

**Univerzita Karlova v Praze**  
**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program:  
Molekulární biologie a biochemie organism  
Studijní obor:  
Speciální biologicko-chemické obory



**Václav Janovec**

Imunita v polyomavirové infekci

Immunity and polyomaviruses

Bakalářská práce

Tržkolitel: RNDr. Alena Morávková, Ph.D.

Praha, 2013

**Prohlášení:**

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

V Praze, 8. 5. 2013

Podpis

Děkuji RNDr. Aleně Morávkové, PhD. za cenné připomínky a rady při vypracování bakalářské práce. Dále bych chtěla poděkovat svojí rodině za podporu, bez které by tato práce nemohla vzniknout.

# Obsah

## Seznam použitých zkratk

## Abstrakt

1. Úvod .....	1
2. <b>Role nespecifické imunity</b> .....	3
2.1 Obecná funkce a principy fungování nespecifické imunity proti virové infekci .....	3
2.2 Role antigen prezentujících bun k na aktivaci imunitní odpov ědi proti polyomavir m .....	3
2.3 Inhibi ní efekt interferonu gamma.....	5
2.4 Zapojení interferon  alfa a beta .....	7
2.5 Moflný vliv TGF-  na reaktivaci lidských polyomavir  .....	8
2.6 Moflný vliv TNF-  na reaktivaci lidských polyomavir  .....	11
2.7 NK bu ky a  T lymfocyty .....	13
2.8 Role polyomavirových miRNA.....	15
3. <b>Role specifické imunity</b> .....	17
3.1 Obecná funkce a principy fungování specifické imunity proti virové infekci .....	17
3.2 Úloha B lymfocyt  a protilátek .....	17
3.3 Vliv CD4 <sup>+</sup> a CD8 <sup>+</sup> T lymfocyt  .....	20
4. <b>Záv r</b> .....	25
5. <b>Seznam poufité literatury</b> .....	26

## Seznam použitých zkratek

AMD	acute myeloproliferative disease	akutní myeloproliferativní onemocnění
APCs	antigen presenting cells	antigen prezentující buňky
CD	cluster of differentiation	diferenční antigen
C/EBP	CCAAT/enhancer-binding protein beta	CCAAT vazebný enhancerový protein beta
CR	complement receptor	komplementový receptor
CTL	cytotoxic T lymphocyte	cytotoxický T lymfocyt
ERK	extracellular signal regulated kinase	extracelulárním signálem regulovaná kináza
FKBP12	FK506 binding protein 12	FK506 vázající protein 12
GADPH	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	glyceraldehyde 3-fosfát dehydrogenáza
GAF	gamma-interferon activation factor	interferonem gamma aktivovaný faktor
GAS	interferon-gamma activated sequence	interferonem gamma aktivovatelná sekvence
HCDCs	human collecting duct cells	lidské epiteliální buňky sbírného kanálku
HIV	human immune deficiency virus	virus lidské imunodeficiency
HLA	human leukocyte antigen	hlavní lidský histokompatibilní antigen
ICS	intracellular cytokine staining	intracelulární značení cytokin
IgM	immunoglobulin M	imunoglobulin M
IgG	immunoglobulin G	imunoglobulin G
IFN	interferon	interferon
IL	interleukin	interleukin
IRF	interferon regulatory factor	interferon regulační faktor
ISGs	IFN-stimulated genes	IFN-stimulované geny
ISRE	IFN-stimulated response element	IFN stimulovaný element
KB	kappa binding	kappa vázající
MAP-K	mitogen activated protein kinase	mitogeny aktivovaná protein kináza
MHC	major histocompatibility complex	hlavní histokompatibilní komplex
MICB	MHC class I-related	neklasická MHC molekula
miRNA	microRNA	malá nekódující RNA
MPyV	murine polyoma virus	myší polyomavirus
MyD88	myeloid differentiation primary response 88	myeloidní diferenční faktor 88
OAS2	2'-5'-oligoadenylate synthetase 2	2'-5'-oligoadenylát syntetáza 2

NCCR	noncoding control region	nekódující kontrolní oblast
NFAT4	nuclear factor of activated T cells	jaderný faktor aktivovaných T lymfocyt
NF- B	nuclear factor kappa light chain enhancer of activated B cells	nukleární faktor aktivovaných B lymfocyt
NK	natural killer	p írozený zabíje
NKG2D	NK activating receptor	aktiva ní receptor NK bun k
NLRs	NOD like receptors	receptory skupiny NOD
PBMCs	peripheral blood mononuclear cells	periferní krevní mononukleární bu ky
PHFGC	primary human fetal glial cells	lidské primární fetální gliové bu ky
PML	progressive multifocal leukoencephalopathy	progresivní multifokální leukoencefalopatie
PRRs	pattern recognition receptors	receptory rozeznávající chemické vzory asociované s patogeny
PVAN	polyomavirus associated nephropathy	polyomavirem asociovaná nefropatie
PyVTu	polyomavirus tumor	polyomavirem vyvolaný tumor
RLRs	RIG-I-like receptors	receptory skupiny RIG
SCID	severe combined immunodeficiency	t ílká kombinovaná imunodeficience
shRNA	small hairpin RNA	malá vlásenková RNA
siRNA	small interfering RNA	malá interferující RNA
SMAD	Sma and Mad related protein	Sma a Mad podobný protein
STAT	signal transducer and activator of transcription	signální zesilova a aktivátor transkripce
Tat	trans activator of transcription	transaktivátor transkripce
TCR	T cell receptor	receptor T lymfocyt pro antigen
TGF	transforming growth factor	transformující r stový faktor
Th	helper T cell	pomocný T lymfocyt
TLRs	Toll-like receptors	receptory skupiny Toll
TNF	tumor necrosis factor	faktor nekrotizující nádory
VSIG	viral stress inducible genes	virovým stresem indukované geny
WT	wild type	divoký typ
ZEB-1	zinc finger E-box binding homeobox 1	E-box vázající p es motiv zinkového prstu homeobox 1

## **Abstrakt**

Lidské polyomaviry JC a BK patří do skupiny malých neobalených DNA virů a jsou široce rozšířené v lidské populaci. Po zpravidla bezpříznakové prvotní infekci následně přetrvávají celoživotně v organismu ve stavu perzistence. Tato práce si tak klade za cíl shrnutí dosavadních poznatků týkajících se zapojení jednotlivých imunitních mechanismů, podílejících se na imunitním dohledu vůči perzistujícím JC a BK virům. Z dosud publikovaných poznatků vyplývá, že imunitní dohled vůči lidským polyomavirům představuje velice komplexní proces, kde důležitým faktorem je zapojení a spolupráce nescifické i specifické imunitní obrany. Dlouhodobý imunitní dohled proti perzistujícím virům je zprostředkován zejména specifickými T lymfocyty. Pokud je tento imunitní dohled narušen, může docházet k reaktivaci těchto virů. Další významnou roli v případech reaktive hrají i změny v cytokinové prostředí a genetická výbava jedince. Zmíněné dva lidské polyomaviry navíc rozvinuly mechanismus, který jim umožňuje částečně uniknout před imunitním dohledem. To také otevírá otázku, zda tímto imunitním únikem nepřispívají k indukci tumorogeneze.

**Klíčová slova:** JCV, BKV, perzistence, reaktive, imunitní dohled, PML, PVAN

## **Abstract**

Human polyomaviruses JC and BK belongs to the group of small non-enveloped DNA viruses, and are widespread in the human population. After usually asymptomatic primary infection subsequently persist throughout life in the body in a state of persistence. Thus, this thesis aims to summarize present knowledge concerning the involvement of immune mechanisms involved in immune surveillance against persistent JC and BK viruses. The published findings show that the immune surveillance against human polyomaviruses is a very complex process where an important factor is the involvement and cooperation of non-specific and specific immune defense. Long-term immune surveillance against persistent viruses is mainly mediated by specific T lymphocytes. If this immune surveillance disrupted, it can lead to reactivation of the virus. The change in cytokine environment and the genetic makeup of an individual are another important factors in cases of reactivation. The two human polyomaviruses were developed mechanisms that allow them seemed to partially escape immune surveillance. It also raises the question whether this immune escape contribute to induce tumorigenesis.

**Keywords:** JCV, BKV, persistence, reactivation, immune surveillance, PML, PVAN

## 1. Úvod

Polyomaviry jsou malé neobalené DNA viry mající za hostitele vyší obratlovce v etn lov ka, p i emfl do dne-ní doby je popsáno deset lidských polyomavir . Polyomaviry mají, podobn jako dal-í malé DNA viry, tumorogenní potenciál. Ostatn název „poly“ pochází z eckého slova „mnoho“, jelikofl po aplikaci viru do novorozených my-í dochází k indukci mnoho etných nádor .

Mezi první lidské polyomaviry objevené v 70 letech 20. století pat í JC a BK viry, p i emfl tyto viry nesou pojmenování podle pacient , u kterých byly první identifikovány.

Polyomavirus JC byl poprvé izolován z mozkové tkán pacient trpících progresivní multifokální leukoencefalopatií (PML). Toto demyeliniza ní onemocn ní centrální nervové soustavy je zp sobené lýzou oligodendrocyt infikovaných JCV. V t-ina lidí v-ak prod lá prvotní zpravidla bezp íznakovou infekci JCV b hem d tství, poté virus, u zdravých jedinc bez dal-ích komplikací, p etrvává po celou dobu jejich flivota ve stavu perzistence. Av-ak v n kterých p ípadech t flké imunoprese vyvolané HIV nebo p i pouflití imunopresivní lé by, m fle dojít k reaktivaci JCV a propuknutí PML. Tak ka stejný scéná platí i pro BKV, který byl objeven zhruba ve stejné dob jako JCV. V p ípadech navození imunoprese u pacient s transplantovanou ledvinou m fle op t docházet k reaktivaci BKV, která vyvolá onemocn ní zvané polyomavirem asociovaná nefropatie (PVAN). To m fle v kone ném stádiu vyústit v odhojení transplantovaného t pu. P estofle jsou v-ak oba zmín né polyomaviry -iroce roz-í ené v lidské populaci, výskyt PML a PVAN je velmi vzácný. Velice diskutovaným tématem poslední doby je také spojení JCV a BKV s výskytem n kterých typ rakoviny u lov ka, nebo oba viry kódují ve svém genomu prost edky, kterými z ejm mohou za ur itých podmínek transformovat infikované bu ky.

Prozatím není k dispozici ú inný lék, který by zabránil reaktivaci JCV a BKV. Jedinou moflností p i reaktivaci t chto vir u pacient s farmaceuticky navozenou imunopresí tak nadále z stává pouze moflnost sníflení této imunoprese, cofl v-ak m fle mít v p ípad autoimunitních chorob nebo v p ípad transplantací dal-í nefládoucí ú inky. Podrobn j-í pochopení a objasn ní jednotlivých imunitních mechanism podílejících se na imunitním dohledu JCV a BKV, tak p edstavuje základní p edpoklad v boji proti t mto lidským polyomavir m. Tato práce si proto klade za cíl zhodnotit dosavadní poznatky zapojení jednotlivých imunitních mechanism , které se podílejí na imunitním dohledu proti JCV a BKV, p i emfl k objasn ní n kterých imunitních mechanism je vyuffit také model my-ího

polyomaviru. Dalším cílem této práce je zhodnotit do budoucna možnosti dalších výzkumů zabývajících se obecnou otázkou imunitního dohledu v případě polyomavirů.

## 2. Role nespecifické imunity

### 2.1 Obecná funkce a principy fungování nespecifické imunity proti virové infekci

Nespecifická imunita rozpoznává a eliminuje invazivní patogenní mikroorganismy, jako jsou bakterie, kvasinky a také viry. Představuje proto první linii obrany proti vnikajícím patogenům, nicméně často není schopna sama zajistit úplné odstranění patogenu. Zejména pro virovou infekci platí, že nespecifická imunita zajišťuje první kontrolu infekce s následnou aktivací specifické imunity, která je schopná zcela odstranit virus z organismu. Kooperace a komunikace mezi nespecifickou a specifickou imunitou tak hraje zásadní roli v kontrole virové infekce.

Buněná složka nespecifické imunity je tvořena několika buněnými typy, z nichž nejdříve funkce zastávají dendritické buňky, monocyty/makrofágy a NK (natural killer) buňky. Nespecifický imunitní systém je aktivován rozpoznáním virové komponenty pomocí pattern-recognition receptorů (PRRs). Mezi nejvýznamnější PRRs patří: Toll-like receptory (TLRs), RIG-I-like receptory (RLRs) a nucleotide binding-oligomerization domain (NOD)-like receptory (NLRs). Po detekci virové komponenty pomocí těchto receptorů dochází obecně ke spuštění intracelulární signální kaskády, což vede k produkci interferonů typu I a II, chemokinů, prozántlivých cytokinů, a všechny tyto molekuly se podílejí na vzniku antivirového stavu a navíc je indukována zvýšená exprese kostimulačních molekul, které následně moduluji antivirovou odpověď (Takeuchi and Akira, 2009).

