

**PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA UNIVERSITY KARLOVY V PRAZE**

**KATEDRA GENETIKY A MIKROBIOLOGIE**

**KMIHOVNA** *Hydrologie*  
*patol. biologie, mikrobiologie a virologie*  
*Přírodovědecká fakulta*  
**228 44** *Praha 2*

**BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

# **Vstup DNA virů do buněčného jádra**

**Kamila Fejglová**  
**Školitel: Doc. RNDr Jitka Forstová**

2007/2008

Chtěla bych poděkovat paní Doc. RNDr Jitce Forstové za její neocenitelnou pomoc při psaní této bakalářské práce.

<b>Seznam použitých zkratek</b> .....	3
<b>Abstrakt</b> .....	5
<b>Abstract</b> .....	6
<b>1. Úvod</b> .....	7
<b>2. Jaderný import</b> .....	8
2.1. Jaderná membrána a jaderné póry .....	8
2.2. Jaderný import, jaderné lokalizační signály (NLS) a importiny .....	11
<b>3. Vstup DNA virů do jádra</b> .....	14
3.1. Adenoviry .....	14
3.2. Herpesviry .....	16
3.3. Papillomaviry .....	18
3.4. Parvoviry .....	20
3.5. Polyomaviry .....	21
<b>4. Závěr</b> .....	25
<b>5. Použitá literatura</b> .....	27

## Seznam použitých zkratek

AAV	adeno-associated virus
Ad	adenovirus
Ad2	adenovirus sérotypu 2
Ad3	adenovirus sérotypu 3
Ad5	adenovirus sérotypu 5
Ad7	adenovirus sérotypu 7
Arm	armadillo
ATP	adenosintrifosfát
BAF	barrier-to-autoregulation factor
CAN/Nup 214	filamentární nukleoprotein jaderného póru 214
CAS	nuclear export factor, jaderný exportní faktor
CAR	Coxsackie and Adenovirus Receptor
CPV	canine parvovirus, parvovirus infikující psy
CRM1	chromosome region maintenance 1, exportní faktor
DNA	deoxyribonukleová kyselina
ds	dvouvláknová
EM	elektronová mikroskopie
ER	endoplazmatické retikulum
ERAD	ER-associated degradation, degradační cesta asociovaná s ER
FG	fenylalanin-glycin
g	glykoprotein
GTP	guanozintrifosfát
GDP	guanozindifosfát
H	histon
HP1	heterochromatin protein 1, heterochromatinový protein 1
HPV	human papillomavirus, lidský papillomavirus
Hsp70	heat-shock protein 70
IBB	importin- $\beta$ binding domain, importin- $\beta$ vázající doména
imp- $\alpha$	importin- $\alpha$
imp- $\beta$	importin- $\beta$
INM	inner nuclear membrane, vnitřní jaderná membrána

JM	jaderná membrána
Kap	karyopherin
L1	late protein 1, hlavní strukturní protein papillomavirů
L2	late protein 2, minoritní strukturní protein papillomavirů
LAP1, 2	lamina associated proteins 1, 2, s laminou spojené proteiny 1, 2
LBR	lamin B receptor
LT	large tumorogenic antigen, velký tumorogenní antigen
kDa	tisíc daltonů
mAb 414	monoklonální protilátka 414
MDa	milion daltonů
MTOC	microtubul-organizing centrum, organizační centrum mikrotubulů
MVM	minute virus of mice, myší parvovirus
NES	nuclear export signal, jaderný exportní signál
NLS	nuclear import signal, jaderný lokalizační signál
nm	nanometr
NTF2	nuclear transport factor 2, jaderný transportní faktor 2
Nup (NUP)	nukleoporin
ONM	outer nuclear membrane, vnější jaderná membrána
PDI	protein disulfid izomeraze, protein disulfid isomeráza
PLA <sub>2</sub>	fosfolipázová aktivita
RanGAP	RanGTPase activating protein, aktivační protein RanGTPázy
RanGEF (RCC1)	Ran guanin nucleotide exchange factor
RanGDP	Ran s navázaným guanozin difosfátem
RanGTP	Ran s navázaným guanozin trifosfátem
RNA	ribonukleová kyselina
ss	jednovláknová
SUN 1, 2	receptor v jaderném obalu 1 a 2
3D	trojrozměrný
VP1	virus protein 1, majoritní kapsidový protein polyomavirů
VP2, VP3	virus protein 2, 3, minoritní kapsidové proteiny 2, 3
WGA	wheat germ agglutinin, aglutinin pšeničných klíčků

## **Abstrakt**

Buněčné jádro je u eukaryotických buněk obklopeno dvojitou jadernou membránou, která je perforovaná póry, proteinovými komplexy složenými asi z 30 proteinů nazývaných nukleoporiny, uspořádaných do oktagonální symetrie (GALL, 1967; ROUT *et al.*, 2000; CRONSHAW *et al.*, 2002; COLIN *et al.*, 2007), Nukleoporiny jsou rozděleny do tří skupin: transmembránové, strukturní a tzv. FG (opakování fenylalanin-glycin) nukleoporiny (DEVOS *et al.*, 2006). Hlavní rysy morfologie jaderného póru jsou konzervovány od kvasinek až po vyšší eukaryota (YANG *et al.*, 1998). Aktivní transport póry se uskutečňuje u molekul do velikosti průměru ~39 nm (PANTE a KANN, 2002). Volnou difúzí pak prochází molekuly do ~100 kDa (WANG a BRATTAIN, 2007). Makromolekuly (proteiny, RNA, DNA) či nukleoproteinové komplexy jsou transportovány aktivním transportem, který, mimo jiné vyžaduje, aby transportované molekuly nesly určité sekvence pro rozpoznání specifickými transportními receptory. Těmito sekvencemi jsou jaderný lokalizační (NLS), pro jaderný import a jaderný exportní signál (NES), pro jaderný export. Existuje několik různých NLS rozpoznávaných různými transportními receptory - karyopheriny, nebo také nazývanými importiny (FRIED a KUTAY, 2003; PEMBERTON a PASCHAL, 2005; STEWART, 2007). Téma této bakalářské práce je věnováno vstupu vybraných čeledí DNA virů do buněčného jádra. Těmito viry jsou adenoviry, herpesviry, papillomaviry, polyomaviry a parvoviry. Tyto DNA viry jsou replikovány v buněčném jádře a proto je vstup do jádra esenciálním krokem jejich infekčního cyklu. Vyvinuly si různé mechanismy, jak cestovat od buněčného povrchu k jádru a jak vstoupit do jádra prostřednictvím jaderného póru nebo možná jinou alternativní cestou.

**Klíčová slova:** Adenoviry, Herpesviry, Papillomaviry, Parvoviry, Polyomaviry, jaderný import, jaderný pór

## **Abstract**

The nucleus of eukaryotic cells is surrounded by a double nuclear membrane, which is perforated by pores - protein complexes which consist of approximately 30 proteins called nucleoporins (GALL, 1967; ROUT *et al.*, 2000; CRONSHAW *et al.*, 2002; COLIN *et al.*, 2007) and arranged in octagonal symmetry. Nucleoporins are divided into three groups: transmembrane, structural, and so called FG (phenylalanine-glycine repeats) nucleoporins (DEVOS *et al.*, 2006). Principal morphology feature of the nuclear pore is conserved from yeasts to higher eukaryotes (YANG *et al.*, 1998). The molecules with a diameter size up to 39 nm are actively transported through the pore (PANTE and KANN, 2002). The molecules up to ~100 kDa can freely diffuse through the pore (WANG and BRATTAIN, 2007). For active transport of macromolecules (proteins, RNAs, DNAs) or nucleoprotein complexes, transported molecules should possess certain sequences for their recognition by transport receptors. These sequences are nuclear localization signal (NLS) for nuclear import and nuclear export signal (NES) for nuclear export, respectively. Different NLS are recognized by different transport receptors – karyopherins, also called importins (FRIED and KUTAY, 2003; PEMBERTON and PASCHAL, 2005; STEWART, 2007).

The theme of this thesis is dedicated to nuclear entry of selected DNA virus families (*Adenoviridae*, *Herpesviridae*, *Papillomaviridae*, *Polyomaviridae* and *Parvoviridae*) These DNA viruses are replicated in the cell nucleus and, therefore, nuclear entry is the essential step of their infectious cycle. These viruses have developed different mechanisms how to travel from the cell membrane towards the cell nucleus and how to enter the nucleus, through the nuclear pore, or by an alternative way.

**Key words:** Adenoviruses, Herpesviruses, Papillomaviruses, Parvoviruses, Polyomaviruses, nuclear import, nuclear pore

## 1. Úvod

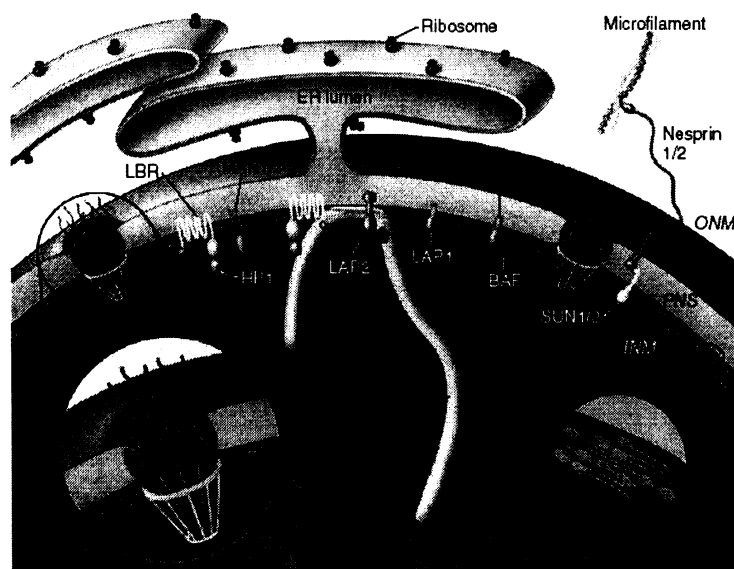
Adenoviry, herpesviry, papillomaviry, polyomaviry a parvoviry jsou DNA viry, které využívají buněčné jádro pro svou replikaci. Jádro jim poskytne substráty a enzymy pro syntézu a úpravy RNA nebo i replikaci DNA. Pokud je virus závislý na jaderných funkcích musí se nějakým způsobem dopravit od povrchu buňky, přes cytoplazmu, až do jádra. Prostřednictvím navázání na receptor či receptory na buněčném povrchu proniká virus do cytoplazmy. Obalené herpesviry vstupují fúzí svého obalu s cytoplazmatickou membránou a uvolní tak kapsidu do cytoplazmy. Neobalené DNA viry, jako adeno, papilloma, parvo a polyomaviry vstupují receptorem zprostředkovanou endocytózou do buněčných endosomů. Aby se mohla jejich genová informace dopravit do jádra jadernými póry, musí se virus z endosomálních kompartmentů uvolnit. Kapsidy jsou příliš velké na to, aby se efektivně dostaly až k jadernému póru, bez toho, aniž by využily transportu po mikrotubulech, jako je tomu u herpesvirů a zvláště pak u adenovirů. Polyomaviry jsou charakteristické svým transportem přes ER, kde pravděpodobně dochází k významným změnám kapsidy. Jak přesně vstupují do jádra se neví. Jádro eukaryotických buněk je od cytoplazmy odděleno dvojitou membránou. Neustálá výměna látek mezi jádrem a cytoplazmou se uskutečňuje prostřednictvím jaderných pórů, proteinových komplexů zabudovaných v jaderném obalu. Viry si vyvinuly řadu strategií jak obejít tuto limitující vlastnost jádra. Dopravení virového genomu jaderným pórem znamená využít buněčné mašinerie aktivního transportu. Aktivní transport přes jaderné póry se zdá být převažující způsob dopravení virového genomu do jádra, nicméně se ukazuje na možnost viru vstoupit přes jadernou membránu, i jinými způsoby. Tato práce se shrnuje současné znalosti o tom, jak DNA viry dopravují své genomy do buněčného jádra pro jejich expresi.



