

Univerzita Karlova

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Speciální chemicko-biologické obory

Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organismů



Veronika Zachovalová

MikroRNA kódované polyomaviry

MicroRNA encoded by polyomaviruses

Typ závěrečné práce:

Bakalářská práce

Školitel: Mgr. Kateřina Bruštíková, Ph.D.

Praha, 2021

Poděkování

Nejvíce bych chtěla poděkovat své školitelce Mgr. Kateřině Bruštkové, Ph.D. za trpělivost, užitečné rady, vstřícný přístup a také bych chtěla ocenit čas, který musela vynaložit na vedení mé bakalářské práce.

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, 12. 8. 2021

Podpis:

Veronika Zachovalová

Abstrakt

MicroRNA jsou malé regulační molekuly RNA kódované v genomu organismu. Biogeneze mikroRNA probíhá částečně v jádře a částečně v cytoplazmě. Výsledkem je funkční, 22 nt dlouhá molekula mikroRNA. MikroRNA jsou schopné umlčovat geny za pomoci sekvenčně specifické degradace cílové mRNA, nebo za pomoci represe translace cílových, komplementárních mRNA. U savců je běžnější mechanismus represe translace, kdy je mikroRNA neúplně komplementární k 3'UTR cílové mRNA. Polyomaviry jsou malé, neobalené DNA viry s cirkulárním dsDNA genomem a ikosahedrální kapsidou tvořenou pentamerami VP1 proteinu. Tyto viry se řadí mezi tzv. onkogenní viry, neboť mohou přispět k transformaci buněk a rozvoji vážných onemocnění jako je například karcinom Merkelových buněk. Ve svém genomu kódují regulační proteiny nazývané T antigeny, strukturální geny kapsidy, ale také mikroRNA. Právě na mikroRNA kódované genomem SV40, MPyV, MCPyV, BKPyV a JCPyV bude zaměřená tato práce.

Klíčová slova: polyomaviry, malé interferující RNA, mikroRNA, siRNA, RNA interference, myší polyomavirus, BK virus, JC virus, SV40

Abstract

MicroRNAs are small regulating molecules of RNA that are encoded by organism's genome. Biogenesis of microRNA takes place partly in the nucleus and partly in the cytoplasm. Result of this biogenesis is a 22 nt long microRNA molecule. They are able to silence the genes thanks to sequence-specific degradation of a target mRNA or thanks to the repression of translation of target, complementary mRNA. In mammalian cells the mechanism of translational repression is more common. During this mechanism the microRNA molecule is not entirely complementary to 3'UTR of its target mRNA. Polyomaviruses are small, non-enveloped dsDNA viruses with a circular genome and icosahedral capsid composed of VP1 protein pentamers. These viruses belong in a group called onkoviruses, which can transform infected cells and contribute to development of serious illnesses such as Merckel cell carcinoma. Their genome encodes regulating proteins called T antigens, structural capsid proteins and also microRNAs. My main focus in this thesis will be SV40, MPyV, MCPyV, BKPyV and JCPyV encoded microRNA molecules.

Key words: polyomaviruses, small interfering RNA, microRNA, siRNA, RNA interference, mouse polyomavirus, BK virus, JC virus, SV40

Seznam použitých zkratk

3'UTR (3' Untranslated Region) – 3' nepřekládaná oblast

5-HT_{2A} – 5-hydroxy-tryptamin 2A – serotoninový receptor 2A

Ago – protein Argonaut

Å – jednotka vzdálenosti Ångström

BKPyV – lidský polyomavirus BK

bp (base pair) – páry bází

CTL (cytotoxic T lymphocyte) - cytotoxické T lymfocyty

CXCL8 (C-X-C motif chemokine ligand 8) - interleukin 8

DCR-1 – lidský Dicer

DGCR8 (DiGeorge syndrome critical region 8) – DiGeorge syndrom kritická oblast 8

DMWD (dystrophia myotonica WD repeat-containing protein)

dsDNA (double-stranded DNA) – dvouřetězcová DNA

dsRNA (double-stranded RNA) – dvouřetězcová RNA

ER – endoplazmatické retikulum

ERAD dráha (endoplasmatic reticulum associated degradation) – dráha degradace spojená s ER

Exp-5 – exportin 5

IL-17F – interleukín 17F

JCPyV – lidský polyomavirus JC

kbp (kilobase pair) – páry kilobází

kDa – jednotka molekulární hmotnosti kilodalton

LT (Large tumor antigen) – velký T antigen

MAPK – mitogenem aktivované protein kinázy

miRNA - mikroRNA

MCPyV (Merkel cell polyomavirus) – polyomavirus Merkelových buněk

miRISC (mikro RNA-induced silencing complex) – komplex nakládající miRNA duplex

MPyV (Murine polyomavirus) – myší polyomavirus

MT (Middle tumor antigen) – střední T antigen

NCCR (non-coding control region) – nekódující regulační oblast

NLS (nucleus localization sequence) – signál/sekvence jaderné lokalizace

nt – nukleotidů

ORF (open reading frame) – otevřený čtecí rámeček

PI3K – fosfatidylinositol-3-kináza

PML (progressive multifocal leukoencephalopathy) – progresivní multifokální leukoencefalopatie

PP2A – protein fosfatáza 2

pRb – retinoblastomový protein

pre-miRNA – prekursorová mikroRNA

pri-miRNA – primární mikroRNA

PVAN (polyomavirus-associated nephropathy) - nefropatie spojená s polyomaviry

RISC (RNA-induced silencing complex) – komplex nakládající siRNA i miRNA duplexů u savců

RPTEC (primary renal proximal tubule epithelial cells) – renální tubulární epiteliální buňky

RT-PCR (reverse transcriptase polymerase chain reaction) – polymerázová řetězová reakce s reverzní transkriptázou

siRNA (small interfering RNA) – malá interferující RNA

Src (sarcoma) – nереceptorové tyrosinkinázy Src

ssRNA (single-stranded RNA) – jednořetězcová RNA

ST (Small tumor antigen) – malý T antigen

SV40 (Simian virus) 40 – opičí vakuolační polyomavirus 40

VP (Viral protein) – virový protein

TNF- α (tumor necrosis factor α) – faktor nádorové nekrózy α

TRBP (TAR-RNA binding protein) – TAR-RNA vazebný protein

Tt (Tiny T antigen) – velmi malý T antigen

ULBP2 (UL16 binding protein 2) – UL16 vazebný protein 2

ULBP3 (UL16 binding protein 3) – UL16 vazebný protein 3

Obsah

1. Úvod.....	1
2. Umlčování RNA pomocí malých nekódujících RNA.....	2
2.1. Historie a dělení malých nekódujících RNA.....	2
2.2. MikroRNA dráha v savčích buňkách.....	3
2.2.1. Začátek miRNA biogeneze v jádře savčích buněk.....	3
2.2.2. Přesun pre-miRNA do cytoplazmy a přeměna na miRNA	5
2.2.3. Maturace miRNA za pomoci RISC.....	6
2.2.4. Mechanismus represe genové exprese navozené miRNA.....	7
2.3. Funkce miRNA u savců	9
3. Polyomaviry	9
3.1. Představení a zařazení polyomavirů.....	9
3.2. Patologie polyomavirů	10
3.3. Viriony polyomavirů.....	11
3.4. Genom polyomavirů a jeho organizace.....	11
3.4.1. Proteiny polyomavirů a jejich funkce	13
3.5. Životní cyklus polyomavirů	16
4. MiRNA kódované polyomaviry.....	19
4.1. Úvod k polyomavirovým miRNA.....	19
4.1.1. miRNA kódovány genomem SV40 a jejich funkce	19
4.1.2. miRNA kódovány genomem MPyV a jejich funkce.....	21
4.1.3. miRNA kódovány genomem BKPyV a jejich funkce.....	23
4.1.4. miRNA kódovány genomem JCPyV a jejich funkce.....	25
4.1.5. miRNA kódované genomem MCPyV a jejich funkce	27
6. Závěr	29
7. Seznam použité literatury.....	30

1. Úvod

Viry jsou systémy na molekulární úrovni, které se nacházejí na pomezí života a smrti, neboť nevykazují všechny znaky živých organismů. Jejich replikační cykly jsou zcela závislé na hostitelských buňkách a jejich translační mašinérii. Jedná se o nejvíce zastoupené entity na této planetě a jejich význam pro koevoluci s ostatními organismy i jejich význam v ekologii je obrovský. Konkrétně polyomaviry jsou součástí života většiny z nás, protože séropozitivita na tyto malé, dvouřetězcové DNA viry v české populaci činí okolo 60%, přičemž 69% Čechů ve věku 6-64 let je séropozitivních na BKPyV, 57% na JCPyV a 63% na MCPyV (Sroller *et al.* 2014). Lidské polyomaviry dokáží v našich buňkách persistovat, tedy dlouhodobě přežívat, aniž by působily jakékoli obtíže. Situace se ovšem může rapidně změnit u jedinců vykazujících imunodeficienci, kdy lidské polyomaviry přejdou z perzistence do aktivního stavu, reaktivují svou replikaci, popř. indukují transformaci infikovaných buněk, a tak způsobí neléčitelné, mnohdy fatální onemocnění.

Reaktivace virové replikace a transformace buněk indukovaná přítomností virů je často spojována s nižší expresí nekódujících, regulačních molekul mikroRNA (miRNA), ať už se jedná o přímo virem kódované miRNA, nebo miRNA buněčného původu, u kterých dochází k deregulaci způsobené přítomností virových onkoproteinů. Jak přesně virové miRNA ovlivňují expresi určitých virových a buněčných proteinů, a jak přesně probíhá životní cyklus viru je velice důležité pro pochopení zatím nejasných mechanismů, jakým dochází k perzistenci polyomavirů v hostitelských buňkách, k reaktivaci replikace jejich genomu, k transformaci hostitelských buněk.

Hlavním cílem této práce je shrnout poznatky o mikroRNA, které jsou kódovány nejstudovanějšími polyomaviry, a to myším polyomavirem (MPyV), opičím polyomavirem (SV40) a lidskými polyomaviry BKPyV, JCPyV a polyomavirem Merkelových buněk (MCPyV).

Práce je dále rozdělena na tři dílčí cíle:

Prvním z nich je představit proces umlčování RNA (RNA silencing) i molekuly, které jej způsobují. Detailněji pak popsat dráhu mikroRNA v savčích buňkách, včetně biogeneze mikroRNA a mechanismu jejich účinku na cílové transkripty.

Druhým dílčím cílem je představit polyomaviry, zařadit je v kontextu klasifikace virů, dále popsat jejich genom a proteiny, které kódují. A v neposlední řadě představit replikační cyklus a patologii.

Třetím dílčím cílem je shrnout poznatky o polyomaviry kódovaných mikroRNA, jejich úloze v replikačním cyklu viru a v interakci s hostitelskou buňkou. Zaměřím se na výše zmíněné zástupce čeledi *Polyomaviridae*.

2. Umlčování RNA pomocí malých nekódujících RNA

Umlčování RNA (anglicky RNA silencing) se děje v cytoplazmě buněk za pomoci malých nekódujících RNA a jejich drah. Malé nekódující RNA mají velikost 21-30 nt. Jejich společným rysem je asociace s Argonautovými proteiny (Ago) (shrnuť v Czech & Hannon 2011). Při umlčování genů se chovají jako negativní regulátory a navozují posttranskripční inhibici genové exprese. Tato inhibice je sekvenčně specifická, neboť tyto malé regulační molekuly RNA cílí na částečně, nebo úplně komplementární cílové mRNA. Malé nekódující RNA jsou jednou z hlavních složek regulace exprese genů v eukaryotických genomech, mluvíme o RNA umlčování, neboť regulace malými RNA molekulami má inhibiční charakter.

2.1. Historie a dělení malých nekódujících RNA

Objev umlčování RNA byl učiněn roku 1990 na petúniích (Napoli *et al.* 1990). Poté, co Napoli a jeho spolupracovníci vnesli do rostlin chimerický gen pro chalkon syntázu se daly viditelně odlišit dva fenotypy rostlin: divoký typ se sytě fialovými korunními lístky a mutantní fenotyp s bílými lístky, nebo s fialovými lístky s bílými skvrnami. Zjistilo se, že tyto mutanty se od divokého typu liší v množství mRNA produkované genem pro chalkon syntázu. U petúnií s bílými místy na květu či s celými bílými květy byly naměřeny 50x nižší hladiny mRNA pro chalkon syntázu. Došlo tedy k inhibici genové exprese, ovšem nezjistili, jakým mechanismem (Napoli *et al.* 1990). Dnes už víme, že šlo právě o sekvenčně specifické umlčování transkriptů za pomoci malých nekódujících RNA.

Dalším velkým průlomem v oblasti drah malých nekódujících RNA byl objev RNA interference u *Caenorhabditis elegans*. Za objevem stojí Andrew Fire a Craig C. Mello, kteří zjistili, že po injekci dsRNA do buněk dochází k jejich hybridizaci s endogenní mRNA, což má za následek snížení hladiny cílové mRNA. Tento jev, při kterém dochází k sekvenčně specifickému snížení genové exprese v buňkách na posttranskripční úrovni, nazvali RNA interference (Fire *et al.* 1998).

Ačkoli pojem RNA interference někteří autoři zobecňují, jedná se jen o jednu ze tří hlavních drah umlčování RNA. RNA interference (RNAi) je způsobena malými interferujícími RNA (siRNA). V roce 1998 byl také učiněn objev siRNA a umlčování genů u hmyzu, konkrétně u *Drosophila melanogaster* (Kennerdell & Carthew 1998). V roce 1999 objevili Hamilton a Baulcombe tyto malé (25 nt dlouhé) nekódující RNA u rostlin. Zjistili, že hrají úlohu v posttranskripčním umlčování genů a jedná se o sekvenčně specifický obranný mechanismus proti virové mRNA. Ovšem siRNA mohou cílit i na buněčnou mRNA (Hamilton & Baulcombe 1999). V roce 2001 bylo objeveno, že siRNA vložené do buněk mohou umlčovat geny v myším, opičím i lidském genomu (Elbashir *et al.* 2001). Tento objev otevřel dveře do diagnostické a experimentální budoucnosti synteticky vyrobených siRNA, které mají v současnosti obrovský význam v cílovém umlčování konkrétních genů, především v základním výzkumu a v budoucnosti by mohly být dobrými nástroji při diagnostice, prognostice a léčbě nemocí.

Druhá dráha umlčování RNA souvisí s piRNA, což jsou malé RNA interagující s PIWI proteiny. Třetí je mikroRNA dráha využívající molekuly mikroRNA (miRNA).

V roce 1993 byla objevena první molekula mikroRNA v *Caenorhabditis elegans*, objevitelé byli Lee a spolupracovníci. Zjistili, že mikroRNA snižuje expresi proteinu LIN-14 tak, že se naváže na jeho transkript a zabrání translaci. Snížení tohoto proteinu má u hád'átka za následek přechod z prvního larválního stádia (L1) do následujícího larválního stádia (L2). Nejprve se myslelo, že umlčování genů za pomoci mikroRNA je pouze u *Caenorhabditis elegans*, ale později byly objeveny tyto molekuly i u dalších organismů (Lee *et al.* 1993). Ve své bakalářské práci se zaměřím na mikroRNA dráhu a její enzymy v savčích buňkách.

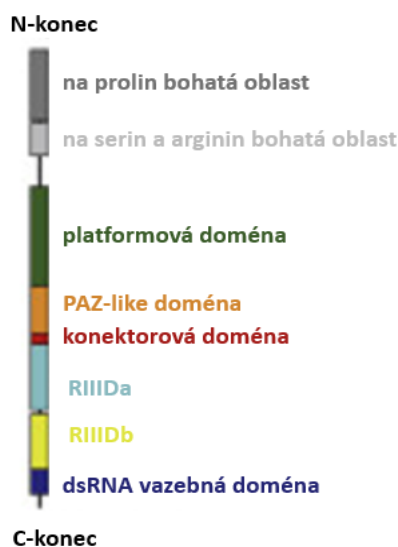
2.2. MikroRNA dráha v savčích buňkách

2.2.1. Začátek miRNA biogeneze v jádře savčích buněk

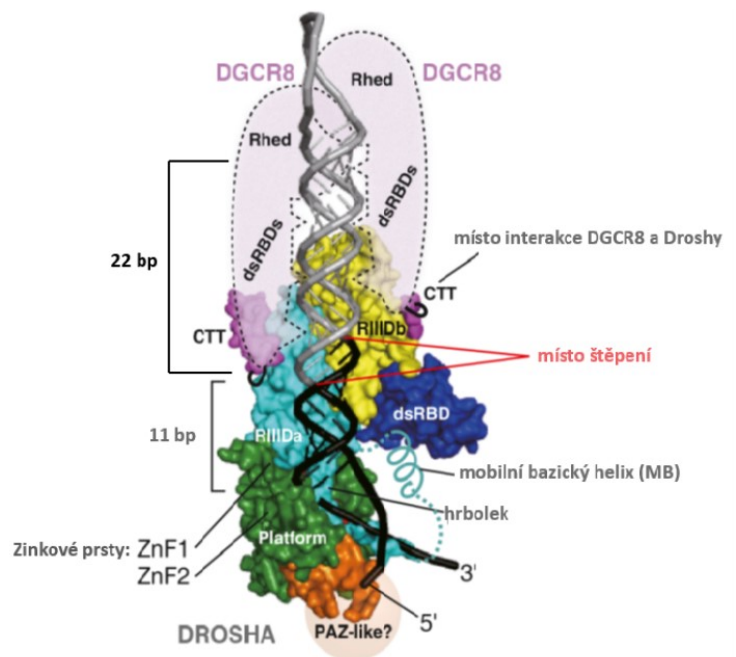
Savčí mikroRNA jsou kódovány přímo genomem. Přibližně polovina z nich je kódována v intronech protein kódujících genů. Další možností je, že jsou kódovány v oblastech genomu, které nekódují proteiny, v tomto případě se chovají jako samostatná, nezávislá transkripční jednotka. V genomu jsou organizovány buď jednotlivě, po transkripci mají tedy monocistronní strukturu s jednou vlásenkou, nebo se nachází v klastrech a jsou přepisovány jako polycistronní transkripty, obsahující jednotky, desítky až stovky vlásenek. Každá z těchto vlásenek představuje jeden budoucí miRNA duplex a je dále zpracovávána jednotlivě. V klastrech jsou organizovány miRNA, které se řadí do jedné tzv. rodiny, tyto miRNA ze stejné rodiny mají stejnou cílovou, tzv. „seed“ sekvenci (Rodriguez *et al.* 2004). Seed sekvence tvoří nukleotidy na pozici 2 až 7 od 5' konce miRNA, které jsou nezbytné pro interakci s cílovou mRNA. MiRNA patřící do jedné rodiny mají stejné sekvence na 5' koncích, ale na 3' koncích se mohou lišit (Brennecke *et al.* 2005). MikroRNA nemá výlučně endogenní původ, v savčí buňce se mohou nacházet i miRNA exogenního původu, především virového původu. Několik čeledí virů ve svém genomu kódují vlastní miRNA, například herpesviry, adenoviry, bakuloviry nebo polyomaviry, kterým se v této práci budu věnovat (shrnuto v Grundhoff & Sullivan 2011).

Genomem kódované miRNA jsou až na výjimky přepisovány RNA polymerázou II za vzniku tzv. primární RNA (pri-miRNA), která je tvořena asi 35 bp dlouhým stonkem vlásenky, dále smyčkou různé délky na apikálním konci vlásenky a dvěma jednořetězcovými přečnivajícími konci. V případě polycistronních transkriptů může pri-miRNA obsahovat takových vlásenek více, čímž se zvětšuje i její délka. Tak jako jiné produkty RNA polymerázy II nese i pri-miRNA na 3' konci polyA sekvenci a na 5' konci methylguanovinovou čepičku. Malá část miRNA je transkribována RNA polymerázou III. (Lee *et al.* 2002, Lee *et al.* 2004).

V jádře je dále pri-miRNA štěpena na tzv. prekursorovou miRNA (pre-miRNA) za pomoci jaderného Mikroprocesorového komplexu. Ten se skládá z RNázy III 2. třídy nazývané Drosha (Filippov *et al.* 2000) a dvou molekul proteinu DGCR8 (DiGeorge Syndrome Critical Region 8), které vážou dsRNA prostřednictvím své dsRNA vazebné domény. Drosha je multidoménový protein, domény jsou seřazeny na primární sekvenci následovně: N-terminální doména s oblastí bohatou na prolin, následuje oblast bohatá na serin a arginin, dále platformová doména, PAZ-like doména, konektorová doména, dvě RNázové domény – RIIIDa a RIIIDb, na C-konci se nachází doména vážící dvouřetězcovou RNA (dsRBP) (Obr. 1). Interakce Droshy s dvěma molekulami DGCR8 a s pri-miRNA substrátem je znázorněna na obrázku 2 (Obr. 2).



