a cytoplazmou. Např. k regulaci apoptózy může DAXX přispívat rozdílnými mechanismy jak v cytoplazmě, tak v buněčném jádře (viz 2.3.3.1). Lokalizace DAXX je převážně jaderná, k translokaci DAXX do cytoplazmy dochází např. v důsledku aktivace Fas receptoru nebo při nadprodukci kinázy ASK1 (Charette et al., 2000; Ko et al., 2001). Další výzkum pomohl objasnit význam ASK1 pro lokalizaci DAXX. Při nedostatku glukózy a oxidačním stresu je prostřednictvím ASK1 spuštěna signalizace JNK. K její aktivaci může přispívat také protein DAXX, který svou C-terminální oblastí interaguje s ASK1, způsobuje oligomerizaci ASK1 a následnou aktivaci JNK. Kináza JNK fosforyluje kinázu HIPK1, která následně fosforyluje DAXX a podporuje jeho transport do cytoplazmy (Song & Lee, 2003). Export DAXX z jádra je umožněn přítomností jaderného exportního signálu (NES) v C-terminální části proteinu. NES je rozpoznáván proteinem CRM1 (chromosomal region maintenance 1, známý také jako exportin 1). Fosforylace DAXX kinázou HIPK1 je spojena se změnou konformace a zpřístupněním NES pro vazbu CRM1. Protein DAXX je pomocí CRM1 transportován do cytoplazmy, kde interaguje s ASK1, indukuje její oligomerizaci a podporuje další aktivaci signální dráhy JNK (Song & Lee, 2004).

SUMOylace DAXX podporuje transport DAXX do jádra, kromě toho také zvyšuje jeho stabilitu (C. Chen et al., 2020). Jaderná lokalizace DAXX je kritická pro jeho úlohu v regulaci transkripce (Yeung et al., 2008). Funkce DAXX je také regulována jeho akumulací nebo uvolňováním z PML tělísek. Např. interakce DAXX s kinázou HIPK1 nezávisle na jeho fosforylaci narušuje interakci DAXX s PML a způsobuje uvolnění DAXX z PML-NBs. Po uvolnění z PML-NBs DAXX asociuje s histon deacetylázou HDAC1 a pravděpodobně se podílí na represii transkripce (Ecsedy et al., 2003). Zdá se, že dochází také k dynamickému přesunu DAXX mezi PML tělísky a chromatinem v závislosti na fázi buněčného cyklu (Everett et al., 1999). DAXX je ve většině buněk asociován s PML-NBs nebo s heterochromatinem, částečně se vyskytuje napříč nukleoplazmou. V pozdní S fázi je DAXX uvolněn z PML-NBs a asociován s heterochromatinem. Během G2 fáze se DAXX vrací do PML-NBs (Ishov et al., 2004).

2.3.3 Funkce DAXX

2.3.3.1 Regulace apoptózy

Protein DAXX byl objeven v souvislosti s jeho proapoptotickou funkcí v důsledku vazby Fas receptoru a aktivace signální dráhy JNK (X. Yang et al., 1997). DAXX funguje jako adaptorový protein, prostřednictvím C-terminální oblasti váže doménu smrti (death domain) v cytosolické části Fas receptoru a dále interaguje s kinázou ASK1. Tato interakce vede k aktivaci ASK1, která indukuje apoptózu spuštěním MAP kinázové signální kaskády. ASK1 jakožto MAPKKK aktivuje kinázu MKK4, která následně aktivuje MAP kinázu JNK. Kináza ASK1 se uplatňuje také při indukci apoptózy p38 MAPK drahou prostřednictvím aktivace kináz MKK3 a MKK6 (H. Y. Chang et al., 1998; Ichijo et al., 1997; X. Yang et al., 1997).

Další výzkum ukázal, že kromě vazby Fas v cytoplasmě reguluje DAXX apoptózu v buněčném jádře a může podporovat apoptózu nezávisle na jeho funkci v aktivaci dráhy JNK. Pro funkci DAXX v indukcii apoptózy je důležitá jeho přítomnost v PML-NBs (Torii et al., 1999; Zhong et al., 2000).

Kromě apoptózy vyvolané vazbou Fas ligandu byla odhalena role DAXX v apoptóze indukované TGF- β , kdy interakce DAXX s receptorem pro TGF- β vede opět k aktivaci JNK (Perlman et al., 2001), nebo v apoptóze indukované interferony typu I, kdy má pravděpodobně význam přesun DAXX do PML-NBs (Gongora et al., 2001). DAXX podporuje také aktivaci JNK při apoptóze indukované TNF- α , významnou roli v tomto procesu hraje fosforylace DAXX kinázou ASK1 (Kitamura et al., 2009).

Kromě funkce DAXX v indukcii apoptózy byly popsány také antiapoptotické funkce DAXX související s regulací aktivity p53 (viz níže).

2.3.3.2 Regulace transkripce

Další popsanou funkcí DAXX byla jeho úloha v regulaci transkripce v důsledku asociace s transkripčními faktory. Interakcí s transkripčními faktory může být DAXX naveden k promotorům cílových genů a způsobovat jejich epigenetickou represi interakcí s DNA methyltransferázami. DAXX interaguje např. s RelB, transkripčním faktorem z rodiny NF- κ B, a rekrutuje DNA methyltransferázu I, čímž podporuje metylaci CpG v promotorech a represi transkripce genů regulovaných RelB (Puto & Reed, 2008). DAXX se může také podílet na epigenetické represi transkripce interakcí s histon deacetylázami (Hollenbach et al., 2002; H. Li et al., 2000). Pro interakci DAXX s transkripčními faktory je důležitý motiv SIM. DAXX váže SUMOylované transkripční faktory, jako je např. Smad4 (mothers against decapentaplegic homolog 4), AR (androgenní receptor) a GR (glukokortikoidní receptor) nebo CBP a potlačuje jejich transkripční aktivitu (Lin et al., 2006).

Přestože byl DAXX ve většině případů charakterizován jako negativní regulátor transkripce, byla popsána také funkce DAXX v aktivaci transkripce. DAXX interaguje svojí C-terminální oblastí s transkripčním faktorem Pax5 (paired box protein 5) a v různých lidských a myších buněčných liniích funguje jako korepresor nebo koaktivátor transkripce. Aktivace transkripce pravděpodobně zahrnuje interakci DAXX s histon acetyltransferázou CBP (Emelyanov et al., 2002). DAXX také působí jako koaktivátor transkripce regulované transkripčním faktorem 4 (TCF4), s nímž opět interaguje C-terminální oblastí (Y.-S. Huang & Shih, 2009). Podporuje také transkripční aktivaci zprostředkovanou faktorem c-Jun, pro tuto funkci DAXX jsou nezbytné oba SIM (Santiago et al., 2009).

Významnou funkcí DAXX je regulace transkripční aktivity proteinu p53. DAXX interaguje s p53 svou C-terminální oblastí, způsobuje tak represi transkripce regulované proteinem p53 a inhibuje jeho funkci v indukcii apoptózy (L. Y. Zhao et al., 2004). Ovlivňuje také aktivaci p53 při poškození DNA. DAXX váže ubikvitin ligázu Mdm2, stabilizuje ji interakcí s deubikvitinázou USP7 a podporuje ubikvitinaci p53 proteinem Mdm2 vedoucí k degradaci p53. V reakci na poškození DNA DAXX

disociuje od proteinu Mdm2, který podstupuje autoubikvitinaci a degradaci, čímž je zvýšena stabilita p53 (J. Tang et al., 2006).

2.3.3.3 Regulace chromatinu

Komplex DAXX/ATRX a funkce DAXX jako histonového chaperonu

V komplexu s proteinem ATRX (alpha-thalassemia/mental retardation, X-linked) se DAXX účastní regulace struktury chromatinu. ATRX patří do proteinové rodiny SNF2 (sucrose non-fermenting 2), která zahrnuje faktory remodelující chromatin za hydrolyzy ATP (Picketts, 1996). Mutace ATRX jsou příčinou stejnojmenného syndromu, projevujícího se α -talasémií a vývojovými abnormalitami včetně mentální retardace. Tyto mutace ovlivňují genovou expresi a metylaci DNA a vyskytují se převážně v N-terminální ADD doméně (ATRX-DNMT3-DNMT3L) a C-terminální ATPázové doméně (Gibbons et al., 2008). Doména ADD je důležitá pro interakci s histonem H3 trimethylovaným na lysinu 9 (H3K9me3) (Iwase et al., 2011). DAXX interaguje svou DHB doménou s DAXX-vazebným motivem (DBM) proteinu ATRX (Hoelper et al., 2017).

Protein ATRX se vyskytuje v buněčném jádře asociovaný s pericentrickým heterochromatinem a s PML tělísky, do kterých je rekrutován proteinem DAXX. ATRX asociovaný s DNA se uplatňuje při represí transkripce, tato funkce je inhibována interakcí s DAXX vedoucí k relokizaci ATRX do PML tělísek. Pro remodelaci chromatinu komplexem DAXX/ATRX je zásadní ATPázová aktivita ATRX umožňující přesun ATRX podél DNA a narušení interakcí mezi DNA a histony (McDowell et al., 1999; J. Tang et al., 2004; Xue et al., 2003).

K dalšímu objasnění funkce komplexu DAXX/ATRX přispěl objev jeho interakce s H3.3, nekanonickou variantou histonu H3. Od kanonických histonů H3.1 a H3.2 se H3.3 liší pouze pěti (H3.1), resp. čtyřmi aminokyselinami (H3.2). Na rozdíl od histonů H3.1 a H3.2, jejichž exprese je vázaná na S fázi buněčného cyklu a jsou vkládány do nukleozomů při probíhající replikaci DNA, je varianta H3.3 exprimována v průběhu celého buněčného cyklu a její inkorporace do nukleozomů je na replikaci DNA nezávislá (shrnuto v Choi et al., 2024). Depozice H3.1 při replikaci DNA je zprostředkovaná chaperonem CAF-1 (chromatin assembly factor 1), H3.3 je nezávisle na replikaci vkládán do nukleozomů pomocí chaperonového komplexu HIRA (histone cell cycle regulator) (Tagami et al., 2004) nebo DAXX/ATRX (Goldberg et al., 2010). V dělících se buňkách je mezi formami histonu H3 zastoupena varianta H3.3 přibližně z 20 %, v diferencovaných buňkách roste podíl H3.3 na 90 % (Piña & Suau, 1987). Nukleozomy s H3.3 jsou sestavovány např. při transkripci nebo opravách poškození DNA. H3.3 se uplatňuje v heterochromatinu při represí transkripce související s histonovými modifikacemi, jako je hypoacetylace lysinu nebo trimethylace lysinu (shrnuto v Choi et al., 2024). Chaperony HIRA a DAXX/ATRX sestavují nukleozomy obsahující H3.3 v odlišných oblastech genomu. Komplex HIRA vkládá H3.3 do transkripčně aktivních i neaktivních genů, jeho aktivita může být spojena s probíhající transkripcí. Komplex DAXX/ATRX vkládá H3.3 do oblastí heterochromatinu.

V myších embryonálních kmenových buňkách je aktivní především v oblasti telomer, zodpovídá za represi transkripce nekódující telomerické RNA (Goldberg et al., 2010).

Kromě inkorporace nově syntetizovaných histonů H3.3 do chromatinu nezávisle na replikaci DNA byla popsána také recyklace stávajících H3.3 při replikaci DNA. Na opětovném ukládání H3.3 do nukleozomů během S fáze se podílejí složky replikačního aparátu – Mcm2 (minichromosome maintenance complex component 2, podjednotka replikativní helikázy), katalytická podjednotka DNA polymerázy α a podjednotky 3 a 4 DNA polymerázy ϵ . Určitý význam má i protein DAXX, delece *DAXX* vede ke sníženému přenosu původního H3.3 na replikovanou DNA (X. Xu et al., 2022).

Protein DAXX je schopen vkládat do nukleozomů heterotetramer H3.3/H4 jak v komplexu s ATRX, tak samostatně. Funguje jako histonový chaperon specifický pro H3.3 díky vazbě tohoto histonu prostřednictvím domény HBD. Ukládání H3.3 do chromatinu (např. pericentrických oblastí nebo telomer) komplexem DAXX/ATRX je závislé na vazbě H3.3 proteinem DAXX, zatímco ATRX je důležitý pro remodelaci chromatinu, umožňuje posun nukleozomů obsahujících H3.3 podél DNA a může také přivádět DAXX do specifických oblastí chromatinu, např. telomer (Drané et al., 2010; Lewis et al., 2010). ATRX je vázán na tandemové repetice včetně sekvencí s vysokým zastoupením guaninových nukleotidů tvořících strukturu G-kvadruplexu (Law et al., 2010). Pro selektivní interakci DAXX s H3.3 je zásadní zvýšení stability jak histonu, tak chaperonu v místě jejich kontaktu. Prostřednictvím domény HBD s šesti α -helixy obklopuje DAXX 40 % povrchu histonového dimeru H3.3-H4. Většina tohoto povrchu se shoduje s histony H3.1 a H3.2. Klíčové je rozpoznání malého množství specifických aminokyselinových zbytků H3.3, kterého se účastní „coiled-coil“ struktura helixů $\alpha 1$ a $\alpha 2$ v HBD. Při výskytu DAXX jako volného monomeru je jeho HBD z větší části neuspořádaná, vyšší stabilitu vykazuje pouze oblast helixů $\alpha 1$ a $\alpha 2$. Interakce s H3.3 vyvolává skládání domény HBD a stabilizaci všech tří složek heterotrimeru DAXX/H3.3/H4 (DeNizio et al., 2014; Elsässer et al., 2012; C.-P. Liu et al., 2012).

Ukládání H3.3 do chromatinu je regulováno PML tělísky, do nichž se nově syntetizovaný histon H3.3 přemísťuje v důsledku interakce s DAXX. Protein PML se samostatně nebo jako součást PML-NBs může podílet na organizaci chromatinu heterochromatinových domén, pericentrických oblastí a centromer. PML-NBs představují místa akumulace dimeru H3.3-H4, komplexu DAXX/ATRX a také proteinu HP1 (heterochromatin protein 1), regulují sestavování nukleozomů s H3.3 nezávisle na replikaci DNA a tvorbu heterochromatinu (Corpet et al., 2014; Delbarre et al., 2013, 2017; Drané et al., 2010). Dalším proteinem, který jako součást PML-NBs reguluje funkci DAXX/ATRX je chromatin-vazebný protein DEK. DEK snižuje inkorporaci H3.3 do heterochromatinu komplexem DAXX/ATRX a podporuje akumulaci H3.3 v PML-NBs. V embryonálních kmenových buňkách podporuje asociaci ATRX s telomerami, ukládání H3.3 a udržování struktury chromatinu telomer, v absenci DEK dochází k redistribuci H3.3 z telomer do dalších oblastí chromatinu včetně pericentrického chromatinu (Ivanauskienė et al., 2014). S proteinem PML souvisí také regulace ukládání H3.3 do chromatinu během buněčného cyklu. Proteiny DAXX a PML jsou rekrutovány do oblastí

heterochromatinu mechanismem závislým na SUMOylaci. DAXX je v oblastech heterochromatinu lokalizován v průběhu celého buněčného cyklu. PML je asociován s heterochromatinem v S fázi, kdy potlačuje sestavování nukleozomů obsahujících H3.3 proteinem DAXX a může se podílet na udržování epigenetických modifikací při replikaci DNA (Shastrula et al., 2019).

SUMOylace pravděpodobně významně ovlivňuje lokalizaci DAXX v heterochromatinových oblastech. Zatímco akumulace DAXX v PML-NBs je zprostředkována SUMO-1 i SUMO-2/3, pro lokalizaci DAXX v centromerických a pericentrických oblastech je zásadní izoforma SUMO-2. Centromerická lokalizace DAXX je zprostředkována interakcí s centromerovým proteinem CENP-B modifikovaným SUMO-2. CENP-B a DAXX se podílejí na udržování struktury heterochromatinu, podporují akumulaci proteinů HP1 a ATRX a vkládání H3.3 do chromatinu, zvyšují zastoupení modifikace H3K9me3 v centromerách a jsou důležité pro stabilitu genomu (Morozov et al., 2017). Pro asociaci DAXX s pericentrickým heterochromatinem by mohla být důležitá interakce s ATRX, který může být v pericentromerách lokalizován např. v důsledku interakce s H3K9me3 nebo proteinem HP1 (Iwase et al., 2011).

Inkorporace H3.3 zprostředkovaná DAXX/ATRX není omezená na centromeru, pericentrický heterochromatin a telomery. V myších embryonálních kmenových buňkách je ATRX vázán převážně na tandemové repetice, endogenní retrovirové sekvence (ERV) nebo CpG oblasti, tato místa se vyznačují vysokým zastoupením histonu H3.3 a modifikací H3K9me3 a H4K20me3 charakteristických pro heterochromatin. ATRX se také účastní vkládání H3.3 do chromatinu umlčovaných alel imprintovaných genů. Depozice H3.3 prostřednictvím ATRX probíhá přednostně na methylované DNA, podporuje histonové modifikace H3K9me3 a podílí se tak na udržování konstitutivního heterochromatinu (Voon et al., 2015). DAXX a ATRX se rovněž podílejí na ochraně před replikačním stresem způsobeným strukturami G-kvadruplexů, pro tuto funkci je důležitá depozice H3.3 a helikázová aktivita ATRX. ATRX patrně rozvolňuje strukturu G-kvadruplexu, která představuje překážku při replikaci DNA, v komplexu s DAXX ukládá H3.3 do chromatinu, podporuje modifikaci H3K9me3 katalyzovanou histon methyltransferázou SETDB1 (SET Domain, Bifurcated 1) a formování heterochromatinu (Teng et al., 2021). Komplex DAXX/ATRX je důležitý pro udržování struktury chromatinu a stability genomu, narušená funkce komplexu DAXX/ATRX může být příčinou vzniku nádorů. Mutace DAXX a ATRX jsou např. spojeny s chromozomální nestabilitou a alternativním prodlužováním telomer (mechanismus udržování telomer nezávislý na aktivitě telomerázy) u pacientů s pankreatickými neuroendokrinními nádory (Marinoni et al., 2014).

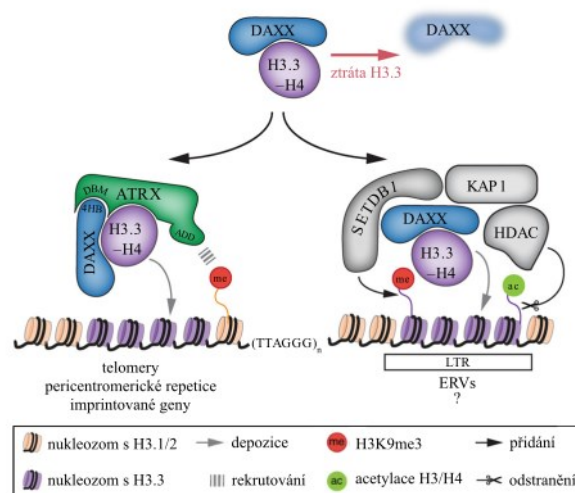
Funkce DAXX nezávislé na ATRX

DAXX může fungovat také nezávisle na ATRX (viz Obr. 7). Zatímco v komplexu s ATRX se účastní represe genů a ovlivňuje strukturu chromatinu telomer, nezávisle na ATRX může DAXX v myších embryonálních kmenových buňkách působit např. při umlčování ERV, transponovatelných elementů obsahujících dlouhé terminální repetice (LTR). DAXX interaguje s korepresorem KAP1

(KRAB-associated protein 1) a enzymem SETDB1. K umlčování ERV pravděpodobně přispívá jak korepresorový komplex DAXX/KAP1/SETDB1, tak H3.3 (Elsässer et al., 2015). Inkorporace H3.3 do chromatinu není nezbytná pro funkci DAXX v umlčování ERV, role H3.3 může spočívat ve stabilizaci DAXX. Pro umlčování ERV by mohla mít spolu s methylací histonů enzymem SETDB1 význam také interakce DAXX s HDAC1 (Hoelper et al., 2017). Podobným způsobem, zahrnujícím interakci s enzymem SETDB1 a KAP1, se DAXX podílí na udržování struktury centromerického chromatinu. Vazba H3.3 má opět význam pro zvýšení stability proteinu DAXX (Pinto et al., 2024).

DAXX se dále účastní formování heterochromatinu indukci methylace histonů před jejich inkorporací do nukleozomů. Váže nově syntetizované histony H3.3-H4 a podporuje katalýzu trimethylace H3K9me3 methyltransferázami SETDB1 a SUV39H1 (suppressor of variegation 3-9 homolog 1). Schopnost DAXX podporovat modifikaci H3K9me3 je závislá na interakcích SUMO-SIM a nezávislá na ATRX (Carraro et al., 2023).

Kromě ATRX interaguje DAXX také s dalším chromatin remodelačním faktorem s ATPázovou aktivitou, proteinem BRG1 (Brahma-related gene-1). Důsledkem interakce s DAXX je snížení transkripce genů regulovaných BRG1 (Svadlenka et al., 2016).



Obr. 7: Funkce DAXX v komplexu s proteinem ATRX a nezávislé na ATRX. DAXX může fungovat nejméně ve dvou komplexech lišících se funkcí a složením. Funkcí komplexu tvořeného DAXX, ATRX a histony H3.3-H4 je sestavování nukleozomů obsahujících H3.3 v telomerách, pericentrických oblastech a chromatinu imprintovaných genů. Druhý komplex je složen z DAXX, H3.3-H4, KAP1 (KRAB-associated protein 1), histon methyltransferázy SETDB1 a histon deacetylázy (HDAC), uplatňuje se při represi endogenních retrovirů (ERV) v myších embryonálních kmenových buňkách. Tento komplex pravděpodobně reguluje také centromerický chromatin a může mít další funkce, které zatím nebyly popsány (?). Pro funkci obou komplexů je důležitá vazba H3.3 proteinem DAXX. Převzato z Hoelper et al., 2017, upraveno.

2.3.3.4 Funkce DAXX jako chaperonu

Kromě známé funkce DAXX jako histonového chaperonu může DAXX fungovat jako molekulární chaperon napomáhající proteinům zaujmout nativní konformaci nově popsáným způsobem. Na rozdíl od většiny chaperonů je jeho funkce nezávislá na ATP a funguje jako monomer. DAXX brání agregaci proteinů, solubilizuje proteinové agregáty a rozbaluje špatně sbalené proteiny. Mezi tyto proteiny patří např. p53 a jeho antagonist, ubikvitin ligáza Mdm2. K rozpoznávání špatně sbalených

proteinů pravděpodobně přispívají elektrostatické interakce acidické oblasti DAXX s bazickými aminokyselinami cílových proteinů. Podobná funkce byla zjištěna také u dalších proteinů obsahujících oblast s vysokým zastoupením Asp a Glu, což naznačuje, že tyto proteiny by mohly představovat nový typ chaperonů nezávislých na ATP (L. Huang et al., 2021).

2.3.4 Role proteinu DAXX a PML tělísek při virové infekci

Podobně jako další proteiny PML-NBs, také protein DAXX může významně ovlivňovat virovou infekci, a to jak pozitivně, tak negativně. U některých virů se vyvinuly mechanismy, jak funkci DAXX inhibovat nebo pozměnit. V následujícím textu je popsán význam proteinu DAXX pro infekci vybranými DNA viry.

Herpesviry

Úloha PML tělísek a jejich jednotlivých komponent byla nejvíce zkoumána v kontextu herpesvirové infekce. Proteiny PML, DAXX a Sp100 fungují nezávisle na sobě jako restriční faktory virové infekce, kombinace jejich aktivity přispívá k potlačení exprese virových genů a omezení replikace např. viru HSV-1 nebo HCMV (Glass & Everett, 2013).

V jádře buněk infikovaných **HSV-1** jsou v blízkosti virových genomů akumulovány proteiny PML, DAXX a Sp100 za účasti motivu SIM těchto proteinů, v případě proteinu PML je klíčová jeho SUMOylace. V blízkosti virových genomů se vyskytují také izoformy SUMO-1/2/3 a SUMO E3 ligáza PIAS2β (protein inhibitor of activated STAT2), což naznačuje probíhající SUMOylaci v těchto místech. Proteiny DAXX a Sp100 mohou prostřednictvím interakce se SUMOylovanými proteiny obklopovat virové genomy i v nepřítomnosti PML (Cuchet-Lourenço et al., 2011; Everett et al., 2006). Také protein ATRX se v důsledku interakce s DAXX přesouvá do bezprostřední blízkosti virových genomů krátce po jejich vstupu do jádra. Komplex DAXX/ATRX přispívá k potlačení genové exprese a replikace HSV-1 (Lukashchuk & Everett, 2010). Virový genom je po vstupu do jádra uspořádán do struktury chromatinu. ATRX nemá vliv na počáteční formování virového chromatinu, podporuje ale udržování modifikace H3K9me3 a stabilního virového heterochromatinu v průběhu infekce. Při infekci HSV-1 se také mohou projevovat funkce DAXX nezávislé na ATRX. Zatímco v komplexu s ATRX působí DAXX represi virové transkripce, po degradaci ATRX by mohl potenciálně podporovat virovou transkripci a replikaci. V buňkách *ATRX* KO vede potlačení exprese DAXX ke snížení transkripce pozdního genu pro glykoprotein B HSV-1 (Cabral et al., 2018).

Ve strukturách tvořených proteiny PML tělísek je akumulován také bezprostředně časný virový protein ICP0, a to nezávisle na přítomnosti PML (Everett et al., 2006). ICP0 je E3 ubikvitin ligáza, spolu s E2 konjugčním enzymem UbCH5a vyvolává degradaci PML (H. Gu & Roizman, 2003). Vykazuje vlastnosti StUbL (SUMO-targeted ubiquitin ligase) – rozpoznává SUMOylované proteiny a indukuje jejich degradaci ubikvitin-proteazomální drahou. Motiv SIM proteinu ICP0 přispívá k degradaci

restrikčních faktorů a stimulaci lytické infekce i reaktivaci z latence. ICP0 je však schopen indukovat také degradaci proteinů bez SUMO modifikace (Boutell et al., 2011).

Komplex DAXX/ATRX také může hrát roli v ustanovení latence (Lukashchuk & Everett, 2010). Charakteristickým znakem latentní infekce HSV-1 je tvorba PML-NBs obsahujících virovou DNA (vDCP-NBs, viral DNA-containing PML-NBs). Tyto struktury obsahují H3.3 spolu s histon chaperonovými komplexy HIRA a DAXX/ATRX. Virový genom je zde v podobě chromatinu s vysokým zastoupením histonů H3.3 s modifikací H3K9me3, virová transkripce je umlčena. Na utváření chromatinu s H3.3 se podílí DAXX/ATRX i HIRA, významná je také úloha PML. V nepřítomnosti PML není komplex DAXX/ATRX v kontaktu s virovým genomem, výsledkem je snížená inkorporace H3.3. Narušení vDCP-NBs proteinem ICP0 podporuje obnovení virové transkripce a reaktivaci z latence (Cohen et al., 2018).

V průběhu lytické i latentní infekce **HCMV** dochází k asociaci kanonických histonů H3.1/2 a nekanonických histonů H3.3 s virovou DNA nezávisle na virové transkripci a replikaci genomu (Albright & Kalejta, 2016). Protein DAXX se podílí na umlčování virové transkripce během lytické replikace HCMV. Krátce po infekci DAXX interakcí s histon deacetylázami reguluje formování transkripčně neaktivního chromatinu v oblasti promotoru MIEP a omezuje expresi bezprostředně časných (IE) genů potřebných pro iniciaci lytického cyklu HCMV (Hwang & Kalejta, 2007; Woodhall et al., 2006). K represi transkripce IE genů přispívá také protein ATRX (Lukashchuk et al., 2008).

Proti transkripční represi virových genů zprostředkované DAXX a ATRX působí virový protein pp71. Protein pp71 je součástí virového tegumentu, krátce po infekci vstupuje do jádra, kde způsobuje disociaci ATRX a později i DAXX z PML-NBs (Lukashchuk et al., 2008). Indukuje proteazomální degradaci DAXX mechanismem nezávislým na ubikvitinaci a umožňuje tak zahájení lytického replikačního cyklu (Hwang & Kalejta, 2007; Saffert & Kalejta, 2006). Protein pp71 také způsobuje SUMOylaci DAXX, význam tohoto procesu pro virovou infekci však zůstává neobjasněný (Hwang & Kalejta, 2009).

Navzdory předpokládané funkci DAXX jako restrikčního faktoru HCMV byl v nedávné studii popsán pozitivní vliv DAXX na expresi bezprostředně časných a časných genů HCMV v endoteliálních buňkách. Infekce HCMV zde způsobovala ztrátu SUMOylovaného PML a rozpad PML-NBs. Proteiny PML a Sp100 měly v souladu s represivní funkcí PML-NBs negativní vliv na expresi virových genů, protein DAXX vykazoval opačný efekt. Funkce DAXX se může lišit v závislosti na buněčném typu, při infekci fibroblastů byl shodně s předchozími studiemi pozorován negativní vliv DAXX na expresi virových genů (Seitz et al., 2022).

Vliv DAXX na latentní infekci HCMV je dosud nejasný. Během latence DAXX podporuje vkládání H3.3 do transkripčně neaktivních oblastí genomu, mohl by se zde tedy uplatňovat mechanismus podobný represi IE genů v lytické fázi infekce (Albright & Kalejta, 2016). Spolu s HDAC DAXX potlačuje transkripci IE genů v experimentálních modelech latence HCMV *in vitro*. Podporuje

ustanovení latence v nepermissivních buňkách, kde by jinak docházelo k abortivní infekci. Jeho funkce není inhibována proteinem pp71 přítomným v tegumentu, protože tento protein v nediferencovaných buňkách zůstává v cytoplazmě a nemůže indukovat degradaci DAXX. Nově syntetizovaný pp71 v těchto buňkách vstupuje do jádra (Saffert et al., 2010; Saffert & Kalejta, 2007). Podle další studie proteiny PML, DAXX a Sp100 působí jako restriční faktory při lytické infekci a reaktivaci latentního viru, ustanovení latence však pravděpodobně významně neovlivňují. Zatímco při infekci nediferencovaných monocytů nebyl pozorován vliv PML, DAXX ani Sp100 na expresi IE genů a ustanovení latence, knockdown PML, DAXX a Sp100 podporuje expresi IE genů při reaktivaci latentního HCMV spojené s diferenciací monocytů a při lytické infekci makrofágů (Wagenknecht et al., 2015).

U některých virů se vyvinuly mechanismy, jak pozměnit funkci DAXX a dalších součástí PML-NBs ve svůj prospěch. Příkladem je virus **EBV**, který inhibuje funkci komplexu DAXX/ATRX a využívá DAXX pro ustanovení latence. Komplex DAXX/ATRX negativně reguluje expresi virových genů v časně fázi primární infekce B-lymfocytů, knockdown ATRX vede ke zvýšení exprese genů spojených s ustanovením latence. DAXX/ATRX také brání reaktivaci latentního viru.

Proti funkci DAXX/ATRX působí virový protein BNRF1, který je součástí tegumentu EBV. Obsahuje DAXX interakční doménu (DID), pomocí níž váže HBD proteinu DAXX a histony H3.3-H4. V důsledku interakce s DAXX je BNRF1 lokalizován v PML-NBs, nahrazuje ATRX v komplexu s DAXX a způsobuje disociaci ATRX z PML-NBs. BNRF1 tak brání asociaci komplexu DAXX/ATRX s virovou DNA, snižuje depozici H3.3, zvyšuje zastoupení modifikace H3K4me3 spojené s aktivací transkripce a podporuje expresi genů EBV potřebných pro přechod do latence. Interakce BNRF1 s DAXX umožňuje selektivní aktivaci transkripce latentních genů spojenou s proliferací a imortalizací B-lymfocytů (H. Huang et al., 2016; K. Tsai et al., 2011, 2014). Na rozdíl od jiných herpesvirových proteinů včetně ICP0 viru HSV-1 a pp71 viru HCMV, které překonávají obrannou funkci PML tělísek mechanismy zahrnujícími degradaci proteinů, BNRF1 nezpůsobuje degradaci PML, DAXX ani ATRX (K. Tsai et al., 2011).

Proteiny PML tělísek včetně komplexu DAXX/ATRX představují významné restriční faktory herpesvirové infekce. U zástupců napříč čeledí *Herpesviridae* se vyskytují proteiny inhibující restriční mechanismy PML-NBs, tyto proteiny jsou funkčně zaměnitelné. Bylo prokázáno, že protein BNRF1 viru EBV dokáže nahradit funkci herpesvirových proteinů ICP0 a pp71 a zajistit tak efektivní genovou expresi a replikaci HSV-1 a HCMV (Y. Lu et al., 2016).

Adenoviry

Genová exprese a replikace **Ad5** je negativně regulována komplexem DAXX/ATRX nezávisle na lokalizaci v PML-NBs a funkčním SIM proteinu DAXX. ATRX se váže na virové promotory a přivádí k nim protein DAXX, komplex DAXX/ATRX pak vkládá H3.3 do nukleozomů

v adenovirových promotorech a utváří kondenzovaný transkripčně neaktivní chromatin. DAXX sám o sobě nemá vliv na replikaci Ad5, jeho antivirové působení je závislé na interakci s ATRX (Schreiner et al., 2010, 2013).

Pro zajištění replikace Ad5 je důležitý časný protein E1B-55K (early region 1B 55-kDa protein), který váže ATRX a spolu s E4orf6 (early region 4 open reading frame protein 6) a buněčnými proteiny sestavuje komplex E3 ubikvitin ligázy. ATRX je degradován ubikvitin-proteazomovým systémem (Schreiner et al., 2013). E1B-55K interaguje také s DAXX a indukuje jeho degradaci, na rozdíl od ATRX není degradace DAXX závislá na E4orf6 (Schreiner et al., 2010), je regulována buněčným proteinem RNF4 (RING-finger protein 4), který patří mezi E3 ubikvitin ligázy rozpoznávající SUMOylované proteiny (STUbl). SUMOylovaný protein E1B-55K váže DAXX a podporuje jeho interakci s RNF4. DAXX je ubikvitinován a následně degradován pomocí proteazomu. Degradaci proteinu DAXX podporuje RNF4 transkripci adenovirových genů a replikaci viru (Müncheberg et al., 2018).

Represi transkripce zprostředkované proteinem DAXX brání také kapsidový protein VI, který je akumulován v jádře v blízkosti PML-NBs, váže DAXX, způsobuje jeho uvolnění z PML tělísek a relokizaci do cytoplazmy. Překonání represe zprostředkované DAXX vyžaduje motiv proteinu VI pro interakci s ubikvitin ligázami. Výsledkem je exprese proteinu E1A, který je důležitým transaktivátorem adenovirových genů (Schreiner et al., 2012).

Také další viroví antagonisté DAXX, mezi něž patří pp71 viru HCMV a minoritní kapsidový protein L2 viru HPV, aktivují expresi adenovirového E1A. Stejně tak adenovirový protein VI stimuluje expresi z cytomegalovirového promotoru. Je zřejmé, že inhibice represivní funkce DAXX představuje způsob překonání buněčné obrany společný pro větší množství DNA virů (Schreiner et al., 2012).

Papilomaviry

Na rozdíl od výše zmíněných virů, u nichž převažoval negativní vliv DAXX na infekci, DAXX podporuje transkripci a replikaci genomu lidských papilomavirů (HPV). Replikace papilomavirové DNA probíhá v těsné blízkosti PML-NBs, proteiny DAXX a PML v buňkách U2OS částečně kolokalizují s virovou DNA a proteinem E2, který se účastní replikace virového genomu. Knockdown DAXX vede ke snížené transkripci časných genů a snížené replikaci DNA HPV11 a HPV18 (Kivipöld et al., 2015). Minoritní kapsidový protein L2 viru HPV33 způsobuje reorganizaci PML-NBs. Jeho C-terminální oblast obsahuje doménu pro lokalizaci v PML-NBs a interakci s DAXX. Po asociaci s PML-NBs způsobuje L2 uvolnění Sp100, a naopak zvyšuje zastoupení DAXX v PML-NBs. L2 interaguje s DAXX nezávisle na PML, předpokládá se tvorba komplexu DAXX a L2 v nukleoplazmě a následná akumulace tohoto komplexu v PML-NBs (Becker et al., 2003; Florin et al., 2002). Byla také popsána interakce DAXX s onkoproteiny E6 a E7 viru HPV16, které mohou inhibovat proapoptické působení DAXX prostřednictvím regulace dráhy DAXX/JNK (Ding et al., 2023; S. Tang et al., 2020).

Role PML-NBs v polyomavirové infekci

Význam proteinu DAXX pro polyomavirovou infekci dosud nebyl objasněn. Zdá se, že replikace různých zástupců čeledi *Polyomaviridae* v buněčném jádře je úzce spjata s PML-NBs. Znamé interakce polyomavirů s PML-NBs jsou shrnuty v následujícím textu.

SV40 je jedním z prvních virů, u nichž byla objevena lokalizace jejich genomu v blízkosti PML-NBs. Replikace genomu SV40 v blízkosti PML tělísek nezpůsobuje změnu jejich struktury (Ishov & Maul, 1996). Na rozdíl od replikace DNA, která probíhá v blízkosti PML-NBs, není transkripce SV40 vázaná na PML-NBs. Výzkum ukázal, že pro asociaci virového genomu s PML-NBs je nezbytná přítomnost počátku replikace a LT antigenu a dochází k ní při aktivní replikaci polyomavirové DNA (Jul-Larsen et al., 2004; Q. Tang et al., 2000). Snížení exprese PML v buňkách transfekovaných plazmidem obsahujícím genom SV40 neovlivnilo hladinu LT, tvorbu replikačních center ani replikaci virové DNA (Jul-Larsen et al., 2004). V rozporu s předchozí studií byl také pozorován pokles replikace DNA SV40 v buňkách se sníženou expresí PML. Pozitivní vliv PML-NBs na replikaci by mohl souviset s jejich funkcí v regulaci DDR (Boichuk et al., 2011). LT antigen SV40 kolokalizuje s PML a složkami DDR, mezi které patří komplex MRN (Mre11-Rad50-Nbs1) a protein Rad51 (Boichuk et al., 2010). PML-NBs se účastní oprav poškození DNA, PML je důležitý pro akumulaci proteinů regulujících opravy DNA, včetně rekombinázy Rad51, která se podílí na opravách dvouřetězcových zlomů pomocí homologní rekombinace. LT tak může lokalizací v blízkosti PML-NBs zajišťovat interakci s Rad51 a dalšími proteiny DDR, které jsou potřebné pro efektivní replikaci DNA SV40 (Boichuk et al., 2010, 2011).

Také replikační centra **BKPyV** se nacházejí v těsné blízkosti PML-NBs (Jul-Larsen et al., 2004). Infekce BKPyV nemá významný vliv na expresi hlavních komponent PML-NBs, proteinů PML, DAXX a Sp100, ačkoliv v případě proteinu DAXX byl pozorován mírný nárůst exprese v infikovaných buňkách. Dochází však ke zvětšení PML-NBs a snížení jejich počtu a také uvolnění proteinů DAXX a Sp100 z tělísek. SUMO-1 zůstává v průběhu infekce asociovaný s PML. S postupem infekce se PML tělíska dále zvětšují. V současné době není známý mechanismus ani funkce těchto změn PML-NBs. V časně fázi infekce kolokalizuje LT s PML-NBs, v pozdní fázi infekce byl pozorován výskyt virové DNA v blízkosti PML tělísek. Protein DAXX v průběhu infekce kolokalizuje se shluky LT. Bylo zjištěno, že pro reorganizaci PML-NBs není dostačující LT antigen, je nutné zahájení replikace virového genomu. Knockdown PML způsobil cca 50% pokles hladiny LT, produkce virového potomstva nebyla významně ovlivněna. Přestože infekce BKPyV není výrazně ovlivněna PML tělísky, ukázalo se, že BKPyV podporuje replikaci viru HSV-1 s delecí ICP0, pravděpodobně tedy reorganizace PML-NBs BK polyomavirem představuje způsob inaktivace buněčné obrany proti virové infekci (Jiang et al., 2011).

Změny PML-NBs v průběhu infekce BKPyV byly zkoumány v nedávné studii zaměřené na mikroskopickou analýzu infekce BKPyV na úrovni jednotlivých buněk. Byla pozorována značná

heterogenita odpovědi buněk na infekci. Celkově byl v rámci buněk pozitivních na LT antigen ve srovnání s neinfikovanými buňkami snížený počet PML-NBs, jednotlivé buňky s podobným množstvím LT antigenu se však lišily intenzitou signálu PML, počtem a velikostí PML-NBs (Procario et al., 2023). Výsledky podpořily předchozí poznatek, že spíše než vlivem LT mohou být změny PML-NBs vysvětleny přímým vlivem replikace virového genomu na PML-NBs (Jiang et al., 2011). Dalším navrženým vysvětlením změn PML-NBs je nepřímý vliv viru např. prostřednictvím interakcí s DDR (Procario et al., 2023).

Časně i pozdní kroky infekce **JCPyV** jsou spojeny s PML-NBs. LT antigen vytváří shluky v místech přilehlých k PML tělískům obsahujícím proteiny PML, DAXX a Sp100. Virový genom je replikován v blízkosti PML-NBs, JCPyV také využívá PML-NBs jako místo akumulace kapsidových proteinů VP1, VP2 a VP3 a sestavování virionů (Gasparovic et al., 2009; Shishido-Hara et al., 2004, 2008). V lidských gliových buňkách infikovaných JCPyV bylo pozorováno zvětšení PML tělísek a snížení jejich počtu. Protein VP1 byl lokalizován na povrchu PML-NBs (Shishido-Hara et al., 2012). Produkce virionů je spojena se zvětšováním PML tělísek, s postupem infekce dochází k jejich rozpadu (Shishido-Hara et al., 2014). PML-NBs mají význam pro patogenezi progresivní multifokální leukoencefalopatie při infekci JCPyV. Interakce JCPyV s PML-NBs a produkce virionů spojená s rozpadem PML-NBs by mohly mít vliv na degeneraci oligodendrocytů, demyelinaci a rozvoj progresivní multifokální leukoencefalopatie (Shishido-Hara et al., 2008).

Zdá se, že PML-NBs by mohla negativně regulovat transkripci JCPyV. Snížení hladiny PML podporuje virovou transkripci, zvýšená exprese PML a asociace LT s PML-NBs vyvolaná působením IFN- β má opačný efekt (Gasparovic et al., 2009).

JCPyV je jediným polyomavirem, u kterého byl objeven protein způsobující reorganizaci PML-NBs a potenciální narušení jejich funkce v obraně proti virové infekci. Nově charakterizovaný protein ORF4 (open reading frame 4), vzniklý alternativním sestřihem pozdního transkriptu, interaguje s PML-NBs a způsobuje změnu jejich uspořádání. Jeho sekvence je shodná s C-terminální částí VP1 a obsahuje jaderný lokalizační signál. ORF4 kolokalizuje s PML, DAXX a ATRX, ne však s Sp100. Absence Sp100 v PML-NBs v přítomnosti ORF4 naznačuje možný vliv ORF4 na uvolnění Sp100 z tělísek, případně jeho degradaci. Vzhledem k pozorovanému poklesu replikace DNA JCPyV v důsledku mutace ORF4 by tento protein mohl zmírňovat antivirové účinky PML-NBs.

Podobný otevřený čtecí rámec se nachází také v genomu BKPyV. Po transfekci buněk vektorem obsahujícím sekvenci kódující ORF4 BKPyV byla pozorována kolokalizace tohoto proteinu s PML a reorganizace PML-NBs (Saribas et al., 2023).

Také při infekci **MCPyV** je LT lokalizován v blízkosti PML-NBs obsahujících PML, DAXX a Sp100. Infekce MCPyV způsobuje nárůst počtu a velikosti PML-NBs. Přestože ve většině buněk se při replikaci MCPyV protein Sp100 nadále vyskytoval ve zvětšených PML-NBs, přibližně ve 30 %

buněk nebyl Sp100 detekován. Reorganizace PML-NBs je závislá na replikaci virové DNA. Proteiny PML a DAXX nemají vliv na replikaci MCPyV, zvýšená replikace MCPyV při potlačení exprese Sp100 naopak poukazuje na funkci Sp100 jako restričního faktoru MCPyV (Neumann et al., 2016).

V buňkách infikovaných **MPyV** kolokalizují v blízkosti PML-NBs LT antigen, virová DNA a buněčný protein MRE11 (meiotic recombination 11 homolog), který je součástí komplexu MRN účastnícího se oprav dvouřetězcových zlomů DNA. V myších fibroblastech 3T3 a MEF byla 28 hpi pozorována zvětšená PML tělíska, nebyla však pozorována přestavba tělísek jako např. v buňkách infikovaných BKPyV. Knockout PML neměl vliv na lokalizaci LT, virové DNA a MRE11 ani produkci infekčních virových částic (Erickson et al., 2012).

3 Cíle práce

Výzkum Laboratoře virologie Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy se soustředí mimo jiné na roli jaderných tělísek PML a s nimi spojených chaperonů histonu H3.3, kterými jsou DAXX a HIRA, při infekci myším polyomavirem. DAXX je jedním z proteinů jaderných tělísek PML, které byly identifikovány jako restrikční faktory mnoha virů. Ukazuje se však, že DAXX a další složky PML tělísek mohou mít také pozitivní vliv na virovou infekci. Replikace polyomavirové DNA v buněčném jádře probíhá v blízkosti jaderných tělísek PML a proteinu DAXX, v některých případech je spojena se změnami struktury a složení těchto tělísek. Při infekci buněk myším polyomavirem nebo BK polyomavirem byla popsána kolokalizace proteinu DAXX s virovými replikačními centry. Význam proteinu DAXX pro průběh infekčního cyklu polyomavirů dosud nebyl objasněn.

Cíle první části diplomové práce byly následující:

- Charakterizovat vliv proteinu DAXX na infekci MPyV
 - Určit vliv proteinu DAXX na replikaci virové DNA
 - Určit vliv proteinu DAXX na virovou transkripci
 - Určit vliv proteinu DAXX na počet buněk infikovaných MPyV
- Připravit buněčnou linii pro studium vlivu proteinu DAXX na infekci BKPyV
 - Charakterizovat fenotyp dostupných linií U2OS *DAXX* KO
 - Provést delecii genu *DAXX* v buňkách HEK293 pomocí systému CRISPR/Cas9 (clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated protein 9)

Dalším výzkumným tématem Laboratoře virologie je charakterizace interakčních partnerů LT antigenu MPyV a jejich vlivu na virovou infekci. LT antigeny polyomavirů jsou důležité regulační proteiny, jejichž funkce je nezbytná pro úspěšnou replikaci viru. Prostřednictvím interakcí s buněčnými proteiny regulují LT antigeny mnoho procesů včetně drah signální transdukce, mezi které patří MAP kinázové signální kaskády. Bylo identifikováno mnoho buněčných interakčních partnerů polyomavirových LT antigenů, funkce těchto interakcí je však často neznámá.

