

Univerzita Karlova

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: BIOLOGIE (B1501)

Studijní obor: BBI (1501R001)



Lucie Schreiberová

**Mývalí polyomavirus: příklad nebo výjimka při onkogenezi
způsobené polyomavirem?**

*Raccoon polyomavirus: example or exception of polyomavirus driven
oncogenesis?*

Bakalářská práce

Školitel: RNDr. Hana Španielová, Ph.D.

Konzultant: Mgr. Alžběta Sekavová

Praha 2018

Poděkování

Ráda bych touto formou poděkovala své školitelce RNDr. Haně Španielové, Ph.D. a konzultantce Mgr. Alžbětě Sekavové za jejich cenné rady, komentáře, nekonečnou trpělivost a neustálou podporu při psaní bakalářské práce a dále všem, kteří mě při psaní podporovali.

Prohlášení

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

V Praze, 8. 5. 2018

Podpis:

Abstrakt

Polyomaviry (PyV) jsou široce rozšířené jak v lidské tak zvířecí populaci a jsou spojené s asymptomatickou perzistentní infekcí. Ve výjimečných případech může infekce PyV způsobovat nádorovou transformaci. V indukovaných nádorech se genom PyV často vyskytuje integrovaný v genomu hostitele. V posledních pár letech byl u mývalů monitorován zvýšený počet velmi agresivních mozkových nádorů a nádorů čichového ústrojí. Tyto nádory jsou spojené s infekcí nově objeveným mývalím polyomavirem, který se v buňkách hostitele vyskytuje v episomální formě. Tato práce se proto soustředila na porovnání dostupných poznatků o mývalím polyomaviru s dosud popsány mechanismy tumorogeneze u PyV. Na rozdíl od ostatních PyV může u mývalího polyomaviru hrát klíčovou roli fakt, že s velkou pravděpodobností dochází k primární infekci nervových kmenových buněk. V nádorech dochází také k nebývale vysoké expresi virem kódované mikro RNA, která se zdá být zapojena do indukce tumorů. Stejně jako u ostatních nádorů způsobených PyV je v nádorech nalézáno velké množství časných virových proteinů s onkogenním potenciálem. Odhalení dosud neznámých faktorů zodpovědných za rozvoj nádorů způsobených mývalím polyomavirem může přispět k pochopení mechanismů onkogeneze.

Klíčová slova

Polyomavirus, onkogeneze, mýval severní, nádory mozku

Abstract

Polyomaviruses (PyV) are widespread through human and animal populations and typically associated with asymptomatic persistent infection. Rarely, natural PyV infections can lead to oncogenic transformation. Virus genome is usually integrated into the host DNA of tumour tissue. Over the past few years, an increased number of very aggressive brain tumours and olfactory tumours have been observed in raccoons. These tumours are associated with the newly discovered raccoon polyomavirus, which was found as an intact episome in host cells. This bachelor thesis is therefore focused on comparison of current state of knowledge on raccoon polyomavirus with previously described mechanisms of PyV tumorigenesis. Unlike for other PyVs, the fact that primary neuronal stem cell infection is most likely to occur can play a key role in raccoon polyomavirus driven oncogenesis. Tumours also exhibit unusually high expression of virus-encoded micro RNA that can be connected with tumour induction. Similarly to other tumours caused by PyV, a large amount of early viral proteins with oncogenic potential is found in tumours. Revealing unknown factors responsible for the development of tumours caused by raccoon polyomavirus may help in understanding of mechanisms of oncogenesis.

Key words

Polyomavirus, oncogenesis, raccoon (*Procyon lotor*), brain tumours

Obsah

| | |
|--|-----------|
| Seznam zkratk | 1 |
| 1 Úvod | 3 |
| 2 Čeleď Polyomaviridae | 3 |
| 2.1 Molekulární biologie čeledi <i>Polyomaviridae</i> | 4 |
| 2.1.1 Struktura virionu..... | 4 |
| 2.1.2 Genom | 4 |
| 2.1.3 Životní cyklus | 5 |
| 2.1.3.1 Vazba partikule a vstup viru do buňky | 5 |
| 2.1.3.2 Transkripce | 5 |
| 2.1.3.3 Replikace | 7 |
| 2.1.3.4 Sestavení a uvolnění partikulí z hostitelské buňky | 7 |
| 3 Onkogeneze způsobená polyomaviry | 7 |
| 3.1 Velký tumorogenní antigen | 9 |
| 3.1.1 Velký tumorogenní antigen a RB proteinová rodina | 11 |
| 3.1.2 Velký tumorogenní antigen a p53..... | 13 |
| 3.1.2.1 Růstový faktor prvního typu podobný inzulínu..... | 15 |
| 3.1.2.2 Acetylace velkého tumorogenního antigenu | 16 |
| 3.2 Middle tumor antigen | 16 |
| 3.3 Small tumor antigen | 18 |
| 3.4 miRNA čeledi Polyomaviridae | 18 |
| 4 Mývalí polyomavirus | 20 |
| 4.1 Molekulární biologie mývalího polyomaviru | 21 |
| 4.1.1 Struktura virionu..... | 21 |
| 4.1.2 Genom a fylogeneze | 22 |
| 4.2 Onkogeneze a mývalí polyomavirus | 25 |
| 4.3 Mývalí polyomavirus: příklad nebo výjimka? | 30 |
| 5 Závěr | 32 |
| 6 Seznam použité literatury | 33 |

Seznam zkratek

| | | |
|--------------------|--|--|
| AIDS | syndrom získaného selhání imunity | <i>acquired immune deficiency syndrome</i> |
| ALTO | alternativní antigen pro otevřený čtecí rámec velkého tumorogenního antigenu | <i>alternate to LT antigen open reading frame</i> |
| Asn | asparagin | <i>asparagine</i> |
| Asp | kyselina asparagová | <i>aspartic acid</i> |
| ATP | adenosintrifosfát | <i>adenosine triphosphate</i> |
| BKPyV | BK polyomavirus | <i>BK polyomavirus</i> |
| bp | pár bází | <i>base pair</i> |
| BRD4 | protein obsahující bromo-doménu typu 4 | <i>bromodomain-containing protein 4</i> |
| Bub1 | --- | <i>budding uninhibited by benzimidazoles 1</i> |
| CAHFS | Kalifornská laboratoř pro zdraví zvířat a bezpečnost potravin | <i>California Animal Health and Food Safety Laboratory</i> |
| CBP | CREB vazebný protein | <i>CREB binding protein</i> |
| CDK | cyklin-dependentní kinázy | <i>cyclin-dependent kinases</i> |
| CREB | protein vázající element cAMP | <i>cAMP response element-binding protein</i> |
| Cul7 | cullin 7 | <i>cullin 7</i> |
| Cys | cystein | <i>cysteine</i> |
| DAG | diacylglycerol | <i>diacylglycerol</i> |
| DDR | odpověď na DNA poškození | <i>DNA damage response</i> |
| DNA | deoxyribonukleová kyselina | <i>deoxyribonucleic acid</i> |
| dsDNA | dvouřetězcová DNA | <i>double-stranded DNA</i> |
| dsRNA | dvouřetězcová RNA | <i>double-stranded RNA</i> |
| FBW7 | F-box protein obsahující WD repetici typu 7 | <i>F-box/WD repeat-containing protein 7</i> |
| Glu | kyselina glutamová | <i>glutamic acid</i> |
| GTP | guanosin-5'-trifosfát | <i>guanosine-5'-triphosphate</i> |
| HaPyV | křeččí polyomavirus | <i>hamster polyomavirus</i> |
| HR | --- | <i>host range</i> |
| Hsc70 | protein teplotního šoku | <i>heat shock cognate 71 kDa protein</i> |
| Hsp70 | rodina proteinů teplotního šoku | <i>heat shock proteins 70</i> |
| ICTV | Mezinárodní komise pro taxonomii virů | <i>International Committee on Taxonomy of Viruses</i> |
| IGF-I | růstový faktor prvního typu podobný inzulínu | <i>insulin-like growth factor 1</i> |
| IGF-IR | receptor pro růstový faktor prvního typu podobný inzulínu | <i>insulin-like growth factor 1 receptor</i> |
| IP3 | inositoltrifosfát | <i>inositol trisphosphate</i> |
| IRS-1 | substrát pro inzulínový receptor 1 | <i>insuline receptor substrat 1</i> |
| JCPyV | JC polyomavirus | <i>JC polyomavirus</i> |
| Leu | leucin | <i>leucine</i> |
| LT-Ag | velký tumorogenní antigen | <i>large tumor antigen</i> |
| MAPK | mitogenem aktivovaná protein kinázová signální kaskáda | <i>mitogen-activated protein kinases</i> |
| MCPyV | polyomavirus Merkelových buněk | <i>Merkel cell polyomavirus</i> |
| Mdm2 | --- | <i>mouse double minute 2 homolog</i> |
| MEF | myší embryonální fibroblasty | <i>mouse embryonic fibroblast</i> |
| miRNA | mikro RNA | <i>micro RNA</i> |
| MPyV | myší polyomavirus | <i>mouse polyomavirus</i> |
| mRNA | mediátorová RNA | <i>messenger RNA</i> |
| mT-Ag | střední tumorogenní antigen | <i>middle tumor antigen</i> |
| mTOR | --- | <i>mammalian target of rapamycin</i> |
| MUR | MCPyV unikátní oblast | <i>MCPyV-Unique Region</i> |
| NCCR | nekódující kontrolní oblast | <i>noncoding control region</i> |
| NJ (metoda) | --- | <i>neighbour-joining method</i> |
| NLS | jaderná lokalizační sekvence | <i>nuclear localization signal</i> |
| OBD | ori vazebná doména | <i>ori binding domain</i> |
| ORF | otevřený čtecí rámec | <i>open reading frame</i> |

| | | |
|--------------------------------|--|---|
| ori | replikační počátek | <i>origin of replication</i> |
| p14^{ARF} | protein 14 alternativního čtecího rámce | <i>alternate reading frame protein 14</i> |
| p21^{WAF/CIP1} | inhibitor cyklin dependentních kináz 1 | <i>cyclin-dependent kinase inhibitor 1</i> |
| PCR | polymerázová řetězcová reakce | <i>polymerase chain reaction</i> |
| PI3K | fosfatidylinositol-3-kináza | <i>phosphoinositide 3-kinase</i> |
| PKB | protein kináza B | <i>protein kinase B</i> |
| PLCγ1 | fosfolipáza C, gamma 1 | <i>phospholipase C, gamma 1</i> |
| PP2A | protein fosfatáza 2A | <i>protein phosphatase 2A</i> |
| pRB | retinoblastomová proteinová rodina | <i>retinoblastoma protein family</i> |
| PTK | protein tyrozinové kinázy | <i>protein tyrosine kinases</i> |
| PyV | polyomavirus | <i>polyomavirus</i> |
| RacPyV | mývalí polyomavirus | <i>raccoon polyomavirus</i> |
| RCA | --- | <i>rolling circle amplification</i> |
| RISC | umlčovací komplex indukovaný RNA | <i>RNA-induced silencing complex</i> |
| RNA | ribonukleová kyselina | <i>ribonucleic acid</i> |
| RPA | replikační protein A | <i>replication protein A</i> |
| RSEM | RNA sekvencování pomocí očekávané maximalizace | <i>RNA-sequencing by expectation-maximization</i> |
| Ser | serin | <i>serin</i> |
| S-HML | lidské mezoteliální buňky transformované SV40 | <i>SV40-transformed mesothelial cell lines</i> |
| siRNA | malé interferující RNA | <i>small interfering RNA</i> |
| SIV | virus opičí imunodeficiency | <i>simian immunodeficiency virus</i> |
| sT-Ag | malý tumorogenní antigen | <i>small tumor antigen</i> |
| SV40 | simian virus 40 | <i>simian virus 40</i> |
| T-Ag | tumorogenní antigen(y) | <i>tumor antigen</i> |
| Thr | treonin | <i>threonin</i> |
| Vam6p | vakuolární protein morfogeneze typu 6 | <i>vacuolar morphogenesis protein 6</i> |
| VLP | viru podobné částice | <i>virus-like particles</i> |
| VP1, 2, 3, 4 | virový strukturní protein 1, 2, 3, 4 | <i>viral structural protein 1, 2, 3, 4</i> |

1 Úvod

Onkogenních virů se v přírodě vyskytuje mnoho. Mohou jimi být jak RNA, tak DNA viry. Z RNA virů mohou nádory u zvířat způsobovat některé viry z čeledi *Retroviridae*, které jsou schopné přepsat reverzní transkriptázou svou genetickou informaci do podoby DNA molekuly a pomocí integrázy ji zabudovat do genomu hostitelské buňky. Jako retrovirus s transformačním potenciálem u člověka lze uvést např. virus lidské T-buněčné leukémie. Z ostatních RNA virů se na rakovinném bujení u člověka může podílet i virus Hepatitidy C z čeledi *Flaviviridae*. Onkogenních virů obsahujících genetickou informaci v podobě molekuly DNA je více a náleží do několika čeledí: *Polyomaviridae*, *Papillomaviridae*, *Adenoviridae*, *Herpesviridae*, *Hepadnaviridae* a *Poxviridae*. V rámci této bakalářské práce se budu věnovat karcinogenezi, kterou mohou způsobovat zástupci z čeledi *Polyomaviridae*.

Cílem bakalářské práce je shrnout aktuální poznatky o karcinogenezi způsobené polyomaviry a porovnat její molekulární mechanismy s mechanismy karcinogeneze u nově objeveného mývalího polyomaviru. Mývalí polyomavirus se zdá být výjimečný mezi zástupci čeledi *Polyomaviridae* právě protože je původcem mozkových nádorů mývalů a může být polyomavirem způsobující rakovinné bujení v buňkách svého přirozeného hostitele.

2 Čeď Polyomaviridae

Čeď *Polyomaviridae* je skupina malých neobalených virů s genomem v podobě cirkulární dvouřetězcové molekuly DNA (dsDNA). Řadí se do I. třídy, viry s dsDNA genomem, dle Baltimorovy klasifikace. Podle zprávy Mezinárodní komise pro taxonomii virů (ICTV) z roku 2017 se čeď *Polyomaviridae* dělí na čtyři řády: *Alphapolyomavirus*, *Betapolyomavirus*, *Deltapolyomavirus* a *Gammapolyomavirus* (Moens *et al.* 2017a). Název polyomavirus (PyV) byl poprvé použit v roce 1958 pro myší polyomavirus (MPyV) objevený v roce 1953 a původně nazvaný *parotid agent* (angl.). Stewart *et al.* při dalším výzkumu zjistili, že se jedná o virus způsobující různé druhy nádorů u novorozených myší. Název je odvozený od řeckého slova *poly*, znamenající mnoho, a *oma*, jež znamená nádor (Stewart *et al.* 1958).

Po mnoho let byly PyV studovány jako model pro zkoumání buněčných procesů jako je DNA replikace, RNA transkripce nebo sestřih RNA či onkogenní transformace. PyV jsou široce rozšířené a jejich infekce je typicky asymptomatická nebo má mírný

průběh, vyjma jedinců s oslabenou imunitou, a často k ní dochází v dětském věku. K transformaci způsobené PyV dochází především v nepermissivních či semipermissivních buňkách organismů s oslabenou imunitní odpovědí, kde virus nemůže dokončit svůj životní cyklus.

2.1 Molekulární biologie čeledi *Polyomaviridae*

2.1.1 Struktura virionu

Viriony měří v průměru přibližně 40-45 nm. Čeď *Polyomaviridae* se vyznačuje virovou kapsidou s ikosahedrální symetrií, která obsahuje jednu kopii dsDNA. Kapsida je složena ze 72 kapsomer s triangulačním číslem $T=7$ (Rayment *et al.* 1982) a tvoří ji virové strukturní proteiny (VP). Majoritním kapsidovým proteinem je protein VP1, jehož C-konec spojuje kapsomery tvořené pěti monomery VP1 dohromady. N-konec proteinu VP1 interaguje s dsDNA genomem (Stehle *et al.* 1996; Ben-nun-Shaul *et al.* 2009). Mezi minoritní kapsidové proteiny čeledi *Polyomaviridae* patří proteiny VP2 a VP3 (Tooze 1980, citováno v Delos *et al.* 1995), které se vyskytují u většiny savčích PyV. Protein VP3 ale například u polyomaviru Merkelových buněk (MCPyV) nebyl detekován (Schowalter *et al.* 2013). U ptačích PyV byl navíc objeven i další minoritní kapsidový protein VP4 (Müller a Johne, 2001).

Ve virionu prototypických zástupců čeledi *Polyomaviridae* byly objeveny histony H2A, H2B, H3 a H4, které sbalují dsDNA molekulu do struktury nukleozomů (Frearson a Crawford 1972; Lake *et al.* 1973; Fang *et al.* 2010). Tyto proteiny byly nalezeny u opičího viru SV40 (simian virus, SV40), BK viru (BKPyV) a u MPyV. U dalších zástupců nebyla jejich přítomnost potvrzena, ale předpokládá se, že molekula DNA také zaujímá podobu nukleozomů (shrnutí v Moens *et al.* 2017b).

2.1.2 Genom

Genom čeledi *Polyomaviridae* je v průměru 5 000 párů bází (bp) velký a je rozdělen na tři oblasti: časná, pozdní a regulační. Časná oblast genomu je exprimována ještě před samotnou replikací, pozdní po replikaci. Regulační oblast, která je často nazývána nekódující kontrolní oblastí (NCCR), obsahuje replikační počátek a promotory pro časnou i pozdní oblast a fyzicky odděluje tyto oblasti od sebe. Zmíněné promotory se vzájemně překrývají společně s replikačním počátkem (shrnutí v Knipe a Howley 2013).

Každý PyV kóduje nejméně dva **časné geny**, ty po transkripci podléhají alternativnímu sestřihu a poté vznikají (nejméně) dva produkty, malý tumorogenní antigen (sT-Ag) a velký tumorogenní antigen (LT-Ag). U MPyV a křeččího polyomaviru (HaPyV) vzniká i třetí produkt, střední tumorogenní antigen (mT-Ag) (shrnutí v Knipe a Howley 2013; Habel 1965). Oblast genomu kódující **pozdní geny** je transkribována v opačném směru než časná oblast a pozdní geny také podléhají alternativnímu sestřihu. Pozdní geny u zástupců čeledi *Polyomaviridae* kódují výše zmíněné kapsidové proteiny VP1 a VP2, případně u některých zástupců VP3 a VP4 (shrnutí v Knipe a Howley 2013).

2.1.3 Životní cyklus

2.1.3.1 Vazba partikule a vstup viru do buňky

Prvotním krokem v životním cyklu viru je připojení se k hostitelské buňce tak, aby se virus nebo obsah virové partikule mohl dostat do buňky. Pro vazbu je stěžejní kapsidový protein VP1. Způsob, jakým se VP1 protein váže k hostitelské buňce, je jiný pro různé druhy savčích PyV. Typickou vazbou pro PyV je vazba VP1 na gangliosidy různých typů se sialovou kyselinou. Pro různé PyV je ale orientace vazby na kyselinu rozdílná (Neu *et al.* 2011). Viriony PyV se do buňky dostávají endocytózou. Pomocí endozomů jsou partikule transportovány až do endoplazmatického retikula, kde dojde k jejich rozbalení (shrnutí v Moens *et al.* 2017b). Po rozbalení následuje transport do jádra, jehož přesný mechanismus zatím není znám.

2.1.3.2 Transkripce

U PyV probíhá nejprve transkripce časných genů následována replikací a celý proces je zakončen transkripcí pozdních genů.

Transkripce časných genů je řízena promotorem pro časnou oblast, jehož součástí je kromě jiného i TATA kanonická sekvence (tzv. TATA box), která je důležitá pro vazbu hostitelské RNA polymerázy II. Promotor také obsahuje několik vazebných míst pro buněčné transkripční faktory. Produkty transkripce časných genů jsou proteiny LT-Ag a sT-Ag a případně další přídavné proteiny (shrnutí v Moens *et al.* 2017b).