Obr. 1: Domény lidské Droshy a jejich seřazení na primární sekvenci. Převzaté a upravené: Kwon, Nguyen, Choi, Jo, Hohng, Kim, Woo 2016



Obr. 2: Interakce lidské droshy s DGCR8 a jejich domény vyznačené na 3D modelu. Převzaté a upravené: Kwon, Nguyen, Choi, Jo, Hohng, Kim, Woo 2016

Tak jak je tomu i u ostatních RNáz typu III, závisí i katalytická aktivita enzymu Drosha na přítomnosti Mg^{2+} iontů. Ačkoli je již samotný enzym Drosha schopný štěpit dsRNA substrát, štěpení probíhá nespecificky (Gregory *et al.* 2004). Podle modelu vytvořeného Kwon *et al.* 2016 se každé vlákno vlásenky pri-miRNA naváže na jednu molekulu DGCR8 tak, že DGCR8 rozpozná místo, kde stonek vlásenky dsRNA přechází na ssRNA smyčku a od tohoto místa změří 22 bp. Poté je Droshou vyměřena vzdálenost 11 bp od kořene vlásenky, tedy místa, kde přecházející ssRNA přechází na dsRNA stonek, směrem k DGCR8. Místo štěpení je tedy vzdáleno 22 bp od apikálního přechodu ssRNA na dsRNA a 11 bp od bazálního přechodu ssRNA na dsRNA (Han *et al.* 2006, Kwon *et al.* 2016).

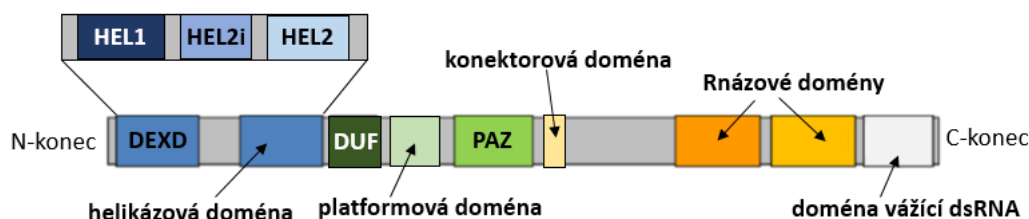
Drosha funguje jako molekulární pravítko, přičemž na vyměrování místa štěpení se podílí její PAZ-like doména, dále tzv. hrbolek (bulb), mobilní bazický helix a platformová doména. Model štěpení

pomocí Mikroprocesorového komplexu byl detailně popsán na základě krystalové struktury lidské Droshy v komplexu s C koncovým helixem DGCR8 (obr. 2) při rozlišení 3.2 Å (Kwon *et al.* 2016). Výsledným produktem štěpení je kratší vlásenka nazývaná prekursorová miRNA (pre-miRNA). Produkt Droshy je dlouhý 70 nt a je charakteristický svým 2 nt přesahem a hydroxylovou skupinou na 3'konci, přičemž na 5'konci se nachází monofosfát (Y. Lee *et al.* 2003, Han *et al.* 2004).

2.2.2. Přesun pre-miRNA do cytoplazmy a přeměna na miRNA

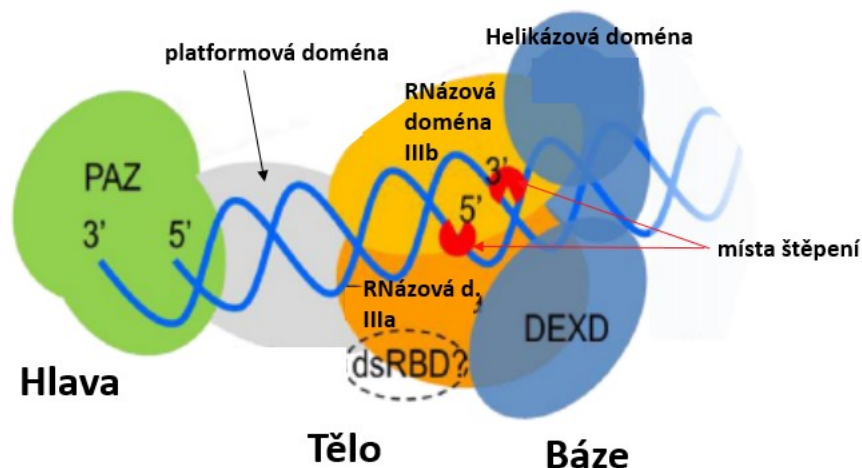
Pre-miRNA jsou z jádra do cytoplazmy transportovány pomocí exportinu 5 mechanismem závislým na Ran-GTP (Yi *et al.* 2003).

Dalším, a zároveň posledním krokem mikroRNA biogeneze v cytoplazmě je štěpení pre-miRNA na miRNA duplex za pomoci RNA nukleázy III. rodiny zvanou Dicer (Bernstein *et al.* 2001). Savčí Dicer je protein velký okolo 220kDa, skládá se z několika domén, seřazené na primární sekvenci od N k C-konci jsou následovně: N-terminální DEAD-like (DEXD), N-terminální helikázová doména, doména DUF283, Piwi/Argonaut/Zwille (PAZ) doména, RNázová IIIa a RNázová IIIb doména, a C-terminální dsRNA-vazebná doména (dsRBD).



Obr. 3: Savčí Dicer a jeho domény seřazené od N-konce k C-konci. Převzaté a upravené: Svobodova, Kubikova, Svobodova 2016

Tvar Diceru v prostoru připomíná písmeno L a lze jej rozdělit do tří základních částí – hlava, tělo a báze. V bázi Diceru se nachází helikázová doména, ta patří do RIG-I helikázové rodiny a skládá se ze tří globulárních podjednotek – HEL1, HEL2, HEL2i, všechny tři se nachází v blízkosti aktivního místa RNázových domén (shrnuto v Svobodova *et al.* 2016).



Obr. 4: Model lidského Diceru s vyznačenými jednotlivými doménami, místy štěpení pre-miRNA a třemi částmi – hlavou, tělem a bází. Převzato a upraveno: Svobodova, Kubikova, Svoboda 2016

Dvouřetězcová RNA je rozpoznávána PAZ doménou, ta se nachází na úplném vrcholu hlavy Diceru. PAZ doména rozpoznává RNA substráty, které mají na 3'konci 2 nt přesah. V těle Diceru se nachází dvě RNázové III domény (RIIIa a RIIIb), každá štěpí jedno vlákno z pre-miRNA (Lau *et al.* 2012). RNázové domény III vyžadují ke své katalytické funkci Mg^{2+} ionty, stejně jako je tomu u Droshy. Savčí Dicer štěpí 22 nt od PAZ domény, funguje tedy jako molekulární pravítko, podobně jako Drosha. Produktem Diceru je duplex RNA dlouhý 22 nt s 2 nt přesahem na 3'konci a s fosfátovou skupinou na 5'konci (Zhang *et al.* 2004).

Při navázaném substrátu má savčí Dicer buď otevřenou, nebo uzavřenou formu. Při otevřeném Diceru se pre-miRNA ohýbá směrem k helikázové doméně a má přístup k aktivním místům RNázových domén, substrát tedy může být štěpen. Při uzavřené konformaci Diceru je substrát uvězněn mezi helikázovou a PAZ doménou, na kterou je navázaný, je tedy dále od katalytických míst RNázových domén a nemůže být naštěpen. Uzavřená forma se nejčastěji tvoří při navázání prekursorů siRNA, protože Dicer má štěpící preferenci pro prekursorů miRNA (Taylor *et al.* 2013). U lidí s Dicerem interagují dva důležité pomocné proteiny – PACT a TRBP. Výzkumy naznačují, že nejsou přímo vyžadovány na katalytickou aktivitu Diceru, ale oba proteiny se váží na helikázovou doménu Diceru a významně přispívají ke stabilitě enzymu (Lee *et al.* 2006, Wilson *et al.* 2015). Funkce TRBP spočívá v tom, že se naváže na Dicer s navázanou pre-miRNA a navádí tento komplex směrem k Argonautu (Ago) (Chendrimada *et al.* 2005).

2.2.3. Maturace miRNA za pomoci RISC

Po dokončení biogeneze duplexu miRNA nastává další fáze miRNA dráhy a to vytvoření jednořetězcové, maturované miRNA za pomoci komplexu miRISC a jeho hlavního enzymu – Argonautu (Ago). Součástí miRISC je vždy jeden z Ago proteinů (J. Liu *et al.* 2004). RISC (RNA-

inducted silencing complex) je ribonukleoprotein nacházející se nejen v cytoplazmě, ale i v buněčných kompartmentech, jako například v ER, GA, lysozomech nebo endozomech. (shrnutí v Makarova *et al.* 2016). Ago proteiny se nachází v cytoplazmatických P-tělískách, což jsou centra v buňce, kde probíhá rozklad mRNA (Sen & Blau 2005).

Duplex miRNA se skládá ze dvou vláken miRNA/miRNA*. Vláknu, které je označené hvězdičkou se říká tzv. „passenger“ vlákno, druhému se říká vedoucí, tzv. „guide“ vlákno. Za guide miRNA vlákno se dle prvnotních studií považovalo vlákno integrované do zralého miRISC komplexu s termodynamicky méně stabilním 5'koncem (Khvorova *et al.* 2003), nicméně novější studie ukazuje, že se na regulaci genové exprese mohou podílet stejnou měrou obě vlákna miRNA duplexu a zvolení jednoho, či druhého závisí na cílové mRNA a na tkáni, kde dochází k její expresi (Ro *et al.* 2007).

Sestavení miRISC se dá rozdělit na dvě fáze – nakládání a maturace. Při nakládání dojde k připojení miRNA duplexu na Ago, k tomuto procesu je potřeba Hsc70 a Hsp90 chaperonů (Naruse *et al.* 2018). Při interakci dvouřetězcové miRNA a Ago se komplexu říká pre-miRISC. Maturace miRISC začíná tím, že N-koncová doména Ago oddělí 3' konec guide vlákna, které je připojeno na 5'konec passenger vlákna. Dojde k rozvolnění dvoušroubovice a passenger vlákno je uvolněno z miRISC do cytoplazmy. Uvolněné passenger vlákno je následně degradováno. Tímto procesem je dokončena maturace miRISC. Maturovaný komplex obsahující pouze jednořetězcovou, guide miRNA a Ago se nazývá miRISC (shrnutí v Kobayashi & Tomari 2016).

2.2.4. Mechanismus represe genové exprese navozené miRNA

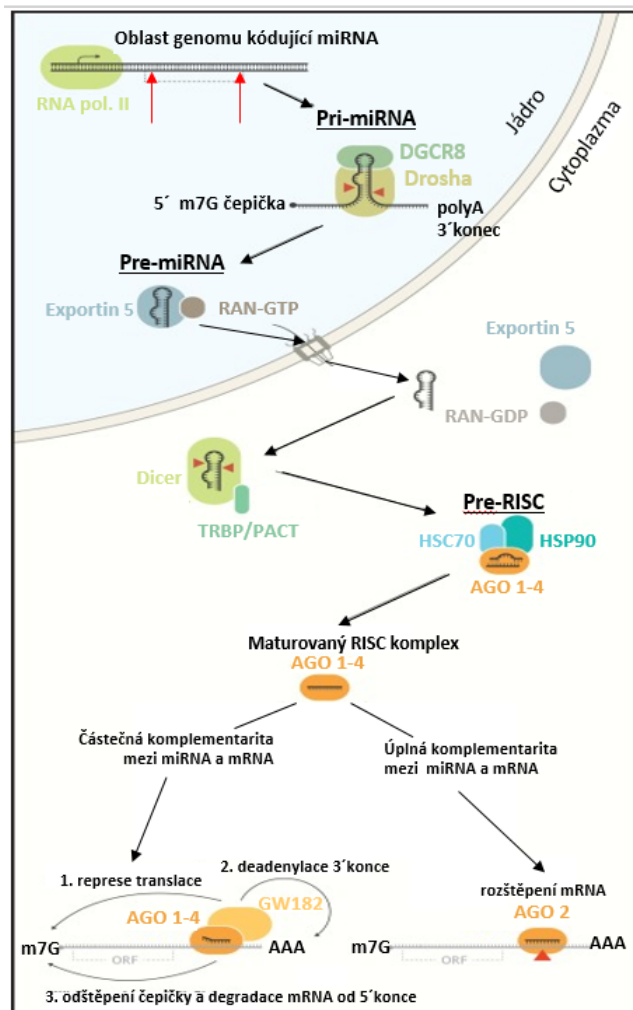
Po maturaci efektorového komplexu miRISC dochází k samotnému vyhledávání cílových mRNA a k posttranskripční regulaci jejich exprese. Guide vlákno miRNA, které je v miRISC komplexu, páruje s cílovou mRNA za pomoci Watson-Crickovského párování bází. Rozpoznání cílové mRNA je uskutečněno za pomoci úplné komplementarity cílové „seed“ sekvence miRNA s mRNA, zbytek miRNA nemusí být úplně komplementární. Jak již bylo zmíněno výše, „seed“ sekvence miRNA je tvořena 2. až 7. nukleotidem, počítáno od 5'konce k 3'konci miRNA. Většina miRNA se váží do nepřekládané oblasti na 3'konci cílové mRNA (3'UTR) (Brennecke *et al.* 2005).

K represí genové exprese může docházet dvěma mechanismy. Oba mechanismy začínají tím, že se guide vlákno miRNA interagující s miRISC naváže na komplementární část mRNA. Jaký mechanismus se uplatní, záleží na tom, zda je transkript zcela komplementární s miRNA, či nikoli. Při úplné komplementaritě dojde ke štěpení mRNA vlákna (shrnutí v Makarova *et al.* 2016). K tomu dochází prostřednictvím proteinu Ago2, jediného ze čtyř Ago proteinů, který má endonukleázovou aktivitu (Meister *et al.* 2004). Ago2 se skládá ze čtyř domén, z toho tři jsou RNA-vazebné: PIWI doména, střední doména (MID) a PIWI/Argonaut/Zwille (PAZ) doména, jediná RNA-nevazebná je N-terminální doména (Schirle & MacRae 2012). Vlákno cílové mRNA je naštěpeno uprostřed párované sekvence s miRNA a poté je celá mRNA degradována cytoplazmatickými exonukleázami (shrnutí v

Makarova *et al.* 2016). U savců se tento mechanismus uplatňuje jen výjimečně. Většina miRNA u savců totiž páruje se svými cílovými molekulami mRNA nedokonale, mluvíme o částečné nebo neúplné komplementaritě (shrnutí v Bartel 2009). V případě částečné komplementarity nedochází ke katalytickému štěpení cílové mRNA, nýbrž je zablokována translace tohoto transkriptu. Při tomto scénáři se v miRISC může nacházet kterýkoli ze čtyř savčích Ago proteinů a zároveň je ještě potřeba pomocný protein GW182, 182 kDa velký protein obsahující repetice glycinu a tryptofanu (Elkayam *et al.* 2017). Pomocí těchto repetit se GW182 naváže na PIWI doménu Ago a indukuje represi translace (shrnutí v Makarova *et al.* 2016).

Nakonec se celý komplex, tedy Ago, GW182, miRNA i s mRNA přesouvá do cytoplazmatických tělísek nazývaných P-tělíska (P-bodies, processing bodies). Tato tělíska obsahují různé enzymy, hlavně exonukleázy a slouží k hromadění a následné degradaci mRNA molekul (J. Liu *et al.* 2005). Uvnitř P-tělísek na sebe GW182 váže enzymy, které deadenylují 3'polyA konec, a které odstraňují čepičku na 5'konci. Poté dojde k degradaci zbytku mRNA ve směru od 5' ke 3' konci (shrnutí v Makarova *et al.* 2016).

Obr. 5: Dráha mikroRNA v savčí buňce začíná v jádře transkripční částí genu či intronu pomocí RNA polymerázy II nebo III za vzniku pri-miRNA, ta je dále štěpena komplexem obsahující DROSHU a DGCR8 a vzniká pre-miRNA, která je transportována do cytoplazmy za pomoci komplexu sestávajícího z Exportinu 5, Ran a GTP. V cytoplazmě se pre-miRNA oddělí od komplexu a je dále štěpena na 22 nt miRNA duplex enzymem Dicer, který interaguje s proteiny TRBP nebo PACT, miRNA duplex se poté nakládá na pre-RISC s Ago za pomoci Hsc70 a Hsp90. Passenger vlákno miRNA duplexu je uvolněno a následně degradováno. V komplexu RISC zůstává guide vlákno miRNA, které se naváže na cílovou mRNA. Při úplné komplementaritě je v RISC Ago2 a dojde k rozštěpení cílové mRNA a její následné degradaci. Při částečné komplementaritě je přítomný jeden ze 4 Ago a zapojí se i protein GW182, nastává represe translace, deadenylace 3'konce a odštěpení čepičky a následná degradace mRNA od 5'konce. Převzaté a upravené: Makarova, Shkurnikov, Wicklein, Lange, Samatov, Turchinovich, Tonevitsky, 2016



2.3. Funkce miRNA u savců

U savců může jedna molekula miRNA regulovat více sekvenčně podobných transkriptů. Až třetina savčích i lidských genů je inhibována miRNA molekulami, u člověka je známo přes 2000 molekul miRNA (shrnutí v Hammond 2015). Mezi hlavní biologické funkce miRNA u savců je regulace embryogeneze, proliferace, diferenciace buněk, metabolismu a apoptózy (shrnutí v Ha & Kim 2014). Ke studiu miRNA může být využit téměř jakýkoli živočišný model, protože miRNA spolu s jejich cílovými mRNA jsou velice sekvenčně konzervované napříč taxony, od ryb až po savce (Friedman *et al.* 2009). U savců se v některých případech podobné miRNA mohou vzájemně zastoupit v případě nefunkčnosti jedné z nich. Aby například došlo ke změně fenotypu, musíme zablokovat více molekul z jedné skupiny miRNA. Ovšem u savců není problém samotná menší či žádná exprese miRNA, ale její důsledek, což je nadměrná exprese určitých mRNA (shrnutí v Vidigal & Ventura 2015). Experimenty u myši ukázaly, že při ztrátě funkčních miRNA dochází k vývojovým vadám všech orgánů, kostry, svalů, kůže, dokonce i krvetvorby, dochází také k buněčným, fyziologickým defektům a změnám v chování (shrnutí v Bartel 2018). Například delece miR-128 způsobuje nadměrnou expresi několika mRNA MAP kinázové dráhy a to má za následek epilepsii (shrnutí v Vidigal & Ventura 2015). Delece jedné kopie miR-96 u myši i u člověka způsobuje hluchotu, delece jedné kopie klastru miR-17~92 zase způsobuje anomálie kostí a vývojové vady (shrnutí v Bartel 2018). Při onemocněních různých tkání je často zaznamenána nižší hladina tkáňově specifických miRNA. Toto prokazuje, že miRNA jsou důležité pro diferenciaci tkání a udržování tkáňově specifických funkcí jednotlivých buněk. Abnormální hladiny miRNA jsou také spojené s transformací buněk a rakovinou, například nadměrná exprese miR-21 a miR-17~92 klastru, naopak tkáňově specifické miRNA jsou při transformaci buněk sniženy (shrnutí v Hammond 2015).

3. Polyomaviry

3.1. Představení a zařazení polyomavirů

Polyomaviry patří do čeledě *Polyomaviridae*, což jsou malé, neobalené viry s cirkulárním dsDNA genomem dlouhým přibližně 5 000 bp (shrnutí v Moens *et al.* 2017). Podle genomu a strategie přepisu nukleové kyseliny na mRNA jsou polyomaviry řazeny do I. třídy Baltimorovy klasifikace virů (Baltimore 1971). Na základě aminokyselinových sekvencí jednoho z proteinů kódovaných genomem, konkrétně velkého tumorogenního antigenu (LT antigen) se dají fylogeneticky rozdělit do čtyř rodů: *Alfapolyomaviry*, *Betapolyomaviry*, *Gammapolyomaviry* a *Deltapolyomaviry* (shrnutí v Moens *et al.* 2017). Přestože polyomaviry mohou infikovat savce, ptáky i ryby, hostitelský rozsah jednotlivých polyomavirů je velice úzký (Buck *et al.* 2016). Já se v této práci budu blíže věnovat dvěma zástupcům *Alfapolyomavirů* – myšimú polyomaviru (murine polyomavirus, MPyV), lidskému polyomaviru Merkelových buněk (Merkel cell polyomavirus, MCPyV) a třem zástupcům *Betapolyomavirů* a to

opičímu vakuolačnímu viru 40 (SV40, Simian Virus 40) a dvěma lidským polyomavirům - BK viru (BKPyV) a JC viru (JCPyV).