Cíle druhé části diplomové práce, týkající se interakčních partnerů LT antigenu MPyV se zaměřením na kinázu MKK3 a p38 MAP kinázovou dráhu, byly následující:

- Sledovat vzájemnou lokalizaci LT antigenu MPyV a jeho potenciálních interakčních partnerů v infikovaných buňkách
- Charakterizovat roli kinázy MKK3 při infekci MPyV
 - Sledovat vzájemnou lokalizaci MKK3 a LT v infikovaných buňkách a neinfikovaných buňkách exprimujících LT
 - Určit vliv infekce MPyV na hladinu kinázy MKK3 a aktivaci MAP kinázy p38
 - Určit vliv snížené exprese MKK3 na průběh infekce MPyV

4 Materiál a metody

4.1 Materiál

4.1.1 Buněčné linie

Myší buněčné linie

- **MEF** – primární linie myších embryonálních fibroblastů (Lonza; M-FB-481)
- **MEF *Daxx* Tet-On** – linie MEF s tetracyklinem indukibilní expresí *Daxx* (systém Tet-On) a selekčním markerem v podobě genu pro rezistenci k blasticidinu, poskytnuta Ladislavem Anděrou (Ústav molekulární genetiky AV ČR)
- **NIH/3T3** – linie odvozená od myších embryonálních fibroblastů (ATCC; CRL-1658)
- **3T6** – linie odvozená od myších embryonálních fibroblastů (ATCC; CCL-96)
- **3T6MT** – linie 3T6 se stabilní expresí MT antigenu myšího polyomaviru, připravena L. Hykou (Hyka, 2019)

Lidské buněčné linie

- **U2OS** – linie odvozená od nádorových buněk osteosarkomu
- **U2OS *DAXX* KO** (klony č. 79, 80, 81) – buňky linie U2OS s inaktivovaným genem *DAXX*, poskytnuty Ladislavem Anděrou (Ústav molekulární genetiky AV ČR)
- **HEK293** – linie odvozená z buněk embryonálních ledvin, immortalizovaná integrací fragmentu genomu adenoviru 5 (ATCC; CRL-1573)

4.1.2 Bakteriální kmen

- ***Escherichia Coli* XL1-Blue** (Agilent), chemicky kompetentní, genotyp: *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac* [*F' proAB lacI^q ZΔM15 Tn10 (Tet^r)*]

4.1.3 Virus

- **MPyV** – myší polyomavirus, kmen A3

4.1.4 Média pro savčí buněčné kultury

- DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium – high glucose; Sigma-Aldrich)
- Kompletní médium DMEM – DMEM, 10% (v/v) FBS (fetální bovinní sérum; Sigma-Aldrich)
- Kompletní médium DMEM s antibiotiky – DMEM, 10% (v/v) FBS, směs antibiotik pro tkáňové kultury (viz 4.1.7, Antibiotika)
- Kompletní médium DMEM pro kultivaci MEF *Daxx* Tet-On – DMEM, 5% (v/v) FBS, směs antibiotik pro tkáňové kultury, blasticidin 10 µg/ml
- RPMI-1640 (Sigma-Aldrich)
- Opti-MEMTM I (Gibco)

- Kryoprezervační médium – DMEM, 20% (v/v) FBS, 10% (v/v) DMSO (dimethylsulfoxid)

4.1.5 Média pro bakteriální kultury

- Millerovo LB (lysogeny broth) médium (Sigma-Aldrich): 1% (w/v) pepton, 0,5% (w/v) kvasničný autolyzát, 1% (w/v) NaCl
- LB agar: 1% (w/v) pepton, 0,5% (w/v) kvasničný autolyzát, 1% (w/v) NaCl, 1,5% (w/v) agar
- SOC médium (Super Optimal broth with Catabolite repression): 2% (w/v) pepton, 0,5% (w/v) kvasničný autolyzát, 20mM glukóza, 10mM NaCl, 2,5mM KCl, 10mM MgCl₂, 10mM MgSO₄

4.1.6 Chemikálie a roztoky

- Abberior Mount Liquid Antifade (Abberior)
- Agaróza (Amresco)
- Aprotinin (Sigma-Aldrich), výsledná koncentrace 2 µg/ml
- APS (peroxodisíran amonný; Serva)
- Blokovací roztok pro imunofluorescenci – 0,25% (w/v) BSA (bovinní sérový albumin), 0,25% (w/v) želatina v PBS (fosfátem pufovaném fyziologickém roztoku)
- Blokovací roztok pro western blot – 5% (w/v) roztok sušeného odtučněného mléka v PBST (PBS s Tween[®] 20)
- Blotovací pufr (Towbin buffer; pH 8,3) – 25mM Tris, 192mM glycin, 20% (v/v) methanol
- B-pufr – 10mM Tris-HCl (pH 7,4), 150mM NaCl, 0,01mM CaCl₂
- CsCl (Carl Roth)
- DAPI (4',6-diamidin-2-fenylindol) – roztok v PBS o koncentraci 1 µg/ml
- DMSO (Sigma-Aldrich)
- dNTPs (dNTP PCR Mix, 10mM; Serva)
- DPBS (BioWhittaker™ Dulbecco's Phosphate Buffered Saline without Ca and Mg; Lonza)
- elektroforetický pufr pro SDS-PAGE (pH 8,3) – 25mM Tris, 192mM glycin, 0,1% (w/v) SDS (dodecylsírán sodný)
- Ethanol (96%; Lach-Ner)
- Fixační roztok – 4% (w/v) paraformaldehyd (Sigma-Aldrich) v PBS
- GelRed[®] Nucleic Acid Gel Stain (Biotium)
- Glycerol (Lach-Ner)
- Chemiluminiscenční roztoky
 - Roztok A: 0,1M Tris-HCl (pH 8,5), 2,5mM luminol, 0,36mM kyselina p-kumarová
 - Roztok B: 0,1M Tris-HCl (pH 8,5), 0,03% (w/v) H₂O₂
- Inhibitory proteáz – cOmplete™ Protease Inhibitor Cocktail (Roche), 25× koncentrovaný roztok

- Kyselina chlorovodíková (Lach-Ner)
- Laemmliho pufr (5×) – 50% (v/v) glycerol, 25% (v/v) β-merkaptoethanol, 50mM Tris (pH 6,8), 0,005% (w/v) bromfenolová modř, 5% (w/v) SDS
- Loading Buffer (10×; Takara Bio)
- Lyzační pufr (5× koncentrovaný, pro přípravu vzorků na kvantifikaci virových genomů) – 50mM Tris-HCl (pH 8), 2,5% Tween[®] 20
- Midori Green Advance DNA Stain (NIPPON Genetics)
- Parafinový olej (Carl Roth)
- PBS – 137mM NaCl; 2,7mM KCl; 10mM Na₂HPO₄; 1,8mM KH₂PO₄
- PBST – 0,1% (v/v) Tween[®] 20 (Serva) v PBS
- Permeabilizační roztok – 0,5% Triton X-100 v PBS
- Peroxid vodíku, 30% (w/w) (Sigma-Aldrich)
- poly-D-lysin (Gibco), roztok o koncentraci 0,1 mg/ml
- Preextrakční pufr (pH 7,4) – 50mM NaCl, 3mM MgCl₂, 300mM sacharóza, 25mM HEPES-KOH, 0,5% (v/v) Triton X-100
- RIPA pufr (radioimmunoprecipitation assay buffer) – 150mM NaCl, 5mM EDTA (kyselina ethylendiamintetraoctová), 50mM Tris-HCl (pH 7,4), 0,05% (v/v) NP-40, 1% (w/v) deoxycholát sodný, 1% (v/v) Triton X-100, 0,1% (w/v) SDS
- Roztok akrylamidu – 29% (w/v) akrylamid (Serva), 1% (w/v) bisakrylamid (Serva)
- Sacharóza (Serva) v B-pufu, 10% (w/v) roztok (sterilizován filtrací přes 0,22μm filtr)
- SDS (Sigma-Aldrich)
- TBE (Tris-borát-EDTA) pufr (0,5×; pH 8,3) – 45mM Tris-HCl, 45mM kyselina boritá, 1mM EDTA
- TEMED (tetramethylethylendiamin; Sigma-Aldrich)
- Tris (tris(hydroxymethyl)aminomethan; (Serva))
- Triton X-100 (Carl Roth)
- trypsin – 0,25% roztok trypsinu v PBS
- versen – 0,02% EDTA v PBS

4.1.7 Antibiotika

- Směs antibiotik pro tkáňové kultury (Antibiotic Antimycotic Solution, 100× koncentrovaný roztok; Sigma-Aldrich), výsledná koncentrace: penicilin 100 U/ml, streptomycin 100 μg/ml, amfotericin B 250 ng/ml
- Blastidín (InvivoGen), výsledná koncentrace 10 μg/ml
- Doxycyklin (Sigma-Aldrich), výsledná koncentrace 0,5 μg/ml nebo 1 μg/ml
- Ampicilin (Sigma-Aldrich), výsledná koncentrace 100 μg/ml

4.1.8 Enzymy

- BpiI, restrikční endonukleáza (Thermo Fisher Scientific), 10 U/ μ l
- Neuraminidáza (Sigma-Aldrich)
- Proteináza K (20 mg/ml)
- Q5[®] Hot Start High-Fidelity DNA Polymerase (New England Biolabs)
- T4 DNA ligáza (Thermo Fisher Scientific), 5 U/ μ l
- Taq DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific)
- Vent[®] DNA Polymerase (New England Biolabs)

4.1.9 Reakční pufrы

- 10× Buffer G (Thermo Fisher Scientific)
- 10× pufr pro T4 DNA ligázu (Thermo Fisher Scientific)
- 5× Q5[®] Reaction Buffer (New England Biolabs)
- 10× ThermoPol[®] Reaction Buffer (New England Biolabs)
- 10× Taq Buffer (Thermo Fisher Scientific)

4.1.10 Transfekční činidla

- Amaxa[®] Cell Line Nucleofector[®] Kit V (Lonza)
- Lipofectamine[®] RNAiMAX Transfection Reagent (Thermo Fisher Scientific)

4.1.11 Komerční soupravy

- CyQUANT[™] LDH Cytotoxicity Assay (Thermo Fisher Scientific)
- GenElute[™] HP Plasmid Miniprep Kit (Sigma-Aldrich)
- NucleoBond[®] Xtra Midi (Macherey-Nagel)
- NucleoSpin[®] Tissue (Macherey-Nagel)
- QIAquick[®] Gel Extraction Kit (QIAGEN)
- NucleoSpin[®] Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel)
- KiCqStart[®] SYBR[®] Green qPCR ReadyMix[™] (Sigma-Aldrich)
- RNeasy[®] Mini Kit (QIAGEN)
- NucleoSpin[®] RNA (Macherey-Nagel)
- TATAA GrandScript cDNA Synthesis Kit (TATAA Biocenter)
- LunaScript[®] RT SuperMix Kit (New England Biolabs)

4.1.12 Plazmidy

- **pSpCas9(BB)-2A-GFP(PX458)** (Addgene #48138) – vektor pro expresi nukleázy Cas9 *Streptococcus pyogenes*, sgRNA (single guide RNA) a EGFP (zeleného fluorescenčního proteinu), kódující rezistenci proti ampicilinu (Ran et al., 2013)
- **pcDNA3.1(+)-LT** – vektor pro expresi LT antigenu MPyV v savčích buňkách, gen pro LT pod kontrolou CMV promotoru (Hana Španielová)
- **pcDNATM3.1(+)** (Thermo Fisher Scientific) – savčí expresní vektor, použit jako kontrola při transfekci plazmidem pcDNA3.1(+)-LT

4.1.13 siRNA, primery a další oligonukleotidy

siRNA

- siRNA (krátká interferující RNA) pro snížení exprese MKK3 v myších buňkách: *Silencer*[®] Select Map2k3 siRNA (Thermo Fisher Scientific)
 - sekvence „sense“: 5' - GGA UCA ACC CUG AAC UGA Att - 3'
 - sekvence „antisense“: 5' - UUC AGU UCA GGG UUG AUC Ctc - 3'
- kontrolní siRNA: *Silencer*[®] Select Negative Control #1 siRNA (Thermo Fisher Scientific)

Oligonukleotidy pro klonování sekvence *DAXX* sgRNA do plazmidu PX458

Cílová sekvence v genu *DAXX* pro systém CRISPR/Cas9 byla zvolena pomocí online nástroje CHOPCHOP (Labun et al., 2019). Na základě této sekvence byly navrženy oligonukleotidy přizpůsobené pro inzerci do vektoru PX458 štěpeného enzymem BpiI (podle protokolu¹ vytvořeného laboratoří F. Zhanga, Broad Institute of MIT and Harvard).

Sekvence syntetizovaných fosforylovaných oligonukleotidů (Integrated DNA Technologies):

- 5' - P - CAC CGG AGC AGC GCA TCC CCT ACC G - 3'
- 5' - P - AAA CCG GTA GGG GAT GCG CTG CTC C - 3'

(P = fosfát)

Primery

Primery byly syntetizovány společností Integrated DNA Technologies.

Primery pro ověření inaktivace genu DAXX systémem CRISPR/Cas9

- „forward“ primer **DAXX CRISPR f1** 5' - GCG ACT ATG TGA GCT GAA AGA C - 3'
- „forward“ primer **DAXX CRISPR f2** 5' - ATC TCT CAG AAT TGG ATG AAC C - 3'
- „reverse“ primer **DAXX CRISPR r** 5' - CCC ATA GTC AGG GAA GGT ATC A - 3'

Primer pro sekvenaci plazmidu PX458

- 5' - GTA TCT TTA TAG TCC TGT CG - 3'

¹ Protokol pro klonování sekvence sgRNA do plazmidu PX458 je dostupný na https://media.addgene.org/cms/filer_public/6d/d8/6dd83407-3b07-47db-8adb-4fada30bde8a/zhang-lab-general-cloning-protocol-target-sequencing_1.pdf.

Primery pro kvantifikaci mRNA MKK3

- **MKK3 fw 5'** - CTG CTT CTA CAC TGT CAC CTT C - 3'
- **MKK3 rev 5'** - GCA CCT TCC GGT AGA ACT TAT C - 3'

- **MKK3 ori fw 5'** - GGA CCT TCA TCA CTA TCG GAG AC - 3'
- **MKK3 ori rev 5'** - ATG CCG CAC TTT CTC TAC CAC C - 3'
(sekvence páru primerů byla nalezena v nabídce firmy OriGene)

Primery pro kvantifikaci cDNA LT

- **LTspl fw 5'** - GAA CCG GCT TCC AGG GCT C - 3'
- **LTspl rev 5'** - CTT AGG CGG CGA CTG GTA G - 3'

Primery pro kvantifikaci cDNA VPI

- **spVP1 fw 5'** - GCC TTT GTA CAT TTT GTC TCG C - 3'
- **spVP1 rev 5'** - GCT GAT CAA GGC TGT ACG G - 3'

Primery pro kvantifikaci cDNA GAPDH (glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenázy)

- **GAPDH fw 5'** - ATG ACA TCA AGA AGG TGG TG - 3'
- **GAPDH rev 5'** - CAT ACC AGG AAA TGA GCT TG - 3'

Primery pro kvantifikaci cDNA PPIA (proteinfosfatázy 1A)

- **PP1A fw 5'** - AAG ACT GAA TGG CTG GAT GGC - 3'
- **PP1A rev 5'** - CAT TCC TGG ACC CAA AAC GC - 3'

Primery pro kvantifikaci genomů MPyV

- **MPyV E fw 5'** - GCT GAC AAA GAA AGG CTG CT - 3'
- **MPyV E rev 5'** - CCT TTG TCT GGG TGC AGT AG - 3'

Primery pro kvantifikaci buněčné p53 DNA (intron)

- **p53 fw 5'** - GAC TTG GGC TTT GGT GTT GG - 3'
- **p53 rev 5'** - ACC TTG ATG ATG GCT GTG GA - 3'

4.1.14 Protilátky

4.1.14.1 Primární protilátky

(WB = western blot, IF = imunofluorescence)

- M α DAXX – myší monoklonální protilátka proti proteinu DAXX (H-7, sc-8043; Santa Cruz Biotechnology), ředění 1:100 (WB)
- Rb α DAXX – králičí polyklonální protilátka proti proteinu DAXX (M-112, sc-7152; Santa Cruz Biotechnology), ředění 1:50–1:100 (IF)
- G α DAXX – kozí polyklonální protilátka proti proteinu DAXX (S-20, sc-7001; Santa Cruz Biotechnology), ředění 1:50–1:100 (IF)

- M α PML – myší monoklonální protilátka proti proteinu PML (sc-966; Santa Cruz Biotechnology), ředění 1:50 (IF)
- Rb α GAPDH – králičí polyklonální protilátka proti proteinu GAPDH (sc-25778, Santa Cruz Biotechnology), ředění 1:1000 (WB)
- Rb α GAPDH – králičí polyklonální protilátka proti proteinu GAPDH (G9545; Sigma-Aldrich), ředění 1:2000 (WB)
- R α LT (LT1) – krysí monoklonální protilátka proti LT antigenu MPyV (Dilworth & Griffin, 1982), ředění 1:50 (IF)
- R α LT (C1) – krysí monoklonální protilátka proti T antigenům MPyV (Dilworth & Griffin, 1982), ředění 1:50 (IF)
- M α VP1 – myší monoklonální protilátka proti VP1 MPyV (Forstová et al., 1993), ředění 1:100 (WB)
- Rb α BAF57 – králičí polyklonální protilátka proti proteinu BAF57 (PA5-92420; Invitrogen) 1:50–1:100 (IF)
- M α BAG2 – myší monoklonální protilátka proti proteinu BAG2 (sc-390107; Santa Cruz Biotechnology), ředění 1:50 (IF)
- M α NONO – myší monoklonální protilátka proti proteinu NONO (sc-376865; Santa Cruz Biotechnology), ředění 1:50 (IF)
- M α PRC1 – myší monoklonální protilátka proti proteinu WDR48 (sc-376983; Santa Cruz Biotechnology), ředění 1:50 (IF)
- Rb α SMC4 – králičí monoklonální protilátka proti proteinu SMC4 (A3559; ABclonal) 1:50–1:100 (IF)
- M α WDR48 – myší monoklonální protilátka proti proteinu WDR48 (sc-514473; Santa Cruz Biotechnology), ředění 1:50 (IF)
- M α MKK3 – myší monoklonální protilátka proti proteinu MKK3 (sc271779; Santa Cruz Biotechnology), ředění 1:50 (IF)
- Rb α MKK3 – králičí polyklonální protilátka proti kináze MKK3 (CST, 5674), ředění 1:1000 (WB)
- Rb α p38 – králičí monoklonální protilátka proti MAP kináze p38 (8690; Cell Signaling Technology), ředění 1:1000 (WB), 1:100 (IF)
- Rb α p-p38 – králičí polyklonální protilátka proti MAP kináze p38 fosforylované na Thr180/Tyr182 (9211; Cell Signaling Technology), ředění 1:1000 (WB), 1:400 (IF)

4.1.14.2 Sekundární protilátky

- G α M-AF488 – koží polyklonální protilátka proti myším imunoglobulinům IgG konjugovaná s Alexa Fluor™ 488 (A11029; Invitrogen), ředění 1:1000 (IF)

- D α M-AF488 – oslí polyklonální protilátka proti myším imunoglobulinům IgG konjugovaná s Alexa Fluor™ 488 (A21202; Invitrogen), ředění 1:1000 (IF)
- D α Rb-AF488 – oslí polyklonální protilátka proti králičím imunoglobulinům IgG konjugovaná s Alexa Fluor™ 488 (A21206; Invitrogen), ředění 1:1000 (IF)
- G α Rt-AF488 – kozí polyklonální protilátka proti krysím imunoglobulinům IgG konjugovaná s Alexa Fluor™ 488 (A11006; Invitrogen), ředění 1:1000 (IF)
- D α G-AF488 – oslí polyklonální protilátka proti kozím imunoglobulinům IgG konjugovaná s Alexa Fluor™ 488 (A11055; Invitrogen), ředění 1:1000 (IF)
- G α M-Cy3 – kozí polyklonální protilátka proti myším imunoglobulinům IgG konjugovaná s Cyanine3 (A10521; Invitrogen), ředění 1:1000 (IF)
- D α Rb-AF546 – oslí polyklonální protilátka proti králičím imunoglobulinům IgG konjugovaná s Alexa Fluor™ 546 (A10040; Invitrogen), ředění 1:1000 (IF)
- G α Rt-AF546 – kozí polyklonální protilátka proti krysím imunoglobulinům IgG konjugovaná s Alexa Fluor™ 546 (A11081; Invitrogen), ředění 1:1000 (IF)
- G α M-HRP – kozí monoklonální protilátka proti myším imunoglobulinům IgG konjugovaná s křenovou peroxidázou (Bio-Rad), ředění 1:2000 (WB)
- G α Rb-HRP – kozí monoklonální protilátka proti králičím imunoglobulinům IgG konjugovaná s křenovou peroxidázou (Bio-Rad), ředění 1:2000 (WB)
- G α Rt-HRP – kozí monoklonální protilátka proti krysím imunoglobulinům IgG konjugovaná s křenovou peroxidázou (Santa Cruz Biotechnology), ředění 1:1000 (WB)

4.1.15 Markery molekulových hmotností

DNA markery

- GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific)
- MassRuler™ Low Range DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific)

Proteinové markery

- Color Prestained Protein Standard, Broad Range (10-250 kDa) (New England Biolabs)
- Black Protein Ladder (Central European Biosystems)

4.2 Metody

4.2.1 Sterilizace

Roztoky byly sterilizovány v autoklávu při teplotě 120 °C a tlaku 120 kPa po dobu 30 minut, stejným způsobem byly sterilizovány také materiály jako jsou mikrozkmavky a pipetovací špičky. Laboratorní sklo bylo sterilizováno horkým vzduchem 3 h při teplotě 180 °C.

4.2.2 Práce s buněčnými kulturami

4.2.2.1 Kultivace a pasážování buněk

Savčí buněčné linie byly kultivovány v miskách nebo destičkách pro tkáňové kultury v inkubátoru při teplotě 37 °C v atmosféře s 5 % CO₂. Buněčné linie použité v této práci byly kultivovány v médiu DMEM s 10% FBS, s výjimkou linie MEF *Daxx* Tet-On, pro kterou bylo použito DMEM s 5% FBS a selekčním antibiotikem blasticidinem (viz 4.1.4).

Buněčné linie byly pasážovány po dosažení přibližně 80–90% konfluence, zpravidla dvakrát týdně. Potřebné roztoky a média byly předehřáty na 37 °C. Buňky narostlé v misce pro tkáňové kultury o průměru 6 cm byly zbaveny kultivačního média a opláchnuty roztokem versenu (2 ml). Poté bylo přidáno 300 µl roztoku trypsinu a buňky byly inkubovány při 37 °C, dokud nedošlo k jejich uvolnění z povrchu misky (do 5 minut, kontrolováno pomocí mikroskopu). Trypsin byl inaktivován přidáním média s obsahem FBS (1–5 ml), buňky byly resuspendovány pipetováním a požadovaný objem buněčné suspenze byl přenesen do nové 6cm kultivační misky. Buňky U2OS, U2OS *DAXX* KO a HEK293 byly pasážovány v poměru 1 : 10, buňky MEF a MEF *Daxx* Tet-On v poměru 1 : 5 – 1 : 10, buňky 3T6 a 3T3 v poměru 1 : 10 – 1 : 20. Buněčná suspenze byla doplněna kultivačním médiem do celkového objemu 5 ml a buňky byly dále inkubovány při 37 °C v atmosféře s 5 % CO₂.

V případě použití jiných kultivačních misek nebo destiček byly objemy použitých roztoků patričně upraveny podle velikosti misky nebo jamky (viz Tab. 1)

	versen	trypsin	médium
6cm miska	1–3 ml	300 µl	5 ml
10cm miska	5 ml	500 µl	10 ml
6jamková destička	1 ml	200 µl	2,5 ml
12jamková destička	0,5 ml	100 µl	1–1,5 ml
24jamková destička	0,3 ml	50 µl	0,5–1 ml

Tab. 1: Objemy roztoků při pasážování a kultivaci buněk. V případě kultivačních destiček se množství vztahuje k 1 jamce.

4.2.2.2 Kryoprezervace buněk

Příprava buněčné konzervy

Buňky narostlé v 6cm misce do 80–90% konfluence byly převedeny do suspenze pomocí roztoku trypsinu (viz 4.2.2.1, Kultivace a pasážování buněk), resuspendovány v 1 ml média s FBS a centrifugovány 5 min při 300 × g a laboratorní teplotě. Buněčný pelet byl resuspendován v 1 ml kryoprezervačního média (viz 4.1.4, Média pro buněčné kultury), suspenze byla přenesena do kryozkumavky a v zamrazovací nádobě s isopropanolem (Nalgene® Mr. Frosty® Freezing Container, Thermo Fisher Scientific) postupně zmrazena při –80 °C do následujícího dne. Kryozkumavky s buňkami byly následně uchovány v parách kapalného dusíku.

Rozmrazení buněčné konzervy

Kryozkumavka byla vyjmuta z nádoby s kapalným dusíkem a vložena do vodní lázně zahřáté na 37 °C do rozmrznutí buněčné suspenze (cca 2 min). Buňky byly přeneseny do 6cm misky (případně rozděleny do 2 misek) se 4 ml kompletního média předeřátého na 37 °C. Následující den bylo vyměněno kultivační médium, v případě potřeby byly buňky pasážovány.

4.2.2.3 Počítání buněk pomocí Bürkerovy komůrky

Pro stanovení počtu buněk byla použita Bürkerova komůrka (Assistent). Buňky byly převedeny do suspenze trypsinizací (viz 4.2.2.1), po přidání média bylo do obou počítacích sítí Bürkerovy komůrky pod krycí sklo nanášeno 10 µl buněčné suspenze (v případě potřeby vhodně ředěné). Pod světelným mikroskopem byly spočítány buňky v deseti velkých čtvercích (plocha 1 mm², objem 0,1 mm³), případně ve 24 malých čtvercích (plocha 0,04 mm², objem 0,004 mm³). Byl stanoven počet buněk v 1 ml suspenze – průměrný počet buněk v 1 poli počítací komůrky byl vynásoben 10⁴ (při počítání buněk ve velkých čtvercích) nebo 2,5 · 10⁵ (v případě malých čtverců).

4.2.2.4 Synchronizace buněčného cyklu

Aby bylo před infekcí virem dosaženo synchronizace buněčného cyklu, bylo od buněk odsáto kompletní médium a nahrazeno médiem DMEM bez FBS. Buňky byly kultivovány v bezsérovém médiu 24 h a poté infikovány níže uvedeným způsobem.

4.2.2.5 Infekce buněk virem

Z kultivační misky nebo jamky s buňkami bylo odsáto médium a buňky byly opláchnuty médiem DMEM bez FBS předeřátým na 37 °C. Bylo přidáno virové inokulum ředěné v DMEM bez FBS tak, aby bylo dosaženo požadované multiplicity infekce (MOI). Objem média s virovým inokulem činil 1 ml pro 10cm misku, 200 µl pro jamku 24jamkové destičky, 300 µl pro jamku 12jamkové destičky a 500 µl pro jamku 6jamkové destičky. Buňky byly inkubovány 1–1,5 h při 37 °C, každých 20 minut bylo s miskami nebo destičkami zakýváno pro dosažení rovnoměrné distribuce virového inokula. Následně bylo doplněno kompletní médium DMEM předeřáté na 37 °C do obvyklého objemu pro danou kultivační misku nebo destičku. Stejný postup byl použit pro přípravu negativních kontrol (neinfikovaných buněk), s výjimkou přidání bezsérového média DMEM namísto virového inokula. Buňky byly dále inkubovány při 37 °C. Čas infekce byl počítán od přidání virového inokula.

4.2.2.6 Nepřímá imunofluorescence

Kultivace buněk na mikroskopických sklech

Krycí skla o průměru 12 mm byla sterilizována ponořením do ethanolu a opálením nad kahanem a vložena do jamek 24jamkové kultivační destičky. Do jamek byly poté přidány buňky s kompletním médiem a dále inkubovány při 37 °C. Pokud bylo potřeba použít konkrétní počet buněk, byly buňky

před vyšetím do jamek se skly počítány pomocí Bürkerovy komůrky. Počet buněk se v závislosti na buněčné linii a typu experimentu pohyboval v rozmezí $3 \cdot 10^4$ – $6 \cdot 10^4$ buněk na 1 jamku.

Ošetření povrchu krycích skel poly-D-lysinem

Při kultivaci buněk HEK293 na mikroskopických sklech byla pro zvýšení adheze buněk k povrchu nanášena na krycí skla vrstva poly-D-lysinu. Roztok poly-D-lysinu o koncentraci 0,1 mg/ml byl smíchán s DPBS v poměru 1 : 1 (v/v). Sterilizovaná krycí sklíčka ve 24jamkové destičce byla inkubována 1 h ve 100 μ l roztoku poly-D-lysinu s DPBS, třikrát opláchnuta sterilní H₂O a vysušena. Poté byly přidány buňky s kultivačním médiem.

Fixace buněk

Od buněk narostlých na krycích sklech bylo odsáto médium, buňky byly opláchnuty 1 ml PBS a inkubovány 15 min v 0,2–0,5 ml fixačního roztoku. Po fixaci byla ihned provedena permeabilizace buněk a imunofluorescenční značení proteinů (viz níže), nebo byly buňky dvakrát promyty 1 ml PBS (při druhém promytí byly ponechány v PBS 10 min) a uchovány v PBS při 4 °C.

Fixace buněk s preextrakcí

Aplikací preextrakčního pufru jsou buňky permeabilizovány před fixací. Preextrakce vede ke snížení množství solubilních cytoplazmatických a jaderných proteinů. Umožňuje mimo jiné efektivnější detekci proteinů vázaných na chromatin, napomáhá snížení pozadí při detekci imunofluorescence a může zvyšovat přístupnost antigenu pro vazbu protilátky.

Preextrakční pufr a PBS byly vychlazený na ledu. Buňky kultivované na krycích sklech ve 24jamkové destičce byly po odsátí média opláchnuty vychlazeným PBS. Destička byla umístěna na led a buňky byly inkubovány 5 min v 500 μ l preextrakčního pufru. Poté byly buňky 1–2 \times promyty 1 min v 500 μ l PBS. Po odsátí PBS byl přidán fixační roztok, buňky byly fixovány výše uvedeným způsobem.

Imunofluorescenční značení proteinů

Imunofluorescenční barvení bylo provedeno v jamkách 24jamkové destičky (při barvení většího množství vzorků současně a dostatečném množství primární protilátky), nebo na kapkách roztoků na parafilmu.

Imunofluorescenční značení na parafilmu

Krycí skla s fixovanými buňkami byla vyjmuta z 24jamkové destičky a položena na kapku 100 μ l PBS stranou s buňkami dolů. Poté byla postupně pokládána na kapky dalších roztoků. Buňky byly nejprve permeabilizovány ve 100 μ l permeabilizačního roztoku po dobu 5 min (maximálně), třikrát omyty 10 min ve 100 μ l PBS a inkubovány 30 min ve 100 μ l blokovacího roztoku. Následovala inkubace 1 h v 50 μ l primární protilátky ředěné v blokovacím roztoku, promytí třikrát 10 min ve 100 μ l PBS a inkubace 30 min ve 100 μ l sekundární protilátky ředěné v blokovacím roztoku. Od přidání sekundární protilátky byla skla chráněna před světlem. Skla byla omyta dvakrát 5 min ve 100 μ l PBS, poté byla

značena buněčná jádra inkubací 2 min ve 100 μ l roztoku DAPI. Skla byla na 2 minuty položena na kapku 100 μ l PBS, opláchnuta v ddH₂O a sušena stranou s buňkami nahoru. Poté byla umístěna na podložní sklo stranou s buňkami do kapky (2,5 μ l) montovacího média Abberior Mount Liquid Antifade nebo 50% (v/v) roztoku glycerolu. Připravené vzorky byly pozorovány pomocí fluorescenčního mikroskopu Olympus BX60 nebo Olympus IX73, případně pomocí konfokálního mikroskopu LSM 880 NLO (Carl Zeiss).

Imunofluorescenční značení v jamkách 24jamkové destičky

Postup byl obdobný jako při značení na parafilmu, namísto pokládání skel na kapky roztoků byly dané roztoky přidávány do jamek se skly. Použité objemy roztoků byly následující: 1 ml PBS, 200 μ l permeabilizačního a blokovacího roztoku, primární a sekundární protilátky a DAPI.

4.2.2.7 Vnášení nukleových kyselin do buněk

Transfekce DNA metodou nukleofekce (Amaxa)

Pro vnášení DNA do savčích buněk byla použita metoda nukleofekce pomocí soupravy Amaxa[®] Cell Line Nucleofector[®] Kit V (Lonza). Buňky byly transfekovány po dosažení 70–80% konfluence. Po převedení buněk do suspenze roztokem trypsinu byl pomocí Bürkerovy komůrky stanoven počet buněk v 1 ml suspenze. Byl odebrán objem odpovídající požadovanému počtu buněk ($4 \cdot 10^6$ nebo $2 \cdot 10^6$) a centrifugován 5 min při $300 \times g$ a laboratorní teplotě. Pelet byl resuspendován ve 100 μ l „Nucleofector[®] Solution“ a byla přidána plazmidová DNA v poměru 6 μ g DNA na $4 \cdot 10^6$ buněk. Směs byla promíchána a přenesena do elektroporační kyvety. V přístroji Amaxa[®] Nucleofector[®] II (Lonza) byla provedena elektroporace podle programu T-030. Bylo přidáno 500 μ l média RPMI-1640 předeřátého na 37 °C, směs byla přenesena do mikrozkuřavky a inkubována 15 min při 37 °C. Následně byla buněčná suspenze přenesena do kultivační misky nebo destičky a doplněna kompletním médiem.

Transfekce siRNA pomocí Lipofectamine[®] RNAiMAX Transfection Reagent

Pro vnesení siRNA do buněk byla zvolena transfekce pomocí činidla Lipofectamine[®] RNAiMAX Transfection Reagent (Thermo Fisher Scientific), založeného na kationtových lipidech. Transfekce byla provedena v přímém nebo reverzním uspořádání. Reverzní transfekce je méně časově náročná, vzhledem k tomu, že jsou buňky pasážovány až v den transfekce.

Přímá („forward“) transfekce

Buňky byly pasážovány a vysety do 24jamkové destičky tak, aby v den transfekce dosáhly 60–80% konfluence. Při samotné transfekci byl naředěn RNAiMAX Lipofectamine Reagent v množství 3 μ l na 50 μ l média RPMI-1640 nebo DMEM. Dále byl naředěn 1 μ l 10 μ M roztoku siRNA (*Silencer[®] Select Map2k3 siRNA* nebo *Silencer[®] Select Negative Control #1 siRNA*) v 50 μ l média. Uvedené množství odpovídá transfekci buněk ve 2 jamkách 24jamkové destičky. Roztok siRNA byl smíchán s roztokem transfekčního činidla, směs byla inkubována 5 min při laboratorní teplotě a přidána

k buňkám (50 µl na 1 jamku 24jamkové destičky, výsledné množství siRNA na 1 jamku činilo 5 pmol a objem transfekčního činidla 1,5 µl). Buňky byly dále inkubovány při 37 °C.

Reverzní transfekce

Při reverzní transfekci je nejprve připravena transfekční směs, k níž jsou následně přidány buňky. Buňky byly transfekovány ve 24jamkových nebo 12jamkových kultivačních destičkách. Uvedeny jsou hodnoty potřebné pro transfekci buněk v 1 jamce 24jamkové destičky, pro 12jamkovou destičku bylo množství zdvojnásobeno. Při přípravě transfekční směsi byly smíchány 2 µl 10µM roztoku siRNA (*Silencer*[®] Select Map2k3 siRNA nebo *Silencer*[®] Select Negative Control #1 siRNA) se 100 µl bezsérového média DMEM. Transfekční činidlo Lipofectamine RNAiMAX bylo promícháno a 3 µl byly přidány k naředěné siRNA. Transfekční směs byla promíchána a inkubována 15 minut při laboratorní teplotě. Buňky 3T3 byly naředěny v médiu DMEM s 10% FBS bez antibiotik tak, aby 500 µl suspenze obsahovalo $6 \cdot 10^4$ buněk. Do jamek s transfekční směsí bylo přidáno 500 µl buněčné suspenze, buňky byly dále inkubovány při 37 °C. Při experimentech zahrnujících virovou infekci byly buňky infikovány 24 hodin po transfekci.

4.2.2.8 Stanovení cytotoxicity pomocí CyQUANT™ LDH Cytotoxicity Assay (Thermo Fisher Scientific)

Cytotoxicita byla měřena ve vzorcích buněk 3T3 transfekovaných *Silencer*[®] Select Map2k3 siRNA nebo *Silencer*[®] Select Negative Control #1 siRNA ve 24jamkové kultivační destičce a následně infikovaných MPyV (MOI 0,5) nebo neinfikovaných. Pro stanovení cytotoxicity byla použita komerční souprava CyQUANT™ LDH Cytotoxicity Assay (Thermo Fisher Scientific), založená na kolorimetrické kvantifikaci enzymu laktát dehydrogenázy (LDH) uvolněné z buněk do kultivačního média v důsledku poškození cytoplazmatické membrány.

Buňky byly kultivovány ve 24jamkové destičce v 500 µl kompletního média (DMEM, 10% FBS). Byly připraveny dvojice vzorků, *experimentální množství LDH* (množství LDH uvolněné do média v daných experimentálních podmínkách) a *maximální množství LDH* (celkové množství LDH po lyzi buněk).

Ve zvoleném čase (24 hpi a 72 hpi) bylo do jamek se vzorky *maximální množství LDH* přidáno 50 µl „10× Lysis buffer“, do jamek se vzorky *experimentální množství LDH* bylo přidáno 50 µl sterilní H₂O. Zahrnuty byly také kontroly obsahu LDH v použitém kultivačním médiu. Bylo smícháno 500 µl média s 50 µl „10× Lysis buffer“ (kontrola pro vzorky *maximální množství LDH*) nebo 50 µl sterilní H₂O (kontrola pro vzorky *experimentální množství LDH*). Všechny vzorky byly inkubovány 45 min při 37 °C. Po inkubaci byly lyzáty a média přeneseny do mikrocentrifugačních zkumavek a centrifugovány 5 min při $300 \times g$ a 4 °C. Supernatanty byly skladovány při -80 °C.

Při vlastním stanovení cytotoxicity bylo přeneseno 50 µl každého vzorku v duplikátech nebo tripplikátech do jamek 96jamkové destičky s plochým dnem jamek. Kromě vzorků bylo nanášeno také 50 µl „1× LDH positive control“. Do jamek bylo přidáno 50 µl „Reaction Mixture“, směs v jamkách

byla promíchána a inkubována 30 min chráněná před světlem. Poté bylo přidáno 50 µl „Stop Solution“ a byla změřena absorbance při vlnové délce 490 a 680 nm spektrofotometrem Epoch (BioTek). Před výpočtem cytotoxicity byla od průměrných hodnot absorbance při 490 nm odečtena absorbance při 680 nm (pozadí). Od korigovaných absorbancí jednotlivých vzorků byly odečteny odpovídající hodnoty kultivačního média bez buněk (blank). Z takto získaných hodnot množství LDH byla vypočítána procentuální cytotoxicita podle následujícího vzorce:

$$\text{cytotoxicita [\%]} = 100 \cdot \frac{\text{experimentální množství LDH}}{\text{maximální množství LDH}}.$$

4.2.2.9 Třídění buněk pomocí průtokové cytometrie (FACS)

Třídění buněk metodou FACS (fluorescence-activated cell sorting) bylo použito při přípravě linie HEK293 *DAXX* KO pro oddělení buněk transfekovaných plazmidem PX458 s vloženou sekvencí *DAXX* sgRNA. Buňky byly 24 hodin po transfekci (hpt) převedeny do suspenze pomocí roztoku trypsinu, po přidání kompletního média byly centrifugovány 5 min při $300 \times g$ a laboratorní teplotě. Pelet byl resuspendován v médiu Opti-MEM™ I do výsledné koncentrace cca $1 \cdot 10^6$ buněk/ml. Provedení FACS bylo zajištěno Laboratoří zobrazovacích metod (Imaging Methods Core Facility) v centru BIOCEV. Pomocí průtokového cytometru BD FACSAria™ Fusion byly jednotlivé buňky pozitivní na signál EGFP tříděny do jamek 96jamekové destičky s 50 µl kompletního média. Do jamek s buňkami bylo přidáno 50 µl kondiciovaného média (médiu odebrané při kultivaci buněk HEK293, obsahující růstové faktory sekretované buňkami). Buňky byly dále kultivovány při 37 °C.

4.2.2.10 Příprava vzorků pro kvantifikaci virových genomů metodou qPCR

Infikované a neinfikované buňky kultivované ve 12jamekové destičce byly převedeny do suspenze roztokem trypsinu. Pro kvantifikaci DNA pomocí kvantitativní polymerázové řetězové reakce (qPCR) byla odebrána čtvrtina buněčné suspenze a centrifugována 5 min při $300 \times g$ a 4 °C (zbytek buněk byl použit k přípravě vzorků pro kvantifikaci mRNA). Buněčný pelet byl uchován při -80 °C do dalšího zpracování. Pelet byl resuspendován ve směsi 20 µl 5× koncentrovaného lyzačního pufru, 80 µl PCR H₂O (vody v PCR kvalitě) a 0,4 µl proteinázy K (výsledná koncentrace 0,08 mg/ml) a inkubován 60 min při 55 °C. Proteináza K byla inaktivována inkubací 10 min při 95 °C. Část vzorku byla 100× zředěna v PCR H₂O a uchována spolu s neředěným vzorkem při -80 °C.

4.2.3 Práce s viry

4.2.3.1 Izolace MPyV

(podle Horníková et al., 2015)

Pomnožení MPyV v buňkách MEF

Buňky MEF byly vysety na 10 misek o průměru 100 mm tak, aby v den infekce dosáhly 50–70% konfluency. Buňky byly infikovány myším polyomavirem s MOI 0,01–0,05. Infikované buňky

byly inkubovány do projevu masivního cytopatického efektu (8–10 dní), v případě potřeby bylo doplněno kultivační médium. Misky s buňkami byly zmrazeny při $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, následovala izolace virových částic.

Izolace virových částic z infikovaných buněk

Misky s infikovanými buňkami byly celkem třikrát zmrazeny v $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ a rozmrazeny při laboratorní teplotě za účelem lyze buněk a uvolnění virových částic. Buňky byly ze dna misek uvolněny škrabkou pro tkáňové kultury a spolu s médiem přeneseny do 50ml centrifugačních zkumavek. Následovala centrifugace 30 min při $4000 \times g$ a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Supernatant byl odebrán a uchován při $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Sediment byl resuspendován celkem ve 2 ml sterilního B-pufu a homogenizován ve vychlazeném Potter-Elvehjemově homogenizátoru v 5 cyklech po 10 stlačeních. Mezi jednotlivými cykly homogenizace byla suspenze v homogenizátoru chlazená na ledu. Suspenze byla přenesena do 50ml zkumavky a za účelem uvolnění viru vázaného na buněčné receptory byla přidána neuraminidáza do výsledné koncentrace 0,01 U/ml spolu s aprotininem o výsledné koncentraci $2\text{ }\mu\text{g/ml}$. Směs byla inkubována přes noc za stálého kývání při laboratorní teplotě. Následující den byla opakována centrifugace při výše uvedených podmínkách, supernatant byl spojen s předchozím. Pro uvolnění viru nespecificky vázaného na buněčné struktury byl sediment resuspendován v 1 ml 10mM Tris-Cl, pH = 9 a inkubován 2,5–4 h za stálého kývání při laboratorní teplotě. Znovu byla opakována centrifugace, supernatant byl spojen s předchozím a sediment byl vyhozen.

Koncentrace viru centrifugací přes sacharózový polštář

Spojené supernatanty byl rozděleny do centrifugačních zkumavek pro rotor SW 32 (Beckman Coulter) a podvrstveny cca 3 ml 10% (w/v) roztoku sacharózy v B-pufu. Zkumavky byly doplněny sterilním B-pufem a vyváženy s přesností na setiny gramu. Takto připravené zkumavky byly centrifugovány v ultracentrifuze Optima™ XPN-90 (Beckman Coulter) v rotoru SW 32 3 h při 25 000 rpm a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Supernatant byl odstraněn, sediment byl doplněn 1 ml sterilního B-pufu a uchován při $4\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Přečištění viru izopyknickou centrifugací v gradientu CsCl

Sediment resuspendovaný v B-pufu po centrifugaci přes sacharózový polštář byl přenesen do homogenizátoru a homogenizován výše uvedeným způsobem. Suspenze byla doplněna B-pufem a smíchána s CsCl v hmotnostním poměru 2,5 : 1,2 (15,80 g virové suspenze ředěné v B-pufu a 7,58 g CsCl pro 2 zkumavky do rotoru SW 41). Koncentrace CsCl byla ověřena pomocí refraktometru, index lomu by se měl pohybovat v rozmezí 1,363–1,366 (odpovídá hustotě virových partikulí $1,33\text{ g/ml}$). V případě potřeby byla koncentrace upravena přidáním B-pufu nebo CsCl. Směs byla rozdělena do 2 centrifugačních zkumavek pro rotor SW 41 (Beckman Coulter) a převrstvena parafinovým olejem. Zkumavky byly vyváženy s přesností na setiny gramu a centrifugovány v ultracentrifuze Optima™ XPN-90 (Beckman Coulter), rotor SW 41, 20–24 h při 35 000 rpm a $18\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Gradients byly rozděleny do frakcí o přibližném objemu 0,3–0,5 ml pomocí aparatury pro odebrání frakcí (Beckman Coulter). Pomocí refraktometru byl změřen index lomu jednotlivých frakcí, na základě těchto hodnot byly vytvořeny spojené frakce I (index lomu > 1,366), II (hlavní virová frakce, index lomu 1,363–1,366) a III (frakce obsahující převážně prázdné virové partikule, index lomu < 1,363). Spojení frakcí vychází z hustoty plných virových částic 1,33 g/ml, která odpovídá indexu lomu 1,365–1,366 a hustoty prázdných virových částic 1,29 g/ml, odpovídající indexu lomu 1,362–1,363.

Dialýza a koncentrace viru centrifugací přes sacharózový polštář

Za účelem odstranění CsCl byly spojené frakce přeneseny do dialyzačních membrán (průměr 16 mm, hraniční molekulová hmotnost 12–14 kDa; Serva) předem povařených 10 min v destilované vodě a dialyzovány v B-pufriu. Dialýza probíhala dvoustupňově při 4 °C za stálého míchání nejprve 1 h v 1,5 l B-pufriu a poté přes noc ve 2 l B-pufriu.

Po dialýze byly virové částice zakoncentrovány centrifugací přes sacharózový polštář. Virová suspenze byla přenesena do centrifugačních zkumavek pro rotor SW 41, podvrstvena cca 1,5 ml 10% roztoku sacharózy, doplněna B-pufrem a vyvážena s přesností na setiny gramu. Centrifugace v ultracentrifuze Optima™ XPN-90 (Beckman Coulter), rotor SW 41 probíhala 3 h při 35 000 rpm a 4 °C. Sediment byl rozplaven ve 200 µl B-pufriu přes noc při 4 °C a homogenizován ve skleněném homogenizátoru na ledu. Homogenní suspenze byla rozdělena do silikonizovaných mikrozkušavek a skladována při –80 °C.

4.2.3.2 Titrace virového inokula

Myší fibroblasty 3T6 nebo MEF byly vysety do 24jamkové kultivační destičky na mikroskopická skla tak, aby následující den dosáhly přibližně 50–60% konfluence. Poté byly buňky infikovány virovou suspenzí ředěnou v bezsérovém DMEM (ředění 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6}). Jako negativní kontrola byly použity neinfikované buňky. Po 24 hodinách byly buňky fixovány a byl detekován LT antigen MPyV metodou nepřímé imunofluorescence. Ve vhodném ředění byl stanoven počet buněk pozitivních na LT nejméně ve 20 zorných polích fluorescenčního mikroskopu. Titr infekčních virových částic byl vypočítán podle následujícího vzorce:

$$\text{ffu/ml} = n \cdot k \cdot \frac{1}{d} \cdot v,$$

kde **ffu** je počet infekčních virových částic (*fluorescence forming units*), **n** je průměrný počet pozitivních buněk na zorné pole, **k** je počet zorných polí na jamku 24jamkové kultivační destičky (vypočítán jako podíl plochy jamky a plochy zorného pole, pro mikroskop Olympus BX60 činí 211 pro zvětšení objektivu 20× a 488 pro zvětšení 40×), **d** je ředění virové suspenze a **v** je faktor přepočtu objemu na 1 ml ($v = 5$ pro použitý objem virového inokula 200 µl).

4.2.4 Práce s bakteriemi

Média pro kultivaci bakterií byla sterilizována v autoklávu při teplotě 120 °C a tlaku 120 kPa po dobu 30 minut.

4.2.4.1 Kultivace bakterií v suspenzi

Bakteriální kolonie byla pomocí sterilního párátko nebo pipetovací špičky inokulována z agarové plotny do LB média s přidáním selekčním antibiotikem (ampicilin, 100 µg/ml). Pro izolaci plazmidové DNA soupravou GenElute™ HP Plasmid Miniprep Kit (Sigma-Aldrich) byla kolonie zaočkována do 1 ml média, pro izolaci soupravou NucleoBond® Xtra Midi (Macherey-Nagel) do 50 ml média. Bakterie byly kultivovány přes noc (16–20 h) v orbitálně třepaném inkubátoru při 37 °C a 200 rpm.