Transkripce časných genů je regulována pomocí vznikajícího LT-Ag, který se váže do specifické sekvence 5'-GRGGC-3', jež se nachází v NCCR. Vazbou na specifickou sekvenci je LT-Ag schopen regulovat a přepínat transkripci časných genů na následnou replikaci a transkripci pozdních genů (Bochkareva *et al.* 2006; Dean *et al.* 1987; Deb a Tegtmeyer 1987). Při nízké koncentraci LT-Ag dochází k vazbě

pouze na vysoce afinitní LT-Ag vazebné motivy v NCCR oblasti a dochází tak k časně transkripci (Zuo a Mertz 1995). S rostoucí koncentrací LT-Ag dojde k obsazení i nízko afinitních vazebných motivů, které se nachází po proudu TATA boxu. Tímto způsobem dojde k zastavení buněčné RNA polymerázy II, protože nemůže dále syntetizovat RNA z důvodu blokace navázaným LT-Ag. Spuštěním replikace dojde ke zvýšení počtu genomových kopií, což vede k redukci obsazení pozdního promotoru buněčnými represory a LT-Ag může ve správném časovém úseku spolu s buněčnými transkripčními faktory interagovat s pozdním promotorem a spustit transkripci pozdních genů (shrnutí v Moens *et al.* 2017b; Zuo a Mertz 1995; Gruda *et al.* 1993; Dailey a Basilico 1985; Alwine *et al.* 1977).

Gen pro sT-Ag se v genomu částečně překrývá s LT-Ag. Překrývající částí je první exon LT-Ag. Tato oblast se označuje jako DnaJ doména (*kapitola 3.1*). Proteiny LT-Ag a sT-Ag tedy sdílí 75-80 aminokyselin na svém N-konci (shrnutí v DeCaprio a Garcea 2013). Při výzkumu sT-Ag byla dokumentována schopnost sT-Ag ovlivňovat replikaci DNA, kontrolovat přepnutí časně transkripce na pozdní (Bollag *et al.* 2010; Cicala *et al.* 1994; Berger a Wintersberger 1986) a také byl analyzován vliv sT-Ag při vstupu buňky hostitele do S-fáze buněčného cyklu (Ogris *et al.* 1992).

Při transkripci časných genů mohou u mnoha zástupců vznikat po translaci další přídatné proteiny např. u MPyV vzniká mT-Ag (Habel 1965) a u MCPyV a mývalího polyomaviru (RacPyV) je přítomen otevřený čtecí rámeček (ORF) kódující alternativní antigen pro otevřený čtecí rámeček LT-Ag (ALTO). ALTO se ale zdá být pro replikaci genomu RacPyV a MCPyV neesenciální (Pesavento *et al.* 2015; Carter *et al.* 2013).

Transkripce pozdních genů probíhá až po replikaci a to z vlákna, které je komplementární k tomu, jež kóduje geny pro časně proteiny, ale transkripce zde probíhá v opačném směru. Translací pozdních mRNA vznikají kapsidové proteiny VP1 a VP2, popřípadě VP3 a VP4 (shrnutí v Knipe a Howley 2013). U SV40, BKPyV a JC viru (JCPyV) byl ve směru proti proudu od VP1 lokalizován tzv. agnogen, který kóduje přibližně 70 aminokyselin dlouhý agnoprotein. Bylo zjištěno, že agnoprotein může mít u těchto virů vliv na transkripci, replikaci, vznik virionů a jejich uvolnění z buňky (Safak *et al.* 2001; Okada *et al.* 2001; Rinaldo *et al.* 1998; Jay *et al.* 1981).

Některé PyV kódují v pozdní oblasti genomu **mikro RNA (miRNA)** (*kapitola 3.4*), která je komplementární k LT-Ag mRNA. PyV kódující miRNA jsou např. SV40, JCPyV, BKPyV, MCPyV, MPyV a RacPyV (Chen *et al.* 2015; Seo *et al.* 2009; Sullivan *et al.* 2009; Seo *et al.* 2008; Sullivan *et al.* 2005).

2.1.3.3 Replikace

Replikace virového genomu probíhá v jádře, kam je virová dsDNA transportována z endoplazmatického retikula. Ke spuštění replikace je potřeba regulace pomocí LT-Ag, který se váže přímo do virového replikačního počátku (*ori*). LT-Ag funguje jako helikáza a rozvíjí dsDNA vlákno. LT-Ag také rekrutuje proteiny potřebné ke správnému průběhu replikace, kterými jsou replikační protein A (RPA), komplex DNA polymerázy, primázy a topoizomerázy I a II (shrnutí v Knipe a Howley 2013).

2.1.3.4 Sestavení a uvolnění partikulí z hostitelské buňky

Sestavení nových virionů je lokalizováno v jádře (Erickson *et al.* 2012; Roitman-Shemer *et al.* 2007) tj. kapsidové proteiny se musí dostat do jádra hostitelské buňky, kde dojde k formování kapsomer. Přesný mechanismus toho, jakým způsobem se dostávají zralé, neboli maturované, viriony ven z buňky je zatím neznámý.

Zdá se, že se agnoprotein, u virů které jej kódují, podílí na uvolnění maturovaného virového potomstva z jádra, na složení virionů a jejich uvolnění z buňky (Ellis *et al.* 2013; Okada *et al.* 2005). Absence agnoproteinu však vede i ke snížení replikace genomu a exprese virových genů a to u SV40 i JCPyV, jak zjistili Sariyer *et al.* ve studii, kde vyřadili bodovou mutací iniciační kodon ATG pro jeho translaci (Sariyer *et al.* 2011).

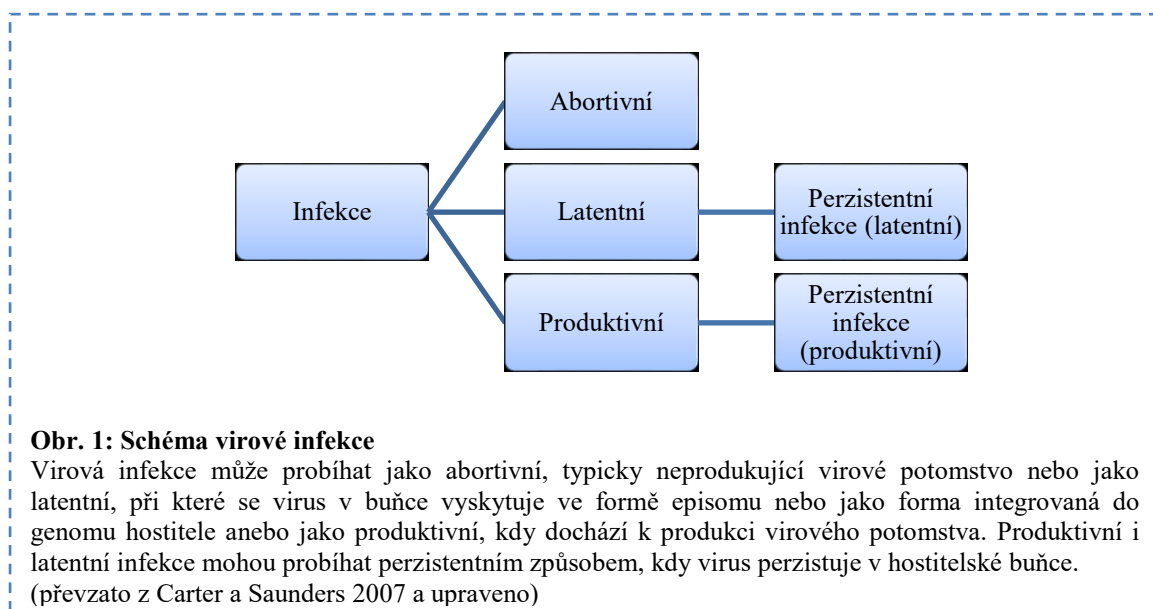
3 Onkogeneze způsobená polyomaviry

Buňky hostitele mohou v mnoha směrech ovlivňovat životní cyklus viru. Obecně se dá říci, že buňky permissivní podporují replikaci virového genomu a vznik virionů, semipermissivní buňky podporují replikaci jen omezeně a nepermissivní buňky replikaci neumožňují. Existuje několik možností virové infekce: latentní, abortivní nebo produktivní a také perzistentní infekce latentní či produktivní (*obr. 1*) (shrnutí v Carter a Saunders 2007).

Při latentní infekci je virový genom udržován v buňce jako virová sekvence integrovaná do hostitelského genomu nebo v podobě episomu – molekula DNA

kovalentně spojená do cirkulární podoby. Během latentní infekce může být exprese virových proteinů zcela vypnutá anebo může docházet k nízké produkci proteinů a/nebo nekódujících RNA. Po změně podmínek nevhodných pro virus (např. přesunutím buňky do další fáze buněčného cyklu, oslabením imunity organismu, případně koinfekcí jiným pomocným virem) může nastat přechod z infekce latentní na produktivní. Pokud nenastane změna podmínek, dochází k tzv. perzistentní latentní infekci, kdy je virový genom udržován v buňkách i při dělení. Při dělení se dostává do dceřiných buněk, aniž by poškodil hostitelskou buňku a produkoval virové potomstvo (shrnutí v Carter a Saunders 2007). Perzistentní infekce je typicky asymptomatická, ale může vést ke vzniku onemocnění a tumorů (shrnutí v Moore a Chang 2010), jelikož bez produkce virového potomstva je pro imunitní systém těžké na infekci virem reagovat, např. Horvath *et al.* ve své studii ukázali, že zástupci *Macaca mulatta* (makak rhesus) se syndromem získaného selhání imunity (AIDS), které u nich vyvolává virus opičí imunodeficiency (SIV), mají predispozice k primární infekci či reaktivaci latentní infekce virem SV40 (Horvath *et al.* 1992).

Při abortivní infekci nedochází k produkci virového potomstva a ani k perzistenci virového genomu v buňce. Dochází pouze ke vstupu viru do buňky a transkripci časných genů, replikace a transkripce pozdních genů je blokována (shrnutí v Robertson 2012; Carter a Saunders 2007).



Obr. 1: Schéma virové infekce

Virová infekce může probíhat jako abortivní, typicky neprodukující virové potomstvo nebo jako latentní, při které se virus v buňce vyskytuje ve formě episomu nebo jako forma integrovaná do genomu hostitele anebo jako produktivní, kdy dochází k produkci virového potomstva. Produktivní i latentní infekce mohou probíhat perzistentním způsobem, kdy virus perzistuje v hostitelské buňce. (převzato z Carter a Saunders 2007 a upraveno)

U PyV dochází obecně k perzistentní infekci, při níž mohou jako onkoproteiny fungovat tumorogenní antigeny (T-Ag), tedy časné proteiny LT-Ag, sT-Ag, případně mT-Ag (u MPyV a HaPyV) (shrnutu v Knipe a Howley 2013).

SV40 může infikovat permisivní opičí buňky s výslednou produkcí nového virového potomstva a lyzí hostitelské buňky. Pokud virus infikuje nepermisivní buňky hlodavců nebo semipermisivní mezoteliální lidské buňky může docházet k transformaci. U SV40 byla transformace studována transfekcí virové DNA nebo pomocí retrovirových vektorů kódujících LT-Ag a/nebo sT-Ag. LT-Ag (u SV40, JCPyV a BKPyV) může indukovat genomovou nestabilitu strukturními i numerickými chromozomovými aberacemi (shrnutu v Carter a Saunders 2007). Maligní transformace způsobená LT-Ag SV40 je vzácná. Dochází při ní k integraci virového genomu typicky ve zkrácené formě do genomu hostitele, následuje pouze exprese časných T-Ag (Ozer *et al.* 1996; Botchan *et al.* 1976; Sambrook *et al.* 1968). Genom **MCPyV** byl objevený jako integrovaný v genomu buněk Merkelova karcinomu. Merkelovy buňky fungují v kůži jako mechanoreceptory (Feng *et al.* 2008). Podle výzkumu Shuda *et al.* (2008) ztrácí virus v buněčné linii odvozené od nádoru část LT-Ag z důvodu delece části C-terminální domény. Genom MCPyV je tedy integrován ve své zkrácené formě.

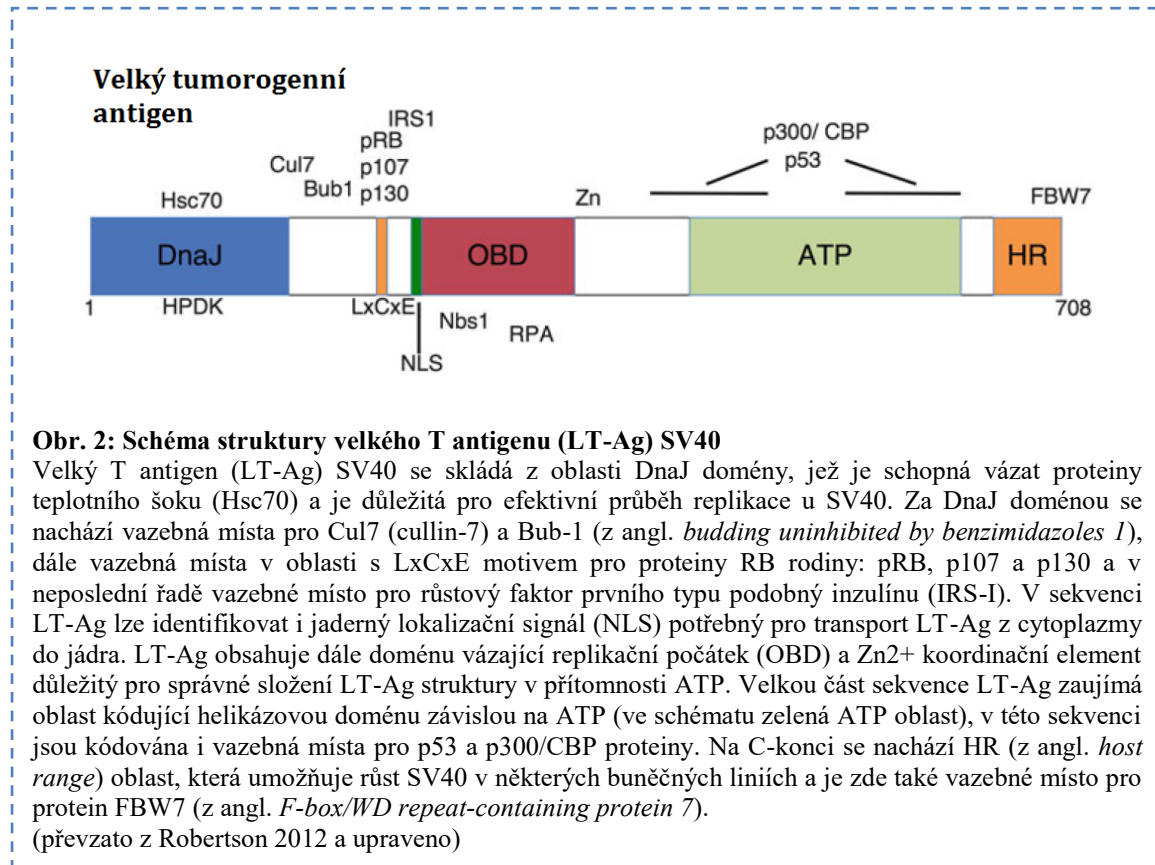
Infekce PyV může vést také k poškození mechanismů pro opravu DNA, tzv. DDR (z angl. *DNA damage response*), kterou PyV aktivují a využívají ji pro vlastní replikaci (shrnutu v Robertson 2012).

3.1 Velký tumorogenní antigen

U čeledi *Polyomaviridae* se LT-Ag u jednotlivých virů liší ve své detailní struktuře a také funkci a proto i transformace způsobená LT-Ag může probíhat mnoha způsoby. SV40 LT-Ag je nejvíce prostudovaným LT-Ag u PyV a je chápán jako jakýsi prototyp (shrnutu v Robertson 2012) a proto vysvětlím transformaci a karcinogenezi na příkladu tohoto velmi dobře popsaného LT-Ag ve srovnání s MCPyV, který je RacPyV blízce příbuzný (*kapitola 4.1.2*) (DelaCruz *et al.* 2013).

LT-Ag SV40 interaguje s různými hostitelskými proteiny, mezi které patří: rodina proteinů teplotního šoku Hsp70, retinoblastomová proteinová rodina (pRB), p53 a koaktivátorová proteinová rodina zahrnující proteiny p300 a CREB vazebný protein (p300/CBP). Hostitelské proteiny se váží na LT-Ag v různých oblastech. LT-Ag SV40 obsahuje tyto oblasti: DnaJ doménu, vazebné místo pro cullin 7 (Cul7) a protein kinázu

Bub1, pRB vazebný motiv LxCxE, vazebné místo pro substrát pro inzulinový receptor 1 (IRS-I), ori vazebnou doménu (OBD) a oblast s jaderným lokalizačním signálem (NLS), element koordinující s Zn^{2+} , ATP-dependentní helikázovou oblast s vazebnými místy pro p53 tumor supresor a p300/CBP a v neposlední řadě na C-konci oblast HR (z angl. *host range*) (shrnuto v Robertson 2012) (obr. 2).



DnaJ doména je oblast LT-Ag jež je funkčně i sekvenčně homologní k J-doméně rodiny DnaJ chaperonů (shrnuto v Kelley a Landry 1994) a je konzervována u PyV LT-Ag včetně LT-Ag u MCPyV. U SV40 se DnaJ doména zapojuje při specifické asociaci s proteiny teplotního šoku Hsc70 (Hsp70 rodina proteinů) a je důležitá pro účinnost DNA replikace (Sullivan *et al.* 2001; Cambell *et al.* 1977). LT-Ag SV40 podněcuje ATPázovou aktivitu Hsc70 a stimuluje uvolnění nesbalených peptidů z domény vázající substrát u Hsc70 (Srinivasan *et al.* 1997).

Za oblastí DnaJ domény se nachází **vazebná místa pro Cul7 a Bub1**. Cul7 je komponentou E3 ubiquitin-ligázového komplexu a spolu s LT-Ag se může Cul7 účastnit transformace buněk hlodavců. Cul7 hraje roli při supresi buněčného růstu a LT-Ag tuto funkci Cul7 inaktivuje (Kasper *et al.* 2005). Bub1 je serin-treoninová (Ser/Thr) protein-kináza. Podle Cotsiki *et al.* (2004) nemá vazba mezi Bub1 a LT-Ag vliv na

imortalizaci buněk, ale mohla by se podílet na transformaci buněk destabilizací genomu. U ostatních PyV, včetně MCPyV zatím nebylo objeveno, zda vážou Cul7 či Bub1.

Další součástí LT-Ag, u SV40 i MCPyV, je oblast s **LxCxE motivem**, který je zodpovědný za interakci s pRB. Oblast s LxCxE motivem SV40 objímá vazebné místo pro IRS-I (*kapitola 3.1.2.1*). U MCPyV se před LxCxE motivem vyskytuje unikátní vazebné místo (MUR) pro buněčný faktor Vam6p, který je pomocí LT-Ag MCPyV přesunut z cytoplazmy do jádra, což může mít vliv spíše na replikaci virového genomu, než na transformaci buněk (Liu *et al.* 2011)

Za LxCxE motivem u SV40 i MCPyV se nachází **NLS**, který navádí LT-Ag do jádra. Bez NLS není virus schopný dokončit lytický cyklus (Lanford a Butel 1984). **OBD** má mnoho funkcí mezi ty stěžejní ale patří umožnění vazby LT-Ag a virového ori (Artur *et al.* 1988). Dále má OBD SV40 funkci při aktivaci transkripce, vazbě RPA a nibrinu. RPA je protein potřebný pro správný průběh replikace a nibrin je spojován s opravou dvouřetězcových zlomů DNA (Wu *et al.* 2004; Weisshart *et al.* 1998).

Ve střední oblasti LT-Ag SV40 se nachází **Zn²⁺ koordinační element** konzervovaný u všech PyV. Zn²⁺ koordinační element je stěžejní pro rozvolnění DNA ori a také pro protein-proteinové interakce v LT-Ag, které vedou ke vzniku správně fungující hexamerní struktury LT-Ag (Mastrangelo *et al.* 1989; Loeber *et al.* 1991).

Helikázová doména je další z důležitých součástí LT-Ag SV40 i MCPyV. Helikázová aktivita této domény je závislá na ATP a je potřebná pro rozvinutí dsDNA v ori (Stahl *et al.* 1986). Tato doména obsahuje i bipartijní vazebné místo pro p53.

Na úplném C-konci LT-Ag SV40 se nachází **HR oblast**, u SV40 je tato oblast zodpovědná za růst v některých specifických buněčných liniích např. v CV-1 (Pipas 1985). Na C-konci LT-Ag se nachází také vazebné místo pro protein FBW7 (z angl. *F-box/WD repeat-containing protein 7*), který je stejně jako Cul7 součástí E3 ubiquitin-ligázového komplexu. Vazba LT-Ag a FBW7 je důležitá z důvodu blokace vazby FBW7 k cyklinu E, který by jinak zprostředkoval degradaci LT-Ag pomocí specifické ubiquitinační ligázy (shrnutí v Robertson 2012; Knipe a Howley 2013).