3.2. Patologie polyomavirů

Polyomaviry patří mezi tzv. onkoviry schopné transformovat infikované buňky. Prvním objeveným polyomavirem byl myší polyomavirus, také byl první, u kterého byla prokázána schopnost transformovat buňky laboratorních myší, křečků a krys. Sarah Stewart poté potvrdila existenci myšího viru, který je při injikaci do opičí buněčné tkáně nebo do myších embryí, schopen způsobit transformaci buněk (Morgan 2014).

SV40 byl poprvé prohlášen za DNA tumorový virus, když se zjistilo, že je schopný transformovat buňky u mláďat křečků (Chang *et al.* 1984). Dále bylo potvrzeno, že SV40 je schopný transformovat různé tkáně u hlodavců i člověka. U myších buněčných linií není SV40 schopen dokončit životní cyklus, virus není schopný se replikovat ani tvořit pozdní proteiny, neboť jeho přirození hostitelé jsou primáti (shrnutí v Pipas 2009).

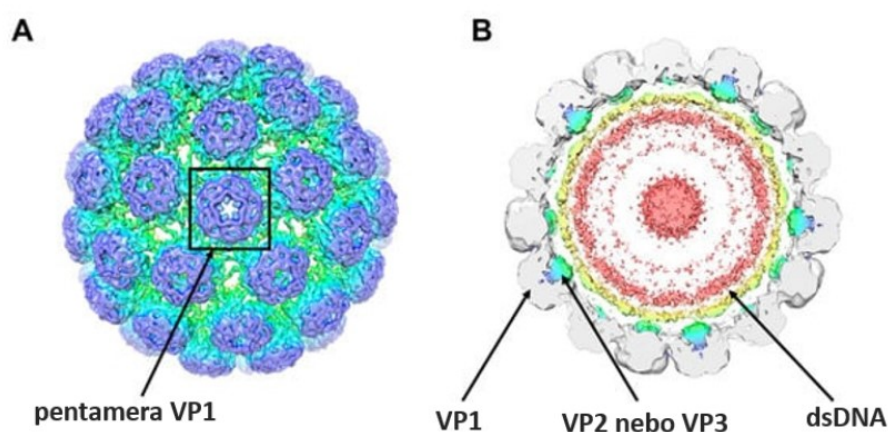
První dva vyizolované lidské polyomaviry (BKPyV a JCPyV) byly objeveny v roce 1971. Jejich názvy jsou odvozeny od iniciálů pacientů, ze kterých byly vyizolovány (Gardner *et al.* 1971, Padgett *et al.* 1971). U zdravých jedinců vykazujících séropozitivitu na lidské polyomaviry nezpůsobují polyomaviry onemocnění, pouze dlouhodobě přežívají v buňkách. Problém nastává u imunodeficientních jedinců. Konkrétně je problém při snížení množství T lymfocytů, nebo jejich nesprávné funkci. U těchto znevýhodněných jedinců, kteří jsou zároveň séropozitivní na polyomaviry, nebo například přijali séropozitivní tkáň při transplantaci, může docházet k onemocněním způsobeným polyomaviry, jako jsou například nefropatie spojená s polyomaviry (anglicky polyomavirus-associated nephropathy, PVAN) – souvisí s BKPyV, hemoragická cystitida, selhání ledvinového štěpu (souvisí s BKPyV a transplantovanou ledvinou od séropozitivního dárce) nebo progresivní multifokální leukoencefalopatie (PML) (shrnutí v Ahsan & Shah 2006). PML je onemocnění, kdy JCPyV infikuje oligodendrocyty, reaktivuje se životní cyklus a dochází k demyelinizaci mozkové tkáně (Takahashi *et al.* 2020).

Dalším lidským polyomavirem je polyomavirus Merkelových buněk (Merkel cell carcinoma polyomavirus), jak napovídá název, způsobuje karcinom Merkelových buněk. Tvoří se nejčastěji u bělochů starších 65 let, konkrétně na místech vystavených UV záření. Co se týká karcinomů, MCPyV je zodpovědný za přibližně 80% veškerých maligních nádorů kůže u lidí žijících na severní polokouli (shrnutí v Tello *et al.* 2018).

3.3. Viriony polyomavirů

Polyomaviry mají neobalený virion s ikosahedrální symetrií o průměru 40-45 nm. Architektura ikosahedrální kapsidy je neobvyklá, skládá se pouze z pentamer, kterých virion obsahuje 72. Pentamery jsou tvořeny pěti molekulami VP1 (viz. obr. 6), což je majoritní, povrchový, kapsidový protein polyomavirů (Rayment *et al.* 1982). Mimo protein VP1 kapsidu tvoří také méně zastoupené proteiny VP2 a VP3. Kapsidu tvoří celkem 360 molekul VP1 a 72 kopií minoritních proteinů VP2 nebo VP3. Počet pentamer tedy odpovídá počtu minoritních kapsidových proteinů, protože vždy pod jednou pentamerou se nachází buď protein VP2, nebo VP3 (Kawano *et al.* 2006). U SV40 se ještě nachází hypotetický protein VP4 (Daniels *et al.* 2007), nicméně jeho existence je v současnosti zpochybněna (Daniels & Hebert 2020, Henriksen & Rinaldo 2020).

Uvnitř virionu se nachází jedna kopie genomu polyomavirů. Interakce polyomavirové kapsidy s virovým genomem je zprostředkována N-koncovou doménou proteinu VP1. VP2 a VP3 také mohou interagovat s genomem polyomaviru, to platí například u BKPyV (Hurdiss *et al.* 2016).



Obr. 6: Struktura povrchu a průřezu virionu BKPyV, na obrázku A jsou patrné vyčnívající pentamery VP1, které tvoří povrch všech virionů polyomavirů. Na obrázku B je vidět umístění minoritních kapsidových proteinů, a to pod pentamerou VP1. Genom viru se nachází uvnitř virionu. Převzaté a upravené: Helle, Brochot, Handala, Martin, Castelain, Francois, Duverlie 2017

3.4. Genom polyomavirů a jeho organizace

Jak již bylo zmíněno výše, polyomaviry mají malý, 5 kbp dlouhý, cirkulární genom tvořený dvouřetězcovou DNA (shrnuto v Moens *et al.* 2017). Uvnitř virionu se nachází jedna kopie dsDNA sbalená za pomoci buněčných histonů H2A, H2B, H3, H4 a společně tvoří virový minichromosom. Histon H1 s virovým genomem neasociuje (Müller *et al.* 1978).

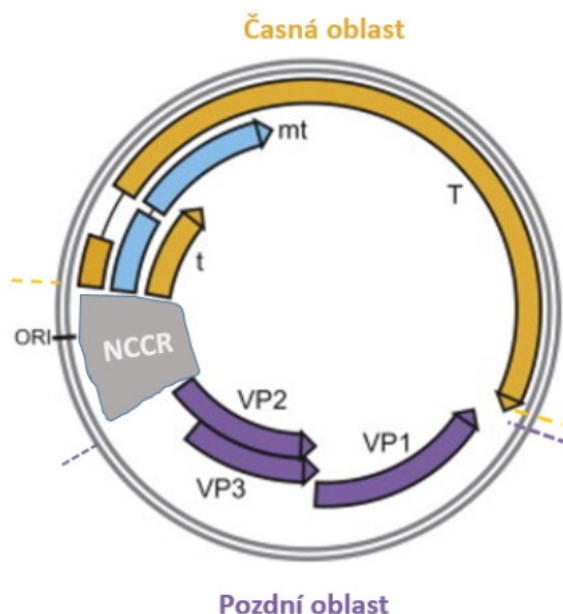
Genom polyomavirů je rozdělen na tři oblasti – nekódující regulační oblast (noncoding control region – NCCR) a dvě transkripční jednotky, které jsou od sebe odděleny za pomoci NCCR (shrnuto v Moens *et al.* 2017, Hudson *et al.* 1970). První transkripční jednotka se nazývá časná oblast genomu, obsahuje geny kódující časné proteiny. Ty jsou exprimovány na začátku infekce, hned po vstupu virionu

do jádra. Časné proteiny se nazývají tumorogenní antigeny (T antigeny), mají regulační funkci při replikaci genomu viru. Každý polyomavirus kóduje nejméně dva T antigeny, a to malý (small T antigen – ST) a velký T antigen (large t antigen – LT) (Crawford *et al.* 1978). Druhá transkripční jednotka se nazývá pozdní oblast, její geny kódují pozdní proteiny. Mezi pozdní proteiny patří strukturní, kapsidové proteiny VP1, VP2, VP3. U některých polyomavirů se nachází i nestrukturní agnoprotein. Jak napovídá jejich název, pozdní proteiny jsou exprimovány v pozdní fázi infekce, až po replikaci genomu viru (shrnutí v Fried & Griffin 1977).

NCCR je velice důležitá oblast, protože obsahuje počátek replikace DNA i promotory a enhancery pro transkripci časných i pozdních genů. NCCR se u různých polyomavirů liší sekvencí i strukturou, je to nejméně evolučně konzervované místo na genomu polyomavirů, jedná se tedy o velice heterogenní oblast napříč celou čeledí *Polyomaviridae*. Dokonce i u jednoho zástupce izolovaného z více jedinců se může NCCR lišit, protože dochází k jeho přestavbám, konkrétně k delekcím a/nebo duplikacím určitých oblastí, potom mluvíme o kmenu (strain). K nejvíce přestavbám dochází u lidských polyomavirů JCPyV a BKPyV (Sundsford *et al.* 1990, shrnutí v Moens *et al.* 1995).

Transkripce obou kódujících oblastí běží na opačné strany, jedna oblast je přepisována po směru hodinových ručiček, druhá proti (viz. obr. 7). Časné proteiny jsou kódovány na jednom vlákně a pozdní na druhém. Každá kódující oblast zabírá přibližně polovinu genomu polyomavirů (Sambrook *et al.* 1973). Časné geny tvoří jednu pre-mRNA, alternativním sestřihem se rozštěpí na jednotlivé transkripty časných proteinů. Pozdní geny jsou transkribovány z druhého, komplementárního vlákna a transkripce probíhá v opačném směru než u časných oblastí. Opět vzniká z celé pozdní oblasti pouze jedna molekula pre-mRNA, která je poté alternativním sestřihem nastříhána na jednotlivé mRNA kódující jednotlivé pozdní proteiny (Noble *et al.* 1986). Jak je vidět na obrázku 7, VP3 má stejnou sekvenci jako VP2, neboť oba dva proteiny jsou kódovány stejnými bázemi, jen VP2 je delší, má START kodón blíže k NCCR. VP2 a VP3 sdílí C-konec (Contreras *et al.* 1977).

Obr. 7: Genom myšního polyomaviru, na obrázku jsou odlišené všechny tři části genomu – NCCR, časná i pozdní oblast. ORI značí počátek replikace. T je oblast kódující velký T antigen, t je oblast kódující malý T antigen a mt je oblast kódující střední T antigen. Čtecí rámce pro VP2 a VP3 se překrývají, jak je patrné z obrázku, jen VP2 je delší a má tedy rozdílný N-konec. Převzaté a upravené: King, Adams, Carstens, Lefkowitz 2012



3.4.1. Proteiny polyomavirů a jejich funkce

Proteiny polyomavirů se dají rozdělit na dvě skupiny – regulační proteiny kódované v časné oblasti a strukturální proteiny tvořící kapsidu viru, které jsou kódovány v pozdní oblasti.

3.4.1.1. Časné proteiny (T antigeny)

Velký T antigen (LT) je multifunkční protein. Skládá se z několika vazebných a funkčních domén, které vážou různé buněčné proteiny, všechny tyto domény jsou klíčové při virové replikaci i při transformaci hostitelských buněk (shrnuté v Topalis *et al.* 2013). Domény JCPyV i SV40 jsou seřazeny směrem od N-konce k C-konci následovně: J-doména, která dokáže stimulovat ATPázovou aktivitu například chaperonu Hsc70 (VanLoock *et al.* 2002), dále pRb-vazebná doména, DNA-vazebná doména a ATPázová doména, která váže p53 (shrnuté v Khalili *et al.* 2008). DNA-vazebná doména a ATPázová doména společně tvoří helikázovou doménu. DNA-vazebná doména se dá ještě rozdělit na dvě části – na ori-vazebnou doménu a na DNA-nespecificky vazebnou doménu. LT se svojí ori-vazebnou doménou váže na specifické sekvence v NCCR, čímž umožní zahájení replikace virového genomu. Váže se v podobě hexameru, někdy se tomuto útvaru také říká prstenec LT. Pro tvorbu hexameru je potřeba ATP. Uprostřed tohoto prstence se nachází centrální kanál, kam jsou nasměrovány všechny ori-vazebné domény ze všech šesti molekul LT a právě sem se váže virová dsDNA (VanLoock *et al.* 2002). Hexamer po nasednutí na ori rozvine dsDNA, má tedy helikázovou aktivitu, která vyžaduje ATP. Dále váže buněčné proteiny důležité pro replikaci genomu, například α primázu, DNA topoizomerázu I., ssDNA-vazebný protein nazývaný replikační protein A (Fairman & Stillman 1988). Váže i buněčné proteiny důležité pro regulaci buněčného cyklu jako jsou pRb a p53 (Klawitz *et al.* 2001). Oba dva proteiny patří mezi tumor supresory. Protein pRb blokuje vstup do S-fáze v případě poškození DNA buňky. Při ztrátě či nepřítomnosti pRb dochází k indukci apoptózy za pomoci p53. Protein p53 je aktivován při stresu

buňky, jako je například poškození DNA UV zářením nebo nepřítomnost pRb. Může vyvolat apoptózu za pomoci aktivace dalších proapoptických buněčných proteinů či za pomoci represe protiapoptických buněčných proteinů (shrnuje v Hickman *et al.* 2002). LT SV40 i JCPyV váže p53, tím ho znefunkční a tak zabrání apoptóze (Kellogg *et al.* 2021). Další důležitou funkcí LT je aktivace pozdního promotoru viru a naopak umlčení časného promotoru viru (shrnuje v Pipas 1992).

Malý T antigen (ST) je dalším proteinem časně fáze, je lokalizován v jádře i v cytoplazmě (Ellman *et al.* 1984). U SV40, JCPyV, BKPyV i MPyV byla prokázána velká homologie aminokyselinových sekvencí ST, to dokazuje jeho společnou funkci u všech těchto zástupců. N-koncové domény ST i LT antigenu jsou stejné, obsahují stejnou doménu – J doménu, C-koncové se naopak liší, ST má na C-konci vazebnou doménu pro fosfolipázu 2A (PP2A), se kterou asociuje, tím inhibuje její fosfátovou aktivitu a tak ovlivňuje i MAP kinázovou dráhu (shrnuje v Khalili *et al.* 2008, Mungre *et al.* 1994). ST podobně jako LT aktivuje určité buněčné promotory, například promotor pro cyklin A a cyklin D, jelikož ST nemá DNA-vazebnou doménu, tak tyto dva promotory aktivuje nepřímo (Watanabe *et al.* 1996). Za pomoci obou cyklinů navozuje S-fázi buněčného cyklu v buňce. Dále také ovlivňuje mTOR signalizační dráhu a tak i translaci některých buněčných proteinů ve prospěch translace virových proteinů (Yu *et al.* 2005, shrnuje v Mamane *et al.* 2006).

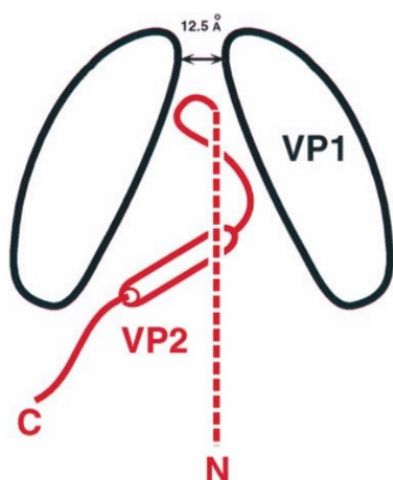
Střední T antigen (MT) se nachází pouze u některých polyomavirů, jako je například MPyV. V buňce se malá část MT nachází v cytoplazmatické membráně, většina se ale nachází v ER (Dilworth *et al.* 1986). Tento protein interaguje s buněčnými proteiny regulujícími buněčný růst, jako je protoonkogenní tyrosinkináza s-Src (Dunant *et al.* 1996), fosfatidylinositol-3-kináza (PI3K) (Auger *et al.* 1992) nebo protein fosfatáza 2A (PP2A) (Pallas *et al.* 1990). MT v buňce může zastoupit funkci tyrosinkinázových růstových faktorů, které se naváží na své membránové receptory, tyto receptory dimerizují a tak je spuštěna dráha. MT se tak dají brát jako stále aktivované tyrosinkinázové receptory růstových faktorů, které nepotřebují na svou aktivaci ligand, tedy růstový faktor. Právě tato schopnost dělá z MT hlavní onkoprotein MPyV (shrnuje v Ichaso & Dilworth 2001). Nejdůležitější úlohou MT v životním cyklu MPyV je udržování vysoké hladiny a aktivity MAP kináz v jádře, tyto kinázy fosforylují VP1 a tím napomáhají enkapsidaci genomu viru (Senften *et al.* 1997).

Velmi malý T antigen (tiny – Tt) se nachází u MPyV, stejně jako MT. Spolu s ostatními T antigeny sdílí J-doménu, které je schopná vázat chaperony, jako je Hsc70 a stimulovat jejich ATPázovou aktivitu. Tt má velice krátkou životnost, a proto není schopen se akumulovat v buňce, nejspíše se jedná o neesenciální protein (Riley *et al.* 1997).

3.4.1.2. Pozdní proteiny

Strukturní proteiny VP1, VP2 a VP3 tvoří kapsidu obklopující virový genom (shrnuje v Moens *et al.* 2017). Kromě funkce strukturní, se VP1 váže na buněčný receptor a tak zprostředkuje vstup do

hostitelské buňky. Při vstupu do buňky napomáhá i VP2, jeho N-konec je myristylován, může být odhalen na povrchu virionu (viz. obr. 8) a napomáhá průnikem přes membránu buňky (Chen *et al.* 1998).



Obr. 8: Uspořádání VP1 a VP2 pod ním, N-koncová doména VP2 může proniknout na povrch virionu díky malým mezerám mezi VP1. Převzaté: Chen, Stehle, Harrison 1998

VP2 a VP3 u JCPyV napomáhají LT při vazbě na ori. Při jejich snížené koncentraci došlo ke snížení vazebné aktivity LT na DNA (Saribas *et al.* 2014). Důležitost VP2 a VP3 spočívá v jejich hydrofobicitě, díky ní se mohou dostat přes membránu ER do cytosolu a poté za pomoci jejich signálů jaderné lokalizace (nucleus localization sequence, NLS) až do jádra, kde může začít transkripce časných genů, poté replikace a nakonec transkripce pozdních genů (Huérfino *et al.* 2017). NLS se nachází u VP1 na N-konci a u VP2 a VP3 na C-konci, jejich čtecí rámce se překrývají, proto bodová mutace v NLS u jednoho z kapsidových proteinů se projeví i u zbylých. Při mutaci v NLS dojde k poklesu schopnosti viru infikovat buňky. Za pomoci interakce NLS na jednom ze tří kapsidových proteinů a importinu $\beta 1$ se virion translokuje do jádra (Soldatova *et al.* 2018). U myšího polyomaviru ještě VP2 a VP3 přispívají k lyzi buňky v pozdní fázi buněčného cyklu (Huerfano *et al.* 2010).