## 2. Jaderný import

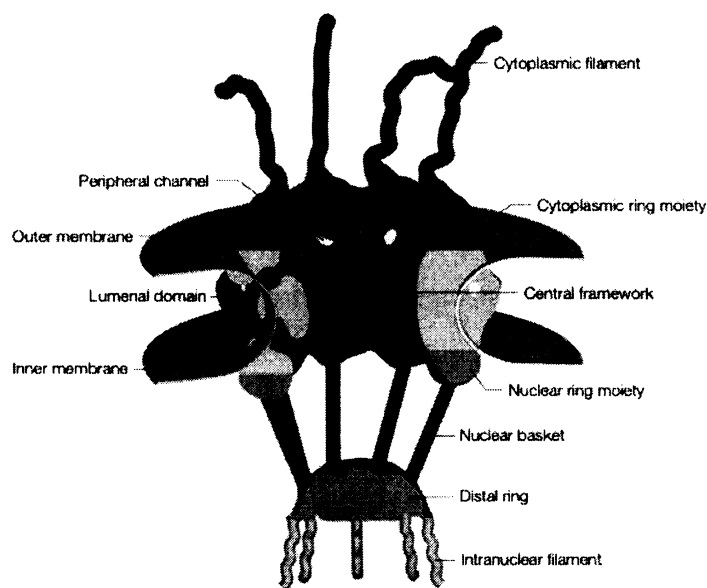
### 2.1. Jaderná membrána a jaderné póry

Buněčné jádro eukaryotických buněk je obklopeno dvojitou jadernou membránou (JM), která uchovává genetický materiál a kompartmentalizuje jaderné a cytoplazmatické děje. JM je složena z vnější a vnitřní jaderné membrány, které mezi sebou vytváří 30-50 nm široký perinukleární prostor, který je v podstatě pokračováním lumen endoplazmatického retikula. Vnější JM, stejně tak jako endoplazmatické retikulum (ER), je pokrytá ribozómy a je místem translace a translokace proteinů. Pro vnitřní JM je charakteristický její obsah integrálních proteinů. Některé z nich jsou popsány v Obr.1. Kromě klíčové role transportu mezi jádrem a cytoplazmou je další důležitou rolí JM vytváření podpory pro ukotvení jaderné laminy, jaderného cytoskeletu a chromatinu, viz. Obr.1 ( STEWART *et al.*, 2007).



Obr. 1: Organizace jaderné membrány a vybrané charakteristické proteiny vnitřní jaderné membrány (INM). S laminou asociované polypeptidy 1 and 2 (LAP1 and LAP2) a lamin B receptor (LBR), interagují s heterochromatinovým proteinem 1 (HP1) a „barrier-to-autoregulation factor“ (BAF) a poskytují tak spojení s chromatinem. Jednotlivá filamenta společně vytváří jadernou laminu (přiblížení v pravé části obrázku). V levé části obrázku je pak vidět spojení vnější a vnitřní membrány a jaderný pór. Endoplazmatické retikulum (ER) přechází ve vnější jadernou membránu (ONM), ve které jsou ukotveny nesprin proteiny interagující s cytoskeletem Prostřednictvím proteinů Sun1 and Sun2 jsou nespriny spojeny s vnitřní jadernou membránou. (STEWART *et al.*, 2007)

V roce 1950 Callan a Tomlin pomocí elektronové mikroskopie (EM) ukázali, že je jaderná membrána perforovaná póry (CALLAN a TOMLIN, 1950). O 17 let později, Gall (1967) negativním barvením prokázal, že se tyto póry vyskytují v oktagonální struktuře (GALL, 1967). Elektronová mikroskopie a trojrozměrné (3D) rekonstrukce odhalily, že jsou hlavní rysy jaderného póru konzervované od kvasinek až po vyšší eukaryota. Celková hmotnost póru u kvasinek činí přibližně 60 Mda, zatímco u obratlovců přibližně 125 Mda (YANG *et al.*, 1998). Jaderné póry se skládají z centrální struktury, devíti cytoplazmatických a devíti jaderných filament. Jaderná filamenta ústí do struktury nazvané distální prstenec a tím se vytváří další struktura - jaderný koš (Obr. 2; FAHRENKROG a AEBI, 2003). U *Xenopus* byla objevena další struktura jaderného póru. Touto strukturou jsou intranukleární filamenta, o kterých se předpokládá, že zajišťují výměnu mezi jádrem a cytoplazmou, zejména ve velkých jádrech (RIS, 1997).



Obr. 2. 3D model jaderného póru. Hlavní komponenty póru zahrnují centrální strukturu (žlutě), cytoplazmatický prstenec s ukotvenými cytoplazmatickými filamenti (modře) a jaderný prstenec s distálním prstencem a jaderným košem. Jaderné membrány jsou zobrazené šedivě (FAHRENKROG a AEBI, 2003).

Jaderný pór je u obratlovců i kvasinek složen asi z 30 proteinů nazývaných také nukleoporiny (ROUT *et al.*, 2000; CRONSHAW *et al.*, 2002) uspořádaných do oktagonální symetrie, formujících centrální strukturu póru, která je také nazývána “spoke” komplex. Centrální strukturou je vytvářen pór o průměru 60-70 nm na cytoplazmatické periférii a periférii jádra, zatímco průměr střední části póru byl určen přibližně na 45 nm (FAHRENKROG a AEBI, 2003). Panté a Kann (2002) stanovili funkční průměr jaderného póru na ~39 nm. Injikovali částice zlata o různých průměrech pokryté nukleoplazminem a importinem  $\alpha/\beta$  do oocytů *Xenopus*. Pouze částice do průměru ~39 nm byly transportovány do jádra. Tímto prokázali, že se funkční průměr (~39 nm) přibližně shoduje s fyzickým průměrem (~45 nm) (PANTE a KANN, 2002).

Ukázalo se, že mimo tento centrální pór existuje ještě jiná cesta pro transport mezi jádrem a cytoplazmou. Okolo centrálního póru se nachází tzv. periferní póry o průměru ~9 nm, o kterých se předpokládá, že se účastní transportu malých molekul a iontů pasivní difúzí (HINSHAW *et al.*, 1992) a také transportu integrálních membránových proteinů do vnitřní jaderné membrány (SOULLAM a WORMAN, 1995). Nicméně není vyloučeno, že se pasivní difúze uskutečňuje také přes centrální pór (NAIM *et al.*, 2007). Jak některé strukturní analýzy jaderného póru tvrdí, centrální pór se občas zdá být zaplněný určitou částicí, měnící svůj objem, pozici a tvar. Tato částice byla proto nazvaná transporterem nebo také zátkou (STOFFLER, 2003; BECK *et al.*, 2004, 2007). Beck a kolegové zpochybnili tuto strukturu otázkou, zda tato částice nepředstavuje distální prstenec a/nebo nezobrazuje transport nějakého nákladu skrz centrální pór (BECK *et al.*, 2004).

Na základě sekundární struktury byly nukleoporiny rozděleny do tří skupin: transmembránové, strukturní a FG (fenylalanin-glycin) nukleoporiny. Skupina transmembránových proteinů kotví jaderný pór v jaderné membráně. Na celkové architektuře se pak podílí strukturní (scaffold) proteiny. FG nucleoporiny, pro něž je charakteristické fenylalanin-glycin opakování (DEVOS *et al.*, 2006), byly pozorovány jako oblak o nízké hustotě vyplňující centrální pór a prostupující jak k jaderné tak i k cytoplazmatické straně (ALBER *et al.*, 2007). FG nukleoporiny jsou známy svou rozvinutou nativní strukturou (DENNING *et al.*, 2003) značnou flexibilitou a mobilitou (SCHWARZ-HERION *et al.*, 2007).

## 2.2 Jaderný import, jaderné lokalizační signály (NLS) a importiny

Transport jaderným pórem probíhá dvěma mechanismy. Pasivní difúzí, zahrnující molekuly do velikosti ~100 kDa a aktivním transportem (WANG a BRATTAIN, 2007). V zásadě, molekuly jako proteiny, RNA či ribonukleoproteinové komplexy nejsou transportovány difúzí, ale aktivním transportem, který, mimo jiné vyžaduje, aby transportované molekuly nesly určité sekvence pro rozpoznání specifickými transportními receptory. Těmito sekvencemi jsou jaderný lokalizační (NLS), pro jaderný import a jaderný exportní signál (NES), pro jaderný export. Existuje několik různých NLS rozpoznávaných různými transportními receptory nazývanými karyopheriny, nebo také nazývanými importiny (FRIED a KUTAY, 2003; PEMBERTON a PASCHAL, 2005; STEWART, 2007).

První identifikovanou NLS byla sekvence bazických aminokyselin (KKKRRK) ve velkém tumorogenním antigenu (LT) Simian viru 40, často nazývána klasickou či monopartitní. Další typ klasické NLS byl nalezen v nukleoplazminu u *Xenopus*. Na rozdíl od monopartitní obsahuje tato NLS dvě bazické sekvence rozdělené skupinou pěti až dvaceti aminokyselin (KRPAATKKAGQAKKKK), a je proto nazývána bipartitní. Třetí typ sekvence byl nalezen v heterogenním jaderném ribonukleoproteinu A1 (hnRNP A1). Tato sekvence, nazývána M9, není bohatá na bazické aminokyseliny a slouží jako importní i exportní signál (GASIOROWSKI a DEAN, 2003; STEWART, 2007). Jaderný import může být, pro lepší pochopení, rozdělen do 4 kroků (Obr. 3):

Podle obrázku č. 3 se první a druhý krok se odehrává v cytoplazmě, kde je protein či jiná molekula nesoucí NLS, rozpoznána importními receptory, karyopheriny (kap) respektive importiny (imp). Klasické, tedy monopartitní a bipartitní NLS, jsou rozpoznávány importním systémem importin- $\alpha/\beta$  (imp- $\alpha/\beta$ ). Tři hlavní domény v molekule importinu- $\alpha$  (imp- $\alpha$ ) jsou známy: N-koncová, centrální a C-koncová doména. V N-koncové doméně rozlišujeme importin- $\beta$  vázající doménu (IBB), která disponuje také autoinhibičními vlastnostmi. Centrální NLS vázající doména je složena z deseti tzv. armadillo (Arm) opakování (repeats), což jsou za sebou jdoucí  $\alpha$ -helixy (GORLICH *et al.*, 1996; WEIS *et al.*, 1996; CHOOK a BLOBEL, 2001). Klasická bipartitní NLS se váže do dvou oddělených vazebných míst na molekule imp- $\alpha$ , do tzv. minoritního a majoritního vazebného místa, zatímco monopartitní se přednostně váže do majoritního vazebného místa imp- $\alpha$  (FONTES *et al.*, 2000).

Neklasické NLS, jsou rozpoznávány impo- $\beta$  přímo, bez předešlé vazby imp- $\alpha$ , jak tomu bylo v případě rozpoznání klasických NLS. Imp- $\beta$ , stejně jako imp- $\alpha$ , je složen z tzv. HEAT

repetic, což jsou opět za sebou jdoucí  $\alpha$ -helixy. (CINGOLANI *et al.*, 1999, 2002). Molekula (cargo) nesoucí neklasickou NLS je rozpoznána prostřednictvím NLS vazebné domény imp- $\alpha$  a vzniká imp- $\alpha$ /cargo-NLS komplex, který interaguje importin- $\beta$  vazací doménou (IBB) s imp- $\beta$  (GORLICH, 1996).

