Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta

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

Barbora Vinšová

DNA viry a proteazomální systém buňky
Proteasomes and DNA virus infection

Bakalářská práce

Školitel: RNDr. Alena Morávková, Ph.D.

Praha, 2013

Prohlášení:

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

V Praze, 13.5.2013

Podpis:

Na tomto místě bych chtěla poděkovat své školitelce RNDr. Aleně Morávkové, PhD. za cenné rady, doporučení a trpělivé úpravy mé bakalářské práce. Děkuji i své rodině a příteli, kteří mi byli v průběhu psaní práce oporou a vždy mě dokázali povzbudit.

Obsah

Seznam použitých zkratek 4
Abstrakt....7
Úvod....8
1. Ubikvitinačně-proteazomální systém 9
1.1 Proteazomy 9
1.2 Ubikvitin-konjugační enzymová kaskáda....10
2. Proteazomy a virový únik imunitnímu systému 12
2.1 MHC molekuly I. třídy a prezentace antigenů 12
2.2 MHC molekuly II. třídy 13
2.3 Redukce MHC molekul na povrchu buněk a bránění v prezentaci antigenů 14
2.4 Degradace TAP 15
2.5 Únik interferonové odpovědi....16
2.6 Zastavení zánětlivé odpovědi degradací adaptorových proteinů TLR2 17
2.7 Zpomalení pohybu buněk imunitního systému 18
3. Proteazomy ovlivňují replikační cyklus DNA virů 18
3.1 Role ND10 při replikaci DNA virů 18
3.2 Využití buněčného proteazomálního aparátu při DNA virové replikaci....19
4. Ubikvitinace a deubikvitinace: Interakce virů s ubikvitin-ligázami 22
4.1 Interakce živočišných DNA virů s ubikvitin-ligázami 22
4.2 Interakce rostlinných DNA virů s ubikvitin-ligázami 25
5. Úloha proteazomů ve virem indukované inhibici apoptózy
a deregulaci buněčného cyklu....27
5.1 Proteazomy a inhibice apoptózy....28
5.2 Proteazomy a deregulace buněčného cyklu....29
6. Úloha proteazomů v rozbalování virionů a jejich transportu 31
Závěr 33
Seznam použité literatury....34

Seznam použitých zkratek

AAV	Adeno-associated virus	Adeno-asociovaný virus
APC	Anaphase-promoting complex	Anafázi podporující komplex
APCs	antigen presenting cells	Antigen prezentující buňky
ATM	Ataxia telangiectasia-mutated	Ataxia telangiectasia kináza
β2m	β2 microglobulin	β2 mikroglobulin
(b)ICP0	(bovine) Infected cell protein 0	Protein 0 z infikovaných buněk
Bax	Bcl-2 associated X protein	Proapoptotický s Bcl-2 asociovaný X protein
BCTV	Beet curly top virus	Virus vrcholové kadeřavosti řepy
BHV1	Bovine herpes virus 1	Bovinní herpesvirs 1
BLM	Bloom syndrom helicase	Helikáza z Bloomova syndromu
Brd4 protein	Bromodomain-containing protein 4	Bromodoménu obsahující protein 4
BSCTV	Beet severe curly top virus	Virus vrcholové kadeřavosti řepy se závažnějšími projevy
CIITA	Class II transactivator	Aktivátor transkripce MHC II
cdk	Cyklin-dependent Kinase	Cyklin-depndentní kináza
CLCuMV	Cotton leaf curl Multan virus	Virus kadeřavosti bavlníku z oblasti Multan (Pákistán)
Cul1, Cul3	Cullin 1, Cullin 3	Cullin 1, Cullin 3
CYTIP	Cytohesin interacting protein	Protein interagující s cytohesinem
Daxx	Death domain-associated protein	Protein asociovaný s death doménou
DC	Dendritic cells	Dendritické buňky
DNA	Deoxyribonucleic acid	Deoxyribonukleová kyselina
DUB	Deubiquitinating enzyme	Deubikvitinační enzym
E2F	E2F transcription factor	Transkripční faktor E2F
EBNA1	Epstein-Barr nuclear antigen 1	Jaderný antigen 1 viru EBV
EBV	Epstein-Baar virus	Virus Epstein-Baarové
ECTV	Ectromelia virus	Virus myších neštovic
EHV1	Equine herpesvirus 1	Koňský herpesvirus 1
ER	Endoplasmic reticulum	Endoplazmatické retikulum
HBV	Hepatitis B virus	Virus hepatitidy B
FBNYV	Faba bean necrotic yellows virus	Virus nekrotického žloutnutí bobu
HCMV	Human cytomegalovirus	Lidský cytomegalovirus
hDlg	Human Discs large	Lidský homolog Discs large proteinu
HIV	Human imunodeficiency virus	Virus lidské imunodeficience
HPV	Human papillomavirus	Lidský papillomavirus
hScrib	Human Scribble	Lidský Srcibble protein

HSV-1,2	Herpes simplex virus 1, resp. 2	Herpes simplex virus 1, resp. 2
IFNγ	Interferon γ	Interferon γ
IKK	IκB kinase	IκB kináza
IL	Interleukin	Interleukin
IRF	Interferon regulatory factor	Interferon regulující faktor
Jak	Janus kinase	Janusova kináza
KPC1	Regulatory protein of cell cycle	Regulátor buněčného cyklu
KSHV	Kaposi´s sarkoma-associated herpesvirus	Herpesvirus asociovaný s Kaposiho sarkomem
LT	Large T-antigen	Velký T-antigen
MAGI-1	Membrane-associated guanylate kinase, WW and PDZ domain-containing protein 1	Membránově-asociovanou guanylát kinázu, WW a PDZ domény obsahující protein 1
Mal	MyD88 adapter-like protein	MyD88 adapterovému proteinu podobný protein
MCMV	Mouse cytomegalovirus	Myší cytomegalovirus
Mdm2, Mdm4	Mouse double minute 2(4) homolog	Buněčné onkoproteiny
MHC	Major histocompatibility complex	Hlavní histokompatibilní komplex
mRNA	Messenger Ribonucleic acid	Mediátorová ribonukleová kyselina
MVM	Minute virus of mice	
MUPP1	Multi PDZ-domain protein 1	Více PDZ-domén obsahující protein 1
MyD88	Myeloid differentiation factor 88	Myeloidní diferenciační faktor 88
ND10	Nuclear Domains 10	Jaderné domény 10
NFκB	Nuclear factor κB	Jaderný faktor κB
NHEJ	Nonhomologous end-joining	Nehomologní spojování konců
OLCV	Okra leaf curl virus	Virus kadeřavosti ibišku
OpMNPV	*Orgyia pseudotsugata* M nucleopolyhedrovirus	*Orgyia pseudotsugata* M nukleopolyhedrovirus
PLC	Peptide loading complex	Peptid-navazující komplex
PLIC1	Protein-linking integrin-associated protein and cytoskeleton 1	Ubikvilin, regulátor ubikvitinace a proteazomální degradace
PML	Promyelocytic leukemia protein	Protein promyelocytické leukémie
pp71	HCMV tegument protein	Tegumentový protein viru HCMV
pRB	Retinoblastoma protein	Retinoblastomový protein
PRV	Pseudorabies virus	Aujeszkyho choroba
Rbx1	RING Box protein 1	RING Box protein 1
RKP protein	Related to KPC1 protein	Protein příbuzný KPC1
SAMDC1	S-adenosyl-methionin decarboxylase 1	S-adenosyl-methionin dekarboxyláza 1

Sp100	Speckled protein of 100kDa	
STAT	Signal transducer and activator of transcription	Snímač signálu a aktivátor transkripce
SUMO-1	Small ubiquitin-related modifier 1	Malý ubikvitinu-příbuzný modifikátor 1
TAP	Transporter associated with antigen processing	Přenašeč asociovaný se zpracováváním antigenu
Tc	Cytotoxic/CD8+ T-lymphocyte	Cytotoxický/CD8+ T-lymfocyt
T_H	Helper/CD4+ T-lymphocyte	Pomocný/CD4+ T-lymfocyt
TCR	T-cell receptor	T-buněčný receptor
TIR	Toll/Interleukin 1 receptor	Toll/Interleukin 1 receptor
TLR	Toll-like receptor	Toll-like receptor
ToCLV	Tomato leaf curl virus	Virus svinutky rajčat
TYLCSV	Tomato yellow leaf curl Sardinia virus	Poddruh viru svinutky rajčat vyskytující se na Sardinii
TYLCV	Tomato yellow leaf curl virus	Virus žluté svinutky rajčat
USP7	Ubiquitin-specific-processing protease 7	Proteáza 7 specificky zpracující ubikvitin
VACV	Vaccinia virus	Virus vakcinie
VARV	Variola virus	Virus pravých neštovic

Abstrakt

Rozvoj virové infekce závisí na interakcích viru s hostitelskou buňkou. Po miliony let trvající koevoluce virů s jejich hostiteli vedla ke vzniku mnoha antivirových obranných mechanismů i virových únikových taktik. Viry se naučily zasahovat do různých buněčných dějů, pozměňovat je a využívat jednotlivé buněčné komponenty ve svůj prospěch. Jednou takovou hojně využívanou komponentou je i ubikvitinačně-proteazomální systém. Proteazomy jsou vícepodjednotkové proteinové struktury, které za normálních okolností umožňují degradaci poškozených, špatně sbalených či přebytečných buněčných proteinů. Svou funkcí se podílejí na regulaci různých buněčných procesů a na udržování proteinové rovnováhy. Viry tyto struktury využívají k degradaci proteinů za účelem úniku imunitnímu systému a deregulace buněčného cyklu, k rozbalování a vstupu virionů do buněk či ke zvýhodnění vlastní replikace. Tato práce je koncipována jako stručný přehled interakcí buněčného ubikvitinačně-proteazomálního systému s DNA viry.

Klíčová slova:

proteazom, DNA virus, ubikvitin, E3 ubikvitin-ligázy, interakce virus-hostitel, imunitní systém

Abstract

The development of virus infection depends on virus – host interactions. Millions of years of ongoing virus – host coevolution led to formation of many antiviral defense mechanisms as same as virus evasion strategies. Viruses have learned to intervene in the various cellular processes, modify it and take advantage of particular cellular components. One of those cellular components widely utilised by viruses is the ubiquitin-proteasome system. Proteasomes are multisubunit protein structures that under normal conditions provide degradation of damaged, missfolded or redundant cellular proteins. With their function proteasomes contribute to regulation of various cellular processes and maintain balance of proteins ratio. Viruses utilise those structures for protein degradation in order to evade host immunity system and deregulate cell cycle, to entry and unpacking of virions or in order to favor virus replication. This thesis is conceived to briefly summarize interactions of cellular ubiquitin-proteasome system and DNA viruses.

Key words:

proteasome, DNA virus, ubiquitin, E3 ubiquitin-ligases, virus-host interaction, immune system

Úvod

Viry jsou intracelulární obligátní parazité schopní infikovat buňky rostlin, živočichů i bakterií. Ačkoliv si některé viry nesou ve virionech části vlastního replikačního aparátu (např. replikázy), nemohou se replikovat mimo buňku. Závislost na replikačním aparátu a energetickém metabolismu hostitelských buněk vedla již od samých počátků buněčného světa k nutnosti soužití virů s jejich hostiteli. Po miliony let trvající koevoluce se projevila vývojem důmyslných antivirových obranných mechanismů i mnoha virových únikových strategií. Za komplexitu našich obranných mechanismů vděčíme zřejmě právě virům a dalším parazitickým organismům.

Smyslem existence virů je úspěšná replikace v hostitelské buňce. Aby k ní ale mohlo dojít, musí viry překonat mnoho překážek. Nejdříve musí do buněk vstoupit, navazují se proto na jejich povrchové receptory a způsobují fúzi vlastního obalu a hostitelské membrány či vstupují do buňky endocytózou. Pak ale bývají viriony často uvězněny v endozomálních váčcích. Toho se v průběhu evoluce viry naučily využívat, nízké pH endolysozomálních kompartmentů umožňuje rozbalení virionů a uvolnění genetické informace do cytoplazmy. DNA viry (viry s genetickou informací ve formě DNA) s výjimkou poxvirů se však replikují v buněčném jádře, je pro ně tedy nezbytné dopravit svou genetickou informaci z cytoplazmy do jádra.

Od vstupu do buňky po celou dobu replikace až do vypuštění nových virionů však musí viry čelit mnohým nástrahám hostitelského imunitního systému. Viry se musí umět před obrannými mechanismy hostitele bezpečně ukrývat, deregulovat buněčný cyklus, aby se mohly efektivně zreplikovat a zastavovat programovanou buněčnou smrt, aby spolu s buňkou neskončila předčasně i jejich replikace. V mnoha těchto dějích hraje významnou roli ubikvitinačně-proteazomální systém, který je zodpovědný za degradaci proteinů. Viry se naučily buněčný proteazomální systém využívat ve svůj prospěch. A tak mění poměry proteinů v buňce, remodelují signální dráhy, pozměňují substrátovou specifitu ubikvitin-konjugační kaskády, záměrně se zbavují některých buněčných proteinů a jiné před degradací chrání.

Cílem této práce je vytvořit stručný souhrn dosud objevených poznatků o mechanismech interakce živočišných či rostlinných DNA virů s buněčným proteazomálním systémem, které zasahují mnoho různých oblastí života hostitelských buněk a manipulují je ke svému užitku. Detailní prozkoumání těchto mechanismů by mohlo přispět k lepšímu porozumění vztahů DNA virů a jejich hostitelských buněk a k vývoji nových antivirových terapeutických léčiv. V případě výzkumu rostlinných virů by nové poznatky mohly vést ke zkvalitnění boje proti zemědělským škůdcům virového původu.

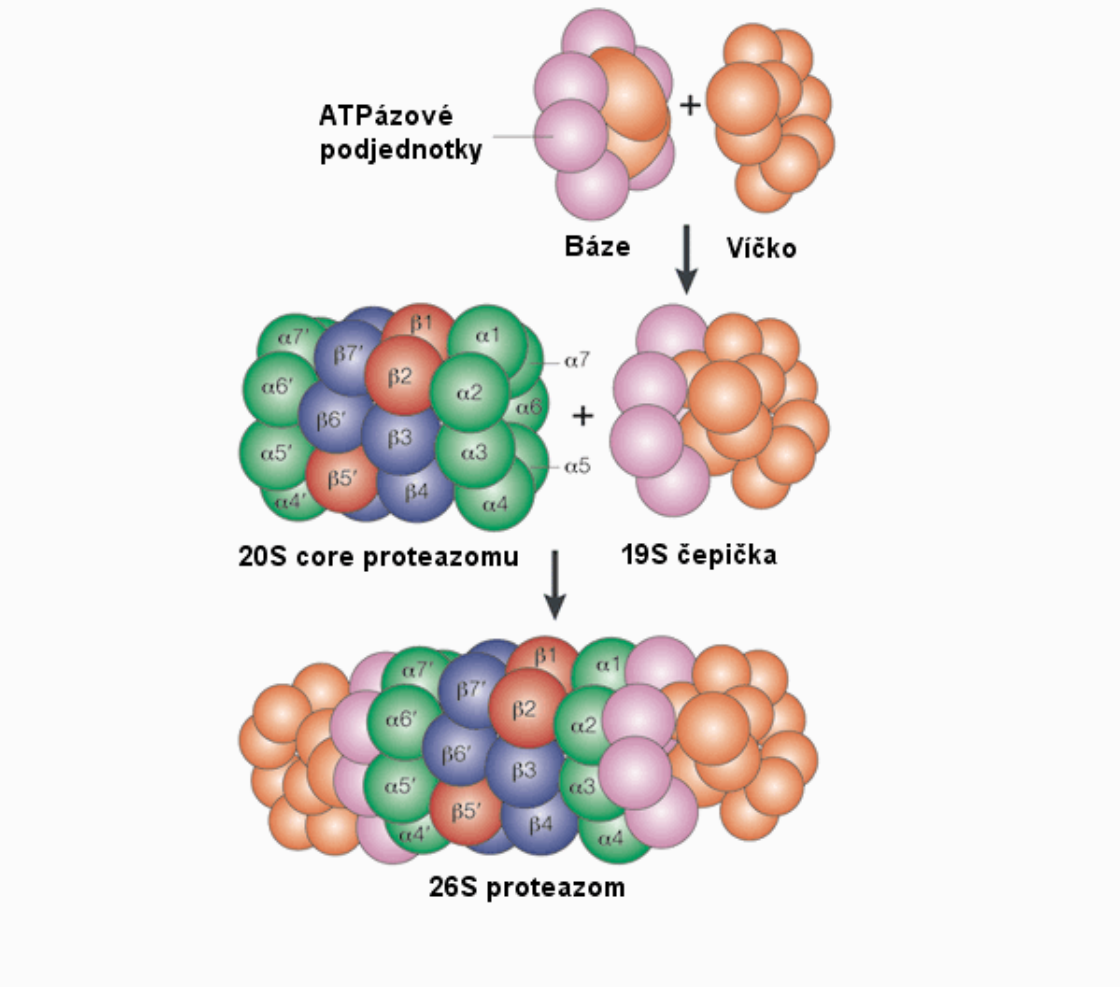
1. Ubikvitinačně-proteazomální systém

1.1 Proteazomy

Proteazomy jsou válcovité multiproteinové struktury s proteolytickou aktivitou vyskytující se v cytoplazmě a jádře eukaryotických buněk, byly nalezeny i u bakterií a archeí. Proteazomy společně s ubikvitinem a dalšími komponenty tvoří u eukaryot tzv. ubikvitinačně-proteazomální systém, který obvykle slouží k rozpoznání, označení a degradaci poškozených, nadbytečných či špatně sbalených buněčných proteinů. Proteazomy jsou po lysozomech druhým největším degradačním místem v buňce, mohou tvořit i více než 1% celkového množství buněčných proteinů. V proteazomech jsou degradovány veškeré proteiny vyskytující se v cytoplazmě, takže v případě infekce buněk viry či bakteriemi jsou kromě buněčných proteinů proteazomálně degradovány i proteiny těchto patogenů. Peptidy vzniklé proteazomální degradací jsou v endoplazmatickém retikulu navazovány na MHC molekuly I. třídy a prezentovány na povrchu buněk, aby byly identifikovány buňkami imunitního systému. Proteazomy prostřednictvím degradace mění poločasy života a okamžité množství různých proteinů v buňce, což může mít vliv na regulaci buněčného cyklu, buněčný růst, hladinu hormonů a signálních molekul či na transkripci určitých genů. Proteazomy jsou nezbytnou součástí buněčného metabolismu, bez kterých je dlouhodobá existence buněk nemožná (Pollard, 2008).