### 2.2 Role antigen prezentujících buněk na aktivaci imunitní odpovědi proti polyomavirům

Jednotlivé inbrední myšičky se rapidně liší v citlivosti na indukci tvorby nádoru po infekci myšičím polyomavirem, od kmenů vysoce citlivých k indukci tvorby tumorů po kmeny vysoce rezistentní. Například myšička kmen C57BR/cdJ (BR) sice vykazuje po infekci značné rozšíření viru, nicméně nedochází k tvorbě nádoru (Lukacher et al., 1995). Příklad kmene, který vykazuje značné tumory vyvolané myšičím polyomavirem (MPyV) je PERA/Ei kmen (PE) (Velupillai et al., 1999). Při srovnávání zmíněných dvou kmenů bylo zjištěno, že zásadní úlohu pro navození rezistence proti indukci tumorigeneze, hrají antigen prezentující buňky (APCs). APCs tumor rezistentního kmene produkují zejména interleukin 12 (IL-12), což má za následek zvýšenou tvorbu interferonu gamma (IFN- $\gamma$ ), a všechny tyto cytokinové prostředí vede k indukci Th1 odpovědi. U kmene PE produkují APCs zejména interleukin 10

(IL-10), což vede naopak ke změně polarity imunitní odpovědi na Th2 typ. Změna polarity je zejména také způsobena rozdílnou expresí kostimulačních molekul u APCs, přičemž u rezistentního kmene BR jsou preferenčně exprimovány B7-1 kostimulační molekuly, zatímco u kmene PE jsou exprimovány B7-2 kostimulační molekuly (Velupillai et al., 2002). Tyto kostimulační molekuly se podílejí na odlišné aktivaci T lymfocytů, přičemž B7-1 kostimulační molekuly stimulují Th1 odpověď a naopak B7-2 molekuly podporují vznik Th2 odpovědi (Kuchroo et al., 1995).

Jak již bylo řečeno, virové komponenty jsou rozeznány pomocí pattern-recognition receptorů (PRRs), přičemž jednu z hlavních rodin těchto receptorů představují Toll-like receptory (TLRs) (Takeuchi and Akira, 2009). Zajímavé zjištění přineslo opět srovnání BR tumor rezistentního myšského kmene a PE tumor senzitivního myšského kmene, nebo APCs mezi těmito kmeny vykazují různou míru exprese mezi TLR2 a TLR4, přičemž TLR2 je jednoduše exprimován u tumor-rezistentního kmene. TLR2 by tak mohl plnit funkci pro rozpoznání MPyV a vytvoření cytokinového prostředí pro specifickou imunitní odpověď (Velupillai et al., 2006). Podobné rozpoznání probíhá například v případě lidského cytomegaloviru, kdy je po rozeznání pomocí TLR2 spuštěna signální dráha zahrnující aktivaci transkripčního faktoru NF- $\kappa$ B, který indukuje expresi prozánětlivých cytokinů (Compton et al., 2003). Nicméně nedávná studie určila jako hlavní receptor TLR4, který určuje polaritu mezi Th1 a Th2 odpovědí u BR a PE kmenů. Rozdíl v určení polarity je přitom dán polymorfismem v tomto receptoru (Velupillai et al., 2012). Přesto zejména nelze funkci TLR2 a například kooperaci více Toll-like receptorů na rozeznání polyomaviru a aktivaci imunitní odpovědi s jistotou vyloučit. Kooperace různých TLRs má totiž vliv na maturaci některých antigen prezentujících buněk a tím i na další modulaci následné specifické Th1 imunitní odpovědi (Bohnenkamp et al., 2007).

Svoji roli může hrát i TLR3, který se podílí na rozeznání dsRNA (Matsumoto et al., 2002) a v životním cyklu MPyV je podle (Gu et al., 2009) také vytvářena dsRNA. Objasnění možné role TLR3 na rozeznání lidského polyomaviru BK se stalo otázkou dalších studií. Vzorky odebrané pomocí biopsie z ledvin vykazujících PVAN poukazují na zvýšenou expresi mRNA kódující TLR3. Za normálních podmínek není povrchový TLR3 u lidských epiteliálních buněk sbírného kanálku (HCDCs) pomocí monoklonální protilátky proti TLR3 detekovatelný. Nicméně po permeabilizaci HCDC buněk bylo objeveno značné množství intracelulárního TLR3. Pomocí RT-PCR navíc bylo zjištěno, že HCDC buňky exprimují za normálních podmínek ještě TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6 a TLR9. Při použití poly(I:C) molekuly představující syntetický analog dsRNA, bylo objeveno značné zvýšení exprese

TLR3 v HCDC buňkách. Navíc prozán tlivé cytokiny TNF- $\alpha$ , IL-1 a IFN- $\gamma$  také zvyšovaly množství TLR3 v HCDC buňkách. Při použití siRNA cílené proti mRNA kódující TLR3 a za použití poly(I:C) aktivátoru TLR3 došlo dále ke snížení exprese interleukinu 6, oproti vzorkům kde byl použit pouze aktivátor poly(I:C). Po infekci HCDC buněk BK virem došlo zhruba 12 hodin po infekci ke značnému zvýšení exprese TLR3 a RIG-1. Dále došlo také ke zvýšení množství interleukinů 6 a 8. Tyto poznatky zejména poukazují na zapojení TLR3 v rozpoznání BK viru a spuštění antivirové odpovědi proti němu (Ribeiro et al., 2012).

Toll-like receptory hrají důležitou roli pro prvotní rozpoznání viru a aktivaci nespecifické imunitní obrany jako první linie obrany, toto rozpoznání a aktivace nespecifické imunity je navíc klíčové pro nastavení adekvátní specifické imunitní odpovědi, což poukazuje na velmi úzký vztah mezi nespecifickou a specifickou imunitou v obraně proti polyomavírové infekci. Další studie těchto receptorů by proto mohla být klíčová k objasnění zahájení antivirové imunitní reakce.

### 2.3 Inhibiční efekt interferonu gamma

Interferon gamma (IFN- $\gamma$ ) představuje další klíčový prvek imunitní antivirové odpovědi. Produkován je zejména CD4<sup>+</sup> Th1 pomocnými lymfocyty, CD8<sup>+</sup> cytotoxickými lymfocyty a NK buňkami. APCs jsou však také schopny produkce IFN- $\gamma$ , což je zejména důležité pro jejich aktivaci a aktivaci okolních buněk. Produkce IFN- $\gamma$  pomocí APCs a NK buněk hraje pravděpodobně úlohu v raných fázích obrany proti infekci, zatímco T lymfocyty se stávají hlavním zdrojem IFN- $\gamma$  po aktivaci specifické imunitní odpovědi v pozdějších fázích infekce. Po navázání IFN- $\gamma$  na receptor je spuštěna Jak/Stat signální dráha, která vede k indukci genů, jejichž promotory obsahují interferon gamma aktivaci sekvenci (GAS) (obr. 1.) Tyto geny mají významnou roli v modulaci nespecifické i specifické imunitní reakce (Schroder et al., 2004).

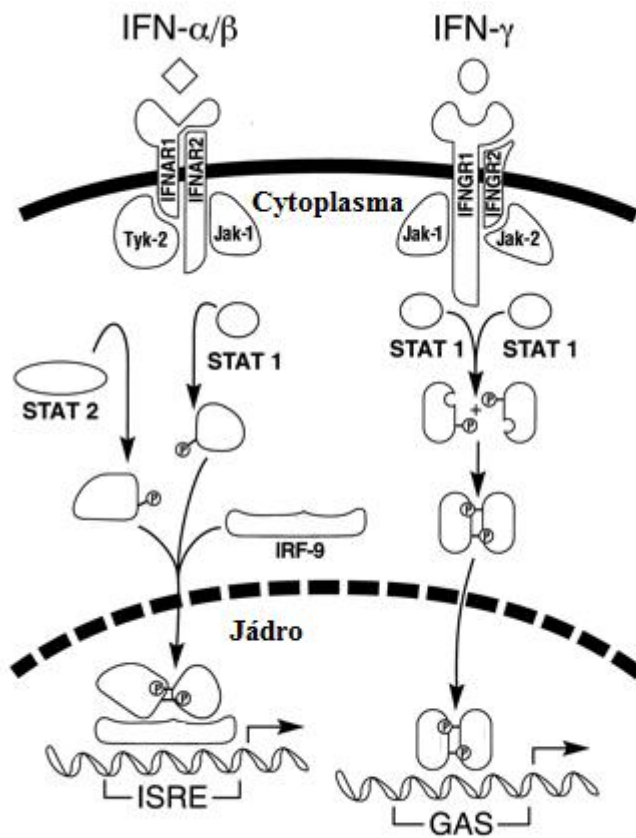
IFN- $\gamma$  se podílí i na kontrole polyomavíru, neboť vykazuje inhibiční efekt na virovou genovou expresi a tím i na produkci virového potomstva BK viru. Pro objasnění role cytokinů na regulaci BK viru, byl sledován efekt těchto cytokinů na expresi BK viru po infekci lidských renálních epiteliálních buněk proximálního tubulu. Zatímco pro IFN- $\gamma$  a IL-6 bylo pozorováno nízké snížení exprese velkého T antigenu a VP1 obalového proteinu, značný inhibiční efekt byl pozorován pro IFN- $\gamma$ . Tento efekt IFN- $\gamma$  byl navíc závislý na množství IFN- $\gamma$ , při vyšší rostoucí koncentraci IFN- $\gamma$  rostla inhibice exprese BK viru. Přestože mechanismus působení IFN- $\gamma$  na inhibici BKV není úplně objasněn, lze zejména vyloučit

nespecifický efekt IFN- $\alpha$  na zastavení proteosyntézy, nebo není ovlivněna transkripce housekeeping genu GAPDH. Za pomoci Western blotu bylo navíc zjištěno, že buňky infikované BK virem vystavené prostředí IFN- $\alpha$  exprimují velký T antigen a VP1 ve stejném množství jako buňky infikované BK virem bez přítomnosti IFN- $\alpha$ , nedochází tedy ke změně exprese virových genů. Dále byla provedena infekce BK virem s různou multiplicitou a zkoumán efekt IFN- $\alpha$ . Cílem byla použita multiplicita infekce 0,1. Nízká multiplicita měla napodobit stav perzistence. Naopak multiplicita 12,5 měla napodobit stav reaktivace a lytické infekce BK viru. Přestože inhibiční efekt u infekce BK virem s nízkou multiplicitou byl výrazný, ke značné redukci docházelo i u infekce s vysokou multiplicitou. IFN- $\alpha$  se tak zřejmě podílí na kontrole BK virové exprese u imunokompetentních i imunosuprimovaných jedinců. IFN- $\alpha$  také značně inhibuje produkci virového potomstva BK viru, při použití multiplicity infekce 0,1 dochází skoro k 80-násobnému snížení produkce virového potomstva, přesto není IFN- $\alpha$  schopen plně zastavit virovou genovou expresi BK viru. Jedním z možných mechanismů působení IFN- $\alpha$  je aktivace transkripčních faktorů, které ovlivňují oblast raných a pozdních promotorů BKV, při čemž tyto BK virové sekvence ovlivněné IFN- $\alpha$  jsou zejména značně konzervované, nebo inhibiční efekt IFN- $\alpha$  lze pozorovat proti různým kmenům BK viru. (Abend et al., 2007).

IFN- $\alpha$  vykazuje podobné inhibiční účinky i v případě MPyV. Jedním z významných mechanismů inhibice je snížení tvorby virového potomstva u infikovaných buněk, které koreluje se snížením exprese velkého T antigenu. IFN- $\alpha$  navíc nepůsobí na životaschopnost infikovaných buněk a nemá tedy přímý cytotoxický efekt na infikované buňky. MPyV obsahuje několik potencionálních GAS sekvencí, při čemž možným mechanismem působení je vazba STAT faktoru na tyto sekvence, což by narušilo virovou replikaci nebo genovou expresi. V úvahu však připadají i možnosti narušení složení virové kapsidy, případně vliv na remodelaci virového minichromosomu. Úlohu IFN- $\alpha$  při kontrole polyomavirové infekce potvrzuje i fakt, že myši deficientní v receptoru pro IFN- $\alpha$  vykazují nižší schopnost imunitní kontroly virové replikace v akutní i perzistentní fázi infekce a navíc jsou vysoce citlivé k indukci tvorby tumorů (Wilson et al., 2011).

Tyto poznatky tak jednoznačně poukazují na významnou roli IFN- $\alpha$  v kontrole polyomavirové infekce. Polymorfismus v lidském genu kódující IFN- $\alpha$  navíc souvisí s množstvím produkce IFN- $\alpha$  (Pravica et al., 2000). Tento polymorfismus tak může u člověka hrát roli ve zvýšené pravděpodobnosti reaktivace BK viru za určitých podmínek, nebo IFN- $\alpha$  zřejmě napomáhá udržet BK virus v relativně neškodném stavu perzistence (Abend et al., 2007). Tuto významnou roli podporuje i zjištění, že myši defektní v FAS, TNF a nesoucí

defekt v genu pro perforin, nevykazovaly sníženou obranyschopnost vůči viru, ani zvýšenou citlivost k indukci tumorů po infekci myším polyomavirem (Byers et al., 2007).



**Obrázek 1. Obecná signální dráha interferonů typu I a II. Převzato od (Samuel, 2001)**

- Na levé straně signální dráha IFN- $\alpha$  a  $\beta$ . Jakmile dojde k rozeznání IFN- $\alpha$  nebo  $\beta$  pomocí příslušného receptoru, aktivují se kinázy Tyk-2 a Jak-1, což vede k fosforylaci a heterodimerizaci STAT1 a STAT2. Tyto faktory pak společně s IRF-9 vytvářejí komplex, který v jádře ovlivuje expresi genů pomocí vazby na elementy ISRE.
- Na pravé straně schéma signální dráhy IFN- $\gamma$ . Po rozeznání IFN- $\gamma$  příslušným receptorem dochází k aktivaci kináz Jak-1 a Jak-2 a následné fosforylaci a homodimerizaci STAT1. Tento STAT1 dimerový komplex označovaný jako GAF komplex následně ovlivuje expresi.