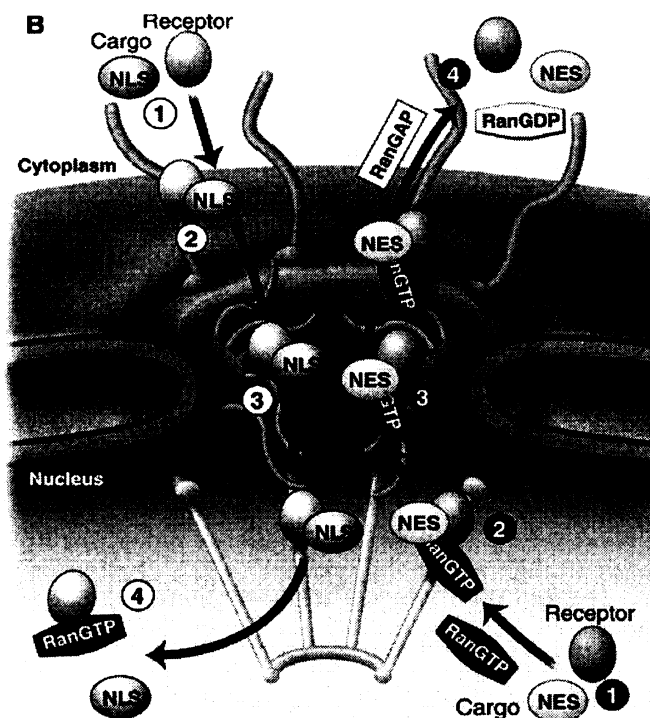
Třetím krokem je translokace vzniklého komplexu,  $\alpha/\beta$ /cargo nebo  $\beta$ /cargo skrz jaderný pór. Komplexy jsou transportovány jaderným pórem prostřednictvím hydrofóbních interakcí imp- $\beta$  a FG repetic (BAYLISS *et al.*, 2000, 2002). Dále se na jaderném importu podílí další transportní složky, jako například protein Ran nesoucí GTP nebo GDP (RanGTP/GDP) a jaderný transportní faktor (NTF2). NTF2 je Ran vazací protein, který usnadňuje jaderný transport RanGDP (RIBBECK *et al.*, 1998).

Posledním krokem jaderného importu je disociace komplexů imp $\alpha/\beta$ /cargo v jádře, na kterém se podílí celá řada faktorů. Protein Ran s navázaným GTP (RanGTP) vytvoří vazbu s imp- $\beta$ , která vede k následné disociaci komplexu imp $\alpha/\beta$ /cargo (PANTE a AEBI, 1996; FRIED a KUTAY, 2003; GASIOROWSKI a DEAN, 2003; PEMBERTON a PASCHAL, 2005). V jádře přítomný "guanine nucleotid exchange factor" (RanGEF, dříve označován RCC1), katalyzuje výměnu GDP za GTP na molekule Ran, za vzniku RanGTP, který už je schopný se navázat na imp- $\beta$  a spustit tak disociaci komplexu imp $\alpha/\beta$ /cargo (BISCHOFF a PONSTINGL, 1991).

Nukleoporin 50 (NUP50) hraje také nepostradatelnou roli v disociaci komplexu imp $\alpha/\beta$ /cargo u obratlovců. Kvasinkový homolog je znám pod názvem Nup2p (STEWART, 2007). Vazbou NUP50 do dvou míst imp- $\alpha$  vzniká komplex NUP50/imp- $\alpha$ . NUP50 se váže na C-koncovou doménu s vysokou afinitou a s nízkou afinitou do místa, které se překrývá s NLS-vazebným místem imp- $\alpha$ . Tím NUP50 katalyzuje disociaci imp $\alpha$ /cargo (MATSURA and STEWART, 2005).

Jaderný exportní faktor pro imp- $\alpha$  (CAS) způsobí vazbou na imp- $\alpha$  disociaci NUP50 z obou vazebných míst a vzniklý komplex CAS/imp- $\alpha$  může být exportován do cytoplazmy (MATSURA a STEWART, 2005), stejně tak jako imp $\beta$ /RanGTP komplex. Aktivační protein Ran GTPázy (RanGAP) vyskytující se v cytoplazmě, způsobí hydrolýzu GTP. Vzniklý RanGDP disociuje z komplexu a je tak volný pro další kolo importu (PANTE a AEBI, 1996; FRIED a KUTAY, 2003; GASIOROWSKI a DEAN, 2003; PEMBERTON a PASCHAL, 2005).

Nicméně samotný RanGAP není schopen spustit hydrolyzu GTP. V cytoplazmě lokalizovaný Ran vazebný protein (RanBP1), svou vazbou na RanGTP usnadňuje na RanGAP závislou hydrolyzu RanGTP za vzniku RanGDP (BISCHOFF *et al.*, 1995).



Obr. 3 Receptorem zprostředkovaný obousměrný transport jaderným pórem. Import (levá část obrázku) a export (pravá část obrázku) jsou popsány ve čtyřech krocích. Transportní receptor rozpozná cargo nesoucí NLS (1). Komplex (receptor-cargo) se usadí na okraji jaderného póru (2). Translokace komplexu jaderným pórem, pravděpodobně interakcemi o nízké afinitě (3). Disociace komplexu (4). Disociace exportního komplexu receptor-cargo-RanGTP hydrolyzou RanGTP na RanGDP prostřednictvím RanGAP (Ran GTPase activatig protein). RanGEF (Ran guanin nucleotide exchange factor) lokalizovaný v jádře generuje vysoké koncentrace RanGTP z RanGDP. RanGDP je pomocí NTF2 proteinu translokován z cytoplazmatické na jadernou stranu (není ukázáno) (TERRY *et al.*, 2007).

### 3. Vstup DNA virů do jádra

#### 3.1. Adenoviry

Virion adenovirů (Ad), o velikosti ~90 nm, je složen z hlavního strukturního proteinu-hexonu, stabilizujících proteinů IIIa, VI, VIII, IX a dvanácti vrcholů. Každý vrchol je tvořen pentonovou bází, ze které vybíhá tzv. vlákno (fiber). Genomová DNA je kondenzovaná pomocí proteinů V, VII, a  $\mu$  a je také nekovalentně spojena s cystein-proteázou L3/p23. Dvouvláknová ds DNA je ještě kovalentně spojena na 5' koncích s virem kódovaným terminálním proteinem (GREBER a KASAMATSU, 1996).

Čeď *Adenoviridae* zahrnuje více než 50 sérotypů. Lidské adenoviry jsou rozděleny do šesti podskupin A až F. Přes značnou variabilitu této virové čeďi a odchylek v infekčním cyklu některých členů byl infekční cyklus adenovirů popsán převážně z pozorování podskupiny C, konkrétně sérotypů 2 a 5.

Infekční cesta adenovirů může být rozdělená do několika kroků: vazba na buněčný povrch, vstup do buňky, únik z endosomu/lyzozomu a jaderný import (LEOPOLD, 2007). Viry podskupiny C se prostřednictvím koncové části vlákna virionu váží na Coxsackie, Adenovirus Receptor (CAR) (BERGELSON *et al.*, 1997). Následující interakce pentonové báse a ko-receptoru integrinu (integrin vázající vitro-nectin) indukuje internalizaci viru klatrinem-zprostředkovanou endocytózou (WICKHAM *et al.*, 1993), regulovanou dynaminem (WANG *et al.*, 1998). Ačkoli podskupina B (sérotyp 7) rozpoznává jiný receptor než podskupina C (TUVE *et al.*, 2006), obě skupiny vstupují do buňky podobně, klatrinovými váčky, ale liší se v endocytických drahách. Miyazawa a kolektiv objevili, že rozpoznání jiného buněčného receptoru svede virus na jinou vnitrobuněčnou cestu. Adenovirus sérotypu 5 (Ad5) rychle uniká z časného endosomu, zatímco adenovirus sérotypu 7 (Ad7) je transportován lyzozomální dráhou a akumuluje se poblíž jádra v pozdních endosomech a lyzosomech. Vysvětlením této akumulace virionů v pozdních endosomech či lyzosomech může být to, že pro rozrušení váčkových membrán je pH optimum u podskupiny B (sérotyp 7) nižší než u podskupiny C (sérotyp 5). Po úniku podskupiny C z časného endosomu a podskupiny B z lyzozomu byla pozorována interakce virionu s tubulinovými motory, dyneiny (MIYAZAWA *et al.*, 2001).

Během cesty od povrchu buňky až k jádru dochází k částečnému rozvolnění kapsidy, která ztrácí pentony s vlákny, peripentonální hexony a proteiny stabilizující kapsidu (VI, VIII, IX, IIIa) (GREBER *et al.*, 1993). Vazba na jadernou membránu může být společným konečným

krokem Ad2 a Ad7 sérotypů na cestě od buněčné membrány k jádru (WISNIVESKY *et al.*, 1999).

Vápenaté ionty prokázaly vliv na vstup adenovirové DNA do jádra. Vyčerpání vápenatých iontů z ER a jaderného obalu vedlo sice k usazení Ad2 na jaderný pór a následnému rozbalení kapsidy (disassembly), ale import DNA a DNA vazebného proteinu VII neproběhl. Dále bylo prokázáno, že inhibitory *O*-glykosylovaných jaderných glykoproteinů zabráňují stabilnímu usazení na jaderné membráně, rozvolnění kapsidy a také jadernému importu virové DNA a VII proteinu (GREBER *et al.*, 1997).

Existuje mnoho studií popisujících transport Ad směrem k jádru (SUOMALAINEN *et al.*, 1999; LEOPOLD *et al.*, 2000; MABIT, 2002). Leopold a kolektiv ukázali, že po té, co Ad5 unikne z endosomu do cytosolu, je jeho interakce s mikrotubuly a cytoplazmatickými dyneiny potřebná pro dopravu virové DNA do jádra i pro předcházející lokalizaci viru v MTOC, které je poblíž jádra (LEOPOLD *et al.*, 2000). Důkazem toho, že je infektivita adenovirů závislá na mikrotubulech je to, že poté, co byly mikrotubuly rozrušeny nocodazolem byl pozorován výrazný pokles infekivity (MABIT *et al.* 2002). Nicméně, některé experimenty závislost infekce adenovirem na mikrotubulech neprokázaly a nevyloučily možnost jiné, na mikrotubulech nezávislé cesty (GLOTZER *et al.*, 2001; YEA *et al.*, 2007). Tyto odlišné výsledky mohou odrážet to, jak komplexní a rozdílná cesta adenovirů od cytoplazmatické membrány k jádru může být. Zatím tedy není jasné, zda jsou intaktní mikrotubuly pro infekci esenciální. Nicméně se nedá přehlížet často pozorovaná asociace Ad s MTOC. Akumulace Ad v blízkosti či přímo v MTOC byla pozorována v endoteliálních buňkách a fibroblastech (BAILEY *et al.*, 2003; STRUNZE 2005). Tím se naskytuje další otázka, jak se virus dopraví z MTOC až k jadernému póru (SUOMALAINEN *et al.*, 1999; LEOPOLD *et al.*, 2000; SUOMALAINEN *et al.*, 2001). Inhibitory jaderného exportního faktoru CRM1 (chromosome region maintenance 1) blokovaly infekci adenovirem. Ukázalo se, že CRM1 usnadňuje oddělení virionů od mikrotubulů a MTOC a tak umožňuje nasednutí na jaderný pór. Cílení kapsid z mikrotubulů a MTOC k jadernému póru tedy vyžaduje aktivitu CRM1 (STRUNZE *et al.*, 2005).