Proteazomy se skládají ze dvou základních strukturních komponent: z core proteazomu - 20S a čepičky - 19S (viz Obr. 1). Core 20S proteazomu je evolučně konzervovaná struktura vyskytující se ve všech třech doménách organismů, dochází zde k na ubikvitinu nezávislé degradaci proteinů. Skládá se ze 14 kopií podjednotky α a ze 14 kopií podjednotky β. Podjednotky jsou uspořádány do čtyř sedmičlenných kruhů umístěných nad sebou a tvoří válcovitou strukturu se třemi dutinami o průměru asi 5 nm (Baumeister *et al.*, 1998).

Eukaryotický 26S proteazom je tvořen výše popsanou 20S podjednotkou a dvěma regulačními podjednotkami 19S (viz Obr. 1). Vnější α-podjednotkami tvořené kruhy 20S proteazomu jsou branou do dutiny, kde probíhá samotná degradace proteinů a zároveň se k nim připojují obě regulační 19S podjednotky jako víka k sudu (Kurepa & Smalle, 2007). Regulační podjednotky 26S proteazomu jsou zodpovědné za na ATP a ubikvitinu závislou proteolýzu. Hydrolýza ATP dodává proteazomu energii na „rozbalení“ proteinů, což je nezbytné pro jejich „nasoukání“ do nitra proteazomu. Přestože je ubikvitin důležitým degradačním signálem, z výzkumů vyplývá, že jsou proteazomy schopny rozeznat a degradovat i některé neubikvitinované proteiny, např. c-Jun protein (Jariel-Encontre et al., 1995).



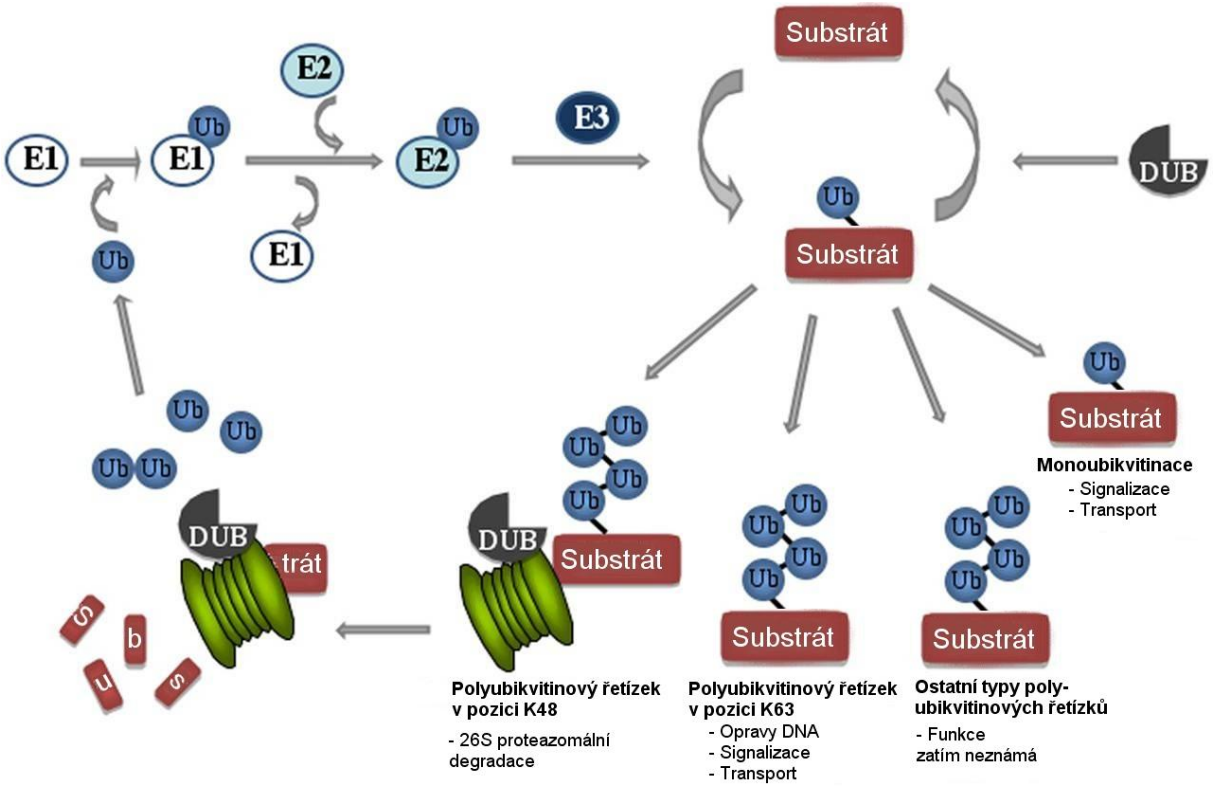
Obr. 1 – Struktura 26S proteazomu. 20S core proteazomu se skládá z 28 různých podjednotek o velikosti 21-31 kDa uspořádaných do čtyř sedmičlenných kruhů. Dva vnitřní (modro-červené) kruhy jsou tvořeny β podjednotkami, červeně jsou znázorněny podjednotky β1, β2 a β5 s aktivními místy. Dva vnější kruhy (zelené) se skládají z α podjednotek. 19S čepičku tvoří dvě substruktury. Báze (růžová) zajišťuje připojení 19S čepičky ke vnějším kruhům α podjednotek 20S core a tvoří ji 6 ATPázových podjednotek a dvě podjednotky bez ATPázové aktivity. Víčko (oranžové) se skládá až z deseti podjednotek bez ATPázové aktivity a odpovídá za navázání substrátu. Upraveno podle Kloetzel (2001).

1.2 Ubikvitin-konjugační enzymová kaskáda

Ubikvitinace je děj, který umožňuje buňce označit proteiny určené k degradaci tak, že mohou být rozpoznány proteazomy. Označení proteinu je způsobeno reverzibilním kovalentním připojením ubikvitinu. Ubikvitin je malý protein tvořený 76 aminokyselinami, který se vyskytuje ve všech eukaryotických buňkách. Signálem k degradaci v proteazomu je polyubikvitinový řetízek zavěšený na lyzinu v pozici 48 (K48) daného proteinu. Naproti tomu, připojení ubikvitinu na lyzin v jiných pozicích má úplně odlišnou funkci. Monoubikvitinace patří mezi reverzibilní posttranslační modifikace proteinů. Slouží zejména k signalizaci při sestavování podjednotek ribozomů, proteazomů a dalších multimerních komplexů a může se podílet na opravách DNA a remodelaci chromatinu.

Lidské buňky mají také k dispozici více než 80 deubikvitinačních enzymů, které dovedou monoubikvitinové značky z proteinů efektivně odstraňovat, čímž zvyšují flexibilitu na ubikvitinu založených buněčných signálních drah.

Celá ubikvitinační kaskáda se skládá ze tří druhů enzymů, tvoří ji E1 ubikvitin-aktivační enzymy, E2 ubikvitin-konjugační enzymy a E3 ubikvitin-ligázy (viz Obr. 2). E1 ubikvitin aktivačních enzymů je nejméně, u kvasinek je dokonce jen jeden, a jak už jejich název napovídá, jejich funkcí je aktivace ubikvitinu. E2 ubikvitin ligáz je v buňce o něco více, dovedou jednotlivé E1-aktivované ubikvitiny navazovat na sebe a tvoří tak polyubikvitinový řetízek. E2 ubikvitin-konjugační enzymy následně interagují s celou škálou komplexů E3 ubikvitin-ligáza/substrát a zprostředkují přenos řetízku polyubikvitinů až na daný protein. E3 ubikvitin-ligáz je v lidské buňce více než 500 a každá z nich dovede navázat několik substrátů. E3 ubikvitin-ligázy mohou nejvýznamněji ovlivnit poločas života jednotlivých proteinů právě svou substrátovou specifitou. I proto je tento článek ubikvitinační kaskády nejčastěji napadán, kontrolován a modifikován při virových infekcích. Nejen, že interakcí s E3 ubikvitin-ligázami mohou viry urychlit, zpomalit či úplně zastavit degradaci některých buněčných proteinů, v některých případech jsou viry dokonce schopny měnit substrátovou specifitu jednotlivých E3 ubikvitin-ligáz a výrazně tak ovlivňovat poločasy života buněčných či vlastních proteinů a vlastní replikaci (Pollard, 2008).



Obr. 2 – Ubikvitin-konjugační enzymová kaskáda. E1 ubikvitin-aktivační enzymy (E1) aktivují ubikvitin (Ub), přenesou ho na E2 ubikvitin-konjugační enzym (E2) a odtud je ubikvitin předán E3 ubikvitin-ligáze (E3), která ho naváže na protein určený k degradaci (Substrát). Celý cyklus se několikrát opakuje. Podle místa, kam se polyubikvitinový řetízek připojuje, má ubikvitinace různou

funkci. Polyubikvitinace lyzinu v pozici 48 vede k degradaci v proteazomu (zeleně), ubikvitin je před degradací ze substrátu odstraněn deubikvitinačním enzymem (DUB). Upraveno podle Alcaide-Loridan & Jupin (2012).

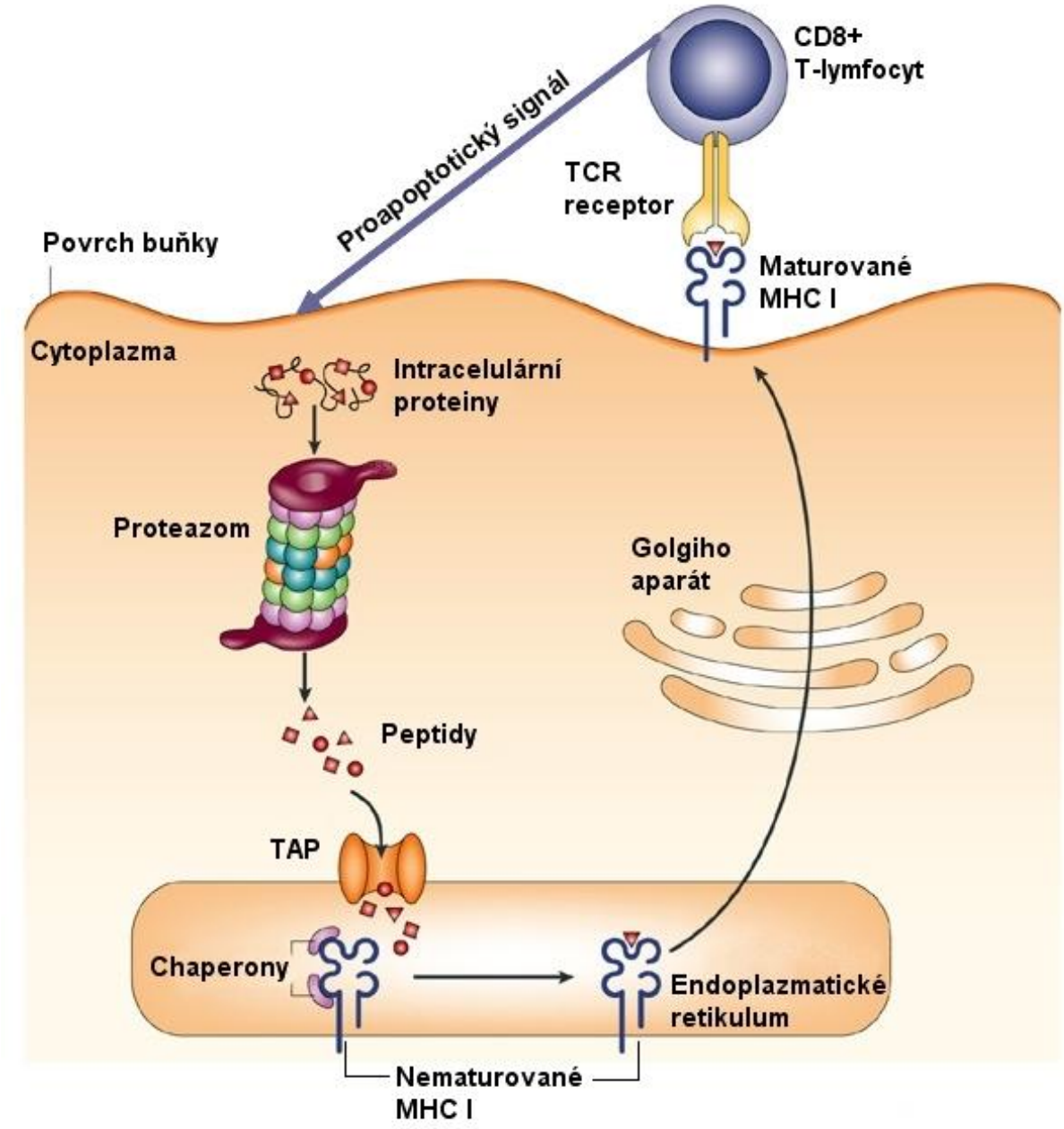
2. Proteazomy a virový únik imunitnímu systému

Imunitní systém je komplexní soustava obranných mechanismů chránící jedince před napadením patogeny. Stejně, jako se v průběhu evoluce vyvíjejí nové a nové obranné mechanismy a imunitní systém se zdokonaluje, viry hledají stále nové způsoby úniku či zneškodnění těchto mechanismů. Různé viry vyvinuly během koevoluce s hostiteli celou širokou paletu mechanismů jak uniknout imunitnímu dozoru. Mimo inhibici interferonové odpovědi sem patří i různé způsoby zabránění prezentace virových peptidů na MHC I molekulách s využitím buněčných degradačních drah.

2.1 MHC molekuly I. třídy a prezentace antigenů

MHC molekuly I. třídy jsou glykoproteiny vyskytující se na povrchu všech jaderných buněk organismu. Jsou součástí adaptivní imunity a slouží k prezentaci antigenních peptidů cytotoxickým T-lymfocytům (Tc, $CD8^+$ T-lymfocyty) a jejich přítomnost je detekována NK buňkami (natural killer). MHC I se skládají ze tří částí: z transmembránového těžkého řetězce α, nekovalentně připojeného β2-mikroglobulinu (β2-m) a z antigenního peptidu. Těžký řetězec α má tři domény – N-koncové domény α_1 a α_2 tvoří vazebné místo pro peptid, doména α_3 je s β2-m strukturně velmi podobná imunoglobulinům. MHC glykoproteiny I. třídy se skládají do funkčních trimerů v lumen endoplazmatického retikula (ER). Řetězce α a β2-m jsou do endoplazmatického retikula dopravovány kotranslačně, peptidy jsou translokovány z cytosolu díky ABC přenašečům TAP (transporter associated with antigen processing) umístěným na membráně ER.

TAP přenašeče tvoří spolu s dalšími proteiny tzv. Peptide-loading complex (PLC), který umožňuje navázání peptidů na MHC I. PLC je tvořen heterodimerem dvou podjednotek TAP-1 a TAP-2, čtyřmi molekulami MHC I, čtyřmi molekulami proteinu tapasinu a proteiny calnexinem, kalretikulinem a oxidoreduktázou ERp57. Peptidy putují cytosolem difuzí až k TAP přenašeči, který je transportuje do ER. Tam se za asistence PLC peptid spojí s α a β2-m řetězci MHC I, čímž se celý komplex stabilizuje a hotový trimer putuje skrz Golgiho aparát na povrch buňky (viz Obr. 3). Peptidy vystavované na MHC I. třídy jsou velké obvykle 8-10 aminokyselin a vznikají proteazomální degradací proteinů nacházejících se v cytoplazmě. Jsou-li prezentovány peptidy buňce vlastní, jsou Tc buňkami tolerovány. Objeví-li se ale na povrchu buňky cizorodý peptid, je spolu s MHC molekulou rozpoznán receptorem TCR na povrchu cytotoxického T-lymfocytu. Tím dojde k aktivaci Tc a k následnému vyslání proapoptotického signálu či aktivaci cytolitických látek a destrukci cílové buňky (Abele & Tampé, 2004; Hořejší a Bartůňková, 2009).