3.1.1 Velký tumorogenní antigen a RB proteinová rodina

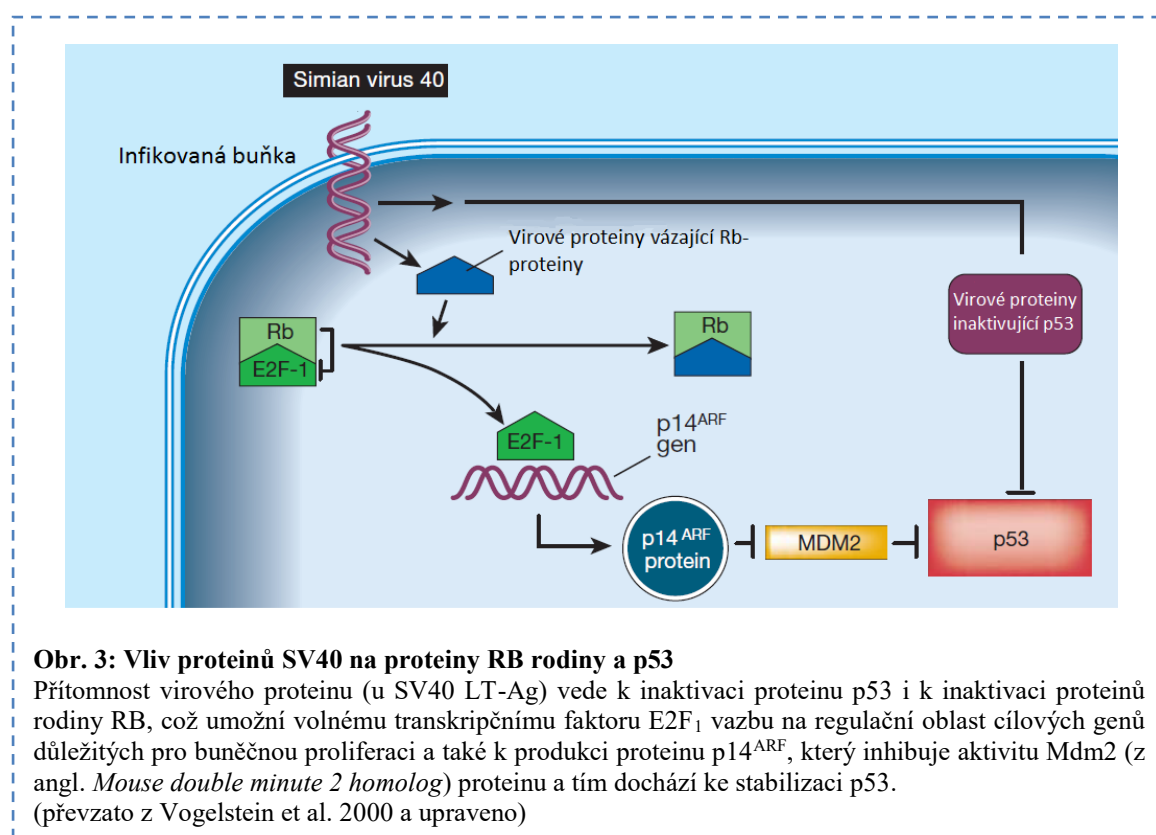
Proteiny **pRb**, **p107** a **p130** náleží do pRB. LT-Ag je schopný vázat všechny tři pRB proteiny (DeCaprio *et al.* 1998; Stubdal *et al.* 1997) a tím je inaktivovat. Proteiny pRB mají na svém povrchu mnoho míst, které mohou podléhat fosforylaci. Při přechodu

buňky mezi G₁ a S-fází buněčného cyklu dochází ke změně fosforylace proteinů z hypofosforylované na hyperfosforylovanou formu a tím je buňce umožněno vstoupit do S-fáze (shrnutí v Du a Pogoriler 2006). Proteiny pRB interagují s transkripčními faktory E2F. Geny, jejichž exprese je regulována transkripčními faktory E2F jsou v nedělící se buňce neaktivní. Komplex p130/E2F₄ se váže do promotorové oblasti těchto genů a tím inhibuje jejich transkripci. Pokud dojde k fosforylaci pRB, dochází k přeměně komplexu na aktivační komplex obsahující E2F₁₋₃. Dochází k expresi genů řízených transkripčními faktory E2F, které se dále podílejí na DNA replikaci, metabolismu nukleotidů, opravě DNA a především na vstupu do buněčného cyklu, tedy přesunu z G₀ do G₁ fáze. pRB se podílí na supresi tumorů, regulaci buněčného cyklu, diferenciaci a apoptóze (shrnutí v Ahuja *et al.* 2005).

LT-Ag SV40 vytváří s pRB stabilní komplex. Pro vazbu pRB a LT-Ag je esenciální konzervovaný LxCxE motiv v oblasti 103-107 LT-Ag, který se nachází ve všech proteinech vázajících pRB. Schopnost vazby pRB s využitím LxCxE motivu není limitována pouze na SV40, proteiny mohou vázat i další PyV zahrnující opičí, myši nebo lidské polyomaviry. Tento motiv je polypeptidovým řetězcem aminokyselin (AA): Asp nebo Asn – Leu – libovolná AA – Cys – libovolná AA – Glu, tj. D/N-L-X-C-X-E (Dyson *et al.* 1990). LT-Ag umí pomocí vazby pRb proteinu inhibovat transkripci a regulovat buněčnou proliferaci. Proteiny pRB se váží na LT-Ag v hypofosforylované formě, což způsobí neschopnost tvorby komplexu s transkripčním faktorem E2F (*obr. 3*). LT-Ag je schopný takto kontrolovat regulaci buněčného cyklu (Ludlow *et al.* 1989). Mutanty s delecí v oblasti LxCxE motivu byly nalezeny defektní při transformaci myších a krysích buněk v primární kultuře (Chen a Paucha 1990). Na rozrušení vazby pRB s transkripčními faktory E2F se podílí i J-doména LT-Ag. Pro rozrušení komplexu p130-E2F₄ *in vitro* je podle studie Sullivan *et al.* (2000) nutná přítomnost nejen funkčního motivu LxCxE v LT-Ag, ale i přítomnost funkční J-domény. J-doména se váže na ATPázovou doménu Hsc70 a v přítomnosti ATP dochází k efektivnímu rozrušení p130-E2F₄ komplexu (Sullivan *et al.* 2000). Podle modelu využívá Hsc70 navázaný na J-doménu hydrolýzu ATP pro rozrušení p130-E2F₄ (shrnutí v Ahuja *et al.* 2005). LT-Ag ovlivňuje pRB v různých buňkách různým způsobem. Při transformaci myších embryonálních fibroblastů (MEF) dochází k degradaci p130 v proteazomu, zvyšuje se množství p107 přičemž množství pRb zůstává nezměněno (Stubdal *et al.* 1997). Při transformaci linie buněk BSC40 (linie ledvinných buněk kočkodana červenozeleného)

dochází podle Sullivan *et al.* (2004) k rozrušení komplexů p130-E2F a p107-E2F, komplex pRb-E2F zůstává intaktní. Podle Ahuja *et al.* (2005) je, dle publikovaných dat, J doména T-Ag potřebná pro inaktivaci p130 a p107, ale ne pro inaktivaci pRb. V cis postavení s nejméně dvěma dalšími částmi LT-Ag zahrnující LxCxE motiv a C-koncovou oblast LT-Ag může J-doména přispívat k transformaci (Srinivasan *et al.* 1997).

U MCPyV dochází také k vazbě pRB, přičemž je vazba efektivnější u zkrácené formy LT-Ag (odvozené od LT-Ag izolované z karcinomu Merkelových buněk), s tím je spojena i efektivnější indukce transkripce genů pod kontrolou E2F. Zkrácená forma LT-Ag se podílí na transformaci primárních myších buněk (Borchert *et al.* 2014).



Obr. 3: Vliv proteinů SV40 na proteiny RB rodiny a p53

Přítomnost virového proteinu (u SV40 LT-Ag) vede k inaktivaci proteinu p53 i k inaktivaci proteinů rodiny RB, což umožní volnému transkripčnímu faktoru E2F₁ vazbu na regulační oblast cílových genů důležitých pro buněčnou proliferaci a také k produkci proteinu p14^{ARF}, který inhibuje aktivitu Mdm2 (z angl. *Mouse double minute 2 homolog*) proteinu a tím dochází ke stabilizaci p53. (převzato z Vogelstein *et al.* 2000 a upraveno)

3.1.2 Velký tumorogenní antigen a p53

Protein **p53 (53kDa protein)** byl objeven v roce 1979 (Lane a Crawford 1979; Linzer a Levine 1979). Je to transkripční faktor, který se podílí na expresi genů potřebných pro zastavení buněčného cyklu či pro spuštění apoptózy vlivem buněčného stresu (shrnuto v Robertson 2012). V normální buňce dochází k vazbě p53 do promotorové oblasti genu pro Mdm2 (z angl. *Mouse double minute 2 homolog*) proteinu a tím spouští jeho transkripci. Mdm2 protein váže p53 a stimuluje polyubiquitinaci na C-konci proteinu, poté je p53 degradován v proteozomu. Snížením koncentrace p53

dochází ke snížení transkripce Mdm2 genu a tím dochází k opětovnému zvýšení koncentrace p53. Tato zpětnovazebná smyčka může být narušena buněčným stresem způsobeným např.: DNA poškozením, abnormální inhibicí RB proteinů či přítomností onkogenů. V nepoškozené buňce inhibuje C-koncová doména p53 DNA vazebnou doménu lokalizovanou ve střední části proteinu. Poškození DNA stimuluje modifikaci p53, konkrétně dochází k acetylaci Lys nebo fosforylaci Ser, což umožní p53 vázat DNA. K stimulaci aktivity p53 dochází i fosforylací N-koncové domény, Mdm2 se poté nemůže vázat na p53. Deacetylaci p53 je indukována ubiquitinace proteinem Mdm2 a p53 je degradován v proteozomu. Přítomnost onkogenů navozuje vyšší hladinu aktivního p53 odlišným způsobem. Onkogeny podněcují expresi p14^{ARF}, který svádí Mdm2 do jádérka a inhibuje tím jeho funkci (shrnutí v Vogelstein *et al.* 2000, Ahuja *et al.* 2005).

Zvýšená exprese p53 vede k produkci inhibitoru CDK (cyklin-dependentní kináza) p21^{WAF/CIP1}, který brání přesunu z G₁ do S fáze a z G₂ do M fáze buněčného cyklu (Bochetta *et al.* 2008), což umožní reparaci poškozené DNA. Pokud ji nelze opravit indukuje p53 apoptózu pomocí mitochondriálních proteinů nebo ji spouští přímo stimulací mitochondrií (shrnutí v Ahuja *et al.* 2005; Vogelstein *et al.* 2000).

LT-Ag SV40 interaguje s centrální DNA vazebnou doménou p53. Tato vazba má za následek nefunkčnost p53 proteinu jako transkripčního faktoru a jako tumor-supresoru. LT-Ag tedy zamezí spuštění transkripce genů, které jsou pod kontrolou p53 (Bargonetti *et al.* 1992). Protein p53 může podle některých studií v komplexu s LT-Ag stále vázat DNA (Long *et al.* 1995, citováno v Bochetta *et al.* 2008). Vazbou pRB a inhibicí funkce p53 se infikovaná buňka stává možnou rakovinnou buňkou, protože může docházet k jejímu nekontrolovatelnému dělení. Vyvážením pRB dochází ke spuštění transkripce genů pro p14^{ARF}, což vede ke stabilizaci inhibovaného p53, protože v této formě nemůže být degradován (*obr. 3*). Delecí oblastí zodpovědných za vazbu pRB nebo p53 se SV40 stává neschopným transformace primárních lidských a myších buněk *in vitro* (shrnutí v Cheng *et al.* 2009; Pipas 2008; Vogelstein *et al.* 2000).

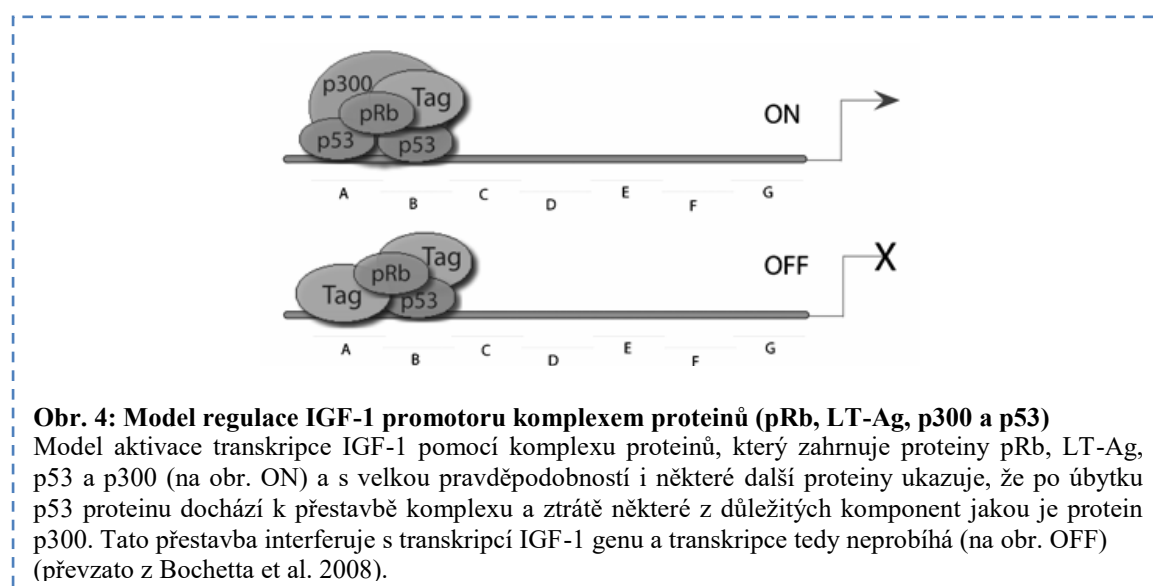
Podle Borchert *et al.* (2014) **LT-Ag MCPyV** neváže p53 tumor-supresor přímo, ale ovlivňuje geny, které jsou pod jeho kontrolou. Zkrácené formy LT-Ag (odvozené od LT-Ag izolovaných z nádorů Merkelových buněk) bez C-koncové helikázové domény nejsou schopné interagovat s p53 a redukovat transkripci genů, které jsou pod kontrolou p53. Ke koprecipitaci p53 dochází u MCPyV v menší míře než u SV40 (Borchert *et al.* 2014). Ve studii Cheng *et al.* (2013) nepotvrdili vazbu p53 a

LT-Ag a ani vazbu p53 a zkrácených forem LT-Ag. Každý z výzkumných týmů ale pracoval s jinými kulturami buněk, což může mít za následek odlišné výsledky pro vazbu normálního LT-Ag a p53.

3.1.2.1 Růstový faktor prvního typu podobný inzulinu

Transformace se v buňkách infikovaných SV40 nemusí projevovat jen díky vazbě s proteiny p53 a pRB, ale také díky jejich interakci s dalšími buněčnými proteiny např. **růstovým faktorem prvního typu podobným inzulinu (IGF-I)**. V normální buňce se IGF-I váže na receptor pro růstový faktor prvního typu podobný inzulinu (IGF-IR), čímž indukuje fosforylaci IRS-I. Následkem fosforylace dochází k disociaci IRS-I od reparačního faktoru Rad51, ten je transportován do jádra a tím se aktivují reparační mechanismy DNA (shrnutí v Reiss *et al.* 2006).

Studie **LT-Ag SV40**, IGF-I a IGF-IR jsou založeny na prvotním výzkumu Sell *et al.* a jeho vědeckého týmu. Tento výzkum ukázal, že LT-Ag není schopen transformovat buňky bez IGF-IR (Sell *et al.* 1993). Podle výzkumu Bochetta *et al.* (2008) se na myším modelu ukázalo, že LT-Ag a p53 mohou v multiproteinovém komplexu s pRb a p300 fungovat jako transkripční faktor pro expresi IGF-I. Při úbytku proteinu p53 došlo k přestavbě komplexu vlivem ztráty některé z důležitých součástí jakou je i protein p300. Protein p300 je spolu s CBP součástí p300/CBP koaktivátorové rodiny proteinů (kapitola 3.1.2.2). Takto přeskupený komplex interferuje s transkripcí IGF-I (obr. 4). Pokud je IGF-I protein exprimován dochází ke spuštění IGF-I signální dráhy, což vede k buněčné proliferaci, která pod kontrolou LT-Ag vede k malignímu buněčnému růstu (Bochetta *et al.* 2008).



Obr. 4: Model regulace IGF-1 promotoru komplexem proteinů (pRb, LT-Ag, p300 a p53)

Model aktivace transkripce IGF-1 pomocí komplexu proteinů, který zahrnuje proteiny pRb, LT-Ag, p53 a p300 (na obr. ON) a s velkou pravděpodobností i některé další proteiny ukazuje, že po úbytku p53 proteinu dochází k přestavbě komplexu a ztrátě některé z důležitých komponent jakou je protein p300. Tato přestavba interferuje s transkripcí IGF-1 genu a transkripce tedy neprobíhá (na obr. OFF) (převzato z Bochetta *et al.* 2008).

LT-Ag váže IRS-I a transportuje jej z cytoplazmy do jádra. IRS-I navázaný na LT-Ag je potřebný při fosforylaci (aktivaci) protein kinázy B (PKB). PKB, Ser/Thr protein kináza, je jednou z klíčových kináz pro kontrolu buněčného růstu (Yu a Alwine 2008). Aktivace této kinázy pomocí LT-Ag inhibuje apoptózu (Yu a Alwine 2002). LT-Ag JCPyV po transportu IRS-I do jádra inhibuje opravu poškozené DNA (Lassak *et al.* 2002). Vlivem poškození jednoho z buněčných reparačních mechanismů může docházet k buněčné transformaci.

3.1.2.2 Acetylace velkého tumorogenního antigenu

Ke koaktivaci transkripce dochází v normální buňce přes proteiny p300/CBP, které tvoří jakýsi most spojující transkripční faktory vázající DNA s bazálním transkripčním aparátem zahrnujícím RNA polymerázu II. Další funkcí p300/CBP je histonacetyltransferázová aktivita, která proteinům umožňuje acetylovat lyzinové zbytky N-konců histonů a tím neutralizovat jejich záporný náboj a umožnit tak rozvolnění DNA od histonů. Acetylace histonových N-konců je spojována s aktivní transkripcí genů. Koaktivátorové proteiny p300/CBP jsou schopné acetylovat i nehistonové proteiny jako např. p53 (shrnuté v Iyer *et al.* 2004).

V roce 1997 Lill *et al.* zjistili, že **LT-Ag SV40** může tvořit komplex s p300/CBP a p53. Další studie odhalily, že pomocí komplexu p300/CBP dochází k acetylaci Lys na pozici K697. Tato acetylace je ale závislá na přítomnosti p53, který musí být plně funkční, aby k vazbě došlo. Protein p53 slouží jako most umožňující interakci LT-Ag a p300/CBP (Borger a DeCaprio 2006; Poullin *et al.* 2004). Podle Shimazu *et al.* (2006) má LT-Ag jako takový schopnost vázat CBP, jeho afinita ale není dostatečně silná a proto je vazba zprostředkována p53, přičemž acetylací Lys dochází k destabilizaci LT-Ag v COS-7 buňkách, což vede k negativní regulaci transformace. Podle studie Hermannstädter *et al.* (2009) může acetylovaný LT-Ag transformovat 3T3 buňky ve větší míře než neacetylovaný LT-Ag.