Trotman a kol. identifikovali jaderný protein nukleoporin, který funguje jako místo pro ukotvení Ad2 kapsid na jaderný pór. Tímto místem je CAN/Nup214, filamentární protein jaderného póru. Stabilně ukotvené kapsidy vyžadují rovněž vazbu k jadernému histonu1 (H1). Mikroinjekce protilátek proti H1 inhibovala jaderný import kapsid. Odlišná situace se ukázala být pro Ad3 kapsidy, které nevytváří stabilní spojení s jaderným pórem jako kapsidy Ad2. To



může být způsobeno odlišnými hexony těchto dvou sérotypů. Navíc, Ad3 nese v hexonech ani sekvenci pro interakci s H1 (TROTMAN LC *et al.*, 2001).

Jsou známy další proteinové interakce zapojené v jaderném vstupu Ad2. O chaperonu „heat-shock 70“ (Hsc70) se předpokládá, že hraje roli ve vstupu DNA do jádra. Zatím není přesně známo jakým způsobem se Hsp70 podílí na vstupu Ad genomu do jádra, nicméně se uvádí dvě možné alternativy. Interakce Hsp70 s kapsidou může indukovat její konformační změny, které vystavují jaderné lokalizační sekvence (NLS), jinak ukryté uvnitř kapsidy. NLS zavedou genom do jádra. Další možnou funkcí Hsp70 může být rozbalení kapsidy u jaderného póru a následným vstupem DNA do jádra. Hlavní komponentou kapsidy směřující virion k jádru se zdá být hexonový protein (STEWART *et al.*, 1997; SAPHIRE *et al.*, 2000).

Představu o vstupu adenovirů do jádra je možno shrnout následovně. Adenovirus je prostřednictvím CRM1 oddělen od mikrotubulů a MTOC a cílen k jádru. Zde rozpoznáním CAN/Nup214 nasedá na jaderný pór. Interakce importních faktorů, Hsp70, H1 s hlavním kapsidovým proteinem-hexonem indukují rozvolnění a konformační změny kapsidy. Tyto změny pravděpodobně umožní interakci transportinů a proteinu VII, které společně importují DNA do jádra. Protein VII je považován za nejvíce pravděpodobný mediátor importu virové DNA (HINDLEY *et al.*, 2007).

### 3.2. Herpesviry

Herpesviry jsou obalené, DNA viry o velikosti kapsidy 120 nm, složené ze 4 různých proteinů - VP5, VP19, VP23 a VP26. Hlavní kapsidový protein, VP5, utváří 150 hexonů a 12 pentonů (TRUS *et al.*, 1992; WHITTAKER *et al.*, 2003). Mezi obalem a kapsidou se nachází vrstva bohatá na proteiny, nazývaná tegument. Dosud zjištěné proteiny tegumentu jsou - VP1-3 (také VP1/2), VP13/14, VP16 a VP22. Virion je celkově tvořena z více než 30 proteinů. Nejlépe prostudovaný člen čeledi *Herpesviridae* je herpes simplex virus typu 1 (HSV-1), shrnuto z review WHITTAKER *et al.* (2003).

Obal HSV-1 představuje lipidovou dvojvrstvu, která obsahuje mnoho virových membránových proteinů včetně glykoproteinů. Některé glykoproteiny zprostředkují vstup do hostitelské buňky. Interakce glykoproteinu C a/nebo glykoproteinu B a D s buněčným povrchovým heparan sulfátem zprostředkuje vazbu virionu na buněčný povrch. Po počátečním rozpoznání heparan sulfátu následuje fúze virového obalu s cytoplazmatickou membránou, která je zprostředkována glykoproteiny B, D, H a L. Glykoprotein D má

schopnost interagovat s několika receptory na buněčném povrchu. S receptorem, který je členem TNF (tumor necrosis factor) rodiny, s imunoglobulinovými receptory a se specifickým místem v molekule heparan sulfátu. Vazba glykoproteinu D s jedním z těchto receptorů indukuje fúzi virového obalu s cytoplazmatickou membránou buňky (SPEAR *et al.*, 2000).

Do cytoplazmy uvolněná kapsida ztrácí některé proteiny tegumentu, zatímco jiné s ní zůstávají pevně spojeny a doprovází ji až k jádru. Proteiny tegumentu VP13/14 a VP16 disociují z kapsidy (SODEIK *et al.*, 1997; MORRISON *et al.*, 1998), zatímco VP1-3 a VP22 zůstávají s kapsidou asociované (MORRISON *et al.*, 1998). Kapsida je dopravena až k jádru prostřednictvím komplexu mikrotubul-dynein-dynaktin. Zatím není známo jaké interakce mezi kapsidou a mikrotubuly umožní její transport po mikrotubulech. Nicméně se ukazuje, že tyto proteiny tegumentu, které doprovází kapsidu až k jádru v ní mohou hrát roli (SODEIK *et al.*, 1997; DOHNER *et al.*, 2002).

K jádru dopravené HSV-1 kapsidy nasedají na jaderný pór, kterým je virová DNA vpuštěna do jádra. Několika EM studiemi byly pozorovány prázdné kapsidy navázané na jaderném póru, což může poukazovat na skutečnost, že po nasednutí kapsidy na jaderný pór, dochází k rychlému uvolnění DNA do jádra. Prázdňá kapsida je pak uvolněna do cytoplazmy (BATTERSON *et al.*, 1983; SODEIK *et al.*, 1997).

Ojala a kolegové (2000) tuto interakci HSV-1 kapsid s jaderným pórem pozorovali *in vitro*. Prokázali, že HSV-1 pravděpodobně využívá cestu závislou na NLS, kde imp- $\beta$ , nikoli imp- $\alpha$ , zprostředkovává nasednutí kapsidy na jaderný pór. Uvolnění DNA z kapsidy je proces závislý na ATP a Ran (OJALA *et al.*, 2000).

V procesu nasednutí kapsidy na pór a uvolnění DNA do jádra hraje pravděpodobně podstatnou roli tegumentový protein VP1-3. To ukazuje pokus Battersona a kolegů (1983) s HSV-1 mutanty (tsB7), které nesly teplotně senzitivní mutaci v genu pro VP1-3 protein. Tyto HSV-1 mutantní kapsidy byly sice schopné se při nepermisivní teplotě navázat na jaderný pór, ale neschopné uvolnit DNA do jádra. Předpokládá se tedy, že VP1-3 protein hraje podstatnou roli v uvolnění DNA z kapsidy (BATTERSON *et al.*, 1983; MORRISON *et al.*, 1998).

Jovasevic a kolektiv (2008) navrhli model, který předpokládá, že pro uvolnění DNA z kapsidy je potřebné štěpení N-konce VP1-3 proteinu. Zatím není dokázáno, jaký mechanismus je za štěpení VP1-3 zodpovědný. Může se jednat o serinovou nebo cyteinovou proteázu, která je rekrutovaná k póru po té, co na něj kapsida nasedne. Nelze ani vyloučit štěpení vlastní, virem kódovanou, serin proteázou. Nedávné studie ukazují na další možný

způsob štěpení N-konce VP1-3 proteinu, a to proteázovou aktivitou N-konce VP1-3 proteinu. N-konec tohoto proteinu nese aktivitu ubiquitin specifické cystein proteázy. Tato vlastnost VP1-3 proteinu se ukázala být konzervovaná u všech členů čeledi *Herpesviridae* (JOVASEVIC *et al.*, 2008).

Mutanty *tsB7* nasedají na pór při permissivní teplotě (BATTERSON *et al.*, 1983) ale k proteolytickému štěpení VP1-3 už nedochází. To naznačuje, že nasednutí kapsidy na pór není závislé na proteolytickém štěpení VP1-3. Štěpení nastává až po nasednutí kapsidy na pór. VP1-3 je pevně asociován s kapsidou, konkrétně s pentony (ZHOU *et al.*, 1999). Díky EM snímkům je evidentní, že kapsida nasedá orientovaně, pentonem směrem do jaderného póru (SODEIK *et al.*, 1997; OJALA *et al.*, 2000). Nasednutí na pór indukuje proteolytické štěpení VP1-3, které způsobí konformační změny v pentonu a následné uvolnění DNA do jádra (JOVASEVIC *et al.*, 2008).

### 3.3. Papillomaviry

Lidské papillomaviry (HPV) jsou neobalené, DNA viry o velikosti kapsidy 55 až 60 nm. HPV kapsida, složená z majoritního (L1) a minoritního (L2) proteinu, obklopuje dvouvláknovou DNA asociovanou s histony. DNA je ve formě minichromozomu.

L1 protein u papillomavirů, stejně tak jako VP1 protein u polyomavirů, vytváří pentamery. Jeho C-konec zprostředkovává kontakt se sousedním pentamerem. Minoritní protein, L2 tvoří třetinu z celkového množství L1, a interaguje s L1 proteinem. (CHEN *et al.*, 2000).

L1 vazbou na heparan sulfát vstupují papillomaviry do buňky klatrinem zprostředkovanou endocytózou (JOYCE *et al.*, 1999). Únik z endosomu je umožněn C-koncovou aktivitou L2 proteinu (KAMPER *et al.*, 2006).

L1 a L2 kapsidový protein vstupuje do jádra ve dvou fázích. Po té, co viriony infikují buňku a později, jako nově syntetizovány během produktivní infekce. Několik studií zabývajících se NLS těchto kapsidových proteinů a jejich importních cest do jádra odhalilo, že oba kapsidové proteiny L1 a L2 vstupují do jádra jak klasickou tak neklasickou importní cestou.

Hlavní kapsidový protein (L1) HPV typu 16, nese dvě klasické NLS sekvence na C-konci. Jedna z nich obsahuje šest bazických aminokyselin. Druhá je bipartitní a překrývá se s první (ZHOU *et al.*, 1991). Ukázalo se, že intaktní kapsidy nebyly schopné vstoupit do jádra, zatímco L1 homopentamerní kapsomery ano (NELSON *et al.*, 2000). Proto se předpokládá, že vystavení kapsid HPV redukčnímu prostředí cytoplazmy během časných fází infekce

může vést ke zrušení některých disulfidických vazeb. Zrušení disulfidických vazeb způsobí destabilizaci interakcí mezi pentamery L1, což vede k rozvolnění kapsidy a odhalení NLS sekvencí kapsidových proteinů (LI *et al.*, 1998).

Bylo prokázáno, že se L1 kapsomery (případně monomery) HPV typu 11, 16 a 45 dopravují do jádra prostřednictvím klasické a neklasické transportní cesty. Jejich interakcí s adapterem kap- $\alpha_2$  a dále kap- $\beta_1$  vzniká heterokomplex kap- $\alpha_2\beta_1$ /NLS, který je zavede do jádra (MERLE *et al.*, 1999; NELSON *et al.*, 2000, 2002). Nelson a kolektiv (2003) zjistili také způsob neklasické interakce L1 kapsomer s kap- $\beta_2$  a kap- $\beta_3$ , přičemž i intaktní kapsidy byly rozpoznány karyopheriny- $\beta_2$ ,  $\beta_3$ . NLS vazebná místa jsou pravděpodobně dostupná na povrchu intaktní kapsidy. Překrývající se L1 NLS sekvence působí kompetici mezi kap- $\alpha_2$  a kap- $\beta_2$ , kap- $\beta_3$  o navázání na NLS (NELSON *et al.*, 2003). Kapsomery mají schopnost interagovat s virovou DNA, prostřednictvím DNA vazebné domény L1 proteinu, která se překrývá s NLS L1 proteinu. Nedá se proto vyloučit schopnost L1 kapsomer zavést genom do jádra při časných fázích infekce (NELSON *et al.*, 2000).