Obr. 3 – Prezentace antigenů na MHC I. Cytoplazmatické proteiny jsou degradovány v proteazomu na malé peptidy a ty jsou prostřednictvím TAP přenašečů transportovány do lumen ER. Zde dojde k navázání peptidů na nematurované MHC I, postupně dochází k maturaci MHC I s navázaným antigenem a komplex je ve váčcích přenášen přes Golgiho aparát k povrchu buňky. Antigen je prezentován $CD8^+$ T-lymfocytům (Tc). Je-li antigen jejich TCR receptorem rozpoznán jako cizorodý, Tc dá buňce signál ke spuštění apoptózy. Upraveno podle Yewdell, Reits & Neefjes (2003).

2.2 MHC molekuly II. třídy

MHC II. třídy prezentují antigeny CD4+ T-lymfocytům (T_H) a nevyskytují se na všech jaderných buňkách jako MHC I, ale na antigen prezentujících buňkách (APCs) jako jsou dendritické buňky (DC), B-lymfocyty, monocyty a makrofágy. Tvoří je dva nekovalentně spojené

transmembránové řetězce α a β o velikosti přibližně 30 kDa, jejichž N-terminální domény α_1 a β_1 vytvářejí strukturně podobné vazebné místo pro antigen jako α_1 a α_2 domény těžkého řetězce MHC I. Peptidy prezentované na MHC II jsou většinou extracelulárního původu, vznikly pohlcením exogenních proteinů a jejich degradací v endolysosomálních váčcích. Velikost prezentovaných peptidů je větší, než u MHC I, obvykle je to 15-35 aminokyselin. V ER dojde k sestavení α a β řetězců a k nim se připojí tzv. invariantní řetězec Ii, který během dalších úprav komplexu v Golgiho aparátu brání navázání peptidů cytoplazmatického původu. MHC II s navázaným Ii opouští Golgiho aparát ve váčku, který před dosažením buněčného povrchu splývá s endozomem. Zde po splynutí s lysozomem a za asistence dalších proteinů dochází k proteolytickému štěpení invariantního řetězce, k uvolnění vazebného místa pro peptid a k navázání exogenního peptidu (Hořejší a Bartůňková, 2009).

2.3 Redukce MHC molekul na povrchu buněk a bránění v prezentaci antigenů

Jak již bylo řečeno, za normálních podmínek jsou na MHC I prezentovány buněčné peptidy. V případě virové infekce je ale značná část přirozené proteinové produkce buňky nahrazena produkcí virových proteinů. Ty jsou pak stejně jako přirozené buněčné proteiny vázány na MHC I a prezentovány na povrchu buňky. Zdravý imunitní systém tyto komplexy rozeznává a vyhodnocuje jako tělu cizí. Výsledkem je likvidace napadené buňky imunitním systémem a tedy i zabránění množení a šíření viru. Aby viry předešly předčasné smrti hostitelské buňky, manipulují s MHC I a mechanismy prezentace buňkou vytvářených virových proteinů.

Jednou z možností takové manipulace je snížení počtu prezentujících MHC I. Lidský cytomegalovirus (HCMV) kóduje několik proteinů, které snižují počet MHC I na povrchu buněk. Dva z těchto proteinů, US2 a US11, využívají proteazomy k degradaci těžkých řetězců MHC I. Oba virové proteiny interagují s těžkými řetězci v časné fázi skládání trimeru MHC I a způsobují jejich translokaci z endoplazmatického retikula do cytosolu (Barel *et al.*, 2006). V předchozích výzkumech bylo prokázáno, že k translokaci těžkých řetězců MHC I do cytosolu a k jejich následné proteazomální degradaci je kromě přítomnosti virového proteinu US11 nutná ubikvitinace (Kikkert *et al.*, 2001; Shamu *et al.*, 2001). V cytosolu jsou těžké řetězce proteazomálně degradovány a zbylé součásti MHC I nemohou v nesloženém stavu opustit endoplazmatické retikulum. Tím se sníží počet MHC I na povrchu buněk a s tím i pravděpodobnost odhalení virové infekce (Barel *et al.*, 2006). Při výzkumu funkční charakteristiky proteinu US11 bylo objeveno, že pro translokaci a degradaci těžkých řetězců MHC I je nezbytná transmembránová doména proteinu US11 a to aminokyselina glutamin v pozici 192. Tato aminokyselin zřejmě interaguje s ubikvitin-proteazomálním komplexem, nebyl však zatím objeven molekulární mechanismus jejího působení (Lee *et al.*, 2005).

V roce 1998 bylo prokázáno, že HCMV dovede v endotelových buňkách zastavit i na interferonu γ (IFNγ) závislou expresi z genů pro MHC II. třídy. IFNγ stimuluje v neinfikovaných buňkách signální kaskádu vedoucí k expresi transkripčního faktoru CIITA (class II transactivator), který v jádře dimerizuje a spouští transkripci genů pro MHC II. V rámci této signální kaskády hraje

velmi důležitou roli interakce Jak kinázy (Janus kinase) a transkripčního faktoru STAT (signal transducer and activator of transcription), kterou virus inhibuje. Ačkoliv v neinfikovaných buňkách dochází k IFNγ stimulované expresi CIITA a následně ke zmnožení MHC II na povrchu buněk, v buňkách infikovaných HCMV se tento jev nevyskytuje. Americký vědecký tým již v roce 1998 zjistil, že virus využívá buněčný proteazomální aparát k degradaci Jak kinázy. Tím přerušuje signální kaskádu vedoucí od IFNγ k transkripci genů pro MHC II a omezuje tím počty MHC II na povrchu buněk infikovaných HCMV (Miller *et al.*, 1998).

Virus Epstein-Barrové (EBV) si proti odhalení imunitním systémem vytvořil vlastní zbraň. Pro navození a udržení latentní fáze infekce EBV exprimuje protein EBNA1 (Epstein-Barr nuclear antigen 1). Tento protein udržuje v latentní fázi virového cyklu hladinu genové exprese na velmi nízké úrovni a teprve za vhodných podmínek začne působit jako transkripční aktivátor a spouštěcí faktor virové replikace a lytického cyklu. Již v roce 1997 byla v proteinu EBNA1 mezinárodním výzkumným týmem objevena repetitivní sekvence aminokyselin glycinu a alaninu, která zabraňuje degradaci tohoto proteinu v proteazomu. Těmito repetitivními sekvencemi se virus Epstein-Barrové efektivně vyhýbá prezentaci peptidů pocházejících z EBNA1 na MHC I a znesnadňuje tak T-lymfocytům odhalení infekce v buňce.

Anti-degradativní funkce Gly-Ala repetic byla ověřena tímtéž týmem. V pokusech byl použit virový protein EBNA4, který je obvykle ihned rozložen v proteazomu. Chimérický protein EBNA4 s Gly-Ala repeticemi však degradaci v proteazomu nepodléhal (Levitskaya *et al.*, 1997). Tohoto jevu využívá i další vědecký tým při přípravě potenciálních terapeutických genů pro léčbu HIV genovou terapií. Bylo totiž prokázáno, že Gly-Ala repetice vložená do Gag genu viru HIV *in vitro* zastavuje jeho degradaci a umožňuje dlouhodobější Gag genem způsobené zpomalování replikace viru v pozdní fázi infekce (Hammer *et al.*, 2008).

2.4 Degradace TAP

Rozpoznání a eliminace virů cytotoxickými T-lymfocyty jsou procesy závislé na prezentaci antigenů na MHC I, při níž hraje klíčovou roli protein TAP. TAP transportuje peptidy z cytosolu do ER (viz Obr. 3), kde se tyto peptidy skládají do funkčních trimerů MHC molekul I. třídy a putují na povrch buněk. Přirozeně se tak prezentují i peptidy virového původu a tento mechanismus se stává cílem virového útoku na imunitní systém.

Bovinní herpesvirus typu 1 (BHV1) produkuje časný protein UL49.5, který v infikovaných buňkách funguje jako inhibitor TAP. UL49.5 se váže na TAP, znemožňuje přenos peptidů do endoplazmatického retikula a způsobuje degradaci TAP v proteazomu, sám je spolu s ním také degradován. Pomocí škály delečních mutantů bylo dále zjištěno, že k degradaci TAP proteinu v proteazomu je nezbytná cytoplasmatická doména proteinu UL49.5. V přítomnosti inhibitoru proteazomu k degradaci TAP ani UL49.5 nedocházelo (Koppers-Lalic *et al.*, 2005). Tentýž vědecký tým podrobil analýze i homology proteinu UL49.5 několika dalších herpesvirů. Homology pocházející

z herpesvirů HSV-1, HSV-2, HCMV a EBV neměly žádný vliv na funkci proteinu TAP. U dvou virů z rodu *Varicelloviridae* snižovaly homology UL49.5 účinnost transportu peptidů do endoplazmatického retikula o 70-90%. Jednalo se o virus PRV (pseudorabies virus) a virus EHV1 (equine herpesvirus 1). Zda je protein TAP v přítomnosti těchto virů degradován, však výzkum nezmiňuje (Koppers-Lalic *et al.*, 2005).

Myší herpesvirus – 68 produkuje protein MK3, který také způsobuje degradaci TAP v proteazomu. RING finger doména MK3 s ubikvitin-ligázovou aktivitou se ukazuje jako nezbytný prvek degradačního procesu. Degradací TAP se snižuje schopnost buněk nadměrně exprimovat interferonem γ indukované MHC I. třídy a zvyšuje se schopnost viru unikat imunitnímu systému hostitele (Boname *et al.*, 2004; Lybarger *et al*., 2003).

2.5 Únik interferonové odpovědi

V živočišných buňkách je udržována stálá hladina interferon-regulujícího faktoru 3 (IRF3). Vyskytuje se v cytosolu a v případě infekce virem dojde k jeho translokaci do jádra, kde nasedá na DNA a působí jako transkripční aktivátor α- a β-interferonových promotorů. Tím se aktivuje jeden z klíčových antivirových mechanismů - interferonová odpověď.

BHV1 exprimuje protein bICP0 (bovine infected cell protein 0), který, kromě toho, že sám působí jako inhibitor β-interferonového promotoru, zároveň v buňkách způsobuje snížení počtu interferon-regulujícího faktoru 3 (IRF3). bICP0 protein má u svého C-konce tzv. RING-finger doménu, která se chová jako E3-ubikvitin ligáza. Při interakci bICP0 a IRF3 dochází zřejmě k ubikvitinaci a následné degradaci IRF3 v proteazomu. Tím se při infekci snižuje pravděpodobnost translokace IRF3 do jádra a aktivace interferonových promotorů (Saira *et al.*, 2007).

Časným produktem Herpesviru asociovaného s Kaposiho sarkomem (KSHV) je transkripční faktor RTA jehož funkcí je, stejně jako u výše zmíněného proteinu bICP0, bránění indukci α- a β-interferonových promotorů. RTA protein se však na rozdíl od bICP0 zaměřuje na interferon-regulující faktor 7 (IRF7). Koncentrace IRF7 je v neinfikovaných buňkách velmi nízká až zanedbatelná oproti koncentraci IRF3, ovšem v pozdějších fázích infekce se množství IRF7 mnohonásobně zvyšuje a vede k aktivaci interferonových promotorů v jádře. Yu *et al*. zjistili, že RTA protein má N-koncovou E3-ubikvitin ligázovou aktivitu, díky níž značí IRF7 polyubikvitinovým řetězcem a způsobuje jeho zvýšenou proteazomální degradaci. V buňkách transformovaných plazmidy s geny pro RTA a IRF7 se při stálém množství plazmidů s IRF7 a zvyšujícím se množství plazmidů s RTA úměrně snižovala koncentrace proteinu IRF7. Po přidání proteazomálního inhibitoru MG132 se koncentrace IRF7 ustálila. To dokazuje, že virový protein RTA způsobuje degradaci buněčného transkripčního faktoru IRF7 ubikvitin-proteazomálním systémem (Yu *et al.*, 2005).

U myšího cytomegaloviru (MCMV) byl objeven gen, který pomáhá viru v boji proti interefronu. Tento gen – M27 produkuje 27kDa velký protein (pM27), jehož hlavní funkcí je navázání

transkripčního faktoru STAT2 a jeho degradace v proteazomu. Na transkripční faktor STAT1 ani na hladiny mRNA obou STAT nemá pM27 žádný vliv. V nepřítomnosti proteinu pM27 byly buňky infikované MCMV mnohem citlivější na antivirovou interferonovou odpověď typu I (α, β) i II (γ). STAT2 v jádře buňky aktivuje transkripci genů pro interferony typu I a ty následně aktivují interferon γ. Interferon γ způsobuje fosforylaci tyrozinových zbytků STAT2, čímž se zvyšuje antivirová obrana buňky. Snížením koncentrace STAT2 pomocí pM27 se snižuje schopnost buňky aktivovat interferonovou odpověď (Zimmermann *et al.*, 2005).

2.6 Zastavení zánětlivé odpovědi degradací adaptorových proteinů TLR2

Homolog již zmiňovaného proteinu bICP0, protein ICP0 (infected cell protein 0) pocházející z Herpes simplex viru (HSV) má také E3-ubikvitin ligázovou aktivitu. Při úniku imunitnímu systému svůj útok cílí na Toll-like receptory (TLR), zejména na jejich adaptorové proteiny. TLR rozpoznávají antigeny patogenního původu a následně prostřednictvím evolučně konzervované TIR domény (Toll/Interleukin 1 receptor) a adaptorových proteinů spouštějí transkripci NF-κB (nuclear factor κB) a tím i signální dráhu vedoucí k aktivaci prozánětlivých cytokinů. Zánětlivá reakce láká do svého okolí buňky imunitního systému a viru hrozí odhalení a zničení.

V roce 2000 bylo zjištěno, že mutace v proteinu ICP0 způsobují hypersensitivitu buněk k interferonové odpovědi a že tento protein hraje roli při úniku imunitnímu systému hostitele. Mutace ostatních časných virových proteinů se podobným způsobem neprojevily (Mossman *et al.*, 2000). V nedávné době tým vědců v čele s van Lintovou objevil, že ICP0 přerušuje signální kaskádu vedoucí od Toll-like receptoru 2 (TLR2) k obranné reakci proti HSV. Důležitou roli zde hraje právě E3-ubikvitin ligázová aktivita tohoto proteinu, která by se mohla uplatňovat při proteazomální degradaci adaptorových proteinů MyD88 (myeloid differentiation factor 88) a Mal (MyD88 adaptor-like protein). V pokusech byly exprimovány vždy protein ICP0 a jeden z adaptorových proteinů MyD88 nebo Mal a to v přítomnosti a v nepřítomnosti proteazomálního inhibitoru. Inhibice proteazomu v obou případech výrazně zvýšila produkci faktoru NF-κB i za přítomnosti vysoké koncentrace proteinu ICP0. To podporuje hypotézu, že protein ICP0 degraduje adaptorové proteiny MyD88 a Mal proteazomální cestou.

Nepostradatelnost E3-ubikvitin ligázové aktivity byla ověřena dalšími pokusy. Byly srovnávány účinky plně funkčních ICP0 proteinů a defektních proteinů ICP0 s mutacemi v RING-finger oblasti s E3-ubikvitin ligázovou aktivitou na regulaci TLR2 signalizace. V přítomnosti mutantního proteinu došlo k transkripci reportérového genu NF-κB a k výraznější sekreci Interleukinu 8 (IL-8), než v přítomnosti plně funkčního ICP0. Tím bylo ověřeno, že E3-ubikvitin ligázová aktivita je nutná pro potlačení aktivace transkripce faktoru NF-κB (van Lint *et al.*, 2010).

V květnu 2011 byla popsána interakce buněčné E3-ubikvitin ligázy SIAH-1 a herpesvirového proteinu ICP0. Bylo zjištěno, že SIAH-1 indukuje polyubikvitinaci ICP0 a jeho degradaci v proteazomu, buněčná E3-ubikvitin ligáza je vzájemnou interakcí naopak stabilizována. V buňkách

s „vypnutým“ genem pro SIAH-1 se po infekci HSV zvýšila hladina ICP0, k jeho ubikvitinaci docházelo méně často a jeho poločas života se prodloužil. Z výzkumu vyplývá, že SIAH-1 snižuje poločas života ICP0 ubikvitinací a následnou degradací a zřejmě se jedná o nový buněčný obranný mechanismus proti herpesvirové infekci (Nagel *et al.*, 2011).

2.7 Zpomalení pohybu buněk imunitního systému

Dendritické buňky (DC) slouží jako fagocyty v periferních tkáních a jako antigen prezentující buňky předkládající peptidy cytotoxickým T-lymfocytům (Cella *et al.*, 1997). Virus HSV-1 při úniku imunitnímu systému zvyšuje přilnavost DC k proteinům extracelulární matrix a tím snižuje jejich pohyblivost (Theodoridis *et al.*, 2011). Maturace DC trvá jen krátkou dobu, proto je zpomalení améboidního pohybu buněk pro virus výhodné.