## 2.4 Zapojení interferonů alfa a beta

Interferony typu I představují největší rodinu interferonů zahrnující IFN- $\alpha$  představující u člověka 13 subtypů a IFN- $\beta$ . Společně se oba tyto interferony zásadním způsobem podílejí v navození antivirového stavu, zejména indukcí IFN-stimulovaných genů (ISGs) (Bonjardim et al., 2009). Po navázání interferonů typu I na receptor dochází k fosforylaci faktorů STAT 1 a 2, které poté vytvářejí společně s IRF-9 heterotrimerní transkripční faktor. Tento faktor poté vazbou na element ISRE spouští expresi ISGs genů (obr. 1.) (Darnell et al., 1994).

Po transfekci lidských primárních fetálních gliových buněk (PHFGC) lidským polyomavirem JC dochází ke zvýšení nebo snížení exprese mnoha genů. Tento poznatek byl dosažen izolací totální RNA z JCV transfekovaných PHFG buněk, při níž byla izolovaná RNA analyzována pomocí microarray analýzy. Mezi geny vykazující zvýšenou expresi je i mnoho

interferon stimulovaných genů (ISGs), jmenovitě jde například o STAT1 nebo OAS2 geny. Zvýšená exprese faktoru STAT 1 se navíc podílí přímo na indukci exprese některých ISGs genů. Při zvýšení multiplicity infekce navíc dochází k významnému vzrůstu exprese ISGs. Dochází také ke zvýšení exprese TGF- $\beta$  a také receptoru pro TGF- $\beta$ . Zajímavý je však fakt, že nedochází k výraznému nárůstu exprese interferonu typu I (Verma et al., 2006). Indukce mnoha ISGs genů totiž může probíhat nezávisle na interferonech, například rozeznáním dsRNA pomocí TLR3 nebo dalších virových produktů. Tyto geny se označují jako virovým stresem-indukované geny (VSIG). Do této rodiny patří i STAT1 a OAS2 geny (Sarkar and Sen, 2004). Jak již bylo zmíněno TLR3 hraje zřejmě roli v rozeznání jiného lidského polyomaviru BK (Ribeiro et al., 2012). Možná role TLR3 na rozeznání JC viru vedoucí ke spuštění VSIG je však otázkou dalších studií.

Ani roli interferonu typu I nelze vyloučit, neboť vykazují silný inhibiční efekt na infekci JC viru, pokud vystavíme buňky prostředí obsahující interferony typu I. V přítomnosti interferonu typu I opět nastává značná indukce několika ISGs u JCV infikovaných, ale i neinfikovaných buněk. Přítomnost interferonu typu I nicméně vede k rapidnímu snížení replikace i transkripce JCV. Dochází k takovému snížení množství virové mRNA kódující velký T antigen a VP1, které koresponduje s omezením replikace JCV o 90 až 95% oproti infekci probíhající bez přítomnosti interferonu typu I. Při srovnání IFN- $\alpha$  a IFN- $\beta$  bylo také zjištěno, že IFN- $\alpha$  vykazuje vyšší efektivitu v inhibici virové replikace. Při použití virových partikulí ozářených UV zářením a partikulí, které byly ještě navíc tepelně deaktivovány a vystaveny UV, nedochází překvapivě k indukci ISGs. Toto zjištění poukazuje na skutečnost, že virová transkripce je zřejmě důležitá pro navození antivirového stavu. Navíc indukce ISGs silně koresponduje se zvýšením mRNA pro velký T antigen, což dále potvrzuje předchozí tvrzení. V přítomnosti IFN- $\alpha$  a protilátky proti tomuto interferonu navíc dochází k reverzi této inhibice, což poukazuje na znatelné zesílení indukce ISGs pomocí interferonu typu I. Přesný mechanismus inhibice však není znám. Přestože dochází k znatelnému omezení virové replikace, nejsou však interferony typu I schopny plně zastavit virovou replikaci, nicméně zřejmě mohou znatelně modulovat šíření JC viru. Znatelný inhibiční efekt interferonu typu I tak predikuje tyto interferony k možnému využití v boji proti JC viru (Co et al., 2007).

## **2.5 Možný vliv TGF- $\beta$ na reaktivaci lidských polyomavirů**

Dosud bylo ukázáno, že v těle zmíněných cytokinů (interferony alfa, beta a gamma) se podílejí na inhibici polyomavirové infekce. Nicméně u jiných cytokinů lze pozorovat i

efekt opa ný. Po infekci myší polyomavirem BK dochází k indukci tumorogeneze. Zajímavé však je, že transformované buňky vykazují vyšší expresi TGF- $\beta$ 1, což navíc zřejmě vede k akceleraci tumorogeneze (Corallini et al., 2003).

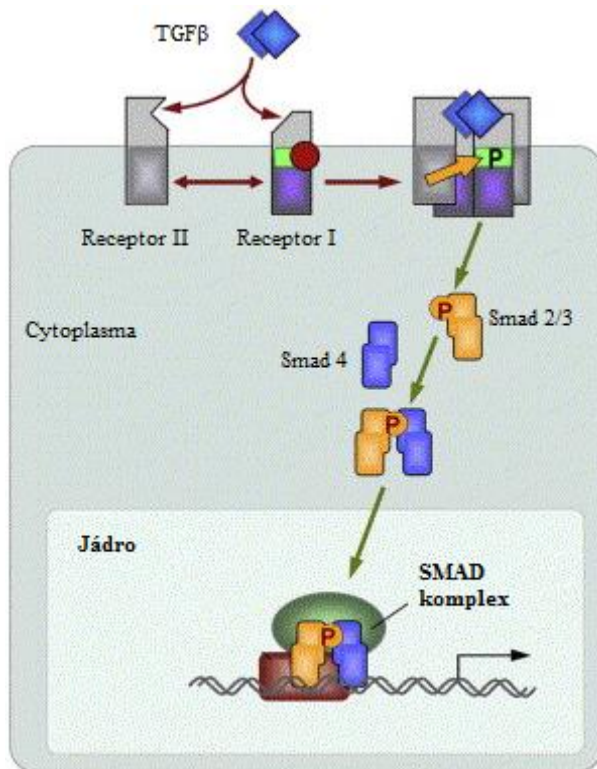
Při testování několika kmenů BK viru bylo dále prokázáno, že TGF- $\beta$  hraje značnou úlohu v regulaci zejména vlastní virové transkripce. V přítomnosti TGF- $\beta$  dochází ke zvýšení transkripce virového velkého T antigenu a to zhruba 3,3-krát. Tato interakce je však závislá na typu kmene BK viru, nebo toto zvýšení exprese lze pozorovat pouze u kmene TU. Za pomoci luciferázového systému bylo ukázáno, že u kmene TU dochází k indukci vlastního promotoru v přítomnosti TGF- $\beta$ . Nicméně při použití jiné buněčné linie a stejného testu pro promotory kmenů Dunlop a Proto-2, dochází naopak k repressi vlastní transkripce, což poukazuje na možnost různé regulace TGF- $\beta$  v různých buněčných typech. Zmapování sekvencí v NCCR elementech odhalilo unikátní sekvenci TU kmene, při němž pro tuto sekvenci byla predikována vazba s transkripčním faktorem ZEB-1. Tento faktor se zřejmě spolu s faktorem SMAD3 váže na vlastní promotory a zvyšuje tím jejich expresi (Abend and Imperiale, 2008). ZEB-1 se totiž podílí na interakci s koaktivátorem p300 a zahajuje tak formování p300-SMAD transkripčního komplexu (Postigo et al., 2003).

SMAD proteiny hrají zásadní úlohu v TGF- $\beta$  signální dráze, nebo po interakci TGF- $\beta$  s receptorem dochází k fosforylaci, která vede k uvolnění inhibičního proteinu FKBP12, při němž se uvolní místo pro SMAD proteiny, které slouží jako nový substrát pro fosforylaci (Huse et al., 2001). Komplex SMAD proteinů putuje do jádra, kde ovlivňuje expresi mnoha genů. Expresí těchto genů ovlivňuje zejména diferenciaci, buněčnou proliferaci a podílí se i na modulaci imunitní odpovědi (Massagué and Gomis, 2006). SMAD signální dráha je nezbytná pro aktivaci většiny, ale ne všech TGF- $\beta$  indukovaných genů. TGF- $\beta$  aktivuje i jiné signální dráhy zahrnující MAP kinázy nebo ER kinázy (Derynck and Zhang, 2003).

Zvýšenou expresí TGF- $\beta$  vyvolává i HIV-1 pomocí působení Tat proteinu, což může vést ke změně cytokinového prostředí v mozku (Rasty et al., 1996). Zvýšená exprese TGF- $\beta$  pomocí Tat proteinu může mít vliv na další lidský polyomavirus JC. Jedním z možných mechanismů je právě modulace JCV replikace přes indukci SMAD signální dráhy prostřednictvím TGF- $\beta$ . Rolí SMAD proteinů zvýrazňuje i fakt, že v infikovaných oligodendrocytech dochází k významné detekci právě proteinů SMAD 3 a SMAD 4. To dále potvrzuje hypotézu, že HIV-1 může nepřímo ovlivnit zvýšenou expresí JC viru, přes zvýšení exprese TGF- $\beta$ , což vede k indukci SMAD signální dráhy. SMAD 3 sám je navíc schopen zvýšit expresi vlastní virových genů 8-krát a expresi pozdních genů 10-krát a podobný efekt lze pozorovat i pro SMAD 4. Nicméně v přítomnosti obou faktorů dochází zhruba k 12-

násobnému zvýšení exprese různých genů a k 27-násobnému zvýšení exprese pozdních genů. HIV-1 se tak může značně podílet na reaktivaci JCV právě v mozku (Enam et al., 2004). Tat protein, kromě stimulace exprese TGF- $\beta$ , navíc ještě přímo zesiluje vazbu SMAD 2,3 a 4 na kontrolní region JC viru a tím zesiluje expresi, čímž dále zvyšuje pravděpodobnost reaktivace. Po zvýšení exprese TGF- $\beta$  pomocí Tat proteinu viru HIV-1 dochází zřejmě ke společné migraci TGF- $\beta$  a Tat do oligodendroglálních buněk, kde společně stimulují rovnou i pozdní genovou transkripci, přičemž i společným působením obou faktorů dochází k 100-násobnému zesílení rovné transkripci. I přes tuto zjevnou vyvstává ve vztahu mezi HIV-1 a JCV mnoho otázek a přesný mechanismus je předmětem dalších studií (Stettner et al., 2009).

**Obrázek 2. Obecná signální dráha TGF- $\beta$ . Převzato od (Massagué and Gomis, 2006)**



TGF- $\beta$  se váže na receptor typu II, přičemž receptor typu II poté tvoří komplex s receptorem typu I. Následně dochází k fosforylaci receptoru typu I receptorem typu II. Fosforylovaný receptor typu I fosforyluje komplex SMAD 2/3, který vazbou se SMAD 4 vytváří aktivovaný SMAD komplex. Tento komplex poté v jádře spolu s dalšími faktory ovlivňuje expresi zhruba 300 genů.

Předchozí studie tedy potvrzují důležitost SMAD proteinů v indukcí polyomavírové exprese, nicméně úloha dalších faktorů podporujících vazbu SMAD není zcela objasněna. Zejména u BK viru nebylo možné přesně určit přímou vazbu SMAD proteinů a ZEB-1 transkripčního faktoru. Přesto mutované virové promotory BK viru nesoucí místo pro vazbu pouze SMAD proteinů nebo pouze ZEB-1 proteinu, nevykazovaly zvýšení exprese po indukci pomocí TGF- $\beta$ , což poukazuje na zapojení dalších transkripčních faktorů (Abend and Imperiale, 2008). Mechanismus působení TGF- $\beta$  však může být velmi roznorodý, neboť po

p idání inhibitoru, který p sobí na MEK signální dráhu, do-lo k výraznému snížení exprese JC viru v bu kách vystavených TGF- (Ravichandran et al., 2007).

Uvedená fakta nazna ují blízký vztah p sobení TGF- a lidských polyomavir se z ejným pozitivním efektem na tyto viry. Nedávná studia navíc potvrzují mofný vliv TGF- na reaktivaci n kterých polyomavir , nebo u pacient se systémovým lupus erythematoses koreluje zvý-ené mnofství TGF- v mo i s reaktivací JC viru. Podobné zvý-ení TGF- v-ak nebylo detekováno pro BK virus, p i emfl byl testován i kmen TU (Rianthavorn et al., 2012). TGF- se navíc podílí i na reaktivaci viru Epstein-Barrové, p i emfl na reaktivaci tohoto viru se op t podílí SMAD signální dráha (Iempridee et al., 2011). Objasn ní p sobení mechanismu TGF- zejména na lidské polyomaviry proto m fle v budoucnu hrát zásadní roli v prevenci reaktive a vyvolání neřádoucích patologií.

## **2.6 Mofný vliv TNF- na reaktivaci lidských polyomavir**

Dal-í z cytokin , který by mohl hrát roli v reaktivaci lidských polyomavir , je tumor necrosis factor alfa (TNF- ). Tento faktor stimuluje asnou i pozdní expresi JC virus v oligodendroglialních a astroglialních bun ných typech. Pomocí imunohistochemických metod navíc bylo ukázáno, fle klinické vzorky HIV pozitivních pacient trpících PML obsahují zvý-ené mnofství TNF- i receptoru pro tento cytokin (Wollebo et al., 2011).