Minoritní kapsidový protein L2 nese také dvě bazické NLS, N-koncovou a C-koncovou, o kterých se předpokládá, že hrají podstatnou roli v transportu L2 do jádra.

Darshan a kolektiv (2004) tuto roli NLS potvrdili. Kapsidový L2 protein HPV16 interaguje s několika druhy importinů. L2 vstupuje do jádra prostřednictvím klasické a neklasické cesty. C-koncová i N-koncová NLS L2 HPV16 proteinu interaguje s adaptorem kap- $\alpha_2$  a dále s kap- $\beta_1$ , čímž vzniká heterokomplex kap- $\alpha_2\beta_1$ /NLS. Zatímco jen N-koncová NLS interaguje s kap- $\beta_2$  a  $\beta_3$ . Tyto L2 interakce s kap- $\alpha_2\beta_1$  a kap- $\beta_2$  a  $\beta_3$  byly potvrzeny i u HPV18 a 11.

Není zcela jasné, proč L1 a L2 protein interaguje s více importními receptory a do jádra tak vstupuje prostřednictvím několika cest. Jedno vysvětlení by mohlo být, že v počátečních fázích infekce využívá jiných importních cest než v pozdní, produktivní fázi infekce. Je také možné, že v buňkách proliferujících a terminálně diferencovaných dochází k odlišným expresím karyopherinů (DARSHAN *et al.*, 2004). Stále není jasné, zda po rozvolnění kapsidy v cytoplazmě nezůstávají některé L1 kapsomery asociované s minoritním kapsidovým proteinem L2, a zda tyto L1/L2 komplexy společně neusnadňují import virové DNA do jádra (NELSON *et al.*, 2002).

### 3.4. Parvoviry

Parvoviry patří k nejvýznamnějším živočišným DNA virům. Jejich genom je tvořen ss DNA. Ikosahedrální kapsida parvovirů, o velikosti ~ 25 nm, obsahuje 10 kopií virového proteinu 1 (VP1) a 50 kopií virového proteinu 2 (VP2). Aminokyselinová sekvence VP1 je identická s VP2, kromě 146 aminokyselin, o které je N-konec VP1 delší (GREBER a FASSATI, 2003). Parvoviry zahrnují dvě skupiny virů, autonomní parvoviry a dependoviry. Dependoviry, nebo také adeno-asociované viry (AAV), vyžadují koinfekci pomocným virem (adenovirus nebo herpesvirus) (WHITTAKER, 2003).

Ačkoliv jednotliví zástupci parvovirů interagují s různými buněčnými receptory, všichni vstupují do buněk stejnou cestou, receptorem zprostředkovanou endocytózou. V průběhu endosomální cesty jsou kapsidy vystaveny prostředí o nízkém pH, které je, jak se ukazuje, esenciální pro jejich infekci. Znalosti o infekčním cyklu parvovirů byly získány především ze studií dvou členů, Canine parvoviru (CPV) a Minute virus of mice (MVM) (VIHINEN-RANTA *et al.*, 1998; PARKER a PARRISH 2000; SUIKKANEN *et al.*, 2002; MANI *et al.*, 2006).

CPV, jeden ze zástupců autonomních parvovirů, vstupuje do buňky po interakci s transferinovým receptorem (PARKER *et al.*, 2001) klatrinem zprostředkovanou endocytózou (PARKER a PARRISH 1997, 2000). Intenzivní studium endosomální cesty CPV odhalilo, že je dopravení CPV k buněčnému jádru závislé na mikrotubulech a dyneinu. CPV cestou směrem k jádru prochází recyklujícím endosomem a dále lyzosemem. V těchto kompartmentech přichází virus do kontaktu s kyselým pH, které navodí strukturní změny kapsidy. Z lyzozomu je pak CPV uvolněn a vstupuje do jádra (PARKER a PARRISH 1997; VIHINEN-RANTA *et al.*, 1998; PARKER a PARRISH, 2000; SUIKKANEN *et al.*, 2002).

Podobný průběh cesty platí i u MVM, dalšího zástupce autonomního parvoviru (MANI *et al.*, 2006). Ukázalo se, že strukturní změny CPV i MVM, podmíněné kyselým pH, jsou nezbytné pro efektivní vstup virů do jádra a produktivní infekci. VP1 N-koncová doména, která je ve virionech uvnitř kapsidy, je vlivem kyselého pH exponována na povrch (VIHINEN-RANTA *et al.*, 1997, 2002; SUIKKANEN, 2003; ; ROS, 2004). Dále bylo zjištěno, že tato doména obsahuje NLS sekvenci. Předpokládá se, že po té, co je NLS vystavená na povrch kapsidy, může být rozpoznána importiny a iniciovat tak import do jádra (LOMBARDO *et al.*, 2002; VIHINEN-RANTA *et al.*, 2002; SUIKKANEN *et al.*, 2003).

Sekvenční analýza VP1 N-koncové domény odhalila její možnou fosfolipázovou aktivitu (PLA<sub>2</sub>) u několika zástupců parvoviru, lidského B19, prasečího a hmyzího parvoviru

(ZÁDORI *et al.*, 2001). Předpokládá se, že se N-koncová fosfolipázová aktivita částečně podílí na úniku viru z endosomálních váčků, nicméně pro únik jsou patrně zapotřebí další pH-dependentní faktory (SUIKKANEN *et al.*, 2003). PLA<sub>2</sub> by se mohla podílet i na vstupu parvovirů do jádra, jak ukazují pokusy Cohena a spolupracovníků, které nasvědčují tomu, že by mohla existovat zcela jiná cesta parvovirů do jádra obcházející jaderný pór.

Cohen a kolektiv microinjikovali MVM do oocytů *Xenopus*. Elektronovou mikroskopií pak pozorovali ultrastrukturní změny v jaderném obalu infikovaných buněk: invaginace jaderné membrány, rozšíření mezi vnitřní a vnější jadernou membránou a přerušení jaderné membrány, kterými by mohl MVM vstupovat do jádra. Uvnitř invaginací byl pozorován virus. Přerušení membrány se nejprve objevovala ve vnější a později i ve vnitřní jaderné membráně (COHEN *et al.*, 2005, 2006).

Molekulární mechanismus vzniku těchto „děr“ v membráně zůstává zatím nejasný. Je ale velmi pravděpodobné, že vznikají fosfolipázovou A<sub>2</sub> aktivitou VP1 N-koncové domény. Původně předpokládaný vstup parvovirů do jádra pomocí importinů a jaderných pórů je proces rychlý (VIHINEN-RANTA *et al.*, 1997; LOMBARDO *et al.*, 2002; VIHINEN-RANTA *et al.*, 2002). Nicméně vstup parvovirů do jádra byl pozorován jako proces pomalý (VIHINEN-RANTA *et al.*, 2002). Zvláště na základě pokusů Cohena a kolegů se začalo uvažovat o alternativní cestě parvovirů do jádra. Nutnost vytvoření „děr“ v jaderné membráně pomocí enzymatické aktivity PLA<sub>2</sub> by mohla vysvětlit pomalý vstup viru do jádra (COHEN *et al.*, 2006).

### 3.5. Polyomaviry

Kapsidy polyomavirů, o velikosti ~50 nm, obsahují dvouvláknovou DNA, která je kondenzovaná histony (H2A, H2B, H3 a H4) do tzv. minichromozomu. Kapsidy jsou složeny z hlavního kapsidového proteinu VP1 a minoritních proteinů VP2 a VP3. VP1 vytváří 72 pentamerních kasomer. VP2 a VP3 mají schopnost interagovat svými C-konci s dutinou VP1 pentameru (GREBER a KASAMATSU, 1996; CHEN *et al.*, 1998).

Simian virus 40 je jeden z nejlépe prostudovaných polyomavirů. Starší studie časných fází polyomavirové infekce, pomocí elektronové mikroskopie a autoradiografie, odhalily výskyt virionů v jádře už 15 minut po infekci. Po vazbě na buněčný povrch vstupovaly viriony v monopinocytických váčcích do cytoplazmy a směřovaly k jádru. Mackay a Consingli

popsali na základě EM pozorování vstup virionů do jádra splynutím váčků nesoucích viriony s jadernou membránou. (MACKAY a CONSINGLI, 1976). Pozdější práce Clevera a kolektivu ukazují jinou cestu do jádra - transport jaderným pórem (CLEVER *et al.*, 1991).

Clever a kolektiv testovali, pomocí mikroinjekce, zda jsou SV40 viriony schopné vstoupit do jádra jaderným pórem a produktivně infikovat buňky. Úspěšnost přenosu genomu do jádra prokazovali akumulací velkého tumorogenního antigenu (LT) v jádře. Mikroinjekcí dochází k rychlejšímu transportu k jádru a tím se zkrátí interval, za který je možno detekovat LT přibližně o 7 hodin, v porovnání s normální infekcí, kde dochází k akumulaci LT 10 až 12 hodin po infekci. LT bylo možno detekovat v infikovaných buňkách už 3 hodiny po injekci. Akumulace LT v jádrech byla blokována WGA (wheat germ agglutinin) a monoklonální protilátkou - mAb 414 (CLEVER *et al.*, 1991). WGA a protilátka mAb 414 se vážou na nukleoporiny v centrální části jaderného póru a blokují tak jaderný import (AKEY a GOLGFARB, 1989). Jaderný import SV40 je kromě inhibitorů jaderného póru blokován také nízkou teplotou a nedostatkem energie ve formě adenosin trifosfátu-ATP (YAMADA a KASAMATSU, 1993).

Ukázalo se, že za import virových struktur do jádra jsou odpovědné virové strukturální proteiny (CLEVER *et al.*, 1991). Proteiny kapsidy VP1, 2 a 3 nesou individuální NLS sekvence ukryté uvnitř kapsidy (LIDDINGTON *et al.*, 1991; ISHII *et al.*, 1994; CHEN *et al.*, 1998). Nakanishi a kolektiv prokázali, že kapsidové proteiny, konkrétně VP3, směřují SV40 DNA do jádra. Mikroinjekce prázdných partikulí (s nebo bez DNA) vedla k jejich importu do jádra, zatímco DNA (s nebo bez histonů) do jádra nevstoupila. Přítomnost protilátek proti VP1 a VP3 v cytoplazmě, blokovala vstup virionů do jádra a tím i expresi LT. Inhibiční efekt na expresi LT měla i injekce protilátek proti VP3 do jádra (NAKANISHI, 1996). Kapsidové struktury jsou stabilizovány vápenatými ionty. Li a kolektiv zjistili, že se vápenaté ionty podílejí nejenom na stabilitě kapsidy, ale také na vstupu kapsidy do jádra. Vápenaté ionty se vážou do dvou vazebných míst každého VP1 monomeru. Rozlišuje se vazebné místo 1 a 2, přičemž mutace v místě 2 znemožnily vstup viru do jádra, kvůli předčasnému rozvolnění kapsidy v cytoplazmě. VP3 NLS sekvence se nachází ve spodní části pentameru (směrem dovnitř kapsidy), stejně tak jako vazebné místo 2. Předpokládá se, že při uvolnění vápenatých iontů z místa 2 nastanou strukturální změny, které odkryjí VP3 NLS (LIDDINGTON *et al.*, 1991; LI *et al.*, 2003). NLS VP3 interaguje s importinem  $\alpha 2/\beta$  (NAKANISHI *et al.*, 2002).

