

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Biologie



Alexey Lovtsov

Interakce malých DNA virů a jaderných tělísek PML
Interplay between small DNA viruses and the PML Nuclear Bodies

Bakalářská práce

Vedoucí práce: Sandra Huérfano-Meneses, M.Sc., Ph.D.

Konzultant: doc. RNDr. Jitka Forstová, CSc.

Praha, 2022

Prohlášení:

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

V Praze, 5. 5. 2022

Alexey Lovtsov

.....

Poděkování:

Děkuji Sandře Huérfano-Meneses, M.Sc., Ph.D. a doc. RNDr. Jitce Forstové, CSc za pomoc, cenné rad, připomínky a trpělivost při zpracování bakalářské práce.

Abstrakt

Tato práce se zaměřuje na mnohostranné interakce mezi malými DNA viry a PML NBs. PML NBs jsou bezmembránová jaderná tělíska, jejichž trvalou nebo přechodnou součástí je více než 170 proteinů. Mezi ty trvalé patří např. proteiny PML, Daxx a Sp100. Podstatnou vlastností mnoha proteinů PML NBs je to, že podléhají SUMOylaci. Kromě funkcí v regulaci apoptózy a genové exprese, remodulaci chromatinu a odpovědích na poškození DNA se tyto struktury podílejí i na antivirové obraně buňky. Viry naopak vyvíjely různé strategie, jak mařit restriční působení PML NBs, nebo dokonce, jak zneužívat některé jejich složky pro posílení infekce. Je pravděpodobně, že PML NBs mají v určitých případech významnou roli ve virové infekci, ale modely takových procesů jsou zatím neúplně vyřešené a v některých kontextech kontroverzní. Některé proteiny adenovirů interagují se složkami PML NBs, aby zabránily negativním dopadům PML NBs na transkripci a replikaci. Naopak genomy papilomavirů se zdají být chráněny PML NBs před degradací po vstupu do jádra a během transkripce. U polyomavirů byly publikovány obě funkce, jak podpora, tak naopak restrikce infekce. U Viru anemie kuřat vedla interakce virového apoptinu a PML k indukci apoptózy, ale výsledky byly v jiné práci zpochybněny. U pacientů s chronickou hepatitidou bylo zjištěno že během radioterapie, blízkost PML a genomů Viru hepatitidy B podporuje reaktivaci viru uvolněním histon deacetylázy 1.

Klíčová slova: jaderná tělíska PML, SUMOylace, Daxx, Sp100, malé DNA viry, restriční faktor

Abstract

This work focuses on interactions between small DNA viruses and PML NBs. PML NBs are membrane-free nuclear bodies that contain, permanently or transiently, more than 170 proteins. The permanent ones include, e.g., the PML, Daxx, and Sp100 proteins. Many PML NB proteins are subjected to SUMOylation. In addition to functions in regulating apoptosis and gene expression, chromatin remodelling, and DNA damage responses, they are also involved in antiviral cell defence. On the other hand, viruses have developed strategies to thwart the restrictive effects of PML NBs, or even to misuse some of their components to support the infection. Apparently, PML NBs play a significant role in some viral infections, but models of such processes are still incomplete and sometimes controversial. Some adenovirus proteins interact with PML NB components to prevent the negative effects of PML NBs on transcription and replication. In contrast, papillomavirus genomes can be protected by PML NBs from degradation upon entry into the nucleus and during transcription. For polyomaviruses, both promoting and restriction functions have been published. In Chicken anaemia virus infection, the interaction of the viral apoptin and PML led to the induction of cell apoptosis, but the results were questioned. In patients with chronic hepatitis, during radiotherapy, the proximity of PML and Hepatitis B virus genomes has been found to promote virus reactivation.

Keywords: PML nuclear bodies, SUMOylation, Daxx, Sp100, small DNA viruses, restriction factor

Seznam použitých zkratk

3D-CRT	three-dimensional conformal radiation therapy	trojrozměrní konformní radioterapie
Ad	adenovirus	adenovirový
Ala, A	alanine	alanin
ALT	alternative lengthening of telomeres	alternativní prodloužení telomer
APBs	ALT-associated PML nuclear Bodies	ALT-asociované PML tělíska
APC/C	anaphase-promoting complex (cyclosome)	anafázi podporující komplex/ cyklozom
APC1	anaphase-promoting complex subunit 1	podjednotka 1 anafázi podporujícího komplexu
APL	acute promyelocitic leukemia	akutní promyelocytární leukémie
Arg, R	arginine	arginin
ASK1	apoptosis signal-regulating kinase 1	kináza 1 regulována apoptickými signály
ATP	adenosine triphosphate	adenosintrifosfát
ATRX	α -thalassemia/mental retardation syndrome X-linked protein	protein „alpha thalassemia/mental retardation syndrome X-linked“
B1	B1-box	B1-box
B2	B2-box	B2-box
BKPyV	BK polyomavirus	BK polyomavirus
BLM	Bloom syndrome protein	protein Bloomova syndromu
BPV	bovine papillomavirus	bovinní papilomavirus
BRCA1	breast cancer protein 1	protein náchylnosti k rakovině prsu typu 1
CAV	Chicken anemia virus	Virus anemie kuřat
CBP	CREB-binding protein	CREB-vázající protein
CC	coiled-coil	„coiled-coil“
cccDNA	covalently closed circular DNA	kovalentně uzavřená kruhová DNA
CD	chromo domain	chromo doména
Cdk2	cyclin-dependent kinase 2	cyklin-dependentní kináza 2
CIITA	class II transactivator	„class II transactivator“
CoREST	REST corepressor 1	REST korepresor 1
CSD	C-terminal chromoshadow domain	C-koncová chromo-stinná doména
Cul5	cullin5	cullin5
CyNPs	cytoplasmic assemblies of PML and Nucleoporins	cytoplazmatické akumulace PML a nukleoporinů
Cys, C	cysteine	cystein
DAPI	4',6-diamidin-2-fenylindol	4',6-diamidin-2-fenylindol
Daxx	death-domain associated protein	protein asociovaný s doménou smrti
D-box	destruction-box	box destrukce
DDR	DNA damage response	odpověď na poškození DNA
DNA	deoxyribonucleic acid	deoxyribonukleová kyselina
Dnmt1	DNA methyltransferase 1	DNA methyl transferáza 1
DSB	DNA double-strand break	dvouřetězcové DNA zlomy
dsDNA	double-stranded DNA	dvouřetězcová DNA
E	early	časný

EED	polycomb protein EED	„polycomb“ protein EED
EpCAM	epithelial cell adhesion molecule	adhezivní molekula epiteliálních buněk
EZH2	histone methyltransferase EZH2	histon methyl transferáza EZH2
FAS	Fas receptor	receptor Fas
FG	phenylalanine-glycine (FG) repeats	fenylalanin-glycinové repetice
Gaf	γ -activated sequence	IFN γ aktivační místo
Gas	γ -activated factor	γ -aktivovaný faktor
Gln, Q	glutamine	glutamin
Gly, G	glycine	glycin
H	histone	histon
HaCaT	immortal keratinocyte	imortalizované keratinocyty
HAdV	human adenovirus V	lidský adenovirus V
HATs	histone acetyltransferases	histon acetylázy
HBcAg	Hepatitis B core antigen	strukturní protein HBV
HBcAg	Hepatitis B envelope antigen	nestrukturní sekretovaný protein HBV
HBsAg	Hepatitis B surface antigen	povrchový protein HBV
HBV	Hepatitis B virus	Virus hepatitidy B
HBx	hepatitis B viral protein X	protein X HBV
HCC	hepatocellular carcinoma	hepatocelulární karcinom
HDAC	histone deacetylase	histon deacetyláza
HDAC I	histone deacetylase I	histon deacetyláza I
HDAC II	histone deacetylase II	histon deacetyláza II
HeLa	immortal human epithelial HeLa cells	nesmrtelné lidské epiteliální HeLa buňky
HFK	immortalized human foreskin keratinocytes	imortalizované lidské keratinocyty z předkožky
His, H	histidine	histidin
HOTAIR	HOX transcript antisense RNA	„HOX transcript antisense“ RNA
HP1	heterochromatin protein 1	heterochromatinový protein 1
HPV18	human papillomavirus 18	lidský papilomavirus 18
HPV33	human papillomavirus 33	lidský papilomavirus 33
HPVs	human papillomaviruses	lidské papilomaviry
HR	high risk	vysoce rizikový
hTRF1	human telomeric repeat-binding factor 1	lidský faktor 1 vzájemící telomerové repetice
hTRF2	human telomeric repeat-binding factor 1	lidský faktor 2 vzájemící telomerové repetice
CHB	chronic hepatitis B infection	chronická HBV Infekce
Chk2	checkpoint kinase 2	checkpoint kináza 2
CRM1	exportin 1	exportin 1
IDH4	conditionally immortalized cell line IDH4	podmíněně imortalizovaná buněčná linie IDH4
I	intermediate	střední
IFN $\alpha/\beta/\gamma$	interferon $\alpha/\beta/\gamma$	interferon $\alpha/\beta/\gamma$
IFNAR-1	IFN α receptor subunit 1	podjednotka 1 IFN α receptoru
IFNAR-2	IFN α receptor subunit 2	podjednotka 2 IFN α receptoru