Protein Cytohesin-1 v dendritických buňkách interaguje s cytoplazmatickou částí β-podjednotky integrinu LFA-1 a tím zvyšuje afinitu integrinu LFA-1 k jeho ligandům. Aktivace integrinu je regulována proteinem CYTIP (cytohesin interacting protein). Při maturaci DC dochází k nadprodukci proteinu CYTIP a buňky se z přisedlých mění na pohyblivé. Při infekci buněk virem HSV-1 dochází zatím neprozkoumaným mechanismem k degradaci proteinu CYTIP v proteazomu. Tím dojde ke konstitutivní aktivaci LFA-1 a DC jsou integriny připoutány v periferních tkáních a nemohou se pohybovat. Virus tak zabrání prezentaci antigenů ostatním buňkám imunitního systému v lymfatických uzlinách (Theodoridis *et al.*, 2011).

3. Proteazomy ovlivňují replikační cyklus DNA virů

Viry využívají mnoho buněčných mechanismů, mj. i buněčný proteazomální aparát k tomu, aby se mohly v buňkách úspěšně replikovat. Mezi přeborníky v této oblasti patří dle dostupných informací zejména herpesviry.

3.1 Role ND10 při replikaci DNA virů

Jaderné domény 10 (Nuclear Domains 10, ND10), PML-jaderná tělíska (PML-nuclear bodies) nebo jaderné tečky, to všechno jsou různé názvy pro tytéž dynamické makromolekulární struktury o velikosti 0,3 - 1 μm vyskytující se v interchromozomálních oblastech buněčného jádra a fungující jako „skladiště“ různých buněčných proteinů (Negorev & Maul, 2001). Tyto proteiny se uplatňují při mnoha dějích v buňce, např. při opravách DNA, apoptóze, při buněčné odpovědi na stres, při ubikvitinaci, při onkogenezi nebo při genové expresi (Dellaire & Bazett-Jones, 2004; Takahashi *et al.*, 2004; Zhong *et al.*, 2000). ND10 se skládají z více než sedmdesáti proteinů, z nichž některé jsou přítomny stále a některé se ke struktuře připojují jen za určitých podmínek. Ke stále přítomným proteinům ND10 patří PML (Promyelocytic leukemia protein), Sp100 (Speckled protein of 100kDa), SUMO-1 (small ubiquitin-related modifier 1), BLM (Bloom syndrom helicase) a Daxx

protein (Tavalai & Stamminger, 2009). Při výzkumu herpesvirových infekcí bylo zjištěno, že proteiny ND10 struktur ovlivňují replikaci těchto virů. V přítomnosti interferonů vykazuje např. protein PML anti-herpesvirovou aktivitu (Chee *et al.*, 2003), protein Sp100 zase potlačuje expresi bezprostředně časných genů viru HSV-1 (Negorev *et al.*, 2006). Není proto překvapením, že se viry tyto struktury snaží zničit.

Herpesviry HSV-1 a HCMV způsobují rozrušení a rozptýlení ND10 již v časných fázích infekce (Maul *et al.*, 1993; Kelly *et al*., 1995). Multifunkční protein ICP0 viru HSV-1 kóduje dvě místa s E3 ubikvitin-ligázovou aktivitou, která interagují s E2 ubikvitin-konjugačními enzymy. E3 ubikvitin-ligázové místo proteinu ICP0 kódované exonem 2 interaguje s enzymy UbcH5a a UbcH6. Interakce ICP0-UbcH5a způsobuje polyubikvitinaci a proteazomální degradaci dvou proteinů, které jsou součásti ND10: PML a Sp100. Zároveň je interakce ICP0 a UbcH5a spojována také s rozrušováním ND10 struktur. Přímá souvislost degradace PML a Sp100 s enzymem UbcH5a byla prokázána sérií pokusů, v nichž figuroval enzym UbcH5a a další E2 ubikvitin-konjugační enzymy s bodovými mutacemi. Nahrazení cysteinu v pozicích 85, 86 a 131 alaninem vedlo v případě UbcH5a k inhibici proteazomální degradace PML a Sp100, u ostatních E2 ubikvitin-konjugačních enzymů neměly bodové mutace na degradaci obou proteinů žádný vliv (Gu & Roizman, 2003).

Dalším z proteinů ND10, jejichž proteazomální degradaci herpesviry způsobují, je protein Daxx. Jeho degradaci způsobuje protein pp71, který se nachází v tegumentu viru HCMV. Ihned po vstupu virionu do buňky se pp71 dostává z tegumentu do cytosolu a následně je translokován do jádra, kde interaguje s Daxx a směřuje ho k degradaci v proteazomu. Funkcí proteinu Daxx je umlčovat virovou expresi bezprostředně časných genů aktivací histon-deacetylázy; jeho degradace probíhá v proteazomu a je nezávislá na ubikvitinu. K prokázání postradatelnosti ubikvitinačního enzymu byly v pokusech použity myší buňky ts20, které mají teplotně senzitivní E1 ubikvitin-aktivační enzym. Při kultivaci buněk ve 35°C ubikvitinační systém normálně funguje, při kultivaci ve 39°C je ubikvitinace nefunkční. Buňky byly kultivovány v obou teplotách v přítomnosti transformovaného adenoviru, který produkoval cytomegalovirový pp71. K proteazomální degradaci proteinu Daxx došlo v obou případech, čímž bylo prokázáno, že degradace Daxx je nezávislá na ubikvitinaci (Saffert & Kalejta, 2006; Hwang & Kalejta, 2007).

3.2 Využití buněčného proteazomálního aparátu při DNA virové replikaci

Nezbytnost proteazomů pro efektivní virovou replikaci viru HCMV byla prokázána několika vědeckými týmy. V obou výzkumech (Prösch *et al.*, 2003; Kaspari *et al.*, 2008) byla po přidání proteazomálního inhibitoru MG132 replikace HCMV zastavena již v časných fázích infekce. Další výzkumné týmy předchozí poznatky potvrdily a dále dokázaly, že proteazomy neovlivňují pouze expresi bezprostředně časných genů HCMV, ale celý replikační cyklus viru (Cantrell & Bresnahan, 2005; Tran *et al.*, 2010). Podobný výzkum vlivu proteazomů na replikační cyklus herpesvirů byl prováděn na viru HSV-1. Replikační cyklus HSV-1 je závislý na aktivaci buněčného transkripčního

faktoru NF-κB. Virem aktivovaný NF-κB se váže na bezprostředně časný promotor genu pro ICP0 a napomáhá virové transkripci a replikaci. Aktivaci NF-κB virus navozuje prostřednictvím IκB kinázy (IKK), která fosforyluje inhibitory transkripčního faktoru NF-κB. Fosforylované inhibitory NF-κB jsou následně degradovány v proteazomu, díky čemuž může NF-κB interagovat s ICP0 promotorem a podporovat virovou transkripci (Everett *et al.,* 1998; Amici *et al.,* 2001). V přítomnosti inhibitorů proteazomu MG132, MG115 a epoxomycinu k aktivaci NF-κB nedocházelo. Pokusy byly prováděny v různých typech buněk a s různými koncentracemi proteazomálních inhibitorů. I nejnižší koncentrace inhibitorů se 24 hodin po přidání k infikovaným buňkám projevily zpomalením replikace HSV-1, všechny inhibitory snížily množství virů v buněčném supernatantu o více než 90% (La Frazia *et al.,* 2006).

V roce 2003 byl publikován článek, který poukazuje na využití proteazomů při replikaci další skupiny virů s DNA genomem, jedná se o adenoviry. Časný adenovirový protein E4-34kDa z různých adenovirových sérotypů aktivuje expresi pozdních genů proteazomální degradací některých buněčných proteinů. V přítomnosti inhibitoru proteazomu MG132 však k expresi pozdních genů a k efektivní replikaci viru nedochází (Corbin-Lickfett & Bridge, 2003). Jiný výzkum týkající se adenovirů prokázal, že proteazomální degradace buněčných onkoproteinů Mdm2 a Mdm4 podporuje expresi virových genů. Onkoproteiny Mdm2 a Mdm4 slouží buňce k regulaci hladiny proteinu p53; Mdm2 interaguje s proteinem p53 a směřuje ho k degradaci v proteazomu, Mdm4 jemně reguluje transkripci p53 (Haupt *et al.*, 1997; Francoz *et al.*, 2006). Po infekci lidských i myších buněk adenoviry byl pozorován úbytek obou onkoproteinů, při laboratorním „vypnutí" genů pro Mdm2 a Mdm4 došlo ke zvýšení exprese a rapidnímu nárůstu množství adenovirových proteinů v infikovaných buňkách. Lidské adenoviry neschopné replikace v myších embryonálních fibroblastech se po „vypnutí" genů pro oba onkoproteiny v myších buňkách začaly replikovat. Přidáním proteazomálního inhibitoru MG132 k infikovaným buňkám se exprese virových genů zastavila a koncentrace Mdm2 i Mdm4 se naopak zvýšila. Koncentrace obou onkoproteinů však nedosáhla hodnot jako před infekcí, z čehož se usuzuje, že ke snižování hladiny Mdm2 a Mdm4 dochází na proteazomech závislou, ale zřejmě i nezávislou cestou (Yang *et al.*, 2012).

Další využití proteazomální degradace při replikaci virů bylo v roce 2009 popsáno u viru vakcinie (VACV) z čeledi *Poxviridae*. V pokusech byly využity proteazomální inhibitory MG132 a epoxomicin. Oba inhibitory byly přidávány k buňkám v různých časových intervalech po a před infekcí VACV. Z pozorování vyplynulo, že exprese časných genů (early genes) VACV trvala v přítomnosti inhibitorů proteazomů delší dobu a exprese středně časných (intermediate genes) a pozdních genů (late genes) byla téměř nedetekovatelná. Virová replikace se díky inhibitorům proteazomu zastavila 2 až 4 hodiny po infekci VACV, tedy v okamžiku počátku syntézy virové DNA. Zároveň bylo ověřeno, že inhibice proteazomů nemá vliv na rozbalení virové DNA z virionu. Autoři výzkumu využili dřívějších poznatků, že v buňkách infikovaných poxviry se replikuje jakákoliv

cirkulární molekula DNA přítomná v cytoplazmě a vložili do VACV infikovaných HeLa buněk plazmid. Replikace plazmidu pUC19, se po přidání MG132 zastavila, stejně jako replikace samotného viru. K expresi pozdních genů nedocházelo ani v přítomnosti inhibitoru E1 ubikvitin-aktivačního enzymu UBEI-41, což podporuje hypotézu o využití ubikvitinačně-proteazomální dráhy při pozdních fázích replikace VACV (Satheshkumar *et al.*, 2009). Na VACV infikované buňky byly i dalším vědeckým týmem aplikovány proteazomální inhibitory za účelem zkoumání jejich působení na replikační cyklus poxvirů. Aplikace každého z proteazomálních inhibitorů MG132, MG115, lactacystinu a bortezomibu působila na replikaci VACV stejně. V počáteční fázi infekce nebyla replikace viru přítomností inhibitorů příliš ovlivněna, nicméně exprese středně časných a pozdních genů byla zastavena. Odstranění reverzibilního proteazomálního inhibitoru MG132 se projevilo opětovným spuštěním virové exprese středně časných a pozdních genů (Teale *et al.*, 2009).

V nedávném výzkumu se švýcarským vědcům podařilo díky RNA interferenci ještě více přiblížit funkci proteazomů v replikačním cyklu VACV. Nejen, že proteazomy napomáhají rozbalování VACV virionů v cytoplazmě, ale ubikvitinačně-proteazomální systém je nezbytný pro spuštění exprese středně časných a pozdních genů. RNA interference prokázala, že Cullin3 (Cul3) a RING Box protein 1 (Rbx1), součásti buněčného BCR E3-ubikvitin ligázového komplexu, se v infikovaných buňkách vyskytují v komplexu s VACV. Zároveň bylo prokázáno, že degradace Cul3 či Rbx1 vede k zastavení replikace viru; degradace proteinu Cullin-1 z buněčného SCF E3-ubikvitin ligázového komplexu se na rychlosti replikace VACV neprojevuje. Těmito pokusy bylo objasněno zastavení virové replikace v přítomnosti proteazomálních inhibitorů 2 až 4 hodiny po infekci buňky z výzkumu v roce 2009. Ubikvitinace a následná proteazomální degradace jsou klíčovými mechanismy započetí syntézy virové DNA středně časných a pozdních genů VACV, bez kterých by efektivní replikace viru nemohla proběhnout (Mercer *et al.*, 2012).

Proteazomy jsou využívány i další skupinou DNA virů - papillomaviry. TIP60 je katalytickou podjednotkou buněčné histon acetyltransferázy, jejíž funkcí je acetylace histonů, remodelace chromatinu a regulace transkripce. Způsobuje acetylaci histonu H4, na který se naváže Brd4 protein (bromo-doménu obsahující protein), způsobí represi hlavního časného promotoru genu E6 lidského papillomaviru (HPV) a zastaví jeho transkripci. E6 onkoprotein slouží HPV k proteazomální degradaci p53 a k inhibici apoptózy (Hawley-Nelson *et al.*, 1989). Svou transkripci E6 protein obnovuje tak, že váže TIP60 a způsobuje jeho degradaci v proteazomu. Degradace TIP60 se v přítomnosti proteazomálního inhibitoru MG132 zastavuje, což dokazuje nezbytnost proteazomu při replikaci HPV (Jha *et al.*, 2010).

Důležitou roli hraje proteazomální aparát i při replikaci rostlinných virů. V roce 2011 byla popsána interakce proteinu C2 rostlinného viru BSCTV (Beet severe curly top virus) z čeledi *Geminiviridae* s proteinem SAMDC1 (S-adenosyl-methionin dekarboxyláza 1) z *Arabidopsis thaliana*. SAMDC1 je protein s malým poločasem života, který ve své struktuře obsahuje tzv. PEST

sekvenci (prolin-glutamát-serin-threonin), jež zprostředkuje interakci s SCF rodinou E3 ubikvitin-ligáz. Interakce SAMDC1 s ubikvitin-ligázovou je příčinou jeho ubikvitinace a proteazomální degradace. SAMDC1 v buňkách dekarboxyluje S-adenosyl-methionin (SAM), který je v nedekarboxylované podobě zdrojem pro metylaci DNA. V nepřítomnosti proteinu C2 není SAMDC1 v buňkách stabilizován a dochází k *de novo* metylaci hostitelské i virové DNA, čímž jsou geny viru i hostitele umlčovány. Naopak, přítomnost C2 stabilizuje SAMDC1, zastavuje jeho proteazomální degradaci, maří DNA-metylaci a umožňuje účinnou replikaci viru BSCTV. Přidání proteazomálního inhibitoru MG132 v neinfikovaných buňkách znemožnilo degradaci SAMDC1, což prokázalo, že SAMDC1 je běžně degradován v proteazomu. Proteinem C2 zprostředkovaná inhibice proteazomální degradace SAMDC1 umožňuje geminiviru BSCTV vyhnout se umlčení vlastních genů DNA-metylací a produktivně se replikovat (Zhang *et al.*, 2011).

4. Ubikvitinace a deubikvitinace: Interakce virů s ubikvitin-ligázami

E3 ubikvitin-ligázy jsou enzymy, které prostřednictvím ubikvitinace a následné proteazomální degradace regulují poločasy života mnoha proteinů, které plní své funkce např. v regulaci růstu a diferenciace buněk nebo v buněčné signalizaci. E3 ubikvitin ligázy jsou jednou z nejdůležitějších součástí celého ubikvitinačně-proteazomálního systému, protože určují substrátovou specifitu ubikvitin-konjugační enzymové kaskády. Interakcemi s E3 ubikvitin-ligázami mění viry proteinové složení buňky a zajišťují si vhodné podmínky pro replikaci. Některé viry pozměňují svými proteiny specifitu buněčných E3 ubikvitin ligáz, jiné viry kódují vlastní E3 ubikvitin-ligázy.

4.1 Interakce živočišných DNA virů s ubikvitin-ligázami

Existuje mnoho rodin E3 ubikvitin-ligáz a jednou z nich jsou i SCF ubikvitin-ligázy. SCF ubikvitin-ligázy se skládají ze třech stálých komponent - z RING finger proteinu Rbx1/Roc1, Skp1 proteinu (adaptérový protein) a z CUL1 proteinu (scaffold protein) a z jedné variabilní komponenty – tzv. F-box proteinu. F-box proteiny ve své struktuře obsahují vazebná místa pro proteiny, k nimž ubikvitin-ligázy připojují polyubikvitinový řetízek a značí je tak k degradaci v proteazomech. Viry využívají ubikvitin-ligázy ke značení a následné degradaci buněčných proteinů, které spouštějí antivirové mechanismy nebo naopak zabraňují ubikvitinaci proteinů jim vlastních či jinak prospěšných.