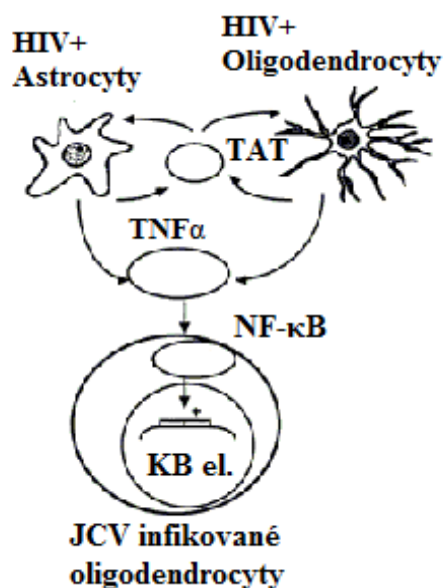
TNF- je jedním ze len rodiny tumor nekrotizujících nádory. Obecn tyto faktory hrají d leřlitou roli v mnoha procesech zahrnující nap íklad kontrolu tumorogeneze, podílí se na tvorbu zán tu a jsou zapojeny i v antivirové obran . Jedním z mechanism ú ink TNF- je i aktivace NF- B (Chu, 2013). Tento fakt je velmi d leřlitý, nebo JC virus obsahuje v kontrolním regionu KB element, na který se váfle NF- B, p i emfl tato vazba navíc ovliv uje expresi JC virových promotor (Safak et al., 1999). Podobný efekt lze sledovat i pro BK virus, kde exprese p65, jedné z podjednotek NF- B, také ovliv uje expresi asných virových promotor . Podjednotka p65 se podílí na modulaci asné virové exprese kooperací s dal-ím transkrip ním faktorem C/EBP . Transkrip ní faktor C/EBP sám neovliv uje asnou virovou transkripci, nicmén pokud je v ur ítém mnofství p ítomen společ n s NF- B dochází k významnému zesílení asné virové transkripce BK viru. Zajímavý je v-ak fakt, fle oba tyto faktory inhibují expresi pozdního virového promotoru. To poukazuje na r zný efekt obou faktor na asnou a pozdní transkripci BK viru. D leřlitost KB elementu pro vazbu NF- B bylo navíc ov eno pomocí mutagenese, nebo mutací KB vazebného místa do-lo ke zru-ení stimula ního efektu NF- B na asnou virovou transkripci. KB vazebné místo tak

představuje další element pro stimulaci transkripce z čínského virového promotoru (Gorrill and Khalili, 2005).

Další transkripční faktor hrající úlohu v indukci exprese je NFAT4. Tento faktor se váže do KB elementu stejně jako NF- $\kappa$ B a zesiluje tím transkripci jak čínských tak pozdních genů u JC viru. Faktory NFAT4 a NF- $\kappa$ B dokážou navíc kooperativně stimulovat expresi virových genů (Wollebo et al., 2012). NFAT4 faktor se navíc podílí na stimulaci transkripce i u BK viru (Jordan et al., 2010).

Množství TNF- $\alpha$  může být v mozku zvýšeno například u HIV pozitivních pacientů, nebo HIV indukuje změnu cytokinového prostředí v mozku a zvyšuje tak množství TNF- $\alpha$  (Yeung et al., 1995). Toto zjištění poukazuje na další možnost reaktivace JC viru v mozkové tkáni například po soběm HIV (obr. 3.), nebo zvýšená hladina TNF- $\alpha$  zejména aktivuje NF- $\kappa$ B, který se společně s NFAT4 váže na KB element a pravděpodobně zvýší JC virovou čínsou genovou transkripci. KB element tak může hrát roli například mezi perzistentní infekcí a reaktivací viru například v určitých podmínkách (Wollebo et al., 2012).

**Obrázek 3. Neplánované soběm HIV produkcí TNF- $\alpha$ . Převzato od (Sweet et al., 2002).**



HIV infikované astrocyty a oligodendrocyty produkují protein TAT, například tato produkce stimuluje také expresi TNF- $\alpha$ . Zvýšené množství TNF- $\alpha$  v mozkové tkáni vede k aktivaci NF- $\kappa$ B faktoru v JCV infikovaných oligodendrocytech, například TAT NF- $\kappa$ B vazbou na KB element následně stimuluje expresi JCV.

Zajímavé zjištění však přinesl fakt, že například použití monoklonální protilátky infliximab cílené proti TNF- $\alpha$  u pacienta trpícího revmatoidní artritidou došlo k reaktivaci JCV v mozku a vyvolání PML. Pravděpodobně důvodem reaktivace JCV je zejména efekt infliximabu na specifickou imunitní reakci zprostředkovanou T lymfocyty (Kumar et al., 2010). TNF- $\alpha$  hraje významnou roli v aktivaci specifické imunitní odpovědi, nebo se podílí na aktivaci a maturaci dendritických buněk, například dendritické buňky následně ovlivní aktivitu T lymfocytů. Při zablokování TNF- $\alpha$  dochází ke značné redukci aktivity T lymfocytů, nebo u

tchto T lymfocyt dochází k redukci tvorby IFN- $\gamma$ , STAT-1, granzymu B a dalších gen podílejících se na tvorbu zánětu (Gottlieb et al., 2005).

Ze zmíněných faktů tedy vyplývá, že zatímco lokální zvýšení TNF- $\alpha$  v mozku má zejména vliv na reaktivaci JCV, obecné snížení TNF- $\alpha$  mechanismem blokace působení TNF- $\alpha$  prostřednictvím protilátek zřejmě také vede ke zvýšené pravděpodobnosti reaktivace JCV. Objasnění role TNF- $\alpha$  a dalších TNF- $\alpha$  indukovatelných faktorů tak představuje jednu z dalších cest v boji proti patologiím vyvolaných lidskými polyomaviry.

## 2.7 NK buňky a T lymfocyty

Další významnou roli v kontrole tumorogeneze u myši infikovaných MPyV hrají NK buňky společně s T lymfocyty. Pro zjištění úlohy NK buněk a T lymfocytů byly použity myšičí kmeny s deletovanými geny pro TCR $\beta$ , postrádající T lymfocyty, dále kmeny s deletovanými geny pro TCR $\alpha$ , postrádající T lymfocyty i T lymfocyty a myšičí kmen E26 postrádající všechny T lymfocyty a neobsahující NK buňky. U zmíněných kmenů byl sledován efekt MPyV při dlouhodobé infekci na indukci tvorby tumorů. Myšiči postrádající pouze T lymfocyty nevykazovaly viditelné tumory a zhruba 80% těchto myšiči přežilo déle než 10 měsíců. Zatímco dobu 10 měsíců přežilo pouze 5% myšiči postrádajících T lymfocyty i T lymfocyty, přežilo u 60% těchto myšiči bylo možno pozorovat velké tumory. Většina tumorů přitom pocházela zejména ze slinných žláz. U posledního testovaného kmene E26, kde myšiči postrádají všechny T lymfocyty a nadto i NK buňky, docházelo navíc k rychlejší indukci tumorogeneze než u myšiči postrádajících T lymfocyty a T lymfocyty, ale obsahující NK buňky. Buňky izolované z nádorů vyvolaných MPyV (PyVTu) navíc vykazují schopnost, po smíchání s buňkami izolovanými ze sleziny neinfikované myšiči, indukovat diferenciaci T lymfocytů a NK buněk, přežilo navíc dochází k významnému zesílení produkce IFN- $\gamma$  u T lymfocytů i NK buněk a zvýšené produkci granzymu B u NK buněk. Podobný efekt lze pozorovat *in vivo*, nebo pokud jsou do myšiči injikovány buňky izolované z nádorů vyvolaných MPyV, dochází opět k nárůstu počtu T lymfocytů a NK buněk specifických proti injikovaným buňkám. Zvýšení počtu T lymfocytů a NK buněk navíc nenastává po infekci MPyV, což poukazuje na aktivaci T lymfocytů a NK buněk pouze nádorovými buňkami. Izolované PyVTu buňky byly navíc efektivně zabity buňkami odebraných z peritonea myšiči postrádajících T lymfocyty, avšak k tomuto efektu nedocházelo při odběru buněk z peritonea u myšiči postrádajících NK buňky. To poukazuje na skutečnost, že PyVTu buňky aktivují NK buňky cílenou smrtí cílenou proti transformovaným

bu kám. PyVTu bu ky navíc vykazovaly zvýšené množství povrchového stresového ligandu Rae-1 a NK bu ky stimulované pomocí PyVTu m ly na svém povrchu více molekul CD107a a CD107b (Mishra et al., 2010).

NKG2D je receptor n kterých T lymfocyt v etn T lymfocyt a NK bun k. Po rozeznání stresového ligandu pomocí tohoto receptoru dochází k aktivaci NK a T lymfocytární bun né odpov di zapojené v protinádorové obran (Bauer et al., 1999). Povrchové molekuly CD107a a CD107b jsou exprimovány NK bu kami a CD8+ T lymfocyty, podílejí se na spu-t ní degranulace a p ispívají tak k cytotoxicit NK a CD8+ T lymfocyt (Betts et al., 2003). Jedním ze stresových ligand rozeznávaných NKG2D receptorem je Rae-1 (Cerwenka et al., 2000). PyVTu bu ky vykazují zvý-enou expresi stresového ligandu Rae-1. Pravd podobným mechanismem p sobení NK bun k proti PyVTu bu kám je tedy nejspí-e rozeznání stresového ligandu Rae-1 p es NKG2D receptor, p i emfl toto rozeznání spustí NK ízenou cytotoxickou odpov proti t mto bu kám. Toto tvrzení navíc podporuje fakt, fle pouflití monoklonální protilátky proti NKG2D receptoru vede k selhání cytotoxické odpov di NK bun k. P i porovnání množství viru v r zných tkáních u my-í postrádajících T lymfocyty a u my-ích postrádajících jak T lymfocyty tak i T lymfocyty, v-ak nelze pozorovat rozdílné množství MPyV (Mishra et al., 2010). Navíc my-i nemající NK bu ky také nevykazují vy-í množství viru v r zných orgánech (Szomolanyi-Tsuda et al., 1994). Tyto zji-t ní poukazují na skute nost, fle v p ípad polyomavir se NK bu ky a T lymfocyty podílejí spí-e na protinádorové obran a jejich role v antivirové obran je z ejm minimální. Nicmén NK bu ky nejsou z ejm schopny eliminovat v-echny transformované bu ky, p i emfl NK bu ky z ejm hrají roli v první fázi boje proti tumorovým bu kám. N které transformované bu ky jsou pravd podobn schopny p ekonat kontrolu NK bun k a jsou rozeznány pomocí T lymfocyt . My-i mající NK bu ky, ale postrádající T lymfocyty, totifl vykazují mnohem vy-í indukci tumorogeneze vyvolanou MPyV nefl my-i mající NK bu ky i T lymfocyty. Lymfocyty T tak z ejm p edstavují dal-í výkonnou zbra proti transformovaným bu kám uniklých z kontroly NK bun k (Mishra et al., 2010).

NK bu ky a T lymfocyty vykonávají d leflitou úlohu v protinádorové obran , p i emfl dal-í studie a dal-í objasn ní mechanismu p sobení t chto bun k p edstavuje krok vp ed v boji proti indukci tumorogeneze vyvolanou polyomaviry.

## 2.8 Role polyomavirových miRNA

Lidské polyomaviry JC a BK společně exprimují miRNA, které se podílejí na regulaci jejich vlastní exprese. U obou virů lze pozorovat zhruba 60 nukleotidů dlouhou pre-miRNA, z níž z této pre-miRNA jsou dále vytvářeny zhruba 22 nukleotidové miRNA. S využitím predikčního programu byly navrženy primery specifické k 5' a 3' koncům pre-miRNA. Tímto postupem byly zmapovány 5p a 3p miRNA, z nichž obě tyto miRNA sdílejí u obou virů značnou homologii. Dále bylo zjištěno, že 5p miRNA je vytvářena ve větší množství než 3p miRNA. Ke zjištění kvantitativní inhibice virových miRNA bylo využito luciferázového reportérového systému, z něhož konstrukt obsahoval sekvenci velkého T antigenu JCV komplementární k oběma JCV miRNA. Kótransfekcí buněk reportérovým plazmidem a plazmidem kódujícím JCV pre-miRNA poté došlo k dramatickému snížení luciferázové aktivity. Tento inhibiční efekt byl přičítán za přítomnosti oligonukleotidů komplementárních k 5p a 3p miRNA. Tato zjištění poukazují na efekt 5p a 3p miRNA v regulaci vlastní virové transkripce. Lidské polyomaviry zejména vyvolávají autoregulaci vlastních genů jako nástroje pro snížení rozpoznání pomocí cytotoxických T lymfocytů (Seo et al., 2008), nebo u příbuzného polyomaviru SV40 miRNA zprostředkovaná autoregulace snižuje cytotoxický efekt T lymfocytů proti virem infikovaným buňkám (Sullivan et al., 2005).

Jelikož některé herpesviry vyvolávají expresi miRNA k umlacení stresového ligandu MICB, nebo tímto mechanismem uniknou NK buňkám, které je nejsou schopny rozeznat pomocí NKG2D receptoru (Nachmani et al., 2009). Další studie zkoumala možnost repressi některých stresových ligandů vyvolanou 5p a 3p miRNA kódovaných lidskými polyomaviry BK a JC. Byl proto připraven lentivirový vektor nesoucí 3p miRNA, která má stejnou sekvenci u BK i JC viru. Dále byly připraveny další dva lentivirové vektory nesoucí 5p miRNA BK viru a JC viru, z nichž 5p miRNA se sekvenčně liší mezi těmito viry. Připravené lentivirové vektory byly transdukovány do buněčné linie BJAB, která sama o sobě exprimuje značnou část stresových ligandů rozeznávaných NKG2D. U buněk exprimujících 3p miRNA bylo možné sledovat okolo 40% poklesu exprese stresového ligandu ULBP3, zatímco 5p miRNA nevykazovaly žádný efekt. Podobného efektu bylo dosaženo u buněčné linie 293T, kde došlo k redukci exprese ULBP3 zhruba 30% po transdukci pomocí lentivirového vektoru nesoucí 3p miRNA. Pomocí kvantitativní polymerázové řetězové reakce navíc bylo ukázáno, že redukce exprese ULBP3 není spojena s poklesem mRNA kódující ULBP3, což zejména poukazuje na redukci ULBP3 prostřednictvím inhibice translace (Bauman et al., 2011).