Agnoprotein patří mezi přídatné, regulační proteiny, není součástí virionu. Nachází se například u SV40, BKPyV a JCPyV, tedy u polyomavirů primátů (shrnuto v Moens *et al.* 2017). V buňce je lokalizován v cytoplazmě, nejvíce se akumuluje u jádra. Jedná se o protein, který je fosforylován. Fosforylace má vliv na stabilitu agnoproteinu. U SV40 agnoprotein pomáhá proteinu VP1 dostat se do jádra, při jeho znefunkčnění se většina proteinu VP1 nachází v cytoplazmě a v perinukleárním prostoru (Carswell & Alwine 1986). Také hraje roli při formování virionu, při mutaci v agnoproteinu dochází ke snížení produkce virionů a produkuje se více VP1, agnoprotein tedy také reguluje transkripci VP1 (shrnuto v Gerits & Moens 2012). U JCPyV bylo prokázáno, že agnoprotein nemá téměř žádný vliv na expresi VP1, ovšem váže se na VP1a zvyšuje jeho multimerizaci, pomáhá tak formovat nové viriony. Při znefunkčnění agnoproteinu JCPyV měly viriony nepravidelný tvar (Suzuki *et al.* 2012). Také napomáhá LT při vazbě na ori, pomáhá tedy při replikaci virového genomu (Saribas *et al.* 2012). Agnoprotein JCPyV se chová jako viroporin, pomáhá při úniku virionů z jádra do cytoplazmy na konci životního cyklu (Suzuki *et al.* 2010). Agnoprotein BKPyV interaguje s proliferčním buňkovým jaderným antigenem (proliferating cell nuclear antigen, PCNA). Navázáním PCNA na agnoprotein

dojde k velkému snížení proliferace buněk. PCNA interaguje s DNA polymerázou δ , po navázání agnoproteinu na tento komplex dojde k inhibici polymerázy, a tudíž i replikace DNA (Gerits *et al.* 2015). U BKPyV má agnoprotein, podobně jako u JCPyV, význam při úniku z jádra na konci životního cyklu (Panou *et al.* 2018).

3.5. Životní cyklus polyomavirů

Životní cykly různých druhů polyomavirů se ve své podstatě velmi podobají, liší se jen v detailech znázorněných v tabulce č. 1 a 2. Pro jednoduchost popíši pouze životní cyklus BKPyV. Ten začíná vstupem virionu do buňky skrze vazbu VP1 pentamer na povrchu virionu na buněčné receptory, a to gangliosid GD1b a GT1b. Gangliosidy se nachází v buněčné membráně v místě lipidických raftů. Vyskytují se na povrchu mnoha druhů buněk, což zaručuje širokou tkáňovou specifitu (Low *et al.* 2006).

Po navázání na buněčný receptor dochází k endocytóze. Každý polyomavirus využívá trochu jinou cestu, jak se dostat přes membránu do buňky. BKPyV, ale i SV40, MCPyV a MPyV využívají dva způsoby, a to endocytózu závislou na kaveolinu, nebo endocytózu nezávislou na kaveolinu, ani na klatrinu, také nazývanou endocytóza za pomoci lipidických raftů (Anderson *et al.* 1996, Gilbert & Benjamin 2000, Zila *et al.* 2014, Zhao *et al.* 2016, Becker *et al.* 2019, shrnuto v Mayberry & Maginnis 2020). Jediný JCPyV využívá klatrinové váčky jako způsob endocytózy (Pho *et al.* 2000). Všechny polyomaviry potřebují na přesun váčku směrem k ER mikrotubuly a jejich molekulární motory – kinesin a dynein (shrnuto v Mayberry & Maginnis 2020). BKPyV využívá i mikrofilamenta, dokonce je schopný infikovat buňku při narušení mikrotubulů, ale není schopný buňku infikovat při narušení aktinu (Eash & Atwood 2005). BKPyV je dále transportován do ER z váčku přes časný a pozdní endozom nebo lysozom (shrnuto v Mayberry & Maginnis 2020).

V ER dojde k částečnému rozebrání virionu za pomoci působení enzymů oxidoreduktázy ERp57, která katalyzuje izomerizaci disulfidických můstků mezi pentamerami VP1. VP1 k sobě váží slaběji, pouze za pomoci vápenatých kationtů. Následkem toho dojde k odhalení VP2 a VP3, které se nacházely pod pentamerami. Hydrofobní části VP2 a VP3 jsou dále rozebrány DNAJ-BiP komplexem a zanořeny do membrány ER. Všechny polyomaviry opouštějí ER za pomoci ERAD (ER associated degradation) dráhy a jejích proteinů (Magnuson *et al.* 2005, Kuksin & Norkin 2012).

Další krok rozložení virionu se děje v cytosolu, v prostředí s nízkou koncentrací vápníku. Dojde k rozrušení i vápníkových vazeb mezi VP1, přičemž VP2 i VP3 jsou i po vstupu do cytosolu stále navázány na virion. Všechny strukturální proteiny VP1, VP2 i VP3 obsahují jaderný lokalizační signál (NLS), díky kterému jsou pravděpodobně přeneseny přes póry do jádra (Kuksin & Norkin 2012), a to za pomoci jaderných importinů (Li *et al.* 2003, Soldatova *et al.* 2018, Bennett *et al.* 2015).

Ihned po vstupu virionu do jádra začíná transkripce časných proteinů za pomoci RNA polymerázy II. a dalších buněčných enzymů. Transkripce začíná z časného promotoru, který se nachází

v NCCR. Vytvoří se jedna pre-miRNA, která je poté sestřižena na jednotlivé mRNA. Jak již bylo zmíněno, mRNA je polyadenylována na 3'konci a na 5'konci má methylguanositovou čepičku (Gendra *et al.* 2007). Transkripty putují do cytosolu, kde jsou na ribozomech translatovány, po translaci se vrací do jádra díky NLS (shrnuto v Silver 1991). Když jsou hotové regulační T antigeny, může být zahájena replikace virového genomu. Virus musí v buňce navodit G1/S fázi, protože právě v této fázi buněčného cyklu se replikuje buněčná DNA, tudíž v této fázi jsou dostupné buněčné enzymy důležité pro replikaci.

Jak již bylo zmíněno výše, replikace virového genomu se kromě buněčných proteinů účastní i časné virové proteiny, zejména LT, u některých polyomavirů i ST (Kwun *et al.* 2009). Po replikaci je transkribována pozdní oblast genomu. Transkripty opět putují na ribozomy do cytosolu a pak se vrací do jádra, kde jsou složeny nové viriony (Brady *et al.* 1984). Důležité je také zmínit, že polyadenylační signály primárních transkriptů časné i pozdní oblasti se překrývají, toto je velice důležité pro regulaci životního cyklu. Viry, které přijdou o tento překrývající se polyadenylační signál nejsou schopné vstoupit do pozdní fáze infekce (Gu *et al.* 2009).

Poslední fází životního cyklu polyomavirů je složení nových virionů v jádře a jejich únik z jádra a následně i z infikované buňky. U BKPyV pomáhá s únikem z jádra agnoprotein (Panou *et al.* 2018). Únik z buňky končí nejčastěji její lyzí, ovšem u SV40 a BKPyV byly zaznamenány případy, kdy se viriony dostaly z buňky bez její lyze (Clayson *et al.* 1989, Evans *et al.* 2015). Obecně lze říci, že životní cykly jednotlivých polyomavirů zatím nejsou zcela probádány, zejména potom právě způsob úniku z hostitelské buňky. Na obrázku 9 je shrnut životní cyklus BKPyV. V tabulce č. 1 a 2 jsou sepsány rozdíly i podobnosti mezi životními cykly jednotlivých polyomavirů.

Tabulka č. 1: Porovnání rozdílů i podobností mezi životními cykly *Alfapolyomavirů* MPyV a MCPyV

<u>Události v živ. cyklu</u>	<i>Alfapolyomaviry</i>	
	MPyV	MCPyV
Vstup do buňky (receptory)	GD1a, GT1b [1]	chondroitin a heparansulfát [4]
Koreceptory	α 4-integrin [6]	GT1b [4]
Endocytóza	závislá na kaveolinu [8] přes lipidické rafty [11]	závislá na kaveolinu [8][15] přes lipidické rafty [8][15]
Přesun váčku	mikrotubuly [14]	mikrotubuly i aktín [15]
Cesta do ER přes (endozomy)	časný a pozdní endozom/ lysozom [8]	časný a pozdní e./lysozom [8]
Translokace z ER	Derlin2 [20]	zatím neobjeveno [15]
Únik z buňky	lyze buňky [22]	deskvamace a lyze [24]
Únik bez lyze	ne	ne

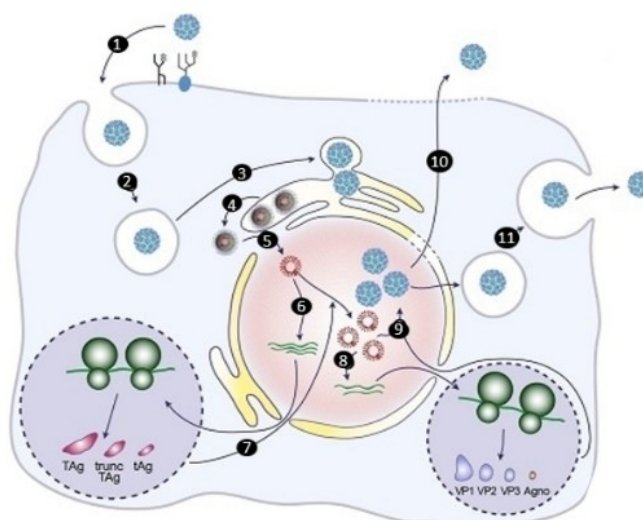
Tabulka č. 2: Porovnání rozdílů i podobností mezi životními cykly *Betapolyomavirů* SV40, BKPyV a JCPyV

	<i>Betapolyomaviry</i>		
<u>Události v živ. cyklu</u>	SV40	BKPyV	JCPyV
Vstup do buňky (receptory)	gangliosid GM1 [1]	GD1b a GT1b [2]	glykolipidy, glykoproteiny [3]
Koreceptory	MHC I. receptory [1]	x	5-HT2A [5]
Endocytóza	závislá na kaveolinu [7] přes lipidické rafty [8]	závislá na kaveolinu [8] přes lipidické rafty [9]	závislá na klathrinu [10]
Přesun váčku	aktin i mikrotubuly [8]	aktin (i mikrotubuly) [12]	aktin i mikrotubuly [13]
Cesta do ER přes (endozomy)	časný a pozdní e./lysozom [8]	časný a pozdní e./lysozom [8]	časný endozom a váček s kaveolinem1 [16]
Translokace z ER	Derlin1 a Sel1 [17]	Derlin1 a Sel1 [18]	Sel1 [19]
Únik z buňky	vakuolizace a následná lyze [21]	lyze buňky [22]	intracel. vesikul. transport [23]
Únik bez lyze	ano [25]	ano [26]	ano [23]

[1] Tsai *et al.* 2003, [2] Low *et al.* 2006, [3] Neu *et al.* 2010, [4] Schowalter *et al.* 2011, [5] Elphick *et al.* 2004, [6] Hara & Garcea 2016, [7] Anderson *et al.* 1996, [8] shrnuto v Mayberry & Maginnis 2020, [9] Zhao *et al.* 2016, [10] Pho *et al.* 2000, [11] Gilbert & Benjamin 2000, [12] Eash & Atwood 2005, [13] Ashok & Atwood 2003, [14] Zila *et al.* 2014, [15] Becker *et al.* 2019, [16] Querbes *et al.* 2006, [17] Schelhaas *et al.* 2007, [18] Jiang *et al.* 2009, [19] Nelson *et al.* 2012, [20] Lilley *et al.* 2006, [21] Motamedi *et al.* 2020, [22] Henriksen *et al.* 2016, [23] shrnuto v Moens *et al.* 2017, [24] shrnuto v Stakaityté *et al.* 2014, [25] Clayson *et al.* 1989, [26] Evans *et al.* 2015

Obr. 9: Životní cyklus BKPyV začíná navázáním

VP1 virionu na gangliosidy (1), přes kaveolin zprostředkovanou endocytózu se dostává do buňky (2), poté se z pozdního endozomu dostává do ER (3), v ER dochází k přestavbě za pomoci enzymů a chaperonů a ERAD dráhou virion uniká z ER (4), následuje transport do jádra (5), exprese časných genů (6), časné proteiny jsou po translaci dopraveny z cytoplazmy zpět do jádra (7), dále nastává exprese pozdních genů (8), kapsidové proteiny (VP1-VP3) jsou transportovány do jádra, kde interagují s nově nasyntetizovaným virovým genomem a sestaví se viriony (9), nové viriony jsou uvolněny ven za pomoci lyze buňky (10), některé viriony se z buňky dostanou nelytickou cestou, za pomoci exocytického vezikulárního transportu buňky (11). Převzaté a upravené: Helle, Brochot, Handala, Martin, Castelain, Francois, Duverlie 2017



4. MiRNA kódované polyomaviry

4.1. Úvod k polyomavirovým miRNA

Pozdní oblast genomu virů SV40, BKPyV, JCPyV, MPyV i MCPyV kóduje mimo pozdních proteinů také dvě molekuly miRNA, které jsou dle většiny dat exprimovány spolu s pozdními proteiny v pozdní fázi infekce. Obě miRNA kódované virovým genomem pochází ze stejné pre-miRNA. Jejich název se liší pouze koncovkou 5p nebo 3p, podle toho, z jakého konce pre-miRNA jsou vyštěpeny (Sullivan *et al.* 2005, Sullivan *et al.* 2009, Seo *et al.* 2008, Seo *et al.* 2009). Virová miRNA je dokonale komplementární k mRNA časných proteinů. Pro většinu miRNA je typické, že nasedají do 3'UTR cílové mRNA, ovšem polyomavirem kódované miRNA nasedají přímo na ORF T antigenů (Sullivan *et al.* 2005, Sullivan *et al.* 2009, Seo *et al.* 2008, Seo *et al.* 2009).

Biogeneze virových miRNA probíhá shodně s biogenezí miRNA buněčných a účastní se jí stejné enzymy. Na rozdíl od většiny buněčných miRNA, u kterých funguje jako „guide“ vlákno pouze jedno vlákno z miRNA duplexu, u polyomavirů jsou nakládány do miRISC komplexu obě vlákna virového miRNA duplexu. Obě vlákna poté slouží jako maturované miRNA, schopné navodit represi genové exprese. Skrze svou cílovou sekvenci se tedy obě miRNA mohou navázat na zcela komplementární místo na ORF T antigenů, nebo na úplně či neúplně komplementární místo na 3'UTR buněčných mRNA, a tak regulovat expresi virových i buněčných genů (shrnuto v Lagatie *et al.* 2013).

4.1.1. miRNA kódovány genomem SV40 a jejich funkce

SV40 patří stejně jako BKPyV a JCPyV mezi *Betapolyomaviry*, pro něž platí, že svoje miRNA kódují na 3'konci antisense vlákně k LT, v pozdní oblasti genomu, jak je vidět na obrázku 10. Váží se na mRNA časných proteinů. MikroRNA kódované genomem SV40 nesou název sv40-miR-S1-5p a sv40-miR-S1-3p, dle toho, zda pochází z 5'konce pre-miRNA vlásenky, nebo z jejího 3'konce (Sullivan *et al.* 2005). Sekvenční podobnost mezi miRNA SV40 a JCPyV, stejně jako mezi miRNA SV40 a BKPyV se pohybuje v rozmezí 50-75% (Seo *et al.* 2008).

V roce 2005 Sullivan a jeho spolupracovníci vyvinuli počítačový program na vyhledávání potenciálních pre-miRNA v genomu SV40. Poté se jim podařilo za pomoci *in silico* analýzy a northern blot analýzy potvrdit existenci pre-miRNA kódované na pozdním řetězci genomu SV40. Zjistili také, že se pre-miRNA exprimuje v pozdní fázi infekce, spolu s pozdními proteiny. Za pomoci specifických sond zjistili, že z jedné pre-miRNA vznikají dvě molekuly miRNA, které jsou dlouhé 22 nt a obě jejich vlákna mohou být inkorporována do komplexu miRISC, tudíž tvořit funkční miRNA a reprimovat genovou expresi cílových mRNA. K výzkumu funkce miRNA kódovaných SV40 byly použity mutanty SV40 (značené SM) s mutovanými nukleotidy v oblasti, kde je kódována pre-miRNA a zároveň se zachovanou sekvencí a funkčností T antigenů. Tyto mutanty, na rozdíl od divoké typu vykazovaly mnohem vyšší expresi LT i ST a nedocházelo k tvorbě produktů spojených se štěpením T antigenů. Znefunkčnění miRNA nemělo vliv na výtěžek viru, ani na množství pozdních proteinů. Potvrdilo se

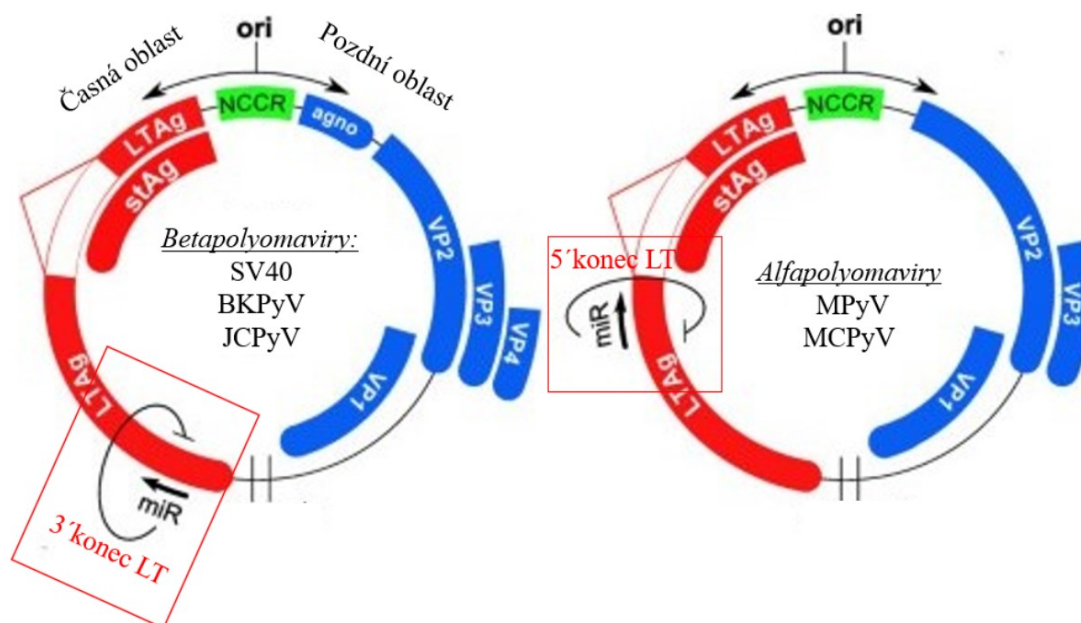
tak, že miRNA slouží jako negativní regulátory exprese LT i ST. Další experiment soustředili na skutečnost, že cytotoxické T lymfocyty (CTL) cílí imunitní odpověď na T antigeny (Mylin *et al.* 2000). K zjištění, zda produkce miRNA nějakým způsobem souvisí s náchylností k lyzi buňky způsobené CTL, použili stejné mutanty – SM a divoký typ viru. Zjistili, že při časných fázích infekce nemá nepřítomnost miRNA žádný vliv na SV40, ovšem v pozdní fázi infekce u SM mutanty, na rozdíl od divokého typu, dochází k velké expresi LT a také mnohem větší expresi interferonu γ CTL, tudíž i vyšší náchylnosti k lyzi spuštěné CTL. Tímto dokázali, že SV40 kódované miRNA mají také důležitou funkci v dlouhodobém přežívání v infikované buňce a unikání imunitní odpovědi za pomoci zabránění akumulace LT a vyhnutí se tak lyzi buňky spuštěné CTL (Sullivan *et al.* 2005).

You a jeho spolupracovníci v roce 2012 zjistili, že sv40-miR-S1-5p je funkční ortolog k lidské, buněčné miRNA hsa-miR423-5p. Nejprve porovnali sekvence SV40 kódovaných miRNA se sekvencemi lidských miRNA v databázi miRBase. Přišli na to, že virová sv40-miR-S1-5p i lidská hsa-miR423-5p miRNA mají totožné „seed“ sekvence. Pomocí experimentu založeného na duálním fluorescenčním reportérovém systému se jim podařilo ověřit, že obě miRNA inhibují expresi cílových indikátorových vektorů. Když následně hledali potenciaální cíle lidské hsa-miR423-5p, našli 3'UTR genů DMWD a C20orf27. Pomocí dalších experimentů se jim podařilo ověřit hypotézu, že virová sv40-miR-S1-5p je schopna regulovat expresi proteinů kódovaných geny DMWD a C20orf27, a tak fungovat jako ortolog buněčné hsa-miR423-5p (You *et al.* 2012).