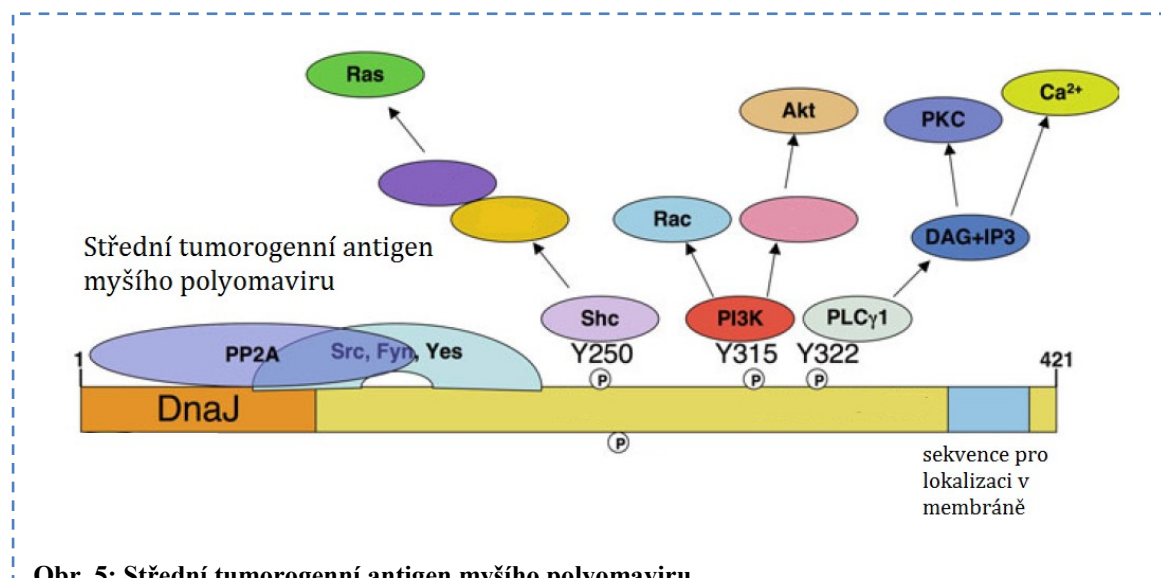
3.2 Middle tumor antigen

Střední tumorogenní antigen byl objeven pouze u **MPyV** a **HaPyV** a vzniká alternativním sestřihem virové mRNA (Treisman *et al.* 1981).

Pro transformaci je důležité, že mT-Ag váže protein fosfatázu 2A (PP2A), díky které dochází k aktivaci protein tyrozinových kináz (PTK) (Pallas *et al.* 1990; Courtneidge a Smith 1983). PP2A je trimerní komplex podjednotek A, B a C,

příčemž A a B jsou regulační podjednotky a C je k nim navázaná katalytická podjednotka. mT-Ag váže A a C podjednotky PP2A. Rekrutace PTK je důležitá pro mT-Ag transformaci, PTK fosforylují Y250, Y315 a Y322 místa na mT-Ag. Fosforylace a aktivace příslušných signálních drah je shrnuta na *obr. 5* (shrnuto v Robertson 2012; Knipe a Howley 2013).

Ve své C-koncové doméně obsahuje mT-Ag nenabitou hydrofobní sekvenci, proto je mT-Ag lokalizován v cytoplazmatické membráně (Ito 1979). Membránová lokalizace mT-Ag je klíčová pro jeho transformační aktivitu. V roce 1981 Novak a Griffin prokázali, že transmembránová C-koncová doména mT-Ag je klíčová pro transformační aktivitu, fosforylaci a kinázovou aktivitu. Pro výzkum využili plazmidové vektory se zkráceným genem pro mT-Ag. Pokud byla DNA zkrácena o 14 a více aminokyselin nedošlo k buněčné transformaci (Novak a Griffin 1981).



Obr. 5: Střední tumorogenní antigen myšího polyomaviru

N-koncová doména středního tumorogenního antigenu (mT-Ag) obsahuje J-doménu, která se ale nepodílí na transformaci myších buněk a vazebné místo pro protein fosfatázu 2A (PP2A), díky které dochází k rekrutaci protein tyrosinových kináz (PTK) (ve schématu Src, Fyn a Yes). PTK se podílejí na fosforylaci míst Y250, Y315 a Y322. Fosforylace Y250 katalyzuje vazbu Shc adaptorový protein, který spouští kaskádu Ras a poté mitogenem aktivovanou protein kinázovou signální kaskádu (MAPK), která umožní mT-Ag kontrolovat buněčnou proliferaci, diferenciaci a apoptózu. Fosforylace Y315 vede k vazbě jedné z podjednotek fosfatidylinositol-3-kinázy (PI3K), jež ve výsledku aktivuje malý GTP vazebný protein Rac, který se podílí na transformaci myších buněk a Ser/Thr protein kinázu B, která indukuje protiapoptotickou obranu. Fosforylace Y322 stimuluje vazbu PLC γ 1 (fosfolipáza C, gamma 1), která indukuje vznik signálních molekul, diacylglycerolu (DAG) a inositoltri fosfátu (IP3), jež mohou aktivovat protein kinázu C, která se podílí na mnoha buněčných procesech. Na C-konci je lokalizována hydrofobní oblast, která kotví mT-Ag v buněčné membráně, kde se chová jako trvale aktivní tyrosinová kináza, která zprostředkovává buněčnou signalizaci. (převzato z Robertson 2012 a upraveno)

3.3 Small tumor antigen

Malý tumorogenní antigen je dalším z časných proteinů, který se také vytváří alternativním sestřihem (Treisman *et al.* 1981). sT-Ag je proteinem, jenž sdílí s LT-Ag N-koncovou oblast obsahující J-doménu jak u SV40 tak u MCPyV. Obsahuje ale i unikátní C-konec, u SV40 oblast 92 AK zbytků bohatou na Cys. Konzervovaná oblast je u SV40 rozdělena na dva klastry CxCxxC (Friedmann *et al.* 1978), které jsou zodpovědné za vazbu zinečnatých iontů (Zn^{2+}). Vazba zinečnatých iontů poskytuje sT-Ag SV40 konformační stabilitu (Turk *et al.* 1993) a také se tato Zn^{2+} vazebná doména podílí na vazbě PP2A. Vazba sT-Ag a PP2A je stabilizována J-doménou. Stejně jako mT-Ag je sT-Ag schopný vázat A podjednotku PP2A, přičemž k vazbě sT-Ag a A podjednotky PP2A dochází i u MCPyV. Ve zjednodušeném modelu dochází vazbou A podjednotky k zamezení vazby regulační podjednotky B. Komplex sT-Ag/A u SV40 může vázat katalytickou podjednotku C, tím dojde k inaktivaci PP2A funkce (Pallas *et al.* 1990, Yang *et al.* 1991). Vazba sT-Ag SV40 a PP2A vede k ovlivnění signálních kaskád spojených se zvýšenou buněčnou proliferací, změnou cytoskeletu nebo s antiapoptotickou dráhou. sT-Ag SV40 není sám schopný transformovat buňky, ale pouze v kooperaci s LT-Ag (shrnutí v Cheng *et al.* 2009; Sablina a Hahn, 2008). Podle Shuda *et al.* (2011) je sT-Ag MCPyV v lidských nádorech detekován mnohem častěji než LT-Ag, přičemž sT-Ag umí sám transformovat myši buňky, ale LT-Ag ne. U MCPyV nedochází vyřazením vazebného místa pro PP2A k porušení transformace, přičemž je sT-Ag schopný indukovat transformaci pomocí fosforylace některých komponent P13K/PKB/mTOR signální kaskády (Shuda *et al.* 2011) a také indukovat genomovou nestabilitu inhibicí FBW7 (Kwun *et al.* 2017).

3.4 miRNA čeledi Polyomaviridae

Mikro RNA jsou krátké molekuly RNA s délkou 10-22 nt, které se v buňce účastní postranskripční regulace, RNA interference. RNA interference zahrnuje rozštěpení dsRNA na krátké interferující RNA proteinem Dicer. Interferující RNA je rozpletena a vytváří spolu s dalšími proteiny **umlčovací komplex indukovaný RNA (RISC)**, který váže mRNA komplementární k interferující RNA. Pokud je párování s mRNA dokonalé, dochází k rozštěpení a degradaci mRNA. Interferující molekuly RNA, které jsou zcela komplementární k cílové mRNA, se nazývají krátké interferující RNA (siRNA). Pokud je párování nedokonalé, dochází k zastavení translace mRNA a tyto nedokonale párující RNA jsou miRNA (shrnutí v Snustad a Simmons 2009).

U řady virů byly miRNA také objeveny (nejvíce u čeledi *Herpesviridae*). Plaisance-Bonstaff a Renne uvádí, že se virové miRNA mohou zapojovat v mnoha procesech, např.: v kontrole latentní či lytické infekce, na inhibici buněčných miRNA resp. při potlačení jejich funkce, mohou hrát roli i při onkogenezi, ovlivňovat buněčnou proliferaci a také imunitní odpověď a mohou se podílet také na udržování perzistentní infekce (Chen *et al.* 2015; shrnuto v Plaisance-Bonstaff a Renne 2011).

V roce 2005 Sullivan *et al.* prokázali, že SV40 kóduje pre-miRNA vlásečkový prekurzor, který je štěpen na dvě funkční molekuly miRNA, které snižují expresi virových genů s pomocí RISC komplexu (Sullivan *et al.* 2005). O 3 roky později publikovali Seo *et al.* studii, která se zabývala detekcí miRNA u dalších PyV, konkrétně u JCPyV a BKPyV. U JCPyV a BKPyV byla také detekována miRNA, která se s SV40 miRNA shodovala na 65 %. Velmi zajímavým faktem je, že i když se miRNA u JCPyV a BKPyV viru lišila ve 35 % jejich funkce je konzervovaná (Seo *et al.* 2008). O rok později se stejnému vědeckému týmu podařilo detekovat miRNA u dalších PyV, konkrétně u MCPyV a MPyV (Seo *et al.* 2009; Sullivan *et al.* 2009).

Všechny miRNA u JCPyV, BKPyV, MCPyV, MPyV i SV40 se podílí na štěpení časných transkriptů v pozdější fázi infekce pomocí komplexu miRNA/RISC a podílejí se tedy na procesu autoregulace časných genů (Seo *et al.* 2009; Sullivan *et al.* 2009; Seo *et al.* 2008). Podle Seo *et al.* je tato autoregulační funkce PyV miRNA konzervovaná i přes miliony let evoluce (Seo *et al.* 2008, Seo *et al.* 2009).

MicroRNA byla detekována i *in vivo* v případě miRNA JCPyV v mozkové tkáni pacientů, kteří zemřeli následkem progresivní multifokální leukoencefalopatie. U SV40 bylo prokázáno, že funkce miRNA *in vivo* je spojena s redukcí imunitní odpovědi cytotoxických T lymfocytů na infekci SV40 (Sullivan *et al.* 2005), u MPyV se ale tato funkce neprojevila (Sullivan *et al.* 2009). Důsledky snížení exprese časných proteinů pomocí miRNA vzhledem k buněčným proteinům a *in vivo* není u PyV miRNA zatím zcela pochopena.

Carbone *et al.* (2008) zjistili, že při infekci imortalizovaných lidských mezoteliálních buněk transformovaných SV40 (S-HML) dochází k umlčování pozdní oblasti virového genomu pomocí RNA. SV40 se v S-HML buňkách vyskytuje v episomální formě, což je u SV40 unikátní situace, protože normálně se v transformovaných buňkách vyskytuje integrovaný v genomu hostitelské buňky. RNA

polymeráza II při přepisu časně oblasti genomu pročte polyadenylační signál časně oblasti genomu a pokračuje v transkripci pozdní oblasti, čímž vzniká dlouhá molekula nekódující RNA (v angl. *antisense RNA*), která se podílí na destabilizaci mRNA pozdní oblasti genomu (Carbone *et al.* 2008). Při klasické transkripci pozdní oblasti vzniká kódující RNA (v angl. *sense RNA*), spojením nekódujícího a kódujícího vlákna vzniká dsRNA, která může následně podléhat degradaci proteinem Dicer. Umlčení pozdních genů pomocí dlouhé nekódující RNA je udržováno i při pasážování buněčné kultury (Carbon *et al.* 2008). Již dříve bylo zjištěno, že jsou lidské mezoteliální buňky citlivé na transformaci způsobenou SV40. V infikovaných buňkách dochází k vazbě LT-Ag a p53 a jeho stabilizaci a nemůže tak docházet k lyzi buňky (Bocchetta *et al.* 2000). Kombinace vazby p53 a umlčení pozdní oblasti genomu umožní viru existovat v buňce v episomální formě a indukovat transformaci (Carbon *et al.* 2008).

4 Mývalí polyomavirus

Mýval severní (*Procyon lotor*) je živočich patřící do řádu šelmy (*Carnivora*) a čeledi medvídkovití (*Procyonidae*). Mýval je značně rozšířen především v severní a střední Americe. Mýval severní je velice adaptivní a proto ho můžeme hojně nalézt i v blízkosti lidských obydlí (Timm *et al.* 2016). Mývalové jsou přenašeči různých infekčních onemocnění, ale nádorová onemocnění mozku jsou u nich velmi vzácná. (shrnutí v Giannitti *et al.* 2014).

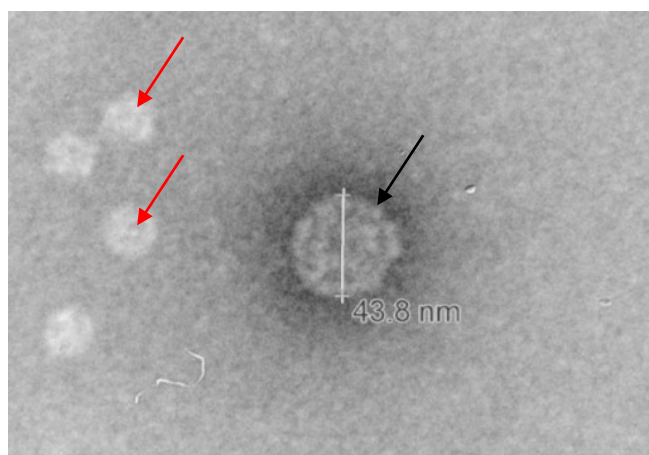
Od ledna 2010 do května 2012 identifikovala Kalifornská laboratoř pro zdraví zvířat a bezpečnost potravin (CAHFS) u 10 volně žijících mývalů mozkové nádory. Tito mývalové byli nalezeni především v blízkosti urbanizovaných oblastí, nejvíce v Kalifornii. U mývalů s diagnostikovaným tumorem byla pozorována kromě jiného ztráta strachu, slepota, letargie nebo ataxie tzn. ztráta hybnosti a schopnosti koordinace pohybů (Giannitti *et al.* 2014; Dela Cruz *et al.* 2013).

V roce 2013 byl popsán **RacPyV** (DelaCruz *et al.* 2013). Vzorky pro studii byly získány pitvou právě těchto 10 mývalů, u nichž byly diagnostikovány pleomorfní nádory v nosní dutině, čichovém bulbu, čelním laloku anebo čichovém nervu (Giannitti *et al.* 2014; Dela Cruz *et al.* 2013). Genom RacPyV byl amplifikován pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR) a degenerovaných primerů navržených na základě konzervované sekvence LT-Ag PyV. Plná délka genomu byla získána díky kombinaci primerů specifických pro RacPyV (Dela Cruz *et al.* 2013).

4.1 Molekulární biologie mývalího polyomaviru

4.1.1 Struktura virionu

Při popisu RacPyV byla snaha o identifikaci virových partikulí v tkáňových vzorcích s pomocí elektronového mikroskopu, ale v žádném z tkáňových vzorků výše zmíněných 10 mývalů nebyly partikule nalezeny (Dela Cruz *et al.* 2013; Gianitti *et al.* 2014). Špatná detekce RacPyV virionů může být následkem jejich sporadické produkce nebo může být důvodem specifická buněčná regulace genové exprese u viru. Špatná detekce virionů je popisována i pro MCPyV (shrnutí v DeCaprio a Garcea 2013). Zajímavá je studie Neumann *et al.* (2011), ve které popisují, jak synteticky vytvořili konsenzus MCPyV genom plné délky (MCPyV-Syn) a sami si pomocí permisivních buněk vytvořili MCPyV-Syn viriony, které následně negativně obarvili a detekovali pomocí elektronového mikroskopu. Virové částice však vykazovaly nezvyklou morfologii a nebyly infekční. V heterologním expresním systému lze z kapsidových proteinů MCPyV částice bez problému vytvořit (Tolstov *et al.* 2009).



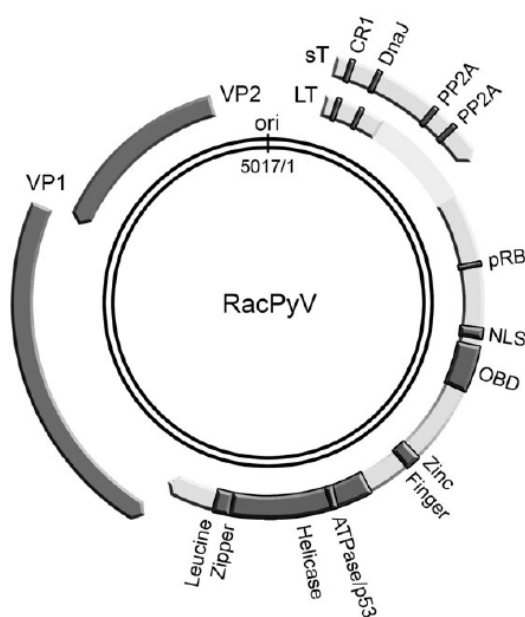
Obr. 6 – Viru podobné partikule odvozené od RacPyV:

Viru podobná partikule (VLP) tvořená majoritním kapsidovým proteinem VP1 (označeno černou šipkou) je partikule s T=7 symetrií, v průměru měří 43,8 nm. Vzorek je negativně barven. Menší partikule na snímku z elektronového mikroskopu jsou VP1 partikule s T=1 symetrií (označeno červenou šipkou) (Salunke *et al.* 1986). (převzato z Church *et al.* 2016a a upraveno)

I u RacPyV byly pomocí Bac-to-Bac bakulovirového expresního systému vytvořeny viru podobné partikule (VLP). Tvoří je majoritní kapsidový protein VP1. VLP byly zobrazeny elektronovým mikroskopem (*obr. 6*). Jejich velikost 40-50 nm odpovídala velikosti virionů PyV (Church *et al.* 2016a).

4.1.2 Genom a fylogeneze

Na základě genomové analýzy F. N. Dela Cruz a jeho vědeckého týmu bylo v roce 2013 zjištěno, že RacPyV obsahuje genetickou informaci v podobě cirkulární dsDNA molekuly, stejně jako u další zástupci z jeho čeledi. DNA genom (*obr. 7*) je rozdělen na časnou, pozdní a regulační oblast a transkripce probíhá stejně jako u jiných PyV. Genetická informace je transkribována ve dvou směrech. V jednom směru je transkribována časná oblast genomu, ze které vznikají časné proteiny: sT-Ag a LT-Ag. V opačném směru je transkribována pozdní oblast genomu a po translaci vznikají proteinové produkty ve formě kapsidových proteinů VP1 a VP2.