4.2.4.2 Kultivace bakterií na pevném médiu

Na připravené LB médium s agarem a selekčním antibiotikem (ampicilin, 100 µg/ml) byla nanášena bakteriální suspenze a rozetřena bakteriologickou hokejkou sterilizovanou ponořením do ethanolu a opálením nad kahanem, nebo byla pomocí sterilního párátko či pipetovací špičky přenesena část biomasy bakteriální kolonie narostlé na agarové plotně. Bakterie byly kultivovány přes noc (16–20 h) při 37 °C v miskách otočených dnem vzhůru. Agarové plotny s narostlými koloniemi byly krátkodobě uchovány při 4 °C.

4.2.4.3 Transformace bakterií teplotním šokem

Chemicky kompetentní bakterie *E. coli* XL1 Blue, skladované v glycerolovém roztoku při –80 °C, byly rozmrazeny na ledu. Do 50 µl bakteriální suspenze byly přidány 2 µl roztoku DNA (ligační směsi). Směs byla inkubována 10 min na ledu, 1–2 min při 42 °C a 2 min na ledu. Poté bylo přidáno 450 µl SOC média a bakterie byly inkubovány 1 h při 37 °C v orbitálně třepaném inkubátoru. Následně byly bakterie vysety na agarové plotny (10 µl, 50 µl, 100 µl a zbytek bakteriální suspenze) a kultivovány přes noc (16–20 h) při 37 °C.

4.2.5 Práce s DNA

4.2.5.1 Izolace plazmidové DNA soupravou GenElute™ HP Plasmid Miniprep Kit (Sigma-Aldrich)

Bakteriální kultura o objemu 1 ml byla sedimentována centrifugací 5 min při 6000 × g a 4 °C. Plazmidová DNA byla izolována soupravou GenElute™ HP Plasmid Miniprep Kit (Sigma-Aldrich) podle návodu výrobce. Všechny centrifugace probíhaly při 12 000 × g. DNA byla eluována 50 µl elučního roztoku (10 mM Tris-HCl, pH 8,5). Koncentrace a čistota DNA byla stanovena pomocí spektrofotometru NanoDrop™ 2000 (Thermo Fisher Scientific). Izolovaná DNA byla skladována při –20 °C.

4.2.5.2 Izolace plazmidové DNA soupravou NucleoBond® Xtra Midi (Macherey-Nagel)

Bakteriální kultura o objemu 50 ml byla centrifugována 15 min při 6000 × g a 4 °C. Plazmidová DNA byla izolována pomocí soupravy NucleoBond® Xtra Midi (Macherey-Nagel) podle návodu výrobce. Kroky zahrnující centrifugaci byly provedeny při 15 000 × g. Koncentrace a čistota DNA byla

určena pomocí spektrofotometru NanoDrop™ 2000 (Thermo Fisher Scientific). Izolovaná DNA byla skladována při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

4.2.5.3 Izolace genomové DNA z lidských buněk

Buňky HEK293 kultivované v 6cm misce do cca 90% konfluency byly převedeny do suspenze a sedimentovány 5 min při $300 \times g$ a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Před izolací DNA byly buněčné pelety uchovány při $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Genomová DNA byla izolována komerční soupravou NucleoSpin® Tissue (Macherey-Nagel) podle postupu uvedeného výrobcem. Izolovaná DNA ve 100 μl elučního pufru (5mM Tris-HCl, pH = 8,5) byla skladována při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Koncentrace a čistota DNA byla stanovena pomocí spektrofotometru NanoDrop™ 2000 (Thermo Fisher Scientific).

4.2.5.4 Restrikční štěpení

Při štěpení restrikční endonukleázou BpI (Thermo Fisher Scientific) byla připravena reakční směs o následujícím složení:

- 5 μg plazmidové DNA
- 4 μl (40 U) enzymu BpI
- 6 μl reakčního pufru 10 \times Buffer G (Thermo Fisher Scientific)
- H₂O do celkového objemu 60 μl .

Štěpení probíhalo 1 h při $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, výsledek štěpení byl ověřen elektroforézou v agarózovém gelu.

4.2.5.5 Hybridizace oligonukleotidů

Nasyntetizované fosforylované oligonukleotidy určené pro vnesení sgRNA sekvence DAXX do vektoru PX458 byly resuspendovány v PCR H₂O do výsledné koncentrace 100 μM . Dvojice komplementárních oligonukleotidů byla hybridizována podle protokolu vytvořeného Zhangovou laboratoří (viz 4.1.13, pozn. pod čarou 1). Byla připravena reakční směs o celkovém objemu 10 μl , jejíž složení bylo následující:

- 1 μl 100 μM roztoku oligonukleotidu č. 1
- 1 μl 100 μM roztoku oligonukleotidu č. 2
- 1 μl 10 \times pufru pro T4 DNA ligázu (Thermo Fisher Scientific)
- 7 μl H₂O

Směs byla inkubována 30 min při $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, 5 min při $95\text{ }^{\circ}\text{C}$, poté byla teplota postupně snižována na $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ rychlostí $5\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$.

4.2.5.6 Ligace

K ligaci hybridizovaných sgRNA oligonukleotidů do vektoru PX458 štěpeného enzymem BpI byla použita T4 DNA ligáza (Thermo Fisher Scientific). Byla připravena reakční směs o objemu 10 μl (Tab. 2).

Složka reakce	Množství
Plazmid PX458 štěpený enzymem BpiI	2 µl (50 ng)
200× ředěný duplex sgRNA oligonukleotidů	1 µl
Pufr pro T4 DNA ligázu (10×)	1 µl
T4 DNA ligáza	0,5 µl (2,5 U)
H ₂ O	5,5 µl

Tab. 2: Složení ligační reakce.

Paralelně byla připravena kontrolní reakce bez inzertu. Ligace probíhala 1 h při laboratorní teplotě. Ligační směs byla použita k transformaci bakterií (viz 4.2.4.3).

4.2.5.7 Agarózová elektroforéza

Pro separaci DNA na základě délky fragmentu byla použita horizontální elektroforéza v agarózovém gelu. Podle délky daného úseku DNA byl připraven 0,8% nebo 2% (w/v) agarózový gel v 0,5× TBE pufru. Směs agarózy a TBE pufru byla zahřívána v mikrovlnné troubě do úplného rozpuštění agarózy a ochlazena přibližně na 50 °C. Pro vizualizaci DNA bylo přidáno barvivo GelRed nebo Midori Green. Směs byla nalita do připravené formy s vloženým hřebenem pro vytvoření jamek. Po ztuhnutí (20–30 min) byl vyjmut hřeben, gel byl vložen do elektroforetické aparatury (Clever Scientific) a zalit 0,5× TBE puftrem. Vzorek DNA byl smíchán s nanášecím puftrem (10× Loading Buffer; Takara Bio) a nanesen do jamek gelu, pro porovnání velikosti separovaných molekul DNA byl nanesen marker (viz 4.1.15). Elektroforéza probíhala při konstantním napětí 5–6 V/cm (vzdálenost mezi elektrodami). Po ukončení elektroforézy byla DNA vizualizována pomocí UV transiluminátoru InGenius 3 (Syngene), gely byly fotodokumentovány s použitím příslušného softwaru GeneSys.

4.2.5.8 Izolace DNA z gelu

Po elektroforetické separaci DNA byla na UV-transiluminátoru z agarózového gelu vyříznuta skalpelem nebo žiletkou část obsahující požadovaný fragment DNA. V případě potřeby byla vyříznutá část gelu uchována při –20 °C do dalšího zpracování. K extrakci DNA byla použita souprava QIAquick® Gel Extraction Kit (QIAGEN) nebo NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel). Bylo postupováno podle návodu výrobce. Koncentrace a čistota izolované DNA byla zjištěna pomocí spektrofotometru NanoDrop™ 2000 (Thermo Fisher Scientific). DNA byla skladována při –20 °C.

4.2.5.9 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

K amplifikaci DNA pomocí PCR byla připravena reakční směs o celkovém objemu 50 µl. Složení reakční směsi podle použité DNA polymerázy je uvedeno v Tab. 3. V termocykleru GenePro (Bioer Technology) byla spuštěna amplifikace podle programu v Tab. 4. Produkty reakce byly ověřeny agarózovou DNA elektroforézou.

	DNA polymeráza Q5	DNA polymeráza Vent	DNA polymeráza Taq
Složka	Množství (výsledná koncentrace)		
5× Q5 [®] Reaction Buffer	10 µl	-	-
10× ThermoPol [®] Reaction Buffer	-	5 µl	-
10× Taq Buffer	-	-	5 µl
Směs dNTP (10mM)	1 µl (0,2 mM)		
„Forward“ primer (10µM)	2,5 µl (0,5 µM)	1–2,5 µl (0,2–0,5 µM)	2,5 µl (0,5 µM)
„Reverse“ primer (10µM)	2,5 µl (0,5 µM)	1–2,5 µl (0,2–0,5 µM)	2,5 µl (0,5 µM)
Templátová DNA	40–150 ng	40–150 ng	40–150 ng
Q5 [®] Hot Start High-Fidelity DNA Polymerase	0,5 µl (0,02 U/µl)	-	-
Vent [®] DNA Polymerase	-	0,5 µl (0,02 U/µl)	-
Taq DNA Polymerase	-	-	0,5 µl (0,05 U/µl)
PCR H ₂ O	do 50 µl		

Tab. 3: Složení PCR reakcí. Uvedena jsou 3 složení reakčních směsí v závislosti na použité DNA polymeráze.

Krok	DNA polymeráza Vent		DNA polymeráza Q5 / Vent / Taq		
	Teplota [°C]	Čas	Teplota [°C]	Čas	
Počáteční denaturace	95	2 min	98	30 s	
30 cyklů	Denaturace	95	15 s	98	15 s
	Nasedání primerů	52	30 s	50–60	15 s
	Elongace	72	1 min	72	30 s
Závěrečná elongace	72	5 min	72	5 min	
Chlazení	4		4		

Tab. 4: Program PCR v závislosti na použité DNA polymeráze.

4.2.5.10 Přečištění produktů PCR

Produkty PCR byly před sekvenací DNA přečištěny pomocí soupravy NucleoSpin[®] Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel) podle návodu výrobce. DNA v 15 µl elučního pufru (5mM Tris-HCl, pH = 8,5) byla skladována při -20 °C, její koncentrace a čistota byla stanovena pomocí spektrofotometru NanoDrop[™] 2000 (Thermo Fisher Scientific).

4.2.5.11 Sekvence DNA

Sangerovo sekvenování bylo provedeno v laboratoři Core facility OMICS – Genomika (BIOCEV). Dle pokynů laboratoře byly připraveny vzorky složené z 5 pmol sekvenačního primeru, 3 ng/100 bp plazmidové DNA nebo 5 ng/100 bp produktu PCR, objem byl doplněn vodou do 8 µl.

4.2.5.12 Kvantitativní PCR (qPCR)

Relativní množství mRNA nebo virových genomů bylo stanoveno metodou qPCR. S použitím KiCqStart® SYBR® Green qPCR ReadyMix™ (Sigma-Aldrich) bylo připraveno 10 µl reakční směsi, jejíž složení je uvedeno v Tab. 5. Vzorky byly nanášeny v duplikátech nebo triplikátech do 384jamkové destičky na qPCR. Jako negativní kontrola sloužila reakční směs bez přidané templátové DNA, případně také kontrola RT(-) u vzorků cDNA (viz 4.2.6.2). Destička byla zalepena fólií, centrifugována 3 min při 195 × g a laboratorní teplotě a vložena do přístroje LightCycler® 480 Instrument II (Roche). Reakce probíhala podle programu uvedeného v Tab. 6. Výsledky byly analyzovány s využitím softwaru LightCycler® 480 (Roche), množství mRNA nebo virových genomů bylo stanoveno relativní kvantifikací pomocí metody $\Delta\Delta C_t$. Grafy byly vytvořeny pomocí GraphPad Prism (verze 10.2.3).

Složka	Objem (výsledná koncentrace)
KiCqStart® SYBR® Green qPCR ReadyMix™ (2×)	5 µl
„Forward“ primer (10 µM)	0,2 µl (0,2 µM)
„Reverse“ primer (10 µM)	0,2 µl (0,2 µM)
PCR H ₂ O	3,6 µl
Templát (cDNA nebo buněčný lyzát vystavený působení proteinázy K)	1 µl

Tab. 5: Složení reakční směsi pro qPCR s použitím KiCqStart® SYBR® Green qPCR ReadyMix™ (Sigma-Aldrich).

Krok	Teplota [°C]	Čas
Preinkubace	95	10 min
Amplifikace (45 cyklů)	95	10 s
	60	20 s
	72	30 s
Stanovení křivky tání	95	5 s
	65	1 min
	97	-
Chlazení	40	10 s

Tab. 6: Reakční program qPCR.

4.2.6 Práce s RNA

4.2.6.1 Izolace RNA ze savčích buněk

Buňky v kultivační destičce byly trypsinizovány a centrifugovány 5 min při 300 × g a 4 °C. Buněčný pelet byl v případě potřeby uchován před izolací RNA při -80 °C. Celková RNA byla izolována soupravou RNeasy® Mini Kit (QIAGEN) nebo NucleoSpin® RNA (Macherey-Nagel). V obou případech bylo postupováno podle návodu výrobce. Koncentrace a čistota izolované RNA byla stanovena pomocí spektrofotometru NanoDrop™ 2000 (Thermo Fisher Scientific). RNA byla skladována při -80 °C, případně ihned použita k syntéze komplementární DNA.

4.2.6.2 Syntéza cDNA

Izolovaná RNA byla přepsána do cDNA pomocí soupravy TATAA GrandScript cDNA Synthesis Kit (TATAA Biocenter) nebo LunaScript® RT SuperMix Kit (New England Biolabs). Dle návodu výrobce byla připravena reakční směs o objemu 20 µl. Pro jednu reakci bylo použito 100–200 ng RNA. Při použití soupravy LunaScript® RT SuperMix Kit byla připravena kontrola RT(–) bez reverzní transkriptázy s použitím No-RT Control Mix (5×). Reverzní transkripce probíhala podle programu doporučeného výrobcem v termocykleru GenePro (Bioer Technology). Získaná cDNA byla uchována při –20 °C.

4.2.7 Práce s proteiny

4.2.7.1 Příprava buněčného lyzátu ze savčích buněk

Buněk byly trypsinizovány a centrifugovány 5 min při 300 × g a 4 °C. Pelet byl resuspendován v PBS a centrifugace byla opakována. Získaný pelet byl uchován při –80 °C pro pozdější zpracování, nebo ihned resuspendován v RIPA puftru, do kterého byla před použitím přidána směs inhibitorů proteáz (cOmplete™ Protease Inhibitor Cocktail; Roche). RIPA pufr byl přidán přibližně v poměru 100 µl na 10⁶ buněk. Buněčný pelet v RIPA puftru byl 15× protáhnut jehlou (průměr 0,45 mm) a ponechán 15 min na ledu. Následně byl lyzát centrifugován 10 min při 15000 × g a 4 °C, supernatant byl odebrán a skladován při –80 °C.

4.2.7.2 Denaturační proteinová elektroforéza SDS-PAGE

Pro separaci proteinů na základě molekulové hmotnosti byla použita elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti SDS (SDS-PAGE). Do sestavené aparatury pro přípravu polyakrylamidových gelů (Hoefer), jejíž utěsnění bylo ověřeno naplněním ddH₂O, byl nanesen separační gel do výšky cca 0,5 cm pod spodní okraj hřebenu. V závislosti na velikosti proteinu zájmu byl použit 8% nebo 10% separační gel (viz Tab. 7). Gel byl převrstven ddH₂O a ponechán polymerovat 30 min. Voda byla odstraněna, na separační gel byl nanesen gel zaostřovací, do kterého byl vložen hřeben pro vytvoření jamek. Po polymeraci zaostřovacího gelu (cca 20 min) byl vyjmut hřeben, gely byly vloženy do připravené elektroforetické aparatury (SE260 Mighty Small II Deluxe Mini Vertical Protein Electrophoresis Unit; Hoefer) a zality elektroforetickým pufrem pro SDS-PAGE. Jamky gelu byly vypláchnuty elektroforetickým pufrem.

Buněčné lyzáty byly smíchány s 5× koncentrovaným Laemmliho pufrem v poměru 4 : 1 a denaturovány 4 min při 100 °C. Takto připravené vzorky byly nanесeny do jamek polyakrylamidového gelu (nanášeno bylo 8–20 µl vzorku, nejčastěji 15 µl). Dále byly nanесeny 4 µl markeru molekulových hmotností (viz 4.1.15). Elektroforéza probíhala 20 min při napětí 80 V a poté cca 2 h při napětí 140 V.

Složka	Separační gel		Zaostřovací gel
	8%	10%	(5%)
ddH ₂ O	4,05 ml	3,25 ml	4,22 ml
Tris-HCl, pH = 8,8	4,5 ml	4,5 ml	-
Tris-HCl, pH = 6,8	-	-	0,75 ml
10% (w/v) SDS	120 µl	120 µl	60 µl
30% (w/v) akrylamid/bisakrylamid 29 : 1	3,2 ml	4 ml	1 ml
10% (w/v) APS	40 µl	40 µl	40 µl
TEMED	8,5 µl	8,5 µl	10 µl

Tab. 7: Složení polyakrylamidových gelů. Složky byly přidávány v uvedeném pořadí, APS a TEMED byly přidány bezprostředně před nanesením gelu mezi elektroforetická skla. SDS – dodecylsírán sodný, APS – peroxidisírán amonný, TEMED – tetramethylethylendiamin.

4.2.7.3 Western blot a imunodetekce proteinů na membráně

Proteiny byly přeneseny z polyakrylamidového gelu na nitrocelulózovou membránu metodou „semi-dry“ transfer. Po ukončení SDS-PAGE byl odříznut zaostřovací gel a separační gel byl ekvilibrován 10 min v blotovacím pufru (Towbin transfer buffer). Nitrocelulózová membrána (GE Healthcare Life Sciences) a 2 kusy extra silného filtračního papíru o tloušťce 2,5 mm (Thermo Fisher Scientific) byly namočeny v blotovacím pufru. V kazetě přístroje Trans-Blot Turbo Transfer System (Bio-Rad) byl sestaven tzv. blotovací sendvič v následujícím pořadí: filtrační papír, nitrocelulózová membrána, polyakrylamidový gel, filtrační papír. Vzniklé vzduchové bubliny byly odstraněny pomocí válečku. Přenos proteinů na membránu byl proveden pomocí přístroje Trans-Blot Turbo podle přednastaveného programu „Standard SD“ 30 min při konstantním napětí 25 V.

Po transferu proteinů byla membrána omyta 3 min v PBST na třepačce a inkubována 1 h v blokovacím roztoku. Následně byla inkubována s primární protilátkou ředěnou v blokovacím roztoku na parafilmu přes noc při 4 °C nebo 1 h při laboratorní teplotě. Membrána byla za stálého třepání třikrát promyta 10 min v PBST a 30 min inkubována se sekundární protilátkou (konjugovanou s křenovou peroxidázou, HRP) ředěnou v blokovacím roztoku. Následovalo promytí třikrát 5 min v PBST a třikrát 5 min v PBS na třepačce.

Proteiny byly detekovány prostřednictvím chemiluminiscence vzniklé při reakci katalyzované HRP. Na membránu byly nakapány chemiluminiscenční roztoky A a B (viz 4.1.6) smíchané v poměru 1 : 1 bezprostředně před vyvoláním signálu. Membrána byla inkubována 1 min chráněná před světlem, poté byla detekována chemiluminiscence pomocí přístroje Amersham™ Imager 600 RGB (GE Healthcare Life Sciences). Densitometrická analýza intenzity signálu byla provedena v programu ImageJ, grafy byly vytvořeny pomocí GraphPad Prism (verze 10.2.3).

Inaktivace HRP a opakovaná imunodetekce proteinů na membráně

Při opakovaném použití membrány pro detekci dalšího proteinu byla nejprve membrána opláchnuta v ddH₂O, poté byla inaktivována HRP inkubací membrány 15 min v 30% H₂O₂ na parafilmu při 37 °C. Membrána byla omyta 15 min v ddH₂O a 15 min v PBS za stálého třepání. Takto připravená membrána byla znovu použita pro imunologickou detekci proteinů počínaje krokem blokování.

5 Výsledky

5.1 Příprava inokula MPyV

Pro uskutečnění experimentů zahrnujících infekci buněk myším polyomavirem bylo nutné nejprve připravit virové inokulum. Při pomnožení viru a izolaci virových částic bylo postupováno podle kapitoly 4.2.3.1. Virové částice byly izolovány z buněk MEF 8–10 dní po infekci MPyV, kdy byl při sledování světelným mikroskopem již patrný výrazný cytopatický efekt, projevující se změnami buněčné morfologie a uvolňováním řetězců a shluků buněk od vrstvy adherentních buněk. Po izolaci virových částic z buněk a centrifugaci přes sacharózový polštář byl virový izolát přečištěn centrifugací v gradientu CsCl. Gradienty byly rozděleny do frakcí, které byly na základě změřeného indexu lomu zařazeny do spojených frakcí I, II a III (Tab. 8). Sloučené frakce byly dialyzovány, poté byly virové částice koncentrovány centrifugací přes sacharózový polštář. Titr získaného virového inokula byl stanoven ve frakci II a III podle postupu v kapitole 4.2.3.2. Výsledky ze tří provedených izolací jsou uvedeny v Tab. 9. Připravené inokulum bylo použito při všech následujících infekcích buněk virem MPyV v této diplomové práci.

frakce	index lomu	
	gradient 1	gradient 2
1	1,376	1,373
2	1,376	1,371
3	1,373	1,370
4	1,371	1,367
5	1,369	1,366
6	1,368	1,366
7	1,366	1,365
8	1,366	1,365
9	1,365	1,363
10	1,365	1,363
11	1,364	1,362
12	1,363	1,361
13	1,363	1,360
14	1,362	1,360
15	1,361	
16	1,359	

Tab. 8: Indexy lomu jednotlivých frakcí gradientů CsCl při izolaci MPyV. Dva gradienty jsou označeny čísly 1, 2. Na základě indexu lomu byly frakce spojeny do frakce I (žlutě), frakce II s indexem lomu odpovídajícím kompletním virionům (zeleně) a frakce III s indexem lomu odpovídajícím prázdným virionům (modře). Zobrazeny jsou hodnoty z jedné ze tří provedených izolací MPyV.

	Titr MPyV [ffu/ml]	
	frakce II	frakce III
1. izolace	$5,3 \cdot 10^7$	$1,4 \cdot 10^7$
2. izolace	$1,8 \cdot 10^8$	$2,4 \cdot 10^7$
3. izolace	$2,5 \cdot 10^7$	$2,3 \cdot 10^6$

Tab. 9: Infekční titr frakcí II a III izolovaného MPyV. Titr byl stanoven detekcí LT antigenu MPyV 24 hpi pomocí nepřímé imunofluorescence. Virové inokulum bylo připraveno celkem třikrát (1.–3. izolace).

5.2 Vliv proteinu DAXX na polyomavirovou infekci

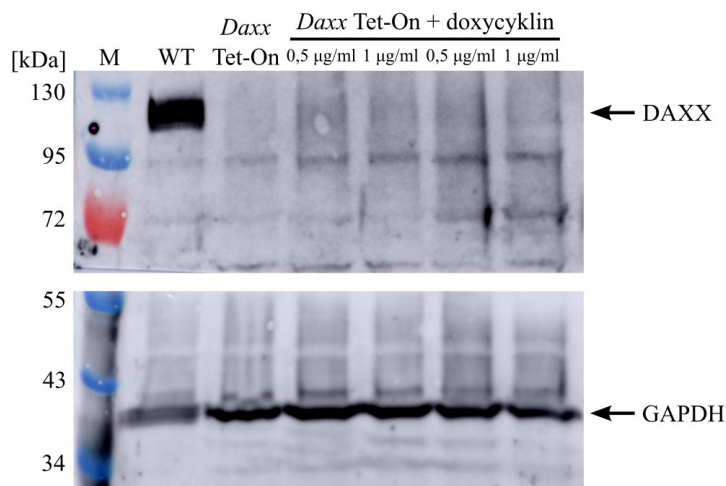
Jedno z výzkumných témat Laboratoře virologie je zaměřeno na roli PML tělísek a asociovaných chaperonů histonu H3.3 včetně proteinu DAXX na replikační cyklus polyomavirů MPyV a BKPyV. Vzhledem k lokalizaci PML-NBs v blízkosti virových replikačních center a kolokalizaci proteinu DAXX s LT antigenem je možné, že DAXX je jedním z faktorů regulujících replikaci MPyV nebo BKPyV. Cílem následující části diplomové práce je charakterizovat možný vliv proteinu DAXX na infekci MPyV.

5.2.1 Role proteinu DAXX v replikačním cyklu MPyV

Charakterizace buněčné linie MEF *Daxx* Tet-On

Pro výzkum vlivu proteinu DAXX na infekci MPyV byla použita buněčná linie MEF *Daxx* Tet-On s expresí *Daxx* indukovatelnou tetracyklinovými antibiotiky. Této vlastnosti by bylo možné využít pro porovnání průběhu infekce MPyV v buňkách produkujících DAXX po přidání antibiotika doxycyklinu a buňkách bez přidaného doxycyklinu, v nichž by měla být exprese DAXX potlačena nebo omezena pouze na minimální úroveň.

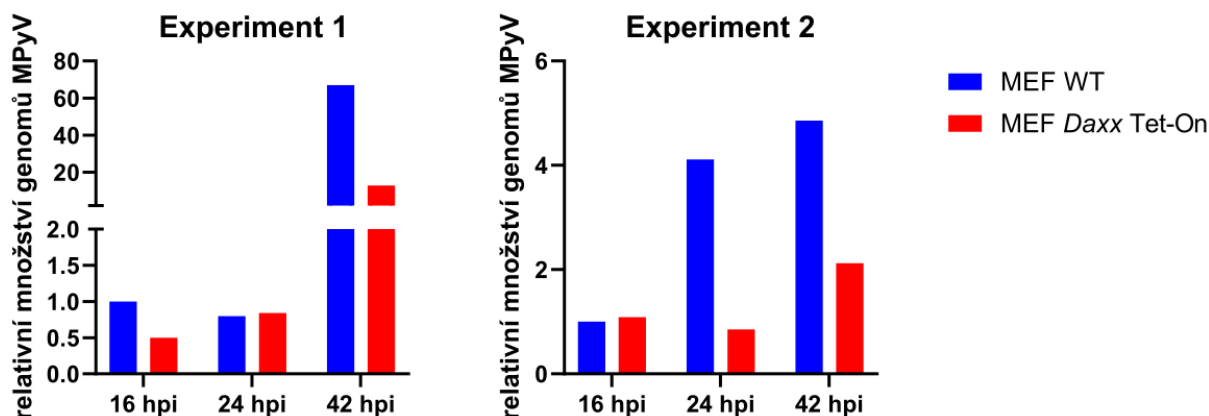
Vlastnosti buněčné linie byly testovány metodou western blot. Pro indukci exprese *Daxx* byly buňky MEF *Daxx* Tet-On po dobu 24 h vystaveny působení doxycyklinu přidaného do kultivačního média (koncentrace 0,5 $\mu\text{g/ml}$ nebo 1 $\mu\text{g/ml}$). Byly připraveny lyzáty z buněk MEF *Daxx* Tet-On s přidaným doxycyklinem nebo bez něj a z buněk MEF (označovaných dále jako wild type, MEF WT). Pomocí western blotu byl detekován protein DAXX (**Obr. 8**). Ve vzorku MEF WT byl dle očekávání detekován protein DAXX o přibližné molekulové hmotnosti 110–120 kDa. Na rozdíl od buněk MEF WT nebyl ve vzorcích MEF *Daxx* Tet-On viditelný signál DAXX, a to ani ve vzorcích s přidaným doxycyklinem. Při použitých koncentracích doxycyklinu se expresi *Daxx* nepodařilo indukovat. Potvrdilo se tedy, že buňky MEF *Daxx* Tet-On neexprimují protein DAXX v detekovatelném množství. Protože jsme však u nich nedokázali indukovat doxycyklinem protein DAXX, nemohli jsme je použít pro sledování průběhu replikačního cyklu MPyV za přítomnosti proteinu DAXX. Průběh replikačního cyklu MPyV v buňkách exprimujících DAXX byl proto analyzován v buněčné linii MEF WT.



Obr. 8: Ověření vlastností buněčné linie *Daxx* Tet-On MEF. V buněčných lyzátech MEF (WT) a MEF *Daxx* Tet-On bez přidaného doxycyklinu nebo s doxycyklinem v uvedených koncentracích byly pomocí SDS-PAGE a následného western blotu detekovány proteiny DAXX (protilátky M α DAXX H-7 a G α M-HRP) a GAPDH (kontrola množství nanášeného vzorku, protilátky Rb α GAPDH sc-25778 a G α Rb-HRP). M – marker molekulových hmotností Color Prestained Protein Standard, Broad Range (10-250 kDa) (New England Biolabs).

Vliv DAXX na replikaci virového genomu

Průběh infekce MPyV v buňkách MEF *Daxx* Tet-On a MEF WT byl porovnán kvantifikací genomů MPyV metodou qPCR. Buněčný cyklus buněk MEF *Daxx* Tet-On a MEF WT byl synchronizován inkubací v bezsérovém médiu, buňky byly následně infikovány MPyV s MOI 5. V časech 16 hpi, 24 hpi a 42 hpi byly připraveny vzorky pro kvantifikaci virové DNA (buněčné lyzáty ošetřené proteinázou K, viz 4.2.2.10). Graf na Obr. 9 (Experiment 1) ukazuje prudké zvýšení počtu kopií genomu MPyV 42 hpi, které je výraznější v buňkách MEF WT. Při opakování experimentu (Experiment 2) se postup infekce lišil, ve zkoumaném časovém úseku došlo pouze k mírnému postupnému nárůstu množství virové DNA. V obou případech byl zjištěn nižší počet virových genomů v buňkách MEF *Daxx* Tet-On oproti MEF WT. V případě experimentu 1 byl počet genomů MPyV v buňkách *Daxx* Tet-On výrazně nižší 42 hpi, v experimentu 2 se rozdíl projevil také 24 hpi, 42 hpi byl rozdíl méně výrazný. Porovnání počtu kopií genomu MPyV vyjádřené jako podíl MEF *Daxx* Tet-On / MEF WT je uvedeno v Tab. 10.



Obr. 9: Vliv proteinu DAXX na množství genomové DNA MPyV. Buňky MEF WT a MEF *Daxx* Tet-On byly infikovány MPyV (MOI 5). V časech 16 hpi, 24 hpi a 42 hpi byla provedena relativní kvantifikace virových genomů pomocí qPCR. Hodnoty byly normalizovány k počtu kopií buněčného genu pro p53 a vztaheny k MEF WT 16 hpi. Zobrazeny jsou výsledky dvou nezávislých experimentů.

MEF <i>Daxx</i> Tet-On / MEF WT		
	experiment 1	experiment 2
16 hpi	0,50	1,09
24 hpi	1,06	0,21
42 hpi	0,19	0,44

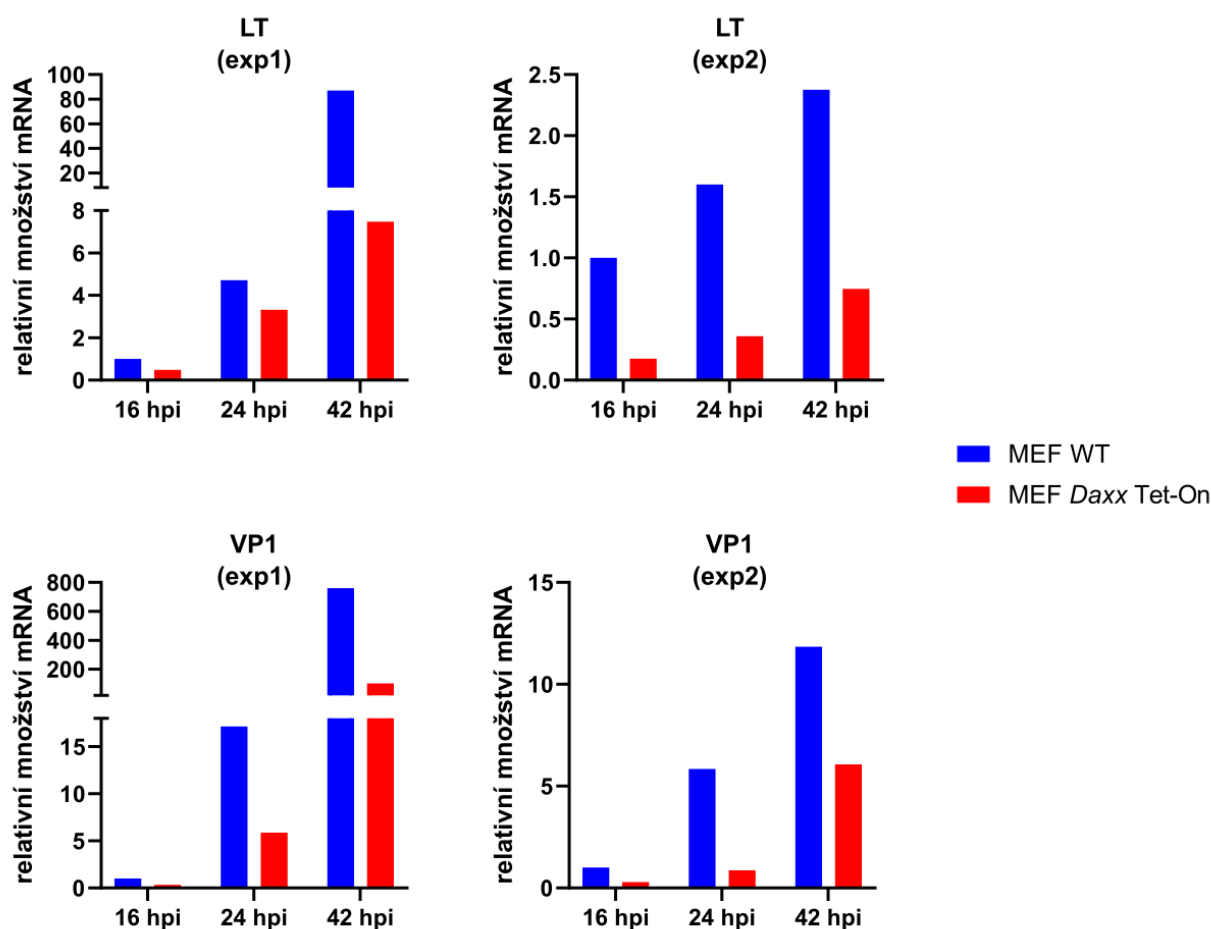
Tab. 10: Podíl relativního počtu kopií genomu MPyV v buňkách MEF *Daxx* Tet-On vůči buňkám MEF WT. Množství genomů stanovené pomocí qPCR 16, 24 a 42 hpi bylo normalizováno k počtu kopií genu pro p53.

Vliv DAXX na virovou transkripci

Dále bylo srovnáváno množství virových transkriptů v infikovaných buňkách. Vzorky byly připraveny současně se vzorky pro kvantifikaci virových genomů (viz výše). Z buněk MEF *Daxx* Tet-On a MEF WT byla 16 hpi, 24 hpi a 42 hpi izolována RNA, syntetizována cDNA a pomocí qPCR byla měřena hladina časného virového transkriptu pro LT a pozdního virového transkriptu pro VP1. Ve shodě s výsledky kvantifikace virových genomů byl výrazný nárůst virové transkripce pozorován v průběhu experimentu č. 1, v případě experimentu 2 se hladina transkriptů zvyšovala pomaleji (Obr. 10). I přes rozdílný průběh infekce výsledky obou experimentů naznačují snížení transkripce virových genů v důsledku potlačení exprese proteinu DAXX.

Hladiny mRNA pro LT i VP1 byly nižší v buňkách MEF *Daxx* Tet-On 16, 24 i 42 hpi. V experimentu 1 se tento rozdíl nejvíce projevil v expresi LT 42 hpi, kdy došlo ke značnému nárůstu množství mRNA v buňkách MEF WT, zatímco v buňkách MEF *Daxx* Tet-On byl nárůst menší.

V experimentu 2 byly hladiny obou transkriptů pro LT i VP1 také nižší v buňkách MEF *Daxx* Tet-On 16, 24 i 42 hpi. Hodnoty relativní exprese virových mRNA v buňkách *Daxx* Tet-On vztahené k hodnotám MEF WT jsou uvedeny v Tab. 11.



Obr. 10: Vliv proteinu DAXX na virovou transkripci. Buňky MEF WT a MEF *Daxx* Tet-On byly infikovány MPyV (MOI 5). V časech 16 hpi, 24 hpi a 42 hpi byla pomocí qPCR stanovena hladina časného virového transkriptu pro LT a pozdního transkriptu pro VP1, hodnoty byly normalizovány k expresi GAPDH a vztaženy k MEF WT 16 hpi. Jednotlivé grafy zobrazují výsledky dvou nezávislých experimentů (exp1 a exp2).

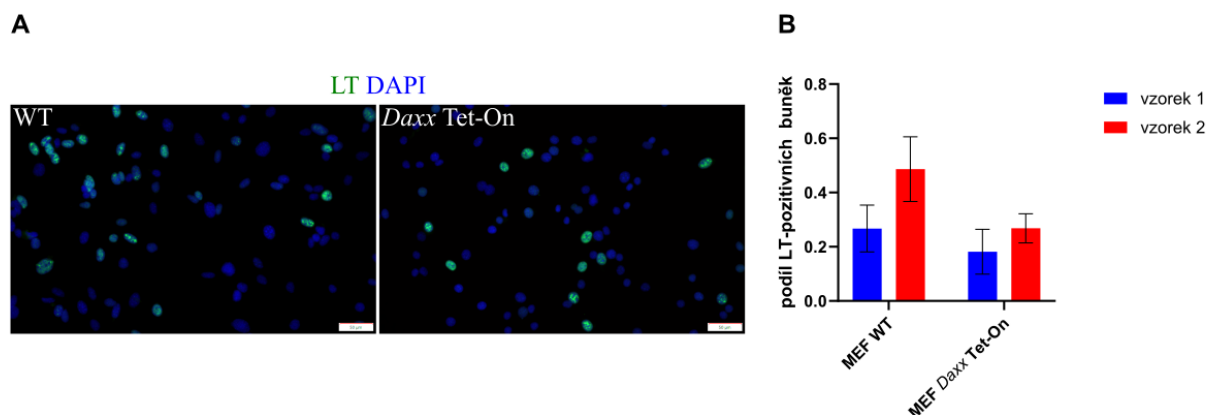
MEF <i>Daxx</i> Tet-On / MEF WT				
	LT		VP1	
	experiment 1	experiment 2	experiment 1	experiment 2
16 hpi	0,49	0,18	0,34	0,29
24 hpi	0,71	0,22	0,34	0,15
42 hpi	0,09	0,31	0,13	0,51

Tab. 11: Podíl relativního množství mRNA pro LT a VP1 MPyV v buňkách MEF *Daxx* Tet-On vůči buňkám MEF WT. Relativní exprese mRNA stanovená pomocí qPCR 16, 24 a 42 hpi byla normalizována k expresi GAPDH.

Vliv DAXX na počet infikovaných buněk

Pomocí nepřímé imunofluorescence byla zkoumána časná fáze infekce MPyV. Buňky MEF *Daxx* Tet-On a MEF WT kultivované na mikroskopických sklech byly infikovány MPyV (MOI 0,5). V čase 24 hpi byl porovnán počet infikovaných buněk pozitivních na LT antigen ve vzorcích buněk MEF *Daxx* Tet-On a MEF WT. Vzorky byly připraveny v duplikátech, LT-pozitivní buňky byly počítány vždy v 10 zorných polích mikroskopu (celkem 20 polí MEF WT a 20 polí *Daxx* Tet-On). Celkově byl

pozorován snížený počet LT-pozitivních buněk MEF *Daxx* Tet-On oproti MEF WT (Obr. 11), výsledky se však především v případě buněk MEF WT lišily v rámci duplikátu.



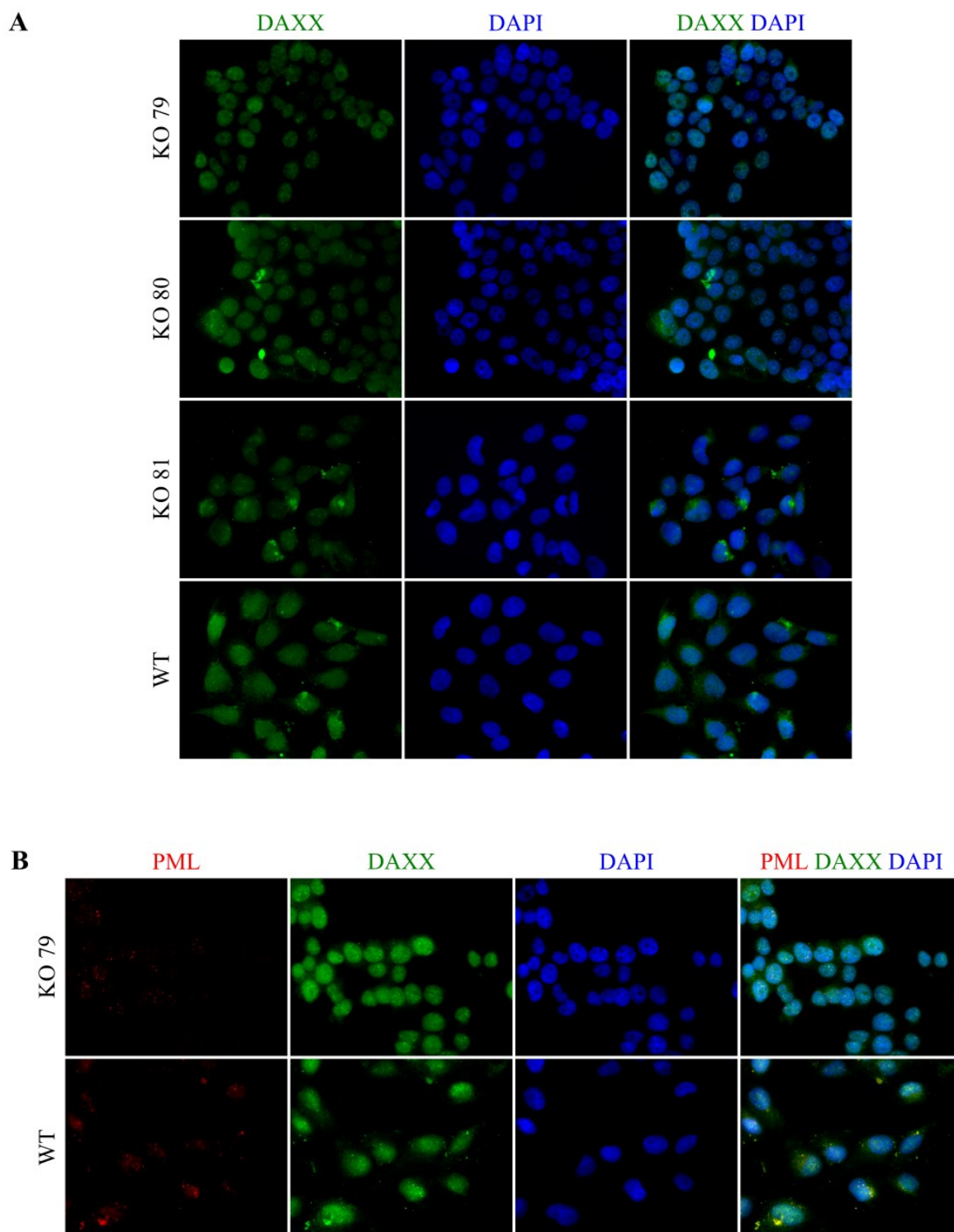
Obr. 11: Vliv proteinu DAXX na počet infikovaných buněk pozitivních na LT antigen. Buňky MEF WT a MEF *Daxx* Tet-On byly infikovány MPyV (MOI 0,5), po fixaci 24 hpi byl detekován LT antigen MPyV pomocí nepřímé imunofluorescence. (A) Reprezentativní snímky buněk MEF WT a MEF *Daxx* Tet-On. LT je značen zeleně kombinací protilátek Rt α LT (LT1) a GaRt-AF488, buněčná jádra jsou značena modře pomocí DAPI. Délka měřítka je 50 μ m. (B) Průměrný počet LT-pozitivních buněk v 10 zorných polích mikroskopu vztažený k celkovému počtu buněk \pm směrodatná odchylka. Vzorky byly připraveny v duplikátech v rámci jednoho experimentu (vzorek 1, vzorek 2). Graf byl vytvořen pomocí GraphPad Prism (verze 10.2.3).

5.2.2 Role proteinu DAXX v replikačním cyklu BKPyV

5.2.2.1 Charakterizace buněčné linie U2OS *DAXX* KO

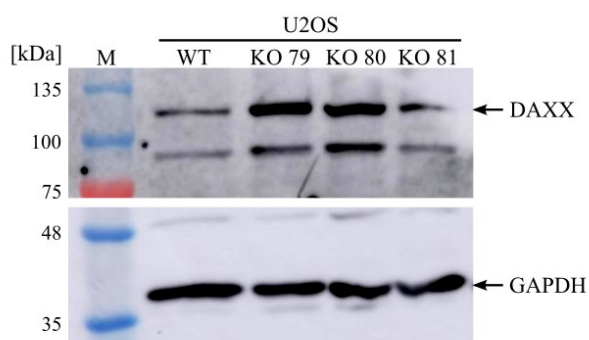
Objasnění možného významu proteinu DAXX pro infekci BKPyV by mohlo napomoci studium replikačního cyklu BKPyV v nepřítomnosti DAXX. Pro tyto účely bylo potřeba použít buňky s částečně nebo zcela potlačenou expresí *DAXX*. Byla zvolena buněčná linie U2OS *DAXX* KO (3 klony označené č. 79, 80, 81). Před zahájením experimentů bylo nutné ověřit KO fenotyp této linie, prvním krokem byla detekce DAXX metodou nepřímé imunofluorescence.

Buňky U2OS *DAXX* KO (klony 79, 80 a 81) a U2OS WT kultivované na mikroskopických sklech byly fixovány a bylo provedeno imunofluorescenční značení DAXX. Signál DAXX byl pozorován převážně v jádře a v menší míře v cytoplazmě buněk U2OS WT, ale také všech tří testovaných klonů U2OS *DAXX* KO (Obr. 12 A). Buňky U2OS WT a *DAXX* KO 79 byly značeny také kombinací protilátek proti DAXX a PML (Obr. 12 B). Protein PML byl lokalizován převážně v buněčném jádře v podobě teček odpovídajících PML tělískům. Signál DAXX a PML se z části překrýval. Z výsledků vyplývá, že protein DAXX se vyskytuje v PML-NBs, rozptýleně v jádře a v cytoplazmě buněk U2OS WT i U2OS *DAXX* KO, ve kterých by měl být dle předpokladu gen *DAXX* inaktivován.



Obr. 12: Charakterizace buněk U2OS *DAXX* KO pomocí nepřímé imunofluorescence. (A) V buňkách U2OS *DAXX* KO (3 klony: KO 79, KO 80, KO 81) a U2OS WT byl značen zeleně protein DAXX kombinací protilátek Rb α DAXX M-112 a D α Rb-AF488 (WT a KO 79) nebo G α DAXX S-20 a D α G-AF488 (KO 80, KO 81). Buněčné jádro je obarveno modře pomocí DAPI. **(B)** V buňkách U2OS *DAXX* KO 79 a U2OS WT byl spolu s DAXX (zeleně) značen červeně protein PML kombinací protilátek M α PML a G α M-Cy3. Zobrazeny jsou vybrané snímky z fluorescenčního mikroskopu BX60.

Pro ověření exprese DAXX byly buňky U2OS a U2OS *DAXX* KO 79, 80 a 81 dále testovány metodou western blot. Teoretická molekulová hmotnost proteinu DAXX je 81 kDa, pozorovaná velikost se však obvykle pohybuje v rozmezí 100–120 kDa, pravděpodobně v důsledku posttranslačních modifikací (zejména fosforylace), elektroforetická migrace může být ovlivněna také vysokým zastoupením kladně nabitých aminokyselin v neuspořádané C-terminální oblasti DAXX (Hollenbach et al., 1999; Kiriakidou et al., 1997). V buňkách U2OS byl detekován signál odpovídající molekulovým hmotnostem přibližně 95 a 120 kDa (Obr. 13). Signál o vyšší molekulové hmotnosti se shoduje s proteinem DAXX detekovaným v myších buňkách při použití stejné protilátky (viz Obr. 8). Proužek o nižší molekulové hmotnosti by mohl představovat nespecifickou vazbu protilátky, odlišnou posttranslační modifikaci DAXX, případně izoformu nebo produkt degradace. Signál o molekulové hmotnosti přibližně 120 kDa, který odpovídá proteinu DAXX, byl přítomen ve všech třech testovaných klonách U2OS *DAXX* KO v podobném, případně i zdanlivě vyšším množství než v buňkách U2OS WT. Metodou western blot tak byla potvrzena předchozí detekce proteinu DAXX imunofluorescenčním barvením. Vzhledem k tomu, že byl protein DAXX exprimován ve všech testovaných liniích, které byly označeny jako KO, nebylo možné tyto buňky použít pro výzkum vlivu DAXX na infekci BKPyV.