Jelikož ULBP3 je jedním ze stresových ligandů rozeznávaných NKG2D receptorem NK buněk, z nichž toto rozeznání spouští cytotoxické působení NK buněk (Cosman et al.,

2001). Objasn ní vlivu snížení exprese stresového ligandu ULBP3 na snížení NK cytotoxického úinku bylo dalším p edem tem studií. P i použití r zných shRNA cílených proti ULBP3 došlo ke zji-t ní, že i malé snížení p edstavující zhruba 15% zp sobuje zna nou redukci úinku NK bun k. Redukce cytotoxického úinku byla také ov ena pro bun nou linii U87, nebo tuto glioblastomovou bun nou linii p irozen infikuje JC virus. Pokud jsou do bun né linie U87 transdukovány lentivirové vektory nesoucí 3p miRNA kódované JC a BK virem, dochází k 30% redukci exprese ULBP3, což vede ke snížení NK cytotoxicity. Ke srovnatelnému snížení cytotoxického úinku NK bun k proti U87 dochází p i použití monoklonálních protilátek proti NKG2D receptoru NK bun k. S využitím luciferázového reportérového systému poté bylo ur eno, že 3p miRNA se cílen váží na 3' nep ekládanou oblast mRNA kódující ULBP3. Pro zji-t ní jestli samotná infekce lidským polyomavirem JC ovliv uje exprese ULBP3 v U87 bu kách, byla provedena kvantitativní polymerázová et zová reakce, ke zji-t ní množství mRNA kódující stresové ligandy ULBP3, ULBP2 a MICA. Tato analýza odhalila zna né zvý-ení mRNA kódující stresové ligandy ULBP3 a MICA po infekci JC virem. P estofe dochází k indukci mRNA po infekci, nedochází 72 hodin po infekci k výrazn j-ímu zvý-ení množství stresových ligand MICA a ULBP3. Naopak 6 dn po infekci dochází k redukci množství stresového ligandu ULBP3, což koreluje se zvý-ením množství 3p miRNA. Pro kone né potvrzení mechanismu p sobení 3p miRNA na snížení množství ULBP3 byly p ipraveny RNA sekvence obsahující vazebné místo pro 3p miRNA a sloufící tak k vychytání 3p miRNA. P i použití RNA sekvencí obsahující vazebné místo pro 3p miRNA byl po infekci JC virem pozorován o 40% nár st stresového ligandu ULBP3 oproti infekci, kde nebylo použito RNA s vazebným místem pro 3p miRNA. Tento 40% nár st ULBP3 navíc vedl ke zvý-enému cytotoxickému úinku NK bun k proti infikovaným bu kám. Tyto zji-t ní tedy nazna ují, že 3p miRNA dvou lidských BK a JC polyomavir sloufí jako nástroj úniku p ed cytotoxickým úinkem NK bun k, p i emfl 3p miRNA cílen redukuje stresový ligand ULBP3 a snižuje tím -anci na rozeznání pomocí NKG2D receptoru NK bun k (Bauman et al., 2011).

Zji-t né poznatky poukazují na fakt, že polyomaviry kódované miRNA p edstavují nejspí-e jednu ze strategií úniku p ed hostitelským imunitním dohledem a pravd podobn se podílejí na navození perzistentní polyomavirové infekce. Jak již navíc bylo zmín no v p edchozí kapitole, rozeznání pomocí NKG2D receptoru vede k aktivaci nejenom NK bun k, ale také n kterých T lymfocyt , p i emfl tato aktivace hraje významnou úlohu také v protinádorové obran (Bauer et al., 1999). Vystává tak zajímavá otázka, zda lidské polyomaviry tímto imunitním únikem nep ispívají také ke vzniku nádorového bujení.

### 3. Role specifické imunity

#### 3.1 Obecná funkce a principy fungování specifické imunity proti virové infekci

Po rozeznání viru dochází nejprve k aktivaci nescifické odpov di, p i emfl následn dochází také k aktivaci specifické imunitní reakce. Po spu-t ní specifické imunitní reakce dochází ke zvý-ení množství protilátek a T lymfocyt , které specificky rozeznávají virové antigeny. Virové antigeny prezentované APCs jsou rozeznány  $CD4^+$  T lymfocyty, p i emfl toto rozeznání vede ke stimulaci makrofág ,  $CD8^+$  T lymfocyt a B lymfocyt . Aktivované  $CD8^+$  T lymfocyty dále p edstavují jednu z hlavních zbraní v antivirové obran . Svoji roli mají v-ak i B lymfocyty, nebo tvorbou neutraliza ních protilátek p ispívají k redukci množství infek ních ástic.

D lefitost B a T lymfocyt lze demonstrovat u SCID my-ího kmene, u kterého my-i postrádají T i B lymfocyty, nebo po infekci SCID my-í MPyV dochází k indukci akutního myeloproliferativního onemocn ní (AMD), které zp sobuje smrt zhruba do 14 dn po infekci (Szomolanyi-Tsuda et al., 1994).

#### 3.2 Úloha B lymfocyt a protilátek

B lymfocyty produkcí protilátek, které specificky váflí virové antigeny, p edstavují dal-í významný imunitní mechanismus podléjící se na antivirové obran . Pasivní imunizace protilátkami specifickými proti MPyV zabra uje tvorb nádor vyvolaných MPyV u imunosuprimovaných my-í, pokud je ov-em tato imunizace provedena p ed infekcí MPyV. Stejný mechanismus pasivní imunizace chrání i novorozené my-i v prvních týdnech flivota, kdy jsou velmi citlivé k indukci tvorby nádor vyvolaných MPyV (Gaugas et al., 1973).

Obecn platí, fle pro izotypový p esmyk a vytvo ení vysokoafinitních protilátek IgG je zapot ebí pomoci od  $CD4^+$  T lymfocyt (DeKruyff et al., 1993). Nicmén my-i postrádající T lymfocyty jsou schopny vytvo it protilátkovou odpov IgG nezávislou na pomoci T lymfocyt . Pro zji-t ní tohoto poznatku bylo vyuffito my-ích kmen postrádajících T nebo B lymfocyty, p i emfl tyto my-í kmene byly infikovány MPyV. Z výsledk tohoto experimentu vyplývá, fle my-i postrádající B lymfocyty p eflily akutní fázi infekce MPyV a nevykazovaly ani citlivost k výskytu nádor . Toto zji-t ní potvrzuje d lefitou roli T lymfocyt v kontrole MPyV, p i emfl tato role byla je-t potvrzena, nebo pokud byly do my-ího kmene postrádajícího B lymfocyty navíc injikovány protilátky cílené proti  $CD4^+$  a  $CD8^+$  T lymfocyt m, do-lo op t k indukci akutního myeloproliferativního onemocn ní (AMD) a ke

smrti do 16 dn po infekci. Zajímavé však bylo zjištění, že myši mající pouze B lymfocyty jsou po infekci MPyV rezistentní proti AMD vyvolané MPyV. Z toho vyplývá, že B lymfocyty jsou schopné v nepřítomnosti T lymfocyt zajistit po infekci antivirovou odpověď. Role B lymfocyt byla opět potvrzena pšením B lymfocyt z neinfikovaných myší do SCID myší, které postrádají B i T lymfocyty, nebo po infekci MPyV došlo opět k ochraně proti AMD. Přesto samotné B lymfocyty přenesené do SCID myší nezabránilo pozdějšímu formování nádorů vyvolaných MPyV. Naopak k ochraně proti nádorům indukovaným MPyV došlo po společném přenosu T i B lymfocyt do SCID myší. Při srovnávání množství MPyV v časovém období 3 až 14 dn po infekci v některých orgánech, navíc nebyl pozorován žádný rozdíl obsahu virové DNA mezi SCID myšmi, do kterých byly přeneseny pouze B lymfocyty, a mezi SCID myšmi, u kterých došlo ke společnému přenosu B i T lymfocyt. Dále bylo testováním séra odebraného z myší majících pouze B lymfocyty ukázáno, že B lymfocyty generují specifickou protilátkovou IgM a IgG odpověď proti MPyV. Toto sérum navíc po aplikaci do SCID myší oddálilo zhruba o 3 týdny nástup AMD po infekci MPyV. B lymfocyty jsou tak schopny podílet se na kontrole MPyV infekce a zejména v akutní fázi infekce představují jednu z obranných linií, nebo snižují rozšíření viru. Přesto nejsou samotné B lymfocyty schopny v pozdější fázi zabránit vzniku MPyV indukovaným nádorům (Szomolanyi-Tsuda and Welsh, 1996).

Při imunizaci myší těmi různými formami antigenů MPyV byly zjištěny další významné poznatky týkající se T nezávislé protilátkové odpovědi. Bylo zjištěno, že samotný VP1 je sice schopen navodit IgM protilátkovou odpověď, nicméně oproti umělým virovým kapsidám myšího polyomaviru (VLPs) a infekčnímu viru je tato odpověď zhruba 10-krát menší. Jelikož jsou VLPs a MPyV charakteristické svým uspořádáním, lze říci, že vysoké opakování stejných antigenů má vliv na sílu IgM T nezávislé odpovědi. Dále bylo prokázáno, že pouze replikující se MPyV je schopen navodit T nezávislou protilátkovou odpověď IgG, při které tvorba této IgG odpovědi nezahrnovala tvorbu germinálních center, z čehož plyne, že pro tvorbu germinálních center je potřeba pomoci od T lymfocyt (Szomolanyi-Tsuda et al., 1998).

Protože B lymfocyty jsou schopny generovat bez pomoci T lymfocyt protilátkovou odpověď IgG pouze proti živému MPyV, tvorba této T nezávislé protilátkové odpovědi je zřejmě složitý proces zahrnující mnoho interakcí a signálních drah. Další studie odhalily, že virová kapsida myšího polyomaviru vyvolává T nezávislou protilátkovou odpověď typu 2. Tato protilátková odpověď je sice vyvolána i bez přítomnosti NK buněk, nicméně NK buňky se zřejmě sekrecí IFN- $\gamma$  podílejí na modulaci této odpovědi, nebo IFN- $\gamma$  přímo působením

na B lymfocyty aktivuje zejména na izotyp IgG2a (Szomolanyi-Tsuda et al., 2001). Dalším mechanismem zesílení IgG nezávislé na T lymfocytech odpovídá zhruba o polovinu je interakce kostimulačních molekul CD40 s CD40L, přičemž k této interakci zejména dochází vzájemně mezi B lymfocyty (Szomolanyi-Tsuda et al., 2000).

Zajímavá zejména přinesla také studie zabývající adaptorovým proteinem MyD88 a jeho úlohou v navození protilátkové odpovídání proti MPyV, nebo tento protein je zapojen do signální kaskády zahrnující také Toll-like receptory (Kawai et al., 1999), ale je také zapojen v signální dráze interleukinů 1 a 18 (Adachi et al., 1998). Pro zejména roli MyD88 byl vyuffit myší kmen s deletovaným genem pro MyD88, přičemž tento myší kmen byl následně testován a porovnáván s divokým myším kmenem (WT) ve schopnosti a rozsahu tvorby protilátkové odpovídání proti MPyV. Takto bylo zejména známo, že myši neobsahující MyD88 jsou schopny v přítomnosti T lymfocytů navodit protilátkovou odpověď proti MPyV, přičemž tato odpověď se oproti protilátkové odpovídání u WT myší značně liší v zastoupení izotypu IgG2b. Pomocí ELISpotu bylo také ukázáno, že počet plazmocytně produkujících IgM a IgG protilátek specifických proti MPyV je v případě IgM zhruba 10-krát a IgG zhruba 4-krát redukován oproti WT myším. Navíc u WT myšů kmene docházelo v kostní dřevě ke zvýšení počtu plazmocytně produkujících IgG protilátek proti MPyV, přičemž počet těchto plazmocytně znatelně vzrostl do doby 1,5 roku po infekci. Tento efekt však nebylo možno pozorovat u myší postrádajících MyD88, přičemž počet plazmocytně produkujících IgG protilátek proti MPyV byl zhruba 25-krát nižší než u WT kmene. Dále bylo zejména známo, že interleukiny 1 a 18 se nepodílejí na formování dlouhodobé odpovídání, nebo myši postrádající receptory pro tyto interleukiny vykazovaly stejnou protilátkovou odpověď jako WT kmen. Na spuštění dlouhodobé protilátkové odpovídání zahrnující aktivaci MyD88 se tak zejména podílejí Toll-like receptory B lymfocytů, nebo B lymfocyty postrádající MyD88 v přítomnosti T lymfocytů exprimujících MyD88 nedokázaly vytvářet dlouhodobou protilátkovou odpověď (Guay et al., 2007). Znamená vliv na robustnost protilátkové odpovídání proti MPyV závislou i nezávislou na T lymfocytech představuje také interakce komplementového receptoru 2 (CR2) lokalizovaného na povrchu B lymfocytů (Szomolanyi-Tsuda et al., 2006).