Bylo prokázáno, že adenoviry využívají ubikvitin-ligázové komplexy oběma výše zmíněnými způsoby. Fbw7 je F-box protein ubikvitin-ligázy SCF^{Fbw7}, který rozeznává několik protoonkogenů a cílí je k degradaci. To z něho dělá tumor supresorový protein chránící buňku před nekontrolovatelným dělením. Časný adenovirový protein, onkogen E1A, interaguje s SCF^{Fbw7} ubikvitin-ligázou a zpomaluje degradaci jejích cílových proteinů (v pokusech testováno na proteinech c-Myb, c-Myc a cyklinu E). Byl změřen poločas života všech tří buněčných proteinů v přítomnosti SCF ubikvitin

ligázy bez Fbw7 F-box proteinu, s Fbw7 a poté i v přítomnosti adenovirového časného proteinu E1A. Přidání Fbw7 k buňkám s SCF ubikvitin-ligázou poločas života všech proteinů výrazně snížilo, jeho degradace probíhala s vyšší účinností. Naopak po přidání adenovirového proteinu E1A se poločas života všech protoonkogenů zvýšil, což naznačuje antagonistické působení E1A na Fbw7. Adenovirový protein E1A by mohl být příčinou nekontrolovatelné proliferace infikovaných buněk a tím i perspektivním cílem pro antivirovou terapii (Isobe *et al.*, 2009).

Adenoviry využívají interakce s ubikvitin-ligázami i k degradaci některých buněčných proteinů. DNA ligáza IV a protein Mre11 v komplexu s dalšími buněčnými proteiny způsobují nehomologní spojování konců DNA (NHEJ) sloužící zejména k opravám přerušených řetězců DNA. Zároveň v infikovaných buňkách navozují i konkatemerizaci adenovirových genomů. Lidský adenovirus AD-5 se konkatemerizaci genomu brání interakcí vlastních proteinů E4 34k (E4orf6) a E1B 55k s buněčnými proteiny Cullinem 5, elonginy B a C a proteinem Rbx1 (Harada *et al.*, 2002). Všechny tyto komponenty dohromady tvoří E3 ubikvitin-ligázu, která je při adenovirové infekci zodpovědná za ubikvitinaci a proteazomální degradaci právě DNA ligázy IV či proteinu p53 (Querido *et al.*, 2001; Harada *et al.*, 2002). Bylo zjištěno, že k proteazomální degradaci DNA ligázy IV je nutný fyzický kontakt pouze s jednou virovou komponentou této E3 ubikvitin-ligázy – s virovým proteinem E1B 55k (Baker *et al.*, 2007).

Ubikvitin-ligázová aktivita je adenoviry využívána i ke kontrole exportu buněčné a virové mRNA v pozdních fázích infekce. V roce 1986 byl zveřejněn výzkum, z něhož vyplývá, že výše zmíněný adenovirový protein E1B 55k pozitivně ovlivňuje akumulaci pozdní virové mRNA v cytoplazmě a současně brání transportu a akumulaci buněčné mRNA (Pilder *et al.*, 1986). V roce 2008 bylo prokázáno, že k akumulaci virové mRNA nestačí samotný E1B 55k, ale je nezbytná přítomnost i virového proteinu E4 34k a dalších buněčných komponent. Konkrétně bylo zjištěno, že za akumulaci mRNA pozdních adenovirových genů je zodpovědná E3 ubikvitin-ligázová aktivita komplexu obou virových proteinů a dalších buněčných komponent. Jedná se o stejnou E3 ubikvitin-ligázu zmiňovanou v roce 2007 v práci Baker *et al.* v souvislosti s degradací DNA ligázy IV (Blanchette *et al.*, 2008).

Další příklad interakce ubikvitin-ligázy s virem můžeme nalézt u polyomaviru SV40 (Simian virus 40). Bylo objeveno spojení velkého T-antigenu (LT, časný produkt virového genomu) s F-box proteinem SFC^{Fbw7} ubikvitin ligázy. V pokusech vyvolalo toto spojení snížení rychlosti degradace cyklinu E, což potvrzuje vliv LT na na SCF^{Fbw7} závislou degradaci proteinů. Cyklin E byl vázán k LT pouze v případě, že byl fosforylován v pozici Thr^{701}, v nefosforylované ani v mutantní formě, kdy chyběla část proteinu v okolí threoninu v pozici 701, cyklin E s LT neinteragoval. Z výzkumu vyplynuly i další podněty ke zkoumání vlivu LT na ubikvitin-ligázy, mj. i to, že by LT mohl ovlivňovat substrátovou specifitu SCF^{Fbw7} ubikvitin-ligázy (Welcker & Clurman, 2005).

Ubikvitin-ligázová aktivita byla objevena i u poxvirů. Většina poxvirů kóduje protein p28 o velikosti 28 kDa. Tento protein interaguje s buněčnými E2 ubikvitin-konjugačními enzymy a připojuje polyubikvitinové řetízky k různým proteinům. Struktura p28 byla zkoumána u dvou virů z rodu *Orthopoxviridae*, u Myšího poxviru (ECTV, ectromelia virus) a u viru Varioly (VARV). Bylo zjištěno, že protein p28 ve své struktuře obsahuje RING finger doménu a *in vitro* i *in vivo* se chová jako E3 ubikvitin-ligáza. Bodové mutace uvnitř sekvence pro RING finger doménu vedly ke znemožnění interakce p28 s E2 ubikvitin-konjugačními enzymy a k polyubikvitinaci nemohlo dojít. Ačkoliv zatím nebylo zjištěno, které proteiny p28 ubikvitinuje, autoři výzkumu se domnívají, že by mohlo jít o buněčné proteiny antivirové povahy. Jejich proteazomální degradace by tak usnadnila virovou replikaci a přispěla by k šíření viru. Pokud by se potvrdila důležitost p28 pro replikaci a šíření poxvirů, protein p28 by se mohl stát cílem terapeutické léčby poxvirových infekcí (Huang *et al.*, 2004).

Herpesvirus HSV-1 využívá interakce vlastního proteinu UL9 s NFB42 - F-box proteinem SCF^{NBF42} ubikvitin-ligázy k ustavení latentní infekce v neuronálních buňkách. UL9 spolu s dalšími virovými proteiny ovlivňuje replikaci virové DNA, UL9 je potřebný k jejímu zahájení. Pro ustavení latentní fáze infekce je ale nezbytné virovou replikaci snížit na minimum a právě o to se postará NFB42. Při interakci UL9 s NFB42 dojde k polyubikvitinaci UL9 a následuje jeho proteazomální degradace. To zabrání aktivaci replikace virové DNA a nepřítomnost UL9 udržuje HSV-1 v latentním stavu. Inhibitor proteazomů MG132 zastavuje degradaci UL9 a znemožňuje navození latence viru HSV-1 (Eom & Lehman, 2003).

Opačný děj byl pozorován u herpesviru EBV. Aktivace virové replikace časným virovým proteinem EBNA1 a ukončení latentní fáze infekce jsou spjaty se sekvenčně specifickou deubikvitinací histonu H2B. Ubikvitinace a deubikvitinace stejně jako ostatní posttranslační modifikace histonů způsobují remodelaci chromatinu a regulují transkripci. EBNA1 reguluje expresi pozdních genů i setrvání v latentní fázi infekce navázáním sebe sama do specifických oblastí virového replikačního počátku *OriP*. V tom mu napomáhá protein USP7. Buněčný deubikvitinační protein USP7 je proteinem EBNA1 přitahován, tvoří s ním komplex a zvyšuje rychlost jeho navázání na virovou DNA. USP7 deubikvitinuje histony H2B a pokud je navázán na EBNA1, deubikvitinuje histony právě v oblasti *OriP*. Tím je usnadněno spuštění EBV virové replikace a reaktivace viru. (Sarkari *et al.*, 2009).

Bakulovirus *Bombyx mori* nukleopolyhedrovirus ve svém genomu zase kóduje šest proteinů s RING-finger doménou, u tří z nich byla pokusy prokázána E3 ubikvitin-ligázová aktivita. Bakulovirové proteiny IAP2, IE2 a PE38 byly v přítomnosti E2 ubikvitin-konjugačních enzymů (z rodiny Ubc4/5) schopné zahájit polyubikvitinaci a mutačními testy bylo zjištěno, že za tuto funkci vděčí právě svým RING-finger doménám. Další dva zkoumané proteiny (IAP1 a ORF35) nevykazovaly schopnost ubikvitinace, u posledního proteinu (CG30) nebyla schopnost ubikvitinace

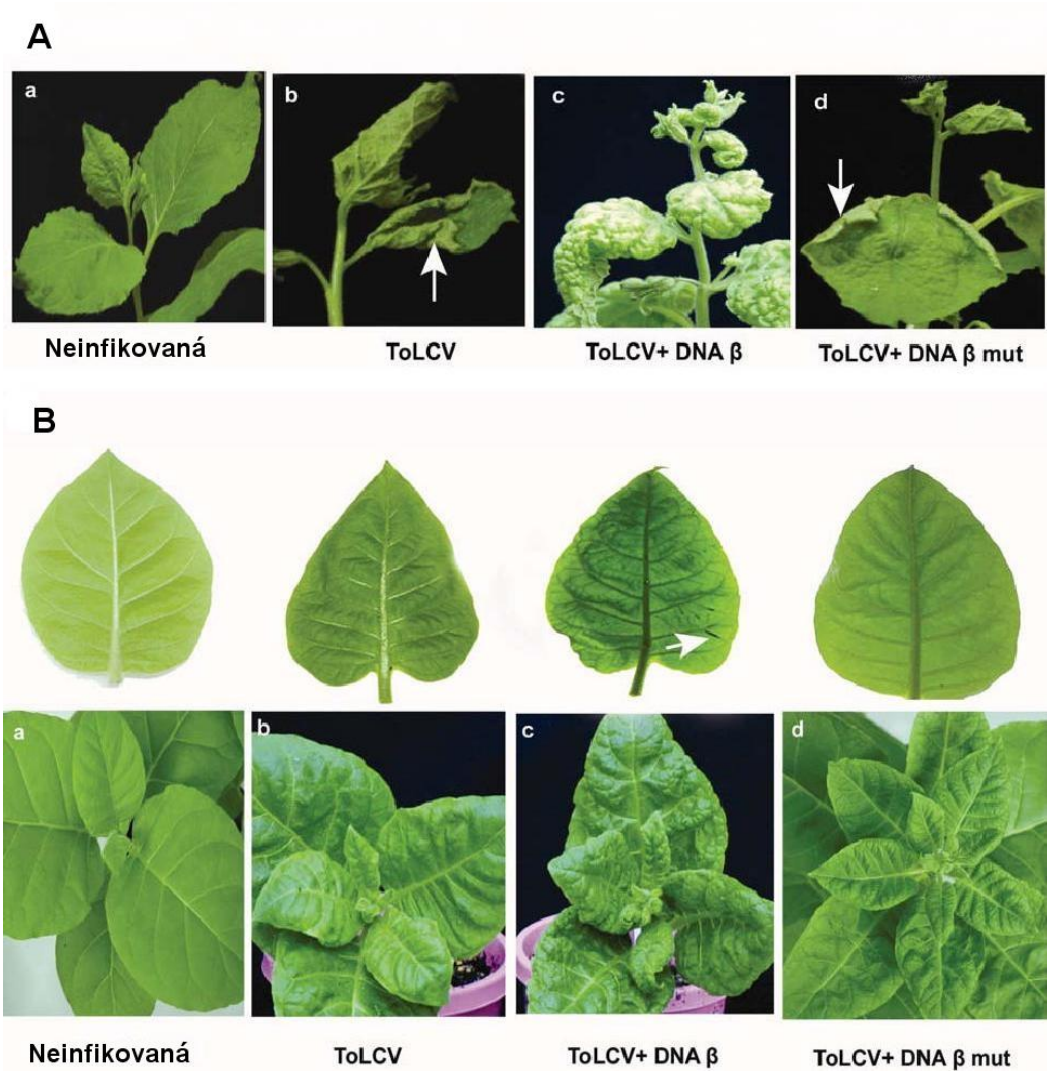
dostatečně průkazná. Do budoucna však zbývá nalézt substráty, jejichž ubikvitinaci tyto bakulovirové proteiny způsobují (Imai *et al.*, 2003). U bakuloviru OpMNPV (*Orgyia pseudotsugata* M nukleopolyhedrovirus) byl v roce 2004 také popsán protein s RING finger doménou a E3 ubikvitin-ligázovou aktivitou, protein Op-IAP3. Své jméno dostal podle funkce v buňce, je to inhibitor apoptózy (inhibitor of apoptosis, IAP). Tato jeho funkce byla prokázána pokusem, kdy byl současně s Op-IAP3 exprimován pro-apoptotický protein HID z mušky *Drosophila*. Docházelo k interakci obou proteinů, k ubikvitinaci a jejich následné proteazomální degradaci. Z toho vyplývá, že Op-IAP3 je funkční E3 ubikvitin-ligáza, která kromě ubikvitinace pro-apoptotického proteinu HID způsobuje i auto-ubikvitinaci (Green *et al.*, 2004).

4.2 Interakce rostlinných DNA virů s ubikvitin-ligázami

E3 ubikvitin-ligázy hrají stejně důležitou roli u živočichů jako u rostlin. Polyubikvitinací ovlivňují poločasy života některých proteinů a tím i buněčný cyklus rostlinných buněk. Proto můžeme najít příklady interakce s E3 ubikvitin-ligázami i u rostlinných virů. Rostlinný virus BSCTV z čeledi *Geminiviridae* kóduje protein C4, který při vnesení do rostliny *Arabidopsis thaliana* indukuje abnormální proliferaci buněk. Při porovnání C4-exprimující rostliny s rostlinou kontrolní byl objeven rostlinný protein RKP (related to KPC1) s RING finger doménou, jehož množství bylo v C4-exprimujících rostlinách osmkrát vyšší. Mutace v RING finger oblasti proteinu RKP vedla ke snížení citlivosti *Arabidopsis* na infekci BSCTV; v mutantních rostlinách s „vypnutým" genem pro RKP byla snížena rychlost replikace virové DNA. Dalšími pokusy bylo zjištěno, že RKP interaguje se šesti negativními regulátory buněčného cyklu z rodiny ICK/KRP, kromě ICK3/KRP5, který nebylo možné vyrobit jako GST-fúzní protein. Bylo zjištěno, že RKP působí jako regulátor buněčného cyklu. V *rkp* mutantní rostlině a v kontrolní rostlině bylo srovnatelné množství mRNA pro ICK2/KRP2 (inhibitor buněčného cyklu v G1/S fázi), z analýzy proteinů ale vyplynulo, že je koncentrace ICK2/KRP2 v mutantní rostlině mnohem vyšší. Tím se potvrdila hypotéza, že virový protein C4 podporuje expresi RKP, protože ten způsobuje proteazomální degradaci negativních regulátorů buněčného cyklu (Lai *et al.*, 2009).

Dalším geminivirem interagujícím s ubikvitin-proteazomálním systémem je Cotton leaf curl Multan virus (CLCuMV), konkrétně jeho β-satelitní DNA. Některé pokusy byly prováděny i s dalšími geminiviry - ToCLV (Tomato leaf curl virus) a OLCV (Okra leaf curl virus). Bylo objeveno, že protein βC1 kódovaný jediným genem β-satelitní virové DNA interaguje s rostlinným E2 ubikvitin-konjugačním enzymem S1UBC3. Výsledkem této interakce je hromadění proteinů s polyubikvitinovými řetízky v cytoplazmě a fenotypické projevy s tím spojené (viz Obr. 4). Přítomnost βC1 proteinu vede k markantnějšímu projevu fenotypických symptomů virové infekce. Za výrazné zakudrnacení listů je odpovědný tzv. „myristoylation-like" motiv β-satelitní DNA. I jedna bodová mutace v této oblasti proteinu βC1 – glycin v pozici 103 byl nahrazen alaninem – vede ke

značnému zmírnění projevů infekce. Fenotypické projevy infekce s mutantním βC1 se tak podobají projevům infekce za nepřítomnosti βC1 (Eini *et al.*, 2009).



Obr. 4 – Projevy infekce ToLCV virem, β-satelitní DNA a mutovanou β-satelitní DNA na rostlinách *Nicotiana benthamiana* a *Nicotiana tabacum.* A) Rostlina *N. bethamiana* neinfikovaná (a), infikovaná samotným ToLCV (b), infikovaná ToLCV s β-satelitní DNA (c) a infikovaná ToLCV s mutantní β-satelitní DNA (d). Bílé šipky ukazují části listů zkroucené směrem vzhůru. B) Rostlina N. tabacum neinfikovaná (a), infikovaná samotným ToLCV (b), infikovaná ToLCV s β-satelitní DNA (c) a infikovaná ToLCV s mutantní β-satelitní DNA (d). Bílá šipka upozorňuje na místo s rozšířenými žilkami a na tmavnutí listu. Mutovaná β-satelitní DNA má mutaci v „myristoylation-like" motivu βC1 části β-satelitu. Každý experiment byl prováděn na 12 rostlinách se stejným výsledkem, fotografie byly pořízeny 28 dní po inokulaci. Upraveno dle Eini *et al.* (2009).