Obr. 13: Charakterizace buněk U2OS *DAXX* KO metodou western blot. V buněčných lyzátech U2OS WT a U2OS *DAXX* KO (3 klony: KO 79, KO 80, KO 81) byly proteiny rozděleny SDS-PAGE elektroforézou a pomocí western blotu byl detekován protein DAXX (protilátky M α DAXX H-7 a G α M-HRP) a protein GAPDH (protilátky Rb α GAPDH G9545 a G α Rb-HRP). Protein DAXX o předpokládané molekulové hmotnosti cca 120 kDa je označen šipkou. M – marker molekulových hmotností Black Protein Ladder (Central European Biosystems).

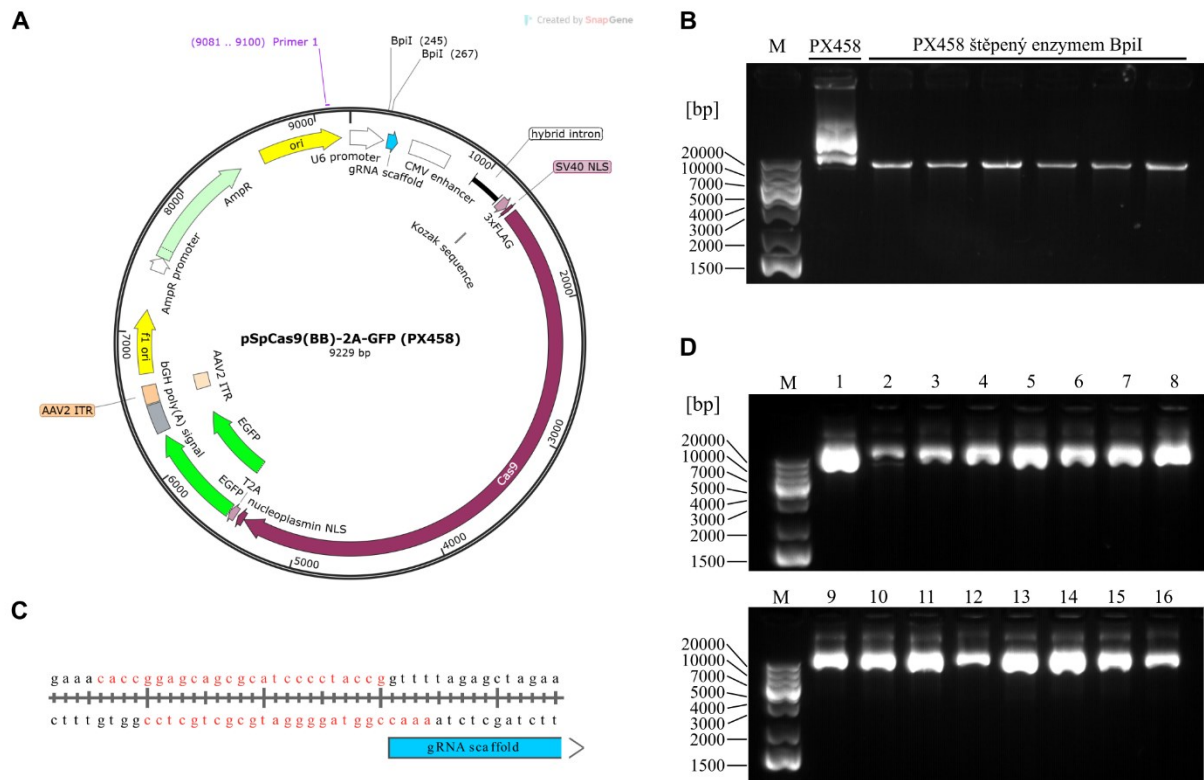
5.2.2.2 Příprava buněčné linie HEK293 *DAXX* KO

Vzhledem k tomu, že se nám nepodařilo potvrdit *DAXX* KO fenotyp u klonů linie U2OS, bylo pro studium vlivu DAXX na replikaci BKPyV potřeba vytvořit linii s inaktivovaným genem *DAXX*. Pro tento účel byla vybrána metoda genového knockoutu systémem CRISPR/Cas9 v buněčné linii HEK293.

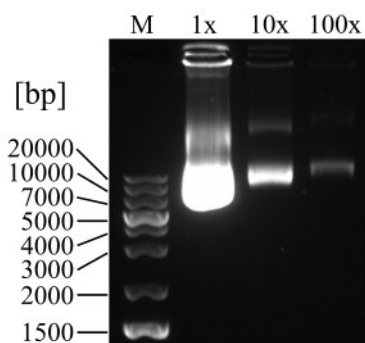
Příprava vektoru pro expresi Cas9 a sgRNA

V prvním kroku byla do plazmidu pSpCas9(BB)-2A-GFP (PX458) vložena sekvence pro expresi sgRNA cílené proti genu *DAXX*. Cílová sekvence v genu *DAXX* pro štěpení nukleázou Cas9 byla vybrána pomocí online nástroje CHOPCHOP. Na základě této sekvence byly syntetizovány oligonukleotidy, které byly klonovány do sgRNA kostry plazmidu PX458 (Obr. 14 C).

Plazmid PX458 byl štěpen restriční endonukleázou BpI, která štěpí na dvou místech za vzniku odlišných kohezivních konců, což brání recirkularizaci plazmidu. Štěpený plazmid byl nanesen na 0,8% agarózový gel a po elektroforéze izolován z gelu (Obr. 14 B). Připravené fosforylované oligonukleotidy byly hybridizovány, 200× zředěny a ligovány se štěpeným vektorem. Vzniklou ligační směsí byly transformovány kompetentní bakterie *E. coli* XL1 Blue prostřednictvím teplotního šoku. Transformované bakterie byly vysety na agarové plotny s ampicilinem a kultivovány do následujícího dne. Bylo vybráno 16 kolonií, které byly dále kultivovány a byla z nich izolována plazmidová DNA metodou minipreparace (Obr. 14 D). Pro ověření ligace byly sekvenovány plazmidy izolované z kolonií č. 8, 11 a 14. Místo nasedání sekvenačního primeru je naznačeno na Obr. 14 A. Vložení oligonukleotidů do plazmidu PX458 bylo potvrzeno ve všech třech sekvenovaných plazmidech. Pro další postup byla vybrána kolonie č. 11, která byla kultivována pro následnou izolaci plazmidu metodou midipreparace. Izolace plazmidu byla ověřena elektroforézou (Obr. 15). Tento plazmid (dále označovaný jako PX458-sgDAXX) byl použit k transfekci buněk HEK293.



Obr. 14: Klonování plazmidu pro CRISPR/Cas9 knockout DAXX. (A) Schéma vektoru PX458 s vyznačenými místy štěpení restriční endonukleázou BpI. Vyznačena je také pozice sekvenačního primeru (Primer 1). Schéma bylo vytvořeno v programu SnapGene. (B) Elektroforéza plazmidu PX458 po štěpení enzymem BpI a neštěpeného plazmidu PX458. Elektroforéza probíhala v 0,8% agarózovém gelu při 70 V. (C) Schéma spárovaných oligonukleotidů obsahujících sekvenci pro expresi DAXX sgRNA vložených do vektoru PX458 štěpeného BpI. Sekvence oligonukleotidů je vyznačena červeně. (D) Elektroforéza plazmidové DNA izolované z 16 bakteriálních kolonií transformovaných plazmidem PX458 po ligaci s duplexem sgRNA oligonukleotidů. Elektroforéza probíhala v 0,8% agarózovém gelu při 70 V. M – marker GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific)



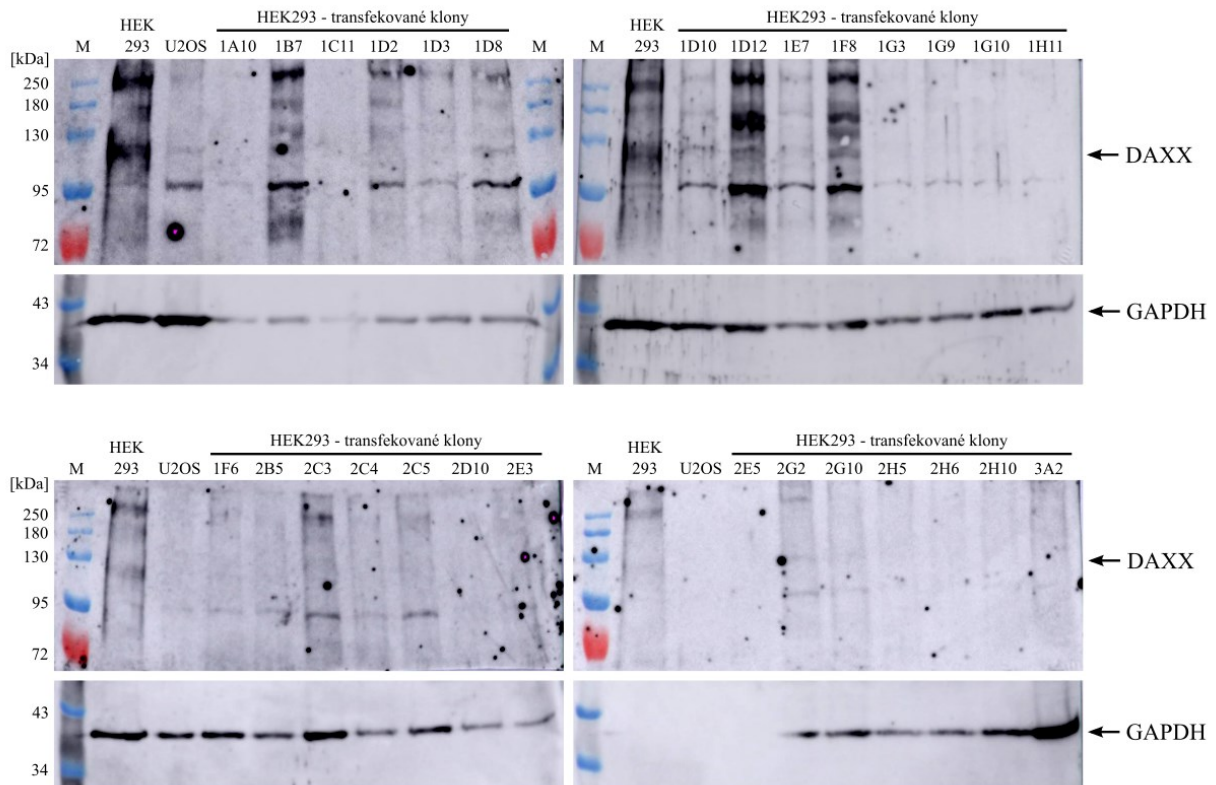
Obr. 15: Elektroforéza plazmidu PX458-sgDAXX izolovaného z bakteriální kolonie č. 11. Plazmid s vloženou sekvencí DAXX sgRNA (ověřeno sekvenací) byl izolován pomocí midipreparace, nanesen ve třech ředěních (1×, 10×, 100×) na 0,8% agarózový gel a separován při napětí 70 V. M – marker GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific)

Transfekce buněk HEK293 a selekce pomocí FACS

Připravený plazmid PX458 s vloženou sgRNA sekvencí byl transfekován do buněk HEK293 metodou nukleofekce (Amaxa). Pro transfekci bylo použito $4 \cdot 10^6$ buněk a 6 μg plazmidové DNA. Následující den byla úspěšnost transfekce ověřena pozorováním signálu GFP pod fluorescenčním mikroskopem (plazmid PX458 kóduje EGFP). Transfekované buňky byly separovány pomocí FACS (viz 4.2.2.9). Jednotlivé buňky exprimující EGFP byly tříděny do 96jamkových destiček a dále kultivovány postupně v 96jamkových destičkách, 24jamkových destičkách a 6cm miskách. Tímto způsobem byly získány potenciální *DAXX* KO buněčné klony, které byly dále testovány.

Ověření inaktivace genu DAXX

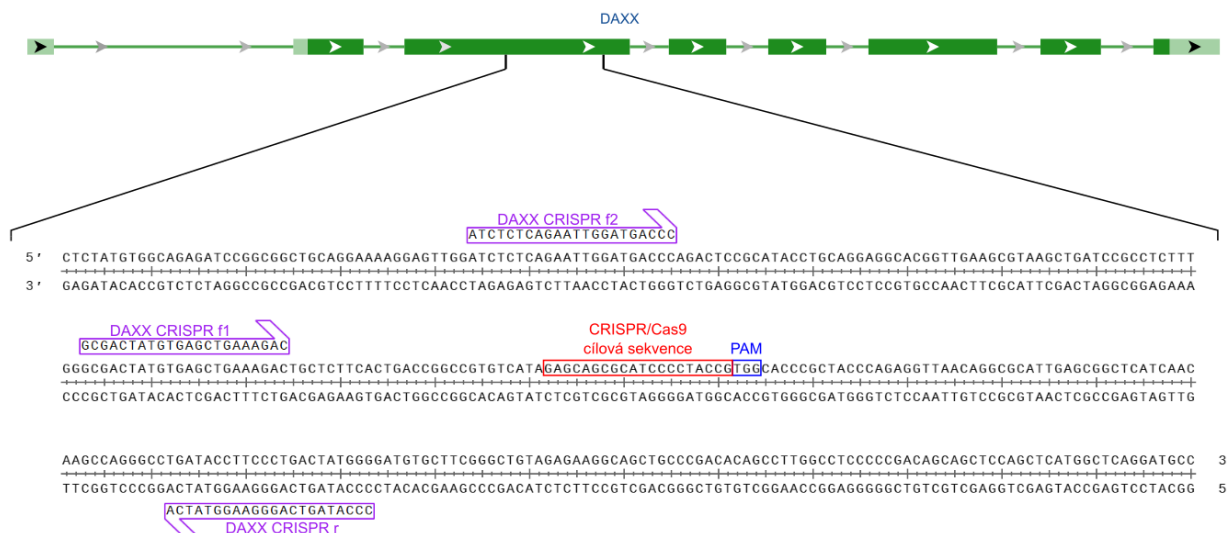
Úspěšnost modifikace systémem CRISPR/Cas9 byla testována nejprve na úrovni produkce proteinu DAXX. Z celkem 28 buněčných klonů byly připraveny lyzáty a metodou western blot byl detekován DAXX. Buňky po transfekci plazmidem PX458-sgDAXX byly porovnávány s netransfekovanými buňkami HEK293 a také s buňkami linie U2OS. Signál odpovídající obvyklé molekulové hmotnosti DAXX při detekci metodou western blot, přibližně 120 kDa, byl detekován v netransfekovaných buňkách HEK293 a v některých transfekovaných klonech (Obr. 16). Podobně jako v případě linie U2OS byl ve většině transfekovaných klonů detekován signál, patrně nespecifický, o přibližné molekulové hmotnosti 95 kDa. Identifikaci klonů se sníženým množstvím proteinu DAXX komplikovala přítomnost většího množství proužků v oblasti různých molekulových hmotností a nebylo možné jednoznačně určit, ve kterých případech se jedná o specifický signál DAXX. Problémem bylo také nízké množství vstupního materiálu v důsledku pomalého růstu transfekovaných buněk. Několik klonů s potenciálně nižším množstvím proteinu DAXX bylo vybráno pro sekvenační analýzu.



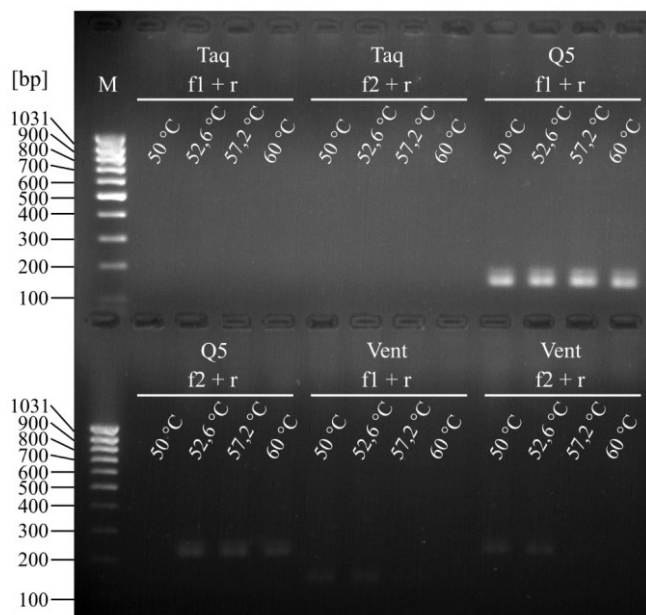
Obr. 16: Detekce proteinu DAXX v buňkách transfekovaných plazmidem PX458-sgDAXX. Pomocí western blotu byl detekován DAXX (kombinací protilátek $\text{M}\alpha\text{DAXX H-7}$ a $\text{G}\alpha\text{M-HRP}$) v jednotlivých kloněch buněk HEK293 transfekovaných plazmidem PX458-sgDAXX. Pro kontrolu byly použity netransfekované buňky HEK293 a buňky U2OS. Jako kontrola nanášky byl detekován protein GAPDH (protilátky $\text{Rb}\alpha\text{GAPDH sc-25778}$ a $\text{G}\alpha\text{Rb-HRP}$). M – marker molekulových hmotností Color Prestained Protein Standard, Broad Range (10-250 kDa) (New England Biolabs).

Inaktivace genu *DAXX* byla dále ověřována pomocí PCR a následné sekvenace. Byla izolována genomová DNA z 5 buněčných klonů (1D2, 1G3, 1G9, 1G10, 2H6) a prostřednictvím PCR byl amplifikován úsek DNA obsahující sekvenci, na kterou byl cílen systém CRISPR/Cas9.

První amplifikace s použitím DNA polymerázy Vent nebyla úspěšná, bylo tedy potřeba optimalizovat podmínky PCR. Testovány byly tři různé polymerázy, dva páry primerů lišící se délkou amplifikovaného úseku DNA (viz Obr. 17) a teploty nasedání primerů v rozmezí 50–60 °C. Templátem pro PCR byla DNA klonu 1G9. Nejlepšího výsledku bylo dosaženo při použití polymerázy Q5 a páru primerů fl + r, přičemž použité teploty nasedání primerů neměly vliv na úspěšnost amplifikace (viz Obr. 18). Ve všech případech, kdy došlo k amplifikaci, byly viditelné dva fragmenty DNA.



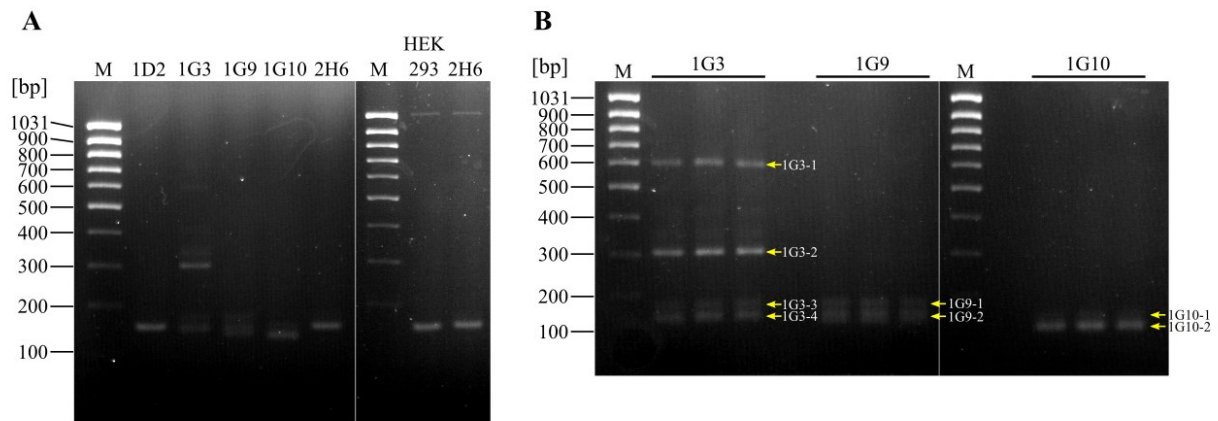
Obr. 17: Schéma sekvence genu *DAXX* s primery pro ověření modifikace systémem CRISPR/Cas9. Schematické znázornění lidského genu *DAXX* (převzato z <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/1616>) s částí sekvence třetího exonu s vyznačenou oblastí rozpoznávanou systémem CRISPR/Cas9. Červeně je označena sekvence, na kterou je cílena nukleáza Cas9, modře sekvence PAM (protospacer-adjacent motif). Označeny jsou dva „forward“ primery (DAXX CRISPR f1, f2) a jeden „reverse“ primer (DAXX CRISPR r). Kombinace primerů f1 a r ohraničuje amplifikovaný úsek o délce 151 bp, kombinace f2 a r 230 bp.



Obr. 18: Optimalizace podmínek PCR pro ověření knockoutu *DAXX*. Genomová DNA izolovaná z buněk HEK293 transfekovaných plazmidem PX458-sgDAXX (klon 1G9) byla použita jako templát pro PCR se dvěma kombinacemi primerů (f1 + r nebo f2 + r). Pro amplifikaci byla použita DNA polymeráza Q5, Vent nebo Taq. Vyznačeny jsou 4 testované teploty nasedání primerů. Produkty PCR byly separovány elektroforézou ve 2% agarózovém gelu při 80V. M – marker MassRuler™ Low Range DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific)

Pro další PCR byla zvolena polymeráza Q5, dvojice primerů DAXX CRISPR f1 a DAXX CRISPR r a teplota nasedání primerů 52 °C. Na základě provedené elektroforézy (Obr. 19 A) byly produkty PCR klonů 1D2 a 2H6 přečištěny pomocí soupravy NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up

(Macherey-Nagel) a sekvenovány. U těchto dvou klonů byl pozorován jeden produkt amplifikace o velikosti přibližně odpovídající velikosti amplifikovaného úseku DNA netransfekovaných buněk HEK293. V případě zbylých tří klonů bylo zjištěno více fragmentů DNA různé délky. Produkty PCR těchto tří klonů byly elektroforeticky rozděleny za účelem následné izolace jednotlivých fragmentů z gelu (Obr. 19 B). Připravené vzorky přečištěných PCR produktů a fragmentů izolovaných z gelu byly odeslány k sekvenování. Pro sekvenaci byl využit primer f1 (vzorky 1D2, 1G3) nebo r (vzorky 1G9, 1G10, 2H6). Ve vzorcích 1D2 a 2H6 nebyly nalezeny změny sekvence, na kterou byla cílena nukleáza Cas9, v těchto klonech tedy k modifikaci genu *DAXX* systémem CRISPR/Cas9 nedošlo. Sekvence vzorků 1G3-1 a 1G3-3 byla neúspěšná, při sekvenaci ostatních vzorků nebylo dosaženo dostatečné kvality dat pro identifikaci *DAXX* KO klonů. Pro další postup by bylo potřeba sekvenaci opakovat s kvalitnějšími vzorky DNA.



Obr. 19: Elektroforéza produktů PCR určených k sekvenční analýze. (A) DNA izolovaná z buněk HEK293 transfekovaných plazmidem PX458-sgDAXX (klony 1D2, 1G3, 1G9, 1G10, 2H6) nebo netransfekovaných buněk HEK293 byla amplifikována pomocí PCR s Q5 polymerázou a primery DAXX CRISPR f1 + r. Produkty reakce byly ověřeny elektroforézou ve 2% agarózovém gelu při 80V. **(B)** Produkty PCR klonů 1G3, 1G9 a 1G10, u nichž bylo přítomno více fragmentů DNA, byly naneseny na 2% agarózový gel, po elektroforéze byly z gelu izolovány označené fragmenty, které byly následně odeslány k sekvenaci. M – marker MassRuler™ Low Range DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific)

5.3 Interakce LT antigenu MPyV s buněčnými proteiny

Dalším směrem výzkumu Laboratoře virologie je charakterizace nových buněčných interakčních partnerů polyomavirového LT antigenu. Navázali jsme na experimenty provedené Mgr. Karolínou Štaflovou (Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, skupina Ing. Ivy Pichové, CSc.), která zjišťuje buněčné proteiny interagující s LT antigenem MPyV v myších fibroblastech. Ty jsou transfekovány plazmidem exprimujícím LT s hemaglutinovým tagem. Po imunoprecipitaci a analýze dat z hmotnostní spektrometrie byla identifikována řada proteinů, které potenciálně interagují s LT myšího polyomaviru.

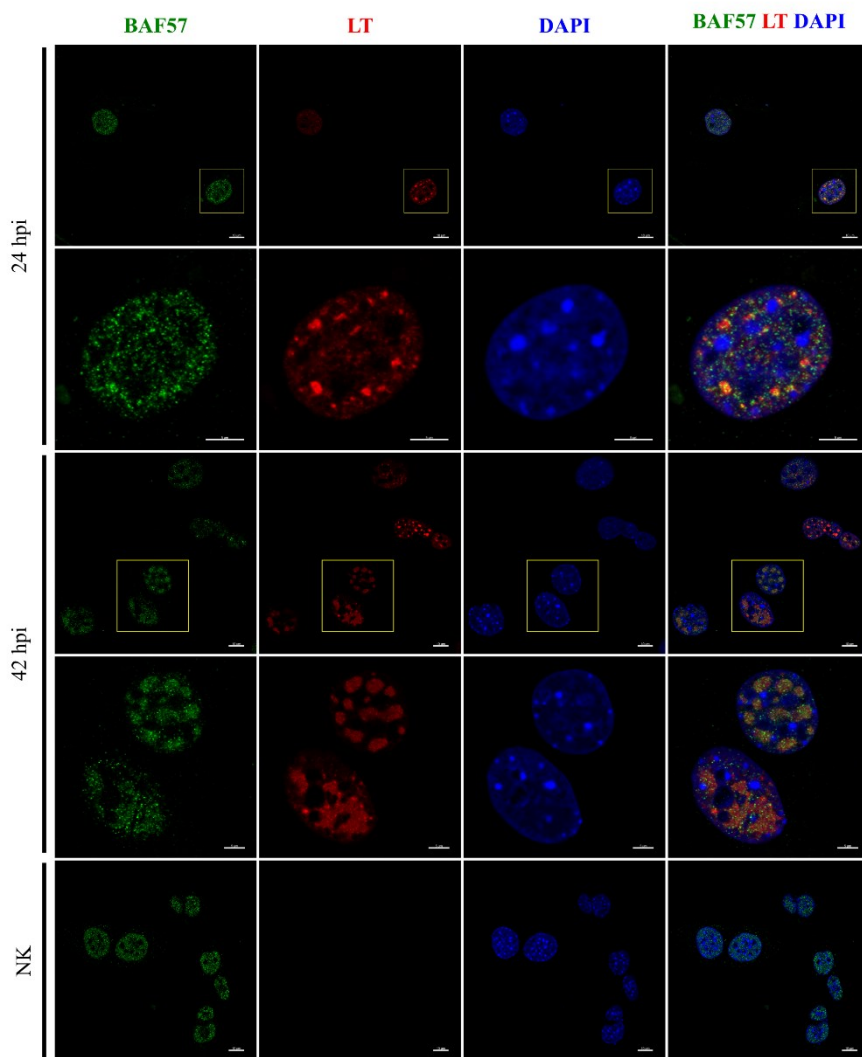
Na základě těchto pokusů bylo vybráno několik buněčných proteinů, které doposud nebyly v literatuře popsány jako interakční partneři LT MPyV, a které jsou součástí různých buněčných drah zapojených mimo jiné do imunitní odpovědi nebo oprav poškození DNA. Konkrétně se jednalo o proteiny MKK3, BAG2 (Bcl2-associated athanogene 2), PRC1 (protein regulator of cytokinesis 1), WDR48 (WD repeat-containing protein 48), BAF57 (BRG1-Associated Factor 57), NONO (non-POU domain-containing octamer-binding protein) a SMC4 (structural maintenance of chromosomes protein 4).

Pro ověření interakce s LT byly buňky MEF infikovány MPyV a v průběhu infekčního cyklu byla sledována kolokalizace LT s vybraným proteinem pomocí imunofluorescenčního barvení. Buňky MEF infikované MPyV (MOI 1) byly fixovány 24 hpi a 42 hpi. Pro kontrolu byly použity neinfikované buňky MEF fixované v čase 24 hpi. Výsledky jsou shrnuty v kapitolách 5.3.1–5.3.7.

5.3.1 Interakce LT s BAF57

Protein BAF57, známý také jako SMARCE1 (SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily e, member 1) je podjednotkou chromatin remodelačního komplexu SWI/SNF. Tento komplex za hydrolyzy ATP narušuje strukturu nukleozomů a reguluje tak vazbu transkripčních faktorů do různých oblastí genomu. BAF57 obsahuje DNA-vazebnou doménu, může také interagovat s dalšími proteiny mimo komplex SWI/SNF, regulovat remodelaci chromatinu a způsobovat aktivaci i represi transkripce (shrnuto v Lomelí & Castillo-Robles, 2016).

Protein BAF57 byl lokalizován v jádře infikovaných i neinfikovaných buněk. V infikovaných buňkách se BAF57 vyskytoval v blízkosti shluků LT antigenu 24 hpi a 42 hpi a v obou časech docházelo k překryvu signálů pro BAF57 a LT (Obr. 20).

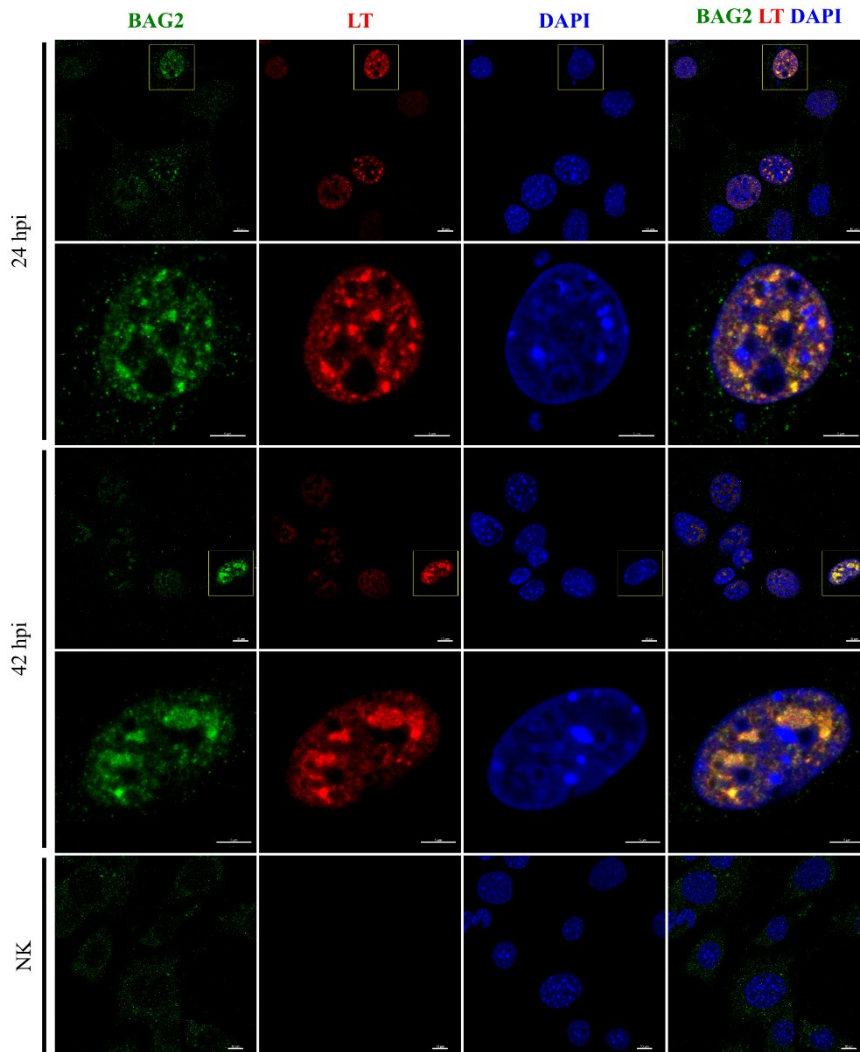


Obr. 20: Vzájemná lokalizace proteinů BAF57 a LT v buňkách infikovaných MPyV. Myší embryonální fibroblasty byly infikovány MPyV (MOI 1) a fixovány 24 hpi a 42 hpi. Neinfikované buňky (NK) byly fixovány v čase 24 hpi. Protein BAF57 byl značen zeleně kombinací primární protilátky Rb α BAF57 a sekundární protilátky D α Rb-AF488. LT byl značen červeně kombinací primární protilátky R α LT (LT1) a sekundární protilátky G α Rt-AF546. Jádru je obarveno modře pomocí DAPI. Druhý a čtvrtý řádek ukazuje výřez z prvního, resp. třetího řádku, kde je zvětšená buňka ohraničena rámečkem. Délka měřítka je 10 μ m, resp. 5 μ m v případě výřezů. Zobrazeny jsou vybrané snímky z konfokálního mikroskopu.

5.3.2 Interakce LT s BAG2

Protein BAG2 je členem rodiny proteinů BAG, které interagují s ATPázovou doménou chaperonů Hsp70 a Hsc70 a podporují výměnu ADP za ATP, čímž regulují funkci těchto chaperonů. Prostřednictvím interakce s dalšími proteiny také mohou regulovat řadu buněčných procesů včetně signalizace vyvolané buněčným stresem, apoptózy, dělení a diferenciaci buněk (shrnutí v Qin et al., 2016). Protein BAG2 byl popsán jako interakční partner LT antigenu MCPyV a ST antigenu virů MCPyV a BKPyV, biologická signifikance těchto interakcí však zůstává neznámá (shrnutí v Moens & Macdonald, 2019). BAG2 je také nezbytný pro uvolnění viru SV40 z endoplazmatického retikula do cytosolu, při tomto procesu se uplatňuje interakce BAG2 s chaperonem Hsc70 (Dupzyk & Tsai, 2018).

V neinfikovaných buňkách byl pozorován slabý signál BAG2 v cytoplasmě. V infikovaných buňkách byl 24 hpi a 42 hpi kromě cytoplazmatické lokalizace pozorován v buněčném jádře signál BAG2 o výrazně vyšší intenzitě. V obou sledovaných časech po infekci se jaderný výskyt BAG2 téměř zcela překrýval se signálem LT antigenu MPyV (Obr. 21).



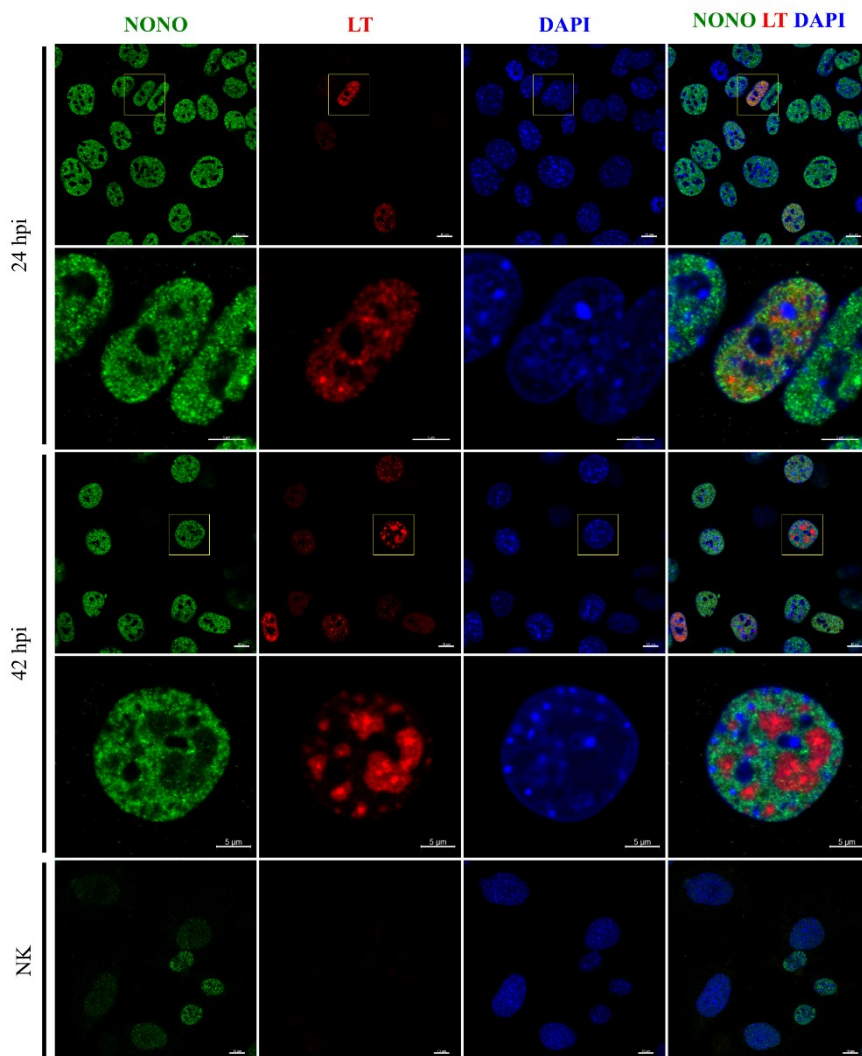
Obr. 21: Vzájemná lokalizace proteinů BAG2 a LT v buňkách infikovaných MPyV. Myší embryonální fibroblasty byly infikovány MPyV (MOI 1) a fixovány 24 hpi a 42 hpi. Neinfikované buňky (NK) byly fixovány v čase 24 hpi. Protein BAG2 byl značen zeleně kombinací primární protilátky M α BAG2 a sekundární protilátky G α M-AF488. LT byl značen červeně kombinací primární protilátky R α LT (LT1) a sekundární protilátky G α Rt-AF546. Jádro je obarveno modře pomocí DAPI. Druhý a čtvrtý řádek ukazuje výřez z prvního, resp. třetího řádku, kde je zvětšená buňka ohraničena rámečkem. Délka měřítka je 10 μ m, resp. 5 μ m v případě výřezů. Zobrazeny jsou vybrané snímky z konfokálního mikroskopu.

5.3.3 Interakce LT s NONO

NONO, alternativním názvem p54/nrb (54 kDa nuclear RNA- and DNA-binding protein) je jaderný protein s rozmanitými funkcemi spojenými s jeho schopností vázat DNA a RNA. Účastní se mimo jiné regulace genové exprese a oprav poškození DNA (shrnuto v Ronchetti et al., 2024). NONO se také může podílet na obraně proti virové infekci. Byla popsána jeho vazba na kapsidu HIV (lidského viru imunitní nedostatečnosti) v buněčném jádře, tato vazba podporuje asociaci DNA senzoru cGAS

s virovou DNA a následnou aktivaci vrozené imunitní reakce zprostředkované IFN typu I a III (Lahaye et al., 2018).

Protein NONO byl detekován v jádře infikovaných i neinfikovaných buněk. V infikovaných buňkách nebyla pozorována kolokalizace NONO s LT 24 hpi ani 42 hpi (Obr. 22). V některých pozorovaných buňkách se překryv signálu NONO a LT jevil téměř nulový, proteiny NONO a LT se vyskytovaly každý v jiné oblasti buněčného jádra.



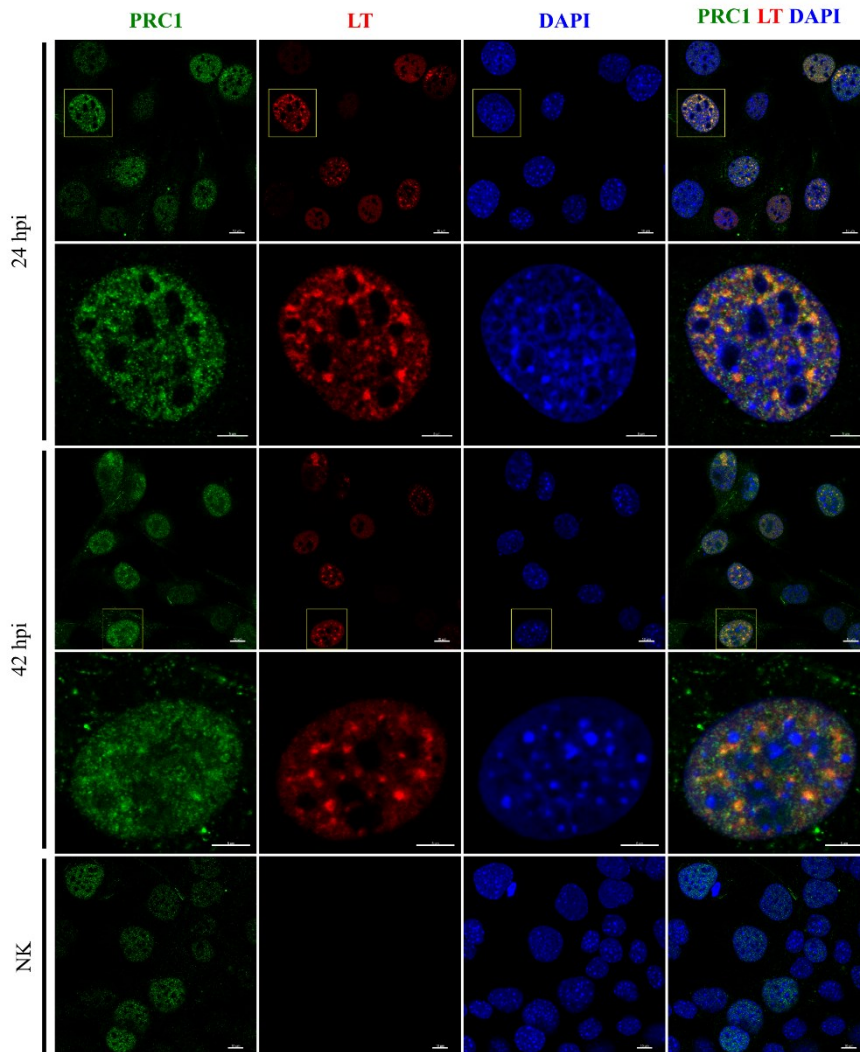
Obr. 22: Vzájemná lokalizace proteinů NONO a LT v buňkách infikovaných MPyV. Myší embryonální fibroblasty byly infikovány MPyV (MOI 1) a fixovány 24 hpi a 42 hpi. Neinfikované buňky (NK) byly fixovány v čase 24 hpi. Protein NONO byl značen zeleně kombinací primární protilátky M α NONO a sekundární protilátky D α M-AF488. LT byl značen červeně kombinací primární protilátky R α LT (LT1) a sekundární protilátky G α Rt-AF546. Jádro je obarveno modře pomocí DAPI. Druhý a čtvrtý řádek ukazuje výřez z prvního, resp. třetího řádku, kde je zvětšená buňka ohraničena rámečkem. Délka měřítka je 10 μ m, resp. 5 μ m v případě výřezů. Zobrazeny jsou vybrané snímky z konfokálního mikroskopu.

5.3.4 Interakce LT s PRC1

PRC1 hraje klíčovou roli v cytokinezi. Během interfáze je lokalizován v buněčném jádře, v průběhu mitózy je asociován s dělicím vřeténkem, interaguje s mikrotubuly a reguluje průběh cytokineze. Jeho funkce je negativně regulována fosforylací cyklin-dependentní kinázou 1 (shrnutí

v J. Li et al., 2018). Hladina proteinu PRC1 je zvýšena v buňkách infikovaných BKPyV, význam PRC1 pro polyomavirovou infekci však nebyl popsán (Justice et al., 2015).

V infikovaných i neinfikovaných buňkách vykazoval PRC1 převážně jadernou lokalizaci, v menší míře se vyskytoval také v cytoplazmě (Obr. 23). Intenzita jaderného signálu byla zpravidla vyšší v infikovaných buňkách. V čase 24 i 42 hpi se signál PRC1 a LT částečně překrýval, což poukazuje na kolokalizaci těchto dvou proteinů při infekci.



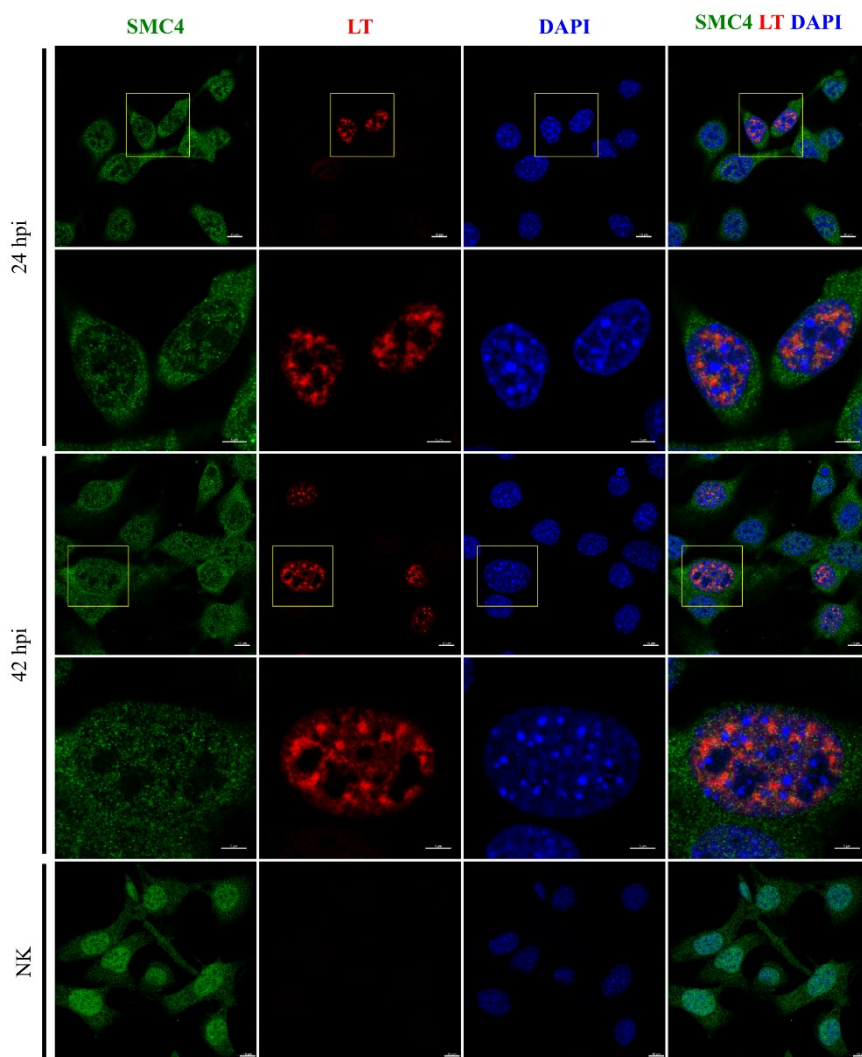
Obr. 23: Vzájemná lokalizace proteinů PRC1 a LT v buňkách infikovaných MPyV. Myší embryonální fibroblasty byly infikovány MPyV (MOI 1) a fixovány 24 hpi a 42 hpi. Neinfikované buňky (NK) byly fixovány v čase 24 hpi. Protein PRC1 byl značen zeleně kombinací primární protilátky M α PRC1 a sekundární protilátky G α M-AF488. LT byl značen červeně kombinací primární protilátky R α LT (LT1) a sekundární protilátky G α Rt-AF546. Jádru je obarveno modře pomocí DAPI. Druhý a čtvrtý řádek ukazuje výřez z prvního, resp. třetího řádku, kde je zvětšená buňka ohraničena rámečkem. Délka měřítka je 10 μ m, resp. 5 μ m v případě výřezů. Zobrazeny jsou vybrané snímky z konfokálního mikroskopu.