Použití mikroinjekce pro studium vstupu virionů do jádra se ukázalo být jako dobrý způsob studia časných fází infekce u SV40. Je totiž známo, že pouze 10% virionů způsobí produktivní infekci. Mikroinjekce zabezpečí to, že mnohem víc injikovaných virionů způsobí

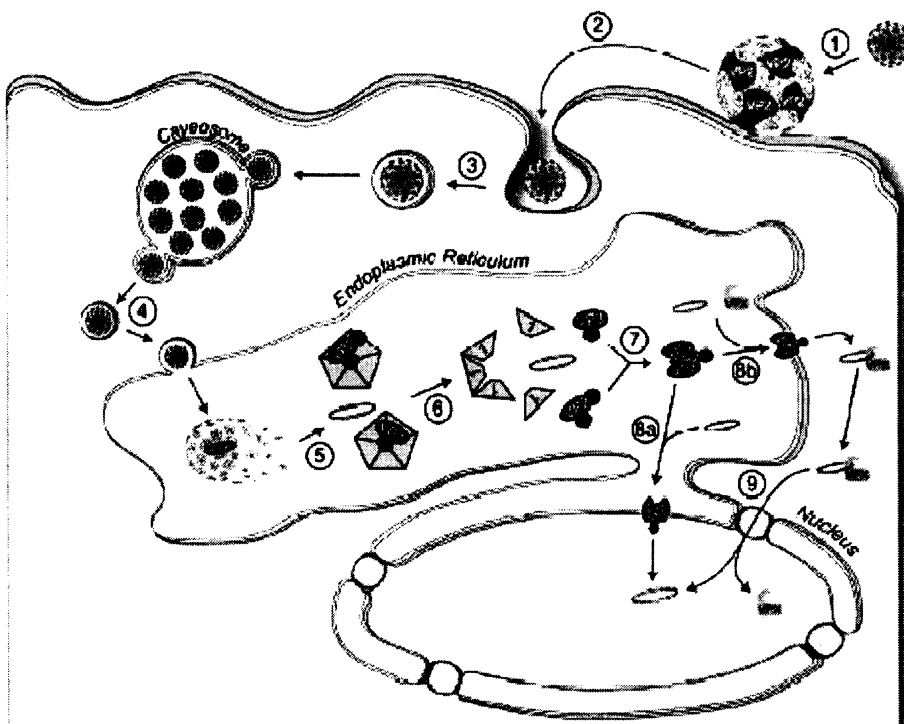
produktivní infekci, než je tomu u normální infekce (GREBER a KASAMATSU, 1996). Nicméně tato metoda nevyovídá nic o tom, jak se internalizované viriony dostanou z membránových kompartmentů do cytosolu a zdali cesta pozorovaná po mikroinjekci virionů do buňky skutečně odráží mechanismy používané viry při infekci.

SV40 vstupuje do buňky endocytózou po vazbě na buněčný receptor gangliosid GM (PELKMANS *et al.*, 2001; TSAI *et al.*, 2003) a je internalisován do váček obsahujících kaveolin 1 (PELKMANS *et al.*, 2001). Tyto, na kaveolin 1 bohaté váčky, směřují do organel nazývaných kaveosomy. Z nich je virus dopravován v membránových útvarech (neobsahujících kaveolin) podél mikrotubulů až do ER (PELKMANS *et al.*, 2001), kde pravděpodobně dochází k částečnému rozvolnění kapsidy.

SV40 patrně využívá mašinerii ER, která jinak slouží k identifikaci špatně složených proteinů a jejich translokaci přes membránu ER. Thiol-disulfid oxidoreduktáza (ERp57), obsažená v lumen ER, způsobí počáteční rozvolnění kapsidy. Erp57 katalyzuje izomerizaci disulfidických vazeb, čímž naruší vazby mezi jednotlivými VP1 pentamery (SCHELLHAAS *et al.*, 2007).

Podle představy Danielse a kolektivu dochází v ER k rozvolnění kapsidy a uvolnění strukturálních proteinů VP2 a VP3, které v lumen oligomerizují a integrují se do membrány ER. V membráně ER vytvoří pór, kterým se virová DNA se zbytky rozvolněné virové kapsidy transportují do cytoplazmy. Další možností, kterou autoři zvažují je přímá cesta z ER do jádra přes pór vytvořený minoritními proteiny na vnitřní jaderné membráně ( Viz obr. 4). Alternativně se předpokládá, že SV40 může využívat tzv. ERAD (ER-associated degradation) degradační cestu, na kterou jsou v ER cíleny špatně složené proteiny. Dislokou na membráně ER, součást ERAD cesty, translokuje špatně složené proteiny z ER do cytoplazmy, kde jsou degradovány. Rozvolněné kapsidy by mohly představovat špatně složený protein a mohou tak být transportovány z ER do cytoplazmy prostřednictvím dislokou (DANIELS *et al.*, 2006a). Nedávné studie odhalily, že viroporinové vlastnosti minoritních proteinů (schopnost perforovat membrány) se mohou uplatňovat i v závěrečném stadiu virové infekce při uvolňování virového potomstva z buněk. V pozdní fázi infekčního cyklu byla pozorována exprese nového pozdního virového proteinu SV40, VP4. VP4 oligomerizuje s VP3, možná i s VP2. Vzájemná interakce těchto proteinů změní jejich vlastnosti. Společně jsou směřovány do buněčné membrány, kde vytváří pór, který iniciuje lyzi buňky. Ukázalo se tedy, že je VP4 esenciální pro šíření virové infekce do dalších buněk (DANIELS *et al.* 2006b).





Obr.4 Model vstupu SV40 a penetrace membrány ER

(1) Vazba SV40 na buněčný povrch zprostředkovaná kapsidou a VP2. (2) Navázaný virus vstupuje do kaveol. (3) Virus je endocytován a transportován od kaveol odvozenými váčky do kaveosomu. (4) SV40 partikule vypučí z kaveosomu a putují k ER. (5) V ER je kapsida rozvolněná pomocí chaperonů, které sídlí v ER. Dochází k uvolnění genomu a VP1 pentamerů asociovaných s VP2 a VP3. (6) Další disociace VP1 pentamerů uvolní navázané VP2 a VP3. (7) VP2 and VP3 oligomerizují a zabudují se do membrány ER, kde vytvoří multimerní komplex, kterým se transportuje genom skrz membránu ER. (8a) Integrace komplexu VP2 a VP3 do membrány společné ER a jádru transportuje genom přímo do jádra. (8b) VP2 a VP3 komplex zabudovaný v membráně ER daleko od jádra transportuje genom do cytoplazmy, (9) kde jeden ze strukturálních proteinů “VPX,” s využitím své NLS a DNA vazebné domény dopraví genom do jádra (DANIELS *et al.*, 2006a).

Jak už bylo zmíněno, po vypuštění z kaveosomu putuje SV40 do ER. Nicméně se stále neví k jakým událostem zde přeně dochází. Mohou zde nastat strukturální změny, které odkryjí NLS či jen rozvolní kapsidu, která se po vstupu do cytosolu plně či částečně rozpadne. DNA (s nebo bez kapsidových proteinů) by pak mohla být pomocí importinů transportována do jádra. Daniels a kolektiv ukazují na zcela jiné strukturální změny. Existuje tedy několik představ o vlivu ER a o cestě do jádra, nicméně žádná z nich není prokázána.

#### 4. Závěr

Spojení mezi cytoplazmou a jádrem zprostředkuje jaderný pór, jehož nepostradatelnou funkcí, je transport mezi cytoplazmou a jádrem. Mnoho studií bylo zpočátku věnováno samotné struktuře póru a později i transportu jaderným pórem. Celková struktura póru, transport a jeho jednotlivé komponenty jsou v současné době dobře prostudovány, nicméně jsou zde stále nejasnosti v roli jednotlivých nukleoporinů v transportu a přesunu nákladu skrz pór. DNA viry, kterým byla věnována tato bakalářská práce, se všechny dostávají do jádra, ale často odlišným způsobem. Všechny čeledi, kromě parvovirů, jsou příliš velké pro vstup jaderným pórem. Dalo by se předpokládat, že 25 nm velké parvoviry, interakcí s importiny vstupují do jádra jaderným pórem aniž by se jejich kapsida musela podstatně rozvolnit. Nicméně se uvažuje o zcela nové cestě parvovirů do jádra, obcházející jaderný pór. Parvovirus enzymaticky naruší vnější i vnitřní jadernou membránu a po té vstupuje do jádra. Autoři navrhuující tuto alternativní cestu parvovirů do jádra nevysvětlují, zda takovéto narušení jaderné membrány ovlivní viabilitu infikovaných buněk. Kapsidy adenovirů a herpesvirů jsou příliš velké na průchod pórem. Proto se dá předpokládat, že se do jádra jejich kapsida nedostane. Po nasednutí na pór se kapsida adenovirů téměř celá rozpadne, naproti tomu u herpesvirů je kapsida u póru v cytoplazmě zachována a dochází ke strukturním změnám především ve VP1-3 proteinu, jehož štěpení je esenciální pro vstup virové DNA do jádra. Papilloma a polyomaviry byly donedávna součástí jedné čeledi. Zatím se jen ukazuje, jako společný znak jejich vstupu do jádra, interakce s importními receptory. Papillomaviry jsou v této oblasti málo probádané. Stejně tak jako u parvovirového VP1 proteinu, tak i u minoritního kapsidového proteinu L2 papillomavirů, se ukázala enzymatická aktivita. Obecně se tyto enzymatické aktivity kapsidových proteinů uplatňují při úniku z endosomu či pozdních váčků a není vyloučeno že by nemohly rozrušit i jiné buněčné membrány, jako membránu jadernou nebo endoplazmatického retikula. Je zajímavé, že se na výsledky starších pokusů zapomíná. Většina novějších studií na vstupu SV40 do jádra byla provedená pomocí mikroinjekcí virionů do jádra. Mikroinjekce SV40 sice poukazuje na interakce mezi kapsidovými proteiny a importiny, které zprostředkují jaderný vstup, nicméně nebere v úvahu přirozenou infekční cestu. Tento nepřirozený způsob infekce pomíjí cestu, kterou virus prochází od buněčného povrchu, dále přes ER až do jádra. Proto je výsledky mikroinjekcí nutno brát s rezervou. Při klasické infekci se pozoruje akumulace SV40 v ER. Nejnovější experimenty odhalují pravděpodobnou funkci ER ve vstupu SV40 do jádra. Budoucí studium vstupu SV40 do jádra by se mělo zaměřit na vliv ER na viriony polyomavirů a na jejich

následující osud. Stále není rozhodnuto, zdali se virus, nebo jeho část translokuje z ER do cytozolu, nebo existuje, s účastí viroporinových vlastností minoritních proteinů VP2 a VP3, z ER přímá cesta do jádra.

## 5. Použitá literatura

Akey, C.W., Goldfarb, D.S. (1989): Protein import through the nuclear pore complex is a multistep process. *J Cell Biol* 109:971-982.

Alber, F., Dokudovskaya, S., Veenhoff, L.M., Zhang, W., Kipper, J., Devos, D., Suprapto, A., Karni-Schmidt, O., Williams, R., Chait, B.T., Sali, A., Rout, M.P. (2007): The molecular architecture of the nuclear pore complex. *Nature* 450:695-701.

Bailey, C.J., Crystal, R.G., Leopold, P.L. (2003): Association of adenovirus with the microtubule organizing center. *J Virol* 77:13275-13287.

Batterson, W., Furlong, D., Roizman, B. (1983): Molecular genetics of herpes simplex virus. VIII. further characterization of a temperature-sensitive mutant defective in release of viral DNA and in other stages of the viral reproductive cycle. *J Virol* 45:397-407.

Bayliss, R., Corbett, A.H., Stewart, M. (2000): The Molecular Mechanism of Transport of Macromolecules Through Nuclear Pore Complexes. *Traffic* 1:448-456.

Bayliss, R., Littlewood, T., Strawn, L.A., Wenthe, S.R., Stewart, M. (2002): GLFG and FxFG nucleoporins bind to overlapping sites on importin-beta. *J Biol Chem* 277:50597-50606.