IFNGR-1	IFN γ receptor subunit 1	podjednotka 1 IFN γ receptoru
IFNGR-2	IFN γ receptor subunit 2	podjednotka 2 IFN γ receptoru
Ile, I isoleucin	isoleucine	isoleucin
INBC	JAK kinase inhibitor INBC	inhibitor JAK kinázy INBC
IR	ionizing radiation	ionizující záření
ISGF3	interferon-stimulated gene factor 3	IFN stimulovaný genový faktor 3
ISGs	interferon-stimulated genes	geny stimulované IFN
ISRE	interferon-stimulated response element	citlivý na IFN element odezvy
JAK	Janus kinase	Janus kináza
JNK	c-Jun N-terminal kinases	„c-Jun N-terminal kinase“
JCPyV	JC polyomavirus	JC polyomavirus
kbp	kilobase pairs	kilopárů bází
KPBN1	karyopherin subunit β 1	podjednotka karyoferinu β 1
L	late	pozdní
L1/2	late protein 1/2	pozdní protein 1,2
Leu, L	leucine	leucin
LLPS	liquid–liquid phase separation	model fázové separace „liquid–liquid“
lncRNA	long non-coding RNA	dlouhá nekódující RNA
LRS	leucine rich sequence	bohatý na leucin úsek
LSD1	lysine demethylase 1	lysin demethyláza 1
LT-ag	large T antigene	velký T antigen
Lys, K	lysine	lysin
MAP2K	mitogen-activated protein kinase	mitogeny aktivována kináza protein kinázy
MAPPs	mitotic accumulation of PML protein	mitotická akumulace PML proteinu
MCPyV	Merkel cell polyomavirus	polyomavirus Merkelových buněk
Mdm2	mouse double minute 2 homolog	„mouse double minute 2 homolog“
Me	methylation	metylace
MEF	mouse embryonic fibroblast	myší embryonální fibroblasty
MHC II	major histocompatibility complex class II	hlavní histokompatibilní komplex třídy II
Mre11	meiotic recombination 11 protein	protein meiotické rekombinace
MRN	komplex Mre11-Rad50-Nbs1	komplex Mre11-Rad50-Nbs1
mRNA	messenger RNA	informační RNA
MPyV	murine polyomavirus	myší polyomavirus
Nbs1	Nijmegen breakage syndrome 1 protein	protein 1 „Nijmegen breakage syndrome“
ND10 (též PML NBs)	nuclear domain 10	jaderná doména 10
NES	nuclear export signal	jaderný exportní signál
NLS	nuclear localization sequence	jaderný lokalizační signál
NUPs	nucleoporins	nukleoporiny
ORF	open reading frame	otevřený čtecí rámec
p53	p53 protein	protein 53

PBC	primary biliary cholangitis	primární biliární cholangitida
pgRNA	pregenomic RNA	pregenomová RNA
Phe, f	phenylalanine	fenylalanin
PIAS3	kinase PIAS3	kináza PIAS3
Plk1	„polo-like“ kinase 1	„polo-like“ kináza 1
PML	promyelocytic leukemia protein	protein promyelocytární leukémie
PML NBs	PML nuclear bodies	jaderná tělíska PML
Pol	polymerase	polymeráza
PRC2	polycomb repressive komplex 2	„polycomb“ represivní komplex 2
PyVs	polyomaviruses	polyomaviry
Rad50	DNA repair protein Rad50	DNA reparační protein Rad50
Rad51	DNA repair protein Rad51	DNA reparační protein Rad51
RAR α	retinoic acid receptor α	receptor pro retinovou kyselinu α
RBCC	RING-B box-Coiled Coil	RING-B box-Coiled Coil
Rbx1	RING-box protein 1	RING-box protein 1
rcDNA	relaxed circular DNA	relaxovaná kruhová DNA
RCs	replication centres	replikační centra
RING	really interesting new gene	velmi zajímavý nový gen
RNA	ribonucleic acid	ribonukleová kyselina
RNF4	RING-finger protein 4	RING-finger protein 4
ROS	reactive oxygen species	reaktivní formy kyslíku
RT	reverse transkription	reversní transkripce
S	Svedberg unit	Svedbergova jednotka
S100A10	S100 calcium-binding protein A10	S100 vápník vázající protein A10
SAE1	SUMO E1 activating enzyme subunit 1	podjednotka 1 SUMO aktivujícího enzymu E1
SAE2	SUMO E1 activating enzyme subunit 1	podjednotka 2 SUMO aktivujícího enzymu E1
SAND	Sp100, AIRE-1, NucP41/75, DEAF-1	Sp100, AIRE-1, NucP41/75, DEAF-1
SBV (též SIM)	SUMO-binding domain	SUMO-vázající motiv
SCE	sister chromatid exchange	výměna sesterských chromatid
SD1	subdomain 1	subdoména 1
SD2	subdomain 2	subdoména 2
SENPs	sentrin-specific proteases	sentrin – specifické proteázy
Ser, S	serine	serin
SIM	SUMO-interagující motiv	SUMO-vázající motiv
siRNA	small interfering RNA	malé interferující RNA
Smc5/6	structural maintenance of chromosomes protein 5/6	protein udržování struktury chromozomů 5/6
Sp100	speckled protein 100 kilodaltons	„speckled“ protein o velikosti 100 kilodaltonů
Sp100A	speckled protein 100 kilodaltons isoform A	„speckled“ protein o velikosti 100 kilodaltonů izoforma A

Sp100C	speckled protein 100 kilodaltons isoform C	„speckled“ protein o velikosti 100 kilodaltonů izoforma C
Sp100HMG	speckled protein 100 kilodaltons isoform HMG	„speckled“ protein o velikosti 100 kilodaltonů izoforma HMG
Sp110	speckled protein 110 kilodaltons	„speckled“ protein o velikosti 110 kilodaltonů
ST2	STAT2 homodimer	STAT2 homodimer
STAT	signal transducer and activator of transcription protein	proteinová rodina signálních transduktorů a aktivátorů transkripce
STUbL	SUMO targeted ubiquitin ligase	SUMO cílená ubikvitin E3 ligáza
SUMO	small ubiquitin-like modifier	malý modifikátor podobný ubikvitinu
SUZ12	polycomb protein SUZ12	„polycomb“ protein SUZ12
SV40	simian virus 40	opičí virus 40
T-ag	T antigen	T antigen
TopBP1	DNA topoisomerase 2- binding protein 1	protein 1 vázající DNA topoizomerázu 2
TRIM	tripartite motif-containing family	proteinová rodina s tripartitním motivem
TRIM19 (též PML)	TRIM19 protein	TRIM19 protein
Trp, W	tryptophan	tryptofan
TYK2	tyrosine kinase 2	tyrosin kináza 2
Ub	ubiquitin	ubikvitin
Ubc9	SUMO E2 conjugating enzyme Ubc9	SUMO E2 konjugační enzym Ubc9
Val, V	valine	valin
VP1/2/3	viral protein 1/2/3	virový protein 1/2/3
ZNF198	zing finger protein 198	„zing finger“ protein
γH2AX	phosphorylated H2AX	fosforylovaný H2AX

Obsah

1 Úvod	1
2 Struktura a fyziologické funkce PML NBs	2
2.1 PML protein	3
2.2 Sp100 protein	6
2.3 Daxx protein.....	7
2.4 Formování PML NBs	8
2.5 Přehled funkcí PML NBs	11
2.5.1 PML NBs jsou asociované s chromatinem pro regulaci transkripce.....	11
2.5.2 Dynamika PML NBs během buněčného cyklu	11
2.5.3 PML NBs a interferonová signalizace.....	12
2.5.4 Některé další funkce PML NBs: alternativní prodloužení telomer, odpověď na poškození DNA, apoptóza.....	14
3 Interakce PML NBs a malých DNA virů	15
3.1 Adenoviry a jejich interakce s PML NBs.....	15
3.2 Papilomaviry a jejich interakce s PML NBs	18
3.3 Polyomaviry a jejich interakce s PML NBs	21
3.4 Anelloviry: Virus anemie kuřat (CAV) a jeho interakce s PML NBs.....	24
3.5 Virus hepatitidy B (HBV) a jeho interakce s PML NBs	24
4 Závěr	29
5 Literatura	31

1 Úvod

Jaderná tělíska představují oddělené struktury v jádře buňky a v posledních desetiletích tyto útvary jsou hodně zkoumané. Na rozdíl od cytozolických kompartmentů, jaderná tělíska nemají membrány, což ukazuje na odlišnost jejich biogeneze. V dnešní době byla identifikována jaderná tělíska, která mají různou morfologii a funkci. Mohou se například podílet na editaci RNA, udržování stability genomu, odpovědi na stres, nebo obraně proti virům. Jaderná tělíska jsou důležitá z toho důvodu, že rozdělují jádro na odlišná prostředí, což usnadňuje průběh různých biologických reakcí. Mezi obecně známá jaderná tělíska patří například jadérko, tělíska „Polycomb“, Cajalova tělíska a klastozomy (shrnutí v Mao et al., 2011).

Dalším druhem jaderných tělísek jsou PML NBs (jaderná tělíska promyelocytární leukémie). Počet a morfologie těchto struktur jsou závislé na typu buněk, fázi buněčného cyklu a na dalších stimulech jako například probíhající virová infekce (shrnutí v Patra & Müller, 2021). Součástí PML NBs je více než 170 proteinů, které jsou asociované s různými funkcemi v buňce jako například regulace organizace chromatinu (shrnutí v Corpet et al., 2020). Podstatnou vlastností PML NBs je i to, že souvisí s interferonovou signalizací. Mezi další fyziologické funkce těchto jaderných tělísek patří například regulace apoptózy a genové exprese, PML NBs souvisí také s odpovědí na poškození DNA (shrnutí v Patra & Müller, 2021).