5.3.5 Interakce LT s SMC4

SMC4 tvoří heterodimer s proteinem SMC2 a je součástí kondenzinového komplexu. Podílí se na regulaci kondenzace chromatinu, transkripcce, replikace a oprav DNA. Obsahuje ATPázovou doménu, která je důležitá pro funkci SMC4 v kondenzaci a segregaci chromozomů (shrnutí v Z. Zhao et al.,

2023). Kromě klíčové funkce v kondenzaci chromozomů se SMC4 účastní také indukce vrozené imunity při virové infekci, podporuje produkci prozánětlivých cytokinů a IFN- β prostřednictvím aktivace signálních drah NF- κ B a IRF3 (Q. Wang et al., 2018). Množství proteinu SMC4 je zvýšeno při infekci BKPyV, případná funkce během infekce však není známa (Justice et al., 2015).

V neinfikovaných i infikovaných buňkách byl protein SMC4 lokalizován v cytoplazmě a v jádře (Obr. 24). V neinfikovaných buňkách byl detekován intenzivnější jaderný signál SMC4. Nebyla pozorována kolokalizace SMC4 s LT antigenem 24 hpi ani 42 hpi.



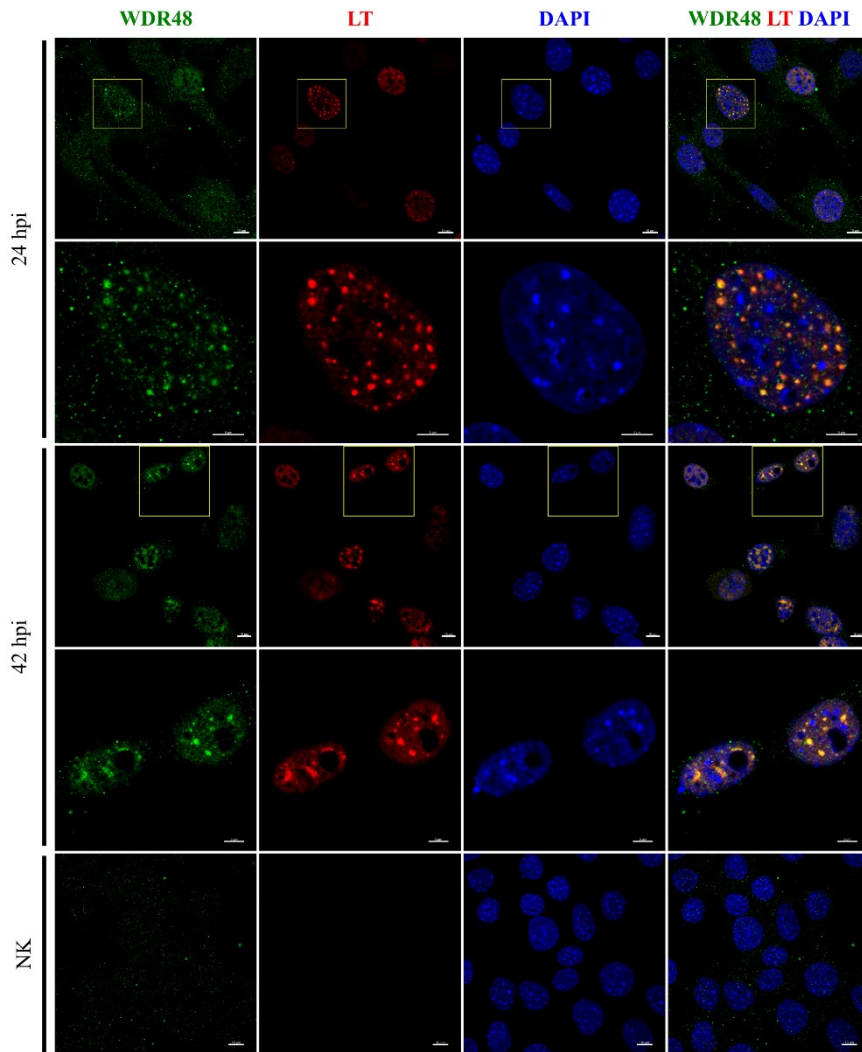
Obr. 24: Vzájemná lokalizace proteinů SMC4 a LT v buňkách infikovaných MPyV. Myší embryonální fibroblasty byly infikovány MPyV (MOI 1) a fixovány 24 hpi a 42 hpi. Neinfikované buňky (NK) byly fixovány v čase 24 hpi. Protein SMC4 byl značen zeleně kombinací primární protilátky Rb α SMC4 a sekundární protilátky D α Rb-AF488. LT byl značen červeně kombinací primární protilátky Rt α LT (LT1) a sekundární protilátky G α Rt-AF546. Jádro je obarveno modře pomocí DAPI. Druhý a čtvrtý řádek ukazuje výřez z prvního, resp. třetího řádku, kde je zvětšená buňka ohraničena rámečkem. Délka měřítka je 10 μ m, resp. 5 μ m v případě výřezů. Zobrazeny jsou vybrané snímky z konfokálního mikroskopu.

5.3.6 Interakce LT s WDR48

Protein WDR48 je známý také pod názvy UAF-1 (USP1-associated factor 1) a p80. Byl objeven jako interakční partner proteinu Tip (tyrosine kinase-interacting protein) viru HVS (herpesvirus saimiri)

infikujícího primáty, interakce vedla k formování lyzozomálních váčků. V této studii byla také popsána buněčná lokalizace WDR48 převážně v pozdních endozomech a lyzozomech (Park et al., 2002). Protein WDR48 se v komplexu s enzymem USP1 podílí na deubikvitinaci proteinů a účastní se např. oprav DNA homologní rekombinací. Pro tuto funkci je důležitá také schopnost WDR48 vázat DNA (Liang et al., 2020). Byla popsána interakce WDR48 s helikázou E1 viru HPV11. E1 způsobuje relokizaci WDR48 do jádra, interakce E1 s WDR48 se pravděpodobně podílí na udržování virového episomu v nediferencovaných keratinocytech (Côté-Martin et al., 2008). WDR48 se také účastní imunitní reakce při virové infekci. V podobě deubikvitinázového komplexu s USP1 stabilizuje kinázu TBK1 (TANK-binding kinase 1) a podporuje tak antivirovou signalizaci vyvolanou prostřednictvím receptorů TLR3/4, RIG-I (retinoic acid-inducible gene 1) a DNA senzoru cGAS (Yu et al., 2017).

V neinfikovaných buňkách byl pozorován signál WDR48 o nízké intenzitě v cytoplazmě, pravděpodobně odpovídající lokalizaci v intracelulárních váčcích (Obr. 25). V infikovaných buňkách byl WDR48 detekován převážně v jádře, kde kolokalizoval s LT 24 hpi i 42 hpi. Zároveň se WDR48 vyskytoval 24 hpi také ve váčcích v cytoplazmě, 42 hpi bylo pozorováno zvýšené zastoupení WDR48 v buněčném jádře, v některých případech spojené se sníženým výskytem WDR48 ve váčcích. Toto pozorování naznačuje možnou redistribuci WDR48 do jádra v průběhu infekce MPyV.



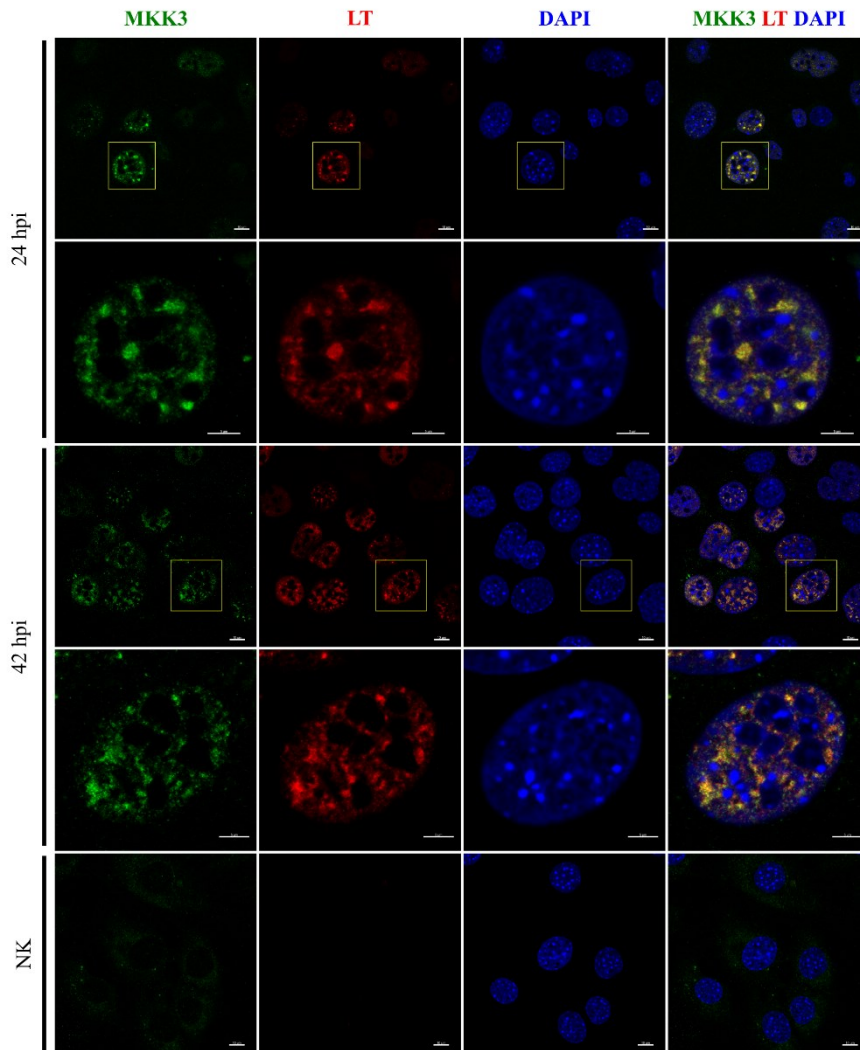
Obr. 25: Vzájemná lokalizace proteinů WDR48 a LT v buňkách infikovaných MPyV. Myší embryonální fibroblasty byly infikovány MPyV (MOI 1) a fixovány 24 hpi a 42 hpi. Neinfikované buňky (NK) byly fixovány v čase 24 hpi. Protein WDR48 byl značen zeleně kombinací primární protilátky M α WDR48 a sekundární protilátky G α M-AF488. LT byl značen červeně kombinací primární protilátky R α LT (LT1) a sekundární protilátky G α Rt-AF546. Jádru je obarveno modře pomocí DAPI. Druhý a čtvrtý řádek ukazuje výřez z prvního, resp. třetího řádku, kde je zvětšená buňka ohraničena rámečkem. Délka měřítka je 10 μ m, resp. 5 μ m v případě výřezů. Zobrazeny jsou vybrané snímky z konfokálního mikroskopu.

5.3.7 Interakce LT s MKK3

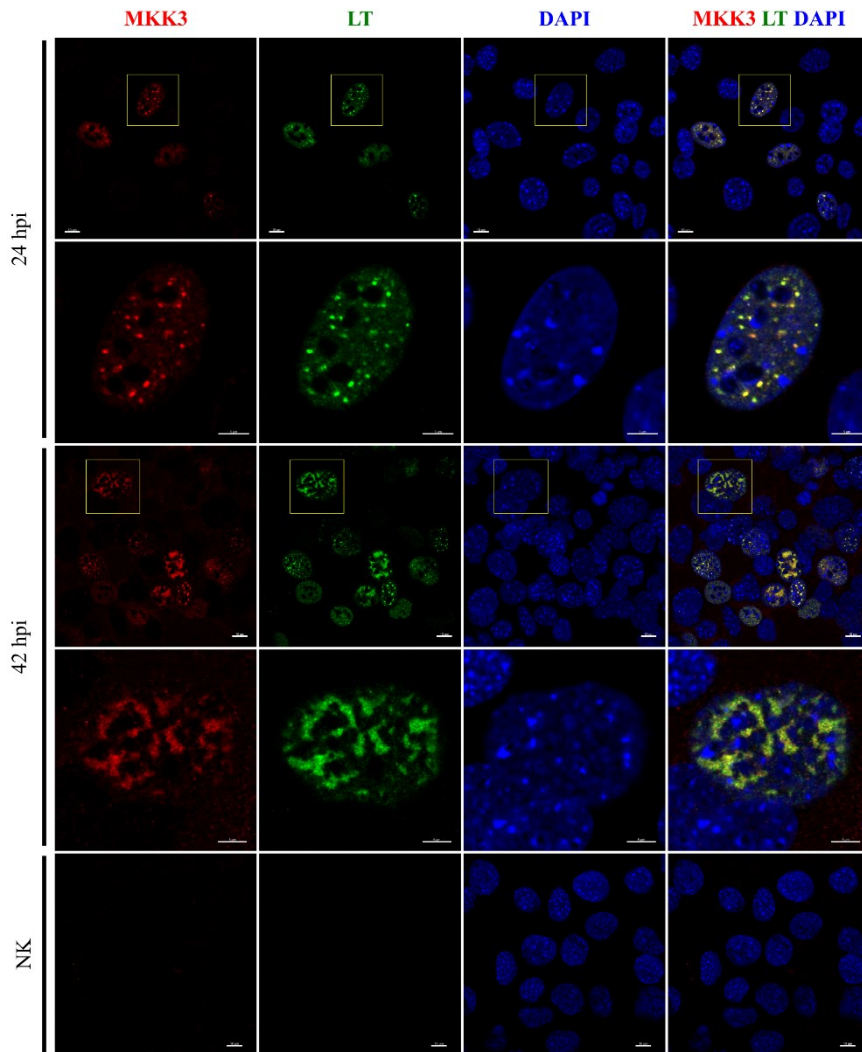
Kináza MKK3 je součástí MAP kinázové signální kaskády p38, její role spočívá ve fosforylaci p38 na aminokyselinových zbytcích Thr180 a Tyr182. Aktivace dráhy MKK3/p38 může mít různý dopad na průběh virové infekce (viz kapitola 2.2).

Zatímco v neinfikovaných buňkách byl pozorován pouze slabý signál MKK3 v cytoplazmě, v čase 24 hpi se kináza MKK3 objevila v jádře (Obr. 26). Téměř dokonalý překryv signálů pro LT a MKK3 ukazuje na vzájemnou kolokalizaci. Stejný obraz byl i v čase 42 hpi. Pro barvení v čase 24 a 42 hpi byl použit i fixační protokol buněk s preextrakcí, který umožňuje snížit množství solubilních proteinů, které by mohly interferovat s detekcí signálu a používá se např. pro barvení proteinů vázaných

na chromatin. I v tomto případě byla pozorována kolokalizace LT a MKK3 24 hpi a 42 hpi. V neinfikovaných buňkách nebyla MKK3 viditelná (Obr. 27).



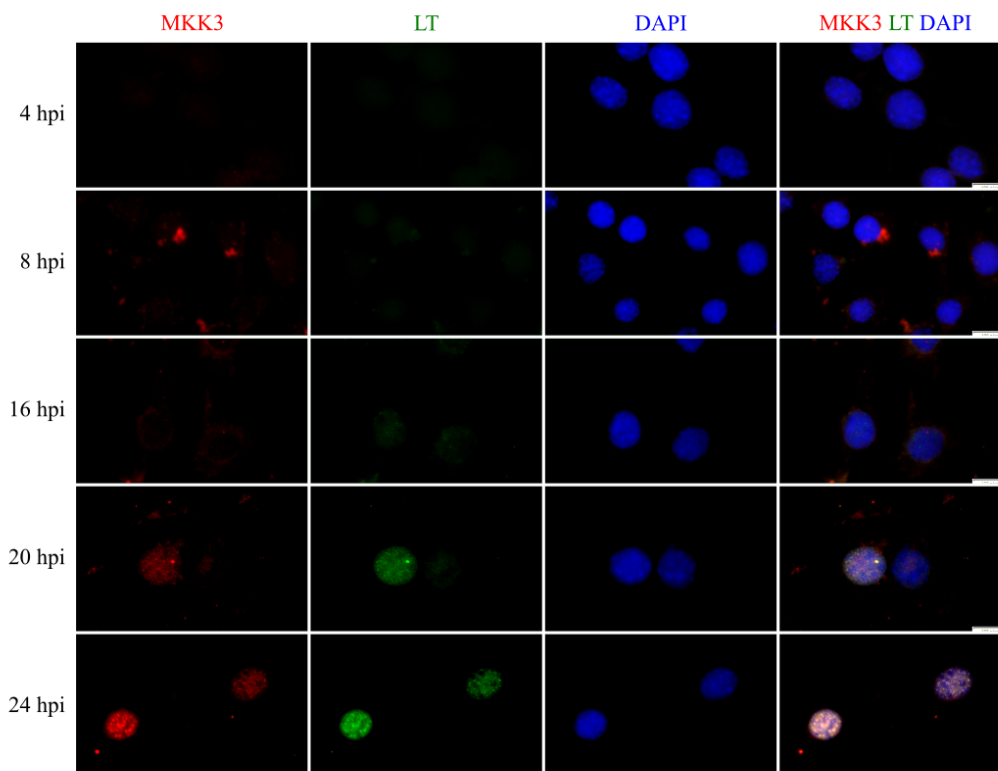
Obr. 26: Kolokalizace proteinů LT a MKK3 v buňkách infikovaných MPyV. Myší embryonální fibroblasty byly infikovány MPyV (MOI 1) a fixovány 24 hpi a 42 hpi. Neinfikované buňky (NK) byly fixovány v čase 24 hpi. Protein MKK3 byl značen zeleně kombinací primární protilátky $M\alpha$ MKK3 a sekundární protilátky $G\alpha$ M-AF488. LT byl značen červeně kombinací primární protilátky $R\alpha$ LT (LT1) a sekundární protilátky $G\alpha$ Rt-AF546. Jádru je obarveno modře pomocí DAPI. Druhý a čtvrtý řádek ukazuje výřez z prvního, resp. třetího řádku, kde je zvětšená buňka ohraničena rámečkem. Délka měřítka je 10 μ m, resp. 5 μ m v případě výřezů. Zobrazeny jsou vybrané snímky z konfokálního mikroskopu.



Obr. 27: Kolokalizace proteinů LT a MKK3 v buňkách infikovaných MPyV a fixovaných se zahrnutím kroku preextrakce. Myši embryonální fibroblasty byly infikovány MPyV (MOI 1) nebo nebyly infikovány (NK). V čase 24 hpi a 42 hpi byla provedena fixace buněk s preextrakcí. Protein MKK3 byl značen červeně kombinací primární protilátky $M\alpha$ MKK3 a sekundární protilátky $G\alpha$ M-Cy3. LT byl značen zeleně kombinací primární protilátky $Rt\alpha$ LT (LT1) a sekundární protilátky $G\alpha$ Rt-AF488. Jádru je obarveno modře pomocí DAPI. Druhý a čtvrtý řádek ukazuje výřez z prvního, resp. třetího řádku, kde je zvětšená buňka ohraničena rámečkem. Délka měřítka je 10 μ m, resp. 5 μ m v případě výřezů. Zobrazeny jsou vybrané snímky z konfokálního mikroskopu.

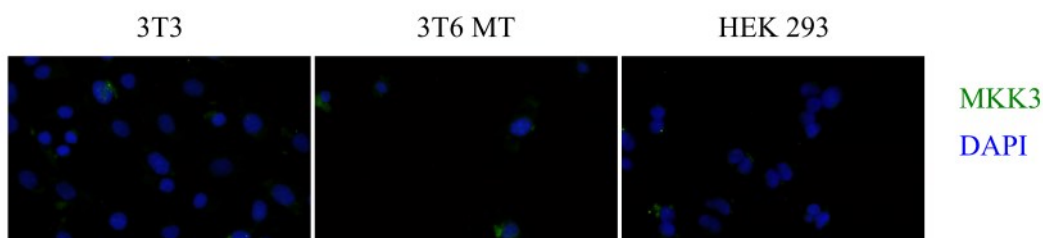
Z buněčných proteinů, u kterých jsme pozorovali kolokalizaci s LT byla kináza MKK3 vybrána pro další experimenty. Jejich cílem bylo přiblížit roli MKK3 v infekčním cyklu MPyV.

Pro detailnější dynamiku byla znovu sledována lokalizace LT a MKK3 se zahrnutím dřívějších časů po infekci – 4, 8, 16, 20 a 24 hpi. V buňkách MEF infikovaných MPyV a fixovaných s preextrakcí byly imunofluorescenčně značeny proteiny MKK3 a LT. V časech 4–16 hpi nebyl detekován LT ani MKK3. V časech 20 hpi a 24 hpi signál LT a MKK3 kolokalizoval v jádře (Obr. 28).



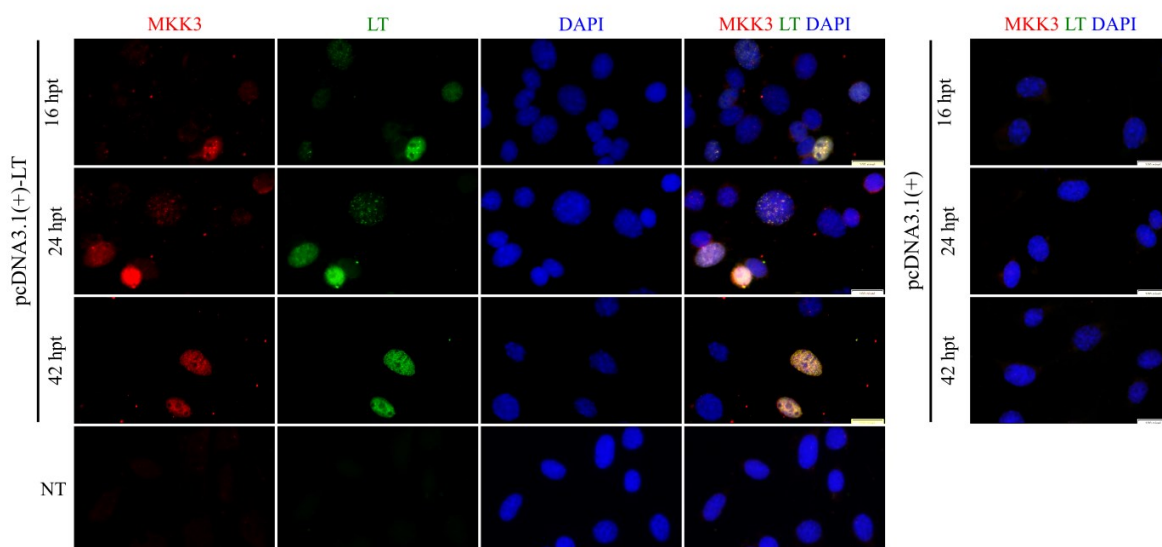
Obr. 28: Kolokalizace proteinů LT a MKK3 v buňkách infikovaných MPyV. Myší embryonální fibroblasty infikované MPyV byly fixovány 4, 8, 16, 20 a 24 hpi s preextrakcí. Kináza MKK3 byla značena červeně kombinací primární protilátky $M\alpha$ MKK3 a sekundární protilátky $G\alpha$ M-Cy3. LT byl značen zeleně kombinací primární protilátky $Rt\alpha$ LT (LT1) a sekundární protilátky $G\alpha$ Rt-AF488. Jádro je obarveno modře pomocí DAPI.

Jak vyplývá z uvedených pozorování, kináza MKK3 se při imunofluorescenčním značení v buňkách MEF objevovala v jádře pouze při infekci MPyV, zatímco v neinfikovaných buňkách signál MKK3 nebyl detekován, případně byl velmi slabý. Pro případ, že by tento efekt byl specifický pro linii MEF, bylo provedeno imunofluorescenční barvení MKK3 také v neinfikovaných buňkách dalších buněčných linií. Buňky MEF byly porovnány s lidskou buněčnou linií HEK293 a myšími fibroblasty 3T3 a 3T6MT (buňky 3T6 exprimující MT antigen MPyV). Podobně jako v případě buněk MEF nebyl protein MKK3 viditelný v neinfikovaných buňkách žádné z testovaných buněčných linií (Obr. 29).



Obr. 29: Detekce MKK3 v buňkách 3T3, 3T6MT a HEK293. V neinfikovaných buňkách uvedených linií byla značena kináza MKK3 kombinací primární protilátky $M\alpha$ MKK3 a sekundární protilátky $G\alpha$ M-AF488. Jádra jsou značena modře pomocí DAPI.

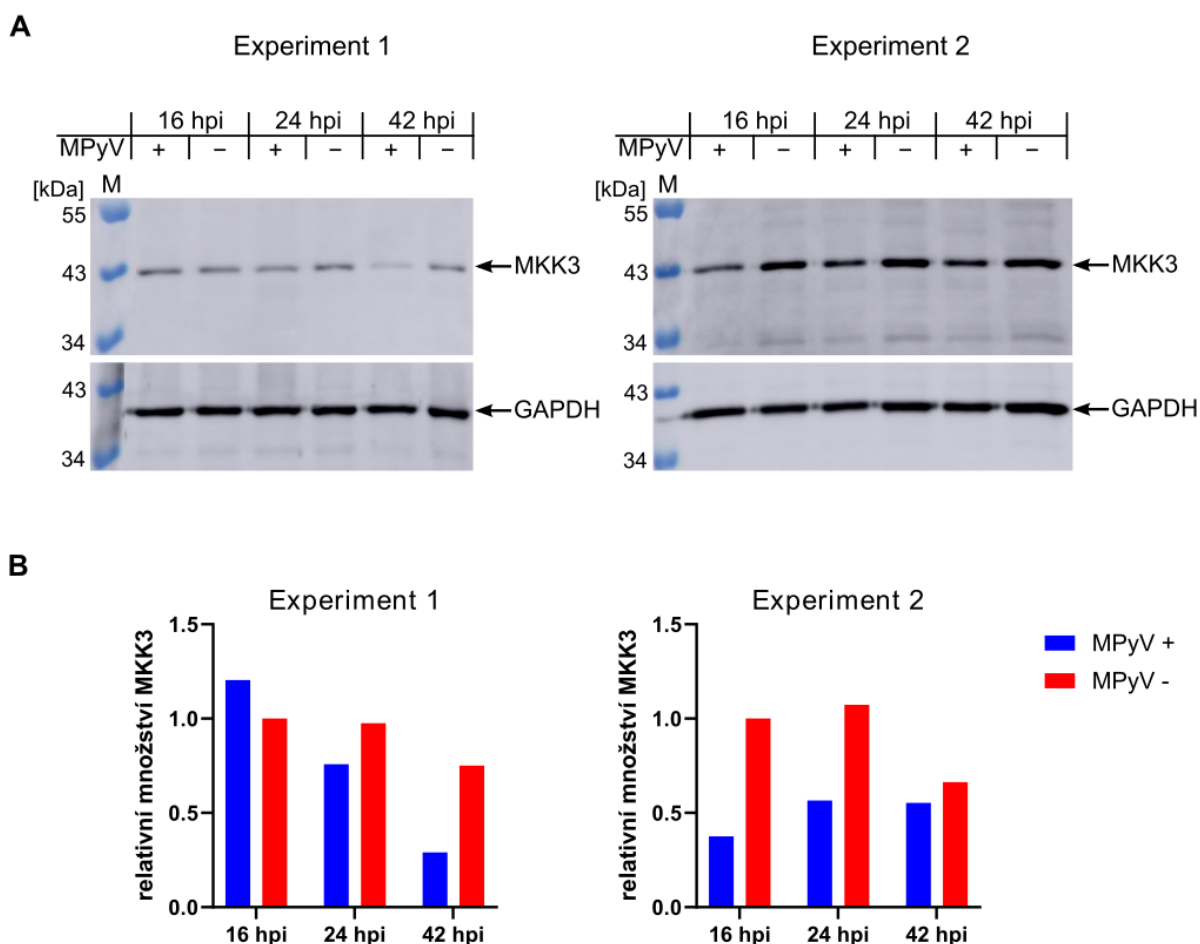
Za účelem ověření, že pozorovaná lokalizace MKK3 přímo souvisí s LT a ke kolokalizaci těchto proteinů dochází nezávisle na virové infekci, byly buňky MEF transfekovány pomocí nukleofekce vektorem zajišťujícím expresi LT antigenu MPyV (pcDNA3.1(+)-LT). Transfekované buňky byly kultivovány na mikroskopických sklíčkách. Po preextrakci a fixaci v čase 16, 24 a 42 hpt byly imunofluorescenčně značeny proteiny MKK3 a LT. Jako kontrola sloužily netransfekované buňky a buňky transfekované vektorem pcDNA3.1(+) bez vložené sekvence LT. V čase 16, 24 i 42 hpt byla pozorována vzájemná kolokalizace proteinů LT a MKK3 podobně jako v infikovaných buňkách (viz výše). V nepřítomnosti LT nebyl viditelný ani protein MKK3 (Obr. 30).



Obr. 30: Kolokalizace proteinů LT a MKK3 v neinfikovaných buňkách exprimujících LT. Myši embryonální fibroblasty transfekované vektorem pro transientní expresi LT MPyV (pcDNA3.1(+)-LT) nebo prázdným vektorem pcDNA3.1(+) byly fixovány 16, 24 a 42 hpt. Netransfekované buňky (NT) byly fixovány v čase 24 h. Kináza MKK3 byla značena červeně kombinací primární protilátky α MKK3 a sekundární protilátky α M-Cy3. LT byl značen zeleně kombinací primární protilátky $\text{Rt}\alpha$ LT (LT1) a sekundární protilátky $\text{G}\alpha$ Rt-AF488. Jádru je obarveno modře pomocí DAPI.

5.3.7.1 Vliv infekce MPyV na kinázu MKK3 a aktivaci p38 MAPK signální dráhy

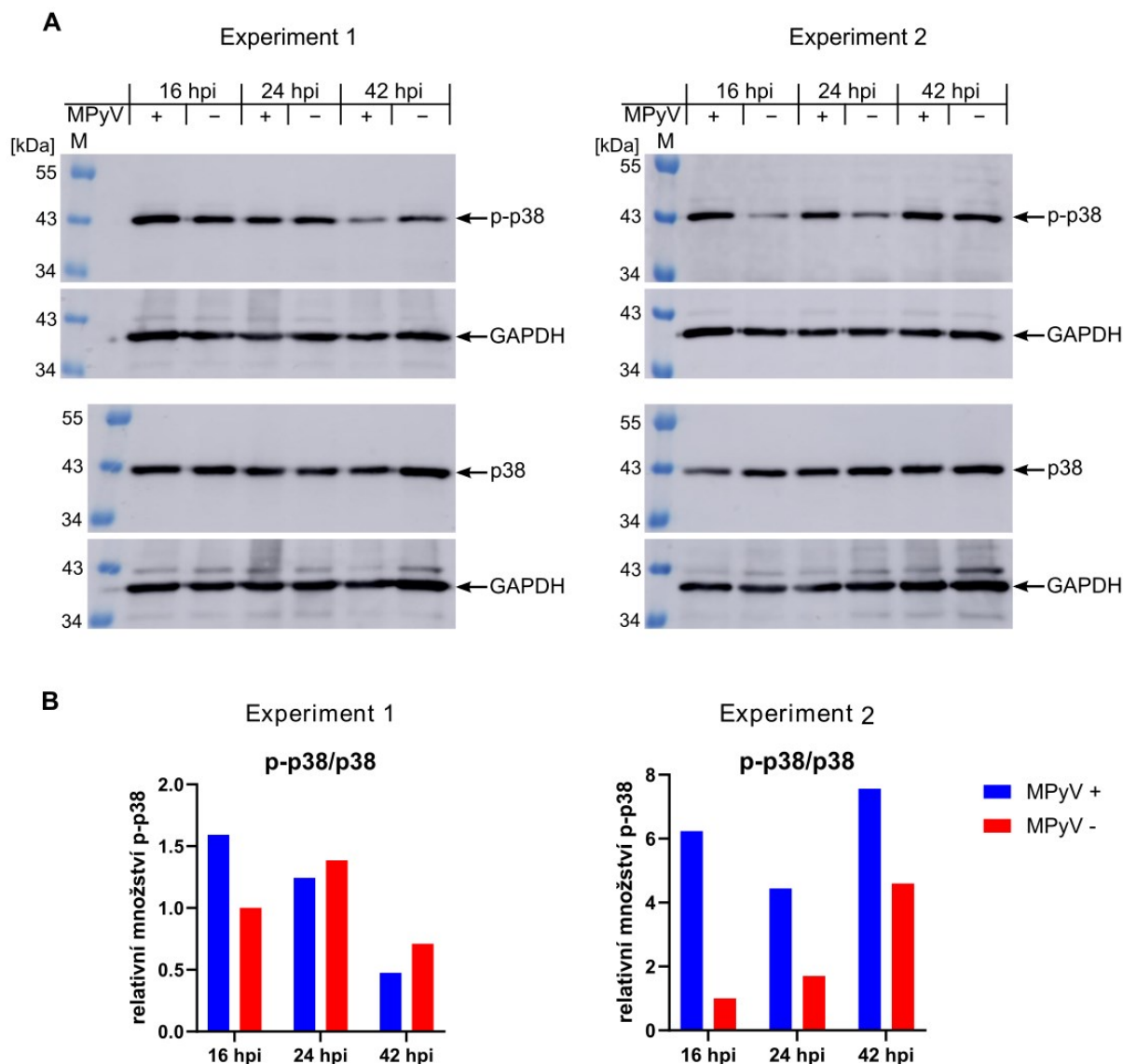
V návaznosti na výsledky imunofluorescenční mikroskopie bylo zkoumáno, zda v průběhu infekce MPyV dochází v buňkách ke změnám množství proteinu MKK3. Buňky MEF byly infikovány MPyV (MOI 5), pomocí western blotu a následné denzitometrické analýzy bylo určeno relativní množství proteinu MKK3 16 hpi, 24 hpi a 42 hpi v porovnání s neinfikovanými buňkami (Obr. 31). Byly provedeny dva nezávislé experimenty, v obou případech byl pozorován pokles množství MKK3 v infikovaných buňkách, ke kterému však docházelo v odlišných fázích infekce. V experimentu č. 2 bylo množství MKK3 v infikovaných buňkách nižší 16 hpi přibližně o 60 % a 24 hpi přibližně o 50 %, v čase 42 hpi byl rozdíl mezi infikovanými a neinfikovanými buňkami nepatrný. V experimentu č. 1 docházelo k postupnému poklesu hladiny MKK3 v průběhu infekce a významné snížení v porovnání s neinfikovanými buňkami bylo detekováno až v čase 42 hpi, kdy bylo množství MKK3 sníženo o cca 60 %.



Obr. 31: Hladina kinázy MKK3 v průběhu infekce MPyV. (A) V buňkách MEF infikovaných MPyV (+) nebo neinfikovaných (-) byla pomocí SDS-PAGE a western blotu detekována kináza MKK3 kombinací protilátek Rb α MKK3 a GaRb-HRP a protein GAPDH kombinací protilátek Rb α GAPDH sc-25778 (experiment 1) nebo Rb α GAPDH G9545 (experiment 2) a GaRb-HRP. Zobrazeny jsou výsledky dvou nezávislých experimentů. M – marker molekulových hmotností Color Prestained Protein Standard, Broad Range (10-250 kDa) (New England Biolabs). (B) Denzitometrická kvantifikace proteinu MKK3 detekovaného na membránách. Relativní množství MKK3 normalizované na množství GAPDH je vztaženo k hodnotě vzorku neinfikovaných buněk 16 hpi.

Dalším cílem bylo zjistit, zda je v průběhu infekce MPyV ovlivněna fosforylace MAP kinázy p38, která je substrátem kinázy MKK3. Pro stanovení míry aktivace p38 byly použity buněčné lyzáty z předchozích experimentů zaměřených na kvantifikaci MKK3. V neinfikovaných a infikovaných buňkách MEF bylo po imunodetekci proteinů na membráně stanoveno relativní množství kinázy p38 a její fosforylované formy 16 hpi, 24 hpi a 42 hpi (Obr. 32). Míra fosforylace p38 (vyjádřená jako podíl p-p38/p38) byla v experimentu 2 zvýšená v infikovaných buňkách, nejvíce patrný byl tento rozdíl 16 hpi, kdy byla fosforylace přibližně 6 \times vyšší v infikovaných buňkách oproti neinfikovaným. V průběhu infekce se tento rozdíl snižoval, snížení rozdílu 42 hpi bylo spojeno s nárůstem fosforylace v neinfikovaných buňkách.

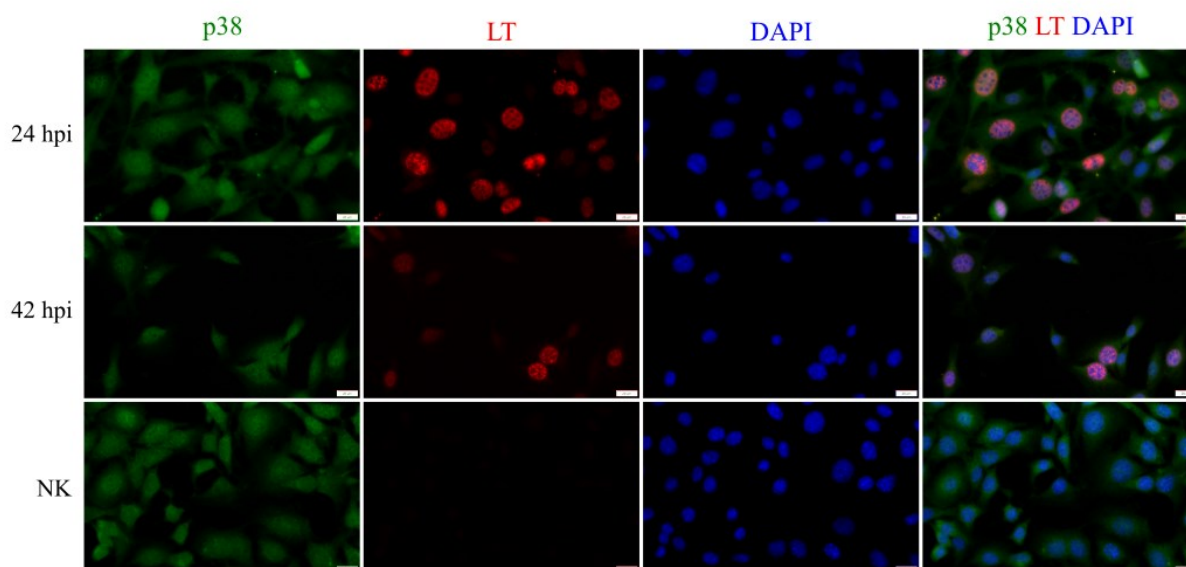
Také v experimentu 1 byla 16 hpi pozorována vyšší fosforylace p38 v infikovaných buňkách, v porovnání s experimentem 2 však byla fosforylace při infekci MPyV celkově nižší. Oproti neinfikovaným buňkám byla v tomto případě fosforylace p38 16 hpi zvýšena 1,6 \times . Byl pozorován podobný trend jako při kvantifikaci MKK3, s postupem infekce docházelo k poklesu fosforylace p38.



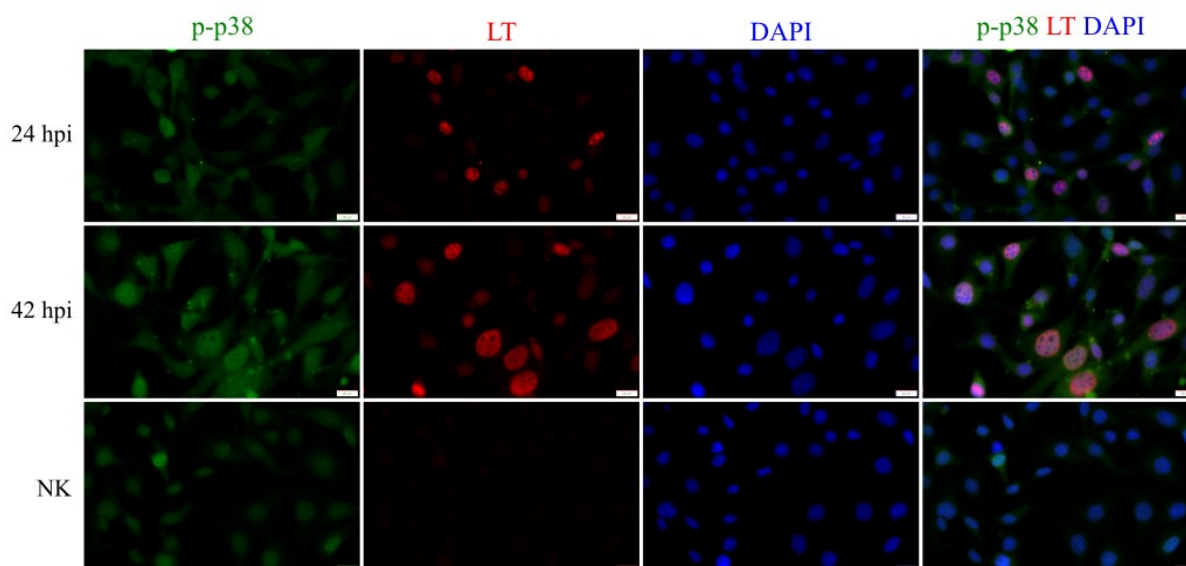
Obr. 32: Aktivace MAP kinázy p38 v průběhu infekce MPyV. (A) V buňkách MEF infikovaných MPyV (+) nebo neinfikovaných (-) byla pomocí SDS-PAGE a western blotu detekována kináza p38 kombinací protilátek Rbαp38 a GαRb-HRP, fosforylovaná forma kinázy p38 (p-p38) kombinací protilátek Rbαp-p38 a GαRb-HRP a protein GAPDH kombinací protilátek RbαGAPDH G9545 a GαRb-HRP. Zobrazeny jsou výsledky dvou nezávislých experimentů. Kináza p38 a její fosforylovaná forma byly detekovány ve stejných vzorcích na dvou různých membránách. M – marker molekulových hmotností Color Prestained Protein Standard, Broad Range (10-250 kDa) (New England Biolabs). (B) Relativní míra fosforylace kinázy p38. Denzitometrickou analýzou bylo stanoveno množství p38 a p-p38 normalizované k množství GAPDH. Grafy reprezentují podíl fosforylované p38 vůči celkovému množství p38 v experimentu 1 a 2, hodnoty jsou vztaheny k vzorku neinfikovaných buněk 16 hpi.

Vliv infekce MPyV na kinázu p38 a její fosforylaci byl dále zkoumán pomocí nepřímé imunofluorescence. Buňky MEF byly infikovány MPyV (MOI 1), po fixaci 24 hpi a 42 hpi byla značena kináza p38 nebo její fosforylovaná forma spolu s LT antigenem MPyV (Obr. 33, Obr. 34). Neinfikované buňky byly fixovány po 24 h. Kináza p38 se v neinfikovaných i infikovaných buňkách vyskytovala v cytoplasmě i v jádře. Při detekci fosforylované p38 byl patrný rozdíl mezi infikovanými a neinfikovanými buňkami. Zatímco v neinfikovaných buňkách byl signál p-p38 slabší, v infikovaných buňkách byla 24 a 42 hpi pozorována zvýšená intenzita signálu p-p38 v jádře. Částečný překryv signálů

p38 nebo p-p38 s LT pozorovaný 24 a 42 hpi naznačuje možnou kolokalizaci těchto proteinů v infikovaných buňkách, pro detailnější zobrazení lokalizace p38 a p-p38 ve vztahu k LT by však bylo vhodné využít konfokální mikroskopii.



Obr. 33: Lokalizace proteinů p38 a LT v buňkách infikovaných MPyV. Myší embryonální fibroblasty byly infikovány MPyV (MOI 1) a fixovány 24 hpi a 42 hpi. Neinfikované buňky (NK) byly fixovány v čase 24 hpi. Kináza p38 byla značena zeleně kombinací primární protilátky Rb α p38 a sekundární protilátky D α Rb-AF488. LT byl značen červeně kombinací primární protilátky R α LT (LT1) a sekundární protilátky G α Rt-AF546. Jádru je obarveno modře pomocí DAPI. Délka měřítka je 20 μ m.



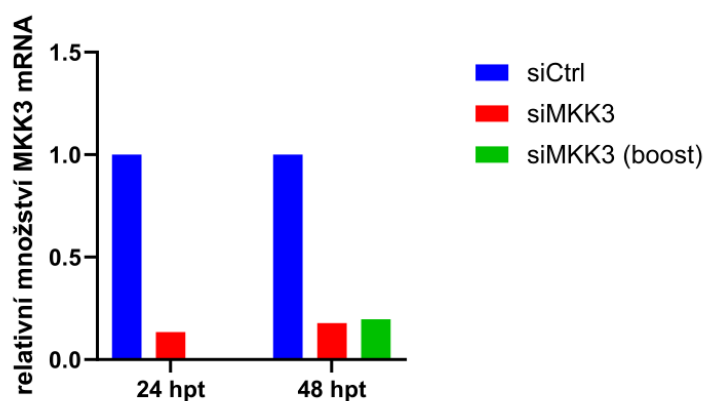
Obr. 34: Lokalizace proteinů p-p38 a LT v buňkách infikovaných MPyV. Myší embryonální fibroblasty byly infikovány MPyV (MOI 1) a fixovány 24 hpi a 42 hpi. Neinfikované buňky (NK) byly fixovány v čase 24 hpi. Fosforylovaná kináza p38 byla značena zeleně kombinací primární protilátky Rb α p-p38 a sekundární protilátky D α Rb-AF488. LT byl značen červeně kombinací primární protilátky R α LT (LT1) a sekundární protilátky G α Rt-AF546. Jádru je obarveno modře pomocí DAPI. Délka měřítka je 20 μ m.

5.3.7.2 Vliv umlčení exprese MKK3 na infekci MPyV

Za účelem charakterizace možného významu interakce MKK3 s LT antigenem MPyV byl zkoumán vliv snížení exprese MKK3 na průběh infekčního cyklu MPyV. Snížení exprese MKK3 bylo dosaženo RNA interferencí pomocí *Silencer*[®] Select Map2k3 siRNA (Thermo Fisher Scientific). Jako negativní kontrola byla použita kontrolní siRNA *Silencer*[®] Select Negative Control #1 (Thermo Fisher Scientific). Efektivita umlčení MKK3 byla ověřena na úrovni mRNA pomocí qPCR.

Nejprve byly testovány primery pro qPCR. Oba páry primerů (MKK3, MKK3 ori – viz kap. 4.1.13) navržené k amplifikaci myší mRNA pro MKK3 vykazovaly podobnou efektivitu při qPCR (výsledky nejsou zahrnuty). Pro další kvantifikaci MKK3 mRNA byly používány primery MKK3 ori. Dále byla testována transfekce buněk siRNA. Do buněk MEF byla pomocí lipofekce vnesena siRNA metodou přímé („forward“) transfekce (viz 4.2.2.7). Z buněk byla 24 hpt a 48 hpt izolována RNA a přepsána do cDNA. Hladina MKK3 mRNA byla stanovena pomocí qPCR. Ke snížení množství transkriptu MKK3 nedošlo (výsledky nejsou ukázány).

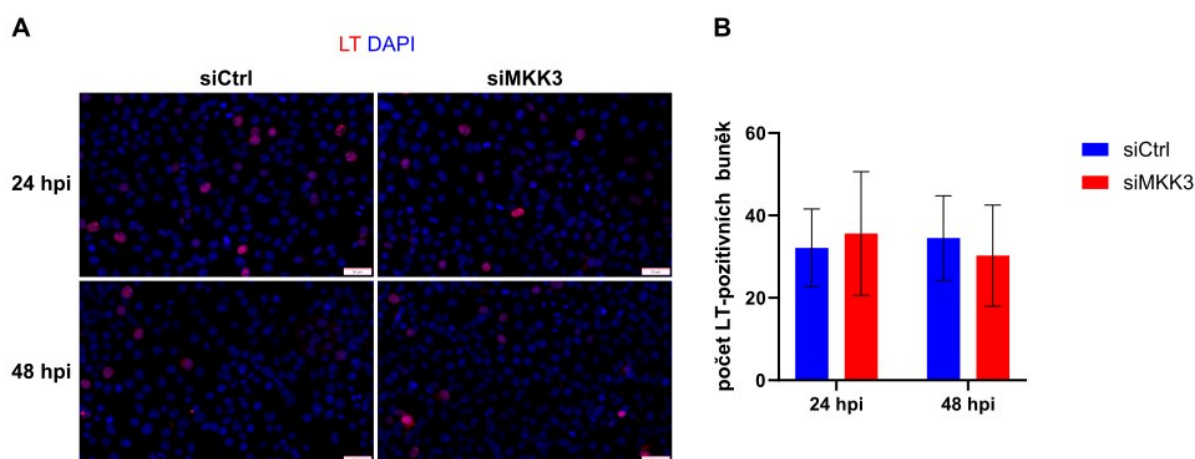
Vzhledem k neúspěšnému umlčení MKK3 při přímé transfekci buněk MEF byla dále testována reverzní transfekce buněk 3T3 s použitím upraveného množství siRNA a transfekčního činidla (viz 4.2.2.7). Buňky 3T3 transfekované *Silencer*[®] Select Map2k3 siRNA nebo kontrolní siRNA *Silencer*[®] Select Negative Control #1 byly kultivovány v 24jamkových destičkách. Po 24 a 48 hodinách byla z buněk izolována RNA, která byla přepsána do cDNA, exprese MKK3 byla kvantifikována pomocí qPCR. Zahrnuta byla také opakovaná transfekce buněk 3T3 siRNA proti MKK3 24 h po první transfekci (druhá transfekce byla provedena metodou přímé transfekce). Podobným způsobem byla také znovu testována transfekce buněk MEF. V buňkách 3T3 se transfekcí MKK3 siRNA podařilo ve všech případech snížit hladinu MKK3 mRNA oproti buňkám transfekovaným kontrolní siRNA o více než 80 % (viz Obr. 35). Podobného výsledku bylo dosaženo také transfekcí buněk MEF (data nezahrnuta). Vzhledem k předchozímu neúspěšnému knockdownu MKK3 v buňkách MEF byla dále používána buněčná linie 3T3.