V roce 2011 byl publikován výzkum, ve kterém je popsána interakce proteinu C2 vyizolovaného z různých geminivirů (Tomato yellow leaf curl Sardinia virus-TYLCSV, Tomato yellow leaf curl virus-TYLCV, Beet curly top virus-BCTV) s katalytickou podjednotkou CSN5

komplexu CSN, jinak zvaného též COP9 signalozom. CSN komplex slouží k odstraňování RUBylované formy Culinu1 z SCF ubikvitin-ligázového komplexu. Připojení proteinu RUB ke Cul1 zlepšuje ubikvitinaci zprostředkovanou SCF ubikvitin-ligázou. Výsledkem interakce C2 s CSN5 je změna odpovědí regulovaných SCF ubikvitin-ligázami v souvislosti s blokací SCF ubikvitin-ligázové funkce. Dále bylo zjištěno, že C2 protein interakcí s CSN5 blokuje v rostlině jasmonátovou dráhu, důležitou součást antivirové obrany (Lozano-Duran *et al.*, 2011). Autoři výzkumů upozorňují na to, že blokace některých SCF ubikvitin ligáz by mohla negativně ovlivnit např. hormonální antivirovou obranu rostlin. Na druhou stranu vyslovují autoři výzkumu hypotézu, že viry způsobují nadměrnou expresi různých F-box proteinů, čímž upřednostní degradaci některých rostlinných proteinů před jinými. Existence geminiviry kódovaných F-box proteinů zatím také zůstává neprozkoumána, ačkoliv není vyloučena (Lozano-Duran & Bejalano, 2011). Například u rostlinných nanovirů již byly virem kódované F-box proteiny objeveny.

Zmiňovaným nanovirem, který kóduje F-box protein je Faba bean necrotic yellows virus (FBNYV). Tento virus kóduje ve svém genomu 20 kDa velký protein Clink, jež má ve své struktuře F-box doménu. Clink díky F-box doméně a aminokyselinovém LxCxE motivu umožňuje současné navázání proteinů pRB a *Ms*SKP1 (homolog SKP1 z *Medicago sativa*). Bylo zjištěno, že interakce Clink s pRB zvyšuje 7-8x rychlost replikace viru, při poškození LxCxE motivu ke zvýšení rychlosti virové replikace nedojde. Druhým interakčním partnerem Clink proteinu je *Ms*SKP1, součást ubikvitin-ligázy. Pro zvýšení rychlosti vlastní replikace musí FBNYV nějak ovlivnit buněčný cyklus. Jako řešení se nabízí hypotéza, že interakce Clink, pRB a *Ms*SKP1 by mohla vést k ubikvitinaci, degradaci nebo jiné změně regulátoru buněčného cyklu pRB. Mutace v sekvenci F-box domény Clink proteinu však nevedla ke snížení Clink proteinem indukované zvýšené rychlosti replikace FBNYV v *Nicotiana benthamiana*, což tuto teorii nepodporuje. Mezi možnosti ovlivnění buněčného cyklu interakcí s ubikvitin ligázami čekající na prozkoumání patří i další hypotézy. Po navázání pRB by mohl být Clink protein polyubikvitinován a degradován spolu s pRB nebo by mohl F-box motiv Clink proteinu interagovat s dalšími proteiny a v komplexu tvořícím E3 ubikvitin-ligázu degradovat jiné regulátory buněčného cyklu. Tyto hypotézy však stále čekají na své probádání (Aronson *et al.*, 2000).

5. Úloha proteazomů ve virem indukované inhibici apoptózy a deregulaci buněčného cyklu

Apoptóza, neboli programovaná buněčná smrt, je přirozený jev úzce propojený s vývojem jedince a jeho imunitním systémem. Při apoptóze dochází k systematickému rozpadu buňky do malých apoptotických váčků, které jsou následně pohlceny fagocytujícími buňkami a dále zpracovány. V embryonálním vývoji slouží apoptóza k šetrnému odstraňování nepotřebných buněk, aniž by došlo k vyvolání zánětlivé reakce. Dále apoptózou hynou buňky nedostatečně zásobené živinami, poškozené

buňky, nadměrně proliferující buňky, buňky s poškozenou DNA či buňky napadené patogeny, které imunitní systém odhalí. Buňka má mnoho kontrolních mechanismů rozmístěných v různých fázích buněčného cyklu. Pokud je nějaký buněčný proces v nepořádku, spustí se signální kaskáda vedoucí k navození programované buněčné smrti. Virová infekce způsobuje v buňkách abnormality, které by měly vést k apoptóze a tím ke zneškodnění viru. Viry však využívají různé cesty, jimiž apoptóze brání a prodlužují život svým hostitelským buňkám. Nejčastěji dochází k inaktivaci či degradaci proapoptotického proteinu p53. Vyřazení některých buněčných kontrolních mechanismů však může vést k nadměrné proliferaci buněk a k rozvoji rakovinného bujení. Důležitost funkce regulačního proteinu p53 dokazuje i fakt, že až 50 % lidských nádorů má mutaci právě v p53 nebo v proapoptotické signální dráze s ním související.

5.1 Proteazomy a inhibice apoptózy

Jak už bylo dříve zmíněno, časné adenovirové proteiny E4 34k (E4orf6) a E1B 55k interakcí s dalšími buněčnými komponenty tvoří E3 ubikvitin-ligázu a způsobují polyubikvitinaci a proteazomální degradaci proteinu p53. To zabrání zastavení růstu napadené buňky a umožní to účinnou replikaci viru. V roce 2001 bylo prokázáno, že k ubikvitinaci p53 jsou nezbytně nutné Cullinové komplexy, které jsou součástí E3 ubikvitin-ligázy. Experimenty byl prováděn v buňkách ts41 (ovariální buňky křečíka čínského, *Cricetulus griseus*), které mají teplotně senzitivní dráhu spojenou s NEDD8 proteinem (homolog Rub z *E. Coli*) pro aktivaci Cullinů. V teplotně neaktivovaných buňkách nebyly časné adenovirové proteiny schopny indukovat polyubikvitinaci a následnou proteazomální degradaci p53, což dokazuje nezbytnost Cullinů v E3 ubikvitin-ligáze při tomto procesu (Querido *et al.*, 2001; Blanchette *et al.*, 2004).

Podobným způsobem je p53 protein degradován i při papillomavirové infekci. Onkoprotein E6 viru HPV vyvolává proteazomální degradaci katalytické podjednotky buněčné acetyltransferázy TIP60, čímž dereprimuje virové promotory a to naruší p53-dependentní aktivaci apoptotické dráhy (Jha *et al.*, 2010). Onkoprotein E5 HPV viru typu 16 zastavuje programovanou buněčnou smrt jiným způsobem. Jak zjistili Oh *et al.*, E5 inhibuje peroxidem vodíku vyvolanou apoptózu v C-33A buňkách děložního čípku. Tímto způsobem zároveň vyvolává nekontrolované dělení těchto buněk, což může přispívat k rozvoji rakoviny děložního čípku. Inhibice apoptózy je způsobena E5 proteinem zprostředkovanou ubikvitinací a proteazomální degradací proapoptotického proteinu Bax (Bcl-2 associated X protein). Bylo zjištěno, že v tomto procesu hrají zatím neobjasněnou roli další komponenty jako cyklooxygenáza-2, prostaglandin E2 nebo PKA protein-kinázová dráha. Přidání inhibitorů těchto komponent stejně jako inhibice proteazomů vedlo ke znovuspuštění apoptózy v C-33A buňkách děložního čípku, (Oh *et al.*, 2010).

Jiný způsob inhibice apoptózy zvolil herpesvirus EBV. Brání spuštění apoptózy expresí proteinu EBNA1, který soutěží s p53 o vazbu do aktivního centra deubikvitinačního enzymu USP7. V experimentu bylo zjištěno, že oba proteiny se vážou do stejného místa enzymu USP7, ale p53 tvoří

méně rozsáhlý kontakt, než EBNA1. EBNA1 ve větší míře vytěsní p53 z USP7 a ten je nedeubikvitinovaný následně odbourán v proteazomu. Tím opět dojde k inhibici apoptózy a virus se může ve své hostitelské buňce nerušeně replikovat (Saridakis *et al.*, 2005). Další herpesvirus KSHV způsobuje degradaci p53 interakcí s virovým malým membránovým proteinem K7. K7 působí proti účinku buněčného proteinu PLIC1 (Protein-linking integrin-associated protein and cytoskeleton 1), který obvykle dimerizuje a váže se na polyubikvitinované proteiny, čímž je stabilizuje. K7 znemožňuje dimerizaci PLIC1 a jeho navázání na polyubikvitinované proteiny, čímž umožňuje jejich proteazomální degradaci. Takto je degradován mj. i protein p53, což vede k inhibici apoptózy (Feng *et al.*, 2004). Tentýž virus využívá k zastavení apoptózy i další virový protein – IRF1 (Interferon regulatory factor 1). Ten interaguje s p53 a zastavuje jeho transkripci a zároveň zvyšuje rychlost jeho ubikvitinace. K tomu dochází interakcí IRF1 s ATM kinázou (ataxia telangiectasia-mutated), což vede ke snížení míry fosforylace serinu v pozici 15 v p53 proteinu, tím se zvýší míra jeho ubikvitinace a je rychleji degradován v proteazomu (Shin *et al.*, 2006). Jiný vědecký tým prokázal, že virový IRF4 interaguje s E3 ubikvitin-ligázou Mdm2 a stabilizuje ji. Mdm2 pak nepodléhá autoubikvitinaci a způsobuje degradaci p53 ve zvýšené míře. Apoptóza je zastavena, buňky se dále dělí a rostou a virus se může replikovat (Lee *et al.*, 2009).

U BHV typu 5 bylo prokázáno, že virový US3 protein je zodpovědný za remodelaci aktinu hostitelských buněk a zároveň vykazuje anti-apoptotickou aktivitu. Bylo zjištěno, že tato aktivita vymizela, když byla do proteinu US3 zavedena mutace aminokyseliny v pozici 261, výměna lyzinu za aspartát. Podrobnější informace o mechanismu anti-apoptotického působení US3 proteinu virů z podčeledi *Alphaherpesvirinae* však ještě čekají na své prozkoumání (Ladelfa *et al.*, 2011).

5.2 Proteazomy a deregulace buněčného cyklu

Buněčný cyklus je soubor dějů, na jejichž konci dojde k replikaci DNA a rozdělení buňky. Cyklus má čtyři fáze: G1 (growth), S (synthesis), G2 a M (mitosis). Za každou z těchto fází následuje kontrolní uzel, který na základě fyziologického stavu buňky rozhoduje, zda je buňka připravena vstoupit do další fáze cyklu či nikoliv. V kontrolním uzlu G1/S má svou úlohu i protein pRB. Pokud buňka není připravena na fázi syntézy, pRB indukuje zastavení buněčného cyklu a buňka může vyčkávat v tzv. G0 fázi. Jestliže se stav buňky do nějaké doby nezlepší, dojde k apoptóze. Viry potřebují ke své replikaci buněčný syntetický aparát, proto je pro ně důležité ovládnout buněčný cyklus. Deregulaci buněčného cyklu často způsobují právě degradací či jinou manipulací s pRB.

O tom, že papillomavirové onkoproteiny E5 a E6 inhibují apoptózu, již byla řeč. Onkoprotein E6 však způsobuje i degradaci tumor supresorových proteinů obsahujících tzv. PDZ doménu. PDZ domény jsou součástí mnoha proteinů, skládají se z 5 až 6 β-listů a ze 2 až 3 α-šroubovic a interagují s C-konci cílových proteinů. Podílejí se na signalizaci, transportu a komunikaci sousedních buněk, ovlivňují i buněčný růst (Lee & Zheng, 2010). Gardiol *et al.* prokázali, že E6 se váže na hDlg protein, homolog proteinu Dlg (discs large) z mušky rodu *Drosophila* a indukuje jeho proteazomální

degradaci. Tento děj byl pozorován pouze u proteinu E6 z HPV typu 16 a typu 18, které často navozují rakoviné bujení. Interakce hDlg a E6 z tzv. „low-risk" papillomavirů k degradaci hDlg nevedla (Gradiol *et al.*, 1999). Později Massimi *et al.* prokázali, že E6 způsobuje degradaci nejen hDlg, ale i dalších proteinů, např. hScrib (Scribble), MUPP1, MAGI-1. Dále bylo prokázáno, že proteiny hDlg, MUPP1 a MAGI-1 efektivně potlačují buněčnou transformaci. Z toho vyplývá, že virus tyto proteiny cílí k degradaci v proteazomu, aby mohl deregulací buněčného cyklu navodit podmínky vhodné pro svou vlastní replikaci (Massimi *et al.*, 2004).

Další HPV onkoprotein E7 dereguluje buněčný cyklus přímou interakcí s pRB. V roce 1996 bylo zjištěno, že se E7 onkoprotein viru HPV typu 16 váže na hypofosforylovanou formu pRB a tím umožňuje transkripčnímu faktoru E2F konstitutivní aktivitu během celého buněčného cyklu. To vede k progresi buněčného cyklu a k nekontrolovanému buněčnému dělení (Boyer *et al.*, 1996). V roce 2007 byl poodhalen molekulární mechanismus degradace pRB v přítomnosti E7 onkoproteinu. Bylo zjištěno, že E7 se v buňce asociuje s enzymaticky aktivním komplexem ubikvitin ligázy obsahujícím Cullin 2. Při odstranění Cullinu 2 z komplexu došlo ke stabilizaci pRB v buňce, naopak při ektopické expresi Cullinu 2 a E7 byl pRB efektivně ubikvitinován a degradován v proteazomu (Huh *et al.*, 2007).

Několik různých mechanismů deregulace buněčného cyklu můžeme nalézt i u viru HCMV. Virový protein pp71 se stejně jako výše zmíněný HPV virový onkoprotein E7 váže na hypofosforylovaný pRB a další proteiny pRB rodiny - p107 a p130 a indukuje jejich proteazomální degradaci. Tak HCMV způsobuje aktivaci buněčného cyklu v klidových buňkách, čímž si zajistí vhodné podmínky pro vlastní replikaci (Kalejta *et al.*, 2003). Další virový protein pUL21a interaguje s APC komplexem (anaphase-promoting complex), což je E3 ubikvitin-ligáza odpovědná za ubikvitinaci a proteazomální degradaci mnoha regulačních proteinů uplatňujících se v buněčném cyklu. Virový protein pUL21a se navazuje na APC a způsobuje degradaci jeho dvou podjednotek, APC4 a APC5. Degradace vede k rozvolnění celého APC komplexu. V tomto ději hraje roli i virová kináza pUL97, která fosforyluje koaktivátor APC, protein Cdh1. Souhra obou proteinů je nezbytná pro rozvrácení funkce APC komplexu a omezení jeho regulačních zásahů do buněčného cyklu (Tran *et al.*, 2010; Fehr *et al.*, 2012).

Virus hepatitidy B (HBV) z čeledi Hepadnaviridae ovlivňuje buněčný cyklus expresí proteinu HBx (X protein of hepatitis B virus). Tento protein interakcemi s regulátory buněčného cyklu přispívá ke vzniku hepatocelulárního karcinomu. Bylo prokázáno, že HBx interaguje s cyklin E/A - cdk komplexem, stabilizuje ho a způsobuje zvýšenou aktivitu cyklin dependentní kinázy 2 (cdk2). Vznik interakce HBx s cyklin E/A-cdk2 komplexem závisí i na spolupráci se Src kinázami. Nadměrná aktivita cdk2 pak vede k proteazomální degradaci proteinu $p27^{Kip}$ (inhibitoru cdk) a k progresi buněčného cyklu (Mukherji *et al.*, 2007). Degradaci $p27^{Kip}$ způsobuje i KSHV virus prostřednictvím interakce virem kódovaného homologu cyklinu a buněčné cyklin dependentní kinázy 6 (cdk6).

Inhibitor cdk protein $p27^{Kip}$ je pomocí cdk6 fosforylován blízko svého C-konce, čímž je destabilizován a následně dochází k jeho degradaci v proteazomu (Ellis *et al.*, 1999).

6. Úloha proteazomů v rozbalování virionů a jejich transportu

Jako důkaz potřebnosti proteazomů při vstupu viru KSHV do endotelových buněk může sloužit experiment, který provedli Greene *et al.* v roce 2012. Přidání proteazomálních inhibitorů MG132 a epoxomycinu k virem infikovaným endotelovým buňkám nemělo vliv na přichycení viru k povrchu hostitelských buněk, ale výrazně snížilo množství virových partikulí v cytoplazmě a v jádře. Dalšími pokusy bylo prokázáno, že kvůli inhibici proteazomů nedocházelo k maturaci časných endozomů s viriony a ty se tam hromadily. Zároveň nefunkčnost proteazomů vedla k hromadění virových partikulí na povrchu cytoplazmatické membrány a byl výrazně omezen transport virionů do jádra buňek. Důležitou roli v těchto procesech hraje i ubikvitinace. Povrchový integrinový receptor β1, na který se navazují viriony KSHV, je internalizován, pokud je ubikvitinován. Jeho ubikvitinaci má na starosti E3 ubikvitin-ligáza c-Cbl, která je aktivována Src kinázami. V experimentu bylo pozorováno, že až 70 % virových partikulí bylo v cytoplazmě asociováno právě s c-Cbl ubikvitin-ligázou. S virovými partikulemi jsou také asociovány dva proteiny - Epsin a Eps15, které napomáhají zabalování clathrinových váčků kolem ubikvitinovaných virionů či jejich receptorů a následné internalizaci. Inhibice proteazomů má za následek hromadění polyubikvitinovaných proteinů v cytoplazmě a vyčerpání volného ubikvitinu. Integrin β1 a popřípadě viriony nemohou pak být na povrchu buněk ubikvitinovány a jejich internalizace je zastavena (Greene *et al.*, 2012).