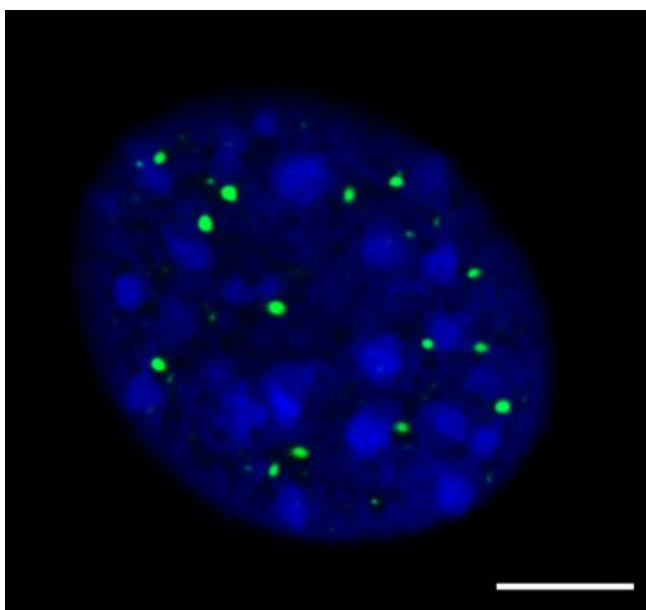
Tyto dynamické struktury jsou známy i v kontextu virových infekcí. Souhra PML NBs s viry může být velmi komplexní a mnohostrannou. Zaprvé, tyto útvary fungují jako restriční faktory vůči některým virům. Zadruhé, určité patogeny dokážou zneužívat různé komponenty PML NBs pro podporu infekce (shrnutí v Patra & Müller, 2021). V této bakalářské práci budou postupně popsány interakce malých DNA virů s PML NBs.

Cílem této bakalářské práce je:

- **Popsat strukturu a vlastnosti nejvýznamnějších komponent PML NBs, diskutovat model formování těchto jaderných tělísek a uvést jejich základní fyziologické funkce**
- **Shrnutí výsledky, které se týkají interakcí mezi PML NBs a malými DNA viry (*Adenoviridae*, *Papillomaviridae*, *Polyomaviridae*, a zástupci čeledi *Anelloviridae*, *Virus anemie kuřat*, a *Hepadnaviridae*, *Virus hepatitidy B*)**

2 Struktura a fyziologické funkce PML NBs

PML NBs vypadají jako sférické tečkovité útvary s průměrem přibližně 0,1-1 μm . Tyto struktury byly nalezeny ve většině jader savčích buněk a jejich počet se může měnit v závislosti na různých podmínkách, kterými jsou například fáze buněčného cyklu nebo fyziologický stav. Typicky je jich kolem 5-30 kopií na buňku a jsou to oddělené útvary bez lipidické membrány rozptýlené uvnitř buněčného jádra. Morfologie a jaderná lokalizace PML NBs jsou ukázané na **obrázku 1**. Chtěl bych zmínit i to, že v některé literatuře autoři místo názvu PML NBs používají taky ND10 (jaderná doména 10). Hlavní stavební část PML tělísek, protein PML (protein promyelocytární leukémie), se nachází v jejich periferní části a spolu s ním je lokalizován Sp100 („speckled“ protein o velikosti 100 kilodaltonů). Jak napovídá název, PML je esenciální součástí PML NBs, ale zajímavým faktem je to, že lokalizace právě Sp100 v těchto jaderných útvarech byla popsána jako první. Vnitřní část těchto struktur se skládá z různých klientských proteinů, kterých již bylo identifikováno kolem 170. V **tabulce 1** jsou uvedeny některé komponenty PML NBs relevantní pro tuto práci. Tyto komponenty jsou složkami PML NBs buď konstitutivně nebo přechodově. Mezi trvalé součásti těchto jaderných tělísek, kromě PML a Sp100, patří taky například Daxx (protein asociovaný s doménou smrti) (shrnutí v Corpet et al., 2020).



Obrázek 1: Morfologie a jaderná lokalizace PML NBs. Optický řez myším embryonálním fibroblastem (MEF), konfokální mikroskopií. Zelená barva odpovídá protilátkám proti PML proteinu a modrá barva odpovídá barvení DAPI (4',6-diamidin-2-fenylindol), který se váže na DNA. Měřítka je 10 μm . Převzato z (Forstova J., nepublikováno).

Fyziologické funkce PML NBs jsou velmi rozmanité: regulace apoptózy, genové exprese a buněčného cyklu. Tyto struktury taky souvisí s odpovědí na poškození DNA a antivirovou obranou buňky (shrnutí v Patra & Müller, 2021). Kromě toho PML NBs mají význam v regulaci dynamiky chromatinu a procesu, který je pojmenován jako alternativní prodloužení telomer (ALT) (shrnutí v Corpet et al., 2020).

V této kapitole budou popsány strukturní a interakční vlastnosti některých nejvýznamnějších komponent PML NBs, budou zmíněny jejich fyziologické funkce a bude diskutován model formování těchto jaderných tělísek.

Protein	Funkce	Reference
PML	Hlavní strukturální část PML NBs, asociován s regulací transkripce (například při interferonové signalizaci), tumor supresorový protein	(shrnutí v Chang et al., 2018), (Chen et al., 2015), (el Bougrini et al., 2011), (Ulbricht et al., 2012)
Sp100	Asociován s regulací transkripce	(shrnutí v Collados Rodríguez, 2020)
HP1	Heterochromatinový protein, který je asociován s dynamikou chromatinu	(shrnutí v Collados Rodríguez, 2020)
Daxx	Asociován s regulací transkripce, má role během Fas – zprostředkované apoptózy a odpovědi na glukózou deprivaci, chaperon H3.3	(shrnutí v Mahmud & Liao, 2019), (Yang et al., 1997), (Hollenbach et al., 2002), (Puto & Reed, 2008), (Kuo et al., 2005), (Lewis et al., 2010)
ATRX	Chaperon H3.3	(Lewis et al., 2010), (shrnutí v Corpet et al., 2020)
CBP	Asociován s regulací transkripce	(shrnutí v Corpet et al., 2020)
H3.3	Je histonovou variantou, která je nalezena jak v euchromatinových, tak i v heterochromatinových oblastech	(shrnutí v Corpet et al., 2020), (Lewis et al., 2010)
BLM	DNA – stimulována ATPáza a ATP-dependentní DNA helikáza	(Karow et al., 1997)
Rad51, Rad50, Mre11, Nbs1, TopBP1	Asociované s udržováním stability genomu a s odpovědí na DNA poškození	(shrnutí v Chang et al., 2018)
p53	Asociován s regulací apoptózy	(shrnutí v Chang et al., 2018)
SUZ12, ZNF198	Jsou součástí represivních komplexů remodelace chromatinu	(shrnutí v Andrisani, 2013)
Smc5/6	Asociován s udržováním stability genomu a s DNA reparací	(shrnutí v Aragón, 2018)
Sp110	Asociován s regulací genové exprese	(Bloch et al., 2000)

Tabulka 1: Seznam vybraných komponent PML NBs a jejich funkcí.

2.1 PML protein

PML je znám již dlouhou dobu, a to z toho důvodu, že byl studován v souvislosti s výskytem onemocnění APL (akutní promyelocytární leukémie). Reciproká chromozomální translokace t(15,17) vede ke vzniku fúzní mRNA kódující mutantní protein složený z PML a RAR α (receptor pro retinovou kyselinu α). Za normálních okolností tyto proteiny jsou od sebe oddělené, ale v důsledku chromozomální mutace N-domény RAR α je substituována proteinem PML. Takto vzniklý produkt má odlišné transkripční vlastnosti od proteinu RAR α , který v normálním kontextu funguje jako transkripční aktivátor nutný k diferenciaci bílých buněk krve (de Thé et al., 1991). Onkogenní potenciál proteinu PML-RAR α byl testován s využitím retrovirového vektoru na hematopoetických progenitorových buňkách slepice *in vitro* a byla prokázána jeho schopnost transformovat tyto buňky (Altabef et al., 1996). Stejně tento onkogenní potenciál byl studován i na transgenní myši (Grisolano et al., 1997).

Protein PML existuje v několika izoformách, jejichž vznik je dán alternativním sestřihem primárního transkriptu genu pro protein PML, který obsahuje 9 exonů. PML patří do proteinové rodiny s tripartitním motivem (TRIM) a v souvislosti s tím dostal taky i jiný název TRIM19. V některé literatuře se TRIM ještě nazývá RBCC, což ukazuje na konzervované N-koncové části tohoto motivu: **RING-B box-Coiled Coil** (shrnutí v Corpet et al., 2020). V této práci nadále bude používána zkratka RBCC. „RING (velmi zajímavý nový gen) finger“ motiv, který má také název C3HC4 motiv, byl popsán například ve studii (Haupt et al., 1991), kde bylo zjištěno, že nepatří do doposud známých motivů zinkových prstů (zinc fingers). Jeho aminokyselinová sekvence obsahuje 7 cysteinů (Cys, C) a 1 histidin (His, H) na určitých

pozicích, mezi kterými mohou být různé aminokyselinové zbytky. Těchto 8 aminokyselinových zbytků (7 cysteinů, 1 histidin) má potenciál koordinovat 2 kovové ionty (Haupt et al., 1991). Sekvenční analýza genu pro PML protein ukázala, že PML právě obsahuje takový motiv a ještě další úseky bohaté na Cys/His (de Thé et al., 1991; Kastner et al., 1992). Tyto zmíněné úseky jsou právě B boxy charakteristické pro proteiny RBCC rodiny. PML má zároveň 2 takové motivy, které se nazývají B1 a B2 box. Další konzervovanou částí proteinů RBCC rodiny je α -helikální „coiled-coil“ doména a PML ji má hned po B2 boxu (shrnuto v Corpet et al., 2020).

Studie (Kastner et al., 1992) uvádí, že protein PML obsahuje jaderný lokalizační signál (NLS). Jiná studie (Le et al., 1996) prokázala, že delece oblasti, která obsahuje NLS, vede k cytoplazmatické a často i k perinukleární lokalizaci proteinu PML. Pro formování PML NBs tato sekvence je esenciální (Le et al., 1996).