Obr. 35: Knockdown MKK3 v buňkách 3T3. Buňky 3T3 byly transfekovány *Silencer*[®] Select Map2k3 siRNA (siMKK3) nebo *Silencer*[®] Select Negative Control #1 siRNA (siCtrl). Testována byla také opakovaná transfekce siMKK3 po 24 h (siMKK3 boost). 24 hpt a 48 hpt bylo pomocí qPCR stanoveno relativní množství MKK3 mRNA normalizované na expresi PP1A. Výsledky jsou vztaženy k hodnotě ve vzorcích siCtrl.

Vliv MKK3 na počet infikovaných buněk a produkci virového potomstva

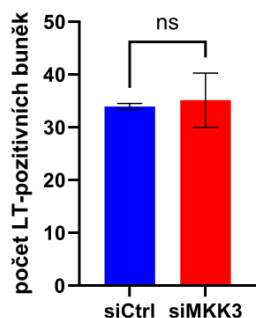
Po ověření metody transfekce siRNA bylo přistoupeno k experimentům zaměřeným na roli MKK3 při infekci MPyV. Nejprve byl zkoumán vliv MKK3 na počet infikovaných buněk. Buňky 3T3 byly transfekovány MKK3 siRNA nebo kontrolní siRNA metodou reverzní lipofekce a kultivovány na mikroskopických sklíčkách. V čase 24 hpt byly infikovány MPyV (MOI 0,5). Buňky byly fixovány 24 a 48 hpi, pomocí nepřímé imunofluorescence byl značen LT antigen MPyV (Obr. 36). Byl stanoven počet buněk pozitivních na signál LT ve 20 zorných polích mikroskopu, průměrný počet infikovaných buněk při snížené expresi MKK3 byl porovnán s kontrolním vzorkem. Výsledky naznačují, že infektivita MPyV není ovlivněna kinázou MKK3. Počet infikovaných buněk 24 hpi při snížené expresi MKK3 byl srovnatelný s buňkami transfekovanými kontrolní siRNA. Počet LT-pozitivních buněk se pohyboval na podobné úrovni také 48 hpi, nebyl pozorován rozdíl mezi vzorky siMKK3 a siCtrl, ani mezi časy 24 a 48 hpi.



Obr. 36: Počet buněk infikovaných MPyV při snížené expresi MKK3. Buňky 3T3 byly transfekovány *Silencer*[®] Select Map2k3 siRNA (siMKK3) nebo *Silencer*[®] Select Negative Control #1 siRNA (siCtrl) a 24 hpt infikovány MPyV (MOI 0,5). (A) V buňkách fixovaných 24 hpi a 48 hpi byl imunofluorescenčně značen LT antigen MPyV (červeně) kombinací primární protilátky R α LT (LT1) a sekundární protilátky G α Rt-AF546. Jádra byla barvena modře pomocí DAPI. Délka měřítka je 50 μ m. Zobrazeny jsou reprezentativní snímky z mikroskopu Olympus IX73. (B) V časech 24 hpi a 48 hpi byl stanoven průměrný počet LT-pozitivních buněk ve vzorcích siMKK3 a siCtrl z 20 zorných polí mikroskopu, výsledky jsou vyjádřeny jako průměr 20 polí \pm směrodatná odchylka. Graf byl vytvořen pomocí GraphPad Prism (verze 10.2.3).

Cílem dalšího experimentu bylo zjistit, zda snížení exprese kinázy MKK3 ovlivní množství infekčních virionů produkovaných infikovanými buňkami. Buňky 3T3 byly transfekovány MKK3 siRNA nebo kontrolní siRNA a infikovány MPyV (MOI 0,5) 24 hpt. Vzorky byly připraveny v triplicátech. V čase 48 hpi bylo odebráno kultivační médium, které bylo centrifugováno 5 min při 300 \times g. Supernatant byl dále použit jako virové inokulum pro infekci buněk 3T6 (každý ze 3 vzorků siMKK3 a 3 vzorků siCtrl byl použit k infekci buněk 3T6 v 1 jamce 24jamkové destičky). V těchto buňkách byl 24 hpi imunofluorescenčně značen LT antigen MPyV, byl porovnán počet infikovaných buněk při použití média odebraného od buněk s umlčenou a neumlčenou expresí MKK3 (Obr. 37). Mezi

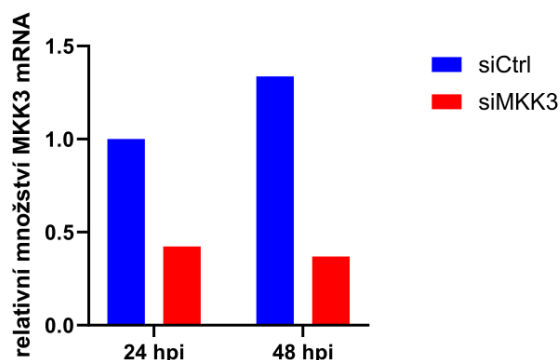
počtem infikovaných buněk nebyl zjištěn signifikantní rozdíl, lze tedy předpokládat, že produkce virových částic v buňkách infikovaných MPyV není ovlivněna kinázou MKK3.



Obr. 37: Produkce infekčních virových částic při snížené expresi MKK3. Buňky 3T3 byly transfekovány *Silencer*[®] Select Map2k3 siRNA (siMKK3) nebo *Silencer*[®] Select Negative Control #1 siRNA (siCtrl) a 24 hpt infikovány MPyV (MOI 0,5). Médium odebrané 48 hpi bylo použito k infekci buněk 3T6. V buňkách 3T6 fixovaných 24 hpi byl imunofluorescenčně značen LT antigen MPyV kombinací primární protilátky RtaLT (LT1) a sekundární protilátky GaRt-AF488. Byl stanoven průměrný počet LT-pozitivních buněk ve vzorcích siMKK3 a siCtrl z 20 zorných polí mikroskopu Olympus BX60. Prezentovaná data představují průměr triplikátů připravených v rámci jednoho experimentu ± směrodatná odchylka. Statistická signifikance byla stanovena pomocí t-testu, mezi hodnotami siMKK3 a siCtrl není signifikantní rozdíl ($p = 0,7$). Graf byl vytvořen pomocí GraphPad Prism (verze 10.2.3).

Současně s přípravou vzorků pro zjištění vlivu MKK3 na počet infikovaných buněk a produkci virového potomstva (viz výše) byla znovu ověřena efektivita siRNA pro MKK3, a to i v infikovaných buňkách. Buňky 3T3 byly transfekovány MKK3 siRNA nebo kontrolní siRNA metodou reverzní lipofekce ve 24jamkové kultivační destičce. V čase 24 hpt byly buňky infikovány MPyV (MOI 0,5), 24 hpi a 48 hpi bylo určeno relativní množství MKK3 mRNA pomocí qPCR.

V čase 24 hpi byla v buňkách transfekovaných siMKK3 hladina MKK3 mRNA v porovnání s buňkami transfekovanými siCtrl snížena na 42 %, 48 hpi bylo množství MKK3 mRNA na úrovni 27 % negativní kontroly (Obr. 38). Při porovnání relativní exprese MKK3 mRNA mezi časy 24 a 48 hpi nebyl pozorován významný rozdíl při transfekci siMKK3 ani siCtrl.

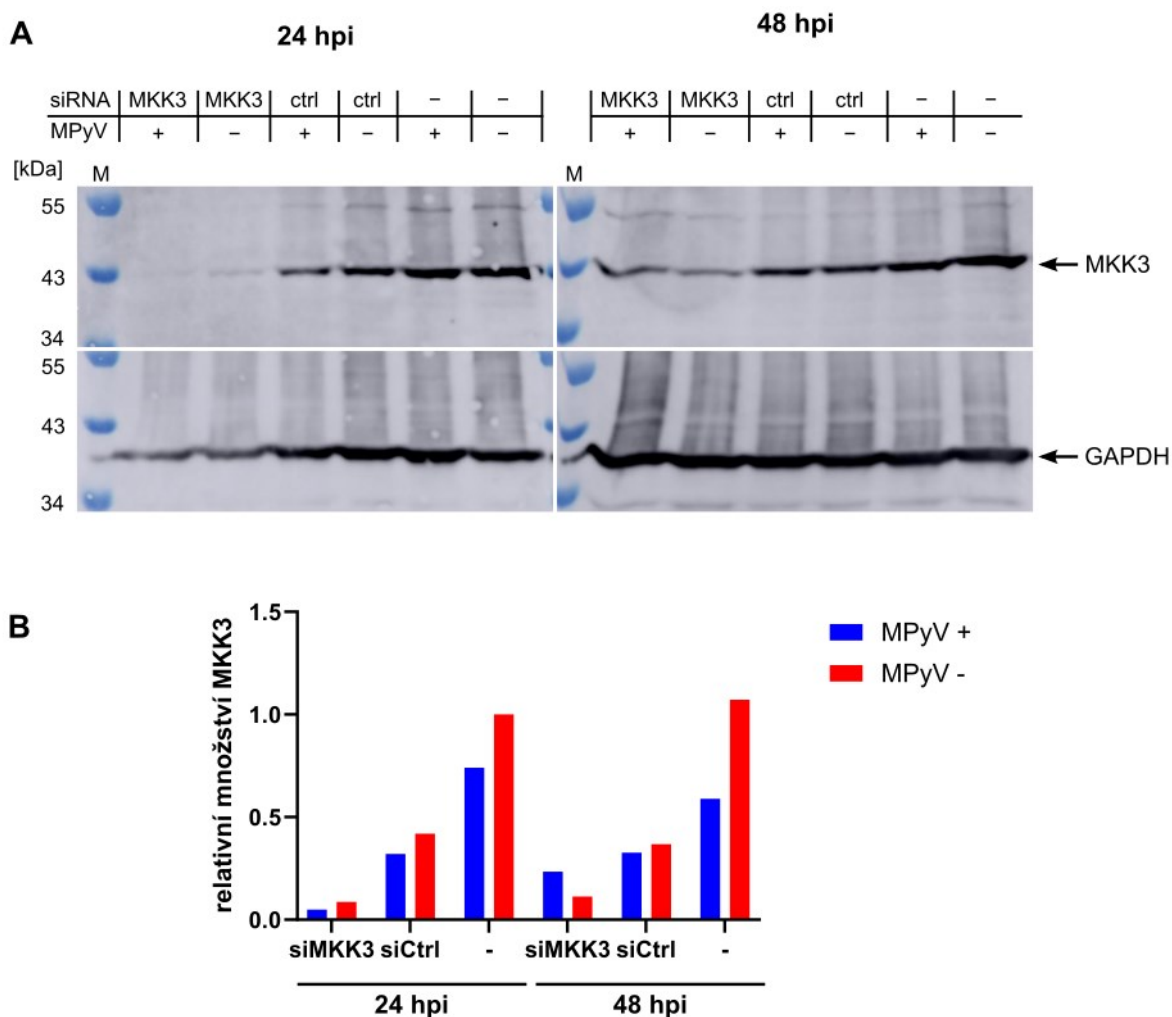


Obr. 38: Knockdown MKK3 s následnou infekcí buněk MPyV. Buňky 3T3 byly transfekovány *Silencer*[®] Select Map2k3 siRNA (siMKK3) nebo *Silencer*[®] Select Negative Control #1 siRNA (siCtrl) a 24 hpt infikovány MPyV (MOI 0,5). 24 hpi a 48 hpi bylo pomocí qPCR stanoveno relativní množství MKK3 mRNA normalizované na expresi PP1A. Výsledky jsou vztaheny k hodnotě siCtrl 24 hpi.

Kromě určení relativního množství MKK3 mRNA pomocí qPCR bylo analyzováno množství proteinu MKK3 metodou western blot. Buňky 3T3 byly transfekovány MKK3 siRNA nebo kontrolní siRNA metodou reverzní lipofekce a kultivovány ve 12jamkové destičce. Kromě transfekovaných buněk byla zahrnuta kontrola v podobě netransfekovaných buněk (bez přidání transfekčního činidla a siRNA). V čase 24 hpt byly buňky infikovány MPyV (MOI 0,5). Byly připraveny lyzáty z neinfikovaných a infikovaných buněk 24 hpi a 48 hpi, po SDS-PAGE elektroforéze a imunodetekci proteinů na membráně bylo stanoveno relativní množství proteinu MKK3 (Obr. 39).

Snížení exprese MKK3 po transfekci siMKK3 se podařilo potvrdit také na úrovni produkce proteinu. V porovnání s netransfekovanými buňkami bylo množství kinázy MKK3 sníženo 24 hpi o více než 90 % v infikovaných i neinfikovaných buňkách. V čase 48 hpi bylo množství MKK3 sníženo cca o 60 % v infikovaných buňkách a o 90 % v neinfikovaných buňkách. Při porovnání buněk transfekovaných MKK3 siRNA s buňkami transfekovanými kontrolní siRNA bylo snížení exprese MKK3 zejména 48 hpi méně výrazné, v infikovaných buňkách bylo detekováno snížení pouze o přibližně 30 %, v neinfikovaných pak o 70 %. 24 hpi bylo v infikovaných i neinfikovaných buňkách detekováno snížení o více než 80 %. Výsledky naznačují, že množství MKK3 bylo v menší míře sníženo také v důsledku transfekce siCtrl.

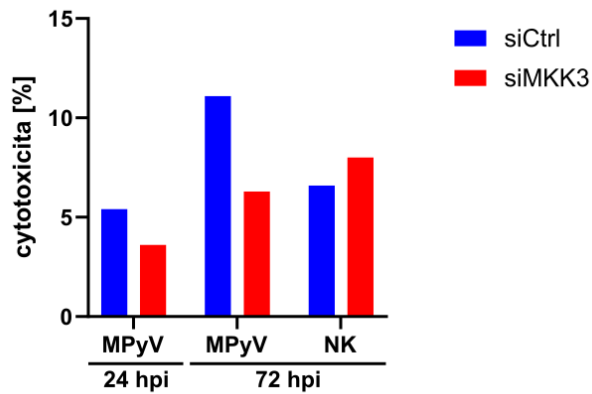
V netransfekovaných buňkách bylo také detekováno snížené množství MKK3 při infekci MPyV 24 hpi a 48 hpi oproti neinfikovaným buňkám. Toto pozorování je v souladu s předchozími výsledky kvantifikace proteinu MKK3 v průběhu infekce MPyV (viz Obr. 31).



Obr. 39: Expze proteinu MKK3 po transfekci siRNA a infekci MPyV. Buňky 3T3 byly transfekovány *Silencer*[®] Select Map2k3 siRNA (siMKK3), *Silencer*[®] Select Negative Control #1 siRNA (siCtrl), nebo nebyly transfekovány (-). 24 hpi byly buňky infikovány MPyV (MOI 0,5; MPyV +), nebo nebyly infikovány (MPyV -). (A) Prostřednictvím SDS-PAGE a western blotu byla 24 hpi a 48 hpi detekována kináza MKK3 kombinací protilátek Rb α MKK3 a G α Rb-HRP a protein GAPDH kombinací protilátek Rb α GAPDH sc-25778 a G α Rb-HRP. M – marker molekulových hmotností Color Prestained Protein Standard, Broad Range (10-250 kDa) (New England Biolabs). (B) Denzitometrická kvantifikace proteinu MKK3 detekovaného na membránách. Relativní množství MKK3 normalizované na množství GAPDH je vztaženo k hodnotě vzorku netransfekovaných neinfikovaných buněk 24 hpi.

Stanovení cytotoxicity při snížené expresi MKK3 v infikovaných buňkách

Další metodou využitou pro charakterizaci průběhu infekce MPyV při umlčení expze MKK3 byl cytotoxický test pomocí soupravy CyQUANT[™] LDH Cytotoxicity Assay (viz 4.2.2.8). Po reverzní transfekci buněk 3T3 MKK3 siRNA nebo kontrolní siRNA a infekci MPyV byly 24 hpi a 72 hpi připraveny vzorky pro stanovení množství enzymu laktát dehydrogenázy (LDH) uvolněné do média v důsledku poškození plazmatické membrány. Z důvodu příliš vysoké absorpce vzorků vedoucí k nepřesnosti měření bylo kolorimetrické stanovení LDH opakováno s 5 \times ředěnými vzorky. Výsledky tohoto měření jsou uvedeny v Obr. 40. V čase 72 hpi byl ve vzorcích infikovaných buněk pozorován mírný pokles cytotoxicity při snížené expresi MKK3. S výjimkou infikovaných buněk transfekovaných kontrolní siRNA nepřesahovala stanovená míra cytotoxicity 8 %.



Obr. 40: Stanovení cytotoxicity po transfekci buněk 3T3 siRNA a infekci MPyV. Buňky 3T3 byly transfekovány *Silencer*[®] Select Map2k3 siRNA (siMKK3) nebo *Silencer*[®] Select Negative Control #1 siRNA (siCtrl) a infikovány MPyV (MOI 0,5) 24 hpi, nebo nebyly infikovány (NK). 24 hpi a 72 hpi byla určena procentuální cytotoxicita spektrofotometrickým stanovením koncentrace laktát dehydrogenázy uvolněné do média.

6 Diskuze

6.1 Vliv proteinu DAXX na polyomavirovou infekci

6.1.1 Role proteinu DAXX v replikačním cyklu MPyV

Z dostupné literatury a předchozích výsledků výzkumu Laboratoře virologie ohledně role proteinu DAXX v infekci MPyV vyplývá, že DAXX je v infikovaných buňkách součástí PML tělísek lokalizovaných v bezprostřední blízkosti virových replikačních center. V buňkách infikovaných MPyV byla také pozorována kolokalizace DAXX a histonu H3.3 s virovými replikačními centry 24 a 42 hpi, v čase 24 hpi spolu s DAXX kolokalizoval s replikačními centry také protein ATRX (Satratzemis, 2023). Průběh infekce MPyV by tak mohl být ovlivněn proteinem DAXX a jeho funkcí jako chaperonu H3.3. Funkce proteinu DAXX při infekci MPyV však dosud nebyla charakterizována. Cílem první části diplomové práce bylo určit, zda protein DAXX, resp. jeho absence ovlivňuje průběh infekce MPyV.

V použité buněčné linii MEF *Daxx* Tet-On (s tetracyklinem indukibilní expresí *Daxx* a rezistencí vůči blastidinu) bylo metodou western blot ověřeno, že v nepřítomnosti antibiotika doxycyklinu buňky neprodukuje protein DAXX v detekovatelném množství. V buňkách MEF WT byl detekován signál odpovídající molekulové hmotnosti DAXX. Nepodařilo se však indukovat expresi DAXX v buňkách MEF *Daxx* Tet-On. Vzhledem k předchozí úspěšné indukci exprese DAXX při použití této buněčné linie pro jiné experimenty v Laboratoři virologie mohlo s postupným pasážírováním dojít ke ztrátě indukibility, ačkoliv rezistence k blastidinu byla zachována.

Porovnáním replikace genomu MPyV v buňkách MEF *Daxx* Tet-On a MEF WT byl zjištěn snížený počet virových genomů v nepřítomnosti DAXX. Tento efekt byl pozorován při obou provedených experimentech, ačkoliv byl průběh infekce odlišný. V prvním experimentu došlo 42 hpi k výraznému zvýšení počtu kopií virového genomu, při opakování experimentu byl nárůst množství virové DNA během sledovaného časového úseku infekce (16 hpi – 42 hpi) pozvolný. Ve všech případech byl však nárůst vyšší v buňkách exprimujících DAXX. Rozdílný průběh infekce může být ovlivněn stářím buněčných kultur použitých při jednotlivých experimentech. Vzhledem k použití virového inokula ze dvou různých izolací MPyV může mít i jeho kvalita vliv na průběh experimentu.

Pozorované snížení počtu virových genomů při potlačení exprese DAXX naznačuje možný pozitivní vliv proteinu DAXX na replikaci virové DNA. Pro statistickou analýzu dat a potvrzení tohoto závěru je potřeba experiment opakovat.

Podobný trend byl pozorován také při kvantifikaci virových transkriptů. V obou experimentech byla detekována nižší hladina transkriptů pro LT i VP1 v buňkách MEF *Daxx* Tet-On, a to ve všech sledovaných časech, tedy 16, 24 a 42 hpi. Na základě těchto výsledků lze uvažovat o možné pozitivní regulaci virové transkripce proteinem DAXX, opět je však pro ověření výsledků zapotřebí více biologických replikátů.

Dále jsme se zaměřili na průběh časné fáze infekce. Výsledky imunofluorescenční detekce LT naznačují možný pozitivní vliv DAXX na infekci MPyV. V buňkách MEF *Daxx* Tet-On byl pozorován snížený počet infikovaných buněk pozitivních na LT antigen 24 hpi, vzhledem k rozdílu mezi duplikáty ale výsledek nebyl jednoznačný.

Získané výsledky ukazují na význam DAXX jako proteinu podporujícího virovou replikaci. Jeho vliv byl pozorován v časné i pozdní fázi infekce MPyV. V literatuře byl popsán pozitivní vliv DAXX na papilomavirovou infekci. Knockdown DAXX způsobil dvojnásobné až trojnásobné snížení replikace DNA viru HPV a dvojnásobné snížení hladiny časných virových transkriptů (Kivipõld et al., 2015; Stepp et al., 2013). DAXX by tak mohl podporovat replikaci polyomavirů a papilomavirů společným mechanismem, který však zatím zůstává neobjasněný.

Také herpesvirová infekce může být v některých případech podporována proteinem DAXX. V endoteliálních buňkách infikovaných HCMV mělo snížení exprese DAXX negativní vliv na expresi virových genů (Seitz et al., 2022). V buňkách infikovaných HSV-1 působí DAXX v komplexu s ATRX represi virových genů, po degradaci ATRX virovým proteinem ICP0 se však pravděpodobně projevuje funkce DAXX nezávislá na ATRX, jejímž výsledkem je zvýšení virové transkripce (Cabral et al., 2018).

Funkce DAXX při virové infekci by mohla souviset s regulací asociace histonu H3.3 s virovým chromatinem. Dle výsledků výzkumu Laboratoře virologie zaměřeného na roli PML-NBs a s nimi spojených chaperonů histonu H3.3 v infekčním cyklu MPyV dochází v infikovaných buňkách k inkorporaci histonu H3.3 do virových minichromozomů. Analýzou virových částic pomocí hmotnostní spektrometrie byl zjištěn zvýšený obsah H3.3 ve virovém chromatinu při absenci proteinů PML nebo DAXX (Satratzemis, 2023).

Nabízí se vysvětlení, že PML tělíska spolu s proteinem DAXX omezují množství volného histonu H3.3 v nukleoplazmě. Histon H3.3 je v důsledku interakce s DAXX akumulován v PML-NBs, čímž je snížena jeho dostupnost pro další chaperony (Delbarre et al., 2013). Tímto způsobem by mohl DAXX snižovat inkorporaci H3.3 do virového chromatinu jiným chaperonem, kterým by mohl být komplex HIRA. PML se podílí na vkládání H3.3 do heterochromatinových domén komplexem DAXX/ATRX. V absenci PML je snížena inkorporace H3.3 do heterochromatinu komplexem DAXX/ATRX, zatímco komplex HIRA funguje nezávisle na PML. Zvýšené množství volného H3.3 v nepřítomnosti PML a DAXX by tak mohlo podporovat jeho vkládání do nukleozomů komplexem HIRA (Delbarre et al., 2017).

Komplex HIRA sestavuje nukleozomy s H3.3 v oblastech transkripčně aktivních i neaktivních genů a regulačních oblastí (Goldberg et al., 2010). Funkce HIRA jako restriktivního faktoru byla popsána např. při infekci herpesviru HSV-1 a HCMV, kdy vkládání H3.3 do virového chromatinu komplexem HIRA vede ke snížení exprese virových genů a replikace těchto virů (Cohen et al., 2018; McFarlane et al., 2019; Rai et al., 2017). Pozitivní vliv DAXX na virovou replikaci by tak mohl spočívat v omezení funkce restriktivního faktoru, kterým by mohl být komplex HIRA, prostřednictvím snížení množství

dostupného histonu H3.3. K objasnění funkce proteinu DAXX při replikaci MPyV by mohlo přispět další studium interakcí MPyV s chaperonem HIRA a vlivu inkorporace H3.3 na virovou transkripci.

DAXX by také mohl ovlivňovat virovou infekci způsobem nezávislým na histonu H3.3, souvisejícím např. s jeho popsanou funkcí molekulárního chaperonu (L. Huang et al., 2021).

6.1.2 Role proteinu DAXX v replikačním cyklu BKPyV

Podobně jako při infekci MPyV, také v buňkách infikovaných BKPyV kolokalizuje DAXX s LT antigenem a virovými replikačními centry. Během infekce dochází k reorganizaci PML-NBs spojené s uvolněním proteinu DAXX z těchto struktur (Jiang et al., 2011). Ani v tomto případě však není známo, zda protein DAXX ovlivňuje průběh infekce.

Pro budoucí výzkum významu proteinu DAXX pro infekci BKPyV bylo potřeba otestovat fenotyp buněčných klonů U2OS *DAXX* KO, které jsme měli k dispozici. Imunofluorescenční mikroskopii byl detekován protein DAXX ve všech testovaných klonech. Pozorovaný signál DAXX v buňkách *DAXX* KO se shodoval s buňkami U2OS WT. Protein DAXX byl lokalizován v jádře i cytoplazmě buněk WT a *DAXX* KO, v jádře byl pozorován překryv signálu DAXX a PML, pravděpodobně odpovídající lokalizaci DAXX v PML-NBs.

Expresí DAXX byla potvrzena metodou western blot, protein DAXX byl detekován ve všech třech testovaných klonech. Buňky nevykazovaly *DAXX* KO fenotyp, nemohly tedy být použity pro další výzkum vlivu DAXX na replikaci BKPyV. Mohlo dojít např. ke kontaminaci buněčných linií *DAXX* KO linií U2OS WT a postupnému převládání WT buněk v důsledku omezeného růstu buněk s delecí *DAXX*.

6.1.2.1 Příprava buněčné linie HEK293 *DAXX* KO

Protože v liniích U2OS s předpokládanou delecí *DAXX* byl protein DAXX produkován, potřebovali jsme pro účely výzkumu vlivu DAXX na replikaci BKPyV připravit linii, kde bude exprese *DAXX* potlačena. Zvolili jsme delecí genu *DAXX* systémem CRISPR/Cas9. Připraveným vektorem pro expresi nukleázy Cas9 a sgrRNA proti *DAXX* byly transfekovány buňky HEK293. V izolovaných buněčných klonech byla testována produkce proteinu DAXX. Identifikace klonů se sníženou expresí DAXX byla komplikována nespecifickým signálem při detekci DAXX metodou western blot. Z pěti vybraných klonů s potenciálně nižší expresí DAXX byla izolována DNA a po amplifikaci úseku obsahujícího sekvenci, na kterou byl cílen systém CRISPR/Cas9 byla provedena sekvenční analýza. Z výsledků sekvenace vyplynulo, že ve dvou z analyzovaných klonů nedošlo k modifikaci systémem CRISPR/Cas9. U těchto dvou klonů byl také při předchozí elektroforéze produktů PCR detekován fragment o velikosti odpovídající produktu PCR z netransfekovaných buněk HEK293. Ve zbylých případech bylo detekováno více produktů PCR o různé velikosti, mohlo by se tedy jednat o heterozygotní buňky. Výsledky sekvenace těchto tří klonů byly neprůkazné, pravděpodobně v důsledku nízké kvality vzorků DNA. Problémem mohla být nevhodná koncentrace templátu nebo nedostatečná čistota vzorků po izolaci DNA z agarózového gelu. Bude tedy nutné sekvenaci opakovat. Po identifikaci *DAXX* KO klonů, případně identifikaci heterozygotních buněk a zopakování modifikace

systémem CRISPR/Cas9, bude možné použít získanou *DAXX* KO linii ke studiu infekčního cyklu BKPyV v nepřítomnosti proteinu *DAXX*.

6.2 Interakce LT antigenu MPyV s buněčnými proteiny

V návaznosti na data získaná studiem interaktomu LT antigenu MPyV (experimenty provedené Mgr. Karolínou Štaflovou, Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, skupina Ing. Ivy Pichové, CSc.) byla sledována vzájemná lokalizace LT a několika vybraných potenciálních interakčních partnerů v infikovaných buňkách. Proteiny byly vybrány na základě jejich interakce s LT antigenem jiných polyomavirů, případně zvýšené exprese při infekci polyomaviry, zapojení v opravách poškození DNA nebo v imunitní odpovědi.

V případě proteinů BAF57, BAG2, PRC1, WDR48 a MKK3 byl pomocí konfokální mikroskopie pozorován překryv signálu daného proteinu s LT antigenem MPyV 24 hpi a 42 hpi, tyto proteiny tedy s velkou pravděpodobností s LT interagují. Další výzkum těchto interakcí může přinést důležité poznatky o regulaci průběhu infekčního cyklu MPyV.

V infikovaných buňkách naopak nebyla pozorována kolokalizace proteinů NONO ani SMC4 s LT antigenem, jejich interakci se tedy potvrdit nepodařilo.

6.2.1 Interakce LT s MKK3

Z proteinů, které v infikovaných buňkách kolokalizovaly s LT antigenem MPyV, jsme se dále zaměřili na kinázu MKK3, která je jednou z hlavních MAPKK signální dráhy p38.

MAP kinázové kaskády jsou evolučně konzervované signální dráhy, které regulují mnoho důležitých buněčných procesů včetně růstu, proliferace, apoptózy, stresové a imunitní odpovědi. Jejich aktivaci zajišťují hierarchicky uspořádané kinázy, aktivované MAPK pak fosforylují mnoho substrátů v cytoplazmě i v jádře, kde se podílejí mimo jiné na regulaci transkripce interakcí s transkripčními faktory a remodelaci chromatinu (shrnutí v Plotnikov et al., 2011).

Na rozdíl od MAP kináz ERK1/2, které jsou aktivovány v cytoplazmě a následně transportovány do buněčného jádra, je vzhledem k popsané jaderné i cytoplazmatické lokalizaci MKK3 a MKK6 možné, že k aktivaci p38 dochází i v jádře (Ben-Levy et al., 1998).

Při imunofluorescenčním značení MKK3 byl v neinfikovaných buňkách pozorován velmi slabý signál MKK3 v cytoplazmě. V infikovaných buňkách se pak MKK3 objevovala v buněčném jádře, čas detekce MKK3 v jádře (20 hpi) se shodoval s první detekcí LT antigenu. Kolokalizace MKK3 s LT byla pozorována také v neinfikovaných buňkách po transfekci vektorem zajišťujícím expresi LT. Získané výsledky naznačují možný vliv LT na redistribuci MKK3 do jádra, ke které dochází nezávisle na virové infekci a přítomnosti dalších virových proteinů.

6.2.1.1 Vliv infekce MPyV na kinázu MKK3 a aktivaci p38 MAPK signální dráhy

Dalším cílem bylo zjistit, zda je infekcí MPyV ovlivněna hladina proteinu MKK3. Celkově bylo pozorováno snížené množství proteinu MKK3 v infikovaných buňkách, výsledky se však lišily mezi

dvěma provedenými experimenty. Zatímco v jednom případě byla detekována nižší hladina MKK3 v infikovaných buňkách 16 a 24 hpi, v druhém experimentu hladina MKK3 klesala v průběhu infekce a snížení oproti neinfikovaným buňkám bylo detekováno až 42 hpi. K vysvětlení těchto rozdílů by mohlo přispět porovnání průběhu infekce detekcí virových proteinů 16, 24 a 42 hpi.

Kináza MKK3 a její interakce s LT by mohla mít vliv na aktivaci MAP kinázy p38 v buňkách infikovaných MPyV. Proto byla zkoumána také míra fosforylace p38 16, 24 a 42 hpi. Byla detekována zvýšená fosforylace p38 v infikovaných buňkách, výsledky se však opět lišily při opakování experimentu. V jednom z experimentů byla fosforylace v infikovaných buňkách mírně zvýšena 16 hpi, s postupem infekce fosforylace klesala. V těchto vzorcích byl pozorován také pokles hladiny MKK3, snížená fosforylace p38 by tedy v tomto případě mohla být způsobena úbytkem MKK3 potenciálně vyvolaným virovou infekcí.

V druhém experimentu byla detekována vyšší fosforylace p38 při infekci MPyV 16, 24 i 42 hpi. Paradoxně bylo v příslušných vzorcích množství MKK3 nižší v infikovaných buňkách, p38 zde mohla být aktivována jinou kinázou, např. MKK6 nebo MKK4. V čase 42 hpi byla detekována zvýšená aktivace p38 v neinfikovaných buňkách. K aktivaci související s délkou kultivace mohlo dojít v důsledku narůstající konfluency buněk. V konfluentních kulturách myších a lidských fibroblastů je aktivována kináza p38 α , byla popsána účast p38 α MAPK dráhy v regulaci kontaktní inhibice (Faust et al., 2005). Rozdíly ve vlivu infekce MPyV na fosforylaci p38 by mohly být způsobeny odlišnými experimentálními podmínkami ovlivňujícími aktivaci signálních drah. Regulace MAPK drah je často vzájemně propojená, některé komponenty mohou být společné např. pro dráhy JNK a p38 (shrnuto v Cargnello & Roux, 2011). Rozdíl ve výsledcích mohl být také způsoben podmínkami při přípravě vzorků, množství detekované p-p38 mohlo být ovlivněno např. rozdílnou aktivitou fosfatáz. Bylo by vhodné experiment opakovat s protokolem upraveným pro detekci fosforylovaných proteinů.

Zvýšenou fosforylaci p38 při infekci naznačují také výsledky imunofluorescenčního barvení, kdy byla pozorována zvýšená intenzita signálu fosforylované kinázy p38 v jádře buněk infikovaných MPyV 24 a 42 hpi. Zdá se také, že by mohlo docházet ke kolokalizaci p-p38 s LT antigenem MPyV, toto pozorování však bude nutné ověřit konfokální mikroskopií.

Otázkou je, zda fosforylace p38 souvisí s interakcí MKK3 a LT a jaký je její význam při infekci MPyV. V literatuře byla popsána zvýšená fosforylace kinázy p38 vlivem ST antigenu MPyV. V buňkách exprimujících ST MPyV byla také zvýšena fosforylace MKK3/6 (detekováno protilátkou rozpoznávající fosforylované kinázy MKK3 i MKK6). Indukce fosforylace ST antigenem je závislá na interakci s fosfatázou PP2A. Vliv ST na fosforylaci p38 se může lišit v různých podmínkách. Zatímco při kultivaci buněk v médiu se sérem ST zvyšoval fosforylaci p38, po kultivaci v médiu bez séra byla fosforylace p38 vlivem ST naopak snížena (Andrabi et al., 2007).

Také při infekci SV40 dochází k fosforylaci p38, její zvýšená aktivace byla detekována 24 hpi a s postupem infekce fosforylace dále narůstala. Inhibice p38 neměla vliv na množství viru uvolněného z buněk (Motamedi et al., 2020). Aktivaci kinázy p38 vyvolává také ST antigen MCPyV, je však

zprostředkována kinázou MKK4 namísto kanonické dráhy fosforylace pomocí MKK3/MKK6. K aktivaci dochází v důsledku interakce ST s katalytickou podjednotkou fosfatázy PP4C (Dobson et al., 2020).

Aktivace kináz může být vyvolána také vazbou viru na buněčný receptor. Infekce MPyV způsobuje aktivaci různých signálních drah, které mohou ovlivňovat jednotlivé kroky replikačního cyklu. Vazba MPyV na gangliosidové receptory nebo $\alpha 4$ integriny na buněčném povrchu způsobuje aktivaci signálních drah včetně aktivace kináz PI3K a FAK/Src nebo MAP kinázových kaskád ERK1/2 a JNK. Nebyl pozorován vliv ERK dráhy na infekci MPyV, zatímco inhibice dráhy PI3K měla negativní vliv na vstup viru do buněk a inhibice FAK/Src vyústila v omezenou asociaci MPyV s mikrotubuly a snížený transport virionu (O'Hara & Garcea, 2016).

Další experimenty by mohly být zaměřeny na sledování fosforylace MKK3 v průběhu infekce MPyV a souvislosti mezi fosforylací MKK3 a p38, případně by pomocí frakcionace buněk mohla být detekována MKK3 přítomná v jádře a cytoplasmě buněk infikovaných MPyV. Vzhledem k pozorovanému úbytku MKK3 v infikovaných buňkách by mohl být studován vliv MPyV na hladinu mRNA pro MKK3 v různých fázích infekčního cyklu.

K aktivaci MKK3 a MKK6 dochází působením interferonů typu I, následná aktivace p38 vede k indukci exprese interferonem stimulovaných genů ISG15 a IRF9. MKK3 se tak podílí na aktivaci interferonové odpovědi (Y. Li et al., 2005). Kináza MKK3 by se tedy mohla účastnit obrany proti virové infekci regulací interferonové signalizace.

6.2.1.2 Vliv umlčení exprese MKK3 na infekci MPyV

Cílem následující části práce bylo určit, zda snížená exprese MKK3 ovlivní průběh infekce MPyV. Pomocí siRNA se podařilo snížit hladinu MKK3 mRNA v buňkách 3T3 přibližně o 60–80 % oproti kontrole. Knockdown byl ověřen také detekcí proteinu MKK3 pomocí western blotu, ačkoliv bylo detekováno také nižší množství MKK3 v buňkách transfekovaných kontrolní siRNA oproti netransfekovaným buňkám. V netransfekovaných buňkách bylo rovněž v soulasu s předchozími výsledky pozorováno nižší množství MKK3 v infikovaných buňkách.

Při imunofluorescenční detekci LT antigenu nebyl zjištěn vliv snížené exprese MKK3 na počet buněk infikovaných MPyV 24 hpi. Také v pozdní fázi infekce (48 hpi) zůstal počet LT-pozitivních buněk na podobné úrovni v buňkách transfekovaných MKK3 siRNA i kontrolní siRNA. Snížená exprese MKK3 neměla vliv ani na produkci infekčních virových částic uvolněných do média 48 hpi.

Cytotoxickým LDH testem byl ve vzorcích buněk transfekovaných MKK3 siRNA a infikovaných MPyV 72 hpi zjištěn mírný pokles cytotoxicity oproti buňkám transfekovaným kontrolní siRNA. V neinfikovaných buňkách byla míra cytotoxicity po transfekci siMKK3 a siCtrl srovnatelná, snížení exprese MKK3 tedy nemělo cytotoxický efekt. Při nižší expresi MKK3 tak mohla být snížena lyze buněk indukovaná infekcí MPyV. Cytotoxicita však byla nízká ve všech vzorcích, nejvyšší

naměřená hodnota činila 11 %. Jedná se pouze o předběžný výsledek jednoho experimentu, nelze z něj vyvodit závěry ohledně vlivu MKK3 na infekci MPyV.

Výsledky provedených experimentů naznačují, že infekce MPyV není ovlivněna sníženou expresí MKK3. Při studiu vlivu MAP kinázových drah na infekci MPyV (Pokorná, 2017) nebyl zjištěn vliv inhibice p38 na počet infikovaných buněk pozitivních na LT antigen 20 hpi. Situace byla odlišná při inhibici kináz JNK a MEK, kdy byl počet infikovaných buněk snížen. Zdá se tedy, že MKK3 a její funkce v aktivaci MAP kinázy p38 není významným faktorem ovlivňujícím počet buněk infikovaných MPyV ani produkci virového potomstva.

Vliv interakce MKK3 s LT by se mohl projevit v jiných krocích infekce MPyV. Další výzkum by se mohl zaměřit na virovou transkripci a replikaci virové DNA při snížené expresi MKK3.

Lze také uvažovat o možném vlivu MKK3 na fosforylaci LT antigenu. Polyomavirové LT antigeny obsahují různé fosforylační motivy, které mohou být modifikovány buněčnými kinázami a fosfatázami. V případě LT antigenu viru SV40 by popsán vliv fosforylace na jeho schopnost vázat DNA, fosforylace LT může hrát roli v regulaci replikace virové DNA. Fosforylace může ovlivňovat také buněčnou lokalizaci LT a jeho interakci s dalšími proteiny (shrnuto v Moens et al., 2023).

7 Souhrn

Výsledky práce lze shrnout do následujících bodů.

První část diplomové práce byla zaměřena na charakterizaci vlivu proteinu DAXX na infekci MPyV.

- Pomocí qPCR byl porovnáním počtu kopií virového genomu v infikovaných buňkách MEF *Daxx* Tet-On s potlačenou expresí *Daxx* a MEF WT zjištěn pozitivní vliv proteinu DAXX na replikaci virového genomu.
- Pomocí RT-qPCR byl porovnáním hladiny transkriptů pro LT antigen a kapsidový protein VP1 v infikovaných buňkách MEF *Daxx* Tet-On s potlačenou expresí *Daxx* a MEF WT zjištěn pozitivní vliv proteinu DAXX na transkripci MPyV.
- Imunofluorescenční barvení proteinu LT v infikovaných buňkách MEF *Daxx* Tet-On s potlačenou expresí *Daxx* a MEF WT naznačilo možný pozitivní vliv proteinu DAXX na počet infikovaných buněk 24 hpi.

Dalším cílem bylo připravit lidskou buněčnou linii s delecí genu *DAXX* pro účely výzkumu vlivu proteinu DAXX na replikaci BKPyV.

- Po transfekci buněk HEK293 připraveným vektorem pro delecí *DAXX* systémem CRISPR/Cas9 byly izolovány potenciální *DAXX* KO buněčné klony. Po identifikaci klonů, u nichž došlo k delecí *DAXX* bude možné získané buněčné linie využít pro studium role DAXX při infekci BKPyV.

Další část práce byla zaměřena na buněčné interakční partnery LT antigenu MPyV.

- Při imunofluorescenčním značení LT spolu s potenciálními interakčními partnery byl pozorován překryv signálu LT s proteiny BAF57, BAG2, PRC1, WDR48 a MKK3. Tyto proteiny s velkou pravděpodobností s LT interagují.
- Při značení proteinů NONO a SMC4 nebyla pozorována kolokalizace s LT antigenem, interakce s LT v těchto případech nebyla potvrzena.
- Kináza MKK3 kolokalizovala s LT v infikovaných buňkách i v neinfikovaných buňkách exprimujících LT.
- V buňkách infikovaných MPyV bylo metodou western blot detekováno snížené množství proteinu MKK3.
- V buňkách infikovaných MPyV byla metodou western blot detekována zvýšená fosforylace MAP kinázy p38.
- Při snížené expresi MKK3 nebyl ovlivněn počet buněk infikovaných MPyV pozitivních na LT antigen 24 hpi ani 48 hpi.
- Při snížené expresi MKK3 nebyla ovlivněna produkce virového potomstva infikovanými buňkami 48 hpi.