SV40-miR-S1-3p snižuje expresi LT a ST. LT i ST jsou cílem imunitního systému. Oba dva T antigeny indukují expresi TNF α a IL-17F. Protože IL-17F vyvolává produkci prozánětlivých cytokinů a chemokinů, rekrutuje i další buňky imunity jako například neutrofilní granulocyty a makrofágy. Nadměrná exprese TNF α a IL-17F je tedy nežádoucí pro dlouhodobé přežívání SV40 v buňce. Neutrofily po indukci způsobují destrukci tkáně napadené virem. Právě tento jev začínající nadměrnou expresí LT, ST a pokračující indukci IL-17F má za následek nefropatii spojovanou s polyomaviry (PVAN). Na ochranu před obrannými mechanismy imunitního systému hostitele, využívá SV40 právě své virové miRNA, díky kterým dojde ke snížení exprese LT a ST, což vede ke snížení TNF α i IL-17F (Tokorodani *et al.* 2020).

5.1.2. miRNA kódovány genomem MPyV a jejich funkce

MPyV kóduje svoje miRNA také na antisense vlákně k pozdním proteinům, ale u *Alfapolyomavirů* se nachází u 5' konce LT jak je vidět na obrázku 10 (shrnutí v Lagatie *et al.* 2013).



Obr. 10: Porovnání genomů *Alfapolyomavirů* (MPyV, MCPyV) a *Betapolyomavirů* (SV40, BKPyV, JCPyV). U polyomavirů primátů (*Betapolyomavirů*) jsou miRNA kódovány u 3' konce LT, kdežto u MPyV a MCPyV (*Alfapolyomavirů*) jsou kódovány u 5' konce LT. Převzaté a upravené: Lagatie, Tritsmans, Stuyver 2013

Stejně jako u *Betapolyomavirů* i MPyV kóduje ve svém genomu dvě miRNA z jedné pre-miRNA, nazývají se MPV-mir-M1-5p a MPV-mir-M1-3p, dle toho z jakého konce vlásenky pre-miRNA pochází (shrnutí v Lagatie *et al.* 2013). MiRNA MPyV nasedají v oblasti 5' konce mRNA LT, váží se přímo na ORF nikoli na UTR na 3' konci, jak je pro miRNA typické.

První zmínka o nevysvětlitelném časném transkriptu, který se ale exprimuje až v pozdní fázi infekce a nemá na 5' konci čepičku se objevila již v roce 1982, s touto informací přišli Fenton a Basilico při provedení northern blot analýzy u myšího polyomaviru (Fenton & Basilico 1982).

V roce 2009 Sullivan a jeho spolupracovníci zjišťovali, zda i myší polyomavirus, podobně jako SV40, kóduje ve svém genomu miRNA. Za pomoci srovnání sekvencí genomu SV40 a MPyV hledali oblast, která by byla sekvencně podobná oblasti, ve které SV40 kóduje pre-miRNA. Žádnou sekvencně podobnou oblast nenalezli, proto hledali za pomoci Vmiru, pre-miRNA predikujícího algoritmu. Nalezli dvě potenciální místa, kde je na genomu MPyV kódována pre-miRNA. Pomocí northern blot analýzy zachytili přibližně 65 nt dlouhou pre-miRNA, kódovanou na 5' konci mRNA pro LT. Při zkoumání kinetiky exprese pre-miRNA a miRNA zachytili proužky odpovídající jak 22 nt dlouhé miRNA, tak i delší, 65nt dlouhé pre-miRNA přibližně 28 hodin po infekci, čímž dokázali existenci dvou miRNA kódovaných genomem myšího polyomaviru. Za pomoci northern blot analýzy a použití

specifických práb zjistili, že miRNA z obou stran pre-miRNA, tedy 3p i 5p, se účastní specifického štěpení časných transkriptů. Aby zjistili, zda tyto dvě miRNA skutečně snižují expresi časných proteinů, provedli biochemické analýzy s pomocí specifických miRNA inhibitorů. Při transfekci inhibitoru 5p miRNA došlo ke zvýšení hladin všech tří T antigenů. Při transfekci inhibitoru 3p miRNA byly hladiny T antigenů mnohem nižší než u 5p, dokonce byly srovnatelné s negativní kontrolou. Hlavní negativní regulátor T antigenů je tedy miRNA, který pochází z 5' konce vlásenky pre-miRNA MPyV. Dále Sullivan a jeho spolupracovníci provedli experiment s mutantou dl1013, tato mutanta má 21 nt dlouhou delecí, která znemožňuje viru exprimovat funkční miRNA, ovšem funkce T antigenů zůstává zachována. Zjistili, že v pozdních fázích infekce je u mutanty ve srovnání s divokým typem viru značný nárůst hladin LT i MT a v menší míře i ST. Divoký typ i mutanta vykazovaly stejné výtěžky viru. Tímto dokázali, že miRNA kódované genomem myšního polyomaviru slouží, stejně jako u SV40, jako negativní regulátory T antigenů. Na konec provedli i experimenty *in vivo* na myších infikovaných buď mutantním, nebo divokým typem viru. Ledviny a slezina byly poté myším odebrány po 3, 7 nebo 34 dnech po infekci. Zkoumali, zda se bude lišit imunitní odpověď CD8 T buněk na LT. Ve třech, časově rozdílných odběrech (3, 7 nebo 34 dní) byly výsledky u mutanty i divokého typu srovnatelné, CD8 T buňky na obě varianty viru reagovaly stejně. Také nepozorovali žádné rozdíly v expresi interferonu γ , ani cytokinů. Počet kopií u obou variant viru byl srovnatelný. Tato data svědčí o tom, že miRNA kódované genomem MPyV zřejmě nejsou esenciální pro infekci buněk (Sullivan *et al.* 2009).

V roce 2014 Sung a jeho spolupracovníci navázali na snahu předchozích týmů nalézt potenciální buněčné cíle miRNA kódovaných myším polyomavirem (Krüger & Rehmsmeier 2006, Lewis *et al.* 2005). V roce 2005 Lewis, Burge a Bartel použili predikční program TargetScanMouse Custom verzi 5.1 a zjistili, že virové miRNA by mohly cílit na mRNA Tgf β RI (Lewis *et al.* 2005). O rok později Krüger a Rehmsmeier použili program RNAhybrid, ten jim ukázal, že sekvenčně komplementární místo k myším miRNA se nachází na 3'UTR mRNA pro Smad2 (Krüger & Rehmsmeier 2006). Sung a jeho spolupracovníci provedli experiment, aby zjistili, zda nepřítomnost miRNA ovlivní expresi Tgf β RI a Smad2. Infikovali ledviny myších mláďat divokým kmenem viru a výše zmíněnou mutantou s delecí dl1013, která není schopná produkovat virové miRNA. Čtyřicet hodin po infekci připravili lyzáty z ledvin infikovaných mláďat myši a provedli western blot analýzu. Hladina proteinu Tgf β RI byla u mutanty i u divokého typu stejná, virová miRNA tedy neovlivňuje expresi tohoto proteinu. Ovšem hladina Smad2 byla podstatně nižší po infekci divokým typem viru. U mutanty byla hladina Smad2 srovnatelná s neinfikovanou, negativní kontrolou. Tyto výsledky napovídají, že miRNA kódované MPyV cílí na Smad2 a snižují jeho hladiny. Smad2 je protein zapojující se do apoptické dráhy buňky. Pro potvrzení provedli ještě experiment, při kterém infikovali myši epiteliální buňky v ledvinách buď mutantou, nebo divokým typem, poté v buňkách byla indukována apoptóza za pomoci etoposidu a pomocí fluorogenních peptidů sledovali aktivitu kaspázy 3. Ta byla značně nižší u divokého typu viru, kdežto u neinfikované kontroly a mutanty dl1013 byla aktivita kaspázy 3 vysoká.

I další experimenty s použitím metody western blot, či pomocí duálního reportérového systému na myších epiteliálních buněk ledvin potvrdily, že myším polyomavirem kódované miRNA se váží na 3'UTR Smad2 a reprimují tak jeho expresi (Sung *et al.* 2014).

Cílem navazujících studií (Burke *et al.* 2018) bylo určit funkci miRNA kódovaných genomem v pozdějších časových úsecích po infekci. Byly použity stejné mutanty MPyV s delecí v genomu dl1013. Mutanty byly poté porovnávány s divokým typem MPyV. Experimenty opět provedli na ledvinách a slezině infikovaných myší. Poté porovnali výtěžky virové DNA z infikovaných buněk v průběhu 1-4 týdnů po infekci u obou variant viru. Výtěžky DNA (počty kopií virového genomu) obou variant izolovaných ze stejných orgánů byly srovnatelné, velice podobné výtěžky byly i v následujících týdnech (4-10 týdnů od infekce). V 16. týdnu po infekci bylo získáno 10x více kopií virového genomu z mutanty než z divokého typu. Během 28. týdne od infekce byly naměřeny malé, srovnatelné výtěžky virové DNA u obou variant MPyV. Výsledky z tohoto experimentu potvrzují, že virem kódované miRNA nejsou esenciální pro vstup MPyV do buňky a pro replikaci v průběhu časné fáze životního cyklu. Další experiment odhalil, že množství DNA MPyV detekované v moči při časných fázích infekce záleží na imunitní odpovědi adaptivní imunity, protože u zdravých myší byl detekován virus v moči jen u 60 % jedinců, kdežto u imunodeficientních myší byla detekována DNA MPyV u všech jedinců (Burke *et al.* 2018)

5.1.3. miRNA kódovány genomem BKPyV a jejich funkce

BKPyV rovněž kóduje dvě molekuly miRNA z jedné pre-miRNA, a to na 3'konci antisense vlákna k LT (shrnutí v Lagatie *et al.* 2013). Nazývají se BKPyV-miR-B1-5p a BKPyV-miR-B1-3p, je důležité zdůraznit, že oblast z 3'konce vlásenky pre-miRNA u JCPyV i BKPyV jsou totožné, ale 5p miRNA obou lidských polyomavirů se liší (Bauman *et al.* 2011).

V roce 2008 Seo a jeho spolupracovníci navázali na Sullivana a jeho objev oblasti kódující pre-miRNA na genomu SV40. Za pomoci softwaru vMir, který je schopný predikovat, kde se na genomu BKPyV i JCPyV nachází pre-miRNA, se jim povedlo nalézt čtyři potenciální homologní sekvence k pre-miRNA SV40, kde by mohla být kódována virová pre-miRNA. Pomocí northern blot analýzy se jim podařilo identifikovat skutečné místo, kde virus BKPyV kóduje pre-miRNA a za pomoci 5'RACE analýzy zjistili, že obě dvě miRNA (3p i 5p) BKPyV jsou úplně komplementární k časným mRNA. Potvrdili, že i miRNA kódované genomem BKPyV regulují množství časných proteinů (Seo *et al.* 2008).

Bauman a jeho spolupracovníci se v roce 2011 zabývali mi-RNA u BKPyV i JCPyV. Na základě dat získaných u herpesvirů (Stern-Ginossar *et al.* 2007), které snižují expresi MICB, stresem indukovaného ligandu pro NKG2D receptor NK buněk a tím unikají imunitní odpovědi, stanovili hypotézu, že by tomu tak mohlo být i v případě polyomavirů BK a JC. Transdukovali buňky BJAB endogenně exprimující NKG2D, GFP reportérovými vektory pro expresi BKPyV a JCPyV miRNA, a

to JCPyV-miR-J1-3p (tedy 3p miRNA JCPyV, která je totožná s BKPyV-miR-B1-3p), BKPyV-miR-B1-5p a JCPyV-miR-J1-5p. Poté byly pozorovány hladiny stresem indukovaného ligandu ULBP3 receptoru NKG2D. U vektoru exprimující 3p miRNA JCPyV byl patrný pokles hladiny ULBP3. U dvou zbývajících vektorů (s 5p miRNA JCPyV a BKPyV) se ULBP3 exprimoval normálně a nedocházelo k represí jeho translace. V dalších experimentech chtěli ověřit, zda se ostatní stresem indukované ligandy, na které se váže NKG2D, také exprimují méně či nikoli, použili tedy výše zmíněné vektory a jinou buněčnou linii – RKO, která endogenně exprimuje ULBP2, ULBP3 a MICB. U vektoru exprimující 3p miRNA opět došlo k poklesu hladiny ligandu ULBP3, ostatní dva ligandy měly stejné hladiny u všech vektorů. Za pomoci následných analýz zjistili, že mRNA ULBP3 nedegraduje, ale dochází k represí translace, že o 15% větší inhibice translace ULBP3 ve srovnání s kontrolou stačí na dostatečné snížení cytotoxicity NK buněk a že cytotoxický efekt NK buněk je mnohem nižší u buněk transdukovaných 3p miRNA, protože se nemohly svým NKG2D ligandem navázat na ULBP3 a tak buňku usmrtit. Potenciální místo vazby JCPyV-miR-J1-3p na mRNA pro ULBP3 bylo stanoveno pomocí programu RNAhybrid a následně ověřeno pomocí duální luciferázové eseje. Potvrdili, že 3p miRNA BKPyV i JCPyV se přímo váží do 3'UTR mRNA ULBP3 a tak snižují hladinu tohoto ligandu v buňce. Tím je viru umožněno vyhnout se imunitní odpovědi ze strany NK buněk a dlouhodobě přežít v hostitelské buňce (Bauman *et al.* 2011).

Další experiment týkající se regulace replikace za pomoci miRNA BKPyV provedli v roce 2013 Broekema a Imperiale (Broekema & Imperiale 2013). Využili mutantu BKPyV se třemi bodovými mutacemi v místě, kde je kódována pre-miRNA, tato mutanta nebyla schopná produkovat funkční miRNA, ale sekvence kódující časné proteiny byla zachována. Divokým nebo mutantním typem byly infikovány buňky 293TT. Pomocí luciferázového reportéru exprimujícího cílovou sekvenci pro miRNA zjistili, že u divokého typu je nižší luciferázová aktivita než u mutanty viru bez miRNA. Dále zkoumali vliv miRNA na replikaci archetypálního viru v přirozených, hostitelských buňkách, tedy v renálních tubulárních epiteliálních buňkách (RPTEC). Tzv. archetyp je základní podtyp BKPyV, který není schopný se replikovat v RPTEC, jako druhý podtyp použili BKPyV, který má ve svém NCCR přestavby, a který je schopný se v těchto buňkách replikovat. U archetypu BKPyV je transkripce časných mRNA pod kontrolou slabšího časného promotoru, exprese miRNA je naopak pod kontrolou silnějšího promotoru. U variant BKPyV s přestavbami v NCCR platí opak, tedy mají silnější časný promotor a exprimují méně miRNA (Zou *et al.* 2020). Následné analýzy pomocí metod western blot a RT-PCR ukázaly zvýšenou hladinu T antigenů i časných mRNA (100x) u archetypální miRNA mutanty oproti divokému typu viru, a to 32 dní po infekci. U varianty miRNA mutanty BKPyV s přestavbami v NCCR zvýšení časných mRNA nezaznamenali, ovšem hladina T antigenů byla oproti divokému typu viru s přestavbami v NCCR zvýšena. U archetypové miRNA mutanty byla oproti divokému typu viru rovněž zvýšena i replikace virového genomu (50x). U archetypové mutanty byla také zvýšená exprese VP1. Naopak u miRNA mutanty s přestavbami v NCCR byla míra replikace srovnatelná s divokým

typem. Tyto experimenty odhalily, že miRNA archetypu BKPyV negativně reguluje expresi časných mRNA v renálních tubulárních epitelech a že miRNA je zodpovědná za snížení replikace virového genomu (Broekema & Imperiale, 2013).

Na experimenty Broekema a Imperiala navázal tým v čele s Martellim a v roce 2018, na rozdíl od Broekema a Imperiala, prováděli experimenty ze vzorků přímo od pacientů a zkoumali, jak se změní replikace genomu BKPyV za pomoci miRNA či přestaveb v NCCR. Zkoumali, zda miRNA BKPyV bude schopna snížit replikaci genomu u *rr*-NCCR-BKPyV, tedy BKPyV obsahující NCCR s přestavbami. Experiment provedli za pomoci transfekce buněk ledvin kočkodana obecného transformovaných SV40 (buněčná linie Cos-7) a lidských buněk renálních tubulárních epitelech (RPTEC) exozomy obsahujícími plasmid, který exprimuje miRNA BKPyV. Poté tyto buňky vystavili supernatantům pocházející ze vzorků moči od 12 pacientů s relaps remitentní formou roztroušené sklerózy. Exozomy s miRNA BKPyV byly poté vyizolovány po 24, 48 a 72 hodinách od vystavení vzorkům moči. Následně izolovali celkovou RNA z obou druhů buněk a provedli RT-PCR amplifikaci. Porovnávali hladiny miRNA u BKPyV s přestavbami a archetypu BKPyV. U NCCR obsahující přestavby (*rr*-NCCR-BKPyV) došlo k poklesu tvorby virových miRNA a nárůstu virové replikace. Ovšem také zjistili, že stačí jen bodová mutace archetypu (ten má původní NCCR bez přestaveb) v místě SP1-4 a dojde k nárůstu replikace virového genomu a naopak poklesu virových miRNA i bez přestaveb NCCR. SP1-4 je místo v NCCR, které se chová jako hlavní přepínač mezi expresí časných a pozdních virových mRNA. Při bodové mutaci v místě SP1-4 dojde k nárůstu exprese časné oblasti genomu. U buněk infikovaných archetypovým BKPyV byla hladina miRNA BKPyV mnohem vyšší než u mutantního viru s mutacemi v SP1-SP4 a mutantního viru s přestavbami v NCCR (Martelli *et al.* 2018).

V roce 2021 Demey a jeho spolupracovníci uskutečnili klinickou studii, ve které zkoumali množství miRNA a množství DNA BKPyV ze vzorků moči získaných od 43 pacientů, kteří podstoupili transplantaci ledviny. Zjistili, že množství vyizolovaných BKPyV-miR-B1-3p a BKPyV-miR-B1-5p přímo koreluje s množstvím vyizolované DNA BKPyV. Ovšem metody na zachycení virové DNA jsou mnohem citlivější a proto lepší pro prevenci rozvoje nefropatie spojené s polyomaviry (anglicky polyomavirus-associated nephropathy, PVAN) u pacientů po transplantaci ledviny. Detekce většího množství DNA BKPyV indikuje reaktivaci replikace genomu a potenciální nebezpečí vzniku PVAN, naopak při detekci velmi malého množství DNA BKPyV a většího množství miRNA značí perzistenci (Demey *et al.* 2021).

5.1.4. miRNA kódovány genomem JCPyV a jejich funkce

Posledním zástupcem *Alfapolyomavirů* je JCPyV, ten kóduje dvě molekuly miRNA na 3' konci na antisense vlákně k LT, obě molekuly pochází z jedné pre-miRNA. JCPyV miRNA nesou název JCPyV-miR-J1-p5 a JCPyV-miR-J1-p3, název opět souvisí s tím, z jakého konce vlásenky pochází (shrnutí v Lagatie *et al.* 2013).

Stejně jako u polyomaviru BK, Seo a jeho spolupracovníci v roce 2008 hledali potenciální místa na genomu, kde je kódována pre-miRNA. Za pomoci použití prediktivního softwaru našli na JCPyV genomu dvě místa, která byla homologní s pre-miRNA SV40 sekvencí. K oběma místům sestrojili specifické próby 3p a 5p a pomoci northern blot analýzy odhalili skutečné místo, kde JCPyV kóduje pre-miRNA. Obě dvě miRNA (3p i 5p) byly úplně komplementární k časným mRNA a byly schopny regulovat hladinu T antigenů v buňce, což se podařilo potvrdit pomocí analýz s použitím luciferázové reportérové eseje a specifických inhibitorů miRNA (Seo *et al.* 2008).

Jak již bylo zmíněno výše, p3 miRNA JCPyV i BKPyV jsou sekvenčně totožné, tudíž mají také stejnou funkci, JCPyV-miR-J1-3p stejně jako BKPyV-miR-B1-3p, snižuje produkci stresového ligandu ULBP3, který je cílem ligandu NKG2D nacházejícím se na NK buňkách. Následně nedochází k NKG2D zprostředkovanému rozpoznání a usmrcení virem infikované buňky, čímž se virus vyhýbá imunitní odpovědi hostitelské buňky (Bauman *et al.* 2011).

Link a jeho spolupracovníci se v roce 2014 zabývali miRNA kódovaných JCPyV a jejich potenciálním využitím v klinické praxi. Systematické analýzy exprese 5p miRNA JCPyV u vzorků tkáně kolorektálního karcinomu, zdravé tkáně tlustého střeva a také ze vzorků stolice zdravých jedinců a pacientů s kolorektálním karcinomem odhalily, že se JCPyV-miR-J1-5p exprimuje ve všech tkáních tlustého střeva. Tkáň kolorektálního karcinomu stejně jako stolice pacientů s kolorektálním karcinomem obsahovala nižší hladiny JCPyV-miR-J1-5p než tkáň zdravá a než stolice od zdravých jedinců. (Link *et al.* 2014). Tudíž by mohla hladina JCPyV-miR-J1-5p ve vzorcích do budoucna sloužit jako biomarker infekce gastrointestinálního traktu, nebo dokonce jako biomarker pro kolorektální neoplázie.