Další charakteristikou PML je to, že na něj je kovalentně připojen SUMO-1 (malý modifikátor podobný ubikvitinu) (Müller et al., 1998). SUMOylovaný protein PML je nalezen pouze v PML NBs, kdyžto se nemodifikovaný protein PML nachází v solubilní nukleoplazmě (Müller et al., 1998). Výzkum Sternsdorfa a spolupracovníků (Sternsdorf et al., 1997) demonstroval, že nejen protein PML, ale i Sp100 je kovalentně modifikován SUMO-1. Autoři taky pozorovali absenci detekovatelných SUMO-1 ve většině PML agregátů během mitózy (Sternsdorf et al., 1997). Toto zjištění bylo podporováno i v jiné studii (Everett et al., 1999). PML i Sp100 jsou konjugované se SUMO-1 v interfázi, ale během mitózy dochází k jejich de-konjugaci. Taky tyto proteiny se nacházejí spolu v PML NBs v interfázních buňkách, naopak během mitózy dochází k jejich separaci. Takže, biochemické změny a intracelulární lokalizace proteinů PML a Sp100 jsou regulované buněčným cyklem. Takové zjištění navrhuje model ovlivnění morfologie a struktury PML NBs tímto procesem (Everett et al., 1999).

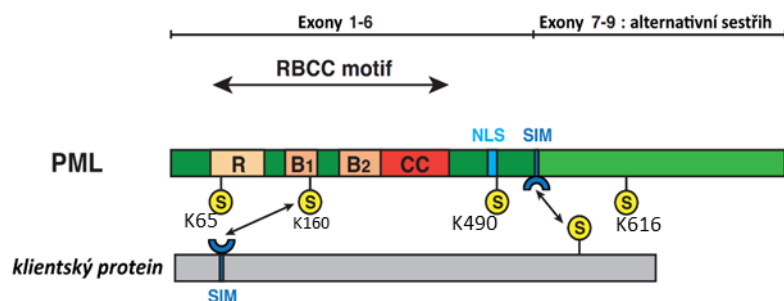
Jako akceptory SUMO-1 fungují určité lysinové (Lys, K) zbytky PML. Konkrétně se jedná o Lys65, Lys160, and Lys490 PML proteinu. První místo SUMOylace (Lys65) je lokalizováno v „RING finger“ doméně a bylo navrženo, že tato doména je důležitá pro regulaci SUMOylace na jiné pozici, která se nachází v B1 boxu (Lys160). Třetím místem SUMOylace je Lys490. Je nutné zmínit, že PML s odstraněným NLS nemůže být SUMOylován (Kamitani, Kito, et al., 1998). Navíc protein PML taky může být konjugován s jinými izoformami SUMO jako SUMO-2 a SUMO-3 (Kamitani, Nguyen, et al., 1998).

Protein PML obsahuje SIM (SUMO-interagující motiv) který je taky pojmenován jako SBV (SUMO-vážící motiv), a ten je nezávislý na místech SUMOylace a je důležitý pro formování PML NBs (Shen et al., 2006). SIM je aminokyselinová sekvence, která interaguje se SUMO (Song et al., 2004). Konsenzus sekvence VVVI (Valiv, Val; Isoleucin, Ile) proteinu PML je vyžadována pro vazbu SUMO a přímo s ním interaguje (Shen et al., 2006). Kromě toho PML je taky fosfoprotein, který je modifikován serin/threonin kinázami (Chang et al., 1995).

Výše již bylo zmíněno, že existuje několik izoform PML. Jensen a spolupracovníci (Jensen et al., 2001) rozdělili tyto izoformy do 7 skupin, které byly pojmenované jako PML I-VII. Všechny tyto

izoformy vznikají alternativním sestřihem transkriptu genu pro protein PML, který obsahuje 9 exonů. Jsou odlišné ve svých C-koncových oblastech, ale vždy obsahují N-koncovou doménu s RBCC motivem. Nejdelší izoforma je PML I, naopak nejkratší je izoforma PML VII, která neobsahuje NLS a je cytoplazmatická (Jensen et al., 2001).

Všechny výše popsané strukturní vlastnosti PML jsou schematicky znázorněné na **obrázku 2**.

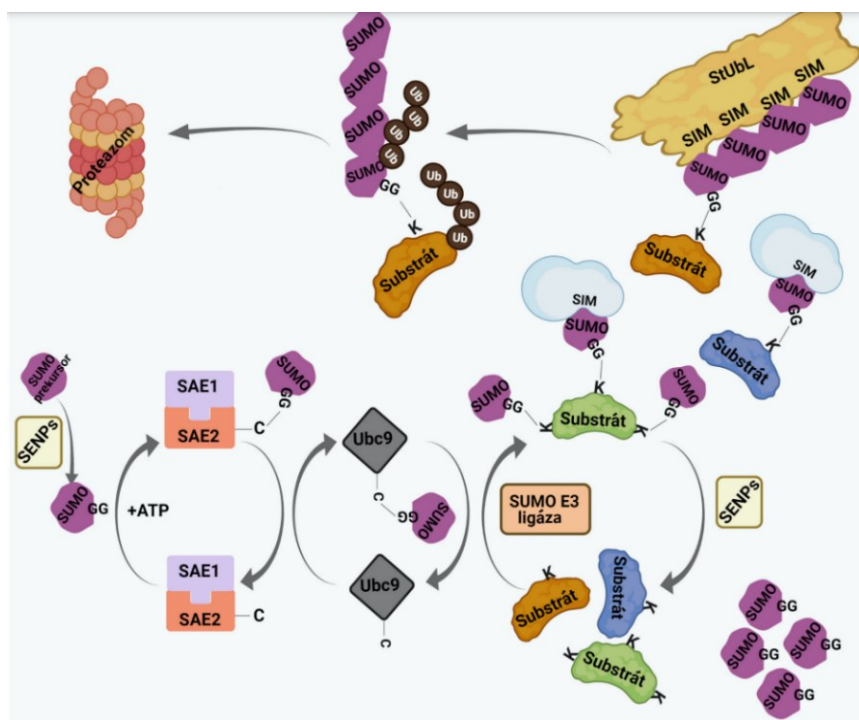


Obrázek 2: Schematické znázornění struktury proteinu PML. Tento protein obsahuje RBCC motiv, který se skládá s několika domén: „RING finger“ (R), dva B boxy (B1, B2) a „coiled-coil“ (CC). Na obrázku je znázorněn příklad jaderné izoformy PML, která má NLS. Hlavními SUMOylačními pozicemi na PML jsou K65, K160 a K490, ale kromě ně byly

taky identifikované i další jako třeba K616, což je taky znázorněno na obrázku. Kromě toho tento protein má SIM a na obrázku je vidět, jak PML interaguje s klientským proteinem pomocí SUMO-SIM interakcí. Převzato a upraveno z (Corpet et al., 2020).

Již bylo zmíněno, že PML podléhá SUMOylaci. Pro pochopení problematiky této bakalářské práce je nezbytné si přiblížit tento proces v detailech. Schematický průběh SUMOylace je znázorněn na **obrázku 3**.

Obrázek 3: Schéma procesu SUMOylace. SUMO je syntetizován jako prekursor a pro jeho aktivaci je potřebné proteolytické štěpení C – koncové části (Kamitani et al., 1997). Provádějí to enzymy, které se nazývají SENPs (sentrin – specifické proteázy). Zde je potřeba zmínit, že SUMO má taky jiný název sentrin. Výsledkem této reakce je to, že dochází k expozici koncového GG (glycin, G) motivu. Dalšího kroku aktivace SUMO se zúčastní SUMO aktivující enzym E1, kterým je u lidí dimer SAE1/SAE2 (dvě podjednotky SUMO aktivujícího enzymu). Tato reakce vyžaduje hydrolyzu ATP (adenosintrifosfát) a při ní dochází ke tvorbě kovalentní vazby mezi C-koncem SUMO a Cys SAE2. Poté je SUMO přenesen na SUMO E2 konjugační enzym, kterým u lidí je Ubc9 (SUMO-konjugační enzym Ubc9). Zde zase vzniká spojení SUMO s Cys Ubc9 prostřednictvím thioesterové vazby. Posledním krokem SUMOylace je přenos SUMO na ε-amino skupinu Lys (K) cílového proteinu. Tohoto procesu se zúčastní SUMO E3 ligáza. Proteiny mohou být SUMOylovány jak na jednom, tak i zároveň na několika místech. Kromě toho může dojít i k polySUMOylaci na stejném lysinovém zbytku. SUMOylace je reversibilní proces a deSUMOylaci provádějí SENPs proteiny (shrnuto v Patra & Müller, 2021). V případě PML jeho N-koncová oblast, RING finger doména, je esenciální pro interakci s Ubc9 proteinem (Duprez et al., 1999). Bylo taky ukázáno, že PML pravděpodobně má vnitřní SUMO E3 ligáční aktivitu a takto může katalyzovat vlastní SUMOylaci (Shen et al., 2006). SUMOylované proteiny dále mohou interagovat s proteiny se SIM motivem a polySUMOylované proteiny mohou interagovat s enzymem StUbl (SUMO cílená ubikvitin E3 ligáza), který má hodně SIM. Tato E3 ubikvitin ligáza zprostředkovává ubikvitinaci (Ub) proteinů, což může vést k jejich degradaci v proteozomu (shrnuto v Patra & Müller, 2021). Převzato a upraveno z (Patra & Müller, 2021).