8 Seznam použité literatury

(* přehledové články)

- Adami, G. R., Marlor, C. W., Barrett, N. L., & Carmichael, G. G. (1989). Leader-to-leader splicing is required for efficient production and accumulation of polyomavirus late mRNAs. *Journal of Virology*, 63(1), 85–93. <https://doi.org/10.1128/JVI.63.1.85-93.1989>
- Adamson, A. L., Darr, D., Holley-Guthrie, E., Johnson, R. A., Mauser, A., Swenson, J., & Kenney, S. (2000). Epstein-Barr Virus Immediate-Early Proteins BZLF1 and BRLF1 Activate the ATF2 Transcription Factor by Increasing the Levels of Phosphorylated p38 and c-Jun N-Terminal Kinases. *Journal of Virology*, 74(3), 1224–1233. <https://doi.org/10.1128/jvi.74.3.1224-1233.2000>
- Acheson, N. H. (1978). Polyoma virus giant RNAs contain tandem repeats of the nucleotide sequence of the entire viral genome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 75(10), 4754–4758. <https://doi.org/10.1073/pnas.75.10.4754>
- Albright, E. R., & Kalejta, R. F. (2016). Canonical and Variant Forms of Histone H3 Are Deposited onto the Human Cytomegalovirus Genome during Lytic and Latent Infections. *Journal of Virology*, 90(22), 10309–10320. <https://doi.org/10.1128/jvi.01220-16>
- Ambrosino, C., Mace, G., Galban, S., Fritsch, C., Vintersten, K., Black, E., Gorospe, M., & Nebreda, A. R. (2003). Negative Feedback Regulation of MKK6 mRNA Stability by p38 α Mitogen-Activated Protein Kinase. *Molecular and Cellular Biology*, 23(1), 370–381. <https://doi.org/10.1128/MCB.23.1.370-381.2003>
- An, K., Fattaey, H. K., Paulsen, A. Q., & Consigli, R. A. (2000). Murine polyomavirus infection of 3T6 mouse cells shows evidence of predominant necrosis as well as limited apoptosis. *Virus Research*, 67(1), 81–90. [https://doi.org/10.1016/S0168-1702\(00\)00133-7](https://doi.org/10.1016/S0168-1702(00)00133-7)
- *An, P., Robles, M. T. S., & Pipas, J. M. (2012). Large T Antigens of Polyomaviruses: Amazing Molecular Machines. *Annual Review of Microbiology*, 66, 213–236. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-092611-150154>
- Ananieva, O., Darragh, J., Johansen, C., Carr, J. M., McIlrath, J., Park, J. M., Wingate, A., Monk, C. E., Toth, R., Santos, S. G., Iversen, L., & Arthur, J. S. C. (2008). The kinases MSK1 and MSK2 act as negative regulators of Toll-like receptor signaling. *Nature Immunology*, 9(9), 1028–1036. <https://doi.org/10.1038/ni.1644>
- Andrabi, S., Gjoerup, O. V., Kean, J. A., Roberts, T. M., & Schaffhausen, B. (2007). Protein phosphatase 2A regulates life and death decisions via Akt in a context-dependent manner. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(48), 19011–19016. <https://doi.org/10.1073/pnas.0706696104>
- Asselin, C., Gelin, C., & Bastin, M. (1983). Role of the Three Polyoma Virus Early Proteins in Tumorigenesis. *Molecular and Cellular Biology*, 3(8), 1451–1459. <https://doi.org/10.1128/mcb.3.8.1451-1459.1983>
- Banerjee, P., deJesus, R., Gjoerup, O., & Schaffhausen, B. S. (2013). Viral Interference with DNA Repair by Targeting of the Single-Stranded DNA Binding Protein RPA. *PLOS Pathogens*, 9(10), e1003725. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003725>
- Barouch, D. H., & Harrison, S. C. (1994). Interactions among the major and minor coat proteins of polyomavirus. *Journal of Virology*, 68(6), 3982–3989. <https://doi.org/10.1128/jvi.68.6.3982-3989.1994>
- Becker, K. A., Florin, L., Sapp, C., & Sapp, M. (2003). Dissection of human papillomavirus type 33 L2 domains involved in nuclear domains (ND) 10 homing and reorganization. *Virology*, 314(1), 161–167. [https://doi.org/10.1016/S0042-6822\(03\)00447-1](https://doi.org/10.1016/S0042-6822(03)00447-1)
- Ben-Levy, R., Hooper, S., Wilson, R., Paterson, H. F., & Marshall, C. J. (1998). Nuclear export of the stress-activated protein kinase p38 mediated by its substrate MAPKAP kinase-2. *Current Biology*, 8(19), 1049–1057. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(98\)70442-7](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(98)70442-7)
- Bird, G., O'Donnell, M., Moroianu, J., & Garcea, R. L. (2008). Possible Role for Cellular Karyopherins in Regulating Polyomavirus and Papillomavirus Capsid Assembly. *Journal of Virology*, 82(20), 9848–9857. <https://doi.org/10.1128/JVI.01221-08>
- Boichuk, S., Hu, L., Hein, J., & Gjoerup, O. V. (2010). Multiple DNA Damage Signaling and Repair Pathways Deregulated by Simian Virus 40 Large T Antigen. *Journal of Virology*, 84(16), 8007–8020. <https://doi.org/10.1128/jvi.00334-10>
- Boichuk, S., Hu, L., Makielski, K., Pandolfi, P. P., & Gjoerup, O. V. (2011). Functional Connection between Rad51 and PML in Homology-Directed Repair. *PLOS ONE*, 6(10), e25814. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0025814>
- Boutell, C., Cuchet-Lourenço, D., Vanni, E., Orr, A., Glass, M., McFarlane, S., & Everett, R. D. (2011). A Viral Ubiquitin Ligase Has Substrate Preferential SUMO Targeted Ubiquitin Ligase Activity that Counteracts Intrinsic Antiviral Defence. *PLoS Pathogens*, 7(9), e1002245. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002245>

- Brancho, D., Tanaka, N., Jaeschke, A., Ventura, J.-J., Kelkar, N., Tanaka, Y., Kyuuma, M., Takeshita, T., Flavell, R. A., & Davis, R. J. (2003). Mechanism of p38 MAP kinase activation in vivo. *Genes & Development*, *17*(16), 1969–1978. <https://doi.org/10.1101/gad.1107303>
- Buck, C. B., Doorslaer, K. V., Peretti, A., Geoghegan, E. M., Tisza, M. J., An, P., Katz, J. P., Pipas, J. M., McBride, A. A., Camus, A. C., McDermott, A. J., Dill, J. A., Delwart, E., Ng, T. F. F., Farkas, K., Austin, C., Kraberger, S., Davison, W., Pastrana, D. V., & Varsani, A. (2016). The Ancient Evolutionary History of Polyomaviruses. *PLOS Pathogens*, *12*(4), e1005574. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005574>
- Buch, M. H. C., Liaci, A. M., O'Hara, S. D., Garcea, R. L., Neu, U., & Stehle, T. (2015). Structural and Functional Analysis of Murine Polyomavirus Capsid Proteins Establish the Determinants of Ligand Recognition and Pathogenicity. *PLOS Pathogens*, *11*(10), e1005104. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005104>
- Burton, J. C., Okalova, J., & Grimsey, N. J. (2023). Fluorescence resonance energy transfer (FRET) spatiotemporal mapping of atypical P38 reveals an endosomal and cytosolic spatial bias. *Scientific Reports*, *13*(1), 7477. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-33953-y>
- Cabral, J. M., Oh, H. S., & Knipe, D. M. (2018). ATRX promotes maintenance of herpes simplex virus heterochromatin during chromatin stress. *eLife*, *7*, e40228. <https://doi.org/10.7554/eLife.40228>
- Cai, B., Chang, S. H., Becker, E. B. E., Bonni, A., & Xia, Z. (2006). P38 MAP Kinase Mediates Apoptosis through Phosphorylation of BimEL at Ser-65 *. *Journal of Biological Chemistry*, *281*(35), 25215–25222. <https://doi.org/10.1074/jbc.M512627200>
- Cai, X., Chang, D., Rottinghaus, S., & Consigli, R. A. (1994). Expression and purification of recombinant polyomavirus VP2 protein and its interactions with polyomavirus proteins. *Journal of Virology*, *68*(11), 7609–7613. <https://doi.org/10.1128/jvi.68.11.7609-7613.1994>
- *Canovas, B., & Nebreda, A. R. (2021). Diversity and versatility of p38 kinase signalling in health and disease. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, *22*(5), 346–366. <https://doi.org/10.1038/s41580-020-00322-w>
- Cappadocia, L., Masclé, X. H., Bourdeau, V., Tremblay-Belzile, S., Chaker-Margot, M., Lussier-Price, M., Wada, J., Sakaguchi, K., Aubry, M., Ferbeyre, G., & Omichinski, J. G. (2015). Structural and Functional Characterization of the Phosphorylation-Dependent Interaction between PML and SUMO1. *Structure*, *23*(1), 126–138. <https://doi.org/10.1016/j.str.2014.10.015>
- Carbone, M., Ascione, G., Chichiarelli, S., Garcia, M.-I., Eufemi, M., & Amati, P. (2004). Chromosome-Protein Interactions in Polyomavirus Virions. *Journal of Virology*, *78*(1), 513–519. <https://doi.org/10.1128/jvi.78.1.513-519.2004>
- Carbone, M., Reale, A., Di Sauro, A., Sthandier, O., Garcia, M.-I., Maione, R., Caiafa, P., & Amati, P. (2006). PARP-1 Interaction with VP1 Capsid Protein Regulates Polyomavirus Early Gene Expression†. *Journal of Molecular Biology*, *363*(4), 773–785. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2006.05.077>
- *Cargnello, M., & Roux, P. P. (2011). Activation and Function of the MAPKs and Their Substrates, the MAPK-Activated Protein Kinases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* : *MMBR*, *75*(1), 50–83. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00031-10>
- *Carmichael, G. G. (2016). Gene Regulation and Quality Control in Murine Polyomavirus Infection. *Viruses*, *8*(10), 284. <https://doi.org/10.3390/v8100284>
- Carmichael, G. G., Schaffhausen, B. S., Dorsky, D. I., Oliver, D. B., & Benjamin, T. L. (1982). Carboxy terminus of polyoma middle-sized tumor antigen is required for attachment to membranes, associated protein kinase activities, and cell transformation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *79*(11), 3579–3583. <https://doi.org/10.1073/pnas.79.11.3579>
- Carraro, M., Hendriks, I. A., Hammond, C. M., Solis-Mezarino, V., Völker-Albert, M., Elsborg, J. D., Weisser, M. B., Spanos, C., Montoya, G., Rappsilber, J., Imhof, A., Nielsen, M. L., & Groth, A. (2023). DAXX adds a de novo H3.3K9me3 deposition pathway to the histone chaperone network. *Molecular Cell*, *83*(7), 1075–1092.e9. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2023.02.009>
- Caruso, M., Belloni, L., Sthandier, O., Amati, P., & Garcia, M.-I. (2003). A4β1 Integrin Acts as a Cell Receptor for Murine Polyomavirus at the Postattachment Level. *Journal of Virology*, *77*(7), 3913–3921. <https://doi.org/10.1128/jvi.77.7.3913-3921.2003>
- Cohen, C., Corpet, A., Roubille, S., Maroui, M. A., Poccardi, N., Rousseau, A., Kleijwegt, C., Binda, O., Texier, P., Sawtell, N., Labetoulle, M., & Lomonte, P. (2018). Promyelocytic leukemia (PML) nuclear bodies (NBs) induce latent/quiescent HSV-1 genomes chromatinization through a PML NB/Histone H3.3/H3.3 Chaperone Axis. *PLOS Pathogens*, *14*(9), e1007313. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007313>
- *Corpet, A., Kleijwegt, C., Roubille, S., Juillard, F., Jacquet, K., Texier, P., & Lomonte, P. (2020). PML nuclear bodies and chromatin dynamics: Catch me if you can. *Nucleic Acids Research*, *48*(21), 11890–11912. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa828>
- Corpet, A., Olbrich, T., Gwerder, M., Fink, D., & Stucki, M. (2014). Dynamics of histone H3.3 deposition in proliferating and senescent cells reveals a DAXX-dependent targeting to PML-NBs important for

- pericentromeric heterochromatin organization. *Cell Cycle*, 13(2), 249–267. <https://doi.org/10.4161/cc.26988>
- Côté-Martin, A., Moody, C., Fradet-Turcotte, A., D’Abramo, C. M., Lehoux, M., Joubert, S., Poirier, G. G., Coulombe, B., Laimins, L. A., & Archambault, J. (2008). Human Papillomavirus E1 Helicase Interacts with the WD Repeat Protein p80 To Promote Maintenance of the Viral Genome in Keratinocytes. *Journal of Virology*, 82(3), 1271–1283. <https://doi.org/10.1128/jvi.01405-07>
- Courtneidge, S. A., & Smith, A. E. (1983). Polyoma virus transforming protein associates with the product of the c-src cellular gene. *Nature*, 303(5916), 435–439. <https://doi.org/10.1038/303435a0>
- Crawford, L. V., Syrett, C., & Wilde, A. (1973). The Replication of Polyoma DNA. *Journal of General Virology*, 21(3), 515–521. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-21-3-515>
- Cuchet-Lourenço, D., Boutell, C., Lukashchuk, V., Grant, K., Sykes, A., Murray, J., Orr, A., & Everett, R. D. (2011). SUMO Pathway Dependent Recruitment of Cellular Repressors to Herpes Simplex Virus Type 1 Genomes. *PLOS Pathogens*, 7(7), e1002123. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002123>
- Dawe, C. J., Freund, R., Mandel, G., Ballmer-Hofer, K., Talmage, D. A., & Benjamin, T. L. (1987). Variations in polyoma virus genotype in relation to tumor induction in mice. Characterization of wild type strains with widely differing tumor profiles. *The American Journal of Pathology*, 127(2), 243–261.
- Deak, M., Clifton, A. D., Lucocq, J. M., & Alessi, D. R. (1998). Mitogen- and stress-activated protein kinase-1 (MSK1) is directly activated by MAPK and SAPK2/p38, and may mediate activation of CREB. *The EMBO Journal*, 17(15), 4426–4441. <https://doi.org/10.1093/emboj/17.15.4426>
- del Barco Barrantes, I., Coya, J. M., Maina, F., Arthur, J. S. C., & Nebreda, A. R. (2011). Genetic analysis of specific and redundant roles for p38 α and p38 β MAPKs during mouse development. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(31), 12764–12769. <https://doi.org/10.1073/pnas.1015013108>
- Delbarre, E., Ivanauskienė, K., Küntziger, T., & Collas, P. (2013). DAXX-dependent supply of soluble (H3.3–H4) dimers to PML bodies pending deposition into chromatin. *Genome Research*, 23(3), 440–451. <https://doi.org/10.1101/gr.142703.112>
- Delbarre, E., Ivanauskienė, K., Spirkoski, J., Shah, A., Vekterud, K., Moskaug, J. Ø., Bøe, S. O., Wong, L. H., Küntziger, T., & Collas, P. (2017). PML protein organizes heterochromatin domains where it regulates histone H3.3 deposition by ATRX/DAXX. *Genome Research*, 27(6), 913–921. <https://doi.org/10.1101/gr.215830.116>
- DeNizio, J. E., Elsässer, S. J., & Black, B. E. (2014). DAXX co-folds with H3.3/H4 using high local stability conferred by the H3.3 variant recognition residues. *Nucleic Acids Research*, 42(7), 4318–4331. <https://doi.org/10.1093/nar/gku090>
- Dérjard, B., Raingeaud, J., Barrett, T., Wu, I.-H., Han, J., Ulevitch, R. J., & Davis, R. J. (1995). Independent Human MAP-Kinase Signal Transduction Pathways Defined by MEK and MKK Isoforms. *Science*, 267(5198), 682–685. <https://doi.org/10.1126/science.7839144>
- Desjardins, P., Pilon, AndréA., Hassell, J. A., & Mes-Masson, A.-M. (1997). Polyomavirus large T-antigen binds the ‘pRb related’ protein p130 through sequences in conserved region 2. *Virus Research*, 47(1), 85–90. [https://doi.org/10.1016/S0168-1702\(96\)01404-9](https://doi.org/10.1016/S0168-1702(96)01404-9)
- Dey, D. C., Bronson, R. P., Dahl, J., Carroll, J. P., & Benjamin, T. L. (2000). Accelerated development of polyoma tumors and embryonic lethality: Different effects of p53 loss on related mouse backgrounds. *Cell Growth & Differentiation: The Molecular Biology Journal of the American Association for Cancer Research*, 11(5), 231–237.
- Dey, D., Dahl, J., Cho, S., & Benjamin, T. L. (2002). Induction and Bypass of p53 during Productive Infection by Polyomavirus. *Journal of Virology*, 76(18), 9526–9532. <https://doi.org/10.1128/jvi.76.18.9526-9532.2002>
- Dilworth, S. M., & Griffin, B. E. (1982). Monoclonal antibodies against polyoma virus tumor antigens. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 79(4), 1059–1063. <https://doi.org/10.1073/pnas.79.4.1059>
- Ding, S., Wang, H., Liao, Y., Chen, R., Hu, Y., Wu, H., Shen, H., & Tang, S. (2023). HPV16 E7 protein antagonizes TNF- α -induced apoptosis of cervical cancer cells via Daxx/JNK pathway. *Microbial Pathogenesis*, 185, 106423. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2023.106423>
- Dobson, S. J., Anene, A., Boyne, J. R., Mankouri, J., Macdonald, A., & Whitehouse, A. (2020). Merkel cell polyomavirus small tumour antigen activates the p38 MAPK pathway to enhance cellular motility. *Biochemical Journal*, 477(14), 2721–2733. <https://doi.org/10.1042/BCJ20200399>
- Drané, P., Ouararhni, K., Depaux, A., Shuaib, M., & Hamiche, A. (2010). The death-associated protein DAXX is a novel histone chaperone involved in the replication-independent deposition of H3.3. *Genes & Development*, 24(12), 1253–1265. <https://doi.org/10.1101/gad.566910>
- Dupzyk, A., & Tsai, B. (2018). Bag2 Is a Component of a Cytosolic Extraction Machinery That Promotes Membrane Penetration of a Nonenveloped Virus. *Journal of Virology*, 92(15), e00607-18. <https://doi.org/10.1128/JVI.00607-18>

- Ecsedy, J. A., Michaelson, J. S., & Leder, P. (2003). Homeodomain-Interacting Protein Kinase 1 Modulates Daxx Localization, Phosphorylation, and Transcriptional Activity. *Molecular and Cellular Biology*, 23(3), 950–960. <https://doi.org/10.1128/MCB.23.3.950-960.2003>
- Elsässer, S. J., Huang, H., Lewis, P. W., Chin, J. W., Allis, C. D., & Patel, D. J. (2012). DAXX envelops a histone H3.3–H4 dimer for H3.3-specific recognition. *Nature*, 491(7425), 560–565. <https://doi.org/10.1038/nature11608>
- Elsässer, S. J., Noh, K.-M., Diaz, N., Allis, C. D., & Banaszynski, L. A. (2015). Histone H3.3 is required for endogenous retroviral element silencing in embryonic stem cells. *Nature*, 522(7555), 240–244. <https://doi.org/10.1038/nature14345>
- Emelyanov, A. V., Kovac, C. R., Sepulveda, M. A., & Birshtein, B. K. (2002). The Interaction of Pax5 (BSAP) with Daxx Can Result in Transcriptional Activation in B Cells *. *Journal of Biological Chemistry*, 277(13), 11156–11164. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111763200>
- Enslin, H., Branchio, D. M., & Davis, R. J. (2000). Molecular determinants that mediate selective activation of p38 MAP kinase isoforms. *The EMBO Journal*, 19(6), 1301–1311. <https://doi.org/10.1093/emboj/19.6.1301>
- Enslin, H., Raingeaud, J., & Davis, R. J. (1998). Selective Activation of p38 Mitogen-activated Protein (MAP) Kinase Isoforms by the MAP Kinase Kinases MKK3 and MKK6 *. *Journal of Biological Chemistry*, 273(3), 1741–1748. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.3.1741>
- Erickson, K. D., Bouchet-Marquis, C., Heiser, K., Szomolanyi-Tsuda, E., Mishra, R., Lamothe, B., Hoenger, A., & Garcea, R. L. (2012). Virion Assembly Factories in the Nucleus of Polyomavirus-Infected Cells. *PLOS Pathogens*, 8(4), e1002630. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002630>
- Escobar-Cabrera, E., Lau, D. K. W., Giovinazzi, S., Ishov, A. M., & McIntosh, L. P. (2010). Structural Characterization of the DAXX N-Terminal Helical Bundle Domain and Its Complex with Rassf1C. *Structure*, 18(12), 1642–1653. <https://doi.org/10.1016/j.str.2010.09.016>
- Escobar-Cabrera, E., Okon, M., Lau, D. K. W., Dart, C. F., Bonvin, A. M. J. J., & McIntosh, L. P. (2011). Characterizing the N- and C-terminal Small Ubiquitin-like Modifier (SUMO)-interacting Motifs of the Scaffold Protein DAXX *. *Journal of Biological Chemistry*, 286(22), 19816–19829. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.231647>
- Everett, R. D., Earnshaw, W. C., Pluta, A. F., Sternsdorf, T., Ainsztein, A. M., Carmena, M., Ruchaud, S., Hsu, W.-L., & Orr, A. (1999). A dynamic connection between centromeres and ND10 proteins. *Journal of Cell Science*, 112(20), 3443–3454. <https://doi.org/10.1242/jcs.112.20.3443>
- Everett, R. D., Rechter, S., Papior, P., Tavalai, N., Stamminger, T., & Orr, A. (2006). PML Contributes to a Cellular Mechanism of Repression of Herpes Simplex Virus Type 1 Infection That Is Inactivated by ICP0. *Journal of Virology*, 80(16), 7995–8005. <https://doi.org/10.1128/jvi.00734-06>
- Faust, D., Dolado, I., Cuadrado, A., Oesch, F., Weiss, C., Nebreda, A. R., & Dietrich, C. (2005). P38alpha MAPK is required for contact inhibition. *Oncogene*, 24(53), 7941–7945. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1208948>
- Faust, D., Schmitt, C., Oesch, F., Oesch-Bartlomowicz, B., Schreck, I., Weiss, C., & Dietrich, C. (2012). Differential p38-dependent signalling in response to cellular stress and mitogenic stimulation in fibroblasts. *Cell Communication and Signaling*, 10(1), 6. <https://doi.org/10.1186/1478-811X-10-6>
- Feng, H., Shuda, M., Chang, Y., & Moore, P. S. (2008). Clonal Integration of a Polyomavirus in Human Merkel Cell Carcinoma. *Science*, 319(5866), 1096–1100. <https://doi.org/10.1126/science.1152586>
- Florin, L., Schäfer, F., Sotlar, K., Streeck, R. E., & Sapp, M. (2002). Reorganization of Nuclear Domain 10 Induced by Papillomavirus Capsid Protein L2. *Virology*, 295(1), 97–107. <https://doi.org/10.1006/viro.2002.1360>
- *Fluck, M. M., & Schaffhausen, B. S. (2009). Lessons in signaling and tumorigenesis from polyomavirus middle T antigen. *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR*, 73(3), 542–563. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00009-09>
- Forstová, J., Krauzewicz, N., Wallace, S., Street, A. J., Dilworth, S. M., Beard, S., & Griffin, B. E. (1993). Cooperation of structural proteins during late events in the life cycle of polyomavirus. *Journal of Virology*, 67(3), 1405–1413. <https://doi.org/10.1128/jvi.67.3.1405-1413.1993>
- Francke, B., & Eckhart, W. (1973). Polyoma gene function required for viral DNA synthesis. *Virology*, 55(1), 127–135. [https://doi.org/10.1016/S0042-6822\(73\)81014-1](https://doi.org/10.1016/S0042-6822(73)81014-1)
- Gardner, Sylvia D., Field, Anne M., Coleman, Dulcie V., & Hulme, B. (1971). New human papovavirus (B.K.) isolated from urine after renal transplantation. *The Lancet*, 297(7712), 1253–1257. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(71\)91776-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(71)91776-4)
- Garren, S. B., Kondaveeti, Y., Duff, M. O., & Carmichael, G. G. (2015). Global Analysis of Mouse Polyomavirus Infection Reveals Dynamic Regulation of Viral and Host Gene Expression and Promiscuous Viral RNA Editing. *PLOS Pathogens*, 11(9), e1005166. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005166>

- Gasparovic, M. L., Maginnis, M. S., O'Hara, B. A., Dugan, A. S., & Atwood, W. J. (2009). Modulation of PML protein expression regulates JCV infection. *Virology*, *390*(2), 279–288. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2009.05.017>
- Ge, B., Gram, H., Di Padova, F., Huang, B., New, L., Ulevitch, R. J., Luo, Y., & Han, J. (2002). MAPKK-Independent Activation of p38 α Mediated by TAB1-Dependent Autophosphorylation of p38 α . *Science*, *295*(5558), 1291–1294. <https://doi.org/10.1126/science.1067289>
- Giardino Torchia, M. L., Dutta, D., Mittelstadt, P. R., Guha, J., Gaida, M. M., Fish, K., Barr, V. A., Akpan, I. O., Samelson, L. E., Tagad, H. D., Debnath, S., Miller Jenkins, L. M., Appella, E., & Ashwell, J. D. (2018). Intensity and duration of TCR signaling is limited by p38 phosphorylation of ZAP-70T293 and destabilization of the signalosome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *115*(9), 2174–2179. <https://doi.org/10.1073/pnas.1713301115>
- Gibbons, R. J., Wada, T., Fisher, C. A., Malik, N., Mitson, M. J., Steensma, D. P., Fryer, A., Goudie, D. R., Krantz, I. D., & Traeger-Synodinos, J. (2008). Mutations in the chromatin-associated protein ATRX. *Human Mutation*, *29*(6), 796–802. <https://doi.org/10.1002/humu.20734>
- Gillis, P. A., Okagaki, L. H., & Rice, S. A. (2009). Herpes Simplex Virus Type 1 ICP27 Induces p38 Mitogen-Activated Protein Kinase Signaling and Apoptosis in HeLa Cells. *Journal of Virology*, *83*(4), 1767–1777. <https://doi.org/10.1128/jvi.01944-08>
- Glass, M., & Everett, R. D. (2013). Components of Promyelocytic Leukemia Nuclear Bodies (ND10) Act Cooperatively To Repress Herpesvirus Infection. *Journal of Virology*, *87*(4), 2174–2185. <https://doi.org/10.1128/jvi.02950-12>
- Goldberg, A. D., Banaszynski, L. A., Noh, K.-M., Lewis, P. W., Elsaesser, S. J., Stadler, S., Dewell, S., Law, M., Guo, X., Li, X., Wen, D., Chapgier, A., DeKolver, R. C., Miller, J. C., Lee, Y.-L., Boydston, E. A., Holmes, M. C., Gregory, P. D., Grealley, J. M., ... Allis, C. D. (2010). Distinct Factors Control Histone Variant H3.3 Localization at Specific Genomic Regions. *Cell*, *140*(5), 678–691. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.01.003>
- Golebiowski, F., Matic, I., Tatham, M. H., Cole, C., Yin, Y., Nakamura, A., Cox, J., Barton, G. J., Mann, M., & Hay, R. T. (2009). System-wide changes to SUMO modifications in response to heat shock. *Science Signaling*, *2*(72), ra24. <https://doi.org/10.1126/scisignal.2000282>
- Gongora, R., Stephan, R. P., Zhang, Z., & Cooper, M. D. (2001). An Essential Role for Daxx in the Inhibition of B Lymphopoiesis by Type I Interferons. *Immunity*, *14*(6), 727–737. [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(01\)00152-2](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(01)00152-2)
- Gonnella, R., Granato, M., Farina, A., Santarelli, R., Faggioni, A., & Cirone, M. (2015). PKC theta and p38 MAPK activate the EBV lytic cycle through autophagy induction. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, *1853*(7), 1586–1595. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2015.03.011>
- Gross, L. (1953). A Filterable Agent, Recovered from Ak Leukemic Extracts, Causing Salivary Gland Carcinomas in C3H Mice. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, *83*(2), 414–421. <https://doi.org/10.3181/00379727-83-20376>
- Gu, H., & Roizman, B. (2003). The degradation of promyelocytic leukemia and Sp100 proteins by herpes simplex virus 1 is mediated by the ubiquitin-conjugating enzyme UbcH5a. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *100*(15), 8963–8968. <https://doi.org/10.1073/pnas.1533420100>
- Gu, R., Zhang, Z., DeCerbo, J. N., & Carmichael, G. G. (2009). Gene regulation by sense–antisense overlap of polyadenylation signals. *RNA*, *15*(6), 1154–1163. <https://doi.org/10.1261/rna.1608909>
- Gubern, A., Joaquin, M., Marquès, M., Maseres, P., Garcia-Garcia, J., Amat, R., González-Nuñez, D., Oliva, B., Real, F. X., de Nadal, E., & Posas, F. (2016). The N-Terminal Phosphorylation of RB by p38 Bypasses Its Inactivation by CDKs and Prevents Proliferation in Cancer Cells. *Molecular Cell*, *64*(1), 25–36. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.08.015>
- Guo, W., Tang, W. J., Bu, X., Bermudez, V., Martin, M., & Folk, W. R. (1996). AP1 enhances polyomavirus DNA replication by promoting T-antigen-mediated unwinding of DNA. *Journal of Virology*, *70*(8), 4914–4918. <https://doi.org/10.1128/jvi.70.8.4914-4918.1996>
- *Han, J., Wu, J., & Silke, J. (2020). An overview of mammalian p38 mitogen-activated protein kinases, central regulators of cell stress and receptor signaling. *F1000Research*, *9*, F1000 Faculty Rev-653. <https://doi.org/10.12688/f1000research.22092.1>
- Heiser, K., Nicholas, C., & Garcea, R. L. (2016). Activation of DNA damage repair pathways by murine polyomavirus. *Virology*, *497*, 346–356. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2016.07.028>
- Hoelper, D., Huang, H., Jain, A. Y., Patel, D. J., & Lewis, P. W. (2017). Structural and mechanistic insights into ATRX-dependent and -independent functions of the histone chaperone DAXX. *Nature Communications*, *8*(1), 1193. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-01206-y>
- Hollenbach, A. D., McPherson, C. J., Mientjes, E. J., Iyengar, R., & Grosveld, G. (2002). Daxx and histone deacetylase II associate with chromatin through an interaction with core histones and the chromatin-

- associated protein Dek. *Journal of Cell Science*, 115(16), 3319–3330.
<https://doi.org/10.1242/jcs.115.16.3319>
- Hollenbach, A. D., Sublett, J. E., McPherson, C. J., & Grosveld, G. (1999). The Pax3–FKHR oncoprotein is unresponsive to the Pax3-associated repressor hDaxx. *The EMBO Journal*, 18(13), 3702–3711.
<https://doi.org/10.1093/emboj/18.13.3702>
- Horníková, L., Žíla, V., Španielová, H., & Forstová, J. (2015). Mouse Polyomavirus: Propagation, Purification, Quantification, and Storage. *Current Protocols in Microbiology*, 38(1), 14F.1.1–14F.1.26.
<https://doi.org/10.1002/9780471729259.mc14f01s38>
- Hu, S., Sheng, W. S., Schachtele, S. J., & Lokensgard, J. R. (2011). Reactive oxygen species drive herpes simplex virus (HSV)-1-induced proinflammatory cytokine production by murine microglia. *Journal of Neuroinflammation*, 8(1), 123. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-8-123>
- Huang, H., Deng, Z., Vladimirova, O., Wiedmer, A., Lu, F., Lieberman, P. M., & Patel, D. J. (2016). Structural basis underlying viral hijacking of a histone chaperone complex. *Nature Communications*, 7(1), 12707. <https://doi.org/10.1038/ncomms12707>
- Huang, L., Agrawal, T., Zhu, G., Yu, S., Tao, L., Lin, J., Marmorstein, R., Shorter, J., & Yang, X. (2021). DAXX represents a new type of protein-folding enabler. *Nature*, 597(7874), 132–137.
<https://doi.org/10.1038/s41586-021-03824-5>
- Huang, Y.-S., & Shih, H.-M. (2009). Daxx positively modulates β -catenin/TCF4-mediated transcriptional potential. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 386(4), 762–768.
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2009.06.126>
- Huérffano, S., Ryabchenko, B., Španielová, H., & Forstová, J. (2017). Hydrophobic domains of mouse polyomavirus minor capsid proteins promote membrane association and virus exit from the ER. *The FEBS Journal*, 284(6), 883–902. <https://doi.org/10.1111/febs.14033>
- Huerfano, S., Žíla, V., Bouřa, E., Španielová, H., Štokrová, J., & Forstová, J. (2010). Minor capsid proteins of mouse polyomavirus are inducers of apoptosis when produced individually but are only moderate contributors to cell death during the late phase of viral infection. *The FEBS Journal*, 277(5), 1270–1283. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2010.07558.x>
- Hwang, J., & Kalejta, R. F. (2007). Proteasome-dependent, ubiquitin-independent degradation of Daxx by the viral pp71 protein in human cytomegalovirus-infected cells. *Virology*, 367(2), 334–338.
<https://doi.org/10.1016/j.virol.2007.05.037>
- Hwang, J., & Kalejta, R. F. (2009). Human Cytomegalovirus Protein pp71 Induces Daxx SUMOylation. *Journal of Virology*, 83(13), 6591–6598. <https://doi.org/10.1128/jvi.02639-08>
- Hyka, L. (2019). Study of exosomes in polyomavirus infection. Diplomová práce, Univerzita Karlova, Přírodovědecká fakulta, Praha. <https://dspace.cuni.cz/handle/20.500.11956/109563>
- *Chander, Y., Kumar, R., Khandelwal, N., Singh, N., Shringi, B. N., Barua, S., & Kumar, N. (2021). Role of p38 mitogen-activated protein kinase signalling in virus replication and potential for developing broad spectrum antiviral drugs. *Reviews in Medical Virology*, 31(5), e2217. <https://doi.org/10.1002/rmv.2217>
- Chang, C.-C., Naik, M. T., Huang, Y.-S., Jeng, J.-C., Liao, P.-H., Kuo, H.-Y., Ho, C.-C., Hsieh, Y.-L., Lin, C.-H., Huang, N.-J., Naik, N. M., Kung, C. C.-H., Lin, S.-Y., Chen, R.-H., Chang, K.-S., Huang, T.-H., & Shih, H.-M. (2011). Structural and Functional Roles of Daxx SIM Phosphorylation in SUMO Paralog-Selective Binding and Apoptosis Modulation. *Molecular Cell*, 42(1), 62–74.
<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2011.02.022>
- Chang, H. Y., Nishitoh, H., Yang, X., Ichijo, H., & Baltimore, D. (1998). Activation of Apoptosis Signal-Regulating Kinase 1 (ASK1) by the Adapter Protein Daxx. *Science*, 281(5384), 1860–1863.
<https://doi.org/10.1126/science.281.5384.1860>
- Chang, W.-W., Su, I.-J., Lai, M.-D., Chang, W.-T., Huang, W., & Lei, H.-Y. (2008). Suppression of p38 mitogen-activated protein kinase inhibits hepatitis B virus replication in human hepatoma cell: The antiviral role of nitric oxide. *Journal of Viral Hepatitis*, 15(7), 490–497. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2893.2008.00968.x>
- Charette, S. J., Lavoie, J. N., Lambert, H., & Landry, J. (2000). Inhibition of Daxx-Mediated Apoptosis by Heat Shock Protein 27. *Molecular and Cellular Biology*, 20(20), 7602–7612.
<https://doi.org/10.1128/MCB.20.20.7602-7612.2000>
- Chen, A., Wang, P.-Y., Yang, Y.-C., Huang, Y.-H., Yeh, J.-J., Chou, Y.-H., Cheng, J.-T., Hong, Y.-R., & Li, S. S.-L. (2006). SUMO regulates the cytoplasmic nuclear transport of its target protein Daxx. *Journal of Cellular Biochemistry*, 98(4), 895–911. <https://doi.org/10.1002/jcb.20703>
- Chen, C., Sun, X., Xie, W., Chen, S., Hu, Y., Xing, D., Xu, J., Chen, X., Zhao, Z., Han, Z., Xue, X., Shen, X., & Lin, K. (2020). Opposing biological functions of the cytoplasm and nucleus DAXX modified by SUMO-2/3 in gastric cancer. *Cell Death & Disease*, 11(7), 514. <https://doi.org/10.1038/s41419-020-2718-3>

- Chen, L., & Fluck, M. (2001). Kinetic Analysis of the Steps of the Polyomavirus Lytic Cycle. *Journal of Virology*, 75(18), 8368–8379. <https://doi.org/10.1128/jvi.75.18.8368-8379.2001>
- Chen, X. S., Stehle, T., & Harrison, S. C. (1998). Interaction of polyomavirus internal protein VP2 with the major capsid protein VP1 and implications for participation of VP2 in viral entry. *The EMBO Journal*, 17(12), 3233–3240. <https://doi.org/10.1093/emboj/17.12.3233>
- Chen, Y., Wang, L., Jin, J., Luan, Y., Chen, C., Li, Y., Chu, H., Wang, X., Liao, G., Yu, Y., Teng, H., Wang, Y., Pan, W., Fang, L., Liao, L., Jiang, Z., Ge, X., Li, B., & Wang, P. (2017). P38 inhibition provides anti-DNA virus immunity by regulation of USP21 phosphorylation and STING activation. *Journal of Experimental Medicine*, 214(4), 991–1010. <https://doi.org/10.1084/jem.20161387>
- Chen, Z., Li, Y.-X., Fu, H.-J., Ren, Y.-L., Zou, L., Shen, S.-Z., Chen, P., Sun, T., & Huang, C.-H. (2017). Hepatitis B Virus Core Antigen Stimulates IL-6 Expression via p38, ERK and NF- κ B Pathways in Hepatocytes. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 41(1), 91–100. <https://doi.org/10.1159/000455954>
- *Cheng, J., DeCaprio, J. A., Fluck, M. M., & Schaffhausen, B. S. (2009). Cellular transformation by Simian Virus 40 and Murine Polyoma Virus T antigens. *Seminars in Cancer Biology*, 19(4), 218–228. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2009.03.002>
- Cheung, P. C. F., Campbell, D. G., Nebreda, A. R., & Cohen, P. (2003). Feedback control of the protein kinase TAK1 by SAPK2 α /p38 α . *The EMBO Journal*, 22(21), 5793–5805. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdg552>
- *Choi, J., Kim, T., & Cho, E.-J. (2024). HIRA vs. DAXX: The two axes shaping the histone H3.3 landscape. *Experimental & Molecular Medicine*, 56(2), 251–263. <https://doi.org/10.1038/s12276-023-01145-3>
- Chromy, L. R., Oltman, A., Estes, P. A., & Garcea, R. L. (2006). Chaperone-Mediated In Vitro Disassembly of Polyoma- and Papillomaviruses. *Journal of Virology*, 80(10), 5086–5091. <https://doi.org/10.1128/jvi.80.10.5086-5091.2006>
- Chromy, L. R., Pipas, J. M., & Garcea, R. L. (2003). Chaperone-mediated in vitro assembly of Polyomavirus capsids. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(18), 10477–10482. <https://doi.org/10.1073/pnas.1832245100>
- Chu, Y., & Yang, X. (2011). SUMO E3 ligase activity of TRIM proteins. *Oncogene*, 30(9), 1108–1116. <https://doi.org/10.1038/onc.2010.462>
- Ichijo, H., Nishida, E., Irie, K., Dijke, P. ten, Saitoh, M., Moriguchi, T., Takagi, M., Matsumoto, K., Miyazono, K., & Gotoh, Y. (1997). Induction of Apoptosis by ASK1, a Mammalian MAPKKK That Activates SAPK/JNK and p38 Signaling Pathways. *Science*, 275(5296), 90–94. <https://doi.org/10.1126/science.275.5296.90>
- Ishov, A. M., & Maul, G. G. (1996). The periphery of nuclear domain 10 (ND10) as site of DNA virus deposition. *Journal of Cell Biology*, 134(4), 815–826. <https://doi.org/10.1083/jcb.134.4.815>
- Ishov, A. M., Sotnikov, A. G., Negorev, D., Vladimirova, O. V., Neff, N., Kamitani, T., Yeh, E. T. H., Strauss, J. F., III, & Maul, G. G. (1999). Pml Is Critical for Nd10 Formation and Recruits the Pml-Interacting Protein Daxx to This Nuclear Structure When Modified by Sumo-1. *Journal of Cell Biology*, 147(2), 221–234. <https://doi.org/10.1083/jcb.147.2.221>
- Ishov, A. M., Vladimirova, O. V., & Maul, G. G. (2004). Heterochromatin and ND10 are cell-cycle regulated and phosphorylation-dependent alternate nuclear sites of the transcription repressor Daxx and SWI/SNF protein ATRX. *Journal of Cell Science*, 117(17), 3807–3820. <https://doi.org/10.1242/jcs.01230>
- Ivanauskienė, K., Delbarre, E., McGhie, J. D., Küntziger, T., Wong, L. H., & Collas, P. (2014). The PML-associated protein DEK regulates the balance of H3.3 loading on chromatin and is important for telomere integrity. *Genome Research*, 24(10), 1584–1594. <https://doi.org/10.1101/gr.173831.114>
- Iwase, S., Xiang, B., Ghosh, S., Ren, T., Lewis, P. W., Cochrane, J. C., Allis, C. D., Picketts, D. J., Patel, D. J., Li, H., & Shi, Y. (2011). ATRX ADD domain links an atypical histone methylation recognition mechanism to human mental-retardation syndrome. *Nature Structural & Molecular Biology*, 18(7), 769–776. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2062>
- Jiang, M., Entezami, P., Gamez, M., Stamminger, T., & Imperiale, M. J. (2011). Functional Reorganization of Promyelocytic Leukemia Nuclear Bodies during BK Virus Infection. *mBio*, 2(1), e00281–10. <https://doi.org/10.1128/mbio.00281-10>
- Johnson, R. A., Huong, S.-M., & Huang, E.-S. (2000). Activation of the Mitogen-Activated Protein Kinase p38 by Human Cytomegalovirus Infection through Two Distinct Pathways: A Novel Mechanism for Activation of p38. *Journal of Virology*, 74(3), 1158–1167. <https://doi.org/10.1128/jvi.74.3.1158-1167.2000>
- Jul-Larsen, Å., Visted, T., Karlsen, B. O., Rinaldo, C. H., Bjerkvig, R., Lønning, P. E., & Bøe, S. O. (2004). PML-nuclear bodies accumulate DNA in response to polyomavirus BK and simian virus 40 replication. *Experimental Cell Research*, 298(1), 58–73. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2004.03.045>
- Justice, J. L., Verhalen, B., Kumar, R., Lefkowitz, E. J., Imperiale, M. J., & Jiang, M. (2015). Quantitative Proteomic Analysis of Enriched Nuclear Fractions from BK Polyomavirus-infected Primary Renal

- Proximal Tubule Epithelial Cells. *Journal of proteome research*, 14(10), 4413–4424. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.5b00737>
- Karaca, G., Hargett, D., McLean, T. I., Aguilar, J. S., Ghazal, P., Wagner, E. K., & Bachenheimer, S. L. (2004). Inhibition of the stress-activated kinase, p38, does not affect the virus transcriptional program of herpes simplex virus type 1. *Virology*, 329(1), 142–156. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2004.08.020>
- Kautz, A. R., Weisshart, K., Schneider, A., Grosse, F., & Nasheuer, H.-P. (2001). Amino Acids 257 to 288 of Mouse p48 Control the Cooperation of Polyomavirus Large T Antigen, Replication Protein A, and DNA Polymerase α -Primase To Synthesize DNA In Vitro. *Journal of Virology*, 75(18), 8569–8578. <https://doi.org/10.1128/jvi.75.18.8569-8578.2001>
- Kern, F. G., Pellegrini, S., Cowie, A., & Basilico, C. (1986). Regulation of polyomavirus late promoter activity by viral early proteins. *Journal of Virology*, 60(1), 275–285. <https://doi.org/10.1128/jvi.60.1.275-285.1986>
- Kim, B.-J., Ryu, S.-W., & Song, B.-J. (2006). JNK- and p38 Kinase-mediated Phosphorylation of Bax Leads to Its Activation and Mitochondrial Translocation and to Apoptosis of Human Hepatoma HepG2 Cells *. *Journal of Biological Chemistry*, 281(30), 21256–21265. <https://doi.org/10.1074/jbc.M510644200>
- Kiriakidou, M., Driscoll, D. A., Lopez-Guisa, J. M., & Strauss, J. F. (1997). Cloning and Expression of Primate Daxx cDNAs and Mapping of the Human Gene to Chromosome 6p21.3 in the MHC Region. *DNA and Cell Biology*, 16(11), 1289–1298. <https://doi.org/10.1089/dna.1997.16.1289>
- Kitagawa, D., Kajihio, H., Negishi, T., Ura, S., Watanabe, T., Wada, T., Ichijo, H., Katada, T., & Nishina, H. (2006). Release of RASSF1C from the nucleus by Daxx degradation links DNA damage and SAPK/JNK activation. *The EMBO Journal*, 25(14), 3286–3297. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601212>
- Kitamura, T., Fukuyo, Y., Inoue, M., Horikoshi, N. T., Shindoh, M., Rogers, B. E., Usheva, A., & Horikoshi, N. (2009). Mutant p53 Disrupts the Stress MAPK Activation Circuit Induced by ASK1-Dependent Stabilization of Daxx. *Cancer Research*, 69(19), 7681–7688. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-2133>
- Kivipõld, P., Vösa, L., Ustav, M., & Kurg, R. (2015). DAXX modulates human papillomavirus early gene expression and genome replication in U2OS cells. *Virology Journal*, 12(1), 104. <https://doi.org/10.1186/s12985-015-0335-z>
- Ko, Y.-G., Kang, Y.-S., Park, H., Seol, W., Kim, J., Kim, T., Park, H.-S., Choi, E.-J., & Kim, S. (2001). Apoptosis Signal-regulating Kinase 1 Controls the Proapoptotic Function of Death-associated Protein (Daxx) in the Cytoplasm *. *Journal of Biological Chemistry*, 276(42), 39103–39106. <https://doi.org/10.1074/jbc.M105928200>
- Kumar, M., & Carmichael, G. G. (1997). Nuclear antisense RNA induces extensive adenosine modifications and nuclear retention of target transcripts. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(8), 3542–3547. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.8.3542>
- Labun, K., Montague, T. G., Krause, M., Torres Cleuren, Y. N., Tjeldnes, H., & Valen, E. (2019). CHOPCHOP v3: Expanding the CRISPR web toolbox beyond genome editing. *Nucleic Acids Research*, 47(W1), W171–W174. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz365>
- Lahaye, X., Gentili, M., Silvin, A., Conrad, C., Picard, L., Jouve, M., Zueva, E., Maurin, M., Nadalin, F., Knott, G. J., Zhao, B., Du, F., Rio, M., Amiel, J., Fox, A. H., Li, P., Etienne, L., Bond, C. S., Colleaux, L., & Manel, N. (2018). NONO Detects the Nuclear HIV Capsid to Promote cGAS-Mediated Innate Immune Activation. *Cell*, 175(2), 488–501.e22. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.08.062>
- Lang, M., Jegou, T., Chung, I., Richter, K., Münch, S., Udvarhelyi, A., Cremer, C., Hemmerich, P., Engelhardt, J., Hell, S. W., & Rippe, K. (2010). Three-dimensional organization of promyelocytic leukemia nuclear bodies. *Journal of Cell Science*, 123(3), 392–400. <https://doi.org/10.1242/jcs.053496>
- Larsen, J. K., Yamboliev, I. A., Weber, L. A., & Gerthoffer, W. T. (1997). Phosphorylation of the 27-kDa heat shock protein via p38 MAP kinase and MAPKAP kinase in smooth muscle. *American Journal of Physiology*, 273(5), L930–L940. <https://doi.org/10.1152/ajplung.1997.273.5.L930>
- Law, M. J., Lower, K. M., Voon, H. P. J., Hughes, J. R., Garrick, D., Viprakasit, V., Mitson, M., Gobbi, M. D., Marra, M., Morris, A., Abbott, A., Wilder, S. P., Taylor, S., Santos, G. M., Cross, J., Ayyub, H., Jones, S., Ragoussis, J., Rhodes, D., ... Gibbons, R. J. (2010). ATR-X Syndrome Protein Targets Tandem Repeats and Influences Allele-Specific Expression in a Size-Dependent Manner. *Cell*, 143(3), 367–378. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.09.023>
- Lewis, P. W., Elsaesser, S. J., Noh, K.-M., Stadler, S. C., & Allis, C. D. (2010). Daxx is an H3.3-specific histone chaperone and cooperates with ATRX in replication-independent chromatin assembly at telomeres. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(32), 14075–14080. <https://doi.org/10.1073/pnas.1008850107>

- Li, H., Leo, C., Zhu, J., Wu, X., O'Neil, J., Park, E.-J., & Chen, J. D. (2000). Sequestration and Inhibition of Daxx-Mediated Transcriptional Repression by PML. *Molecular and Cellular Biology*, 20(5), 1784–1796. <https://doi.org/10.1128/MCB.20.5.1784-1796.2000>
- *Li, J., Dallmayer, M., Kirchner, T., Musa, J., & Grünwald, T. G. P. (2018). PRC1: Linking Cytokinesis, Chromosomal Instability, and Cancer Evolution. *Trends in Cancer*, 4(1), 59–73. <https://doi.org/10.1016/j.trecan.2017.11.002>
- Li, Y., Batra, S., Sassano, A., Majchrzak, B., Levy, D. E., Gaestel, M., Fish, E. N., Davis, R. J., & Platanius, L. C. (2005). Activation of mitogen-activated protein kinase kinase (MKK) 3 and MKK6 by type I interferons. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(11), 10001–10010. <https://doi.org/10.1074/jbc.M410972200>
- Liang, F., Miller, A. S., Tang, C., Maranon, D., Williamson, E. A., Hromas, R., Wiese, C., Zhao, W., Sung, P., & Kupfer, G. M. (2020). The DNA-binding activity of USP1-associated factor 1 is required for efficient RAD51-mediated homologous DNA pairing and homology-directed DNA repair. *Journal of Biological Chemistry*, 295(24), 8186–8194. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA120.013714>
- Liebl, D., Difato, F., Horníková, L., Mannová, P., Štokrová, J., & Forstová, J. (2006). Mouse Polyomavirus Enters Early Endosomes, Requires Their Acidic pH for Productive Infection, and Meets Transferrin Cargo in Rab11-Positive Endosomes. *Journal of Virology*, 80(9), 4610–4622. <https://doi.org/10.1128/jvi.80.9.4610-4622.2006>
- Lilley, B. N., Gilbert, J. M., Ploegh, H. L., & Benjamin, T. L. (2006). Murine Polyomavirus Requires the Endoplasmic Reticulum Protein Derlin-2 To Initiate Infection. *Journal of Virology*, 80(17), 8739–8744. <https://doi.org/10.1128/jvi.00791-06>
- Lin, D.-Y., Huang, Y.-S., Jeng, J.-C., Kuo, H.-Y., Chang, C.-C., Chao, T.-T., Ho, C.-C., Chen, Y.-C., Lin, T.-P., Fang, H.-I., Hung, C.-C., Suen, C.-S., Hwang, M.-J., Chang, K.-S., Maul, G. G., & Shih, H.-M. (2006). Role of SUMO-Interacting Motif in Daxx SUMO Modification, Subnuclear Localization, and Repression of Sumoylated Transcription Factors. *Molecular Cell*, 24(3), 341–354. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2006.10.019>
- Liu, C.-P., Xiong, C., Wang, M., Yu, Z., Yang, N., Chen, P., Zhang, Z., Li, G., & Xu, R.-M. (2012). Structure of the variant histone H3.3–H4 heterodimer in complex with its chaperone DAXX. *Nature Structural & Molecular Biology*, 19(12), 1287–1292. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2439>
- Liu, X., & Cohen, J. I. (2015). Epstein-Barr Virus (EBV) Tegument Protein BGLF2 Promotes EBV Reactivation through Activation of the p38 Mitogen-Activated Protein Kinase. *Journal of Virology*, 90(2), 1129–1138. <https://doi.org/10.1128/jvi.01410-15>
- *Lomelí, H., & Castillo-Robles, J. (2016). The developmental and pathogenic roles of BAF57, a special subunit of the BAF chromatin-remodeling complex. *FEBS Letters*, 590(11), 1555–1569. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.12201>
- Love, T. M., de Jesus, R., Kean, J. A., Sheng, Q., Leger, A., & Schaffhausen, B. (2005). Activation of CREB/ATF Sites by Polyomavirus Large T Antigen. *Journal of Virology*, 79(7), 4180–4190. <https://doi.org/10.1128/jvi.79.7.4180-4190.2005>
- Lu, G., Kang, Y. J., Han, J., Herschman, H. R., Stefani, E., & Wang, Y. (2006). TAB-1 Modulates Intracellular Localization of p38 MAP Kinase and Downstream Signaling *. *Journal of Biological Chemistry*, 281(9), 6087–6095. <https://doi.org/10.1074/jbc.M507610200>
- Lu, H., Yang, D. D., Wysk, M., Gatti, E., Mellman, I., Davis, R. J., & Flavell, R. A. (1999). Defective IL-12 production in mitogen-activated protein (MAP) kinase kinase 3 (Mkk3)-deficient mice. *The EMBO Journal*, 18(7), 1845–1857. <https://doi.org/10.1093/emboj/18.7.1845>
- Lu, Y., Orr, A., & Everett, R. D. (2016). Stimulation of the Replication of ICP0-Null Mutant Herpes Simplex Virus 1 and pp71-Deficient Human Cytomegalovirus by Epstein-Barr Virus Tegument Protein BNRF1. *Journal of Virology*, 90(21), 9664–9673. <https://doi.org/10.1128/jvi.01224-16>
- Lukashchuk, V., & Everett, R. D. (2010). Regulation of ICP0-Null Mutant Herpes Simplex Virus Type 1 Infection by ND10 Components ATRX and hDaxx. *Journal of Virology*, 84(8), 4026–4040. <https://doi.org/10.1128/jvi.02597-09>
- Lukashchuk, V., McFarlane, S., Everett, R. D., & Preston, C. M. (2008). Human Cytomegalovirus Protein pp71 Displaces the Chromatin-Associated Factor ATRX from Nuclear Domain 10 at Early Stages of Infection. *Journal of Virology*, 82(24), 12543–12554. <https://doi.org/10.1128/jvi.01215-08>
- Magnuson, B., Rainey, E. K., Benjamin, T., Baryshev, M., Mkrtchian, S., & Tsai, B. (2005). ERp29 triggers a conformational change in polyomavirus to stimulate membrane binding. *Molecular Cell*, 20(2), 289–300. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2005.08.034>
- *Mahmud, I., & Liao, D. (2019). DAXX in cancer: Phenomena, processes, mechanisms and regulation. *Nucleic Acids Research*, 47(15), 7734–7752. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz634>
- Mahtani, K. R., Brook, M., Dean, J. L. E., Sully, G., Saklatvala, J., & Clark, A. R. (2001). Mitogen-Activated Protein Kinase p38 Controls the Expression and Posttranslational Modification of Tristetraprolin, a