Další experimenty zabývající se miRNA kódovanými JCPyV v souvislosti s patologiemi provedl v roce 2020 Takahashi a jeho spolupracovníci. V lézích mozkové tkáně získaných od 25 pacientů s progresivní multifokální leukoencefalopatií (PML) provedli *in situ* hybridizaci, která v jádře buněk detekovala obě dvě molekuly miRNA kódované v genomu JCPyV, a to u 24 z 25 vzorků. Zjistili, že všechny tkáně s PML vykazovaly mnohem větší množství miR-J1 než zdravé tkáně (Takahashi *et al.* 2020).

V roce 2021 Agostini a jeho spolupracovníci zjišťovali hladiny JCPyV-miR-J1-5p v moči u 25 pacientů s relaps remitující roztroušenou sklerózou. U všech pacientů byla detekována DNA JCPyV v moči, krvi i mozkomíšním moku. Všem pacientům byla nasazena léčba v podobě léku Natalizumabu, imunosupresiva, které zabraňuje migraci leukocytů a jejich procházení cévami. Vzorky moči byly od pacientů získány po 1, 12, 24 a 48 měsících od nasazení léčby. U žádného pacienta se nevyvinula progresivní multifokální leukoencefalopatie (PML), která je vyvolána reaktivací genomu JCPyV a může být způsobena i užíváním Natalizumabu. Žádná korelace mezi věkem či pohlavím a průběhem nemoci nebyla nalezena. Do budoucna by JCPyV-miR-J1 mohla být použita jako biomarker v

diagnostice relaps remitující roztroušené sklerózy a pomoci při výběru vhodné léčby (Agostini *et al.* 2021).

5.1.5. miRNA kódované genomem MCPyV a jejich funkce

Pozice miRNA na genomu MCPyV je stejně jako u MPyV na 5'konci na antisense vlákně k LT. Stejně jako předchozí zástupci má i MCPyV dvě miRNA molekuly – MCV-miR-M1-5p a 3p, tyto miRNA jsou dokonale komplementární k časné mRNA (shrnutí v Lagatie *et al.* 2013).

V roce 2009 Seo a jeho spolupracovníci zkoumali, zda MCPyV kóduje ve svém genomu stejně jako SV40, MPyV, BKPyV a JCPyV miRNA a zda mají funkci regulace exprese T antigenů. Všechny provedené experimenty byly *in vitro*. Nejprve za pomoci počítačového programu Vmir našli oblast na genomu MCPyV, která by mohla odpovídat pre-miRNA, a to ve stejném místě, jako je kódována pre-miRNA MPyV, tedy na pozdním vlákně u 5'konce mRNA pro LT. Pomocí metod genového inženýrství se jim následně podařilo detekovat dvě miRNA, které pojmenovali MCV-mir-M1 5p a MCV-mir-M1 3p. Pomocí luciferázového reportérového systému ověřili, že miRNA skutečně snižují expresi časných proteinů (Seo *et al.* 2009).

Další výzkumnou skupinou zabývající se miRNA MCPyV je Lee a jeho spolupracovníci. V roce 2011 uskutečnili několik *in vivo* experimentů a jako první detekovali MCPyV miRNA v lidské tkáni. Bylo použito celkem 7 vzorků karcinomu z Merkelových buněk a jedna perilezionální kožní tkáň. Ze všech 8 vzorků byla nejprve vyizolována miRNA, poté se vyizolovaná miRNA z každého vzorku separátně sekvenovala a výsledné sekvence se za pomoci počítačového programu MAQ porovnávala se sekvencí genomu MCPyV. Nalezly 22 nt dlouhou dokonale homologní oblast mezi sekvencí miRNA a genomem MCPyV. Ze 7 karcinomů z Merkelových buněk pouze tři obsahovaly detekovatelné množství virové DNA. Pro ověření svých pozorování ještě stejným způsobem otestovali dalších 45 tkání karcinomu z Merkelových buněk, 35 z nich bylo pozitivních na DNA MCPyV. V těchto vzorcích byla exprimována MCV-miR-M1-5p. Naopak u 10 zbylých vzorků, kde nebyla zachycena virová DNA MCPyV, nebyla detekována ani MCV-miR-M1-5p. Po osekvenování pre-miRNA i miRNA zjistili, že sekvence pre-miRNA odpovídá předchozímu osekvenování pre-miRNA MCPyV, ovšem MCV-miR-M1-5p se liší od předchozích publikací, sekvence je posunuta o 2 nt, je možné, že se dle fyziologických a dalších vlivů v buňce tvoří vždy trochu jiná varianta maturované 22 nt dlouhé miRNA (S. Lee *et al.* 2011).

Theiss a jeho spolupracovníci v roce 2015 uskutečnili podrobnou studii zabývající se miRNA kódovaných MCPyV a jejich funkcí při krátkodobé i dlouhodobé replikaci genomu MCPyV. Zjistili, že miRNA může být exprimována i nezávisle na NCCR iniciované transkripci pozdních genů. Když analyzovali množství miRNA v buňce, kde probíhala replikace viru, zjistili, že při replikaci genomu dochází k expresi velkého množství MCV-miR-M1. U buněk odvozených od buněk karcinomu z Merkelových buněk naopak detekovali velmi malé množství MCV-miR-M1, v těchto buňkách se

MCPyV nereplikuje. Za pomoci využití dvou variant viru – divokého typu MCPyV a mutanty s nefunkčními miRNA zjistili, že u mutanty je více exprimován LT a oproti divokému typu také vykazuje zvýšenou replikaci virové DNA. MiRNA MCPyV jsou tedy negativní regulátory časných mRNA, stejně jako je tomu u SV40, MPyV, BKPyV a JCPyV (Theiss *et al.* 2015).

V roce 2018 Akhbari a jeho spolupracovníci zkoumali miRNA kódované MCPyV a jaký mají vliv při unikání imunitní odpovědi ve virem infikovaných buňkách. Buňky 293 infikovali divokým typem MCPyV nebo mutantou, která nebyla schopná tvořit pre-miRNA a tudíž ani funkční miRNA. Po 72 hodinách od infekce z buněk vyizolovali RNA a proteiny. Kromě toho, že byl u mutanty zachycen nárůst kopií virového genomu a množství miRNA a LT bylo ve vztahu negativní korelace, došlo také k nárůstu buněčných transkriptů souvisejících s imunitní odpovědí. Za pomoci RNAhybrid programu provedli srovnání sekvencí MCV-miR-M1 a 3'UTR deregulovaných, buněčných mRNA a našli mRNA pro CXCL8, RAET1G, SELPLG a SP100, jako potenciální cílové mRNA. Pomocí luciferázového reportérového systému nesoucí potenciální cílové místo jedné ze čtyř výše uvedených mRNA a za pomoci molekuly mimikující MCV-miR-M1 se jim podařilo dokázat, že MCV-miR-M1 se váže přímo na 3'UTR mRNA pro SP100 a tak snižuje jeho expresi. Výsledky potvrdily i další experimenty s mutovanými 3'UTR sekvencemi mRNA pro SP100. Pomocí biochemických analýz stanovujících hladinu proteinu SP100 ukázali, že mRNA pro SP100 je přímý cíl MCV-miR-M1-5p, jelikož exprese je touto miRNA snížena. Podobná data získali i v případě proteinu CXCL8 u buněk 293 stimulovaných TNF- α . Hladina sekretovaného CXCL8 byla značně snížena u buněk stimulovaných TNF- α a obsahujících mimikující molekuly obou miRNA MCPyV v porovnání s kontrolou. Nakonec ukázali, že když v buňkách není přítomna MCV-miR-M1-5p dochází k částečnému obnovení tvorby CXCL8. Tímto dokázaly, že hladina CXCL8 je snižována díky snížení hladiny SP100 a hladina SP100 je zase snižována kvůli represi translace z důvodu navázání MCV-miR-M1-5p na 3'UTR mRNA SP100. Snížení hladiny CXCL8 je pro MCPyV velice důležité, tím se totiž vyhne imunitní odpovědi ze strany neutrofilů a tak může v buňce dlouhodobě přežívat (Akhbari *et al.* 2018).

6. Závěr

Polyomavirem kódované miRNA jsou zcela komplementární k časným mRNA, regulují tedy jejich expresi a díky snížení T antigenů v infikované buňce může virus dlouhodobě přežívat v buňce a vyhýbat se imunitní odpovědi. Vyhýbání imunitní odpovědi hostitele se děje dvěma základními principy, prvním je již zmíněné snížení onkoproteinů, druhým je cílené snížení buněčných transkriptů související s imunitní odpovědí za pomoci virem kódovaných miRNA. Oba dva principy tedy souvisí s polyomaviry kódovanými miRNA. Například miRNA kódované MPyV snižují expresi proteinu Smad2, který souvisí s apoptickou dráhou. Rovněž miRNA BKPyV a JCPyV snižují imunitní odpověď hostitele, a to za pomoci snížení exprese ULBP3, jedná se o stresový ligand vážící se na ligand NKG2D na NK buňkách.

Míra exprese virem kódovaných miRNA u polyomavirů souvisí s jejich perzistencí či reaktivací replikace genomu. Při perzistenci se přítomnost viru významně neprojeví, pouze jsou vyizolovány vyšší hladiny miRNA, ovšem při snížení hladiny virových miRNA dochází k reaktivaci replikace genomu a může dojít až k rozvoji některých neléčitelných nemocí u lidí jako je například progresivní multifokální encefalopatie či karcinom Merkelových buněk. Právě detekce polyomavirových miRNA v infikovaných buňkách, ale i v tělních tekutinách by mohla být velice užitečná do budoucna v klinické i diagnostické praxi, miRNA určitých lidských polyomavirů by mohly sloužit jako biomarkery při diagnostice různých, nejen onkologických onemocněních. MiRNA jsou dobrým kandidátem na biomarkery, protože spolu s Ago2 tvoří velice stabilní molekulu, která se v tělních tekutinách nachází po dobu až dvou měsíců. Znalost funkcí polyomavirových miRNA a na jaké buněčné transkripty cílí je velice důležitá jak pro zabránění transformace buněk, tak pro včasnou diagnostiku.

7. Seznam použité literatury

- Agostini S, Mancuso R, Costa AS, Caputo D, Clerici M. JCPyV miR-J1-5p in Urine of Natalizumab-Treated Multiple Sclerosis Patients. *Viruses*. 2021 Mar 12;13(3):468. doi: 10.3390/v13030468. PMID: 33809082; PMCID: PMC8000901.
- * Ahsan N, Shah KV. Polyomaviruses and human diseases. *Adv Exp Med Biol*. 2006;577:1-18. doi: 10.1007/0-387-32957-9_1. PMID: 16626024.
- Akhbari P, Tobin D, Poterlowicz K, Roberts W, Boyne JR. MCV-miR-M1 Targets the Host-Cell Immune Response Resulting in the Attenuation of Neutrophil Chemotaxis. *J Invest Dermatol*. 2018 Nov;138(11):2343-2354. doi: 10.1016/j.jid.2018.03.1527. Epub 2018 May 17. PMID: 29777657.
- Anderson HA, Chen Y, Norkin LC. Bound simian virus 40 translocates to caveolin-enriched membrane domains, and its entry is inhibited by drugs that selectively disrupt caveolae. *Mol Biol Cell*. 1996 Nov;7(11):1825-34. doi: 10.1091/mbc.7.11.1825. PMID: 8930903; PMCID: PMC276029.
- Ashok A, Atwood WJ. Contrasting roles of endosomal pH and the cytoskeleton in infection of human glial cells by JC virus and simian virus 40. *J Virol*. 2003 Jan;77(2):1347-56. doi: 10.1128/jvi.77.2.1347-1356.2003. PMID: 12502851; PMCID: PMC140837.
- Auger KR, Carpenter CL, Shoelson SE, Piwnicka-Worms H, Cantley LC. Polyoma virus middle T antigen-pp60c-src complex associates with purified phosphatidylinositol 3-kinase in vitro. *J Biol Chem*. 1992 Mar 15;267(8):5408-15. PMID: 1372000.
- Baltimore D. Expression of animal virus genomes. *Bacteriol Rev*. 1971 Sep;35(3):235-41. PMID:4329869; PMCID: PMC378387.
- * Bartel DP. Metazoan MicroRNAs. *Cell*. 2018 Mar 22;173(1):20-51. doi: 10.1016/j.cell.2018.03.006. PMID: 29570994; PMCID: PMC6091663.
- * Bartel DP. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell*. 2009 Jan 23;136(2):215-33. doi: 10.1016/j.cell.2009.01.002. PMID: 19167326; PMCID: PMC3794896.
- Bauman Y, Nachmani D, Vitenshtein A, Tsukerman P, Drayman N, Stern-Ginossar N, Lankry D, Gruda R, Mandelboim O. An identical miRNA of the human JC and BK polyoma viruses targets the stress-induced ligand ULBP3 to escape immune elimination. *Cell Host Microbe*. 2011 Feb 17;9(2):93-102. doi: 10.1016/j.chom.2011.01.008. PMID: 21320692.
- Becker M, Dominguez M, Greune L, Soria-Martinez L, Pfliederer MM, Schowalter R, Buck CB, Blaum BS, Schmidt MA, Schelhaas M. Infectious Entry of Merkel Cell Polyomavirus. *J Virol*. 2019 Mar 5;93(6):e02004-18. doi: 10.1128/JVI.02004-18. PMID: 30626687; PMCID: PMC6401430.
- Bennett SM, Zhao L, Bosard C, Imperiale MJ. Role of a nuclear localization signal on the minor capsid proteins VP2 and VP3 in BKPyV nuclear entry. *Virology*. 2015 Jan 1;474:110-6. doi: 10.1016/j.virol.2014.10.013. Epub 2014 Nov 14. PMID: 25463609; PMCID: PMC4259852.
- Bernstein E, Caudy AA, Hammond SM, Hannon GJ. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature*. 2001 Jan 18;409(6818):363-6. doi: 10.1038/35053110. PMID: 11201747.
- Brady J, Bolen JB, Radonovich M, Salzman N, Khoury G. Stimulation of simian virus 40 late gene expression by simian virus 40 tumor antigen. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1984 Apr;81(7):2040-4. doi: 10.1073/pnas.81.7.2040. PMID: 6201850; PMCID: PMC345432.
- Brennecke J, Stark A, Russell RB, Cohen SM. Principles of microRNA-target recognition. *PLoS Biol*. 2005 Mar;3(3):e85. doi: 10.1371/journal.pbio.0030085. PMID: 15723116; PMCID: PMC1043860.
- Broekema NM, Imperiale MJ. miRNA regulation of BK polyomavirus replication during early infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013 May 14;110(20):8200-5. doi: 10.1073/pnas.1301907110. Epub 2013 Apr 29. PMID: 23630296; PMCID: PMC3657827.
- Buck CB, Van Doorslaer K, Peretti A, Geoghegan EM, Tisza MJ, An P, Katz JP, Pipas JM, McBride AA, Camus AC, McDermott AJ, Dill JA, Delwart E, Ng TF, Farkas K, Austin C, Kraberger S, Davison W, Pastrana DV, Varsani A. The Ancient Evolutionary History of Polyomaviruses. *PLoS Pathog*. 2016 Apr 19;12(4):e1005574. doi: 10.1371/journal.ppat.1005574. PMID: 27093155; PMCID: PMC4836724.
- Burke JM, Bass CR, Kincaid RP, Ulug ET, Sullivan CS. The Murine Polyomavirus MicroRNA Locus Is Required To Promote Viruria during the Acute Phase of Infection. *J Virol*. 2018 Jul 31;92(16):e02131-17. doi: 10.1128/JVI.02131-17. PMID: 29875236; PMCID: PMC6069185.

- Carswell S, Alwine JC. Simian virus 40 agnoprotein facilitates perinuclear-nuclear localization of VP1, the major capsid protein. *J Virol.* 1986 Dec;60(3):1055-61. doi: 10.1128/JVI.60.3.1055-1061.1986. PMID: 3023658; PMCID: PMC253345.
- Clayson ET, Brando LV, Compans RW. Release of simian virus 40 virions from epithelial cells is polarized and occurs without cell lysis. *J Virol.* 1989 May;63(5):2278-88. doi: 10.1128/JVI.63.5.2278-2288.1989. PMID: 2539518; PMCID: PMC250646.
- Contreras R, Rogiers R, Van de Voorde A, Fiers W. Overlapping of the VP2-VP3 gene and the VP1 gene in the SV40 genome. *Cell.* 1977 Oct;12(2):529-38. doi: 10.1016/0092-8674(77)90129-5. PMID: 199354.
- Crawford LV, Cole CN, Smith AE, Paucha E, Tegtmeier P, Rundell K, Berg P. Organization and expression of early genes of simian virus 40. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1978 Jan;75(1):117-21. doi: 10.1073/pnas.75.1.117. PMID: 203926; PMCID: PMC411195.
- * Czech B, Hannon GJ. Small RNA sorting: matchmaking for Argonautes. *Nat Rev Genet.* 2011 Jan;12(1):19-31. doi: 10.1038/nrg2916. Epub 2010 Nov 30. PMID: 21116305; PMCID: PMC3703915.
- Daniels R, Hebert DN. In Support of Simian Polyomavirus 40 VP4 as a Later Expressed Viroporin. *mSphere.* 2020 Mar 18;5(2):e00187-20. doi: 10.1128/mSphere.00187-20. PMID: 32188752; PMCID: PMC7082142.
- Daniels R, Sadowicz D, Hebert DN. A very late viral protein triggers the lytic release of SV40. *PLoS Pathog.* 2007 Jul;3(7):e98. doi: 10.1371/journal.ppat.0030098. PMID: 17658947; PMCID: PMC1924868.
- Demey B, Descamps V, Presne C, Helle F, Francois C, Duverlie G, Castelain S, Brochot E. BK Polyomavirus Micro-RNAs: Time Course and Clinical Relevance in Kidney Transplant Recipients. *Viruses.* 2021 Feb 23;13(2):351. doi: 10.3390/v13020351. PMID: 33672313; PMCID: PMC7926448.
- Dilworth SM, Hansson HA, Darnfors C, Bjursell G, Streuli CH, Griffin BE. Subcellular localisation of the middle and large T-antigens of polyoma virus. *EMBO J.* 1986 Mar;5(3):491-9. PMID: 3011409; PMCID: PMC1166790.
- Dunant NM, Senften M, Ballmer-Hofer K. Polyomavirus middle-T antigen associates with the kinase domain of Src-related tyrosine kinases. *J Virol.* 1996 Mar;70(3):1323-30. doi: 10.1128/JVI.70.3.1323-1330.1996. PMID: 8627648; PMCID: PMC189951.
- Eash S, Atwood WJ. Involvement of cytoskeletal components in BK virus infectious entry. *J Virol.* 2005 Sep;79(18):11734-41. doi: 10.1128/JVI.79.18.11734-11741.2005. PMID: 16140751; PMCID: PMC1212632.
- Elbashir SM, Lendeckel W, Tuschl T. RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes Dev.* 2001 Jan 15;15(2):188-200. doi: 10.1101/gad.862301. PMID: 11157775; PMCID: PMC312613.
- Elkayam E, Faehnle CR, Morales M, Sun J, Li H, Joshua-Tor L. Multivalent Recruitment of Human Argonaute by GW182. *Mol Cell.* 2017 Aug 17;67(4):646-658.e3. doi: 10.1016/j.molcel.2017.07.007. Epub 2017 Aug 3. PMID: 28781232; PMCID: PMC5915679.
- Ellman M, Bikel I, Figge J, Roberts T, Schlossman R, Livingston DM. Localization of the simian virus 40 small t antigen in the nucleus and cytoplasm of monkey and mouse cells. *J Virol.* 1984 May;50(2):623-8. doi: 10.1128/JVI.50.2.623-628.1984. PMID: 6323762; PMCID: PMC255688.
- Elphick GF, Querbes W, Jordan JA, Gee GV, Eash S, Manley K, Dugan A, Stanifer M, Bhatnagar A, Kroeze WK, Roth BL, Atwood WJ. The human polyomavirus, JCPYV, uses serotonin receptors to infect cells. *Science.* 2004 Nov 19;306(5700):1380-3. doi: 10.1126/science.1103492. PMID: 15550673.
- Evans GL, Caller LG, Foster V, Crump CM. Anion homeostasis is important for non-lytic release of BK polyomavirus from infected cells. *Open Biol.* 2015 Aug;5(8):150041. doi: 10.1098/rsob.150041. PMID: 26246492; PMCID: PMC4554916.
- Fairman MP, Stillman B. Cellular factors required for multiple stages of SV40 DNA replication in vitro. *EMBO J.* 1988 Apr;7(4):1211-8. PMID: 2841119; PMCID: PMC454458.
- Fenton RG, Basilico C. Changes in the topography of early region transcription during polyoma virus lytic infection. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1982 Dec;79(23):7142-6. doi: 10.1073/pnas.79.23.7142. PMID: 6296819; PMCID: PMC347294.
- Filippov V, Solovyev V, Filippova M, Gill SS. A novel type of RNase III family proteins in eukaryotes. *Gene.* 2000 Mar 7;245(1):213-21. doi: 10.1016/s0378-1119(99)00571-5. PMID: 10713462.
- Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature.* 1998 Feb 19;391(6669):806-11. doi: 10.1038/35888. PMID: 9486653.
- * Fried M, Griffin BE. Organization of the genomes of polyoma virus and SV40. *Adv Cancer Res.* 1977;24:67-113. doi: 10.1016/s0065-230x(08)61013-1. PMID: 192059.