2.2 Sp100 protein

Sp100 je kyselý protein, který byl poprvé popsán jako autoantigen s využitím autoprotilátek z pacientů trpících PBC (primární biliární cholangitida / dříve též jako primární biliární cirhóza) (Szosteki et al., 1987). Jak již jsem zmínil dříve, Sp100 stejně jako PML je kovalentně modifikován SUMOylací (Sternsdorf et al., 1997). Protein Sp100 má několik domén. N-koncová oblast má význam pro protein-proteinové interakce a C-koncová oblast interaguje s DNA a histony. Je důležité zmínit, že Sp100 může přímo vázat DNA (shrnuto v Collados Rodríguez, 2020). Teď bych chtěl přiblížit strukturu tohoto proteinu detailněji. Ve studii (Sternsdorf et al., 1999) bylo popsáno, že Sp100 má NLS, který je esenciální pro jeho transport do jádra a pro jeho SUMOylaci. N-koncová oblast tohoto proteinu obsahuje sekvence, které jsou důležité pro lokalizaci Sp100 v PML NBs a pro jeho dimerizaci. Data autorů taky ukázaly, že Sp100 může formovat homodimery a taky, že jeho izoformy jsou schopné tvořit heterodimery. Takže, stejná doména Sp100 se uplatňuje v dimerizaci, tak i v jeho subnukleárním cílení. Místem SUMOylace Sp100 je Lys 297 (Sternsdorf et al., 1999). Dále Sp100 obsahuje box destrukce (D-box), který je nutný pro jeho proteazomální degradaci (Wang et al., 2011). SIM motiv Sp100 hraje roli v posílení SUMOylace tohoto proteinu pomocí Ubc9 (Knipscheer et al., 2008).

Protein Sp100 má schopnost interagovat s členy rodiny HP1 (heterochromatinový protein 1) *in vitro* a *in vivo*. To vede ke koncentraci těchto komplexů v PML NBs. Bylo taky zjištěno, že zvýšená exprese Sp100 posiluje akumulaci HP1 v těchto útvarech (Seeler et al., 1998). Co to je vlastně HP1? To je proteinová rodina, která je součástí chromatinu. HP1 proteiny mají dvě důležité domény, kterými jsou CSD (C-koncová chromo-stinná doména) a CD (chromo doména). Dimery HP1 mohou například vázat histon methyl transferázy, což má vliv na posttranskripční modifikace histonů a tím na regulaci genové exprese (shrnuto v Collados Rodríguez, 2020). Bylo ukázáno, že pro interakci HP1 s Sp100 je vyžadována právě CSD oblast těchto proteinů (Seeler et al., 1998). SUMOylace Sp100 tuto interakci stabilizuje a zdá se, že právě PML může zprostředkovat konjugaci SUMO s Sp100, a to buď přímo nebo nepřímo (shrnuto v Collados Rodríguez, 2020). Již jsem při popisu PML zmínil, že tento protein pravděpodobně obsahuje SUMO E3 ligáční vlastnosti (Shen et al., 2006). Je pravděpodobně, že se SUMOylace Sp100 objevuje právě v PML NBs (Sahin et al., 2014). Souhrnně řečeno, pro posttranslační modifikace Sp100, jako třeba konjugace se SUMO, mohou být důležité PML NBs. A protože schopnost Sp100 působit na chromatin přes HP1 je pravděpodobně závislá na SUMOylaci, tak to znamená, že lokalizace tohoto proteinu v PML NBs má vliv na jeho funkce. Taky bych ještě chtěl zmínit, že existuje 11 izoform Sp100 a jenom 4 z nich jsou zkoumané. Tyto izoformy (Sp100A, B, C a HMG) mají společnou N-koncovou část a Sp100A je nejkratší z nich. Ty delší izoformy Sp100 mají například DNA-vazebnou doménu SAND (shrnuto v Collados Rodríguez, 2020). Výše jsem taky zmínil, že Sp100 může interagovat s histony. Například, Sp100C má vlastnost vázat specificky modifikovaný histon 3 (H3) (Zhang et al., 2016).

2.3 Daxx protein

Daxx protein má různé funkce jak v jádře, tak i v cytoplazmě. Na jedné straně je tento protein důležitý pro zprostředkování apoptózy, na druhé straně má významnou roli v regulaci genové exprese.

Když byl Daxx poprvé identifikován, tak se zjistilo, že to je signální protein, který má schopnost interagovat svým C-koncem s doménou smrti (death domain) Fas receptoru, a to samozřejmě hraje určitou roli ve Fas – zprostředkované apoptóze (Yang et al., 1997). Takže, v tomto případě Daxx po navázání v cytoplazmě na Fas receptor interaguje s ASK1 (kináza 1 regulována apoptickými signály), a to vede dále přes MAP2K (mitogeny aktivovaná kináza protein kinázy) k aktivaci JNK („c-Jun N-terminal kinase“) kaskády, která má roli ve zprostředkování buněčné smrti (shrnuje v Mahmud & Liao, 2019). Kromě toho, existuje model, podle něhož glukozová deprivace, která vede ke zvýšení hladiny ROS (reaktivní formy kyslíku) v buňce, zahajuje signální dráhu, jejíž výsledkem je asociace Daxx s ASK1. V tomto kontextu Daxx je přemístěn z jádra do cytoplazmy, kde jeho interakce s ASK1 zprostředkovává oligomerizaci ASK1, což pravděpodobně stabilizuje tento protein. Tento proces může mít význam pro udržování aktivace signálních drah zahájených v odpověď na glukozovou deprivaci (Song & Lee, 2003). Tento model taky zahrnuje i způsob, jakým Daxx je transportován do cytoplazmy. Jaderní exportní signál (NES) proteinu Daxx je rozpoznán CRM1 (exportin 1; též je znám jako protein udržování struktury chromozom 1), a tento protein právě zprostředkovává translokaci Daxx do cytoplazmy. Během již zmíněné glukozové deprivace je Daxx fosforylován, a to konkrétně na pozici serin 667 (Ser, S). Taková posttranslační modifikace je důležitá pro interakce Daxx s CRM1. Tryptofan 621 (Trp, W) Daxx proteinu naopak má funkci inhibovat tuto interakci maskováním NES. Při záměně této aminokyseliny za alanin (Ala, A) dochází ke stálému exportu Daxx z jádra. Z toho vyplývá, že fosforylace pravděpodobně narušuje tento inhibiční vliv a umožňuje Daxx interagovat s CRM1 (Song & Lee, 2004).

Ve studii (Li et al., 2000) bylo popsáno, že Daxx interaguje s proteinem PML a formuje s ním stabilní komplex v PML NBs. PML rekrutuje Daxx do PML NBs a právě SUMOylace PML je důležitá pro lokalizaci Daxx v těchto jaderných tělískách. Za nízké hladiny proteinu PML byl Daxx nalezen v kondenzovaném chromatinu (Li et al., 2000). I v jiné studii (Ishov et al., 1999) bylo popsáno, že Daxx je součástí PML NBs a že pro jeho zacílení do těchto útvarů je nezbytná interakce se SUMOylovaným PML (Ishov et al., 1999). Je důležité zde zmínit, že pro interakci proteinu Daxx s PML, který je konjugován se SUMO, je vyžadována SIM sekvence proteinu Daxx (Lin et al., 2006). Samotný Daxx může být rovněž SUMOylován (Jang et al., 2002).

Teď bych chtěl více přiblížit funkce Daxx v kontextu regulace genové exprese. Protein Daxx má schopnosti vázat různé transkripční faktory nebo epigenetické regulátory. S čím konkrétně tento protein může interagovat?

Například, Daxx asociuje s histon deacetylázou (HDAC) II / HDACII, což ukazuje na jeho roli v represí transkripce (Hollenbach et al., 2002). Dále, Daxx může rekrutovat Dnmt1 (DNA methyl transferáza 1), což vede k represí cílových genů mechanismem hypermetylace (Puto & Reed, 2008).

Navíc může Daxx ještě interagovat s CBP (CREB – vázající protein). Pro tuto interakci je nutná SUMOylace CBP a význam této interakce spočívá v tom, že to vede k inhibici pozitivní transkripční aktivity CBP (Kuo et al., 2005). Protein CBP je mimochodem taky asociován s PML NBs (LaMorte et al., 1998). Bylo také zjištěno, že protein Daxx může formovat komplexy s H3.3/H4 (histonové varianty) a spolu s proteinem ATRX (protein „alpha thalassemia/mental retardation syndrome X-linked“) je chaperonem H3.3. Tento komplex je důležitý pro sestavení nukleozomů obsahujících H3.3 (Lewis et al., 2010). Protein ATRX je mimochodem taky součástí PML NBs a jeho lokalizace v PML NBs je závislá na Daxx, který v tomto případě má adaptérovou funkci (Ishov et al., 2004). Nově syntetizovaný H3.3 je lokalizován v PML NBs v závislosti na přítomnosti Daxx. Takže, se zdá, že PML NBs mohou být přechodovým shromažďovacím místem pro H3.3 před jeho depozicí do specifických genomových lokalit (Corpet et al., 2014). Vliv H3.3 na regulaci transkripce a na dynamiku chromatinu je různý a prozatím málo prozkoumaný. H3.3 může být detegován v transkripčně aktivních a zároveň i v heterochromatinových oblastech, kterými jsou například telomery nebo pericentromerický chromatin (Ahmad & Henikoff, 2002; Deaton et al., 2016; Drané et al., 2010; Lewis et al., 2010).

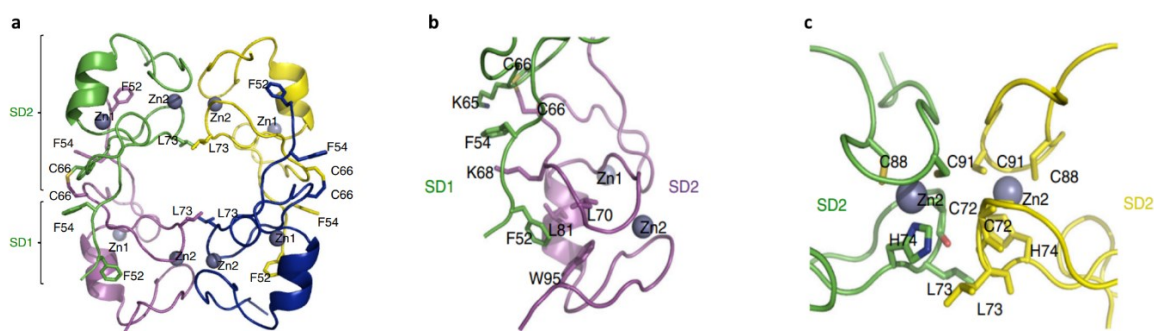
2.4 Formování PML NBs

PML je naprosto esenciální protein pro formování PML NBs a má kritickou roli v akumulaci jiných komponent spojených s PML NBs (Ishov et al., 1999). Je zajímavé, že interakce SUMO-SIM nejsou potřebné pro tvorbu primárního lešení z PML. Expresse jak PML bez SIM, tak i PML, ve kterém 3 hlavní Lys SUMOylačních místa jsou substituované za arginin (Arg, R), v immortalizovaných buňkách MEFs dovoluje formování sférického PML lešení (Sahin et al., 2014). Zacičení PML do jaderné matrix taky není závislé na modifikace SUMO (Lallemand-Breitenbach et al., 2001).