Studie zabývající se vlivem lidského BK viru u pacientů s transplantací ledviny odhalila skutečnost, že přítomnost protilátek proti BKV před transplantací nezabrání následné reaktivaci BK viru po provedení transplantace a s ní spojenou imunosupresí (Hirsch et al., 2002). I přes tento fakt se zejména protilátky podílejí u lidí na antivirové obraně proti lidským polyomavirům, nebo při porovnávání protilátkové odpovídání cílené proti BKV u pacientů v různém stadiu PVAN bylo zejména známo, že protilátková odpověď se v průběhu onemocnění

známí. Množství IgG protilátek má přitom zřejmě souvislost s množstvím BKV v krvi. Vystala tedy hypotéza, že IgG protilátky snižují množství BKV v krvi (Hariharan et al., 2005). Role protilátek na snížení virémie BKV navíc potvrdila další studie, která porovnávala rozsah cytotoxické odpovědi CD8<sup>+</sup> T lymfocytů, množství protilátek proti BKV a množství BKV v krvi. Takto bylo zjištěno, že slabá CD8<sup>+</sup> T lymfocytární odpověď proti BKV, koreluje s vyšším množstvím viru v krvi a také s vyšším množstvím protilátek. Silná CD8<sup>+</sup> cytotoxická odpověď naopak vede ke snížení množství BKV viru a nízké hladině protilátek. Z takto zjištěných výsledků zřejmě vyplývá, že hlavní úlohu v kontrole BKV hraje buď nepřímo prostřednictvím dohledu T lymfocytů, případně pokud je tento dohled narušen nebo není dostatečně silný, BKV je schopen silnější replikace a dostává se ve vyšším množství do krve. Zvýšení BKV v krvi následně aktivuje protilátkovou odpověď, která zřejmě doplní nedostatečný imunitní dohled cytotoxických lymfocytů, že se podílí na snížení virémie (Chen et al., 2006). Za pomoci imunohistochemických metod bylo navíc ze vzorků, které byly získány pomocí biopsie z ledvin vykazujících PVAN, zjištěno, že v místě působení PVAN je více Th2 lymfocytů než Th1. Navíc bylo detekováno i mnoho plazmatických buněk. Možným vysvětlením by mohl být fakt, že v podmínkách imunosuprese dochází ke snížení cytotoxického působení T lymfocytů a tedy k obrátě z Th1 imunitní odpovědi na Th2 odpověď (Buettner et al., 2012). U některých pacientů s potvrzenou diagnózou PML se dokonce tvoří protilátky cílené proti JCV přímo intratekálně. B lymfocyty se tedy angažují i v boji proti JCV a to přímo v mozkové tkáni, nicméně sama přítomnost protilátek nezabrání vzniku PML (Weber et al., 1997).

### 3.3 Vliv CD4<sup>+</sup> a CD8<sup>+</sup> T lymfocytů

Nejdřívejším imunitním mechanismem podílejícím se na kontrole polyomavírové infekce je imunitní dohled prostřednictvím působení CD4<sup>+</sup> a CD8<sup>+</sup> T lymfocytů. U pacientů trpících PML vyvolanou JCV byly detekovány CD8<sup>+</sup> T lymfocyty (CTL) specifické proti JCV infikovaným buňkám. Tato CTL odpověď je závislá na rozeznání JCV virových peptidů vystavených na MHC I. tedy. Zajímavé bylo také zjištění, že CTL odpověď nebylo možné detekovat u některých pacientů vykazujících též stádium PML (Koralnik et al., 2001). Objasnění role této CTL odpovědi se proto stalo klíčovou otázkou dalších výzkumů. Pro potvrzení, že cytotoxické T lymfocyty jsou schopny rozeznat JCV antigeny prezentované na MHC I. tedy, byla provedena studie u pacientů s PML diagnózou majících alelu HLA-A\*0201, případně pro tuto alelu byla predikována vazba několika 9 AK dlouhých peptidů

odvozených od VP1 kapsidového proteinu JCV. Následně byly z pacientů trpících PML izolovány periferní krevní mononukleární buňky (PBMC), které byly stimulovány nasyntetizovanými 9 AK dlouhými peptidy. Pomocí testu specifické lýze buněk, kdy bylo měřeno množství  $^{51}\text{Cr}$  uvolněného z lyzujících buněk, bylo poté zjištěno, že PBMC rozeznávají 9 AK dlouhý peptid odvozený z 100-108 AK sekvence VP1 proteinu. Dále bylo potvrzeno, že tento VP1<sub>p100</sub> epitop je rozeznáván pouze pro HLA-A\*0201 pozitivní buňky a tedy, že CTL odpověď cílená proti VP1<sub>p100</sub> epitopu je závislá na MHC I. třídy kódované HLA-A\*0201 alelou. S využitím tvorby tetramerního komplexu HLA-A\*0201/VP1<sub>p100</sub>, který byl označen streptavidinem nesoucím fykoerytrin a pomocí protilátek proti CD8<sup>+</sup> T lymfocytům, byla navíc pomocí průtokové cytometrie kvantifikována a potvrzena přítomnost JCV specifických cytotoxických lymfocytů. Takto bylo zjištěno, že přítomnost JCV specifických CD8<sup>+</sup> T lymfocytů lze detekovat zejména u pacientů, kteří vykazují stabilní nebo zlepšující se průběh PML 2 až 5 let od diagnózy. Zatímco JCV specifickou CTL odpověď nebylo možno detekovat u pacientů vykazujících progresivní formu PML do 5 měsíců od diagnózy (Koralnik et al., 2002). Další studie navíc odhalila u HLA-A\*0201 pozitivních pacientů další epitop VP1<sub>p36</sub>, který byl rozeznáván pomocí CD8<sup>+</sup> T lymfocytů. Navíc byla opět potvrzena závislost CTL odpovědi, nebo vztáhná pacientů vykazujících stabilní nebo mírnější formu PML vykazovala vyšší frekvenci CD8<sup>+</sup> T lymfocytů cílených proti VP1<sub>p100</sub> a VP1<sub>p36</sub> epitopům. Naopak u většiny pacientů vykazujících těžkou formu PML nebylo možno CTL odpověď proti zmíněným epitopům detekovat. Analýza cytotoxických T lymfocytů cílených proti VP1<sub>p100</sub> epitopu ukázala, že se jedná převážně o aktivované paměťové buňky (Du Pasquier et al., 2003). Pro zjištění, zda CTL odpověď ovlivňuje následný průběh PML, byli vybráni pacienti s jasnou diagnózou symptomů méně než 10 měsíců. Pokud byla u těchto pacientů detekována jasná CTL odpověď proti JCV v 87 % případů došlo k mírnému průběhu PML. Při absenci této CTL odpovědi je naopak 82 % šance k propuknutí těžké formy PML. Role CTL specifické odpovědi proti JCV v různých fázích PML potvrdil i fakt, že u pacientů s diagnózou PML do doby 4 měsíců, u kterých nebyla detekována CTL odpověď, následně propukla progresivní forma PML (Du Pasquier et al., 2004). Další studie u HIV pacientů poukazují na skutečnost, že nízká frekvence JCV specifických T lymfocytů je zřejmě hlavním faktorem vzniku PML. To také vysvětluje, proč dochází k nástupu PML u HIV pacientů, které mají obecně snížený celkový počet CD4<sup>+</sup> T lymfocytů (Khanna et al., 2009).

Další studie se následně zabývaly rolí CD4<sup>+</sup> T lymfocytů, nebo u HIV pozitivních pacientů nevykazujících sice PML, ale s potvrzeným výskytem JCV v moči pomocí PCR, bylo možné detekovat CD4<sup>+</sup> T lymfocyty specifické proti JCV. Výskyt těchto CD4<sup>+</sup> T

lymfocyt nebyl však detekován u HIV pacientů s PML. Tyto poznatky opět poukazují na vliv CD4<sup>+</sup> T lymfocytů v kontrole JCV (Gasnault et al., 2003). Význam CD4<sup>+</sup> T lymfocytů společně s CD8<sup>+</sup> T lymfocyty se tak stal dalším předmětem studií u pacientů s PML. Pro zjištění a kvantifikaci CTL specifické odpovědi bylo využito metody ELISpot, přičemž tato metoda společně měří antigenem specifické CD4<sup>+</sup> a CD8<sup>+</sup> T lymfocyty. Pro rozlišení mezi CD4<sup>+</sup> a CD8<sup>+</sup> T lymfocytární odpovědí byl proto použit ještě intracelulární test měřící produkci cytokinů (ICS). Takto bylo zjištěno, že pacienti s lehkou formou PML mají zhruba 4,8-krát větší pravděpodobnost detekce asné CD4<sup>+</sup> specifické odpovědi a 22,2-krát větší pravděpodobnost detekce CD8<sup>+</sup> specifické odpovědi, oproti pacientům s těžkou formou PML. Bylo také ukázáno, že metoda ICS je mnohem citlivější pro detekci T lymfocytární specifické odpovědi proti JCV nežli metoda ELISpot. Navíc u pacientů s lehkou formou PML bylo zjištěno, že CD4<sup>+</sup> i CD8<sup>+</sup> specifická T lymfocytární odpověď je stabilní a to dokonce do doby přesahující 12 let od diagnózy PML. Tato studie tak potvrdila nejen již několikrát potvrzenou úlohu CD8<sup>+</sup> T lymfocytů, ale také důležitost CD4<sup>+</sup> T lymfocytární odpovědi proti JCV. Zajímavý je také fakt, že obě tyto lymfocytární odpovědi jsou u pacientů, kteří prodělali lehkou formu PML udržovány po znatelně dlouhou dobu (Gheuens et al., 2011). U pacientů, u kterých v době imunosuprese propukla PML a následně po zastavení imunosupresivní léčby došlo k indukci mozkového zánětu, bylo navíc ve vzorcích získaných pomocí biopsie prokázáno, že obsahují zhruba 3-krát větší množství CD4<sup>+</sup> T lymfocytů oproti CD8<sup>+</sup> T lymfocytům. Při provedení metody ICS navíc bylo zjištěno, že přestože zhruba polovina těchto CD4<sup>+</sup> T lymfocytů vykazuje tvorbu IFN- $\gamma$  a tudíž Th1 smírovanou odpověď, při provedení stejného ICS testu detekujícího souasně tvorbu IFN- $\gamma$  a IL-4 bylo zjištěno, že zhruba třetina CD4<sup>+</sup> T lymfocytů vykazuje tvorbu obou těchto cytokinů a má tak vlastně Th1/Th2 fenotyp. Dále by zjištěno, že CD4<sup>+</sup> T lymfocyty specificky rozeznávaly epitopy VP1 proteinu JCV. Opět tedy byla potvrzena role CD4<sup>+</sup> T lymfocytů v boji proti JCV, přestože se objevila nová otázka, pro CD4<sup>+</sup> T lymfocyty vykazují dvojí Th1/Th2 fenotyp (Aly et al., 2011). To jakým způsobem CD4<sup>+</sup> T lymfocyty ovliví CD8<sup>+</sup> T lymfocytární odpověď specifickou proti JCV není doposud plně objasněno. V případě myšího polyomaviru hrají CD4<sup>+</sup> T lymfocyty zásadní úlohu v kontrole perzistentní infekce, nebo se podílejí na tvorbě a na maturaci nově vzniklých CD8<sup>+</sup> T lymfocytů cílených proti MPyV během perzistentní fáze infekce (Kemball et al., 2007). Navíc tyto CD4<sup>+</sup> T lymfocyty, specifické proti VP1 a velkému T antigenu MPyV, také nově vznikají během perzistentní infekce (Lin et al., 2010). To jestli se CD4<sup>+</sup> T lymfocyty podílejí na aktivaci nebo případně na tvorbě nových CD8<sup>+</sup> T lymfocytů i v případě JCV je však otázkou dalšího výzkumu.

Jak již bylo zmíněno v předchozí kapitole o úloze B lymfocytů a protilátek, slabá  $CD8^+$  T lymfocytární odpověď proti BKV, koreluje s vyšším množstvím viru v krvi a naopak silná  $CD8^+$  cytotoxická odpověď naopak vede ke snížení množství BKV viru. Specifická CTL odpověď tak hraje hlavní roli i v případě BKV. Navíc byly detekovány 2 epitopy  $VP1_{p44}$  a  $VP1_{p108}$ , které jsou specificky rozeznávány  $CD8^+$  T lymfocyty (Chen et al., 2006). Detekce specifické T lymfocytární odpovědi proti BKV pomocí ELISpotu dále odhalila, že u pacientů, u kterých probíhá aktivní replikace BKV, lze detekovat nižší frekvenci specifických T lymfocytů. Navíc u pacientů trpících PVAN nebylo možno detekovat T specifickou odpověď proti BKV. U některých PVAN pacientů došlo však po snížení immunosupresivní léčby k obnově specifické T lymfocytární odpovědi, přičemž rozsah této odpovědi byl srovnatelný se zdravými BKV pozitivními pacienty (Comoli et al., 2004). Pomocí ICS analýzy bylo dále zjištěno, že BKV specifické  $CD4^+$  T lymfocyty s vyšší frekvencí rozeznávají epitopy VP1 proteinu, zatímco  $CD8^+$  T lymfocyty jsou zacílené s vyšší frekvencí na velký T antigen BKV (Binggeli et al., 2007). Po omezení immunosuprese u pacientů s pozitivní PVAN diagnózou navíc dochází ke značnému nárůstu T lymfocytární odpovědi zaměřené proti velkému T antigenu BKV, přičemž zesílení této imunitní odpovědi koreluje s potlačením PVAN, nebo po snížení immunosuprese dochází k obnově buněčně zprostředkované specifické odpovědi proti BKV (Prosser et al., 2008).

U BKV bylo navíc podle studie provedené (Ramaswami et al., 2011) ukázáno, že  $CD4^+$  T lymfocyty jsou schopné lyzovat buňky, které mají na MHC II. třídě navázaný BKV antigen, který tyto  $CD4^+$  T lymfocyty specificky rozeznávají. Plní tak zejména roli nejen v poskytnutí pomoci B a  $CD8^+$  T lymfocytům, ale i roli cytotoxickou a jsou schopny sekretovat 2 typy cytokinů a to  $IFN-\gamma$  a  $TNF-\alpha$ . Navíc zhruba 70 % těchto T lymfocytů má na svém povrchu  $CD107a$  molekulu. Přítomnost  $CD107a$  molekuly koreluje s cytotoxickou aktivitou zprostředkovanou pomocí exocytózy váček obsahujících granzymy a perforiny u  $CD8^+$  T lymfocytů (Betts et al., 2003). Navíc u pacientů, u kterých v minulosti došlo k reaktivaci BKV, bylo možné detekovat vyšší frekvenci  $CD4^+$  T lymfocytů, které produkovali  $IFN-\gamma$ ,  $TNF-\alpha$  a IL-2. Tyto polyfunkční  $CD4^+$  T lymfocyty tak zejména představují důležitý ochranný prvek v prevenci reaktive BKV (Trydzenskaya et al., 2011).