Dalším herpesvirem využívajícím proteazomy ke vstupu do buňky a transportu v ní, je HSV. Ve svém tegumentu nese tento virus časný protein ICP0 s E3 ubikvitin-ligázovou aktivitou. Ihned po vstupu kapsidy do buňky interaguje ICP0 s buněčnými proteazomy a usnadňuje vstup viru do buňky. Vstup HSV do buňky je vícekrokový děj končící vypuštěním virové DNA do buněčného jádra, proteazomy ho ovlivňují ve fázi po vstupu kapsidy do cytoplazmy ale před jejím transportem k jádru. Virovým partikulím s ICP0 v tegumentu nebylo umožněno efektivně vstoupit do buněk, na které byly aplikovány proteazomální inhibitory. Viriony, které v tegumentu nenesly ICP0, nebyly inhibicí proteazomů ovlivněny a vstupovaly do buňky na proteazomu nezávislým mechanismem. Zároveň bylo zjištěno, že ICP0 zastává po vstupu viru do buňky funkci ve směřování virionů k jádru. Viriony s mutovaným ICP0 nebo viriony, které ICP0 neobsahovaly, byly defektní ve směřování k jádru a jejich rozmístění v cytoplazmě bylo víceméně náhodné (Delboy *et al.*, 2008; Delboy & Nicola, 2011).

Adenoviry si ve virionu nesou vnitřní kapsidový protein VI, který se ihned po přichycení viru k hostitelské buňce vystaví na povrch kapsidy. V proteinu VI můžeme nalézt tzv. PPxY motiv (prolin-prolin-x-tyrozin) se kterým v cytoplazmě interaguje buněčná E3 ubikvitin-ligáza Nedd4. Ta pak způsobuje ubikvitinaci proteinu VI, což vede k částečnému rozvolnění virové kapsidy a usnadnění transportu virionů po mikrotubulech k buněčnému jádru. Přestože je pro tento děj ubikvitinace zřejmě

nezbytná, v experimentu nebyla zkoumána role proteazomů. Objasnění jejich úlohy v adenovirovém vstupu a transportu by mohlo přispět k vývoji antivirové terapie (Wodrich *et al.*, 2010).

Metodou RNAi umlčování genů se podařilo objevit molekulární mechanismus rozbalování virionu poxviru VACV. Bylo zjištěno, že viry využívají ubikvitinačně proteazomální systém velmi zajímavým a neotřelým způsobem. Viriony vstupující do hostitelské buňky mají totiž již ubikvitinované obalové proteiny. Po vstupu do cytoplazmy jsou tyto proteiny proteazomálně degradovány, čímž dojde k částečnému rozvolnění kapsidy. K iniciaci virové replikace je ale nutná interakce virové DNA s Cullin 3 a Rbx1 obsahující E3 ubikvitin-ligázou (Mercer *et al.*, 2012).

Mezi viry s jednovláknovým DNA genomem využívající proteazomy při transportu v buňce patří i parvovirus MVM (Minute virus of mice). V pokusu byly porovnávány dvě různé buněčné linie infikované MVM a vždy s přidaným proteazomálním inhibitorem MG132 a bez inhibitoru. Celý proces vstupu viru do buněk se v obou liniích shodoval, až do okamžiku, kdy mělo dojít ke vstupu virionů do jádra. V obou liniích s MG132 se viriony pouze hromadily v perinukleárním prostoru a s nerozvolněnou kapsidou nebyly schopné do jádra vstoupit. Naopak v buňkách s funkčními proteazomy DNA z virionů do jádra normálně vstupovala. Po odmytí MG132 se funkce proteazomů obnovila, došlo k normálnímu rozvolnění kapsid a ke vstupu virové DNA do jádra. Z toho vyplývá nezbytnost proteazomů při vstupu MVM do jádra, přesto není molekulární podstata jejich působení objasněna. V experimentu totiž bylo prokázáno, že virové kapsidy nejsou po celou dobu transportu ani ubikvitinovány ani proteazomálně degradovány (Ros & Kempf, 2004).

Opačný efekt má inhibice proteazomů na nepatogenní lidský parvovirus AAV (Adeno-associated virus). Bylo zjištěno, že po vstupu do buněk se hromadí AAV v časných endozomech. Rozbalování virionů a jejich transport do jádra je však účinnější v nižším pH pozdních endozomů až lysozomů. Než však časný endozom s AAV stihne maturovat až do pozdního endozomu, velká část virionů je vypuštěna do cytoplazmy a degradována proteazomy. Inhibitor proteazomů MG132 však umožňuje maturaci endozomů i s AAV viriony a ty jsou pak 50 - 70 krát rychleji, v závislosti na buněčném typu, transportovány k buněčnému jádru. Tento efekt MG132 na rychlost transportu AAV do jádra by mohl být využit při vnášení terapeutických genů pomocí AAV-odvozených vektorů v klinické praxi (Douar *et al.*, 2001).

Závěr

Ubikvitinačně-proteazomální systém hraje při virové infekci důležitou roli. Z poznatků o DNA virech shrnutých v této práci vyplývá, že bez funkčních proteazomů a ubikvitin-konjugační kaskády by některé procesy vůbec nemohly proběhnout. Při úniku DNA virů imunitnímu systému se proteazomy uplatňují např. při redukci MHC I na povrchu buněk infikovaných HCMV, Myší herpesvirus - 68 či BHV1 využívají proteazomy k degradaci TAP, čímž zamezují prezentaci antigenů na MHC I. Díky proteazomální degradaci proteinů IRF3, IRF7 a STAT2 mohou například viry BHV1, KSHV a MCMV uniknout interferonové odpovědi, degradace adaptorových proteinů TLR2 receptoru zase přerušuje aktivaci zánětlivé odpovědi proti viru HSV-1. Virus HSV-1 také v boji s imunitním sytémem využívá proteazomální degradaci ke zpomalení pohybu dendritických buněk.

Při replikaci DNA virů dochází interakcemi s E3 ubikvitn-ligázami k proteazomální degradaci mnoha buněčných proteinů. Například proteiny PML, Sp100 a Daxx, které jsou součástí ND10 jaderných domén a vykazují antivirovou aktivitu, jsou degradovány díky interakci proteazomů s herpesviry HSV-1 a HCMV. Proteazomální degradace buněčných onkoproteinů Mdm2 a Mdm4 zase podporuje expresi adenovirových genů, inhibice proteazomů či degradace některých komponent E3 ubikvitin-ligázového komplexu má fatální vliv na replikaci viru VACV. Z rostlinných virů můžeme jmenovat např. virus BSCTV, jehož protein C2 zastavuje degradaci buněčné SAMDC1 dekarboxylázy, čímž maří methylaci DNA i s ní spojené umlčování virových genů a napomáhá vlastní efektivní replikaci.

Viry také interagují s ubikvitin-konjugační kaskádou buněčných enzymů, modifikují je, mění jejich substrátovou specifitu nebo do nich zakomponovávají vlastní proteiny. Výsledkem je např. adenovirem způsobená degradace DNA ligázy IV a proteinu p53 či kontrola exportu mRNA, polyomavirem SV40 způsobené snížení rychlosti degradace cyklinu E. U viru HSV-1 tyto interakce napomáhají ustavení latentní infekce v neuronech, naopak pro EBV virus jsou interakce s ubikvitin-ligázami důležité pro reaktivaci viru z latence. Byly popsány i virem kódované ubikvitin-ligázy, jejichž substráty pro ubikvitinaci zatím nebyly nalezeny, např. u viru VACV. Interakce s ubikvitin-ligázami byly objeveny i u některých rostlinných DNA virů, jedná se např. různé viry z čeledi *Gemniviridae* či nanovirus FBNYV.

Proteazomální degradaci viry uplatňují i při dalších dějích, jako je např. inhibice apoptózy, deregulace buněčného cyklu nebo vstup virionů do buněk a jejich následný transport v buňce. Ačkoliv je již popsáno mnoho dějů, kdy se proteazomální systém uplatňuje při virové infekci, mnoho z nich není zcela objasněných. Nad molekulárními mechanismy některých jevů visí otazníky a trpělivě vyčkávají na své odhalení. Studium těchto jevů by výrazně pomohlo pochopit životní strategie virů, což by následně bylo možné využít při navrhování a aplikaci antivirové terapie nebo při ochraně zemědělských plodin před škůdci virového původu. Úloha proteazomů v životě virů je velmi zajímavé a široké téma, které skýtá mnoho neprobádaných zákoutí a nezodpovězených otázek.

Seznam použité literatury

Abele, R., and Tampé, R. (2004). The ABCs of Immunology: Structure and Function of TAP, the Transporter Associated with Antigen Processing. Physiology 19, 216–224.

Alcaide-Loridan, C., and Jupin, I. (2012). Ubiquitin and Plant Viruses, Let's Play Together! Plant Physiol. 160, 72–82.

Amici, C. (2001). Activation of Ikappa B Kinase by Herpes Simplex Virus Type 1. A Novel Target For Anti-Herpetic Therapy. Journal of Biological Chemistry 276, 28759–28766.

Aronson, M.N., Meyer, A.D., Gyorgyey, J., Katul, L., Vetten, H.J., Gronenborn, B., and Timchenko, T. (2000). Clink, a Nanovirus-Encoded Protein, Binds both pRB and SKP1. Journal of Virology 74, 2967–2972.

Baker, A., Rohleder, K.J., Hanakahi, L.A., and Ketner, G. (2007). Adenovirus E4 34k and E1b 55k Oncoproteins Target Host DNA Ligase IV for Proteasomal Degradation. Journal of Virology 81, 7034–7040.

Barel, M.T., Hassink, G.C., Voorden, S. van, and Wiertz, E.J.H.. (2006). Human cytomegalovirus-encoded US2 and US11 target unassembled MHC class I heavy chains for degradation. Molecular Immunology 43, 1258–1266.

Baumeister, W., Walz, J., Zühl, F., and Seemüller, E. (1998). The Proteasome: Paradigm of a Self-Compartmentalizing Protease. Cell 92, 367–380.

Blanchette, P., Cheng, C.Y., Yan, Q., Ketner, G., Ornelles, D.A., Dobner, T., Conaway, R.C., Conaway, J.W., and Branton, P.E. (2004). Both BC-Box Motifs of Adenovirus Protein E4orf6 Are Required To Efficiently Assemble an E3 Ligase Complex That Degrades p53. Mol. Cell. Biol. 24, 9619–9629.

Blanchette, P., Kindsmuller, K., Groitl, P., Dallaire, F., Speiseder, T., Branton, P.E., and Dobner, T. (2008). Control of mRNA Export by Adenovirus E4orf6 and E1B55K Proteins during Productive Infection Requires E4orf6 Ubiquitin Ligase Activity. Journal of Virology 82, 2642–2651.

Boname, J.M., de Lima, B.D., Lehner, P.J., and Stevenson, P.G. (2004). Viral Degradation of the MHC Class I Peptide Loading Complex. Immunity 20, 305–317.

Boyer, S.N., Wazer, D.E., and Band, V. (1996). E7 protein of human papilloma virus-16 induces degradation of retinoblastoma protein through the ubiquitin-proteasome pathway. Cancer Res. 56, 4620–4624.

Cantrell, S.R., and Bresnahan, W.A. (2005). Interaction between the Human Cytomegalovirus UL82 Gene Product (pp71) and hDaxx Regulates Immediate-Early Gene Expression and Viral Replication. Journal of Virology 79, 7792–7802.

Cella, M., Sallusto, F., and Lanzavecchia, A. (1997). Origin, maturation and antigen presenting function of dendritic cells. Current Opinion in Immunology 9, 10–16.

Chee, A.V., Lopez, P., Pandolfi, P.P., and Roizman, B. (2003). Promyelocytic Leukemia Protein Mediates Interferon-Based Anti-Herpes Simplex Virus 1 Effects. Journal of Virology 77, 7101–7105.

Corbin-Lickfett, K.A., and Bridge, E. (2003). Adenovirus E4-34kDa requires active proteasomes to promote late gene expression. Virology 315, 234–244.

Delboy, M.G., and Nicola, A.V. (2011). A Pre-Immediate-Early Role for Tegument ICP0 in the Proteasome-Dependent Entry of Herpes Simplex Virus. J Virol 85, 5910–5918.

Delboy, M.G., Roller, D.G., and Nicola, A.V. (2008). Cellular Proteasome Activity Facilitates Herpes Simplex Virus Entry at a Postpenetration Step. J. Virol. 82, 3381–3390.

Dellaire, G., and Bazett-Jones, D.P. (2004). PML nuclear bodies: dynamic sensors of DNA damage and cellular stress. BioEssays 26, 963–977.

Ding, W., Zhang, L., Yan, Z., and Engelhardt, J.F. (2005). Intracellular trafficking of adeno-associated viral vectors. Gene Ther. 12, 873–880.

Eini, O., Dogra, S., Selth, L.A., Dry, I.B., Randles, J.W., and Rezaian, M.A. (2009). Interaction with a Host Ubiquitin-Conjugating Enzyme Is Required for the Pathogenicity of a Geminiviral DNA β Satellite. Molecular Plant-Microbe Interactions 22, 737–746.

Ellis, M., Chew, Y.P., Fallis, L., Freddersdorf, S., Boshoff, C., Weiss, R.A., Lu, X., and Mittnacht, S. (1999). Degradation of p27(Kip) cdk inhibitor triggered by Kaposi's sarcoma virus cyclin-cdk6 complex. EMBO J. 18, 644–653.

Eom, C.-Y., and Lehman, R.I. (2003). Replication-initiator protein (UL9) of the herpes simplex virus 1 binds NFB42 and is degraded via the ubiquitin-proteasome pathway. Proceedings of the National Academy of Sciences 100, 9803–9807.

Everett, R.D., Orr, A., and Preston, C.M. (1998). A viral activator of gene expression functions via the ubiquitin–proteasome pathway. EMBO J 17, 7161–7169.

Fehr, A.R., Gualberto, N.C., Savaryn, J.P., Terhune, S.S., and Yu, D. (2012). Proteasome-Dependent Disruption of the E3 Ubiquitin Ligase Anaphase-Promoting Complex by HCMV Protein pUL21a. PLoS Pathog 8, e1002789.

Feng, P., Scott, C.W., Cho, N.-H., Nakamura, H., Chung, Y.-H., Monteiro, M.J., and Jung, J.U. (2004). Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus K7 Protein Targets a Ubiquitin-Like/Ubiquitin-Associated Domain-Containing Protein To Promote Protein Degradation. Mol. Cell. Biol. 24, 3938–3948.

Francoz, S., Froment, P., Bogaerts, S., De Clerq, S., Maetens, M., Doumont, G., Bellefroid, E., and Marine, J.-C. (2006). Mdm4 and Mdm2 cooperate to inhibit p53 activity in proliferating and quiescent cells in vivo. Proceedings of the National Academy of Sciences 103, 3232–3237.

La Frazia, S., Amici, C., and Santoro, G. (2006). Antiviral activity of proteasome inhibitors in herpes simplex virus-1 infection: role of nuclear factor-kappaB. Antiviral Therapy 995–1004.

Gardiol, D., Kühne, C., Glaunsinger, B., Lee, S.S., Javier, R., and Banks, L. (1999). Oncogenic human papillomavirus E6 proteins target the discs large tumour suppressor for proteasome-mediated degradation. Oncogene 18, 5487-5496.

Green, M.C., Monser, K.P., and Clem, R.J. (2004). Ubiquitin protein ligase activity of the anti-apoptotic baculovirus protein Op-IAP3. Virus Research 105, 89–96.

Greene, W., Zhang, W., He, M., Witt, C., Ye, F., and Gao, S.-J. (2012). The Ubiquitin/Proteasome System Mediates Entry and Endosomal Trafficking of Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus in Endothelial Cells. PLoS Pathog 8, e1002703.

Gu, H., and 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, 8963–8968.

Hammer, D., Wild, J., Ludwig, C., Asbach, B., Notka, F., and Wagner, R. (2008). Fusion of Epstein-Barr Virus Nuclear Antigen-1-Derived Glycine–Alanine Repeat to Trans-Dominant HIV-1 Gag Increases Inhibitory Activities and Survival of Transduced Cells In Vivo. Human Gene Therapy 19, 622–634.

Harada, J.N., Shevchenko, A., Shevchenko, A., Pallas, D.C., and Berk, A.J. (2002). Analysis of the Adenovirus E1B-55K-Anchored Proteome Reveals Its Link to Ubiquitination Machinery. Journal of Virology 76, 9194–9206.

Haupt, Y., Maya, R., Kazaz, A., and Oren, M. (1997). Mdm2 promotes the rapid degradation of p53. Nature 387, 296–299.