Beck, M., Förster, F., Ecke, M., Plitzko, J.M., Melchior, F., Gerisch, G., Baumeister, W., Medalia, O. (2004): Nuclear Pore Complex Structure and Dynamics Revealed by Cryoelectron Tomography. *Science* 306:1387-1390.

Beck, M., Lucic, V., Förster, F., Baumeister, W., Medalia, O. (2007): Snapshots of nuclear pore complexes in action captured by cryo-electron tomography. *Nature* 449:611-615.

Bergelson, J.M., Cunningham, J.A., Droguett, G., Kurt-Jones, E.A., Krithivas, A., Hong, J.S., Horwitz, M.S., Crowell, R.L., Finberg, R.W. (1997): Isolation of a common receptor for Coxsackie B viruses and adenoviruses 2 and 5. *Science* 275:1320-1323.

Bischoff, F.R., Krebber, H., Smirnova, E., Dong, W., Ponstingl, H. (1995): Co-activation of RanGTPase and inhibition of GTP dissociation by Ran-GTP binding protein RanBP1. *EMBO J* 14:705-715.

Bischoff, F.R., Ponstingl, H. (1991): Mitotic regulator protein RCC1 is complexed with a nuclear ras-related polypeptide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:10830-10834.

Callan, H.G., Tomlin, S.G. (1950): Experimental studies on amphibian oocyte nuclei. I. Investigation of the structure of the nuclear membrane by means of the electron microscope. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 137:367-378.

Chen, X.S., Garcea, R.L., Goldberg, I., Casini, G., Harrison, S.C. (2000): Structure of small virus-like particles assembled from the L1 protein of human papillomavirus 16. *Mol Cell* 5:557-567.

- Chen, X.S., Stehle, T., Harrison, S.C. (1998): Interaction of polyomavirus internal protein VP2 with the major capsid protein VP1 and implications for participation of VP2 in viral entry. *EMBO J* 17:3233-3240.
- Chook, Y.M., Blobel, G. (2001): Karyopherins and nuclear import. *Curr Opin Struct Biol* 11:703-715.
- Cingolani, G., Bednenko, J., Gillespie, M.T., Gerace, L. (2002): Molecular basis for the recognition of a nonclassical nuclear localization signal by importin beta. *Mol Cell* 10:1345-1353.
- Cingolani, G., Petosa, C., Weis, K., Müller, Ch.W. (1999): Structure of importin-beta bound to the IBB domain of importin-alpha. *Nature* 399:221-229.
- Clever, J., Yamada, M., Kasamatsu, H. (1991): Import of simian virus 40 virions through nuclear pore complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:7333-7337.
- Cohen, S., Behzad, A.R., Carroll, J.B., Panté, N. (2006): Parvoviral nuclear import: bypassing the host nuclear-transport machinery. *J Gen Virol* 87:3209-3213.
- Cohen, S., Panté, N. (2005): Pushing the envelope: microinjection of Minute virus of mice into *Xenopus* oocytes causes damage to the nuclear envelope. *J Gen Virol* 86:3243-3252.
- Cronshaw, J.A., Krutchinsky, A.N., Zhang, W.Z., Chait, B.T., Matunis, M.J. (2002): Proteomic analysis of the mammalian nuclear pore complex. *J Cell Biol* 158:915-927.
- Daniels, R., Rusan, N.M., Wadsworth, P., Hebert, D.N. (2006a): SV40 VP2 and VP3 insertion into ER membranes is controlled by the capsid protein VP1: implications for DNA translocation out of the ER. *Mol Cell* 28:955-966.
- Daniels, R., Rusan, N.M., Wilbuer, A.K., Norkin, L.C., Wadsworth, P., Hebert, D.N. (2006b): Simian virus 40 late proteins possess lytic properties that render them capable of permeabilizing cellular membranes. *J Virol* 80:6575-6587.
- Darshan, M.S., Lucchi, J., Harding, E., Moroianu, J. (2004): The I2 minor capsid protein of human papillomavirus type 16 interacts with a network of nuclear import receptors. *J Virol* 78:12179-12188.
- Denning, D.P., Patel, S.S., Uversky, V., Fink, A.L., Rexach, M. (2003): Disorder in the nuclear pore complex: The FG repeat regions of nucleoporins are natively unfolded. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:2450-2455.
- Devos, D., Dokudovskaya, S., Williams, R., Alber, F., Eswar, N., Chait, B.T., Rout, M.P., Sali, A. (2006): Simple fold composition and modular architecture of the nuclear pore complex. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:2172-2177.
- Döhner, K., Wolfstein, A., Prank, U., Echeverri, C., Dujardin, D., Vallee, R., Sodeik, B. (2002): Function of dynein and dynactin in herpes simplex virus capsid transport. *Mol Biol Cell* 13:2795-2809.

- Fahrenkrog, B., Aebi, U. (2003): The nuclear pore complex: nucleocytoplasmic transport and beyond. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4:757–766.
- Fontes, M.R., Teh, T., Kobe, B. (2000): Structural basis of recognition of monopartite and bipartite nuclear localization sequences by mammalian importin- $\alpha$ . *J Mol Biol* 297:1183-1194.
- Fried, H., Kutay, U. (2003): Nucleocytoplasmic transport: taking an inventory. *Cell Mol Life Sci* 60:1659-1688.
- Gall, J.G. (1967): Octagonal nuclear pores. *J Cell Biol* 32:391-399.
- Gasiorowski, J.Z., Dean, D.A. (2003): Mechanisms of nuclear transport and interventions. *Adv Drug Deliv Rev* 55:703-716.
- Glotzer, J.B., Michou, A.I., Baker, A., Saltik, M., Cotten, M. (2001): Microtubule-independent motility and nuclear targeting of adenoviruses with fluorescently labeled genomes. *J Virol* 75:2421-2434.
- Greber, U.F., Fassati, A. (2003): Nuclear import of viral DNA genomes. *Traffic* 4:136-143.
- Greber, U.F., Kasamatsu, H. (1996): Nuclear targeting of SV40 and adenovirus. *Trends Cell Biol* 6:189-195.
- Greber, U.F., Suomalainen, M., Stidwill, R.P., Boucke, K., Ebersold, M.W., Helenius, A. (1997): The role of the nuclear pore complex in adenovirus DNA entry. *EMBO J* 16:5998-6007.
- Greber, U.F., Willetts, M., Webster, P., Helenius, A. (1993): Stepwise dismantling of adenovirus 2 during entry into cells. *Cell* 75:477-486.
- Gorlich, D., Henklein, P., Laskey, R.A., Hartmann, E. (1996): A 41 amino acid motif in importin- $\alpha$  confers binding to importin- $\beta$  and hence transit into the nucleus. *EMBO J* 15:1810-1817.
- Hindley, C.E., Lawrence, F.J., Matthews, D.A. (2007): A role for transportin in the nuclear import of adenovirus core proteins and DNA. *Traffic* 8:1313-1322.
- Hinshaw, J.E., Carragher, B.O., Milligan, R.A. (1992): Architecture and design of the nuclear pore complex. *Cell* 69:1133-1141.
- Ishii, N., Nakanishi, A., Yamada, M., Macalalad, M.H., Kasamatsu, H. (1994): Functional complementation of nuclear targeting-defective mutants of simian virus 40 structural proteins. *J Virol* 68:8209-8216.
- Jovasevic, V., Liang, L., Roizman, B. (2008): Proteolytic cleavage of VP1-2 is required for release of herpes simplex virus 1 DNA into the nucleus. *J Virol* 82:3311-3319.

Joyce, J.G., Tung, J.S., Przysiecki, C.T., Cook, J.C., Lehman, E.D., Sands, J.A., Jansen, K.U., Keller, P.M. (1999): The L1 major capsid protein of human papillomavirus type 11 recombinant virus-like particles interacts with heparin and cell-surface glycosaminoglycans on human keratinocytes. *J Biol Chem* 274:5810-5822.

Kämper, N., Day, P.M., Nowak, T., Selinka, H.C., Florin, L., Bolscher, J., Hilbig, L., Schiller, J.T., Sapp, M. (2006): A membrane-destabilizing peptide in capsid protein L2 is required for egress of papillomavirus genomes from endosomes. *J Virol* 80:759-768.

Leopold, P.L., Crystal, R.G. (2007): Intracellular trafficking of adenovirus: many means to many ends. *Adv Drug Deliv Rev* 59:810-821.

Leopold, P.L., Kreitzer, G., Miyazawa, N., Rempel, S., Pfister, K.K., Rodriguez-Boulan, E., Crystal, R.G. (2000): Dynein- and microtubule-mediated translocation of adenovirus serotype 5 occurs after endosomal lysis. *Hum Gene Ther* 11:151-165.

Leopold, P.L., Pfister, K.K. (2006): Viral strategies for intracellular trafficking: motors and microtubules. *Traffic* 7:516-523.

Li, P.P., Naknanishi, A., Tran, M.A., Ishizu, K., Kawano, M., Phillips, M., Handa, H., Liddington, R.C., Kasamatsu, H. (2003): Importance of Vp1 calcium-binding residues in assembly, cell entry, and nuclear entry of simian virus 40. *J Virol* 77:7527-7538.

Li, M., Beard, P., Estes, P.A., Lyon, M.K., Garcea, R.L. (1998): Intercapsomeric disulfide bonds in papillomavirus assembly and disassembly. *J Virol* 72:2160-2167.

Liddington, R.C., Kasamatsu, H. (2003): Importance of Vp1 calcium-binding residues in assembly, cell entry, and nuclear entry of simian virus 40. *J Virol* 77:7527-7538.

Liddington, R.C., Yan, Y., Moulai, J., Sahli, R., Benjamin, T.L., Harrison, S.C. (1991): Structure of simian virus 40 at 3.8-Å resolution. *Nature* 354:278-284.

Lombardo, E., Ramírez, J.C., Garcia, J., Almendral, J.M. (2002): Complementary roles of multiple nuclear targeting signals in the capsid proteins of the parvovirus minute virus of mice during assembly and onset of infection. *J Virol* 76:7049-7059.

Mabit, H., Nakano, M.Y., Prank, U., Saam, B., Döhner, K., Sodeik, B., Greber, U.F. (2002): Intact microtubules support adenovirus and herpes simplex virus infections. *J Virol* 76:9962-9971.

Mackay, R.L., Consigli, R.A. (1976): Early events in polyoma virus infection: attachment, penetration, and nuclear entry. *J Virol* 19:620-636.

Mani, B., Baltzer, C., Valle, N., Almendral, J.M., Kempf, C., Ros, C. (2006): Low pH-dependent endosomal processing of the incoming parvovirus minute virus of mice virion leads to externalization of the VP1 N-terminal sequence (N-VP1), N-VP2 cleavage, and uncoating of the full-length genome. *J Virol* 80:1015-1024.

Matsuura, Y., Stewart, M. (2005): Nup50/Npap60 function in nuclear protein import complex disassembly and importin recycling. *EMBO J* 24:3681-3689.