Biogeneze PML NBs má několik stadií a tím prvním je oligomerizace/polymerizace PML, což vede ke tvorbě makromolekulárního vnějšího lešení těchto jaderných tělísek (Sahin et al., 2014). Tento děj je závislý na různých faktorech: **1)** Důležitou roli hraje přítomnost ROS a **2)** cysteinových zbytků PML. ROS působí tvorbu disulfidických můstků a intermolekulární zesíťování PML. ROS mají tak význam v oxidaci PML a následné tvorbě PML NBs (Jeanne et al., 2010). **3)** Nekovalentní interakce zprostředkované RBCC motivem jsou vyžadované pro shromažďování oxidovaných PML (Sahin et al., 2014). **4)** V tomto případě je pravděpodobně, že tetramerizace RING je prvním krokem, za kterým následuje polymerizace B1 PML (Li et al., 2019). **5)** Kromě toho se ještě navíc ukazuje, že se C-koncové oblasti specifických izoform PML také mohou podílet na formování PML NBs (Li et al., 2017). Druhou fází formování těchto útvarů je rekrutování Ubc9, což vede k SUMOylaci PML důležité pro následné interakce PML-PML prostřednictvím interakcí SUMO-SIM (Sahin et al., 2014; Shen et al., 2006; Wang et al., 2018).

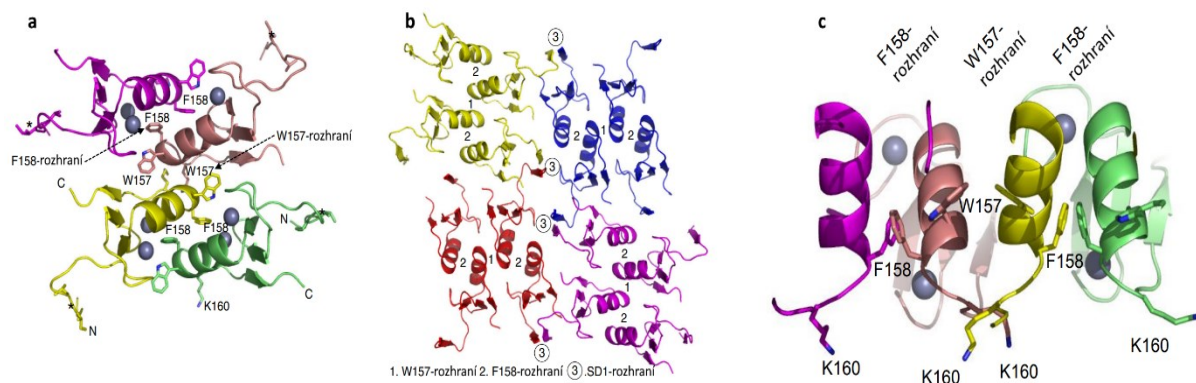
Teď bych chtěl detailně popsat proces oligomerizace PML. Již jsem zmiňoval, že „RING finger“ doména proteinu PML má významnou roli v interakci s Ubc9 (Duprez et al., 1999). Sbalování RING domény PML je koordinováno dvěma zinkovými ionty a táta oblast je důležitá pro tvorbu tetramerů PML. Na formování tetramerů PML se podílí několik interakcí a aminokyselinové zbytky, které se

zúčastní těchto interakcí a koordinace zinkových iontů, jsou velmi konzervované mezi ortology PML. Každá podjednotka PML v rámci takového tetrameru (**Obrázek 4a**) obsahuje dvě důležité subdomény, SD1_{FQF} a SD2. SD1_{FQF} je smyčka se třemi aminokyselinovými zbytky F52 (fenylalanin, phe), Q53 (glutamin, gln), F54. Subdoména SD2 zahrnuje zbytky na pozicích 55-99. **1**) Postranní zbytky jedné podjednotky PML L70 (leucin, leu), L81, W95 (SD2 subdoména) vymezují hydrofobní kapsu, se kterou interaguje F52 (SD1_{FQF} subdoména) druhé podjednotky PML (**Obrázek 4b**). **2**) Dále také uplatňují interakce mezi K68 (SD2 subdoména) jedné podjednotky a F54 (SD1_{FQF} subdoména), K65 (SD2 subdoména) druhé podjednotky (**Obrázek 4b**). **3**) Kromě interakcí mezi SD1_{FQF} a SD2, existují i interakce mezi dvěma SD2. Sousední SD2 se shlukují proti sobě a pro jejich interakci jsou důležité aminokyselinové zbytky L73 a C91 (**Obrázky 4a,c**). **4**) Navíc v tetrameru můžeme najít disulfidické můstky C66-C66 (**Obrázky 4a,b**). Tetramerizace PML je esenciální pro formování PML NBs, SUMOylaci PML a pravděpodobně umožňuje efektivní rekrutování Ubc9 (Wang et al., 2018).



Obrázek 4: Krystalická struktura tetramerů PML, jejichž tvorba je závislých na RING doméně. Různé podjednotky takové struktury jsou obarvené odlišnými barvami. Každá podjednotka PML má dvě subdomény (SD1 a SD2). Kuličky znamenají zinkové dvojmočné kationty. **A**) Celkový pohled na PML tetramer. **B, C**) Zvětšené pohledy na některá interakční rozhraní. Jednotlivé interakce jsou detailně popsány v textu. Převzato a upraveno z (Wang et al., 2018).

Dále následuje polymerizace PML, kde se uplatňuje B1 box. B1-box PML obsahuje 2 subdomény. Aminokyselinové zbytky na pozicích 120-127 formují SD1 subdoménu. SD2 subdoména je představená zbytky 128-167 a dochází tam ke koordinaci dvou zinkových iontů. V tomto případě se mohou formovat dimery několika typů, které se dále shlukují do polymerů (**Obrázek 5**). Konkrétně jsou to W-157, F138 a SD1 dimery. Jsou tam totiž 3 interakční rozhraní, a to souvisí s organizací PML do vyšších řadů pomocí B1-boxu. Střídavé zapojení W157 a F158 rozhraní může vést k tvorbě tetrameru (**Obrázky 5a,c**) a v takové situaci rozhraní SD1 jsou v takové pozici, kde se mohou zapojit do formování B1-polymerů (**Obrázek 5b**). Tento mechanismus oligomerizace PML má jako výsledek například to, že se K160 SUMOylační místa pravděpodobně dostávají do přístupné pro interakce pozici, což by mohlo mít význam při SUMOylaci PML (**Obrázek 5c**) (Li et al., 2019).



Obrázek 5: Krystalická struktura makromolekulárních útvarů PML závislých na B1-boxu. A) PML může formovat dimery pomocí F158 a W157 rozhraní a jejich střídavé zapojení vede ke tvorbě tetramerů. Symbol * na obrázku ukazuje na SD1 rozhraní. Jednotlivé podjednotky PML mají odlišnou barvu. Symboly N a C ukazuje na příslušné konce znázorněných úseků PML podjednotek. **B)** Tetramery (mají odlišnou barvu) se dále mohou shlukovat do polymerů pomocí rozhraní SD1. **C)** Na obrázku je vidět, že se při shlukování PML takovým způsobem K160 místa pravděpodobně dostávají do přístupné pro interakce pozici, což by mohlo mít význam při SUMOylaci PML. Kuličky znamenají Zn (2+). Převzato a upraveno z (Li et al., 2019).

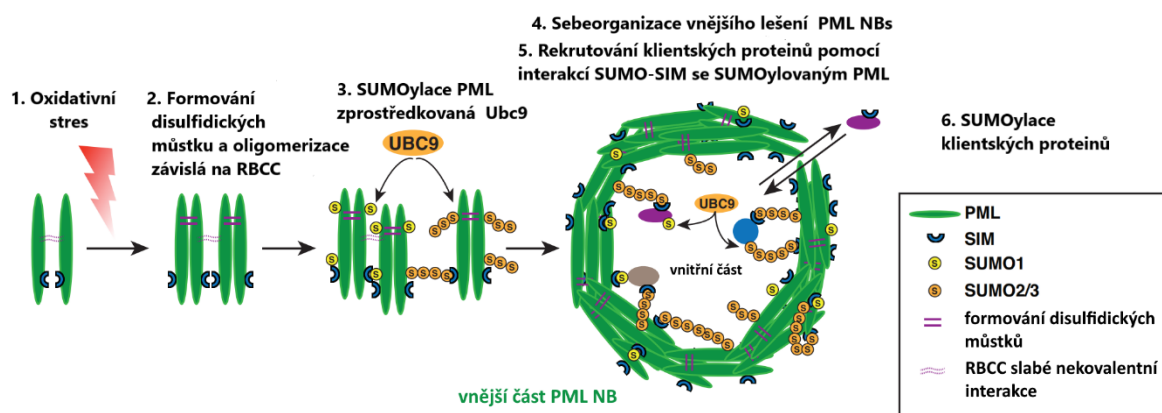
Po polymerizaci PML a jeho SUMOylaci, která zprostředkovává PML-PML SUMO-SIM interakce stabilizující tvorbu primárního lešení PML NBs, nastává třetí fáze representována modelem LLPS (model fázové separace „liquid–liquid“). Je to model, který říká, že nad určitou prahovou koncentrací mohou proteiny být fázově separované. Tím pádem vznikají biomolekulární kondenzáty, které mají odlišný obsah od okolního prostředí. Tento proces je energetický výhodný a je závislý na různých biofyzikálních faktorech, jako například teplota, pH a koncentrace iontů. A bylo právě pozorováno, že *in vitro* směsi polySUMO-polySIM polymerů umožňují tvorbu takových kapiček podobných kapalině. Dále tam mohou být rekrutovány klientské proteiny obsahující SUMO/SIM. Je možné, že tento model přispívá i k biogenezi PML NBs, ale to je zatím spekulace. LLPS sám o sobě není postačující a nevysvětluje složitou architekturu PML NBs (shrnutí v Corpet et al., 2020).