Hawley-Nelson, P., Vousden, K.H., Hubbert, N.L., Lowy, D.R., and Schiller, J.T. (1989). HPV16 E6 and E7 proteins cooperate to immortalize human foreskin keratinocytes. EMBO J 8, 3905–3910.

Hořejší, V., a Bartůňková, J. (2009). MHC glykoproteiny - prezentace peptidových fragmentů. In Základy imunologie, (Praha: Triton), pp. 72–80.

Huang, J., Huang, Q., Xiulan, Z., Shen, M.M., Yen, A., Yu, S.X., Dong, G.Q., Qu, K., Hunag, P., Anderson, E.M., et al. (2004). The Poxvirus p28 Virulence Factor Is an E3 Ubiquitin Ligase. Journal of Biological Chemistry 279, 54110–54116.

Huh, K., Zhou, X., Hayakawa, H., Cho, J.-Y., Libermann, T.A., Jin, J., Wade Harper, J., and Munger, K. (2007). Human Papillomavirus Type 16 E7 Oncoprotein Associates with the Cullin 2 Ubiquitin Ligase Complex, Which Contributes to Degradation of the Retinoblastoma Tumor Suppressor. J Virol 81, 9737–9747.

Hwang, J., and Kalejta, R.F. (2007). Proteasome-dependent, ubiquitin-independent degradation of Daxx by the viral pp71 protein in human cytomegalovirus-infected cells. Virology 367, 334–338.

Imai, N., Matsuda, N., Tanaka, K., Nakano, A., Matsumoto, S., and Kang, W. (2003). Ubiquitin Ligase Activities of Bombyx mori Nucleopolyhedrovirus RING Finger Proteins. Journal of Virology 77, 923–930.

Isobe, T., Hattori, T., Kitagawa, K., Uchida, C., Kotake, Y., Kosugi, I., Oda, T., and Kitagawa, M. (2009). Adenovirus E1A Inhibits SCFFbw7 Ubiquitin Ligase. Journal of Biological Chemistry 284, 27766–27779.

Jariel-Encontre, I., Pariat, M., Martin, F., Carillo, S., Salvat, C., and Piechaczyk, M. (1995). Ubiquitinylation is not an absolute requirement for degradation of c- Jun protein by the 26 S proteasome. J. Biol. Chem. 270, 11623–11627.

Jha, S., Vande Pol, S., Banerjee, N.S., Dutta, A.B., Chow, L.T., and Dutta, A. (2010). Destabilization of TIP60 by human papillomavirus E6 results in attenuation of TIP60-dependent transcriptional regulation and apoptotic pathway. Mol. Cell 38, 700–711.

Kalejta, R.F., Bechtel, J.T., and Shenk, T. (2003). Human Cytomegalovirus pp71 Stimulates Cell Cycle Progression by Inducing the Proteasome-Dependent Degradation of the Retinoblastoma Family of Tumor Suppressors. Mol Cell Biol 23, 1885–1895.

Kaspari, M., Tavalai, N., Stamminger, T., Zimmermann, A., Schilf, R., and Bogner, E. (2008). Proteasome inhibitor MG132 blocks viral DNA replication and assembly of human cytomegalovirus. FEBS Letters 582, 666–672.

Kelly, C., Van Driel, R., and Wilkinson, G.W.G. (1995). Disruption of PML-associated nuclear bodies during human cytomegalovirus infection. Journal of General Virology 76, 2887–2893.

Kikkert, M., Hassink, G., Barel, M., Hirsch, C., van der Wal, F.J., and Wiertz, E. (2001). Ubiquitination is essential for human cytomegalovirus US11-mediated dislocation of MHC class I molecules from the endoplasmic reticulum to the cytosol. Biochem J 358, 369–377.

Kloetzel, P.-M. (2001). Antigen processing by the proteasome. Nat Rev Mol Cell Biol 2, 179–188.

Koppers-Lalic, D., Reits, E.A.J., Ressing, M.E., Lipinska, A.D., Abele, R., Koch, J., Rezende, M.M., Admiraal, P., Leeuwen, D. van, Bienkowska-Szewczyk, K., et al. (2005). Varicelloviruses avoid T cell recognition by UL49.5-mediated inactivation of the transporter associated with antigen processing. PNAS 102, 5144–5149.

Kurepa, J., and Smalle, J.A. (2008). Structure, function and regulation of plant proteasomes. Biochimie 90, 324–335.

Ladelfa, M.F., Kotsias, F., Del Médico Zajac, M.P., Van den Broeke, C., Favoreel, H., Romera, S.A., and Calamante, G. (2011). Effect of the US3 protein of bovine herpesvirus 5 on the actin cytoskeleton and apoptosis. Vet. Microbiol. 153, 361–366.

Lai, J., Chen, H., Teng, K., Zhao, Q., Zhang, Z., Li, Y., Liang, L., Xia, R., Wu, Y., Guo, H., et al. (2009). RKP, a RING finger E3 ligase induced by BSCTV C4 protein, affects geminivirus infection by regulation of the plant cell cycle. The Plant Journal 57, 905–917.

Lee, H.-J., and Zheng, J.J. (2010). PDZ domains and their binding partners: structure, specificity, and modification. Cell Communication and Signaling 8, 8.

Lee, H.-R., Toth, Z., Shin, Y.C., Lee, J.-S., Chang, H., Gu, W., Oh, T.-K., Kim, M.H., and Jung, J.U. (2009). Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus Viral Interferon Regulatory Factor 4 Targets MDM2 To Deregulate the p53 Tumor Suppressor Pathway. J. Virol. 83, 6739–6747.

Lee, S.-O., Hwang, S., Park, J., Park, B., Jin, B.-S., Lee, S., Kim, E., Cho, S., Kim, Y., Cho, K., et al. (2005). Functional dissection of HCMV US11 in mediating the degradation of MHC class I molecules. Biochemical and Biophysical Research Communications 330, 1262–1267.

Levitskaya, J., Sharipo, A., Leonchiks, A., Ciechanover, A., and Masucci, M.G. (1997). Inhibition of ubiquitin/proteasome-dependent protein degradation by the Gly-Ala repeat domain of the Epstein–Barr virus nuclear antigen 1. PNAS 94, 12616–12621.

Van Lint, A.L., Murawski, M.R., Goodbody, R.E., Severa, M., Fitzgerald, K.A., Finberg, R.W., Knipe, D.M., and Kurt-Jones, E.A. (2010). Herpes Simplex Virus Immediate-Early ICP0 Protein Inhibits Toll-Like Receptor 2-Dependent Inflammatory Responses and NF- B Signaling. Journal of Virology 84, 10802–10811.

Lozano-Duran, R., and Bejarano, E.R. (2011). Geminivirus C2 protein might be the key player for geminiviral co-option of SCF-mediated ubiquitination. Plant Signaling & Behavior 6, 999–1001.

Lozano-Duran, R., Rosas-Diaz, T., Gusmaroli, G., Luna, A.P., Taconnat, L., Deng, X.W., and Bejarano, E.R. (2011). Geminiviruses Subvert Ubiquitination by Altering CSN-Mediated Derubylation of SCF E3 Ligase Complexes and Inhibit Jasmonate Signaling in Arabidopsis thaliana. The Plant Cell 23, 1014–1032.

Lybarger, L., Wang, X., Harris, M.R., Virgin, H.W., and Hansen, T.H. (2003). Virus Subversion of the MHC Class I Peptide-Loading Complex. Immunity 18, 121–130.

Massimi, P., Gammoh, N., Thomas, M., and Banks, L. (2004). HPV E6 specifically targets different cellular pools of its PDZ domain-containing tumour suppressor substrates for proteasome-mediated degradation. Oncogene 23, 8033–8039.

Maul, G.G., Guldner, H.H., and Spivack, J.G. (1993). Modification of discrete nuclear domains induced by herpes simplex virus type 1 immediate early gene 1 product (ICP0). Journal of General Virology 74, 2679–2690.

Mercer, J., Snijder, B., Sacher, R., Burkard, C., Bleck, C.K.E., Stahlberg, H., Pelkmans, L., and Helenius, A. (2012). RNAi Screening Reveals Proteasome- and Cullin3-Dependent Stages in Vaccinia Virus Infection. Cell Reports 2, 1036–1047.

Miller, D.M., Rahill, B.M., Boss, J.M., Lairmore, M.D., Durbin, J.E., Waldman, J.W., and Sedmak, D.D. (1998). Human Cytomegalovirus Inhibits Major Histocompatibility Complex Class II Expression By Disruption of the Jak/Stat Pathway. J Exp Med 187, 675–683.

Mossman, K.L., Saffran, H.A., and Smiley, J.R. (2000). Herpes Simplex Virus ICP0 Mutants Are Hypersensitive to Interferon. J. Virol. 74, 2052–2056.

Mukherji, A., Janbandhu, V.C., and Kumar, V. (2007). HBx-dependent cell cycle deregulation involves interaction with cyclin E/A-cdk2 complex and destabilization of p27Kip1. Biochem. J. 401, 247–256.

Nagel, C.-H., Albrecht, N., Milovic-Holm, K., Mariyanna, L., Keyser, B., Abel, B., Weseloh, B., Hofmann, T.G., Eibl, M.M., and Hauber, J. (2011). Herpes Simplex Virus Immediate-Early Protein ICP0 Is Targeted by SIAH-1 for Proteasomal Degradation. Journal of Virology 85, 7644–7657.

Negorev, D., and Maul, G.G. (2001). Cellular proteins localized at and interacting within ND10/PML nuclear bodies/PODs suggest functions of a nuclear depot. Oncogene 20, 7234-7242.

Negorev, D.G., Vladimirova, O.V., Ivanov, A., Rauscher, F., and Maul, G.G. (2006). Differential Role of Sp100 Isoforms in Interferon-Mediated Repression of Herpes Simplex Virus Type 1 Immediate-Early Protein Expression. Journal of Virology 80, 8019–8029.

Oh, J.-M., Kim, S.-H., Cho, E.-A., Song, Y.-S., Kim, W.-H., and Juhnn, Y.-S. (2010). Human papillomavirus type 16 E5 protein inhibits hydrogen-peroxide-induced apoptosis by stimulating ubiquitin-proteasome-mediated degradation of Bax in human cervical cancer cells. Carcinogenesis 31, 402–410.

Pilder, S., Moore, M., Logan, J., and Shenk, T. (1986). The adenovirus E1B-55K transforming polypeptide modulates transport or cytoplasmic stabilization of viral and host cell mRNAs. Mol. Cell. Biol. 6, 470–476.

Pollard, T.D. (2008). Degradation of celluar components. In Cell Biology, (Philadelphia: Saunders/Elsevier), pp. 409–427.

Prösch, S., Priemer, C., Höflich, C., Liebenthal, C., Babel, N., Krüger, D.H., and Volk, H.-D. (2003) Proteasome inhibitors: a novel tool to suppress human cytomegalovirus replication and virus-induced immune modulation. Antiviral Therapy 8, 555–567.

Querido, E., Blanchette, P., Yan, Q., Kamura, T., Morrison, M., Boivin, D., Kaelin, W.G., Conaway, R.C., Conaway, J.W., and Branton, P.E. (2001). Degradation of p53 by adenovirus E4orf6 and E1B55K proteins occurs via a novel mechanism involving a Cullin-containing complex. Genes Dev. 15, 3104–3117.

Ros, C., and Kempf, C. (2004). The ubiquitin–proteasome machinery is essential for nuclear translocation of incoming minute virus of mice. Virology 324, 350–360.

Saffert, R.T., and 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, 3863–3871.

Saira, K., Zhou, Y., and Jones, C. (2007). The Infected Cell Protein 0 Encoded by Bovine Herpesvirus 1 (bICP0) Induces Degradation of Interferon Response Factor 3 and, Consequently, Inhibits Beta Interferon Promoter Activity. Journal of Virology 81, 3077–3086.

Saridakis, V., Sheng, Y., Sarkari, F., Holowaty, M.N., Shire, K., Nguyen, T., Zhang, R.G., Liao, J., Lee, W., Edwards, A.M., et al. (2005). Structure of the p53 binding domain of HAUSP/USP7 bound to Epstein-Barr nuclear antigen 1 implications for EBV-mediated immortalization. Mol. Cell 18, 25–36.

Sarkari, F., Sanchez-Alcaraz, T., Wang, S., Holowaty, M.N., Sheng, Y., and Frappier, L. (2009). EBNA1-Mediated Recruitment of a Histone H2B Deubiquitylating Complex to the Epstein-Barr Virus Latent Origin of DNA Replication. PLoS Pathogens 5, e1000624.

Satheshkumar, P.S., Anton, L.C., Sanz, P., and Moss, B. (2009). Inhibition of the Ubiquitin-Proteasome System Prevents Vaccinia Virus DNA Replication and Expression of Intermediate and Late Genes. Journal of Virology 83, 2469–2479.

Shamu, C.E., Flierman, D., Ploegh, H.L., Rapoport, T.A., and Chau, V. (2001). Polyubiquitination Is Required for US11-dependent Movement of MHC Class I Heavy Chain from Endoplasmic Reticulum into Cytosol. Mol. Biol. Cell 12, 2546–2555.

Shin, Y.C., Nakamura, H., Liang, X., Feng, P., Chang, H., Kowalik, T.F., and Jung, J.U. (2006). Inhibition of the ATM/p53 Signal Transduction Pathway by Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus Interferon Regulatory Factor 1. J. Virol. 80, 2257–2266.

Smalle, J., and Vierstra, R.D. (2004). The Ubiquitin 26S Proteasome Proteolytic. Annual Review of Plant Biology 55, 555–590.

Takahashi, Y., Lallemand-Breitenbach, V., Zhu, J., and de Thé, H. (2004). PML nuclear bodies and apoptosis. Oncogene 23, 2819–2824.

Tavalai, N., and Stamminger, T. (2009). Interplay between Herpesvirus Infection and Host Defense by PML Nuclear Bodies. Viruses 1, 1240–1264.

Teale, A., Campbell, S., Van Buuren, N., Magee, W.C., Watmough, K., Couturier, B., Shipclark, R., and Barry, M. (2008). Orthopoxviruses Require a Functional Ubiquitin-Proteasome System for Productive Replication. Journal of Virology 83, 2099–2108.

Theodoridis, A.A., Eich, C., Figdor, C.G., and Steinkasserer, A. (2011). Infection of dendritic cells with herpes simplex virus type 1 induces rapid degradation of CYTIP, thereby modulating adhesion and migration. Blood 118, 107–115.

Tran, K., Mahr, J.A., and Spector, D.H. (2009). Proteasome Subunits Relocalize during Human Cytomegalovirus Infection, and Proteasome Activity Is Necessary for Efficient Viral Gene Transcription. Journal of Virology 84, 3079–3093.

Tran, K., Kamil, J.P., Coen, D.M., and Spector, D.H. (2010). Inactivation and Disassembly of the Anaphase-Promoting Complex during Human Cytomegalovirus Infection Is Associated with Degradation of the APC5 and APC4 Subunits and Does Not Require UL97-Mediated Phosphorylation of Cdh1. J Virol 84, 10832–10843.

Welcker, M., and Clurman, B.E. (2004). The SV40 Large T Antigen Contains a Decoy Phosphodegron That Mediates Its Interactions with Fbw7/hCdc4. Journal of Biological Chemistry 280, 7654–7658.

Wodrich, H., Henaff, D., Jammart, B., Segura-Morales, C., Seelmeir, S., Coux, O., Ruzsics, Z., Wiethoff, C.M., and Kremer, E.J. (2010). A Capsid-Encoded PPxY-Motif Facilitates Adenovirus Entry. PLoS Pathog 6, e1000808.

Yang, H., Zheng, Z., Zhao, L., Li, Q., and Liao, D. (2012). Downregulation of Mdm2 and Mdm4 enhances viral gene expression during adenovirus infection. Cell Cycle 11, 582–593.

Yewdell, J.W., Reits, E., and Neefjes, J. (2003). Making sense of mass destruction: quantitating MHC class I antigen presentation. Nature Reviews Immunology 3, 952–961.

Yu, Y., Wang, S.E., and Hayward, G.S. (2005). The KSHV Immediate-Early Transcription Factor RTA Encodes Ubiquitin E3 Ligase Activity that Targets IRF7 for Proteosome-Mediated Degradation. Immunity 22, 59–70.

Zhang, Z., Chen, H., Huang, X., Xia, R., Zhao, Q., Lai, J., Teng, K., Li, Y., Liang, L., Du, Q., et al. (2011). BSCTV C2 Attenuates the Degradation of SAMDC1 to Suppress DNA Methylation-Mediated Gene Silencing in Arabidopsis. The Plant Cell 23, 273–288.

Zhong, S., Salomoni, P., and Pandolfi, P.P. (2000). The transcriptional role of PML and the nuclear body. Nat Cell Biol 2, E85–E90.

Zimmermann, A., Trilling, M., Wagner, M., Wilborn, M., Bubic, I., Jonjic, S., Koszinowski, U., and Hengel, H. (2005). A cytomegaloviral protein reveals a dual role for STAT2 in IFN-γ signaling and antiviral responses. J Exp Med 201, 1543–1553.