- Friedman RC, Farh KK, Burge CB, Bartel DP. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res.* 2009 Jan;19(1):92-105. doi: 10.1101/gr.082701.108. Epub 2008 Oct 27. PMID: 18955434; PMCID: PMC2612969.
- Gardner SD, Field AM, Coleman DV, Hulme B. New human papovavirus (B.K.) isolated from urine after renal transplantation. *Lancet.* 1971 Jun 19;1(7712):1253-7. doi: 10.1016/s0140-6736(71)91776-4. PMID: 4104714.
- Gendra E, Colgan DF, Meany B, Konarska MM. A sequence motif in the simian virus 40 (SV40) early core promoter affects alternative splicing of transcribed mRNA. *J Biol Chem.* 2007 Apr 20;282(16):11648-57. doi: 10.1074/jbc.M611126200. Epub 2007 Mar 1. PMID: 17331949.
- Gerits N, Johannessen M, Tümmler C, Walquist M, Kostenko S, Snapkov I, van Loon B, Ferrari E, Hübscher U, Moens U. Agnoprotein of polyomavirus BK interacts with proliferating cell nuclear antigen and inhibits DNA replication. *Virology.* 2015 Feb 1;12:7. doi: 10.1186/s12985-014-0220-1. PMID: 25638270; PMCID: PMC4318453.
- * Gerits N, Moens U. Agnoprotein of mammalian polyomaviruses. *Virology.* 2012 Oct 25;432(2):316-26. doi: 10.1016/j.virol.2012.05.024. Epub 2012 Jun 21. PMID: 22726243; PMCID: PMC7111918.
- Gilbert JM, Benjamin TL. Early steps of polyomavirus entry into cells. *J Virol.* 2000 Sep;74(18):8582-8. doi: 10.1128/jvi.74.18.8582-8588.2000. PMID: 10954560; PMCID: PMC116371.
- Gregory RI, Yan KP, Amuthan G, Chendrimada T, Doratotaj B, Cooch N, Shiekhattar R. The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs. *Nature.* 2004 Nov 11;432(7014):235-40. doi: 10.1038/nature03120. Epub 2004 Nov 7. PMID: 15531877.
- * Grundhoff A, Sullivan CS. Virus-encoded microRNAs. *Virology.* 2011 Mar 15;411(2):325-43. doi: 10.1016/j.virol.2011.01.002. Epub 2011 Jan 31. PMID: 21277611; PMCID: PMC3052296.
- Gu R, Zhang Z, DeCervo JN, Carmichael GG. Gene regulation by sense-antisense overlap of polyadenylation signals. *RNA.* 2009 Jun;15(6):1154-63. doi: 10.1261/rna.1608909. Epub 2009 Apr 23. PMID: 19390116; PMCID: PMC2685520.
- * Ha M, Kim VN. Regulation of microRNA biogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2014 Aug;15(8):509-24. doi: 10.1038/nrm3838. Epub 2014 Jul 16. PMID: 25027649.
- Hamilton AJ, Baulcombe DC. A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. *Science.* 1999 Oct 29;286(5441):950-2. doi: 10.1126/science.286.5441.950. PMID: 10542148.
- * Hammond SM. An overview of microRNAs. *Adv Drug Deliv Rev.* 2015 Jun 29;87:3-14. doi: 10.1016/j.addr.2015.05.001. Epub 2015 May 12. PMID: 25979468; PMCID: PMC4504744.
- Han J, Lee Y, Yeom KH, Kim YK, Jin H, Kim VN. The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing. *Genes Dev.* 2004 Dec 15;18(24):3016-27. doi: 10.1101/gad.1262504. Epub 2004 Dec 1. PMID: 15574589; PMCID: PMC535913.
- Han J, Lee Y, Yeom KH, Nam JW, Heo I, Rhee JK, Sohn SY, Cho Y, Zhang BT, Kim VN. Molecular basis for the recognition of primary microRNAs by the Drosha-DGCR8 complex. *Cell.* 2006 Jun 2;125(5):887-901. doi: 10.1016/j.cell.2006.03.043. PMID: 16751099.
- O'Hara SD, Garcea RL. Murine Polyomavirus Cell Surface Receptors Activate Distinct Signaling Pathways Required for Infection. *mBio.* 2016 Nov 1;7(6):e01836-16. doi: 10.1128/mBio.01836-16. PMID: 27803182; PMCID: PMC5090042.
- Henriksen S, Hansen T, Bruun JA, Rinaldo CH. The Presumed Polyomavirus Viroprotein VP4 of Simian Virus 40 or Human BK Polyomavirus Is Not Required for Viral Progeny Release. *J Virol.* 2016 Oct 28;90(22):10398-10413. doi: 10.1128/JVI.01326-16. PMID: 27630227; PMCID: PMC5105673.
- Henriksen S, Rinaldo CH. Does the Evidence Support the Existence of the Simian Polyomavirus SV40 Vp4 Viroprotein? *mSphere.* 2020 Mar 18;5(2):e00019-20. doi: 10.1128/mSphere.00019-20. PMID: 32188744; PMCID: PMC7082134.
- * Hickman ES, Moroni MC, Helin K. The role of p53 and pRB in apoptosis and cancer. *Curr Opin Genet Dev.* 2002 Feb;12(1):60-6. doi: 10.1016/s0959-437x(01)00265-9. PMID: 11790556.
- Hudson J, Goldstein D, Weil R. A study on the transcription of the polyoma viral genome. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1970 Jan;65(1):226-33. doi: 10.1073/pnas.65.1.226. PMID: 4313194; PMCID: PMC286214.
- Huérffano S, Ryabchenko B, Španielová H, Forstová J. Hydrophobic domains of mouse polyomavirus minor capsid proteins promote membrane association and virus exit from the ER. *FEBS J.* 2017 Mar;284(6):883-902. doi: 10.1111/febs.14033. Epub 2017 Feb 23. PMID: 28164464.
- Huerfano S, Zila V, Boura E, Španielová H, Stokrová J, Forstová J. Minor capsid proteins of mouse polyomavirus are inducers of apoptosis when produced individually but are only moderate contributors to cell death during the late phase of

- viral infection. *FEBS J.* 2010 Mar;277(5):1270-83. doi: 10.1111/j.1742-4658.2010.07558.x. Epub 2010 Feb 1. PMID: 20121946.
- Hurdiss DL, Morgan EL, Thompson RF, Prescott EL, Panou MM, Macdonald A, Ranson NA. New Structural Insights into the Genome and Minor Capsid Proteins of BK Polyomavirus using Cryo-Electron Microscopy. *Structure.* 2016 Apr 5;24(4):528-536. doi: 10.1016/j.str.2016.02.008. Epub 2016 Mar 17. PMID: 26996963; PMCID: PMC4826271.
- Chang LS, Pater MM, Hutchinson NI, di Mayorca G. Transformation by purified early genes of simian virus 40. *Virology.* 1984 Mar;133(2):341-53. doi: 10.1016/0042-6822(84)90400-8. PMID: 6324456.
- Chen XS, Stehle T, Harrison SC. Interaction of polyomavirus internal protein VP2 with the major capsid protein VP1 and implications for participation of VP2 in viral entry. *EMBO J.* 1998 Jun 15;17(12):3233-40. doi: 10.1093/emboj/17.12.3233. PMID: 9628860; PMCID: PMC1170661.
- Chendrimada TP, Gregory RI, Kumaraswamy E, Norman J, Cooch N, Nishikura K, Shiekhattar R. TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing. *Nature.* 2005 Aug 4;436(7051):740-4. doi: 10.1038/nature03868. Epub 2005 Jun 22. PMID: 15973356; PMCID: PMC2944926.
- * Ichaso N, Dilworth SM. Cell transformation by the middle T-antigen of polyoma virus. *Oncogene.* 2001 Nov 26;20(54):7908-16. doi: 10.1038/sj.onc.1204859. PMID: 11753673.
- Jiang M, Abend JR, Tsai B, Imperiale MJ. Early events during BK virus entry and disassembly. *J Virol.* 2009 Feb;83(3):1350-8. doi: 10.1128/JVI.02169-08. Epub 2008 Nov 26. PMID: 19036822; PMCID: PMC2620883.
- Kawano MA, Inoue T, Tsukamoto H, Takaya T, Enomoto T, Takahashi RU, Yokoyama N, Yamamoto N, Nakanishi A, Imai T, Wada T, Kataoka K, Handa H. The VP2/VP3 minor capsid protein of simian virus 40 promotes the in vitro assembly of the major capsid protein VP1 into particles. *J Biol Chem.* 2006 Apr 14;281(15):10164-73. doi: 10.1074/jbc.M511261200. Epub 2006 Feb 14. PMID: 16478732.
- Kellogg C, Kouznetsova VL, Tsigelny IF. Interactions of large T-Antigen (LT) protein of polyomaviruses with p53 unfold their cancerogenic potential. *J Biomol Struct Dyn.* 2021 Jan 8:1-10. doi: 10.1080/07391102.2020.1869097. Epub ahead of print. PMID: 33416027.
- Kennerdell JR, Carthew RW. Use of dsRNA-mediated genetic interference to demonstrate that frizzled and frizzled 2 act in the wingless pathway. *Cell.* 1998 Dec 23;95(7):1017-26. doi: 10.1016/s0092-8674(00)81725-0. PMID: 9875855.
- * Khalili K, Sariyer IK, Safak M. Small tumor antigen of polyomaviruses: role in viral life cycle and cell transformation. *J Cell Physiol.* 2008 May;215(2):309-19. doi: 10.1002/jcp.21326. PMID: 18022798; PMCID: PMC2716072.
- Khvorova A, Reynolds A, Jayasena SD. Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. *Cell.* 2003 Oct 17;115(2):209-16. doi: 10.1016/s0092-8674(03)00801-8. Erratum in: *Cell.* 2003 Nov 14;115(4):505. PMID: 14567918.
- Klawitz I, Preuss U, Scheidtmann KH. Interaction of SV40 large T antigen with components of the nucleo/cytoskeleton. *Int J Oncol.* 2001 Dec;19(6):1325-32. doi: 10.3892/ijo.19.6.1325. PMID: 11713607.
- * Kobayashi H, Tomari Y. RISC assembly: Coordination between small RNAs and Argonaute proteins. *Biochim Biophys Acta.* 2016 Jan;1859(1):71-81. doi: 10.1016/j.bbagr.2015.08.007. Epub 2015 Aug 22. PMID: 26303205.
- Krüger J, Rehmsmeier M. RNAhybrid: microRNA target prediction easy, fast and flexible. *Nucleic Acids Res.* 2006 Jul 1;34(Web Server issue):W451-4. doi: 10.1093/nar/gkl243. PMID: 16845047; PMCID: PMC1538877.
- Kuksin D, Norkin LC. Disassembly of simian virus 40 during passage through the endoplasmic reticulum and in the cytoplasm. *J Virol.* 2012 Feb;86(3):1555-62. doi: 10.1128/JVI.05753-11. Epub 2011 Nov 16. PMID: 22090139; PMCID: PMC3264361.
- Kwon SC, Nguyen TA, Choi YG, Jo MH, Hohng S, Kim VN, Woo JS. Structure of Human DROSHA. *Cell.* 2016 Jan 14;164(1-2):81-90. doi: 10.1016/j.cell.2015.12.019. Epub 2015 Dec 31. PMID: 26748718.
- Kwun HJ, Guastafierro A, Shuda M, Meinke G, Bohm A, Moore PS, Chang Y. The minimum replication origin of merkel cell polyomavirus has a unique large T-antigen loading architecture and requires small T-antigen expression for optimal replication. *J Virol.* 2009 Dec;83(23):12118-28. doi: 10.1128/JVI.01336-09. Epub 2009 Sep 16. PMID: 19759150; PMCID: PMC2786723.
- * Lagatie O, Tritsmans L, Stuyver LJ. The miRNA world of polyomaviruses. *Virol J.* 2013 Aug 28;10:268. doi: 10.1186/1743-422X-10-268. PMID: 23984639; PMCID: PMC3765807.
- Lau PW, Guiley KZ, De N, Potter CS, Carragher B, MacRae IJ. The molecular architecture of human Dicer. *Nat Struct Mol Biol.* 2012 Mar 18;19(4):436-40. doi: 10.1038/nsmb.2268. PMID: 22426548; PMCID: PMC3319852.
- Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell.* 1993 Dec 3;75(5):843-54. doi: 10.1016/0092-8674(93)90529-y. PMID: 8252621.

- Lee S, Paulson KG, Murchison EP, Afanasiev OK, Alkan C, Leonard JH, Byrd DR, Hannon GJ, Nghiem P. Identification and validation of a novel mature microRNA encoded by the Merkel cell polyomavirus in human Merkel cell carcinomas. *J Clin Virol.* 2011 Nov;52(3):272-5. doi: 10.1016/j.JCPyV.2011.08.012. Epub 2011 Sep 9. PMID: 21907614; PMCID: PMC3196837.
- Lee Y, Ahn C, Han J, Choi H, Kim J, Yim J, Lee J, Provost P, Radmark O, Kim S, *et al.* 2003. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature* 425: 415–419.
- Lee Y, Hur I, Park SY, Kim YK, Suh MR, Kim VN. The role of PACT in the RNA silencing pathway. *EMBO J.* 2006 Feb 8;25(3):522-32. doi: 10.1038/sj.emboj.7600942. Epub 2006 Jan 19. PMID: 16424907; PMCID: PMC1383527.
- Lee Y, Jeon K, Lee JT, Kim S, Kim VN. MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization. *EMBO J.* 2002 Sep 2;21(17):4663-70. doi: 10.1093/emboj/cdf476. PMID: 12198168; PMCID: PMC126204.
- Lee, Y., Kim, M., Han, J., Yeom, K.-H., Lee, S., Baek, S.H. and Kim, V.N. (2004), MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *The EMBO Journal*, 23: 4051-4060.
- Lewis BP, Burge CB, Bartel DP. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell.* 2005 Jan 14;120(1):15-20. doi: 10.1016/j.cell.2004.12.035. PMID: 15652477.
- Li PP, Naknaniishi A, Tran MA, Ishizu K, Kawano M, Phillips M, Handa H, Liddington RC, Kasamatsu H. Importance of Vp1 calcium-binding residues in assembly, cell entry, and nuclear entry of simian virus 40. *J Virol.* 2003 Jul;77(13):7527-38. doi: 10.1128/jvi.77.13.7527-7538.2003. PMID: 12805453; PMCID: PMC164782.
- Lilley BN, Gilbert JM, Ploegh HL, Benjamin TL. Murine polyomavirus requires the endoplasmic reticulum protein Derlin-2 to initiate infection. *J Virol.* 2006 Sep;80(17):8739-44. doi: 10.1128/JVI.00791-06. PMID: 16912321; PMCID: PMC1563856.
- Link A, Balaguer F, Nagasaka T, Boland CR, Goel A. MicroRNA miR-J1-5p as a potential biomarker for JC virus infection in the gastrointestinal tract. *PLoS One.* 2014 Jun 16;9(6):e100036. doi: 10.1371/journal.pone.0100036. PMID: 24932487; PMCID: PMC4059717.
- Liu J, Carmell MA, Rivas FV, Marsden CG, Thomson JM, Song JJ, Hammond SM, Joshua-Tor L, Hannon GJ. Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi. *Science.* 2004 Sep 3;305(5689):1437-41. doi: 10.1126/science.1102513. Epub 2004 Jul 29. PMID: 15284456.
- Liu J, Valencia-Sanchez MA, Hannon GJ, Parker R. MicroRNA-dependent localization of targeted mRNAs to mammalian P-bodies. *Nat Cell Biol.* 2005 Jul;7(7):719-23. doi: 10.1038/ncb1274. Epub 2005 Jun 5. PMID: 15937477; PMCID: PMC1855297.
- Low JA, Magnuson B, Tsai B, Imperiale MJ. Identification of gangliosides GD1b and GT1b as receptors for BK virus. *J Virol.* 2006 Feb;80(3):1361-6. doi: 10.1128/JVI.80.3.1361-1366.2006. PMID: 16415013; PMCID: PMC1346969.
- Magnuson B, Rainey EK, Benjamin T, Baryshev M, Mkrtchian S, Tsai B. ERp29 triggers a conformational change in polyomavirus to stimulate membrane binding. *Mol Cell.* 2005 Oct 28;20(2):289-300. doi: 10.1016/j.molcel.2005.08.034. PMID: 16246730.
- * Makarova JA, Shkurnikov MU, Wicklein D, Lange T, Samatov TR, Turchinovich AA, Tonevitsky AG. Intracellular and extracellular microRNA: An update on localization and biological role. *Prog Histochem Cytochem.* 2016 Nov;51(3-4):33-49. doi: 10.1016/j.proghi.2016.06.001. Epub 2016 Jun 25. PMID: 27396686.
- * Mamane Y, Petroulakis E, LeBacquer O, Sonenberg N. mTOR, translation initiation and cancer. *Oncogene.* 2006 Oct 16;25(48):6416-22. doi: 10.1038/sj.onc.1209888. PMID: 17041626.
- Martelli F, Wu Z, Delbue S, Weissbach FH, Giulioli MC, Ferrante P, Hirsch HH, Giannecchini S. BK Polyomavirus MicroRNA Levels in Exosomes Are Modulated by Non-Coding Control Region Activity and Down-Regulate Viral Replication When Delivered to Non-Infected Cells Prior to Infection. *Viruses.* 2018 Aug 30;10(9):466. doi: 10.3390/v10090466. PMID: 30200237; PMCID: PMC6164188.
- * Mayberry CL, Maginnis MS. Taking the Scenic Route: Polyomaviruses Utilize Multiple Pathways to Reach the Same Destination. *Viruses.* 2020 Oct 15;12(10):1168. doi: 10.3390/v12101168. PMID: 33076363; PMCID: PMC7602598.
- Meister G, Landthaler M, Patkaniowska A, Dorsett Y, Teng G, Tuschl T. Human Argonaute2 mediates RNA cleavage targeted by miRNAs and siRNAs. *Mol Cell.* 2004 Jul 23;15(2):185-97. doi: 10.1016/j.molcel.2004.07.007. PMID: 15260970.
- * Moens U, Calvignac-Spencer S, Lauber C, Ramqvist T, Feltkamp MCW, Daugherty MD, Verschoor EJ, Ehlers B, Ictv Report Consortium. ICTV Virus Taxonomy Profile: Polyomaviridae. *J Gen Virol.* 2017 Jun;98(6):1159-1160. doi: 10.1099/jgv.0.000839. Epub 2017 Jun 22. PMID: 28640744; PMCID: PMC5656788.