- Regulator of Tumor Necrosis Factor Alpha mRNA Stability. *Molecular and Cellular Biology*, 21(19), 6461–6469. <https://doi.org/10.1128/MCB.21.9.6461-6469.2001>
- Maillet, S., Fernandez, J., Decourcelle, M., El Koulali, K., Blanchet, F. P., Arhel, N. J., Maarifi, G., & Nisole, S. (2020). Daxx Inhibits HIV-1 Reverse Transcription and Uncoating in a SUMO-Dependent Manner. *Viruses*, 12(6), 636. <https://doi.org/10.3390/v12060636>
- Maione, R., Fimia, G. M., Holman, P., Schaffhausen, B., & Amati, P. (1994). Retinoblastoma antioncogene is involved in the inhibition of myogenesis by polyomavirus large T antigen. *Cell Growth & Differentiation: The Molecular Biology Journal of the American Association for Cancer Research*, 5(2), 231–237.
- Marinoni, I., Kurrer, A. S., Vassella, E., Dettmer, M., Rudolph, T., Banz, V., Hunger, F., Pasquinelli, S., Speel, E.-J., & Perren, A. (2014). Loss of DAXX and ATRX Are Associated With Chromosome Instability and Reduced Survival of Patients With Pancreatic Neuroendocrine Tumors. *Gastroenterology*, 146(2), 453–460.e5. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2013.10.020>
- Masclé, X. H., Gagnon, C., Wahba, H. M., Lussier-Price, M., Cappadocia, L., Sakaguchi, K., & Omichinski, J. G. (2020). Acetylation of SUMO1 Alters Interactions with the SIMs of PML and Daxx in a Protein-Specific Manner. *Structure*, 28(2), 157–168.e5. <https://doi.org/10.1016/j.str.2019.11.019>
- McDowell, T. L., Gibbons, R. J., Sutherland, H., O'Rourke, D. M., Bickmore, W. A., Pombo, A., Turley, H., Gatter, K., Picketts, D. J., Buckle, V. J., Chapman, L., Rhodes, D., & Higgs, D. R. (1999). Localization of a putative transcriptional regulator (ATRX) at pericentromeric heterochromatin and the short arms of acrocentric chromosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(24), 13983–13988. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.24.13983>
- McFarlane, S., Orr, A., Roberts, A. P. E., Conn, K. L., Iliev, V., Loney, C., Filipe, A. da S., Smollett, K., Gu, Q., Robertson, N., Adams, P. D., Rai, T. S., & Boutell, C. (2019). The histone chaperone HIRA promotes the induction of host innate immune defences in response to HSV-1 infection. *PLOS Pathogens*, 15(3), e1007667. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007667>
- McLaughlin, M. M., Kumar, S., McDonnell, P. C., Horn, S. V., Lee, J. C., Livi, G. P., & Young, P. R. (1996). Identification of Mitogen-activated Protein (MAP) Kinase-activated Protein Kinase-3, a Novel Substrate of CSBP p38 MAP Kinase (*). *Journal of Biological Chemistry*, 271(14), 8488–8492. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.14.8488>
- Michaelson, J. S., Bader, D., Kuo, F., Kozak, C., & Leder, P. (1999). Loss of Daxx, a promiscuously interacting protein, results in extensive apoptosis in early mouse development. *Genes & Development*, 13(15), 1918–1923. <https://doi.org/10.1101/gad.13.15.1918>
- Mittelstadt, P. R., Yamaguchi, H., Appella, E., & Ashwell, J. D. (2009). T Cell Receptor-mediated Activation of p38 α by Mono-phosphorylation of the Activation Loop Results in Altered Substrate Specificity. *The Journal of Biological Chemistry*, 284(23), 15469–15474. <https://doi.org/10.1074/jbc.M901004200>
- *Moens, U., Calvignac-Spencer, S., Lauber, C., Ramqvist, T., Feltkamp, M. C. W., Daugherty, M. D., Verschoor, E. J., Ehlers, B., & ICTV Report Consortium. (2017). ICTV Virus Taxonomy Profile: Polyomaviridae. *Journal of General Virology*, 98(6), 1159–1160. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.000839>
- *Moens, U., Krumbholz, A., Ehlers, B., Zell, R., John, R., Calvignac-Spencer, S., & Lauber, C. (2017). Biology, evolution, and medical importance of polyomaviruses: An update. *Infection, Genetics and Evolution*, 54, 18–38. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2017.06.011>
- *Moens, U., & Macdonald, A. (2019). Effect of the Large and Small T-Antigens of Human Polyomaviruses on Signaling Pathways. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(16), 3914. <https://doi.org/10.3390/ijms20163914>
- *Moens, U., Passerini, S., Falquet, M., Sveinbjörnsson, B., & Pietropaolo, V. (2023). Phosphorylation of Human Polyomavirus Large and Small T Antigens: An Ignored Research Field. *Viruses*, 15(11), 2235. <https://doi.org/10.3390/v15112235>
- Morozov, V. M., Giovinazzi, S., & Ishov, A. M. (2017). CENP-B protects centromere chromatin integrity by facilitating histone deposition via the H3.3-specific chaperone Daxx. *Epigenetics & Chromatin*, 10(1), 63. <https://doi.org/10.1186/s13072-017-0164-y>
- Motamedi, N., Sewald, X., Luo, Y., Mothes, W., & DiMaio, D. (2020). SV40 Polyomavirus Activates the Ras-MAPK Signaling Pathway for Vacuolization, Cell Death, and Virus Release. *Viruses*, 12(10), 1128. <https://doi.org/10.3390/v12101128>
- Müncheberg, S., Hay, R. T., Ip, W. H., Meyer, T., Weiß, C., Brenke, J., Masser, S., Hadian, K., Dobner, T., & Schreiner, S. (2018). E1B-55K-Mediated Regulation of RNF4 SUMO-Targeted Ubiquitin Ligase Promotes Human Adenovirus Gene Expression. *Journal of Virology*, 92(13), e00164-18. <https://doi.org/10.1128/jvi.00164-18>
- Muranen, T., Selfors, L. M., Hwang, J., Gallegos, L. L., Coloff, J. L., Thoreen, C. C., Kang, S. A., Sabatini, D. M., Mills, G. B., & Brugge, J. S. (2016). ERK and p38 MAPK Activities Determine Sensitivity to

- PI3K/mTOR Inhibition via Regulation of MYC and YAP. *Cancer Research*, 76(24), 7168–7180. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-16-0155>
- Navarro, L., & David, M. (1999). P38-dependent Activation of Interferon Regulatory Factor 3 by Lipopolysaccharide *. *Journal of Biological Chemistry*, 274(50), 35535–35538. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.50.35535>
- Nemethova, M., Smutny, M., & Wintersberger, E. (2004). Transactivation of E2F-Regulated Genes by Polyomavirus Large T Antigen: Evidence for a Two-Step Mechanism. *Molecular and Cellular Biology*, 24(24), 10986–10994. <https://doi.org/10.1128/MCB.24.24.10986-10994.2004>
- Neumann, F., Czech-Sioli, M., Dobner, T., Grundhoff, A., Schreiner, S., & Fischer, N. (2016). Replication of Merkel cell polyomavirus induces reorganization of promyelocytic leukemia nuclear bodies. *Journal of General Virology*, 97(11), 2926–2938. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.000593>
- O’Hara, S. D., & Garcea, R. L. (2016). Murine Polyomavirus Cell Surface Receptors Activate Distinct Signaling Pathways Required for Infection. *mBio*, 7(6), e01836-16. <https://doi.org/10.1128/mbio.01836-16>
- Padgett, B., Zurhein, G., Walker, D., Eckroade, R., & Dessel, B. (1971). Cultivation of papova-like virus from human brain with progressive multifocal leucoencephalopathy. *The Lancet*, 297(7712), 1257–1260. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(71\)91777-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(71)91777-6)
- Park, J., Lee, B.-S., Choi, J.-K., Means, R. E., Choe, J., & Jung, J. U. (2002). Herpesviral Protein Targets a Cellular WD Repeat Endosomal Protein to Downregulate T Lymphocyte Receptor Expression. *Immunity*, 17(2), 221–233. [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(02\)00368-0](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(02)00368-0)
- *Pearson, G., Robinson, F., Beers Gibson, T., Xu, B., Karandikar, M., Berman, K., & Cobb, M. H. (2001). Mitogen-Activated Protein (MAP) Kinase Pathways: Regulation and Physiological Functions*. *Endocrine Reviews*, 22(2), 153–183. <https://doi.org/10.1210/edrv.22.2.0428>
- Perfettini, J.-L., Castedo, M., Nardacci, R., Ciccocanti, F., Boya, P., Roumier, T., Larochette, N., Piacentini, M., & Kroemer, G. (2005). Essential role of p53 phosphorylation by p38 MAPK in apoptosis induction by the HIV-1 envelope. *Journal of Experimental Medicine*, 201(2), 279–289. <https://doi.org/10.1084/jem.20041502>
- Perlman, R., Schiemann, W. P., Brooks, M. W., Lodish, H. F., & Weinberg, R. A. (2001). TGF-beta-induced apoptosis is mediated by the adapter protein Daxx that facilitates JNK activation. *Nature Cell Biology*, 3(8), 708–714. <https://doi.org/10.1038/35087019>
- Phong, M. S., Van Horn, R. D., Li, S., Tucker-Kellogg, G., Surana, U., & Ye, X. S. (2010). P38 Mitogen-Activated Protein Kinase Promotes Cell Survival in Response to DNA Damage but Is Not Required for the G2 DNA Damage Checkpoint in Human Cancer Cells. *Molecular and Cellular Biology*, 30(15), 3816–3826. <https://doi.org/10.1128/MCB.00949-09>
- Picketts, D. (1996). ATRX encodes a novel member of the SNF2 family of proteins: Mutations point to a common mechanism underlying the ATR-X syndrome. *Human Molecular Genetics*, 5(12), 1899–1907. <https://doi.org/10.1093/hmg/5.12.1899>
- Pilon, A. A., Desjardins, P., Hassell, J. A., & Mes-Masson, A. M. (1996). Functional implications of mutations within polyomavirus large T antigen Rb-binding domain: Effects on pRb and p107 binding in vitro and immortalization activity in vivo. *Journal of Virology*, 70(7), 4457–4465. <https://doi.org/10.1128/jvi.70.7.4457-4465.1996>
- Piña, B., & Suau, P. (1987). Changes in histones H2A and H3 variant composition in differentiating and mature rat brain cortical neurons. *Developmental Biology*, 123(1), 51–58. [https://doi.org/10.1016/0012-1606\(87\)90426-X](https://doi.org/10.1016/0012-1606(87)90426-X)
- Pinto, L. M., Pailas, A., Bondarchenko, M., Sharma, A. B., Neumann, K., Rizzo, A. J., Jeanty, C., Nicot, N., Racca, C., Graham, M. K., Naughton, C., Liu, Y., Chen, C.-L., Meakin, P. J., Gilbert, N., Britton, S., Meeker, A. K., Heaphy, C. M., Larminat, F., & Van Dyck, E. (2024). DAXX promotes centromeric stability independently of ATRX by preventing the accumulation of R-loop-induced DNA double-stranded breaks. *Nucleic Acids Research*, 52(3), 1136–1155. <https://doi.org/10.1093/nar/gkad1141>
- *Pipas, J. M. (1992). Common and unique features of T antigens encoded by the polyomavirus group. *Journal of Virology*, 66(7), 3979–3985. <https://doi.org/10.1128/JVI.66.7.3979-3985.1992>
- *Plotnikov, A., Zehorai, E., Procaccia, S., & Seger, R. (2011). The MAPK cascades: Signaling components, nuclear roles and mechanisms of nuclear translocation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1813(9), 1619–1633. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2010.12.012>
- Pluta, A. F., Earnshaw, W. C., & Goldberg, I. G. (1998). Interphase-specific association of intrinsic centromere protein CENP-C with HDaxx, a death domain-binding protein implicated in Fas-mediated cell death. *Journal of Cell Science*, 111(14), 2029–2041. <https://doi.org/10.1242/jcs.111.14.2029>
- Pokorná, K. (2017). Interakce myšího polyomaviru s Toll-like receptory. Diplomová práce, Univerzita Karlova, Přírodovědecká fakulta, Praha. <https://dspace.cuni.cz/handle/20.500.11956/85720>

- Procario, M. C., Sexton, J. Z., Halligan, B. S., & Imperiale, M. J. (2023). Single-Cell, High-Content Microscopy Analysis of BK Polyomavirus Infection. *Microbiology Spectrum*, *11*(3), e00873-23. <https://doi.org/10.1128/spectrum.00873-23>
- Puto, L. A., & Reed, J. C. (2008). Daxx represses RelB target promoters via DNA methyltransferase recruitment and DNA hypermethylation. *Genes & Development*, *22*(8), 998–1010. <https://doi.org/10.1101/gad.1632208>
- Qi, L., Wang, Y., Wang, H., & Deng, J. (2020). Adenovirus 7 Induces Interleukin-6 Expression in Human Airway Epithelial Cells via p38/NF- κ B Signaling Pathway. *Frontiers in Immunology*, *11*, 551413. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.551413>
- Qian, M., Cai, D., Verhey, K. J., & Tsai, B. (2009). A Lipid Receptor Sorts Polyomavirus from the Endolysosome to the Endoplasmic Reticulum to Cause Infection. *PLOS Pathogens*, *5*(6), e1000465. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000465>
- Qian, M., & Tsai, B. (2010). Lipids and Proteins Act in Opposing Manners To Regulate Polyomavirus Infection. *Journal of Virology*, *84*(19), 9840–9852. <https://doi.org/10.1128/jvi.01093-10>
- Qian, W., & Wiman, K. G. (2000). Polyoma virus middle T and small t antigens cooperate to antagonize p53-induced cell cycle arrest and apoptosis. *Cell Growth & Differentiation: The Molecular Biology Journal of the American Association for Cancer Research*, *11*(1), 31–39.
- *Qin, L., Guo, J., Zheng, Q., & Zhang, H. (2016). BAG2 structure, function and involvement in disease. *Cellular & Molecular Biology Letters*, *21*(1), 18. <https://doi.org/10.1186/s11658-016-0020-2>
- Rai, T. S., Glass, M., Cole, J. J., Rather, M. I., Marsden, M., Neilson, M., Brock, C., Humphreys, I. R., Everett, R. D., & Adams, P. D. (2017). Histone chaperone HIRA deposits histone H3.3 onto foreign viral DNA and contributes to anti-viral intrinsic immunity. *Nucleic Acids Research*, *45*(20), 11673–11683. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx771>
- Rainey-Barger, E. K., Magnuson, B., & Tsai, B. (2007). A Chaperone-Activated Nonenveloped Virus Perforates the Physiologically Relevant Endoplasmic Reticulum Membrane. *Journal of Virology*, *81*(23), 12996–13004. <https://doi.org/10.1128/jvi.01037-07>
- Raingeaud, J., Gupta, S., Rogers, J. S., Dickens, M., Han, J., Ulevitch, R. J., & Davis, R. J. (1995). Pro-inflammatory Cytokines and Environmental Stress Cause p38 Mitogen-activated Protein Kinase Activation by Dual Phosphorylation on Tyrosine and Threonine (*). *Journal of Biological Chemistry*, *270*(13), 7420–7426. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.13.7420>
- Raingeaud, J., Whitmarsh, A. J., Barrett, T., Dérizjard, B., & Davis, R. J. (1996). MKK3- and MKK6-Regulated Gene Expression Is Mediated by the p38 Mitogen-Activated Protein Kinase Signal Transduction Pathway. *Molecular and Cellular Biology*, *16*(3), 1247–1255. <https://doi.org/10.1128/MCB.16.3.1247>
- Ran, F. A., Hsu, P. D., Wright, J., Agarwala, V., Scott, D. A., & Zhang, F. (2013). Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nature Protocols*, *8*(11), 2281–2308. <https://doi.org/10.1038/nprot.2013.143>
- Rassoulzadegan, M., Naghashfar, Z., Cowie, A., Carr, A., Grisoni, M., Kamen, R., & Cuzin, F. (1983). Expression of the large T protein of polyoma virus promotes the establishment in culture of „normal“ rodent fibroblast cell lines. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *80*(14), 4354–4358. <https://doi.org/10.1073/pnas.80.14.4354>
- Rayment, I., Baker, T. S., Caspar, D. L. D., & Murakami, W. T. (1982). Polyoma virus capsid structure at 22.5 Å resolution. *Nature*, *295*(5845), 110–115. <https://doi.org/10.1038/295110a0>
- Richterová, Z., Liebl, D., Horák, M., Palková, Z., Štokrová, J., Hozák, P., Korb, J., & Forstová, J. (2001). Caveolae Are Involved in the Trafficking of Mouse Polyomavirus Virions and Artificial VP1 Pseudocapsids toward Cell Nuclei. *Journal of Virology*, *75*(22), 10880–10891. <https://doi.org/10.1128/jvi.75.22.10880-10891.2001>
- Riley, M. I., Yoo, W., Mda, N. Y., & Folk, W. R. (1997). Tiny T antigen: An autonomous polyomavirus T antigen amino-terminal domain. *Journal of Virology*, *71*(8), 6068–6074. <https://doi.org/10.1128/JVI.71.8.6068-6074.1997>
- Rincón, M., Enslin, H., Raingeaud, J., Recht, M., Zapton, T., Su, M. S.-S., Penix, L. A., Davis, R. J., & Flavell, R. A. (1998). Interferon- γ expression by Th1 effector T cells mediated by the p38 MAP kinase signaling pathway. *The EMBO Journal*, *17*(10), 2817–2829. <https://doi.org/10.1093/emboj/17.10.2817>
- *Ronchetti, D., Traini, V., Silvestris, I., Fabbiano, G., Passamonti, F., Bolli, N., & Taiana, E. (2024). The pleiotropic nature of NONO, a master regulator of essential biological pathways in cancers. *Cancer Gene Therapy*, *31*(7), 984–994. <https://doi.org/10.1038/s41417-024-00763-x>
- Rouleau, C., Pores Fernando, A. T., Hwang, J. H., Faure, N., Jiang, T., White, E. A., Roberts, T. M., & Schaffhausen, B. S. (2016). Transformation by Polyomavirus Middle T Antigen Involves a Unique Bimodal Interaction with the Hippo Effector YAP. *Journal of Virology*, *90*(16), 7032–7045. <https://doi.org/10.1128/JVI.00417-16>

- *Ryabchenko, B., Šroller, V., Horníková, L., Lovtsov, A., Forstová, J., & Huérfano, S. (2023). The interactions between PML nuclear bodies and small and medium size DNA viruses. *Virology Journal*, 20(1), 82. <https://doi.org/10.1186/s12985-023-02049-4>
- Ryo, A., Hirai, A., Nishi, M., Liou, Y.-C., Perrem, K., Lin, S.-C., Hirano, H., Lee, S. W., & Aoki, I. (2007). A Suppressive Role of the Prolyl Isomerase Pin1 in Cellular Apoptosis Mediated by the Death-associated Protein Daxx *. *Journal of Biological Chemistry*, 282(50), 36671–36681. <https://doi.org/10.1074/jbc.M704145200>
- Saffert, R. T., & Kalejta, R. F. (2006). Inactivating a Cellular Intrinsic Immune Defense Mediated by Daxx Is the Mechanism through Which the Human Cytomegalovirus pp71 Protein Stimulates Viral Immediate-Early Gene Expression. *Journal of Virology*, 80(8), 3863–3871. <https://doi.org/10.1128/jvi.80.8.3863-3871.2006>
- Saffert, R. T., & Kalejta, R. F. (2007). Human Cytomegalovirus Gene Expression Is Silenced by Daxx-Mediated Intrinsic Immune Defense in Model Latent Infections Established In Vitro. *Journal of Virology*, 81(17), 9109–9120. <https://doi.org/10.1128/jvi.00827-07>
- Saffert, R. T., Penkert, R. R., & Kalejta, R. F. (2010). Cellular and Viral Control over the Initial Events of Human Cytomegalovirus Experimental Latency in CD34+ Cells. *Journal of Virology*, 84(11), 5594–5604. <https://doi.org/10.1128/jvi.00348-10>
- Saitoh, H., & Hinchev, J. (2000). Functional Heterogeneity of Small Ubiquitin-related Protein Modifiers SUMO-1 versus SUMO-2/3 *. *Journal of Biological Chemistry*, 275(9), 6252–6258. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.9.6252>
- Salvador, J. M., Mittelstadt, P. R., Guszczynski, T., Copeland, T. D., Yamaguchi, H., Appella, E., Fornace, A. J., & Ashwell, J. D. (2005). Alternative p38 activation pathway mediated by T cell receptor–proximal tyrosine kinases. *Nature Immunology*, 6(4), 390–395. <https://doi.org/10.1038/ni1177>
- Santiago, A., Godsey, A. C., Hossain, J., Zhao, L. Y., & Liao, D. (2009). Identification of two independent SUMO-interacting motifs in Daxx: Evolutionary conservation from Drosophila to humans and their biochemical functions. *Cell Cycle*, 8(1), 76–87. <https://doi.org/10.4161/cc.8.1.7493>
- Saribas, A. S., Bellizzi, A., Wollebo, H. S., Beer, T., Tang, H.-Y., & Safak, M. (2023). Human neurotropic polyomavirus, JC virus, late coding region encodes a novel nuclear protein, ORF4, which targets the promyelocytic leukemia nuclear bodies (PML-NBs) and modulates their reorganization. *Virology*, 587, 109866. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2023.109866>
- Satratzemis, C. (2023). Polyomavirové minichromozomy: Interakce se složkami vrozené imunity. Diplomová práce, Univerzita Karlova, Přírodovědecká fakulta, Praha. <https://dspace.cuni.cz/handle/20.500.11956/181212>
- Seitz, S., Heusel, A. T., Stamminger, T., & Scherer, M. (2022). Promyelocytic Leukemia Protein Potently Restricts Human Cytomegalovirus Infection in Endothelial Cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(19), 11931. <https://doi.org/10.3390/ijms231911931>
- Seki, M., Enomoto, T., Eki, T., Miyajima, A., Murakami, Y., Hanaoka, F., & Ui, M. (1990). DNA helicase and nucleoside-5'-triphosphatase activities of polyoma virus large tumor antigen. *Biochemistry*, 29(4), 1003–1009. <https://doi.org/10.1021/bi00456a024>
- Shastrula, P. K., Sierra, I., Deng, Z., Keeney, F., Hayden, J. E., Lieberman, P. M., & Janicki, S. M. (2019). PML is recruited to heterochromatin during S phase and represses DAXX-mediated histone H3.3 chromatin assembly. *Journal of Cell Science*, 132(6), jcs220970. <https://doi.org/10.1242/jcs.220970>
- Shen, T. H., Lin, H.-K., Scaglioni, P. P., Yung, T. M., & Pandolfi, P. P. (2006). The Mechanisms of PML-Nuclear Body Formation. *Molecular Cell*, 24(3), 331–339. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2006.09.013>
- Sheng, Q., Denis, D., Ratnofsky, M., Roberts, T. M., DeCaprio, J. A., & Schaffhausen, B. (1997). The DnaJ domain of polyomavirus large T antigen is required to regulate Rb family tumor suppressor function. *Journal of Virology*, 71(12), 9410–9416. <https://doi.org/10.1128/jvi.71.12.9410-9416.1997>
- Sheng, Q., Love, T. M., & Schaffhausen, B. (2000). J Domain-Independent Regulation of the Rb Family by Polyomavirus Large T Antigen. *Journal of Virology*, 74(11), 5280–5290. <https://doi.org/10.1128/jvi.74.11.5280-5290.2000>
- Shishido-Hara, Y., Higuchi, K., Ohara, S., Duyckaerts, C., Hauw, J.-J., & Uchihara, T. (2008). Promyelocytic Leukemia Nuclear Bodies Provide a Scaffold for Human Polyomavirus JC Replication and Are Disrupted After Development of Viral Inclusions in Progressive Multifocal Leukoencephalopathy. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, 67(4), 299–308. <https://doi.org/10.1097/NEN.0b013e31816a1dd3>
- Shishido-Hara, Y., Ichinose, S., Higuchi, K., Hara, Y., & Yasui, K. (2004). Major and Minor Capsid Proteins of Human Polyomavirus JC Cooperatively Accumulate to Nuclear Domain 10 for Assembly into Virions. *Journal of Virology*, 78(18), 9890–9903. <https://doi.org/10.1128/jvi.78.18.9890-9903.2004>

- Shishido-Hara, Y., Ichinose, S., & Uchihara, T. (2012). JC Virus Intranuclear Inclusions Associated with PML-NBs: Analysis by Electron Microscopy and Structured Illumination Microscopy. *The American Journal of Pathology*, 180(3), 1095–1106. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2011.11.036>
- Shishido-Hara, Y., Yazawa, T., Nagane, M., Higuchi, K., Abe-Suzuki, S., Kurata, M., Kitagawa, M., Kamma, H., & Uchihara, T. (2014). JC Virus Inclusions in Progressive Multifocal Leukoencephalopathy: Scaffolding Promyelocytic Leukemia Nuclear Bodies Grow With Cell Cycle Transition Through an S-to-G2-Like State in Enlarging Oligodendrocyte Nuclei. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, 73(5), 442–453. <https://doi.org/10.1097/NEN.0000000000000066>
- *Scherer, M., & Stamminger, T. (2016). Emerging Role of PML Nuclear Bodies in Innate Immune Signaling. *Journal of Virology*, 90(13), 5850–5854. <https://doi.org/10.1128/jvi.01979-15>
- Schreiner, S., Bürck, C., Glass, M., Groitl, P., Wimmer, P., Kinkley, S., Mund, A., Everett, R. D., & Dobner, T. (2013). Control of human adenovirus type 5 gene expression by cellular Daxx/ATRAX chromatin-associated complexes. *Nucleic Acids Research*, 41(6), 3532–3550. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt064>
- Schreiner, S., Martinez, R., Groitl, P., Rayne, F., Vaillant, R., Wimmer, P., Bossis, G., Sternsdorf, T., Marciniowski, L., Ruzsics, Z., Dobner, T., & Wodrich, H. (2012). Transcriptional Activation of the Adenoviral Genome Is Mediated by Capsid Protein VI. *PLOS Pathogens*, 8(2), e1002549. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002549>
- Schreiner, S., Wimmer, P., Sirma, H., Everett, R. D., Blanchette, P., Groitl, P., & Dobner, T. (2010). Proteasome-Dependent Degradation of Daxx by the Viral E1B-55K Protein in Human Adenovirus-Infected Cells. *Journal of Virology*, 84(14), 7029–7038. <https://doi.org/10.1128/jvi.00074-10>
- Schüchner, S., & Wintersberger, E. (1999). Binding of Polyomavirus Small T Antigen to Protein Phosphatase 2A Is Required for Elimination of p27 and Support of S-Phase Induction in Concert with Large T Antigen. *Journal of Virology*, 73(11), 9266–9273. <https://doi.org/10.1128/jvi.73.11.9266-9273.1999>
- Soldatova, I., Prilepskaja, T., Abrahamyan, L., Forstová, J., & Huérfano, S. (2018). Interaction of the Mouse Polyomavirus Capsid Proteins with Importins Is Required for Efficient Import of Viral DNA into the Cell Nucleus. *Viruses*, 10(4), 165. <https://doi.org/10.3390/v10040165>
- Soloaga, A., Thomson, S., Wiggin, G. R., Rampersaud, N., Dyson, M. H., Hazzalin, C. A., Mahadevan, L. C., & Arthur, J. S. C. (2003). MSK2 and MSK1 mediate the mitogen- and stress-induced phosphorylation of histone H3 and HMG-14. *The EMBO Journal*, 22(11), 2788–2797. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdg273>
- Song, J. J., & Lee, Y. J. (2003). Role of the ASK1-SEK1-JNK1-HIPK1 Signal in Daxx Trafficking and ASK1 Oligomerization *. *Journal of Biological Chemistry*, 278(47), 47245–47252. <https://doi.org/10.1074/jbc.M213201200>
- Song, J. J., & Lee, Y. J. (2004). Tryptophan 621 and Serine 667 Residues of Daxx Regulate Its Nuclear Export during Glucose Deprivation *. *Journal of Biological Chemistry*, 279(29), 30573–30578. <https://doi.org/10.1074/jbc.M404512200>
- Staples, C. J., Owens, D. M., Maier, J. V., Cato, A. C. B., & Keyse, S. M. (2010). Cross-talk between the p38 α and JNK MAPK Pathways Mediated by MAP Kinase Phosphatase-1 Determines Cellular Sensitivity to UV Radiation *. *Journal of Biological Chemistry*, 285(34), 25928–25940. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.117911>
- Stepp, W. H., Meyers, J. M., & McBride, A. A. (2013). Sp100 Provides Intrinsic Immunity against Human Papillomavirus Infection. *mBio*, 4(6), e00845-13. <https://doi.org/10.1128/mbio.00845-13>
- Sullivan, C. S., Cantalupo, P., & Pipas, J. M. (2000). The Molecular Chaperone Activity of Simian Virus 40 Large T Antigen Is Required To Disrupt Rb-E2F Family Complexes by an ATP-Dependent Mechanism. *Molecular and Cellular Biology*, 20(17), 6233–6243. <https://doi.org/10.1128/MCB.20.17.6233-6243.2000>
- Sullivan, C. S., Sung, C. K., Pack, C. D., Grundhoff, A., Lukacher, A. E., Benjamin, T. L., & Ganem, D. (2009). Murine Polyomavirus encodes a microRNA that cleaves early RNA transcripts but is not essential for experimental infection. *Virology*, 387(1), 157–167. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2009.02.017>
- Sun, H., Charles, C. H., Lau, L. F., & Tonks, N. K. (1993). MKP-1 (3CH134), an immediate early gene product, is a dual specificity phosphatase that dephosphorylates MAP kinase in vivo. *Cell*, 75(3), 487–493. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90383-2](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90383-2)
- Suomalainen, M., Nakano, M. Y., Boucke, K., Keller, S., & Greber, U. F. (2001). Adenovirus-activated PKA and p38/MAPK pathways boost microtubule-mediated nuclear targeting of virus. *The EMBO Journal*, 20(6), 1310–1319. <https://doi.org/10.1093/emboj/20.6.1310>
- Svadlenka, J., Brazina, J., Hanzlikova, H., Cermak, L., & Andera, L. (2016). Multifunctional adaptor protein Daxx interacts with chromatin-remodelling ATPase Brg1. *Biochemistry and Biophysics Reports*, 5, 246–252. <https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2015.12.012>
- Sweet, B. H., & Hilleman, M. R. (1960). The Vacuolating Virus, S.V.40. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 105(2), 420–427. <https://doi.org/10.3181/00379727-105-26128>

- Tagami, H., Ray-Gallet, D., Almouzni, G., & Nakatani, Y. (2004). Histone H3.1 and H3.3 Complexes Mediate Nucleosome Assembly Pathways Dependent or Independent of DNA Synthesis. *Cell*, *116*(1), 51–61. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)01064-X](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)01064-X)
- Talmage, D. A., Freund, R., Young, A. T., Dahl, J., Dawe, C. J., & Benjamin, T. L. (1989). Phosphorylation of middle T by pp60c-src: A switch for binding of phosphatidylinositol 3-kinase and optimal tumorigenesis. *Cell*, *59*(1), 55–65. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(89\)90869-6](https://doi.org/10.1016/0092-8674(89)90869-6)
- Tan, Y., Rouse, J., Zhang, A., Cariati, S., Cohen, P., & Comb, M. J. (1996). FGF and stress regulate CREB and ATF-1 via a pathway involving p38 MAP kinase and MAPKAP kinase-2. *The EMBO Journal*, *15*(17), 4629–4642. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1996.tb00840.x>
- Tang, J., Qu, L.-K., Zhang, J., Wang, W., Michaelson, J. S., Degenhardt, Y. Y., El-Deiry, W. S., & Yang, X. (2006). Critical role for Daxx in regulating Mdm2. *Nature Cell Biology*, *8*(8), 855–862. <https://doi.org/10.1038/ncb1442>
- Tang, J., Wu, S., Liu, H., Stratton, R., Barak, O. G., Shiekhata, R., Picketts, D. J., & Yang, X. (2004). A Novel Transcription Regulatory Complex Containing Death Domain-associated Protein and the ATR-X Syndrome Protein *. *Journal of Biological Chemistry*, *279*(19), 20369–20377. <https://doi.org/10.1074/jbc.M401321200>
- Tang, Q., Bell, P., Tegtmeyer, P., & Maul, G. G. (2000). Replication but Not Transcription of Simian Virus 40 DNA Is Dependent on Nuclear Domain 10. *Journal of Virology*, *74*(20), 9694–9700. <https://doi.org/10.1128/jvi.74.20.9694-9700.2000>
- Tang, S., Ding, S., Yu, L., Shen, H., Wan, Y., & Wu, Y. (2020). Effects of HPV16 E6 protein on Daxx-induced apoptosis in C33A cells. *Cellular & Molecular Biology Letters*, *25*(1), 38. <https://doi.org/10.1186/s11658-020-00230-z>
- Tanoue, T., Adachi, M., Moriguchi, T., & Nishida, E. (2000). A conserved docking motif in MAP kinases common to substrates, activators and regulators. *Nature Cell Biology*, *2*(2), 110–116. <https://doi.org/10.1038/35000065>
- Teng, Y.-C., Sundaesan, A., O'Hara, R., Gant, V. U., Li, M., Martire, S., Warshaw, J. N., Basu, A., & Banaszynski, L. A. (2021). ATRX promotes heterochromatin formation to protect cells from G-quadruplex DNA-mediated stress. *Nature Communications*, *12*(1), 3887. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-24206-5>
- Tomida, T., Takekawa, M., & Saito, H. (2015). Oscillation of p38 activity controls efficient pro-inflammatory gene expression. *Nature Communications*, *6*(1), 8350. <https://doi.org/10.1038/ncomms9350>
- *Topalis, D., Andrei, G., & Snoeck, R. (2013). The large tumor antigen: A “Swiss Army knife” protein possessing the functions required for the polyomavirus life cycle. *Antiviral Research*, *97*(2), 122–136. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2012.11.007>
- Torii, S., Egan, D. A., Evans, R. A., & Reed, J. C. (1999). Human Daxx regulates Fas-induced apoptosis from nuclear PML oncogenic domains (PODs). *The EMBO Journal*, *18*(21), 6037–6049. <https://doi.org/10.1093/emboj/18.21.6037>
- Treisman, R. (1980). Characterisation of polyoma late mRNA leader sequences by molecular cloning and DNA sequence analysis. *Nucleic Acids Research*, *8*(21), 4867–4888. <https://doi.org/10.1093/nar/8.21.4867>
- Tsai, B., Gilbert, J. M., Stehle, T., Lencer, W., Benjamin, T. L., & Rapoport, T. A. (2003). Gangliosides are receptors for murine polyoma virus and SV40. *The EMBO Journal*, *22*(17), 4346–4355. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdg439>
- Tsai, K., Chan, L., Gibeault, R., Conn, K., Dheekollu, J., Domsic, J., Marmorstein, R., Schang, L. M., & Lieberman, P. M. (2014). Viral Reprogramming of the Daxx Histone H3.3 Chaperone during Early Epstein-Barr Virus Infection. *Journal of Virology*, *88*(24), 14350–14363. <https://doi.org/10.1128/jvi.01895-14>
- Tsai, K., Thikmyanova, N., Wojcechowskyj, J. A., Delecluse, H.-J., & Lieberman, P. M. (2011). EBV Tegument Protein BNRF1 Disrupts DAXX-ATR-X to Activate Viral Early Gene Transcription. *PLOS Pathogens*, *7*(11), e1002376. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002376>
- Tu, W., Gong, J., Tian, D., & Wang, Z. (2019). Hepatitis B Virus X Protein Induces SATB1 Expression Through Activation of ERK and p38MAPK Pathways to Suppress Anoikis. *Digestive Diseases and Sciences*, *64*(11), 3203–3214. <https://doi.org/10.1007/s10620-019-05681-9>
- Uddin, S., Majchrzak, B., Woodson, J., Arunkumar, P., Alsayed, Y., Pine, R., Young, P. R., Fish, E. N., & Plataniias, L. C. (1999). Activation of the p38 mitogen-activated protein kinase by type I interferons. *The Journal of Biological Chemistry*, *274*(42), 30127–30131. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.42.30127>
- van der Houven van Oordt, W., Diaz-Meco, M. T., Lozano, J., Krainer, A. R., Moscat, J., & Cáceres, J. F. (2000). The Mkk3/6-p38–Signaling Cascade Alters the Subcellular Distribution of Hnmp A1 and Modulates Alternative Splicing Regulation. *The Journal of Cell Biology*, *149*(2), 307–316. <https://doi.org/10.1083/jcb.149.2.307>

- Voon, H. P. J., Hughes, J. R., Rode, C., De La Rosa-Velázquez, I. A., Jenuwein, T., Feil, R., Higgs, D. R., & Gibbons, R. J. (2015). ATRX Plays a Key Role in Maintaining Silencing at Interstitial Heterochromatic Loci and Imprinted Genes. *Cell Reports*, *11*(3), 405–418. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.03.036>
- Wagenknecht, N., Reuter, N., Scherer, M., Reichel, A., Müller, R., & Stamminger, T. (2015). Contribution of the Major ND10 Proteins PML, hDaxx and Sp100 to the Regulation of Human Cytomegalovirus Latency and Lytic Replication in the Monocytic Cell Line THP-1. *Viruses*, *7*(6), 2884–2907. <https://doi.org/10.3390/v7062751>
- Walczak, C. P., & Tsai, B. (2011). A PDI Family Network Acts Distinctly and Coordinately with ERp29 To Facilitate Polyomavirus Infection. *Journal of Virology*, *85*(5), 2386–2396. <https://doi.org/10.1128/jvi.01855-10>
- *Wang, L., Xia, Z., Tang, W., Sun, Y., Wu, Y., Kwok, H. F., Sun, F., & Cao, Z. (2022). P38 activation and viral infection. *Expert Reviews in Molecular Medicine*, *24*, e4. <https://doi.org/10.1017/erm.2021.29>
- Wang, Q., Wang, C., Li, N., Liu, X., Ren, W., Wang, Q., & Cao, X. (2018). Condensin Smc4 promotes inflammatory innate immune response by epigenetically enhancing NEMO transcription. *Journal of Autoimmunity*, *92*, 67–76. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2018.05.004>
- Wang, Y., Huang, S., Sah, V. P., Ross, J., Brown, J. H., Han, J., & Chien, K. R. (1998). Cardiac Muscle Cell Hypertrophy and Apoptosis Induced by Distinct Members of the p38 Mitogen-activated Protein Kinase Family *. *Journal of Biological Chemistry*, *273*(4), 2161–2168. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.4.2161>
- Waskiewicz, A. J., Flynn, A., Proud, C. G., & Cooper, J. A. (1997). Mitogen-activated protein kinases activate the serine/threonine kinases Mnk1 and Mnk2. *The EMBO Journal*, *16*(8), 1909–1920. <https://doi.org/10.1093/emboj/16.8.1909>
- Weihua, X., Ramanujam, S., Lindner, D. J., Kudravalli, R. D., Freund, R., & Kalvakolanu, D. V. (1998). The polyoma virus T antigen interferes with interferon-inducible gene expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *95*(3), 1085–1090. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.3.1085>
- Wethkamp, N., Hanenberg, H., Funke, S., Suschek, C. V., Wetzell, W., Heikau, S., Grinstein, E., Ramp, U., Engers, R., Gabbert, H. E., & Mahotka, C. (2011). Daxx- β and Daxx- γ , Two Novel Splice Variants of the Transcriptional Co-repressor Daxx. *The Journal of Biological Chemistry*, *286*(22), 19576–19588. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.196311>
- White, M. K., & Safak, M. (2016). Molecular Biology of JC Virus and the Human Demyelinating Disease, Progressive Multifocal Leukoencephalopathy. In C. S. Reiss (Ed.), *Neurotropic Viral Infections: Volume 2: Neurotropic Retroviruses, DNA Viruses, Immunity and Transmission*, 75–110. Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-33189-8_3
- Winzen, R., Kracht, M., Ritter, B., Wilhelm, A., Chen, C. A., Shyu, A., Müller, M., Gaestel, M., Resch, K., & Holtmann, H. (1999). The p38 MAP kinase pathway signals for cytokine-induced mRNA stabilization via MAP kinase-activated protein kinase 2 and an AU-rich region-targeted mechanism. *The EMBO Journal*, *18*(18), 4969–4980. <https://doi.org/10.1093/emboj/18.18.4969>
- Woodhall, D. L., Groves, I. J., Reeves, M. B., Wilkinson, G., & Sinclair, J. H. (2006). Human Daxx-mediated Repression of Human Cytomegalovirus Gene Expression Correlates with a Repressive Chromatin Structure around the Major Immediate Early Promoter *. *Journal of Biological Chemistry*, *281*(49), 37652–37660. <https://doi.org/10.1074/jbc.M604273200>
- Wysk, M., Yang, D. D., Lu, H.-T., Flavell, R. A., & Davis, R. J. (1999). Requirement of mitogen-activated protein kinase kinase 3 (MKK3) for tumor necrosis factor-induced cytokine expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *96*(7), 3763–3768. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.7.3763>
- Xiang, W.-Q., Feng, W.-F., Ke, W., Sun, Z., Chen, Z., & Liu, W. (2011). Hepatitis B virus X protein stimulates IL-6 expression in hepatocytes via a MyD88-dependent pathway. *Journal of Hepatology*, *54*(1), 26–33. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2010.08.006>
- Xiao, J., Deng, J., Lv, L., Kang, Q., Ma, P., Yan, F., Song, X., Gao, B., Zhang, Y., & Xu, J. (2015). Hydrogen Peroxide Induce Human Cytomegalovirus Replication through the Activation of p38-MAPK Signaling Pathway. *Viruses*, *7*(6), 2816–2833. <https://doi.org/10.3390/v7062748>
- Xie, A.-Y., Bermudez, V. P., & Folk, W. R. (2002). Stimulation of DNA Replication from the Polyomavirus Origin by PCAF and GCN5 Acetyltransferases: Acetylation of Large T Antigen. *Molecular and Cellular Biology*, *22*(22), 7907–7918. <https://doi.org/10.1128/MCB.22.22.7907-7918.2002>
- Xu, P., Mallon, S., & Roizman, B. (2016). PML plays both inimical and beneficial roles in HSV-1 replication. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *113*(21), E3022–E3028. <https://doi.org/10.1073/pnas.1605513113>
- Xu, X., Duan, S., Hua, X., Li, Z., He, R., & Zhang, Z. (2022). Stable inheritance of H3.3-containing nucleosomes during mitotic cell divisions. *Nature Communications*, *13*(1), 2514. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-30298-4>
- Xue, Y., Gibbons, R., Yan, Z., Yang, D., McDowell, T. L., Sechi, S., Qin, J., Zhou, S., Higgs, D., & Wang, W. (2003). The ATRX syndrome protein forms a chromatin-remodeling complex with Daxx and localizes

- in promyelocytic leukemia nuclear bodies. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *100*(19), 10635–10640. <https://doi.org/10.1073/pnas.1937626100>
- Yang, S.-H., Galanis, A., & Sharrocks, A. D. (1999). Targeting of p38 Mitogen-Activated Protein Kinases to MEF2 Transcription Factors. *Molecular and Cellular Biology*, *19*(6), 4028–4038. <https://doi.org/10.1128/mcb.19.6.4028>
- Yang, X., Khosravi-Far, R., Chang, H. Y., & Baltimore, D. (1997). Daxx, a Novel Fas-Binding Protein That Activates JNK and Apoptosis. *Cell*, *89*(7), 1067–1076. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80294-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80294-9)
- Yeung, P. L., Chen, L.-Y., Tsai, S.-C., Zhang, A., & Chen, J. D. (2008). Daxx contains two nuclear localization signals and interacts with importin α 3. *Journal of Cellular Biochemistry*, *103*(2), 456–470. <https://doi.org/10.1002/jcb.21408>
- You, J., O'Hara, S. D., Velupillai, P., Castle, S., Lavery, S., Garcea, R. L., & Benjamin, T. (2015). Ganglioside and Non-ganglioside Mediated Host Responses to the Mouse Polyomavirus. *PLoS Pathogens*, *11*(10), e1005175. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005175>
- Yu, Z., Song, H., Jia, M., Zhang, J., Wang, W., Li, Q., Zhang, L., & Zhao, W. (2017). USP1–UAF1 deubiquitinase complex stabilizes TBK1 and enhances antiviral responses. *Journal of Experimental Medicine*, *214*(12), 3553–3563. <https://doi.org/10.1084/jem.20170180>
- Zachos, G., Clements, B., & Conner, J. (1999). Herpes Simplex Virus Type 1 Infection Stimulates p38/c-Jun N-terminal Mitogen-activated Protein Kinase Pathways and Activates Transcription Factor AP-1 *. *Journal of Biological Chemistry*, *274*(8), 5097–5103. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.8.5097>
- Zhao, L. Y., Liu, J., Sidhu, G. S., Niu, Y., Liu, Y., Wang, R., & Liao, D. (2004). Negative Regulation of p53 Functions by Daxx and the Involvement of MDM2 *. *Journal of Biological Chemistry*, *279*(48), 50566–50579. <https://doi.org/10.1074/jbc.M406743200>
- *Zhao, Z., Wang, X., Ding, Y., Cao, X., & Zhang, X. (2023). SMC4, a novel tumor prognostic marker and potential tumor therapeutic target. *Frontiers in Oncology*, *13*, 1117642. <https://doi.org/10.3389/fonc.2023.1117642>
- Zhong, S., Salomoni, P., Ronchetti, S., Guo, A., Ruggero, D., & Pandolfi, P. P. (2000). Promyelocytic Leukemia Protein (Pml) and Daxx Participate in a Novel Nuclear Pathway for Apoptosis. *Journal of Experimental Medicine*, *191*(4), 631–640. <https://doi.org/10.1084/jem.191.4.631>
- Zila, V., Difato, F., Klimova, L., Huerfano, S., & Forstova, J. (2014). Involvement of Microtubular Network and Its Motors in Productive Endocytic Trafficking of Mouse Polyomavirus. *PLoS ONE*, *9*(5), e96922. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0096922>