V doplnění k tomuto modelu klientské proteiny jsou zřejmě rekrutované do PML NBs pomocí interakcí SUMO-SIM. Tyto proteiny jsou konjugované se SUMO uvnitř PML NBs, což posiluje jejich kumulaci v těchto jaderných tělíčkách (Sahin et al., 2014). Výše zmíněná polymerizace PML závislá na RBCC motivu pravděpodobně předchází náboru klientských proteinů do PML NBs (Li et al., 2019). Důležitou roli hraje SUMOylace PML na pozici K160, což vede k interakcím s klientskými proteiny přes jejich SIM. Poté ty proteiny podléhají SUMOylaci a dále takto interagují s SIM různých proteinů (jiné klientské proteiny nebo zase PML). Právě PML rekrutuje Ubc9 do PML NBs a oxidativní stres zvyšuje účinnost tohoto procesu (Sahin et al., 2014).

PML NBs můžeme rozdělit do dvou kompartmentů. Vnější je asociován s jadernou matrix a skládá se z oxidovaných a SUMOylovaných PML, které formují multimery (Sahin et al., 2014). Sp100 je taky nalezen v periferní části PML NBs (Lang et al., 2010). Vnitřní kompartment obsahuje klientské proteiny a je závislý na slabých SUMO-SIM interakcích (Sahin et al., 2014). PML NBs jsou unikátní mezi bezmembránovými útvary, což je dáno jejich dvoufázovou architekturou. SUMO-1 je primárně nalezen ve vnější části PML NBs, ale SUMO-2/3 řetězce mohou vyčnívat i dovnitř těchto jaderných tělísek.

Taky je nutné zmínit, že obrat klientských proteinů může být celkem rychlý, a to v rozsahu několika vteřin až minut (shrnutí v Corpet et al., 2020).

Výše popsaný model biogeneze PML NBs je schematicky znázorněn na **obrázku 6**.



Obrázek 6: Schematické znázornění modelu formování PML NBs. 1,2) PML formuje útvary vyšších řadů na základě slabých interakcí závislých na RBCC motivu a tvořením disulfidických můstků posíleným oxidativním stresem. 3) Dále dochází k SUMOylaci PML pomocí SUMO E2 konjugačního enzymu Ubc9. PML může být konjugován se SUMO-1 a se SUMO2/3. 4) Poté je PML samostatně organizován do podoby vnějšího lešení PML NBs interakcemi PML-PML SUMO-SIM. V tomto stádiu může přispívat k formování PML NBs pravděpodobně i LLPS. 5) Další fází biogeneze PML NBs je rekrutování klientských proteinů (nepopsané kuličky různých barev) prostřednictvím interakcí SUMO-SIM. 6) V PML NBs jsou klientské proteiny SUMOylovány, což posiluje jejich kumulaci v těchto jaderných tělíscích. SUMO-1 se nachází spíše v periferní části PML NBs, ale SUMO2/3 řetězce vyčnívají i dovnitř těchto útvarů. PML NBs jsou dynamické struktury, což znamená, že obrat klientských proteinů může mít velmi rychlý. Převzato a upraveno z (Corpet et al., 2020).

2.5 Přehled funkcí PML NBs

2.5.1 PML NBs jsou asociované s chromatinem pro regulaci transkripce

Bylo pozorováno, že vnitřky PML NBs jsou složeny z proteinů a není v nich detekovatelná RNA. K akumulaci nascentní RNA, stejně jako acetylovaného chromatinu, dochází pouze v okolí PML NBs (Boisvert et al., 2000). Později bylo taky ukázáno, že polohová stabilita PML NBs může být závislá na přímých fyzických kontaktech proteinů těchto jaderných tělísek s chromatinem (Eskiw et al., 2004). Kromě toho se zjistilo, že PML NBs jsou asociované s regulačními oblastmi aktivních genů, a to po celém buněčném genomu (Kurihara et al., 2020).

Co tedy může vyplývat ze všech zde dosud zmíněných skutečností? **i)** V PML NBs se nachází řada proteinů, jejichž funkce je spojená s dynamikou chromatinu a regulací transkripce jako například Sp100, HP1, Daxx, CBP a ATRX. **ii)** Přítomnost nascentní RNA v okolí PML NBs naznačuje souvislost těchto struktur s pozitivní regulací genové exprese. **iii)** Kromě toho PML NBs mají potenciál koncentrovat biochemické reakce ovlivňující posttranslační modifikace proteinů (jako například výše popsaná SUMOylace).

2.5.2 Dynamika PML NBs během buněčného cyklu

Bylo pozorováno, že se počet PML NBs zvyšuje s nástupem buňky do S-fáze. Proto v G2-fázi je těchto jaderných tělísek skoro dvakrát více oproti G1-fázi. Takový nárůst PML NBs však není způsobem tím, že by docházelo k nárůstu hladiny PML. Zvýšení počtu PML NBs je dáno tím, že se v časně S-fázi tyto útvary stávají méně strukturně stabilní a dochází k jejich dělení na fragmenty. Děje se to kvůli

topologickým změnám chromatinu během replikace. Bylo postulováno, že PML NBs v této fázi buněčného cyklu mohou mít funkci v zachování prostorové orientace sesterských chromatid (Dellaire, Ching, Dehghani, et al., 2006). V souvislosti s tím bych chtěl zde zmínit, že součástí PML NBs je protein, jehož nepřítomnost je spojená s vyšší frekvencí SCE (výměna sesterských chromatid). Jedná se o protein BLM (protein Bloomova syndromu) Bylo ukázáno, že při absenci PML taky dochází k častější SCE, a to ukazuje na to, že PML NBs jsou důležitá pro normální funkci proteinu BLM a mají tedy určitý význam v udržování stability genomu (Zhong et al., 1999). BLM je mimochodem ATP-dependentní DNA helikáza (Karow et al., 1997).

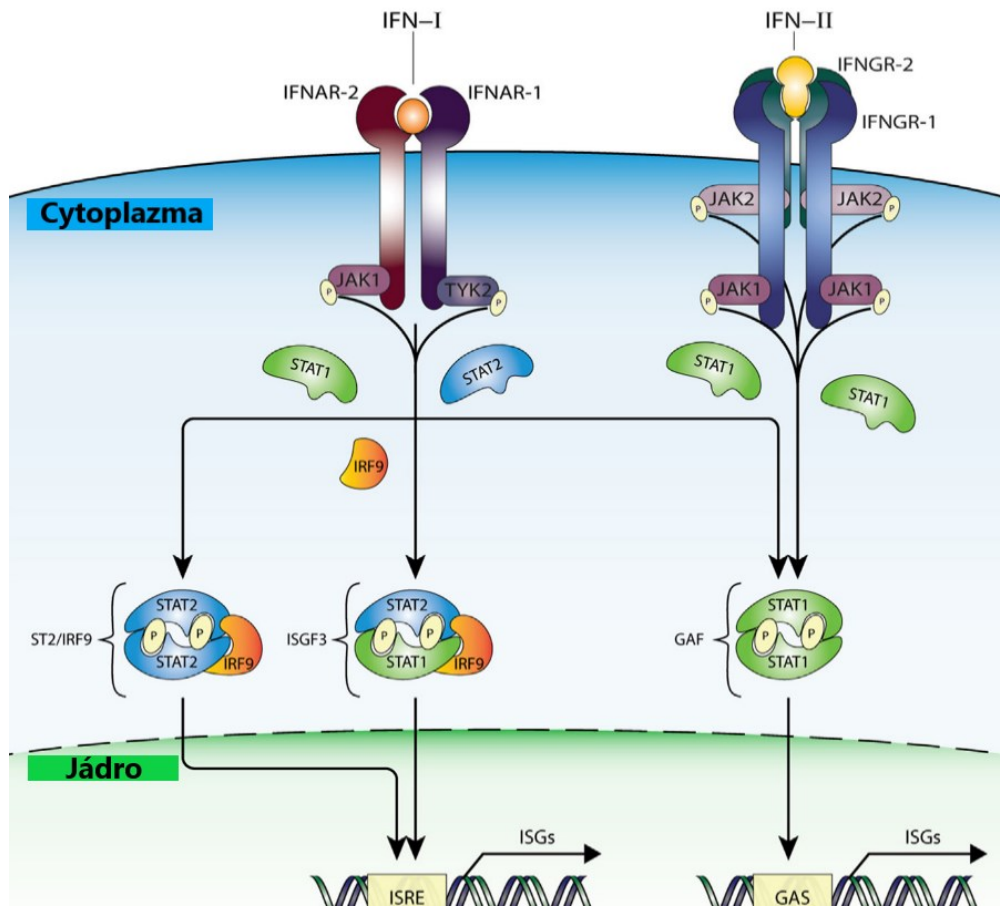
Mitotická akumulace PML proteinu (MAPPs) se biochemicky a strukturálně liší od klasických PML NBs. MAPPs mají například větší velikost. Po cytokinezi jsou MAPPs nalezeny v cytoplazmě (Dellaire, Eskiw, et al., 2006). Již jsem zmiňoval, že během interfáze je PML SUMOylován, ale při mitóze dochází k jeho de-SUMOylaci. Kromě toho během mitózy Sp100 není lokalizován společně s PML, jak tomu normálně bývá v interfázi (Everett et al., 1999). Je nutné taky zmínit, že při mitóze nedochází k degradaci PML, ale tento protein je recyklován a přispívá ke tvorbě PML NBs ve dceřiných buňkách. MAPPs taky neobsahují Daxx (Dellaire, Eskiw, et al., 2006). Bylo pozorováno, že Daxx je akumulován v heterochromatinu na konci S-fáze a bylo spekulováno, že tento protein může hrát roli v modifikaci post-replikačního chromatinu. Je zajímavé, že deplece proteinu Daxx vede ke zrychlení průběhu S-fáze a k tendenci buněk formovat dvojité jádra (Ishov et al., 2004).