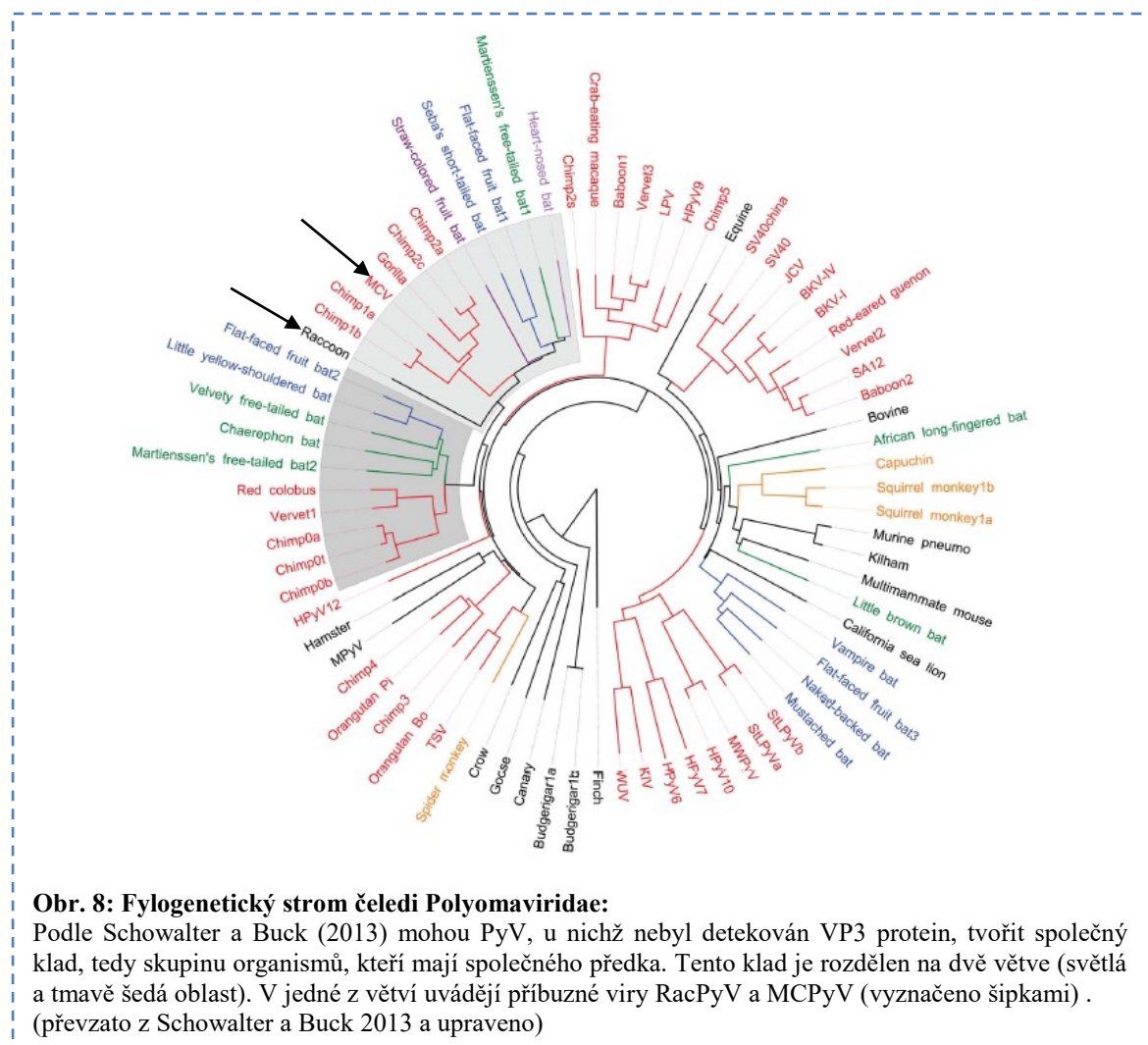


Obr. 7: Schéma genomu mývalího polyomaviru (RacPyV):

Genom RacPyV je regulační oblastí s replikačním počátkem (ori) rozdělen na časnou a pozdní oblast. Časná oblast kóduje geny pro malý (sT) a velký (LT) tumorogenní antigen. Pozdní oblast kóduje geny pro kapsidové proteiny VP1 a VP2. Vazebné domény časných proteinů byly získány na základě konzervovaných vazebných sekvencí polyomavirů. U sT byly identifikovány: konzervovaná oblast (CR1), DnaJ doména (DnaJ), a vazebné místo pro protein fosfatázu 2A (PP2A). V rámci LT oblasti byly detekovány vazebné domény pro proteiny RB rodiny (pRB), ori vazebná doména (OBD) a dále jaderný lokalizační signál (NLS), oblast zinkového prstu (Zinc finger), ATPázová doména potenciálně vázající tumorogenní supresor p53, helikázová doména a leucine-zipper doména. (převzato z Pesavento et al. 2015)

Ve studii DelaCruz *et al.* (2013) je ve schematickém znázornění uváděn gen pro VP3 u RacPyV i u MCPyV. V genomové sekvenci dostupné z GenBank, ze které u MCPyV (*GenBank accession number*: JF813003.1) pravděpodobně vycházeli, existují ORF i pro VP3, protein se ale při infekci nepodařilo nalézt. VP3 se u MCPyV snažili ve stejném roce detekovat Schowalter *et al.* pomocí *Western blot* analýzy MCPyV virionů a

buněk infikovaných MCPyV, VP3 protein ale nedetekovali a v závěru studie uvádí, že spolu s dalšími PyV může na základě jejich fylogenetické analýzy MCPyV tvořit další klad virů, u kterých VP3 protein chybí. Tento klad následně rozdělují na další dvě větve, v jedné z nich se nachází RacPyV i MCPyV (*obr. 8*) (Schowalter *et al.* 2013).



Obr. 8: Fylogenetický strom čeledi Polyomaviridae:

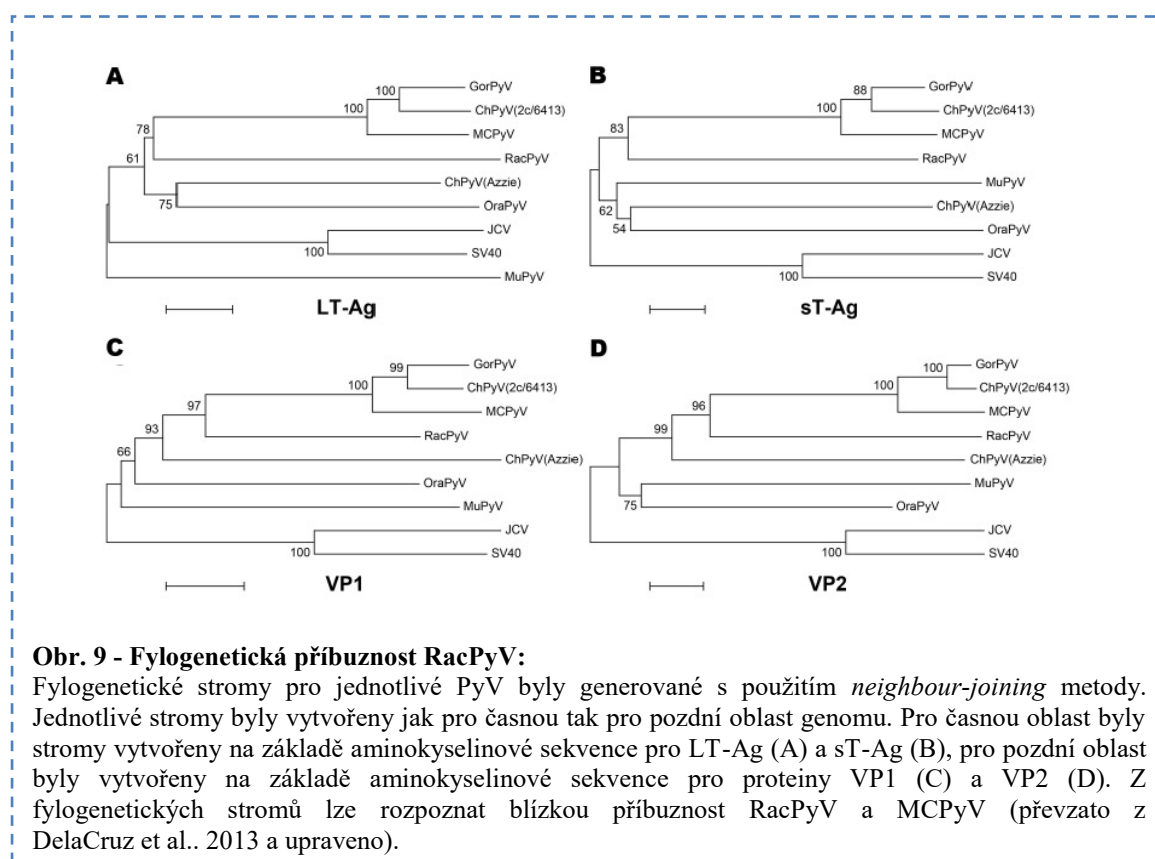
Podle Schowalter a Buck (2013) mohou PyV, u nichž nebyl detekován VP3 protein, tvořit společný klad, tedy skupinu organismů, kteří mají společného předka. Tento klad je rozdělen na dvě větve (světlá a tmavě šedá oblast). V jedné z větví uvádějí příbuzné viry RacPyV a MCPyV (vyznačeno šipkami) . (převzato z Schowalter a Buck 2013 a upraveno)

NCCR je obousměrná a obsahuje replikační počátek a promotory pro obě oblasti genomu. V NCCR oblasti se nachází vazebné místo pro LT-Ag GAGGC.

RacPyV je fylogeneticky příbuzný MCPyV (Pesavento *et al.* 2015; Chen *et al.* 2015; Dela Cruz *et al.* 2013). Pro zjištění příbuznosti byla provedena fylogenetická analýza za použití tzv. *neighbour-joining* (angl.) metody (NJ), která je založena na principu vytvoření všech možných topologií fylogenetického stromu tzn. větvení fylogenetického stromu. NJ metoda určí jako finální strom takový, který zahrnuje nejmenší možný počet celkových evolučních změn (Saitou a Nei 1987). MCPyV a RacPyV jsou si příbuzné na základě podobnosti svých genomů. Podle NJ metody jsou

příbuzné i z hlediska aminokyselinové sekvence pro LT-Ag, sT-Ag, VP1 i VP2 (obr. 9) (Dela Cruz *et al.* 2013). Oba viry obsahují ORF pro ALTO (kapitola 2.2.3.2) (Pesavento *et al.* 2015; DelaCruz *et al.* 2013).

Důkladná genomová analýza RacPyV ukazuje několik sekvenčních rozdílů mezi jednotlivými tkáňovými izoláty pocházejícími z mývalů s diagnostikovaným tumorem. U sedmi mývalů byla osekvenována celá oblast časných genů. Pouze u 2 ze 7 mývalů byl detekován STOP kodón, který individuálně odděluje sT-Ag. U zbylých 5 ze 7 mývalů byla celá oblast LT i sT-Ag kódována jako jediný ORF. Možným vysvětlením je, že pokud je sT-Ag vůbec exprimován, může být exprimován jako alternativně sestřižená forma T-Ag domény na úrovni RNA obsahující jak LT-Ag tak sT-Ag doménu nebo může docházet k proteolytickému vyštěpení sT-Ag (DelaCruz *et al.* 2013).



Obr. 9 - Fylogenetická příbuznost RacPyV:

Fylogenetické stromy pro jednotlivé PyV byly generované s použitím *neighbour-joining* metody. Jednotlivé stromy byly vytvořeny jak pro časnou tak pro pozdní oblast genomu. Pro časnou oblast byly stromy vytvořeny na základě aminokyselinové sekvence pro LT-Ag (A) a sT-Ag (B), pro pozdní oblast byly vytvořeny na základě aminokyselinové sekvence pro proteiny VP1 (C) a VP2 (D). Z fylogenetických stromů lze rozpoznat blízkou příbuznost RacPyV a MCPyV (převzato z DelaCruz *et al.* 2013 a upraveno).

Následnou analýzou pomocí metody RSEM (z angl. *RNA-sequencing by expectation-maximization*), která umožní přesnou kvantifikaci exprese genu a jeho izoform, byla zjištěna přítomnost několika izoform: LT-Ag, sT-Ag, mT-Ag a 35 kDa protein (Brostoff *et al.* 2014). LT-Ag izoforma plné délky obsahuje domény nalezené i u dalších PyV (kapitola 3.1): DnaJ doménu, pRB vazebnou doménu, OBD a helikázovou doménu. Izoforma sT-Ag byla nalezena unikátní v každém z nádorů. Podle Brostoff *et al.*

je důvodem rozdílný sestřih sT-Ag a genomové složení, např. delece 385 nukleotidů u jednoho z mývalů měla za následek vznik zkráceného sT-Ag ORF, který obsahoval pouze jeden ze dvou typických vazebných motivů pro PP2A. Ve své studii se ale Brostoff *et al.* (2014) další možností vzniku unikátních izoform sT-Ag proteolýzou nezabývali.

Pouze u jednoho z mývalů byl detekován unikátní mT-Ag, který vznikl díky deleci v oblasti 522-524 bp. Tento protein u RacPyV výjimečně kóduje DnaJ a pRB vazebné domény. Poslední nalezenou izoformou je 35 kDa protein kódovaný 35kT ORF. Tento protein (a ORF) se vyskytoval ve stejném izolátu jako mT-Ag. ORF 35kT má některé společné znaky s 57kT ORF u MCPyV a 17kT ORF u SV40. ORF pro 57kT u MCPyV dává vzniknout 57kDa proteinu a 17kT ORF dává u SV40 vzniknout 17kDa proteinu. Všechny tyto ORF obsahují tři exony, dva sestřihové spoje (v angl. *splice junction*) a obsahují DnaJ a pRB vazebné domény. Sestřihový spoj je oblast na rozhraní exon-intron, kde dochází k sestřižení. Společným znakem pro 35kT izoformu a 57kT MCPyV izoformu je společná oblast kódující LT-Ag OBD a helikázovou doménu. U 17kT izoformy a 35kT RacPyV izoformy je společným znakem třetí exon končící krátce za sestřihovým spojem, tzn. třetí exon ORF pro 35 kT leží velmi krátkým úsekem mimo čtecí rámeček LT-Ag (Brostoff *et al.* 2014).

U RacPyV byl dále detekován také ORF pro ALTO, který je přítomný také v genomu MCPyV (Pesavento *et al.* 2015; Carter *et al.* 2013). Translací tohoto ORF vzniká ALTO antigen. Jedná se o protein vznikající z alternativního čtecího rámce. Jeho přesná funkce je zatím neznámá, ale jak již bylo uvedeno (*kapitola 2.1.3.2*), nezdá se být pro replikaci virového genomu stěžejní (Pesavento *et al.* 2015; Carter *et al.* 2013). U RacPyV nebyl nalezen agnoprotein (Dela Cruz *et al.* 2013).

4.2 Onkogeneze a mývalí polyomavirus

Mozkové nádory a nádory v čichovém ústrojí mývalů byly identifikovány u mývalů v oblasti severní Kalifornie, USA. U mývalů byly dříve mozkové nádory diagnostikovány velmi vzácně a to pouze ve třech případech od roku 1948. Jednalo se o dva astrocytomy a leukosarkom s metastázemi zasahujícími do mozku (Gianitti *et al.* 2014). RacPyV byl identifikován v jádrech neoplastických buněk (buňky nádorového původu), díky imunohistochemické analýze s použitím monoklonální protilátky rozeznávající peptid, který je součástí exonu 2 LT-Ag a 57kDa izoformy MCPyV (Dela Cruz *et al.* 2013).

Oblast, kde se mývalové s nádory vyskytovali, zaujímá velmi malou plochu (nejvzdálenější body vzdálené cca 88 km). Séroprevalenční studie ukázala, že protilátky proti VP1 proteinu nejsou přítomné jen u mývalů vyskytujících se v oblasti detekce nádorů, ale i u mývalů žijících ve velmi vzdálených oblastech napříč USA a také v Kanadě. Protilátky proti VP1 proteinu byly detekovány ve více než 60 % vzorků z oblasti Kalifornie, v dalších oblastech se séroprevalence pohybovala od 5 do 57 % (Church *et al.* 2016c). U dospělých mývalů byla zjištěna vyšší séropozitivita (45,7 %) než u juvenilních mývalů (16,8 %), tak je tomu i při infekci lidskými PyV, u nichž dochází k infekci v dětství např. MCPyV (shrnutí v Spurgeon a Lambert 2013). Vzhledem k vysoké séropozitivitě na velkém území je vznik mozkových nádorů u mývalů vzácný (Church *et al.* 2016c). Vývoj nádoru u mývalů je velice rychlý neboť se volně žijící mývalové dožívají 2-3 let (DelaCruz *et al.* 2013). Při výzkumu byla u odchycených mývalů provedena eutanazie po 2-33 dnech kvůli velmi špatnému zdravotnímu stavu vlivem rychle se vyvíjejících nádorů (Gianitti *et al.* 2014).

Důležitou otázkou při zkoumání RacPyV je, v jaké formě se virus v nádorových buňkách vyskytuje. Příbuzný MCPyV se v nádorových buňkách vyskytuje v integrované formě (Feng *et al.* 2008). RacPyV byl podroben analýze metodou RCA (z angl. *Rolling Circle Amplification*) a následně pomocí *Southern blot* hybridizace, která ukázala, že se virus nevyskytuje integrovaný, ale ve formě episomu tzn. v podobě cirkulární dsDNA molekuly uvnitř nádorové buňky (Dela Cruz *et al.* 2013). Následně byla zkoumána stabilita episomu v buňkách. Z nádorových buněk byla vytvořena primární kultura, v které byl episomální genom zachován spolu s transkripcí T-Ag i po sedmnácti pasážích (Brostoff *et al.* 2014) a exprese miRNA byla zachována i po dvaceti pasážích (Chen *et al.* 2015).

In situ hybridizace s próbami specifickými pro oblast exonu 2 LT-Ag RacPyV ukázala, že je virus masivně přítomný zejména v nekrotické nádorové tkáni. Virus byl díky této metodě detekován ve všech analyzovaných mozkových nádorech mývalů (Brostoff *et al.* 2014). V průběhu dalšího výzkumu byla genomová DNA viru nalezena pomocí kvantitativní PCR v reálném čase a primerů specifických pro VP1 genomovou oblast v různých buněčných typech, ve fekáliích či moči jak mývalů s mozkovými nádory tak bez nich. Genom byl objeven v oblasti nosní sliznice, slinných žlázách, mozku, v lymfoidní tkáni (mandle a lymfatické uzliny), ledvinách a v neposlední řadě v nádorech. RacPyV DNA je detekovatelná v různých tkáních jak zdravých tak nemocných mývalů,

ale u mývalů s nádorem je její množství mnohonásobně vyšší (Church *et al.* 2016b). Virové partikule jsou v těchto tkáních produkovány v nízkých kvantitách, ale DNA je detekovatelná v mnoha tkáních, což je typické pro PyV perzistentní infekci (Church *et al.* 2016b; Chesters *et al.* 1983).

Pro reprodukci nádorových buněk *in vivo* Brostoff *et al.* transplantovali kulturu nádorových buněk jednoho z mývalů do imunodeficientních myší (xenogenní transplantace). U všech myší došlo ke vzniku nádoru a na základě amplifikace a sekvenace mitochondriální DNA bylo zjištěno, že vzniklé nádory byly mývalího původu, a že nedošlo k *de novo* virové infekci nebo transformaci (Brostoff *et al.* 2014). I tyto nádorové buňky vzniklé xenogenní transplantací si zachovávají expresi miRNA (Chen *et al.* 2015).

U RacPyV dochází k expresi miRNA, která je v nádorech snadno detekovatelná. Ve studii Chen *et al.* byla porovnávána exprese miRNA u MCPyV a RacPyV. Bylo zjištěno, že miRNA u RacPyV a MCPyV jsou si v některých oblastech velmi blízce sekvenčně podobné, což by mohlo znamenat, že RacPyV a MCPyV divergovali ze společného miRNA prekursoru (ze stejného lokusu) (Chen *et al.* 2015). RacPyV miRNA je oproti MCPyV miRNA exprimována v nádorových buňkách ve značném množství. Exprese miRNA nezabraňuje růstu nádorových buněk a podle Chen *et al.* (2015) může být spojena i s onkogenezí. Tvorba miRNA je u RacPyV závislá na Dicer proteinu. Bylo zjištěno, že miRNA je v RISC komplexu plně aktivní a může snižovat expresi časných genů. Jedná se o zvláštní regulaci, jelikož se v nádorových buňkách vyskytuje velké množství časných transkriptů i v přítomnosti miRNA. Chen *et al.* (2015) navrhuji pro tuto situaci několik vysvětlení:

- U RacPyV může pocházet protein schopný transformace buněk z transkriptu, který se vyhýbá regulaci pomocí miRNA. Může nastávat např. alternativní sestřih mRNA, při kterém dojde k vystřížení místa, jenž je rozpoznáno miRNA nebo může dojít k vytvoření struktury mRNA, která není rozpoznávána komplexem RISC.
- miRNA může regulovat množství časných proteinů, protože pokud je v buňce velké množství časného proteinu, může docházet k inhibici buněčného růstu. Optimální množství proteinu by pak na druhou stranu mohlo dávat vzniknout ideálním podmínkám pro tvorbu nádoru.

- Poslední vysvětlení je založeno na schopnosti miRNA ovlivňovat buňku a virus jak pozitivně, tak negativně. Negativní regulace pomocí miRNA by mohla být převážena jinou pro virus pozitivní funkcí miRNA, přičemž konkrétním příkladem může být cílení buněčných tumor-supresorů nebo dalších virových proteinů např. cílení pozdních virových transkriptů. Toto vysvětlení se ale samotným autorům ve studii nepodařilo potvrdit provedeným experimentem, který je založený na luciferázovém značení. Tento experiment byl proveden pomocí dvou reportérových plasmidů, jeden pro miRNA a druhý pro mRNA pozdní oblasti genomu RacPyV. Tyto plasmidy byly klonovány do vektoru, který exprimoval destabilizovanou formu *Renilla* luciferázy. Pomocí luciferázových reportérů, které obsahovaly odpovídající oblast genomu pro časné proteiny a následnou kotransfekcí bylo zjištěno, že miRNA může regulovat expresi časných genů, ale nebylo potvrzeno, že by docházelo k cílení pozdních transkriptů.