Souhrnně lze tedy říci, že  $CD4^+$  T lymfocyty společně s  $CD8^+$  T lymfocyty představují hlavní zbraň imunitního systému v kontrole polyomaviru a zabráňují tak jejich reaktivaci. Zatímco  $CD8^+$  T lymfocyty plní zejména funkci cytotoxickou,  $CD4^+$  T lymfocyty navíc kromě cytotoxické funkce hrají také pomocnou roli, nebo se podílejí na aktivaci  $CD8^+$  T lymfocytů a B lymfocytů. Tato specifická imunitní odpověď je navíc dlouhodobě udržována,

cofi dále zna í její d lefitost v neustálém imunitním dohledu proti perzistujícím polyomavir m. P es d lefitost této imunitní odpov di z stává zejména ve vztahu mezi CD4<sup>+</sup> a CD8<sup>+</sup> T lymfocyty stále mnoho nezodpov zených otázek.

#### 4. Závěr

Přestože v této poznatkové oblasti ohledně imunitní odpovědi vůči BKV a JCV byla zjištěna na metodami *in vitro* a pro objasnění rolí některých imunitních mechanismů byl v této práci vyufit model myšího polyomaviru, po zhodnocení všech poznatků lze usoudit, že imunitní dohled vůči lidským polyomavirům je velice komplexní děj.

Imunitní systém musí zprostředkovat dohled nad lidskými polyomaviry ve všech různých směrech. Prvotně se imunitní systém musí aktivovat po primární infekci lidskými polyomaviry, kdy nastává akutní fáze infekce. V této fázi infekce hraje zásadní roli rozeznání virových antigenů, přičemž toto rozeznání je zprostředkováno zejména nespecifickými imunitními mechanismy. Již samotný vstup viru do buněk nicméně zejména aktivuje tvorbu některých cytokinů, které se podílejí na imunitní reakci vůči nim. Jako příklad lze uvést interferony typu I a II, které vykazují znatelný inhibiční efekt na tvorbu virového potomstva, což poukazuje na možnost jejich farmakologického vyufití. Nicméně interferony ani další složky nespecifické imunitní odpovědi nejsou schopny zcela virus eliminovat. Následně je proto prezentací virových antigenů a tvorbou správného cytokinového prostředí aktivována také specifická imunitní odpověď.

Specifická imunitní odpověď pak hraje zásadní úlohu v pozdějších fázích infekce, kdy lidské polyomaviry perzistují v některých tkáních. Specifický imunitní dohled tak musí zajistit neustálý dohled a udržovat tak nízké množství nově vznikajícího viru. Pokud je tento trvalý imunitní dohled narušen, může dojít k reaktivaci viru, kdy dochází ke zvýšené tvorbě virového potomstva, což má za následek tvorbu mnoha patologií jako PML nebo PVAN. Ke zvýšení pravděpodobnosti reaktivace lidských polyomavirů u imunosuprimovaných jedinců, však může přispět i lokální změna cytokinového prostředí a značnou roli představuje i genetický polymorfismus jedinců.

Imunitní dohled však musí být zprostředkován i u buněk, ve kterých virus není schopen dokončit svůj životní cyklus a vytvořit tak virové potomstvo, nebo v některých případech je zejména virus schopen navodit transformaci těchto buněk v buňky rakovinné. To společně s fakty, že sekvence lidských polyomavirů lze detekovat u některých typů nádorů a navíc s tím, že BKV a JCV jsou zejména schopné uniknout imunitnímu systému, nebo cíleně regulují množství stresového ligandu u infikovaných buněk, poukazuje na možnost spojení JCV a BKV s některými typy rakovinového bujení u lidí. To jakou měrou a zdali vůbec se tyto dva lidské polyomaviry podílejí na vzniku rakoviny, však zůstává otevřenou otázkou.

## 5. Seznam poufité literatury

- Abend, J.R., and Imperiale, M.J. (2008). Transforming growth factor-beta-mediated regulation of BK virus gene expression. *Virology* 378, 6612.
- Abend, J.R., Low, J.A., and Imperiale, M.J. (2007). Inhibitory effect of gamma interferon on BK virus gene expression and replication. *J. Virol.* 81, 2726279.
- Adachi, O., Kawai, T., Takeda, K., Matsumoto, M., Tsutsui, H., Sakagami, M., Nakanishi, K., and Akira, S. (1998). Targeted disruption of the MyD88 gene results in loss of IL-1- and IL-18-mediated function. *Immunity* 9, 1436150.
- Aly, L., Yousef, S., Schippling, S., Jelcic, I., Breiden, P., Matschke, J., Schulz, R., Bofill-Mas, S., Jones, L., Demina, V., et al. (2011). Central role of JC virus-specific CD4+ lymphocytes in progressive multi-focal leucoencephalopathy-immune reconstitution inflammatory syndrome. *Brain* 134, 268762702.
- Bauer, S., Groh, V., Wu, J., Steinle, A., Phillips, J.H., Lanier, L.L., and Spies, T. (1999). Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA. *Science* 285, 7276729.
- Bauman, Y., Nachmani, D., Vitsenshtein, A., Tsukerman, P., Drayman, N., Stern-Ginossar, N., Lankry, D., Gruda, R., and Mandelboim, O. (2011). An identical miRNA of the human JC and BK polyoma viruses targets the stress-induced ligand ULBP3 to escape immune elimination. *Cell Host Microbe* 9, 936102.
- Betts, M.R., Brenchley, J.M., Price, D.A., De Rosa, S.C., Douek, D.C., Roederer, M., and Koup, R.A. (2003). Sensitive and viable identification of antigen-specific CD8+ T cells by a flow cytometric assay for degranulation. *J. Immunol. Methods* 281, 65678.
- Binggeli, S., Egli, A., Schaub, S., Binet, I., Mayr, M., Steiger, J., and Hirsch, H.H. (2007). Polyomavirus BK-specific cellular immune response to VP1 and large T-antigen in kidney transplant recipients. *Am. J. Transplant.* 7, 113161139.
- Bohnenkamp, H.R., Papazisis, K.T., Burchell, J.M., and Taylor-Papadimitriou, J. (2007). Synergism of Toll-like receptor-induced interleukin-12p70 secretion by monocyte-derived dendritic cells is mediated through p38 MAPK and lowers the threshold of T-helper cell type 1 responses. *Cell. Immunol.* 247, 72684.
- Bonjardim, C.A., Ferreira, P.C.P., and Kroon, E.G. (2009). Interferons: signaling, antiviral and viral evasion. *Immunol. Lett.* 122, 1611.
- Buettner, M., Xu, H., Böhme, R., Seliger, B., Jacobi, J., Wiesener, M., Benz, K., and Amann, K. (2012). Predominance of TH2 cells and plasma cells in polyoma virus nephropathy: a role for humoral immunity? *Hum. Pathol.* 43, 145361462.
- Byers, A.M., Hadley, A., and Lukacher, A.E. (2007). Protection against polyoma virus-induced tumors is perforin-independent. *Virology* 358, 4856492.
- Cerwenka, A., Bakker, A.B., McClanahan, T., Wagner, J., Wu, J., Phillips, J.H., and Lanier, L.L. (2000). Retinoic Acid Early Inducible Genes Define a Ligand Family for the Activating NKG2D Receptor in Mice. *Immunity* 12, 7216727.

- Co, J.K.G., Verma, S., Gurjav, U., Sumibcay, L., and Nerurkar, V.R. (2007). Interferon- alpha and - beta restrict polyomavirus JC replication in primary human fetal glial cells: implications for progressive multifocal leukoencephalopathy therapy. *J. Infect. Dis.* *196*, 7126718.
- Comoli, P., Azzi, A., Maccario, R., Basso, S., Botti, G., Basile, G., Fontana, I., Labirio, M., Cometa, A., Poli, F., et al. (2004). Polyomavirus BK-specific immunity after kidney transplantation. *Transplantation* *78*, 122961232.
- Compton, T., Kurt-Jones, E.A., Boehme, K.W., Belko, J., Latz, E., Golenbock, D.T., and Finberg, R.W. (2003). Human cytomegalovirus activates inflammatory cytokine responses via CD14 and Toll-like receptor 2. *J. Virol.* *77*, 458864596.
- Corallini, A., Possati, L., TrabANELLI, C., GiraudO, E., Rocchetti, R., Talevi, S., Caputo, A., Bussolino, F., and Barbanti-Brodano, G. (2003). Tumor-host interaction mediates the regression of BK virus-induced vascular tumors in mice: involvement of transforming growth factor-beta1. *Carcinogenesis* *24*, 143561444.
- Cosman, D., Müllberg, J., Sutherland, C.L., Chin, W., Armitage, R., Fanslow, W., Kubin, M., and Chalupny, N.J. (2001). ULBPs, novel MHC class I-related molecules, bind to CMV glycoprotein UL16 and stimulate NK cytotoxicity through the NKG2D receptor. *Immunity* *14*, 1236133.
- Darnell, J.E., Jr, Kerr, I.M., and Stark, G.R. (1994). Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. *Science* *264*, 141561421.
- DeKruyff, R.H., Rizzo, L.V., and Umetsu, D.T. (1993). Induction of immunoglobulin synthesis by CD4+ T cell clones. *Semin. Immunol.* *5*, 4216430.
- Derynck, R., and Zhang, Y.E. (2003). Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling. *Nature* *425*, 5776584.
- Enam, S., Sweet, T.M., Amini, S., Khalili, K., and Del Valle, L. (2004). Evidence for involvement of transforming growth factor beta1 signaling pathway in activation of JC virus in human immunodeficiency virus 1-associated progressive multifocal leukoencephalopathy. *Arch. Pathol. Lab. Med.* *128*, 2826291.
- Gasnault, J., Kahraman, M., De Goër de Herve, M.G., Durali, D., Delfraissy, J.-F., and Taoufik, Y. (2003). Critical role of JC virus-specific CD4 T-cell responses in preventing progressive multifocal leukoencephalopathy. *AIDS* *17*, 144361449.
- Gaugas, J.M., Allison, A.C., Chesterman, F.C., Rees, R.J., and Hirsch, M.S. (1973). Immunological control of polyoma virus oncogenesis in mice. *Br. J. Cancer* *27*, 10617.
- Gheuens, S., Bord, E., Kesari, S., Simpson, D.M., Gandhi, R.T., Clifford, D.B., Berger, J.R., Ngo, L., and Koralnik, I.J. (2011). Role of CD4+ and CD8+ T-cell responses against JC virus in the outcome of patients with progressive multifocal leukoencephalopathy (PML) and PML with immune reconstitution inflammatory syndrome. *J. Virol.* *85*, 725667263.
- Gorrill, T.S., and Khalili, K. (2005). Cooperative interaction of p65 and C/EBPbeta modulates transcription of BKV early promoter. *Virology* *335*, 169.

- Gottlieb, A.B., Chamian, F., Masud, S., Cardinale, I., Abello, M.V., Lowes, M.A., Chen, F., Magliocco, M., and Krueger, J.G. (2005). TNF inhibition rapidly down-regulates multiple proinflammatory pathways in psoriasis plaques. *J. Immunol.* *175*, 272162729.
- Gu, R., Zhang, Z., DeCerbo, J.N., and Carmichael, G.G. (2009). Gene regulation by sense-antisense overlap of polyadenylation signals. *RNA* *15*, 115461163.
- Guay, H.M., Andreyeva, T.A., Garcea, R.L., Welsh, R.M., and Szomolanyi-Tsuda, E. (2007). MyD88 is required for the formation of long-term humoral immunity to virus infection. *J. Immunol.* *178*, 512465131.
- Hariharan, S., Cohen, E.P., Vasudev, B., Orentas, R., Viscidi, R.P., Kakela, J., and DuChateau, B. (2005). BK virus-specific antibodies and BKV DNA in renal transplant recipients with BKV nephritis. *Am. J. Transplant.* *5*, 271962724.
- Hirsch, H.H., Knowles, W., Dickenmann, M., Passweg, J., Klimkait, T., Mihatsch, M.J., and Steiger, J. (2002). Prospective study of polyomavirus type BK replication and nephropathy in renal-transplant recipients. *N. Engl. J. Med.* *347*, 4886496.
- Huse, M., Muir, T.W., Xu, L., Chen, Y.G., Kuriyan, J., and Massagué, J. (2001). The TGF beta receptor activation process: an inhibitor- to substrate-binding switch. *Mol. Cell* *8*, 6716682.
- Chen, Y., Trofe, J., Gordon, J., Du Pasquier, R.A., Roy-Chaudhury, P., Kuroda, M.J., Woodle, E.S., Khalili, K., and Koralnik, I.J. (2006). Interplay of cellular and humoral immune responses against BK virus in kidney transplant recipients with polyomavirus nephropathy. *J. Virol.* *80*, 349563505.
- Chu, W.-M. (2013). Tumor necrosis factor. *Cancer Lett.* *328*, 2226225.
- Iempridee, T., Das, S., Xu, I., and Mertz, J.E. (2011). Transforming growth factor beta-induced reactivation of Epstein-Barr virus involves multiple Smad-binding elements cooperatively activating expression of the latent-lytic switch BZLF1 gene. *J. Virol.* *85*, 783667848.
- Jordan, J.A., Manley, K., Dugan, A.S., O'Hara, B.A., and Atwood, W.J. (2010). Transcriptional regulation of BK virus by nuclear factor of activated T cells. *J. Virol.* *84*, 172261730.
- Kawai, T., Adachi, O., Ogawa, T., Takeda, K., and Akira, S. (1999). Unresponsiveness of MyD88-deficient mice to endotoxin. *Immunity* *11*, 1156122.
- Kemball, C.C., Pack, C.D., Guay, H.M., Li, Z.-N., Steinhauer, D.A., Szomolanyi-Tsuda, E., and Lukacher, A.E. (2007). The antiviral CD8+ T cell response is differentially dependent on CD4+ T cell help over the course of persistent infection. *J. Immunol.* *179*, 111361121.
- Khanna, N., Wolbers, M., Mueller, N.J., Garzoni, C., Du Pasquier, R.A., Fux, C.A., Vernazza, P., Bernasconi, E., Viscidi, R., Battegay, M., et al. (2009). JC virus-specific immune responses in human immunodeficiency virus type 1 patients with progressive multifocal leukoencephalopathy. *J. Virol.* *83*, 440464411.
- Koralnik, I.J., Du Pasquier, R.A., and Letvin, N.L. (2001). JC virus-specific cytotoxic T lymphocytes in individuals with progressive multifocal leukoencephalopathy. *J. Virol.* *75*, 348363487.