- * Moens U, Johansen T, Johnsen JI, Seternes OM, Traavik T. Noncoding control region of naturally occurring BK virus variants: sequence comparison and functional analysis. *Virus Genes*. 1995;10(3):261-75. doi: 10.1007/BF01701816. PMID: 8560788.
- Morgan GJ. Ludwik Gross, Sarah Stewart, and the 1950s discoveries of Gross murine leukemia virus and polyoma virus. *Stud Hist Philos Biol Biomed Sci*. 2014 Dec;48 Pt B:200-9. doi: 10.1016/j.shpsc.2014.07.013. Epub 2014 Sep 13. PMID: 25223721.
- Motamedi N, Sewald X, Luo Y, Mothes W, DiMaio D. SV40 Polyomavirus Activates the Ras-MAPK Signaling Pathway for Vacuolization, Cell Death, and Virus Release. *Viruses*. 2020 Oct 5;12(10):1128. doi: 10.3390/v12101128. PMID: 33028008; PMCID: PMC7650553.
- Mungre S, Enderle K, Turk B, Porrás A, Wu YQ, Mumby MC, Rundell K. Mutations which affect the inhibition of protein phosphatase 2A by simian virus 40 small-t antigen in vitro decrease viral transformation. *J Virol*. 1994 Mar;68(3):1675-81. doi: 10.1128/JVI.68.3.1675-1681.1994. PMID: 8107228; PMCID: PMC236626.
- Müller U, Zentgraf H, Eicken I, Keller W. Higher order structure of simian virus 40 chromatin. *Science*. 1978 Aug 4;201(4354):406-15. doi: 10.1126/science.208155. PMID: 208155.
- Mylin LM, Schell TD, Roberts D, Epler M, Boesteanu A, Collins EJ, Frelinger JA, Joyce S, Tevethia SS. Quantitation of CD8(+) T-lymphocyte responses to multiple epitopes from simian virus 40 (SV40) large T antigen in C57BL/6 mice immunized with SV40, SV40 T-antigen-transformed cells, or vaccinia virus recombinants expressing full-length T antigen or epitope minigenes. *J Virol*. 2000 Aug;74(15):6922-34. doi: 10.1128/jvi.74.15.6922-6934.2000. PMID: 10888631; PMCID: PMC112209.
- Napoli C, Lemieux C, Jorgensen R. Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into *Petunia* Results in Reversible Co-Suppression of Homologous Genes in trans. *Plant Cell*. 1990 Apr;2(4):279-289. doi: 10.1105/tpc.2.4.279. PMID: 12354959; PMCID: PMC159885.
- Naruse K, Matsuura-Suzuki E, Watanabe M, Iwasaki S, Tomari Y. In vitro reconstitution of chaperone-mediated human RISC assembly. *RNA*. 2018 Jan;24(1):6-11. doi: 10.1261/rna.063891.117. Epub 2017 Oct 2. PMID: 28971854; PMCID: PMC5733571.
- Nelson CD, Derdowski A, Maginnis MS, O'Hara BA, Atwood WJ. The VP1 subunit of JC polyomavirus recapitulates early events in viral trafficking and is a novel tool to study polyomavirus entry. *Virology*. 2012 Jun 20;428(1):30-40. doi: 10.1016/j.virol.2012.03.014. Epub 2012 Apr 18. PMID: 22516137; PMCID: PMC3569719.
- Neu U, Maginnis MS, Palma AS, Ströh LJ, Nelson CD, Feizi T, Atwood WJ, Stehle T. Structure-function analysis of the human JC polyomavirus establishes the LSTc pentasaccharide as a functional receptor motif. *Cell Host Microbe*. 2010 Oct 21;8(4):309-19. doi: 10.1016/j.chom.2010.09.004. PMID: 20951965; PMCID: PMC2957469.
- Noble JC, Prives C, Manley JL. In vitro splicing of simian virus 40 early pre mRNA. *Nucleic Acids Res*. 1986 Feb 11;14(3):1219-35. doi: 10.1093/nar/14.3.1219. PMID: 3005968; PMCID: PMC339499.
- Padgett BL, Walker DL, Zurhein GM, Eckroade RJ, Dessel BH. Cultivation of papova-like virus from human brain with progressive multifocal leucoencephalopathy. *Lancet*. 1971 Jun 19;1(7712):1257-60. doi: 10.1016/s0140-6736(71)91777-6. PMID: 4104715.
- Pallas DC, Shahrik LK, Martin BL, Jaspers S, Miller TB, Brautigam DL, Roberts TM. Polyoma small and middle T antigens and SV40 small t antigen form stable complexes with protein phosphatase 2A. *Cell*. 1990 Jan 12;60(1):167-76. doi: 10.1016/0092-8674(90)90726-u. PMID: 2153055.
- Panou MM, Prescott EL, Hurdiss DL, Swinscoe G, Hollinshead M, Caller LG, Morgan EL, Carlisle L, Müller M, Antoni M, Kealy D, Ranson NA, Crump CM, Macdonald A. Agnoprotein Is an Essential Egress Factor during BK Polyomavirus Infection. *Int J Mol Sci*. 2018 Mar 19;19(3):902. doi: 10.3390/ijms19030902. PMID: 29562663; PMCID: PMC5877763.
- Pho MT, Ashok A, Atwood WJ. JC virus enters human glial cells by clathrin-dependent receptor-mediated endocytosis. *J Virol*. 2000 Mar;74(5):2288-92. doi: 10.1128/jvi.74.5.2288-2292.2000. PMID: 10666259; PMCID: PMC111710.
- * Pipas JM. Common and unique features of T antigens encoded by the polyomavirus group. *J Virol*. 1992 Jul;66(7):3979-85. doi: 10.1128/JVI.66.7.3979-3985.1992. PMID: 1318392; PMCID: PMC241200.
- * Pipas JM. SV40: Cell transformation and tumorigenesis. *Virology*. 2009 Feb 20;384(2):294-303. doi: 10.1016/j.virol.2008.11.024. Epub 2008 Dec 13. PMID: 19070883.
- Querbes W, O'Hara BA, Williams G, Atwood WJ. Invasion of host cells by JC virus identifies a novel role for caveolae in endosomal sorting of noncaveolar ligands. *J Virol*. 2006 Oct;80(19):9402-13. doi: 10.1128/JVI.01086-06. PMID: 16973546; PMCID: PMC1617268.

- Rayment I, Baker TS, Caspar DL, Murakami WT. Polyoma virus capsid structure at 22.5 Å resolution. *Nature*. 1982 Jan 14;295(5845):110-5. doi: 10.1038/295110a0. PMID: 6276752; PMCID: PMC4144041.
- Riley MI, Yoo W, Mda NY, Folk WR. Tiny T antigen: an autonomous polyomavirus T antigen amino-terminal domain. *J Virol*. 1997 Aug;71(8):6068-74. doi: 10.1128/JVI.71.8.6068-6074.1997. PMID: 9223500; PMCID: PMC191866.
- Ro S, Park C, Young D, Sanders KM, Yan W. Tissue-dependent paired expression of miRNAs. *Nucleic Acids Res*. 2007;35(17):5944-53. doi: 10.1093/nar/gkm641. Epub 2007 Aug 28. PMID: 17726050; PMCID: PMC2034466.
- Rodriguez A, Griffiths-Jones S, Ashurst JL, Bradley A. Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units. *Genome Res*. 2004 Oct;14(10A):1902-10. doi: 10.1101/gr.2722704. Epub 2004 Sep 13. PMID: 15364901; PMCID: PMC524413.
- Sambrook J, Sugden B, Keller W, Sharp PA. Transcription of simian virus 40. 3. Mapping of "early" and "late" species of RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1973 Dec;70(12):3711-5. doi: 10.1073/pnas.70.12.3711. PMID: 4129925; PMCID: PMC427312.
- Saribas AS, Mun S, Johnson J, El-Hajmoussa M, White MK, Safak M. Human polyoma JC virus minor capsid proteins, VP2 and VP3, enhance large T antigen binding to the origin of viral DNA replication: evidence for their involvement in regulation of the viral DNA replication. *Virology*. 2014 Jan 20;449:1-16. doi: 10.1016/j.virol.2013.10.031. Epub 2013 Nov 12. PMID: 24418532; PMCID: PMC3987903.
- Saribas AS, White MK, Safak M. JC virus agnoprotein enhances large T antigen binding to the origin of viral DNA replication: evidence for its involvement in viral DNA replication. *Virology*. 2012 Nov 10;433(1):12-26. doi: 10.1016/j.virol.2012.06.017. Epub 2012 Jul 27. PMID: 22840425; PMCID: PMC3444665.
- Sen GL, Blau HM. Argonaute 2/RISC resides in sites of mammalian mRNA decay known as cytoplasmic bodies. *Nat Cell Biol*. 2005 Jun;7(6):633-6. doi: 10.1038/ncb1265. Epub 2005 May 22. PMID: 15908945.
- Senften M, Dilworth S, Ballmer-Hofer K. Multimerization of polyomavirus middle-T antigen. *J Virol*. 1997 Sep;71(9):6990-5. doi: 10.1128/JVI.71.9.6990-6995.1997. PMID: 9261428; PMCID: PMC191984.
- Seo GJ, Fink LH, O'Hara B, Atwood WJ, Sullivan CS. Evolutionarily conserved function of a viral microRNA. *J Virol*. 2008 Oct;82(20):9823-8. doi: 10.1128/JVI.01144-08. Epub 2008 Aug 6. PMID: 18684810; PMCID: PMC2566259.
- Seo GJ, Chen CJ, Sullivan CS. Merkel cell polyomavirus encodes a microRNA with the ability to autoregulate viral gene expression. *Virology*. 2009 Jan 20;383(2):183-7. doi: 10.1016/j.virol.2008.11.001. Epub 2008 Nov 30. Erratum in: *Virology*. 2009 Nov 10;394(1):173. PMID: 19046593.
- Schelhaas M, Malmström J, Pelkmans L, Haugstetter J, Ellgaard L, Grünewald K, Helenius A. Simian Virus 40 depends on ER protein folding and quality control factors for entry into host cells. *Cell*. 2007 Nov 2;131(3):516-29. doi: 10.1016/j.cell.2007.09.038. PMID: 17981119.
- Schirle NT, MacRae IJ. The crystal structure of human Argonaute2. *Science*. 2012 May 25;336(6084):1037-40. doi: 10.1126/science.1221551. Epub 2012 Apr 26. PMID: 22539551; PMCID: PMC3521581.
- Schowalter RM, Pastrana DV, Buck CB. Glycosaminoglycans and sialylated glycans sequentially facilitate Merkel cell polyomavirus infectious entry. *PLoS Pathog*. 2011 Jul;7(7):e1002161. doi: 10.1371/journal.ppat.1002161. Epub 2011 Jul 28. PMID: 21829355; PMCID: PMC3145800.
- * Silver PA. How proteins enter the nucleus. *Cell*. 1991 Feb 8;64(3):489-97. doi: 10.1016/0092-8674(91)90233-o. PMID: 1991319.
- Soldatova I, Prilepskaja T, Abrahamyan L, Forstová J, Huérfano S. Interaction of the Mouse Polyomavirus Capsid Proteins with Importins Is Required for Efficient Import of Viral DNA into the Cell Nucleus. *Viruses*. 2018 Mar 31;10(4):165. doi: 10.3390/v10040165. PMID: 29614718; PMCID: PMC5923459.
- Sroller V, Hamšíková E, Ludvíková V, Vochozková P, Kojzarová M, Fraiberk M, Saláková M, Morávková A, Forstová J, Němečková S. Seroprevalence rates of BKPYV, JCPYV, and MCPyV polyomaviruses in the general Czech Republic population. *J Med Virol*. 2014 Sep;86(9):1560-8. doi: 10.1002/jmv.23841. Epub 2013 Nov 8. PMID: 24214630.
- * Stakaitytė G, Wood JJ, Knight LM, Abdul-Sada H, Adzahar NS, Nwogu N, Macdonald A, Whitehouse A. Merkel cell polyomavirus: molecular insights into the most recently discovered human tumour virus. *Cancers (Basel)*. 2014 Jun 27;6(3):1267-97. doi: 10.3390/cancers6031267. PMID: 24978434; PMCID: PMC4190541.
- Stern-Ginossar N, Elefant N, Zimmermann A, Wolf DG, Saleh N, Biton M, Horwitz E, Prokocimer Z, Prichard M, Hahn G, Goldman-Wohl D, Greenfield C, Yagel S, Hengel H, Altuvia Y, Margalit H, Mandelboim O. Host immune system gene targeting by a viral miRNA. *Science*. 2007 Jul 20;317(5836):376-81. doi: 10.1126/science.1140956. PMID: 17641203; PMCID: PMC4283197.

- Sullivan CS, Grundhoff AT, Tevethia S, Pipas JM, Ganem D. SV40-encoded microRNAs regulate viral gene expression and reduce susceptibility to cytotoxic T cells. *Nature*. 2005 Jun 2;435(7042):682-6. doi: 10.1038/nature03576. PMID: 15931223.
- Sullivan CS, Sung CK, Pack CD, Grundhoff A, Lukacher AE, Benjamin TL, Ganem D. Murine Polyomavirus encodes a microRNA that cleaves early RNA transcripts but is not essential for experimental infection. *Virology*. 2009 Apr 25;387(1):157-67. doi: 10.1016/j.virol.2009.02.017. Epub 2009 Mar 9. PMID: 19272626; PMCID: PMC2722155.
- Sundsford A, Johansen T, Flaegstad T, Moens U, Villand P, Subramani S, Traavik T. At least two types of control regions can be found among naturally occurring BK virus strains. *J Virol*. 1990 Aug;64(8):3864-71. doi: 10.1128/JVI.64.8.3864-3871.1990. PMID: 2164600; PMCID: PMC249682.
- Sung CK, Yim H, Andrews E, Benjamin TL. A mouse polyomavirus-encoded microRNA targets the cellular apoptosis pathway through Smad2 inhibition. *Virology*. 2014 Nov;468-470:57-62. doi: 10.1016/j.virol.2014.07.052. Epub 2014 Aug 20. PMID: 25146733; PMCID: PMC4253860.
- Suzuki T, Orba Y, Okada Y, Sunden Y, Kimura T, Tanaka S, Nagashima K, Hall WW, Sawa H. The human polyoma JC virus agnoprotein acts as a viroporin. *PLoS Pathog*. 2010 Mar 12;6(3):e1000801. doi: 10.1371/journal.ppat.1000801. PMID: 20300659; PMCID: PMC2837404.
- Suzuki T, Semba S, Sunden Y, Orba Y, Kobayashi S, Nagashima K, Kimura T, Hasegawa H, Sawa H. Role of JC virus agnoprotein in virion formation. *Microbiol Immunol*. 2012 Sep;56(9):639-46. doi: 10.1111/j.1348-0421.2012.00484.x. PMID: 22708997.
- * Svobodova E, Kubikova J, Svoboda P. Production of small RNAs by mammalian Dicer. *Pflugers Arch*. 2016 Jun;468(6):1089-102. doi: 10.1007/s00424-016-1817-6. Epub 2016 Apr 6. PMID: 27048428; PMCID: PMC4893058.
- Takahashi K, Sato Y, Sekizuka T, Kuroda M, Suzuki T, Hasegawa H, Katano H. High expression of JC polyomavirus-encoded microRNAs in progressive multifocal leukoencephalopathy tissues and its repressive role in virus replication. *PLoS Pathog*. 2020 Apr 23;16(4):e1008523. doi: 10.1371/journal.ppat.1008523. PMID: 32324824; PMCID: PMC7200015.
- Taylor DW, Ma E, Shigematsu H, Cianfrocco MA, Noland CL, Nagayama K, Nogales E, Doudna JA, Wang HW. Substrate-specific structural rearrangements of human Dicer. *Nat Struct Mol Biol*. 2013 Jun;20(6):662-70. doi: 10.1038/nsmb.2564. Epub 2013 Apr 28. PMID: 23624860; PMCID: PMC3676429.
- * Tello TL, Cogshall K, Yom SS, Yu SS. Merkel cell carcinoma: An update and review: Current and future therapy. *J Am Acad Dermatol*. 2018 Mar;78(3):445-454. doi: 10.1016/j.jaad.2017.12.004. Epub 2017 Dec 9. PMID: 29229573.
- Theiss JM, Günther T, Alawi M, Neumann F, Tessmer U, Fischer N, Grundhoff A. A Comprehensive Analysis of Replicating Merkel Cell Polyomavirus Genomes Delineates the Viral Transcription Program and Suggests a Role for mcv-miR-M1 in Episomal Persistence. *PLoS Pathog*. 2015 Jul 28;11(7):e1004974. doi: 10.1371/journal.ppat.1004974. PMID: 26218535; PMCID: PMC4517807.
- Tokorodani M, Ichikawa H, Yuasa K, Takahashi T, Hijikata T. SV40 microRNA miR-S1-3p Downregulates the Expression of T Antigens to Control Viral DNA Replication, and TNF α and IL-17F Expression. *Biol Pharm Bull*. 2020;43(11):1715-1728. doi: 10.1248/bpb.b20-00415. PMID: 33132317.
- * Topalis D, Andrei G, Snoeck R. The large tumor antigen: a "Swiss Army knife" protein possessing the functions required for the polyomavirus life cycle. *Antiviral Res*. 2013 Feb;97(2):122-36. doi: 10.1016/j.antiviral.2012.11.007. Epub 2012 Nov 28. PMID: 23201316.
- Tsai B, Gilbert JM, Stehle T, Lencer W, Benjamin TL, Rapoport TA. Gangliosides are receptors for murine polyoma virus and SV40. *EMBO J*. 2003 Sep 1;22(17):4346-55. doi: 10.1093/emboj/cdg439. PMID: 12941687; PMCID: PMC202381.
- VanLoock MS, Alexandrov A, Yu X, Cozzarelli NR, Egelman EH. SV40 large T antigen hexamer structure: domain organization and DNA-induced conformational changes. *Curr Biol*. 2002 Mar 19;12(6):472-6. doi: 10.1016/s0960-9822(02)00696-6. PMID: 11909532.
- * Vidigal JA, Ventura A. The biological functions of miRNAs: lessons from in vivo studies. *Trends Cell Biol*. 2015 Mar;25(3):137-47. doi: 10.1016/j.tcb.2014.11.004. Epub 2014 Dec 4. PMID: 25484347; PMCID: PMC4344861.
- Watanabe G, Howe A, Lee RJ, Albanese C, Shu IW, Karnezis AN, Zon L, Kyriakis J, Rundell K, Pestell RG. Induction of cyclin D1 by simian virus 40 small tumor antigen. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996 Nov 12;93(23):12861-6. doi: 10.1073/pnas.93.23.12861. PMID: 8917510; PMCID: PMC24011.
- Wilson RC, Tambe A, Kidwell MA, Noland CL, Schneider CP, Doudna JA. Dicer-TRBP complex formation ensures accurate mammalian microRNA biogenesis. *Mol Cell*. 2015 Feb 5;57(3):397-407. doi: 10.1016/j.molcel.2014.11.030. Epub 2014 Dec 31. PMID: 25557550; PMCID: PMC4320653.

- You X, Zhang Z, Fan J, Cui Z, Zhang XE. Functionally orthologous viral and cellular microRNAs studied by a novel dual-fluorescent reporter system. *PLoS One*. 2012;7(4):e36157. doi: 10.1371/journal.pone.0036157. Epub 2012 Apr 27. PMID: 22558366; PMCID: PMC3338597.
- Yi R, Qin Y, Macara IG, Cullen BR. Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes Dev*. 2003 Dec 15;17(24):3011-6. doi: 10.1101/gad.1158803. Epub 2003 Dec 17. PMID: 14681208; PMCID: PMC305252.
- Yu Y, Kudchodkar SB, Alwine JC. Effects of simian virus 40 large and small tumor antigens on mammalian target of rapamycin signaling: small tumor antigen mediates hypophosphorylation of eIF4E-binding protein 1 late in infection. *J Virol*. 2005 Jun;79(11):6882-9. doi: 10.1128/JVI.79.11.6882-6889.2005. PMID: 15890927; PMCID: PMC1112164.
- Zhang H, Kolb FA, Jaskiewicz L, Westhof E, Filipowicz W. Single processing center models for human Dicer and bacterial RNase III. *Cell*. 2004 Jul 9;118(1):57-68. doi: 10.1016/j.cell.2004.06.017. PMID: 15242644.
- Zhao L, Marciano AT, Rivet CR, Imperiale MJ. Caveolin- and clathrin-independent entry of BKPyV into primary human proximal tubule epithelial cells. *Virology*. 2016 May;492:66-72. doi: 10.1016/j.virol.2016.02.007. Epub 2016 Feb 19. PMID: 26901486; PMCID: PMC5051663.
- Zila V, Difato F, Klimova L, Huerfano S, Forstova J. Involvement of microtubular network and its motors in productive endocytic trafficking of mouse polyomavirus. *PLoS One*. 2014 May 8;9(5):e96922. doi: 10.1371/journal.pone.0096922. PMID: 24810588; PMCID: PMC4014599.
- Zou W, Vue GS, Assetta B, Manza H, Atwood WJ, Imperiale MJ. Control of Archetype BK Polyomavirus MicroRNA Expression. *J Virol*. 2020 Dec 22;95(2):e01589-20. doi: 10.1128/JVI.01589-20. PMID: 33115878; PMCID: PMC7944457.