Pro pochopení onkogenních virů je přínosné vědět, která buněčná linie byla primárním zdrojem nádoru. Nádory u mývalů byly lokalizovány především podél rostrálního migračního systému a také v čichovém ústrojí, proto by nádor mohl být původem z progenitorových kmenových buněk. Rostrální migrační systém je specializovaná migrační cesta, kudy se nervové kmenové buňky dostávají do oblasti čichového bulbu. Pro identifikaci primárních nádorových buněk u RacPyV bylo vytvořeno několik buněčných kultur. Vytvořené kultury byly těchto buněčných typů: neoplastické buňky z nádorů, nervové kmenové buňky mývalů bez nádorů, astrocyty centrálního kortexu mývalů bez nádorů a buňky tubulárního epitelu ledvin mývalů bez nádorů. Nádorové buňky byly srovnány na základě růstových vlastností, které se u nich vyskytly v *in vitro* kulturách, s buňkami z tkání bez nádorů. V *in vitro* kulturách se ukázalo, že nádorové buňky rostou stejným způsobem jako nervové kmenové buňky: v médiu bez séra, vytvářejí neadherentní (nepřilnavé) neurosféry (Church *et al.* 2016b). Neurosféra je označení pro shluk neurálních buněk vytvořených v kultuře. Buňky, které jsou v této kultuře schopné vytvářet neurosféry jsou pravděpodobně buňky kmenové (shrnuto v Ahmed 2009; Reynolds a Weis 1992). Buňky infikované RacPyV exprimovaly markery kmenových buněk: *sox2*, *nestin*, *olig2* a *A2B5* a docházelo také ke koexpresi markerů nervových a gliových buněčných linií (Church *et al.* 2016b).

V kultuře nádorových buněk byla objevena DNA RacPyV asociovaná s proteinem obsahujícím bromo-doménu typu 4 (BRD4). BRD4, protein z BET rodiny proteinů,

obsahuje dvě bromo-domény, které jsou schopné rozeznat acetylované lyzinové zbytky. V normálních buňkách plní různé funkce, mezi něž patří: udržení fenotypu kmenových buněk nebo regulace buněčného cyklu (shrnutí v McBride a Jang, 2013). BRD4 protein byl zkoumán i u jiných zástupců PyV. BRD4 je zapojen do DNA transkripce a replikace u JCPyV viru (Wollebo *et al.* 2016) a u MCPyV (Wang 2012). Nejedná se ale o protein, který by se zapojoval do transkripce a replikace pouze u PyV. BRD4 je spojován s životním cyklem u čeledi *Papillomaviridae* (shrnutí v McBride a Jang, 2013) a také s čeledí *Herpesviridae*. Lidský herpesvirus typu 8 je schopný interagovat se zkrácenou formou BRD4 (Ottinger *et al.* 2006).

Chromatinová imunoprecipitace za použití protilátky proti BRD4 a PCR odhalily fyzickou asociaci DNA **RacPyV s BRD4** v kultuře nádorových buněk. Inhibice BRD4 (malými molekulárními inhibitory JQ1 a IBET-151) se projevila zrušením exprese markerů kmenových buněk a zvýšenou expresí cytoplasmatických filamentárních proteinů, což indukuje zvýšenou diferenciaci buněk. Dále má inhibice BRD4 negativní vliv na snížení životaschopnosti buněk a proliferaci (snížený poměr buněk v S-fázi analyzován průtokovou cytometrií). BRD4 se tedy podílí na transformaci kmenových buněk infikovaných RacPyV udržováním jejich kmenového stavu a udržováním transkripce virových genů (Church *et al.* 2016b). Podle Church *et al.* (2016) RacPyV infikuje nejprve nervové kmenové buňky. Infekce kmenových buněk, udržení jejich kmenového stavu a následná transkripce virových genů mohou být důvodem, proč se nádory nachází pouze v čichovém ústrojí, i když se RacPyV vyskytuje v různých tkáních (Church *et al.* 2016b). Čichové ústrojí je vzhledem k anatomické lokalizaci místem, kde může docházet k přenosu infekce skrz horní cesty dýchací (Gianitti *et al.* 2014).

Při onkogenezi, kterou způsobují PyV jsou důležité proteiny pRB a tumor supresor p53 (*kapitoly 3.1.2 a 3.1.1.*). Podle genomové analýzy bylo zjištěno, že v genomu RacPyV je obsaženo vazebné místo pro pRB (LxCxE motiv). V nádorových buňkách dochází oproti normálním buňkám (buňky mozkové tkáně mývalů bez nádoru) k vyšší expresi pRb proteinu a vyšší transkripci E2F, který je v těchto buňkách vysoce aktivní (Pesavento *et al.* 2015). Přítomnost Walker A box sekvence (GPxxxGKT) může z LT-Ag RacPyV dělat ATPázu vázající p53 tumor-supresor. Imunohistochemickou analýzou byla zjištěna přítomnost LT-Ag a wt-p53 (z angl. *wild type*) v jádrech neoplastických buněk (Dela Cruz *et al.* 2013). F. N. DelaCruz, T. Brostoff a

P. A. Pesavento ukázali, že je transkripce p53 v různých nádorech proměnlivá vzhledem ke kontrolnímu vzorku zdravé mozkové tkáně (Pesavento *et al.* 20115).

4.3 Mývalí polyomavirus: příklad nebo výjimka?

RacPyV se vyskytuje v mývalech s vysokou prevalencí (60 %), což je typické pro perzistentní infekci PyV (Church *et al.* 2016c), ke které dochází v semipermissivních nebo nepermissivních buňkách. Pro perzistentní infekci je typická i přítomnost virové DNA v mnoha různých tkáních, přičemž identifikace virionů v hostiteli je jen v nízkých kvantitách (Church *et al.* 2016b), což z mývala nemusí nutně dělat konečného hostitele pro RacPyV jak se původně předpokládalo (DelaCruz *et al.* 2013).

Zajímavé je, že infekce různými PyV odlišných buněčných kultur vede i k různým projevům, vzniku odlišných typů nádorů a k odlišnému virovému tropismu. Nádory způsobené RacPyV jsou nebývale uniformní, protože se vytváří pouze v mozkové tkáni nebo čichovém ústrojí (DelaCruz *et al.* 2013). Tento fenomén může vysvětlovat především přímá vazba s proteinem BRD4 v infikovaných kmenových buňkách, protože vazbou s BRD4 je udržován kmenový stav buněk, následkem virové transkripce pak může docházet k indukci nádoru pouze v mozku nebo čichovém ústrojí (Church *et al.* 2014b). Přínosem pro výzkum (nejen) uniformity nádorů by mohla být studie zabývající se tkáňovým tropismem RacPyV a receptory umožňujícími produktivní infekci.

RacPyV se vyskytuje v buňkách v episomální formě stejně jako SV40 v buňkách S-HML (DelaCruz *et al.* 2013; Carbone *et al.* 2008). U buněk S-HML bylo zjištěno, že k transformaci přispívá nekódující RNA, která vzniká při transkripci časně oblasti genomu a dále se podílí na degradaci mRNA pro pozdní oblast genomu proteinem Dicer (Carbone *et al.* 2008). U RacPyV dochází k regulaci časných genů pomocí miRNA, která se nachází v časně oblasti genomu (Chen *et al.* 2015). U SV40 a S-HML buněk je jasné, že přítomnost nekódující RNA je stěžejní pro degradaci pozdních transkriptů (Carbone *et al.* 2008). Podle Chen *et al.* (2015), ale k cílení pozdních transkriptů pomocí virem kódované miRNA nedochází, i když je miRNA plně aktivní v RISC komplexu. Dochází pouze k negativní regulaci časných proteinů. Je jasné, že mechanismus degradace pozdních transkriptů pomocí RNA interference je velice zajímavou možností využívanou virem SV40 pro transformaci S-HML buněk, jestli se ale miRNA podílí na transformaci mývalích neoplastických buněk je prozatím nejasné. Virová miRNA se ale v

neoplastických mývalích buňkách vyskytuje ve vysoké míře i s časnými mRNA transkripty, což je velice zajímavý jev pokud vezmeme v potaz negativní regulaci časných proteinů pomocí miRNA (Chen *et al.* 2015).

U MCPyV i SV40 a RacPyV izolovaného u jednoho z mývalů byl identifikován třetí časný antigen, konkrétně se jedná o 35kT protein u RacPyV, 57kT protein u MCPyV a 17kT protein u SV40. Všechny tři vznikají alternativním sestřihem. U 57kT proteinu byly identifikovány J-doména, MUR, pRb vazebné místo s LxCxE motivem avšak vliv na tumorogenezi zatím nebyl prokázán. 57kT může být považován za analog 17 kT proteinu u SV40 (Zerrahn *et al.* 1993), který se nezávisle nebo společně s sT-Ag a LT-Ag podílí na buněčné proliferaci *in vivo* (Comerford *et al.* 2012). Jelikož se 35kT protein vyznačuje některými společnými znaky s 57kT a 17kT je možné, že se také podílí na buněčné proliferaci *in vivo*, vliv na transformaci ale prozatím nebyl prokázán. Třetí časný antigen se vyskytoval pouze u RacPyV s delecí v oblasti 522-524 bp, což znamená, že tento unikátní protein může být v genomu RacPyV pouhou výjimkou stejně jako mT-Ag vzniklý stejnou delecí, které na transformaci buněk nemají vliv, neboť u ostatních vzorků bez 35kT izoformy a mT-Ag nebyla transformační aktivita narušena.

Pro onkogenezi způsobenou PyV je typická vazba proteinů RB rodiny. U RacPyV byl detekován LxCxE vazebný motiv pro pRb protein. Zvýšená exprese pRb a transkripce E2F (Pesavento *et al.* 2015) vede k závěru, že s pomocí pRb proteinu může být LT-Ag RacPyV schopen ovlivňovat buněčnou proliferaci. U RacPyV nebyla provedena studie, která by dokazovala, že vazba pRb s pomocí LxCxE motivu může indukovat transformaci. U SV40 bylo dokázáno, že mutanty s chybějícím LxCxE motivem jsou při transformaci defektní (*kapitola 3.1.1*).

Interakce s p53 je spojována s Walker A sekvencí, přítomnost této sekvence odhalila genomová analýza, což ale neznamená, že se RacPyV nezbytně podílí na inhibici funkce p53 a jeho stabilizaci (DelaCruz *et al.* 2013). Jako příklad lze uvést studii Borchert *et al.* (2014), jehož výzkumný tým zjistil, že LT-Ag neváže p53 přímo. Kombinace inhibice funkce p53 spolu s umlčením pozdních transkriptů umožní viru existovat v podobě episomu a indukovat vznik nádorů (Carbon *et al.* 2008). Z toho vyplývá, že nejspíš dochází k umlčování pozdních transkriptů společně s vazbou p53, aby mohl virus v podobě episomu indukovat vznik nádorů. Pro potvrzení vazby LT-Ag a p53, ať přímé či nepřímé, je zapotřebí dalších studií, které by se této problematice věnovaly více.

Karcinom Merkelových buněk je velmi agresivním rakovinným onemocněním kůže. Nádory vznikající u mývalů vlivem RacPyV jsou také velmi agresivní a stejně jako MCC jsou schopné metastázovat (Kouzmina *et al.* 2017; DelaCruz *et al.* 2013). Unikátnost RacPyV je spojována především s jeho výskytem v nádorech a metastázích v podobě stabilního episomu, a přítomností velkého množství miRNA i v přítomnosti velkého množství časných proteinů. U RacPyV prozatím nebyl zkoumána indukce genomové nestability, která je spojována s transformačním potenciálem např. u SV40 a MCPyV (Kwun *et al.* 2017; shrnuto v Carter a Saunders 2007).

5 Závěr

Polyomaviry byly odjakživa spojovány s indukcí nádorů nejen v laboratorních podmínkách. RacPyV je nově objevený polyomavirus asociovaný s nádory mozku a čichového ústrojí u volně žijících mývalů. Jedná se o velmi agresivní nádory, které se velmi rychle vyvíjejí. MCPyV spojený s karcinomem Merkelových buněk u lidí je prozatím nejbližší příbuzný RacPyV. MCPyV byl identifikován v nádorových buňkách integrovaný do genomu hostitelské buňky, ačkoliv jsou si RacPyV a MCPyV příbuzní na základě podobnosti genomů, vyskytuje se RacPyV v hostitelské buňky v podobě episomu. Oba viry kódují miRNA lokalizovanou ve stejné oblasti genomu, která je nekódujícím vláknem vzhledem k časně oblasti. U RacPyV vzniká miRNA v mnohonásobně větším množství než v buňkách infikovaných MCPyV, kde byla miRNA často i pod detekčním minimem použité metody. RacPyV indukované nádory jsou schopné snadno tolerovat vysokou koncentraci miRNA společně s velkým množstvím časných proteinů, což je nezvyklé vzhledem k negativní regulaci časných proteinů typické pro PyV miRNA.

Tato práce shrnuje dosud známé poznatky o onkogenezi PyV v porovnání s nově objeveným RacPyV. U RacPyV je zapotřebí se dále věnovat především vlivu miRNA na regulaci časných transkriptů a možnému novému mechanismu indukce transformace u PyV s pomocí miRNA. Dále by se měl výzkum soustředit na interakci RacPyV s buněčnými proteiny, které mohou ovlivňovat jeho transformační potenciál (konkrétně p53 a pRB) a v neposlední řadě podmínkám, při kterých bezpodmínečně dochází k transformaci buněk a vzniku agresivních nádorů mývalů. Pochopení mechanismu onkogeneze na zvířecím modelu a jeho odlišností např. od MCPyV může vést k rozklíčování některých otázek v karcinogenezi lidských PyV.

6 Seznam použité literatury

AHMED, Sohail. The culture of neural stem cells. *Journal of Cellular Biochemistry* [online]. 2009, 106(1), 1-6 [cit. 2018-04-06]. DOI: 10.1002/jcb.21972. ISSN 07302312.

AHUJA, Deepika, M Teresa SÁENZ-ROBLES, James M PIPAS, R. E. PARSONS, M. E. ANDERSON a P. TEGTMEYER. SV40 large T antigen targets multiple cellular pathways to elicit cellular transformation. *Oncogene* [online]. 2005, 24(52), 7729-7745 [cit. 2018-05-07]. DOI: 10.1038/sj.onc.1209046. ISSN 0950-9232.

ALWINE, J.C., S.I. REED a G.R. STARK. Characterization of the autoregulation of simian virus 40 gene A. *Journal of Virology* [online]. 1977, 24(1), 22 - 27 [cit. 2018-03-01]. ISSN 0022538X.

ARTHUR, A.K., A. HOSS a E. FANNING. Expression of simian virus 40 T antigen in *Escherichia coli*: Localization of T-antigen origin DNA-binding domain to within 129 amino acids. *Journal of Virology*[online]. 1988, 62(6), 1999 - 2006 [cit. 2018-04-17]. ISSN 0022538X.

BARGONETTI, J., I. REYNISDOTTIR, P.N. FRIEDMAN a C. PRIVES. Site-specific binding of wild-type p53 to cellular DNA is inhibited by SV40 T antigen and mutant p53. *Genes and Development* [online]. 1992, 6(10), 1886 - 1898 [cit. 2018-04-19]. DOI: 10.1101/gad.6.10.1886. ISSN 08909369.

BEN-NUN-SHAUL, Orly, Hagit BRONFELD, Dan RESHEF, Ora SCHUELER-FURMAN a Ariella OPPENHEIM. The SV40 Capsid Is Stabilized by a Conserved Pentapeptide Hinge of the Major Capsid Protein VP1. *Journal of Molecular Biology* [online]. 2009, 386(5), 1382-1391 [cit. 2017-11-30]. DOI: 10.1016/j.jmb.2008.11.034. ISSN 00222836.

BERGER, H. a E. WINTERSBERGER. Polyomavirus small T antigen enhances replication of viral genomes in 3T6 mouse fibroblasts. *Journal of Virology* [online]. 1986, 60(2), 768 - 770 [cit. 2018-03-02]. ISSN 0022538X.

BOCCHETTA, Maurizio, Ilaria Di DI RESTA, Amy POWERS, et al. Human Mesothelial Cells Are Unusually Susceptible to Simian Virus 40-Mediated Transformation and Asbestos Cocarcinogenicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* [online]. 2000, 97(18), 10214-10219 [cit. 2018-05-01]. ISSN 00278424.

BOCCHETTA, Maurizio, Sandra ELIASZ, Melissa Arakelian DE MARCO, Jennifer RUDZINSKI, Lei ZHANG a Michele CARBONE. The SV40 large T antigen-p53 complexes bind and activate the insulin-like growth factor-I promoter stimulating cell growth. *CANCER RESEARCH* [online]. 2008, 68(4), 1022-1029 [cit. 2018-03-26]. ISSN 00085472.

BOCHKAREVA, Elena, Dariusz MARTYNOWSKI, Almagoul SEITOVA a Alexey BOCHKAREV. Structure of the origin-binding domain of simian virus 40 large T antigen bound to DNA. *The EMBO Journal* [online]. 2006, 25(24), 5961-5969 [cit. 2018-03-01]. DOI: 10.1038/sj.emboj.7601452. ISSN 0261-4189.

BOLLAG, Brigitte, Catherine A. HOFSTETTER, Marta M. REVIRIEGO-MENDOZA, Richard J. FRISQUE a Wang-Shick RYU. JC Virus Small t Antigen Binds Phosphatase PP2A and Rb Family Proteins and Is Required for Efficient Viral DNA Replication Activity. *PLoS ONE* [online]. 2010, 5(5), e10606- [cit. 2018-03-02]. DOI: 10.1371/journal.pone.0010606. ISSN 1932-6203.

BORGER, Darrell R. a James A. DECAPRIO. Targeting of p300/CREB Binding Protein Coactivators by Simian Virus 40 Is Mediated through p53. *Journal of Virology* [online]. 2006, 80(9), 4292-4303 [cit. 2018-04-29]. DOI: 10.1128/JVI.80.9.4292-4303.2006. ISSN 0022-538X.

BORCHERT, S., M. CZECH-SIOLI, F. NEUMANN, C. SCHMIDT, P. WIMMER, T. DOBNER, A. GRUNDHOFF a N. FISCHER. High-affinity Rb binding, p53 inhibition, subcellular localization, and transformation by wild-type or tumor-derived shortened Merkel cell polyomavirus large T antigens. *Journal of Virology* [online]. 2014, 88(6), 3144-3160 [cit. 2018-05-04]. DOI: 10.1128/JVI.02916-13. ISSN 0022-538X.

BOTCHAN M, TOPP W a SAMBROOK J. The arrangement of simian virus 40 sequences in the DNA of transformed cells. *Cell* [online]. 1976, 9(2), 269-87 [cit. 2018-05-01]. ISSN 00928674.

BROSTOFF, T., F. N. DELA CRUZ, M. E. CHURCH, K. D. WOOLARD a P. A. PESAVENTO. The Raccoon Polyomavirus Genome and Tumor Antigen Transcription Are Stable and Abundant in Neuroglial Tumors. *Journal of Virology* [online]. 2014, 88(21), 12816-12824 [cit. 2018-03-25]. DOI: 10.1128/JVI.01912-14. ISSN 0022-538X.

CAMPBELL, Kathryn S., Karen .P MULLANE, Ibrahim A. AKSOY, et al. DnaJ/hsp40 chaperone domain of SV40 large T antigen promotes efficient viral DNA replication. Cold Spring Harbor Laboratory Press[online]. 1997, 11(9), 1098-1110 [cit. 2018-04-17]. DOI: 10.1101/gad.11.9.1098. ISSN 0890-9369.

CARBONE M, PANNUTI A, ZHANG L, TESTA JR a BOCCHETTA M. A novel mechanism of late gene silencing drives SV40 transformation of human mesothelial cells. *Cancer Research* [online]. 2008, 68(22), 9488-96 [cit. 2018-05-01]. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-08-2332. ISSN 15387445.

CARTER, J. J., M. D. DAUGHERTY, X. QI, et al. Identification of an overprinting gene in Merkel cell polyomavirus provides evolutionary insight into the birth of viral genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. 2013, 110(31), 12744-12749 [cit. 2018-03-02]. DOI: 10.1073/pnas.1303526110. ISSN 0027-8424.