- Merle, E., Rose, R.C., LeRoux, L., Moroianu, J. (1999): Nuclear import of HPV11 L1 capsid protein is mediated by karyopherin  $\alpha 2\beta 1$  heterodimers. *J Cell Biochem* 74:628-637.
- Miyazawa, N., Crystal, R.G., Leopold, P.L. (2001): Adenovirus serotype 7 retention in a late endosomal compartment prior to cytosol escape is modulated by fiber protein. *J Virol* 75:1387-1400.
- Morrison, E.E., Stevenson, A.J., Wang, Y.F., Meredith, D.M. (1998): Differences in the intracellular localization and fate of herpes simplex virus tegument proteins early in the infection of Vero cells. *J Gen Virol* 79:2517-2528.
- Naim, B., Brumfeld, V., Kapon, R., Kiss, V., Nevo, R., Reich, Z. (2007): Passive and facilitated transport in nuclear pore complexes is largely uncoupled. *J Biol Chem* 282:3881-3888.
- Nakanishi, A., Clever, J., Yamada, M., Li, P.P., Kasamatsu, H. (1996): Association with capsid proteins promotes nuclear targeting of simian virus 40 DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:96-100.
- Nakanishi, A., Shum, D., Morioka, H., Otsuka, E., Kasamatsu H. (2002): Interaction of the Vp3 nuclear localization signal with the importin  $\alpha 2/\beta$  heterodimer directs nuclear entry of infecting simian virus 40. *J Virol* 76:9368-9377.
- Nelson, L.M., Rose, R.C., LeRoux, L., Lane, C., Bruya, K., Moroianu, J. (2000): Nuclear import and DNA binding of human papillomavirus type 45 L1 capsid protein. *J Cell Biochem* 79:225-238.
- Nelson, L.M., Rose, R.C., Moroianu, J. (2002): Nuclear import strategies of high risk HPV16 L1 major capsid protein. *J Biol Chem* 277:23958-23964.
- Nelson, L.M., Rose, R.C., Moroianu, J. (2003): The L1 major capsid protein of human papillomavirus type 11 interacts with Kap  $\beta 2$  and Kap  $\beta 3$  nuclear import receptors. *Virology* 306:162-169.
- Ojala, P.M., Sodeik, B., Ebersold, M.W., Kutay, U., Helenius, A. (2000): Herpes simplex virus type 1 entry into host cells: reconstitution of capsid binding and uncoating at the nuclear pore complex in vitro. *Mol Cell Biol* 20:4922-4931.
- Panté, N., Aebi, U. (1996): Toward the molecular dissection of protein import into nuclei. *Curr Opin Cell Biol* 8:397-406.
- Panté, N., Kann, M. (2002): Nuclear pore complex is able to transport macromolecules with diameters of about 39 nm. *Mol Biol Cell* 13:425-434.
- Parker, J.S., Murphy, W.J., Wang, D., O'Brien, S.J., Parrish, C.R. (2001): Canine and feline parvoviruses can use human or feline transferrin receptors to bind, enter, and infect cells. *J Virol* 75:3896-3902.
- Parker, J.S., Parrish, C.R. (1997): Canine parvovirus host range is determined by the specific conformation of an additional region of the capsid. *J Virol* 71:9214-9222.



Parker, J.S., Parrish, C.R. (2000): Cellular uptake and infection by canine parvovirus involves rapid dynamin-regulated clathrin-mediated endocytosis, followed by slower intracellular trafficking. *J Virol* 74:1919-1930.

Pelkmans, L., Kartenbeck, J., Helenius, A. (2001): Caveolar endocytosis of simian virus 40 reveals a new two-step vesicular-transport pathway to the ER. *Nat Cell Biol* 3:473-483.

Pemberton, L.F., Paschal, B.M. (2005): Mechanisms of receptor-mediated nuclear import and nuclear export. *Traffic* 6:187-198.

Ribbeck, K., Lipowski, G., Kent, H.M., Stewart, M., Gorlich, D. (1998): NTF2 mediates nuclear import of Ran. *EMBO J* 17:6587-6598.

Ris, H. (1997): High-resolution field-emission scanning electron microscopy of nuclear pore complex. *Scanning* 19:368-375.

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

Rout, M.P., Aitchison, J.D., Suprpto, A., Hjertaas, K., Zhao, Y., Chait, B.T. (2000): The yeast nuclear pore complex: composition, architecture, and transport mechanism. *J Cell Bio* 148:635-651.

Saphire, A.C., Guan, T., Schirmer, E.C., Nemerow, G.R., Gerace, L. (2000): Nuclear import of adenovirus DNA in vitro involves the nuclear protein import pathway and hsc70. *J Biol Chem* 275:4298-4304.

Schelhaas, M., Malmström, J., Pelkmans, L., Haugstetter, J., Ellgaard, L., Grünewald, K., Helenius, A. (2007): Simian Virus 40 depends on ER protein folding and quality control factors for entry into host cells. *Cell* 131:516-529.

Schwarz-Herion, K., Maco, B., Sauder, U., Fahrenkrog, B. (2007): Domain topology of the p62 complex within the 3-D architecture of the nuclear pore complex. *J Mol Biol* 370:796-806.

Sodeik, B., Ebersold, M.W., Helenius, A. (1997): Microtubule-mediated transport of incoming herpes simplex virus 1 capsids to the nucleus. *J Cell Biol* 136:1007-1021.

Soullam, B., Worman, H.J. (1995): Signals and structural features involved in integral membrane protein targeting to the inner nuclear membrane. *J Cell Biol* 130:15-27.

Spear, P.G., Eisenberg, R.J., Cohen, G.H. (2000): Three classes of cell surface receptors for alphaherpesvirus entry. *Virology* 275:1-8.

Stewart, C.L., Roux, K.J., Burke, B. (2007): Blurring the boundary: the nuclear envelope extends its reach. *Science* 318:1408-1412.

Stewart, K.J., Roux, B., Burke, B. (2007): Blurring the boundary: the nuclear envelope extends its reach. *Science* 318:1408-1412.

Stewart, M. (2007): Molecular mechanism of the nuclear protein import cycle. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8:195-208.

Stewart, P.L., Chiu, C.Y., Huang, S., Muir, T., Zhao, Y., Chait, B., Mathias, P., Nemerow, G.R. (1997): Cryo-EM visualization of an exposed RGD epitope on adenovirus that escapes antibody neutralization. *EMBO J* 16:1189-1198.

Stoffler, D., Feja, B., Fahrenkrog, B., Walz, J., Typke, D., Aebi, U. (2003) Cryo-electron tomography provides novel insights into nuclear pore architecture: implications for nucleocytoplasmic transport. *J Mol Biol* 328:119–130.

Strunze, S., Trotman, L.C., Boucke, K., Greber, U.F. (2005): Nuclear targeting of adenovirus type 2 requires CRM1-mediated nuclear export. *Mol Biol Cell* 16:2999-3009.

Suikkanen, S., Antila, M., Jaatinen, A., Vihinen-Ranta, M., Vuento, M. (2003): Release of canine parvovirus from endocytic vesicles. *Virology* 316:267-280.

Suikkanen, S., Sääjärvi, K., Hirsimäki, J., Väililehto, O., Reunanen, H., Vihinen-Ranta, M., Vuento, M. (2002): Role of recycling endosomes and lysosomes in dynein-dependent entry of canine parvovirus. *J Virol* 76:4401-4411.

Suomalainen, M., Nakano, M.Y., Boucke, K., Keller, S., Greber, U.F. (2001): Adenovirus-activated PKA and p38/MAPK pathways boost microtubule-mediated nuclear targeting of virus. *EMBO J* 20:1310-1319.

Suomalainen, M., Nakano, M.Y., Keller, S., Boucke, K., Stidwill, R.P., Greber, U.F. (1999): Microtubule-dependent plus- and minus end-directed motilities are competing processes for nuclear targeting of adenovirus. *J Cell Biol* 144:657-672.

Tsai, B., Gilbert, J.M., Stehle, T., Lencer, W., Benjamin, T.L., Rapoport, T.A. (2003): Gangliosides are receptors for murine polyoma virus and SV40. *EMBO J* 22:4346-4355.

Terry, L.J., Shows, E.B., Wentz, S.R. (2007): Crossing the nuclear envelope: hierarchical regulation of nucleocytoplasmic transport. *Science* 318:1412-1416.

Trotman, L.C., Mosberger, N., Fornerod, M., Stidwill, R.P., Greber, U.F. (2001): Import of adenovirus DNA involves the nuclear pore complex receptor CAN/Nup214 and histone H1. *Nat Cell Biol* 3:1092-1100.

Trus, B.L., Newcomb, W.W., Booy, F.P., Brown, J.C., Steven, A.C. (1992): Distinct monoclonal antibodies separately label the hexons or the pentons of herpes simplex virus capsid. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:11508-11512.

Tuve, S., Wang, H., Ware, C., Liu, Y., Gaggar, A., Bernt, K., Shayakhmetov, D., Li, Z., Strauss, R., Stone, D., Lieber, A. (2006): A new group B adenovirus receptor is expressed at high levels on human stem and tumor cells. *J Virol* 80:12109-12120.

- Vihinen-Ranta, M., Kakkola, L., Kalela, A., Vilja, P., Vuento, M. (1997): Characterization of a nuclear localization signal of canine parvovirus capsid proteins. *Eur J Biochem* 250:389-394.
- Vihinen-Ranta, M., Kalela, A., Mäkinen, P., Kakkola, L., Marjomäki, V., Vuento, M. (1998): Intracellular route of canine parvovirus entry. *J Virol* 72:802-806.
- Vihinen-Ranta, M., Yuan, W., Parrish, CR. (2000): Cytoplasmic trafficking of the canine parvovirus capsid and its role in infection and nuclear transport. *J Virol* 74:4853-4859.
- Wang, K., Huang, S., Kapoor-Munshi, A., Nemerow, G. (1998): Adenovirus internalization and infection require dynamin. *J Virol* 72:3455-3458
- Wang, R.W., Brattain, M.G. (2007): The maximal size of protein to diffuse through the nuclear pore is larger than 60 kDa. *FEBS Lett* 581:3164-3170.
- Weis, K., Ryder, U., Lamond, A.I. (1996): The conserved amino-terminal domain of hSRP1 alpha is essential for nuclear protein import. *EMBO J* 15:1818-1825.
- Whittaker, GR. (2003): Virus nuclear import. *Adv Drug Deliv Rev* 55:733-747.
- Whittaker, G.R., Kann, M., Helenius, A. (2000): Viral entry into the nucleus. *Annu Rev Cell Dev Biol* 16:627-651.
- Wickham, T.J., Mathias, P., Cheresch, D.A., Nemerow, G.R. (1993): Integrins alpha v beta 3 and alpha v beta 5 promote adenovirus internalization but not virus attachment. *Cell* 73:309-319.
- Wisnivesky, J.P., Leopold, P.L., Crystal, R.G. (1999): Specific binding of the adenovirus capsid to the nuclear envelope. *Hum Gene Ther* 10:2187-2195.
- Yamada, H., Kasamatsu, H. (1993): Role of nuclear pore complex in simian virus 40 nuclear targeting. *J Virol* 67:119-130.
- Yang, Q., Rout, M.P., Akey, C.W. (1998): Three-dimensional architecture of the isolated yeast nuclear pore complex: functional and evolutionary implications. *Mol Cell* 1:223-234.
- Yea, C., Dembowy, J., Pacione, L., Brown, M. (2007): Microtubule-mediated and microtubule-independent transport of adenovirus type 5 in HEK293 cells. *J Virol* 81:6899-6908.
- Zádori Z, Szelei J, Lacoste MC, Li Y, Gariépy S, Raymond P, Allaire M, Nabi IR, Tijssen P. (2001): A viral phospholipase A2 is required for parvovirus infectivity. *Dev Cell* 1:291-302.
- Zhou, J., Doorbar, J., Sun, X.Y., Crawford, L.V., McLean, C.S., Frazer, I.H. (1991): Identification of the nuclear localization signal of human papillomavirus type 16 L1 protein. *Virology* 185:625-632.

Zhou, Z.H., Chen, D.H., Jakana, J., Rixon, F.J., Chiu, W. (1999): Visualization of tegument-capsid interactions and DNA in intact herpes simplex virus type 1 virions. *J Virol* 73:3210-3218.