- Koralnik, I.J., Du Pasquier, R.A., Kuroda, M.J., Schmitz, J.E., Dang, X., Zheng, Y., Lifton, M., and Letvin, N.L. (2002). Association of prolonged survival in HLA-A2+ progressive multifocal leukoencephalopathy patients with a CTL response specific for a commonly recognized JC virus epitope. *J. Immunol.* *168*, 4996504.
- Kuchroo, V.K., Das, M.P., Brown, J.A., Ranger, A.M., Zamvil, S.S., Sobel, R.A., Weiner, H.L., Nabavi, N., and Glimcher, L.H. (1995). B7-1 and B7-2 costimulatory molecules activate differentially the Th1/Th2 developmental pathways: application to autoimmune disease therapy. *Cell* *80*, 7076718.
- Kumar, D., Bouldin, T.W., and Berger, R.G. (2010). A case of progressive multifocal leukoencephalopathy in a patient treated with infliximab. *Arthritis Rheum.* *62*, 319163195.
- Lin, E., Kembell, C.C., Hadley, A., Wilson, J.J., Hofstetter, A.R., Pack, C.D., and Lukacher, A.E. (2010). Heterogeneity among viral antigen-specific CD4+ T cells and their de novo recruitment during persistent polyomavirus infection. *J. Immunol.* *185*, 169261700.
- Lukacher, A.E., Ma, Y., Carroll, J.P., Abromson-Leeman, S.R., Laning, J.C., Dorf, M.E., and Benjamin, T.L. (1995). Susceptibility to tumors induced by polyoma virus is conferred by an endogenous mouse mammary tumor virus superantigen. *J. Exp. Med.* *181*, 168361692.
- Massagué, J., and Gomis, R.R. (2006). The logic of TGF $\beta$  signaling. *FEBS Letters* *580*, 281162820.
- Matsumoto, M., Kikkawa, S., Kohase, M., Miyake, K., and Seya, T. (2002). Establishment of a monoclonal antibody against human Toll-like receptor 3 that blocks double-stranded RNA-mediated signaling. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *293*, 136461369.
- Mishra, R., Chen, A.T., Welsh, R.M., and Szomolanyi-Tsuda, E. (2010). NK cells and gammadelta T cells mediate resistance to polyomavirus-induced tumors. *PLoS Pathog.* *6*, e1000924.
- Nachmani, D., Stern-Ginossar, N., Sarid, R., and Mandelboim, O. (2009). Diverse Herpesvirus MicroRNAs Target the Stress-Induced Immune Ligand MICB to Escape Recognition by Natural Killer Cells. *Cell Host & Microbe* *5*, 3766385.
- Du Pasquier, R.A., Kuroda, M.J., Schmitz, J.E., Zheng, Y., Martin, K., Peyerl, F.W., Lifton, M., Gorgone, D., Autissier, P., Letvin, N.L., et al. (2003). Low frequency of cytotoxic T lymphocytes against the novel HLA-A\*0201-restricted JC virus epitope VP1(p36) in patients with proven or possible progressive multifocal leukoencephalopathy. *J. Virol.* *77*, 11918611926.
- Du Pasquier, R.A., Kuroda, M.J., Zheng, Y., Jean-Jacques, J., Letvin, N.L., and Koralnik, I.J. (2004). A prospective study demonstrates an association between JC virus-specific cytotoxic T lymphocytes and the early control of progressive multifocal leukoencephalopathy. *Brain* *127*, 197061978.
- Postigo, A.A., Depp, J.L., Taylor, J.J., and Kroll, K.L. (2003). Regulation of Smad signaling through a differential recruitment of coactivators and corepressors by ZEB proteins. *EMBO J.* *22*, 245362462.
- Pravica, V., Perrey, C., Stevens, A., Lee, J.-H., and Hutchinson, I.V. (2000). A single nucleotide polymorphism in the first intron of the human IFN- $\gamma$  gene: Absolute correlation

with a polymorphic CA microsatellite marker of high IFN- production. *Human Immunology* 61, 8636866.

Prosser, S.E., Orentas, R.J., Jurgens, L., Cohen, E.P., and Hariharan, S. (2008). Recovery of BK virus large T-antigen-specific cellular immune response correlates with resolution of bk virus nephritis. *Transplantation* 85, 1856192.

Ramaswami, B., Popescu, I., Macedo, C., Luo, C., Shapiro, R., Metes, D., Chalasani, G., and Randhawa, P.S. (2011). The polyomavirus BK large T-antigen-derived peptide elicits an HLA-DR promiscuous and polyfunctional CD4+ T-cell response. *Clin. Vaccine Immunol.* 18, 8156824.

Rasty, S., Thatikunta, P., Gordon, J., Khalili, K., Amini, S., and Glorioso, J.C. (1996). Human immunodeficiency virus tat gene transfer to the murine central nervous system using a replication-defective herpes simplex virus vector stimulates transforming growth factor beta 1 gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93, 607366078.

Ravichandran, V., Jensen, P.N., and Major, E.O. (2007). MEK1/2 inhibitors block basal and transforming growth factor 1beta1-stimulated JC virus multiplication. *J. Virol.* 81, 641266418.

Rianthavorn, P., Posuwan, N., Payungporn, S., Theamboonlers, A., and Poovorawan, Y. (2012). Polyomavirus reactivation in pediatric patients with systemic lupus erythematosus. *Tohoku J. Exp. Med.* 228, 1976204.

Ribeiro, A., Wörnle, M., Motamedi, N., Anders, H.J., Gröne, E.F., Nitschko, H., Kurktschiev, P., Debiec, H., Kretzler, M., Cohen, C.D., et al. (2012). Activation of innate immune defense mechanisms contributes to polyomavirus BK-associated nephropathy. *Kidney Int.* 81, 1006111.

Safak, M., Gallia, G.L., and Khalili, K. (1999). A 23-bp Sequence Element from Human Neurotropic JC Virus Is Responsive to NF- B Subunits. *Virology* 262, 1786189.

Samuel, C.E. (2001). Antiviral Actions of Interferons. *Clin. Microbiol. Rev.* 14, 7786809.

Sarkar, S.N., and Sen, G.C. (2004). Novel functions of proteins encoded by viral stress-inducible genes. *Pharmacol. Ther.* 103, 2456259.

Seo, G.J., Fink, L.H.L., O'Hara, B., Atwood, W.J., and Sullivan, C.S. (2008). Evolutionarily conserved function of a viral microRNA. *J. Virol.* 82, 982369828.

Schroder, K., Hertzog, P.J., Ravasi, T., and Hume, D.A. (2004). Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *J. Leukoc. Biol.* 75, 1636189.

Stettner, M.R., Nance, J.A., Wright, C.A., Kinoshita, Y., Kim, W.-K., Morgello, S., Rappaport, J., Khalili, K., Gordon, J., and Johnson, E.M. (2009). SMAD proteins of oligodendroglial cells regulate transcription of JC virus early and late genes coordinately with the Tat protein of human immunodeficiency virus type 1. *J. Gen. Virol.* 90, 200562014.

Sullivan, C.S., Grundhoff, A.T., Tevethia, S., Pipas, J.M., and Ganem, D. (2005). SV40-encoded microRNAs regulate viral gene expression and reduce susceptibility to cytotoxic T cells. *Nature* 435, 6826686.

- Sweet, T.M., Del Valle, L., and Khalili, K. (2002). Molecular biology and immunoregulation of human neurotropic JC virus in CNS. *J. Cell. Physiol.* *191*, 2496256.
- Szomolanyi-Tsuda, E., and Welsh, R.M. (1996). T cell-independent antibody-mediated clearance of polyoma virus in T cell-deficient mice. *J. Exp. Med.* *183*, 4036411.
- Szomolanyi-Tsuda, E., Dundon, P.L., Joris, I., Shultz, L.D., Woda, B.A., and Welsh, R.M. (1994). Acute, lethal, natural killer cell-resistant myeloproliferative disease induced by polyomavirus in severe combined immunodeficient mice. *Am. J. Pathol.* *144*, 3596371.
- Szomolanyi-Tsuda, E., Le, Q.P., Garcea, R.L., and Welsh, R.M. (1998). T-Cell-independent immunoglobulin G responses in vivo are elicited by live-virus infection but not by immunization with viral proteins or virus-like particles. *J. Virol.* *72*, 666566670.
- Szomolanyi-Tsuda, E., Brien, J.D., Dorgan, J.E., Welsh, R.M., and Garcea, R.L. (2000). The role of CD40-CD154 interaction in antiviral T cell-independent IgG responses. *J. Immunol.* *164*, 587765882.
- Szomolanyi-Tsuda, E., Brien, J.D., Dorgan, J.E., Garcea, R.L., Woodland, R.T., and Welsh, R.M. (2001). Antiviral T-cell-independent type 2 antibody responses induced in vivo in the absence of T and NK cells. *Virology* *280*, 1606168.
- Szomolanyi-Tsuda, E., Seedhom, M.O., Carroll, M.C., and Garcea, R.L. (2006). T cell-independent and T cell-dependent immunoglobulin G responses to polyomavirus infection are impaired in complement receptor 2-deficient mice. *Virology* *352*, 52660.
- Takeuchi, O., and Akira, S. (2009). Innate immunity to virus infection. *Immunol. Rev.* *227*, 75686.
- Trydzenskaya, H., Sattler, A., Müller, K., Schachtner, T., Dang-Heine, C., Friedrich, P., Nickel, P., Hoerstrup, J., Schindler, R., Thiel, A., et al. (2011). Novel approach for improved assessment of phenotypic and functional characteristics of BKV-specific T-cell immunity. *Transplantation* *92*, 126961277.
- Velupillai, P., Yoshizawa, I., Dey, D.C., Nahill, S.R., Carroll, J.P., Bronson, R.T., and Benjamin, T.L. (1999). Wild-derived inbred mice have a novel basis of susceptibility to polyomavirus-induced tumors. *J. Virol.* *73*, 10079610085.
- Velupillai, P., Carroll, J.P., and Benjamin, T.L. (2002). Susceptibility to polyomavirus-induced tumors in inbred mice: role of innate immune responses. *J. Virol.* *76*, 965769663.
- Velupillai, P., Garcea, R.L., and Benjamin, T.L. (2006). Polyoma virus-like particles elicit polarized cytokine responses in APCs from tumor-susceptible and -resistant mice. *J. Immunol.* *176*, 114861153.
- Velupillai, P., Sung, C.K., Andrews, E., Moran, J., Beier, D., Kagan, J., and Benjamin, T. (2012). Polymorphisms in toll-like receptor 4 underlie susceptibility to tumor induction by the mouse polyomavirus. *J. Virol.* *86*, 11541611547.
- Verma, S., Ziegler, K., Ananthula, P., Co, J.K.G., Frisque, R.J., Yanagihara, R., and Nerurkar, V.R. (2006). JC virus induces altered patterns of cellular gene expression: interferon-inducible genes as major transcriptional targets. *Virology* *345*, 4576467.

Weber, T., Trebst, C., Frye, S., Cinque, P., Vago, L., Sindic, C.J., Schulz-Schaeffer, W.J., Kretzschmar, H.A., Enzensberger, W., Hunsmann, G., et al. (1997). Analysis of the systemic and intrathecal humoral immune response in progressive multifocal leukoencephalopathy. *J. Infect. Dis.* 176, 2506254.

Wilson, J.J., Lin, E., Pack, C.D., Frost, E.L., Hadley, A., Swimm, A.I., Wang, J., Dong, Y., Breeden, C.P., Kalman, D., et al. (2011). Gamma interferon controls mouse polyomavirus infection in vivo. *J. Virol.* 85, 10126610134.

Wollebo, H.S., Safak, M., Del Valle, L., Khalili, K., and White, M.K. (2011). Role for tumor necrosis factor- $\alpha$  in JC virus reactivation and progressive multifocal leukoencephalopathy. *J. Neuroimmunol.* 233, 46653.

Wollebo, H.S., Melis, S., Khalili, K., Safak, M., and White, M.K. (2012). Cooperative roles of NF- $\kappa$ B and NFAT4 in polyomavirus JC regulation at the KB control element. *Virology* 432, 1466154.

Yeung, M.C., Pulliam, L., and Lau, A.S. (1995). The HIV envelope protein gp120 is toxic to human brain-cell cultures through the induction of interleukin-6 and tumor necrosis factor- $\alpha$ . *AIDS* 9, 1376143.