CARTER, John B. a Venetia A. SAUNDERS. *Virology: principles and applications*. Hoboken, NJ: John Wiley, c2007. ISBN 978-0-470-02386-0.

CICALA C, AVANTAGGIATI ML, GRAESSMANN A, RUNDELL K, LEVINE AS a CARBONE M. Simian virus 40 small-t antigen stimulates viral DNA replication in permissive monkey cells. *Journal Of Virology* [online]. 1994, 68(5), 3138-44 [cit. 2018-03-02]. ISSN 0022538X.

COMERFORD, S A, N SCHULTZ, E A HINNANT, S KLAPPROTH a R E HAMMER. Comparative analysis of SV40 17kT and LT function in vivo demonstrates that LT's C-terminus re-programs hepatic gene expression and is necessary for tumorigenesis in the liver. *Oncogenesis* [online]. 2012, 1(9), e28-e28 [cit. 2018-05-05]. DOI: 10.1038/oncsis.2012.27. ISSN 2157-9024.

COTSIKI, M., R. L. LOCK, Y. CHENG, et al. Simian virus 40 large T antigen targets the spindle assembly checkpoint protein Bub1. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. 2004, 101(4), 947-952 [cit. 2018-03-18]. DOI: 10.1073/pnas.0308006100. ISSN 0027-8424.

COURTNEIDGE, Sara A. a Alan E. SMITH. Polyoma virus transforming protein associates with the product of the c-src cellular gene. *Nature* [online]. 1983, 303(5916), 435-439 [cit. 2018-04-20]. DOI: 10.1038/303435a0. ISSN 0028-0836.

DAILEY, L. a C. BASILICO. Sequences in the polyomavirus DNA regulatory region involved in viral DNA replication and early gene expression. *Journal of Virology* [online]. 1985, 54(3), 739 - 749 [cit. 2018-03-01]. ISSN 0022538X.

DEAN, Frank B., James A. BOROWIEC, Yukio ISHIMI, Sumitra DEB, Peter TEGTMEYER a Jerard HURWITZ. Simian Virus 40 Large Tumor Antigen Requires Three Core Replication Origin Domains for DNA Unwinding and Replication in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* [online]. 1987, 84(23), 8267-8271 [cit. 2018-05-07]. ISSN 00278424.

DEB, Swati Palit a P. TEGTMEYER. ATP enhances the binding of simian virus 40 large T antigen to the origin of replication. *Journal of Virology* [online]. 1987, 61(12), 3649 - 3654 [cit. 2018-05-07]. ISSN 0022538X.

DECAPRIO, J.A., J.W. LUDLOW, J. FIGGE, et al. SV40 large tumor antigen forms a specific complex with the product of the retinoblastoma susceptibility gene. *Cell* [online]. 1988, 54(2), 275 - 283 [cit. 2018-03-18]. DOI: 10.1016/0092-8674(88)90559-4. ISSN 00928674.

DECAPRIO, James A. a Robert L. GARCEA. A cornucopia of human polyomaviruses. *Nature Reviews Microbiology* [online]. 2013, 11(4), 264-276 [cit. 2018-03-01]. DOI: 10.1038/nrmicro2992. ISSN 1740-1526.

DELA CRUZ, Florante N., Federico GIANNITTI, Linlin LI, Leslie W. WOODS, Luis DEL VALLE, Eric DELWART a Patricia A. PESAVENTO. Novel Polyomavirus associated with Brain Tumors in Free-Ranging Raccoons, Western United States. *Emerging Infectious Diseases* [online]. 2013, 19(1), 77-84 [cit. 2017-11-30]. DOI: 10.3201/eid1901.121078. ISSN 1080-6040.

DELOS, Sue E., Timothy P. CRIPE, Andrew D. LEAVITT, Harvey GREISMAN a Robert L. GARCEA. Expression of the Polyomavirus Minor Capsid Proteins VP2 and VP3 in Escherichia coli: In Vitro Interactions with Recombinant VP1 Capsomeres. *Journal of Virology* [online]. 1995, 69(12), 7734 [cit. 2017-11-30].

DU, W a J POGORILER. Retinoblastoma family genes. *Oncogene* [online]. 2006, 25(38), 5190-5200 [cit. 2018-03-18]. DOI: 10.1038/sj.onc.1209651. ISSN 0950-9232.

DYSON, Nicholas, Rene BERNARDS, Stephen H. FRIEND, et al. Large T antigens of many polyomaviruses are able to form complexes with the retinoblastoma protein. *Journal Of Virology* [online]. 1990, 64(3), 1353-6 [cit. 2018-04-18]. ISSN 0022538X.

ELLIS, Laura C., Elizabeth NORTON, Xin DANG, Igor J. KORALNIK a Robert Shin FUJINAMI. Agnogene Deletion in a Novel Pathogenic JC Virus Isolate Impairs VP1 Expression and Virion Production. *PLoS ONE*[online]. 2013, 8(11), e80840- [cit. 2018-03-02]. DOI: 10.1371/journal.pone.0080840. ISSN 1932-6203.

ERICKSON, Kimberly D., Cedric BOUCHET-MARQUIS, Katie HEISER, et al. Virion Assembly Factories in the Nucleus of Polyomavirus-Infected Cells. *PLoS Pathogens* [online]. 2012, 8(4), e1002630- [cit. 2018-03-02]. DOI: 10.1371/journal.ppat.1002630. ISSN 1553-7374.

FANG, Chiung-Yao, Hsiang-Ying CHEN, Meilin WANG, et al. Global analysis of modifications of the human BK virus structural proteins by LC-MS/MS. *Virology* [online]. 2010, 402(1), 164-176 [cit. 2018-02-17]. DOI: 10.1016/j.virol.2010.03.029. ISSN 00426822.

FENG, H., M. SHUDA, Y. CHANG a P. S. MOORE. Clonal Integration of a Polyomavirus in Human Merkel Cell Carcinoma. *Science* [online]. 2008, 319(5866), 1096-1100 [cit. 2017-11-30]. DOI: 10.1126/science.1152586. ISSN 0036-8075.

FREARSON, P. M. a L. V. CRAWFORD. Polyoma Virus Basic Proteins. *Journal of General Virology* [online]. 1972, 14(2), 141-155 [cit. 2018-02-17]. DOI: 10.1099/0022-1317-14-2-141. ISSN 0022-1317.

FRIEDMANN, THEODORE, RUSSELL F. DOOLITTLE a GERNOT WALTER. Amino acid sequence homology between polyoma and SV40 tumour antigens deduced from nucleotide sequences. *Nature* [online]. 1978, 274(5668), 291-293 [cit. 2018-04-26]. DOI: 10.1038/274291a0. ISSN 0028-0836.

GIANNITTI, F., R. J. HIGGINS, P. A. PESAVENTO, et al. Temporal and Geographic Clustering of Polyomavirus-Associated Olfactory Tumors in 10 Free-Ranging Raccoons (*Procyon lotor*). *Veterinary Pathology* [online]. 2013, 51(4), 832-845 [cit. 2018-02-19]. DOI: 10.1177/0300985813502817. ISSN 0300-9858.

GRUDA, M.C., J.M. ZABOLOTNY, JIA HAO XIAO, I. DAVIDSON a J.C. ALWINE. Transcriptional activation by simian virus 40 large T antigen: Interactions with multiple components of the transcription complex. *Molecular and Cellular Biology* [online]. 1993, 13(2), 961 - 969 [cit. 2018-03-02]. DOI: 10.1128/MCB.13.2.961. ISSN 02707306.

HABEL, Karl. Specific complement-fixing antigens in polyoma tumors and transformed cells. *Virology*[online]. 1965, 25(1), 55-61 [cit. 2018-03- 01]. DOI: 10.1016/0042-6822(65)90251-5. ISSN 00426822.

HARTL, F. Ulrich. Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature* [online]. 1996, 381(6583), 571-580 [cit. 2018-04-17]. DOI: 10.1038/381571a0. ISSN 0028-0836.

HERMANNSTADTER, A., C. ZIEGLER, M. KUHL, W. DEPERT a G. V. TOLSTONOG. Wild-Type p53 Enhances Efficiency of Simian Virus 40 Large-T-Antigen-Induced Cellular Transformation. *Journal of Virology*[online]. 2009, 83(19), 10106-10118 [cit. 2018-04-29]. DOI: 10.1128/JVI.00174-09. ISSN 0022-538X.

HORVATH CJ, SIMON MA, BERGSAGEL DJ, PAULEY DR, KING NW, GARCEA RL a RINGLER DJ. Simian virus 40-induced disease in rhesus monkeys with simian acquired immunodeficiency syndrome. *The American Journal Of Pathology* [online]. 1992, 140(6), 1431-40 [cit. 2018-03-13]. ISSN 00029440.

CHEN S a PAUCHA E. Identification of a region of simian virus 40 large T antigen required for cell transformation. *Journal Of Virology* [online]. 1990, 64(7), 3350-7 [cit. 2018-04-29]. ISSN 0022538X.

CHEN, Chun Jung, Jennifer E. COX, Kristopher D. AZARM, Karen N. WYLIE, Kevin D. WOOLARD, Patricia A. PESAVENTO a Christopher S. SULLIVAN. Identification of a polyomavirus microRNA highly expressed in tumors. *Virology* [online]. 2015, 476, 43-53 [cit. 2018-03-25]. DOI: 10.1016/j.virol.2014.11.021. ISSN 00426822.

CHENG, J., O. ROZENBLATT-ROSEN, K. G. PAULSON, P. NGHIEM a J. A. DECAPRIO. Merkel Cell Polyomavirus Large T Antigen Has Growth-Promoting and Inhibitory Activities. *Journal of Virology*[online]. 2013, 87(11), 6118-6126 [cit. 2018-05-04]. DOI: 10.1128/JVI.00385-13. ISSN 0022-538X.

CHENG, Jingwei, James A. DECAPRIO, Michele M. FLUCK a Brian S. SCHAFFHAUSEN. Cellular transformation by Simian Virus 40 and Murine Polyoma Virus T antigens. *Seminars in Cancer Biology*[online]. 2009, 19(4), 218-228 [cit. 2018-04-29]. DOI: 10.1016/j.semcancer.2009.03.002. ISSN 1044579X.

CHESTERS, P. M., J. HERITAGE a D. J. MCCANCE. Persistence of DNA Sequences of BK Virus and JC Virus in Normal Human Tissues and in Diseased Tissues. *Journal of Infectious Diseases* [online]. 1983, 147(4), 676-684 [cit. 2018-04-25]. DOI: 10.1093/infdis/147.4.676. ISSN 0022-1899.

CHURCH, M.E., F.N. DELA CRUZ, M. ESTRADA, C.M. LEUTENEGGER, P.A. PESAVENTO a K.D. WOOLARD. Exposure to raccoon polyomavirus (RacPyV) in free-ranging North American raccoons (*Procyon lotor*). *Virology* [online]. 2016c, (489), 292-299 [cit. 2018-04-25]. DOI: 10.1016/j.virol.2015.11.033. ISSN 00426822.

CHURCH, Molly E., Florante N. DELA CRUZ, Kevin KIM, Michele PERSIANI, Leslie W. WOODS, Patricia A. PESAVENTO a Kevin D. WOOLARD. Production of a recombinant capsid protein VP1 from a newly described polyomavirus (RacPyV) for downstream use in virus characterization. *Data in Brief*, Vol 7, Iss C, Pp 60-65 (2016) [online]. 2016a, 7(C), 60-65 [cit. 2018-03-25]. DOI: 10.1016/j.dib.2016.01.070. ISSN 23523409.

CHURCH, Molly E., Marko ESTRADA, Christian M. LEUTENEGGER, Florante N. DELA CRUZ, Patricia A. PESAVENTO a Kevin D. WOOLARD. BRD4 is associated with raccoon polyomavirus genome and mediates viral gene transcription and maintenance of a stem cell state in neuroglial tumour cells. *Journal of General Virology* [online]. 2016b, 97(11), 2939-2948 [cit. 2018-03-25]. DOI: 10.1099/jgv.0.000594. ISSN 0022-1317.

ITO, Yoshiaki. Polyoma virus-specific 55K protein isolated from plasma membrane of productively infected cells is virus-coded and important for cell transformation. *Virology* [online]. 1979, 98(1), 261-266 [cit. 2018-04-20]. DOI: 10.1016/0042-6822(79)90545-2. ISSN 00426822.

IYER, Narayanan Gopalakrishna, Hilal ÖZDAG a Carlos CALDAS. P300/CBP and cancer. *Oncogene* [online]. 2004, 23(24), 4225-4231 [cit. 2018-04-29]. DOI: 10.1038/sj.onc.1207118. ISSN 0950-9232.

JAY, Gilbert, Shigeko NOMURA, Carl W. ANDERSON a George KHOURY. Identification of the SV40 agnogene product: a DNA binding protein. *Nature* [online]. 1981, 291(5813), 346-349 [cit. 2018-03-02]. DOI: 10.1038/291346a0. ISSN 0028-0836.

KASPER, J. S., H. KUWABARA, T. ARAI, S. H. ALI a J. A. DECAPRIO. Simian Virus 40 Large T Antigen's Association with the CUL7 SCF Complex Contributes to Cellular Transformation. *Journal of Virology*[online]. 2005, 79(18), 11685-11692 [cit. 2018-03-18]. DOI: 10.1128/JVI.79.18.11685-11692.2005. ISSN 0022-538X.

KELLEY WL a LANDRY SJ. Chaperone power in a virus?. *Trends In Biochemical Sciences* [online]. 1994, 19(7), 277-8 [cit. 2018-03-18]. ISSN 09680004.

KNIFE, David M. a Peter M. HOWLEY. *Fields virology*. 6th ed. Philadelphia, PA: Wolters Kluwer/Lippincott Williams, c2013. ISBN 978-145-1105-636.

KOUZMINA, Maria, Virve KOLJONEN, Junnu LEIKOLA, Tom BÖHLING a Eila LANTTO. Frequency and locations of systemic metastases in Merkel cell carcinoma by imaging. *Acta Radiologica Open* [online]. 2017, 6(3), 205846011770044- [cit. 2018-05-08]. DOI: 10.1177/2058460117700449. ISSN 2058-4601.

KWUN, H J, J A WENDZICKI, Y SHUDA, P S MOORE a Y CHANG. Merkel cell polyomavirus small T antigen induces genome instability by E3 ubiquitin ligase targeting: inverse association with cytotoxic drug sensitivity in KRAS mutant lung cancer. *Oncogene* [online]. 2017, 36(49), 6784-6792 [cit. 2018-05-09]. DOI: 10.1038/onc.2017.277. ISSN 0950-9232.

LAKE, Robert S., Stanley BARBAN a Norman P. SALZMAN. Resolutions and identification of the core deoxynucleoproteins of the simian virus 40. *Biochemical and Biophysical Research Communications*[online]. 1973, 54(2), 640-647 [cit. 2018-02-17]. DOI: 10.1016/0006-291X(73)91471-X. ISSN 0006291x.

LANE, D. P. a L. V. CRAWFORD. T antigen is bound to a host protein in SY40-transformed cells. *Nature*[online]. 1979, 278(5701), 261-263 [cit. 2018-04-19]. DOI: 10.1038/278261a0. ISSN 0028-0836.

LANFORD, R.E. a J.S. BUTEL. Construction and characterization of an SV40 mutant defective in nuclear transport of T antigen. *Cell* [online]. 1984, 37(3), 801 - 813 [cit. 2018-04-17]. DOI: 10.1016/0092-8674(84)90415-X. ISSN 00928674.

LASSAK, Adam, Luis DEL VALLE, Francesca PERUZZI, Jin Ying WANG, Sahnila ENAM, Sidney CROUL, Kamel KHALILI a Krzysztof REISS. Insulin Receptor Substrate 1 Translocation to the Nucleus by the Human JC Virus T-antigen. *Journal of Biological Chemistry* [online]. 2002, 277(19), 17231-17238 [cit. 2018-04-19]. DOI: 10.1074/jbc.M110885200. ISSN 0021-9258.

LILL, N.L., R. ECKNER, D.M. LIVINGSTON, N. MODJTAHEDI a M.J. TEVETHIA. P300 Family members associate with the carboxyl terminus of simian virus 40 large tumor antigen. *Journal of Virology* [online]. 1997, 71(1), 129 - 137 [cit. 2018-04-29]. ISSN 0022538X.

LINZER, D.I.H. a A.J. LEVINE. Characterization of a 54K Dalton cellular SV40 tumor antigen present in SV40-transformed cells and uninfected embryonal carcinoma cells. *Cell* [online]. 1979, 17(1), 43 - 52 [cit. 2018-04-19]. DOI: 10.1016/0092-8674(79)90293-9. ISSN 00928674.

LIU, X., J. HEIN, T. TOPTAN, P.S. MOORE, O.V. GJOERUP, Y. CHANG, P.H. BASSE a S.C.W. RICHARDSON. Merkel cell polyomavirus large T antigen disrupts lysosome clustering by translocating human Vam6p from the cytoplasm to the nucleus. *Journal of Biological Chemistry* [online]. 2011, 286(19), 17079 - 17090 [cit. 2018-05-01]. DOI: 10.1074/jbc.M110.192856. ISSN 00219258.

LOEBER, G., J. E. STENGER, S. RAY, R. E. PARSONS, M. E. ANDERSON a P. TEGTMEYER. The zinc finger region of simian virus 40 large T antigen is needed for hexamer assembly and origin melting. *Journal Of Virology* [online]. 1991, 65(6), 3167-74 [cit. 2018-05-07]. ISSN 0022538X.

*LONG, S.-B., H.-Y. HO, C.-L. CHEN a M.-D. LAI. Complex of simian virus large T antigen and p53 can bind DNA specifically. *Anticancer Research* [online]. 1995, 15(4), 1375 - 1380 [cit. 2018-04-19]. ISSN 02507005.

LUDLOW, John W., James A. DECAPRIO, Eva PAUCHA, David M. LIVINGSTON, Chun-Ming HUANG a Wen-Hwa LEE. SV40 large T antigen binds preferentially to an underphosphorylated member of the retinoblastoma susceptibility gene product family. *Cell* [online]. 1989, 56(1), 57 - 65 [cit. 2018-04-18]. DOI: 10.1016/0092-8674(89)90983-5. ISSN 00928674.

MASTRANGELO, Iris A., Paul V. C. HOUGH, Joseph S. WALL, Mark DODSON, Frank B. DEAN a Jerard HURWRTZ. ATP-dependent assembly of double hexamers of SV40 T antigen at the viral origin of DNA replication. *Nature* [online]. 1989, 338(6217), 658-662 [cit. 2018-04-17]. DOI: 10.1038/338658a0. ISSN 0028-0836.

MCBRIDE, Alison a Moon JANG. Current Understanding of the Role of the Brd4 Protein in the Papillomavirus Lifecycle. *Viruses* [online]. 2013, 5(6), 1374-1394 [cit. 2018-04-06]. DOI: 10.3390/v5061374. ISSN 1999-4915.

MOENS, Ugo, Andi KRUMBHOLZ, Bernhard EHLERS, Roland ZELL, Reimar JOHNE, Sébastien CALVIGNAC-SPENCER a Chris LAUBER. Biology, evolution, and medical importance of polyomaviruses: An update. *Infection, Genetics and Evolution* [online]. 2017b, 54, 18-38 [cit. 2018-03-01]. DOI: 10.1016/j.meegid.2017.06.011. ISSN 15671348.

MOENS, Ugo, Sébastien CALVIGNAC-SPENCER, Chris LAUBER, Torbjörn RAMQVIST, Mariet C.W. FELTKAMP, Matthew D. DAUGHERTY, Ernst J. VERSCHOOR a Bernhard EHLERS. ICTV Virus Taxonomy Profile: Polyomaviridae. *Journal of General Virology* [online]. 2017a, 98(1159-1160), - [cit. 2017-11-30]. DOI: 10.1099/jgv.0.000839. ISSN 0022-1317.

MOORE, Patrick S. a Yuan CHANG. Why do viruses cause cancer? Highlights of the first century of human tumour virology. *Nature Reviews Cancer* [online]. 2010, 10(12), 878-889 [cit. 2018-05-07]. DOI: 10.1038/nrc2961. ISSN 1474-175X.

- MÜLLER, Hermann a Reimar JOHNE. Avian polyomavirus agnoprotein 1a is incorporated into the virus particle as a fourth structural protein, VP4. *Journal of General Virology* [online]. 2001, 82(4), 909-918 [cit. 2017-11-30]. DOI: 10.1099/0022-1317-82-4-909. ISSN 0022-1317.
- NEU, Ursula, Johannes BAUER a Thilo STEHLE. Viruses and sialic acids: rules of engagement. *Current Opinion in Structural Biology* [online]. 2011, 21(5), 610-618 [cit. 2018-03-01]. DOI: 10.1016/j.sbi.2011.08.009. ISSN 0959440X.
- NEUMANN, Friederike, Sophie BORCHERT, Claudia SCHMIDT, Rudolph REIMER, Heinrich HOHENBERG, Nicole FISCHER, Adam GRUNDHOFF a Volker THIEL. Replication, Gene Expression and Particle Production by a Consensus Merkel Cell Polyomavirus (MCPyV) Genome. *PLoS ONE* [online]. 2011, 6(12), e29112- [cit. 2018-04-25]. DOI: 10.1371/journal.pone.0029112. ISSN 1932-6203.
- NOVAK, U. a B. E. GRIFFIN. Requirement for the C-terminal region of middle T-antigen in cellular transformation by polyoma virus. *Nucleic Acids Research* [online]. 1981, 9(9), 2055-73 [cit. 2018-05-07]. ISSN 03051048.
- OGRIS, E., I. MUDRAK a E. WINTERSBERGER. Polyomavirus large and small T antigens cooperate in induction of the S phase in serum-starved 3T3 mouse fibroblasts. *Journal of Virology* [online]. 1992, 66(1), 53 - 61 [cit. 2018-03-02]. ISSN 0022538X.
- OKADA, Y., S. ENDO, H. TAKAHASHI, H. SAWA, T. UMEMURA a K. NAGASHIMA. Distribution and function of JCV agnoprotein. *Journal of NeuroVirology* [online]. 2001, 7(4), 302 - 306 [cit. 2018-03-02]. DOI: 10.1080/13550280152537148. ISSN 13550284.
- OKADA, Yuki, Tadaki SUZUKI, Yuji SUNDEN, et al. Dissociation of heterochromatin protein 1 from lamin B receptor induced by human polyomavirus agnoprotein: role in nuclear egress of viral particles. *EMBO reports* [online]. 2005, 6(5), 452-457 [cit. 2018-03-02]. DOI: 10.1038/sj.embor.7400406. ISSN 1469-221X.
- OTTINGER, M., T. CHRISTALLA, K. NATHAN, M. M. BRINKMANN, A. VIEJO-BORBOLLA a T. F. SCHULZ. Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus LANA-1 Interacts with the Short Variant of BRD4 and Releases Cells from a BRD4- and BRD2/RING3-Induced G1 Cell Cycle Arrest. *Journal of Virology* [online]. 2006, 80(21), 10772-10786 [cit. 2018-04-06]. DOI: 10.1128/JVI.00804-06. ISSN 0022-538X.
- OZER, H.L., S.S. BANGA, T. DASGUPTA, et al. SV40-mediated immortalization of human fibroblasts. *Experimental Gerontology* [online]. 1996, 31(1-2), 303 - 310 [cit. 2018-05-01]. DOI: 10.1016/0531-5565(95)00024-0. ISSN 05315565.
- PALLAS, D.C., L.K. SHAHRIK, T.M. ROBERTS, B.L. MARTIN, S. JASPERS, T.B. MILLER a D.L. BRAUTIGAN. Polyoma small and middle T antigens and SV40 small t antigen form stable complexes with protein phosphatase 2A. *Cell* [online]. 1990, 60(1), 167 - 176 [cit. 2018-04-20]. DOI: 10.1016/0092-8674(90)90726-U. ISSN 00928674.
- PESAVENTO, Patricia A., Terza BROSTOFF, Molly E. CHURCH, Florante N. DELA CRUZ a Kevin D. WOOLARD. Polyomavirus and Naturally Occuring Neuroglial Tumors in Raccoons (*Procyon lotor*). *ILAR Journal* [online]. 2016, 56(3), 297-305 [cit. 2018-02-26]. DOI: 10.1093/ilar/ilv036. ISSN 1084-2020.
- PIPAS, J.M. Mutations near the carboxyl terminus of the simian virus 40 large tumor antigen alter viral host range. *Journal of Virology* [online]. 1985, 54(2), 569 - 575 [cit. 2018-04-17]. ISSN 0022538X.
- PIPAS, James M. SV40: Cell transformation and tumorigenesis. *Virology* [online]. 2009, 384(2), 294-303 [cit. 2018-04-29]. DOI: 10.1016/j.virol.2008.11.024. ISSN 00426822.
- PLAISANCE-BONSTAFF, Karlie a Rolf RENNE. Viral miRNAs. *Antiviral RNAi* [online]. Totowa, NJ: Humana Press, 2011, 2011-2-15, , 43-66 [cit. 2018-05-07]. *Methods in Molecular Biology*. DOI: 10.1007/978-1-61779-037-9_3. ISBN 978-1-61779-036-2.
- POULIN, D. L., A. L. KUNG a J. A. DECAPRIO. P53 Targets Simian Virus 40 Large T Antigen for Acetylation by CBP. *Journal of Virology* [online]. 2004, 78(15), 8245-8253 [cit. 2018-04-29]. DOI: 10.1128/JVI.78.15.8245-8253.2004. ISSN 0022-538X.
- RAYMENT, Ivan, Timothy S. BAKER, Donald L. D. CASPAR a W. T. MURAMAKY. Polyoma virus capsid structure at 22.5 Å resolution. *Nature* [online]. 1982, 295(5845), 110-115.

REISS, Krzysztof, Kamel KHALILI, Antonio GIORDANO a Joanna TROJANEK. JC virus large T-antigen and IGF-I signaling system merge to affect DNA repair and genomic integrity. *Journal of Cellular Physiology*[online]. 2006, **206**(2), 295-300 [cit. 2018-05-07]. DOI: 10.1002/jcp.20455. ISSN 0021-9541.

REYNOLDS, B.A. a S. WEISS. Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous.. *Science* [online]. 1992, 255(5052), 1707-1710 [cit. 2018-04-06]. ISSN 00368075.

RINALDO, C.H., T. TRAAVIK a A. HEY. The agnogene of the human polyomavirus BK is expressed. *Journal of Virology* [online]. 1998, 72(7), 6233 - 6236 [cit. 2018-03-02]. ISSN 0022538X.

ROBERTSON, Erle S. *Cancer associated viruses*. New York: Springer, c2012. Current cancer research. ISBN 978-1-4614-0016-5.

ROITMAN-SHEMER, Vered, Jitka STOKROVA, Jitka FORSTOVA a Ariella OPPENHEIM. Assemblages of simian virus 40 capsid proteins and viral DNA visualized by electron microscopy. *Biochemical and Biophysical Research Communications* [online]. 2007, 353(2), 424-430 [cit. 2018-03-02]. DOI: 10.1016/j.bbrc.2006.12.038. ISSN 0006291X.

SABLINA, Anna A. a William C. HAHN. SV40 small T antigen and PP2A phosphatase in cell transformation. *Cancer and Metastasis Reviews* [online]. 2008, 27(2), 137-146 [cit. 2018-04-20]. DOI: 10.1007/s10555-008-9116-0. ISSN 0167-7659.

SAFAK, M., R. BARRUCCO, A. DARBINYAN, Y. OKADA, K. NAGASHIMA a K. KHALILI. Interaction of JC Virus Agno Protein with T Antigen Modulates Transcription and Replication of the Viral Genome in Glial Cells. *Journal of Virology* [online]. 2001, 75(3), 1476-1486 [cit. 2018-03-02]. DOI: 10.1128/JVI.75.3.1476-1486.2001. ISSN 0022-538X.

SAITOU, Naruya a Masatoshi NEI. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* [online]. 1987, 4(4), - [cit. 2018-04-06]. DOI: 10.1093/oxfordjournals.molbev.a040454. ISSN 1537-1719.

SALUNKE, D.M., D.L.D. CASPAR a R.L. GARCEA. Self-assembly of purified polyomavirus capsid protein VP1. *Cell* [online]. 1986, 46(6), 895 - 904 [cit. 2018-04-17]. DOI: 10.1016/0092-8674(86)90071-1. ISSN 00928674.

SAMBROOK, J., H. WESTPHAL, P.R. SRINIVASAN a R. DULBECCO. The integrated state of viral DNA in SV40-transformed cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*[online]. 1968, 60(4), 1288 - 1295 [cit. 2018-05-01]. DOI: 10.1073/pnas.60.4.1288. ISSN 00278424.

SARIYER, Ilker K, Abdullah S SARIBAS, Martyn K WHITE a Mahmut SAFAK. Infection by agnoprotein-negative mutants of polyomavirus JC and SV40 results in the release of virions that are mostly deficient in DNA content. *Virology Journal* [online]. 2011, 8(1), 255- [cit. 2018-03-02]. DOI: 10.1186/1743-422X-8-255. ISSN 1743-422X.

SELL, Christian, Michele RUBINI, Raphael RUBIN, Jeh-Ping LIU, Argiris EFSTRATIADIS a Renato BASERGA. Simian Virus 40 Large Tumor Antigen is Unable to Transform Mouse Embryonic Fibroblasts Lacking Type 1 Insulin-Like Growth Factor Receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* [online]. 1993, 90(23), 11217-11221 [cit. 2018-04-26]. ISSN 00278424.

SEO GJ, CHEN CJ a SULLIVAN CS. Merkel cell polyomavirus encodes a microRNA with the ability to autoregulate viral gene expression. *Virology* [online]. 2009, 383(2), 183-7 [cit. 2018-03-26]. DOI: 10.1016/j.virol.2008.11.001. ISSN 10960341.

SEO, G. J., L. H. L. FINK, B. O'HARA, W. J. ATWOOD a C. S. SULLIVAN. Evolutionarily Conserved Function of a Viral MicroRNA. *Journal of Virology* [online]. 2008, 82(20), 9823-9828 [cit. 2018-03-26]. DOI: 10.1128/JVI.01144-08. ISSN 0022-538X.

SHIMAZU, T, Y KOMATSU, K I NAKAYAMA, H FUKAZAWA, S HORINOUCI a M YOSHIDA. Regulation of SV40 large T-antigen stability by reversible acetylation. *Oncogene* [online]. 2006, 25(56), 7391-7400 [cit. 2018-04-29]. DOI: 10.1038/sj.onc.1209731. ISSN 0950-9232.

SHUDA, M., H. FENG, H. J. KWUN, S. T. ROSEN, O. GJOERUP, P. S. MOORE a Y. CHANG. T antigen mutations are a human tumor-specific signature for Merkel cell polyomavirus. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. 2008, 105(42), 16272-16277 [cit. 2017-11-30]. DOI: 10.1073/pnas.0806526105. ISSN 0027-8424.

- SHUDA, Masahiro, Hyun Jin KWUN, Huichen FENG, Yuan CHANG a Patrick S. MOORE. Human Merkel cell polyomavirus small T antigen is an oncoprotein targeting the 4E-BP1 translation regulator. *Journal of Clinical Investigation* [online]. 2011, **121**(9), 3623-3634 [cit. 2018-05-07]. DOI: 10.1172/JCI46323. ISSN 0021-9738.
- SCHOWALTER, Rachel M., Christopher B. BUCK a Michael J. IMPERIALE. The Merkel Cell Polyomavirus Minor Capsid Protein. *PLoS Pathogens* [online]. 2013, **9**(8), e1003558- [cit. 2018-03-02]. DOI: 10.1371/journal.ppat.1003558. ISSN 1553-7374.
- SNUSTAD, D. Peter a Michael J. SIMMONS, RELICHOVÁ, Jiřina, ed. *Genetika*. Brno: Masarykova univerzita, 2009. ISBN 978-802-1048-522.
- SPURGEON, Megan E. a Paul F. LAMBERT. Merkel cell polyomavirus: A newly discovered human virus with oncogenic potential. *Virology* [online]. 2013, **435**(1), 118-130 [cit. 2018-05-04]. DOI: 10.1016/j.virol.2012.09.029. ISSN 00426822.
- SRINIVASAN, Ashok, Amie J. MCCLELLAN, Jay VARTIKAR, et al. The amino-terminal transforming region of simian virus 40 large T and small t antigens functions as a J domain. *Molecular And Cellular Biology* [online]. 1997, **17**(8), 4761-73 [cit. 2018-04-18]. ISSN 02707306.
- STAHL, H., P. DRÖGE a R. KNIPPERS. DNA helicase activity of SV40 large tumor antigen. *The EMBO journal* [online]. 1986, **5**(8), 1939 - 1944 [cit. 2018-04-17]. ISSN 02614189.
- STEHLE, Thilo, Steven J GAMBLIN, Youwei YAN a Stephen C HARRISON. The structure of simian virus 40 refined at 3.1 Å resolution. *Structure* [online]. 1996, **4**(2), 165-182 [cit. 2017-11-30]. DOI: 10.1016/S0969-2126(96)00020-2. ISSN 09692126.
- STEWART, Sarah E., Bernice E. EDDY a Ninette BORGESSE. Neoplasms in Mice Inoculated with a Tumor Agent Carried in Tissue Culture2 [online]. [cit. 2018-04-29]. DOI: 10.1093/jnci/20.6.1223. ISBN 10.1093/jnci/20.6.1223.
- STUBDAL H, ZALVIDE J, CAMPBELL KS, SCHWEITZER C, ROBERTS TM a DECAPRIO JA. Inactivation of pRB-related proteins p130 and p107 mediated by the J domain of simian virus 40 large T antigen. *Molecular And Cellular Biology* [online]. 1997, **17**(9), 4979-90 [cit. 2018-03-18]. ISSN 02707306.
- SULLIVAN CS, GRUNDHOFF AT, TEVETHIA S, PIPAS JM a GANEM D. SV40-encoded microRNAs regulate viral gene expression and reduce susceptibility to cytotoxic T cells. *Nature* [online]. 2005, **435**(7042), 682-6 [cit. 2018-03-26]. ISSN 14764687.
- SULLIVAN, Christopher S., Chang K. SUNG, Christopher D. PACK, Adam GRUNDHOFF, Aron E. LUKACHER, Thomas L. BENJAMIN a Don GANEM. Murine Polyomavirus encodes a microRNA that cleaves early RNA transcripts but is not essential for experimental infection. *Virology* [online]. 2009, **387**(1), 157-167 [cit. 2018-03-26]. DOI: 10.1016/j.virol.2009.02.017. ISSN 00426822.
- SULLIVAN, C. S., A. E. BAKER a J. M. PIPAS. Simian virus 40 infection disrupts p130-E2F and p107-E2F complexes but does not perturb pRb-E2F complexes. *Virology* [online]. 2004, **320**(2), 218-28 [cit. 2018-05-07]. ISSN 00426822.
- SULLIVAN, Christopher S., Paul CANTALUPO a James M. PIPAS. The molecular chaperone activity of simian virus 40 large T antigen is required to disrupt Rb-E2F family complexes by an ATP-dependent mechanism. *Molecular and Cellular Biology* [online]. 2000, **20**(17), 6233 - 6243 [cit. 2018-04-18]. DOI: 10.1128/MCB.20.17.6233-6243.2000. ISSN 02707306.
- SULLIVAN, Christopher S., Susan P. GILBERT a James M. PIPAS. ATP-Dependent Simian Virus 40 T-Antigen-Hsc70 Complex Formation. *Journal of Virology* [online]. 2001, **75**(4), 1601-1610 [cit. 2018-04-18]. DOI: 10.1128/JVI.75.4.1601-1610.2001. ISSN 0022-538X.
- TIMM, R., A. D. CUARÓN a F REID. *Procyon lotor*. The IUCN Red List of Threatened Species [online]. 2016, , 1-10 [cit. 2018-03-02]. Dostupné z: <http://www.iucnredlist.org/details/41686/0>
- TOLSTOV, Yanis L., Diana V. PASTRANA, Huichen FENG, et al. Human Merkel cell polyomavirus infection II. MCV is a common human infection that can be detected by conformational capsid epitope immunoassays. *International Journal of Cancer* [online]. 2009, **125**(6), 1250-1256 [cit. 2018-05-08]. DOI: 10.1002/ijc.24509. ISSN 00207136.
- *TOOZE, John. a N. H. ACHESON. *DNA tumor viruses*. 2nd ed., rev. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory, c1981. *Molecular biology of tumor viruses* (2nd ed., rev.), pt. 2. ISBN 978-087-9691-424.

- TREISMAN, R., A. COWIE, J. FAVALORO, P. JAT a R. KAMEN. The structures of the spliced mRNAs encoding polyoma virus early region proteins. *Journal of Molecular and Applied Genetics* [online]. 1981, 1(2), 83 - 92 [cit. 2018-04-19]. ISSN 02716801.
- TURK B, PORRAS A, MUMBY MC a RUNDELL K. Simian virus 40 small-t antigen binds two zinc ions. *Journal Of Virology* [online]. 1993, 67(6), 3671-3 [cit. 2018-04-20]. ISSN 0022538X.
- VOGELSTEIN, Bert, David LANE a Arnold J. LEVINE. Surfing the p53 network. *Nature* [online]. 2000, 408(6810), 307-310 [cit. 2018-04-19]. DOI: 10.1038/35042675. ISSN 0028-0836.
- WANG, Xin, Jing LI, Rachel M. SCHOWALTER, Jing JIAO, Christopher B. BUCK, Jianxin YOU a Denise A. GALLOWAY. Bromodomain Protein Brd4 Plays a Key Role in Merkel Cell Polyomavirus DNA Replication. *PLoS Pathogens* [online]. 2012, 8(11), e1003021- [cit. 2018-04-06]. DOI: 10.1371/journal.ppat.1003021. ISSN 1553-7374.
- WEISSHART K, TANEJA P a FANNING E. The replication protein A binding site in simian virus 40 (SV40) T antigen and its role in the initial steps of SV40 DNA replication. *Journal Of Virology* [online]. 1998, 72(12), 9771-81 [cit. 2018-04-17]. ISSN 0022538X.
- WOLLEBO, Hassen S., Anna BELLIZZI, Dominique H. COSSARI, Julian SALKIND, Mahmut SAFAK a Martyn K. WHITE. The Brd4 acetyllysine-binding protein is involved in activation of polyomavirus JC. *Journal of NeuroVirology* [online]. 2016, 22(5), 615-625 [cit. 2018-05-07]. DOI: 10.1007/s13365-016-0435-6. ISSN 1355-0284.
- WU, X. SV40 T antigen interacts with Nbs1 to disrupt DNA replication control. *Genes Dev.* [online]. 2004, 18(11), 1305-1316 [cit. 2018-04-17]. DOI: 10.1101/gad.1182804. ISSN 0890-9369.
- YANG SI, LICKTEIG RL, ESTES R, RUNDELL K, WALTER G a MUMBY MC. Control of protein phosphatase 2A by simian virus 40 small-t antigen. *Molecular And Cellular Biology* [online]. 1991, 11(4), 1988-95 [cit. 2018-04-20]. ISSN 02707306.
- YU, Yongjun a James C. ALWINE. Human Cytomegalovirus Major Immediate-Early Proteins and Simian Virus 40 Large T Antigen Can Inhibit Apoptosis through Activation of the Phosphatidylinositide 3'-OH Kinase Pathway and the Cellular Kinase Akt. *Journal of Virology* [online]. 2002, 76(8), 3731-3738 [cit. 2018-04-19]. DOI: 10.1128/JVI.76.8.3731-3738.2002. ISSN 0022-538X.
- YU, Yongjun a James C. ALWINE. Interaction between Simian Virus 40 Large T Antigen and Insulin Receptor Substrate 1 Is Disrupted by the K1 Mutation, Resulting in the Loss of Large T Antigen-Mediated Phosphorylation of Akt. *Journal of Virology* [online]. 2008, 82(9), 4521-4526 [cit. 2018-04-19]. DOI: 10.1128/JVI.02365-07. ISSN 0022-538X.
- ZERRAHN J, KNIPPSCHILD U, WINKLER T a DEPPERT W. Independent expression of the transforming amino-terminal domain of SV40 large I antigen from an alternatively spliced third SV40 early mRNA. *The EMBO Journal* [online]. 1993, 12(12), 4739-46 [cit. 2018-05-05]. ISSN 02614189.
- ZUO, Fengrong a Janet E. MERTZ. Simian Virus 40 Late Gene Expression is Regulated by Members of the Steroid/Thyroid Hormone Receptor Superfamily. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* [online]. 1995, 92(19), 8586-8590 [cit. 2018-05-07]. ISSN 00278424.