Během přechodu z mitózy do G1-fáze dochází ke tvorbě CyNPs (cytoplazmatické akumulace PML a nukleoporinů) (Jul-Larsen et al., 2009). Na začátku PML interaguje s importním receptorem KPBN1 (podjednotka karyoferinu $\beta 1$), což je závislé na NLS PML. Dále jsou do tohoto komplexu rekrutované periferní nukleoporiny (NUPs), které obsahují FG (fenylalanin-glycinové repeticity). Zdá se, že takové komplexy mohou přispívat k post-mitotickému transportu PML do jádra. Byla navržena hypotéza, že NUPs nemusí být jenom statickou součástí jaderného póru, ale je možné, že solubilní NUPs mají roli v post-mitotickém transportu proteinů. Tento model je celkem nový a jeho detaily jsou málo prozkoumané. Samozřejmě, jsou potřebná další studia (Lång et al., 2017).

2.5.3 PML NBs a interferonová signalizace

Interferony (IFN) patří mezi cytokiny a mají významnou roli v antivirové obraně. Molekuly IFNs, které jsou po syntéze sekretovány z buněk, se vážou na transmembránové receptory a tím aktivují JAK-STAT dráhu („Janus“ kinázy; proteinová rodina signálních transduktorů a aktivátorů transkripce). Výsledkem je aktivace exprese ISGs (geny stimulované IFN). ISGs obsahuje ve svých regulačních sekvencích ISRE (citlivý na $IFN\alpha/\beta$ element odezvy) a/nebo GAS ($IFN\gamma$ aktivační místo). Během interferonové signalizace typu I ($IFN\alpha/\beta$) a typu II ($IFN\gamma$) se dimery STAT1 vážou na GAS. Dále se při interferonové signalizaci typu I taky IRF9 (interferonem regulovaný faktor 9) spolu s heterodimerem STAT1/2 nebo s homodimerem STAT2 (ST2) váže na ISRE. Funkcí takových interakcí je aktivace transkripce ISGs). Schéma aktivace JAK-STAT dráhy je uvedeno na **obrázku 7** (shrnutí v Michalska et al., 2018). Expese PML je výrazně indukována $IFN\alpha$, $IFN\beta$ a $IFN\gamma$ a v promoru genu pro PML byly nalezeny ISRE a GAS

(Chelbi-Alix et al., 1995; Stadler et al., 1995). Kromě toho exprese Sp100 je taky sensitivní k IFN a promotor tohoto genu obsahuje ISRE a GAS (Grötzinger et al., 1996; Guldner et al., 1992).



Obrázek 7: Schematický model aktivace JAK-STAT drahý. IFN-I se váže na receptorový komplex IFNAR-2, IFNAR-1 (2 podjednotky IFN α receptoru), což vede k dimerizaci tohoto receptoru a přiblížení kináz JAK1 a TYK2 (tyrozin kináza 2) k sobě. Dále si tyto kinázy navzájem fosforylují a poté k nim je rekrutován STAT. STAT je fosforylován, což vede k jeho dimerizaci a translokaci do jádra. IFN-II na rozdíl od IFN-I interaguje s receptorem, který je složen ze dvou podjednotek IFNGR-1 (INF γ receptor) a ze dvou podjednotek IFNGR-2. S tímto receptorem jsou asociované kinázy JAK2 a JAK1. STAT protein v obou případech funguje jako transkripční faktor, který posiluje expresi ISGs. STAT může formovat několik typů komplexů: ST2/IRF9, ISGF3 (IFN stimulovaný genový faktor 3) a GAF (γ -aktivovaný faktor) (shrnuje Michalska et al., 2018). Převzato a upraveno z (Michalska et al., 2018).

Bylo pozorováno, že se izoforma PML-II může chovat jako pozitivní regulátor exprese IFN- β a taky transkripce ISGs, které jsou aktivované interferonovou odpovědí typu I. S čím to může souviset? Tato izoforma interaguje s různými transkripčními faktory, což zlepšuje jejich vazbu na DNA. Například, PML-II podporuje vazbu STAT1 na ISG promotor. Pro takové interakce je esenciální unikátní C-koncová oblast PML-II, ale RBCC motiv je postradatelný (Chen et al., 2015). Absence PML vede ke snížení exprese genů v odpovědi na IFN γ . Isoformy PML I až VI mohou posilovat fosforylaci STAT1 a taky pozitivně ovlivňují DNA-vazebné vlastnosti tohoto proteinu. Tyto procesy vyžadují SUMOylaci PML a přítomnost RING finger domény (el Bougrini et al., 2011). Ulbricht a spolupracovníci (Ulbricht et al., 2012) demonstrovali na příkladu lokusu bohatého na geny pro MHC II (hlavní histokompatibilní komplex třídy II), že se PML NBs mohou dostat do těsné blízkosti transkripčně aktivních oblastí genomu. Výrazné přiblížení lokusu MHC II k PML NBs je indukováno IFN γ . Přitom se ukázalo se, že

protein PML je důležitý pro účinnou transkripci MHC II, indukovanou IFN γ . Té je totiž docíleno regulací CIITA („class II transactivator“). Role proteinu PML (jeho izoformy II) spočívá v tvorbě stabilního komplexu s CIITA v PML NBs, což chrání tento transaktivátor před degradací v proteazomech (Ulbricht et al., 2012).

2.5.4 Některé další funkce PML NBs: alternativní prodloužení telomer, odpověď na poškození DNA, apoptóza

Občas nesmrtelné buněčné linie mohou prodlužovat své telomery mechanismem nezávislým na telomeráze (Bryan et al., 1995). Tento mechanismus zahrnuje proces homologní rekombinace (Dunham et al., 2000). K takovému ALT dochází i v některých nádorech (Bryan et al., 1997). Bylo zjištěno, že tyto ALT-buněčné linie a nádory obsahují zvláštní typ PML NBs, které dostali název APBs (ALT-asociované PML tělíska). Čím takové struktury jsou unikátní? Zprv APBs obsahují telomerovou DNA a zadruhé v nich jsou lokalizované určité specifické proteiny jako například hTRF1 a hTRF2 (lidské faktory 1 a 2 vázající telomerové repetice). Kromě toho v těchto strukturách ještě byla nalezena i rekombináza Rad51 (DNA reparační protein Rad51) (Yeager et al., 1999). Ukázalo se, že při depleci APBs v důsledku dlouhodobé absence PML dochází ke zkracování telomer a byla navržena hypotéza, že tato tělíska mají význam v rozvoji ALT-pozitivních nádorů (Osterwald et al., 2015). Při nejmenším jsou APBs dobrým markerem ALT (Yeager et al., 1999).

Spekuluje se, že PML NBs jsou sensory DNA poškození. Po objevení DSB (DNA dvouřetězcové zlomy) se rychle zvětšuje počet PML NBs, a to mechanismem formování mikrotělísek. Zdá se, že k tomu dochází kvůli topologickým změnám v chromatinu, které mají destabilizační účinek na PML NBs. Je taky pravděpodobně, že kromě takovéto biofyzikální regulace pro nárůst počtu PML NBs jsou důležité i probíhající reparační procesy (Dellaire, Ching, Ahmed, et al., 2006). Kromě toho po expozici buněk ionizujícímu záření (IR) je PML lokalizován v místě ložisek ssDNA (jednořetězcová DNA), a to spolu s proteinem účastnícím se odpovědi na poškození DNA, kterým je TopBP1 (protein 1 vázající DNA topoizomerázu 2) (Xu et al., 2003). S PML NBs jsou spojené proteiny Mre11 (protein meiotické rekombinace 11), Rad50 (DNA reparační protein Rad50) a Nbs1 (protein 1 „Nijmegen breakage syndrome“), což jsou podjednotky komplexu MRN, důležitého pro udržování stability genomu (Mirzoeva & Petrini, 2001). Po expozici buněk IR protein PML, p53 (protein 53) a ložisky Mre11 s časem kolokalisují s ložisky poškození DNA. Na základě těchto pozorování bylo také postulováno, že PML NBs mohou mít roli v odpovědi na DNA poškození (DDR) (Carbone et al., 2002).

Kromě toho se spekuluje potenciální role PML NBs pro apoptózu. V důsledku poškození DNA může být p53 lokalizován v PML NBs spolu s kinázou Chk2 (checkpoint kináza 2). Takový děj má za následek to, že p53 je fosforylován, což zabraňuje inhibičnímu působení ubikvitin ligázy Mdm2 („mouse double minute 2 homolog“), která normálně brání apoptickým aktivitám p53 (Louria-Hayon et al., 2003). Ještě bych chtěl taky dodat, že byla demonstrována schopnost PML potlačovat buněčný růst prodloužením G1-fáze. Protein PML může mít pravděpodobně vliv na některé komponenty regulace

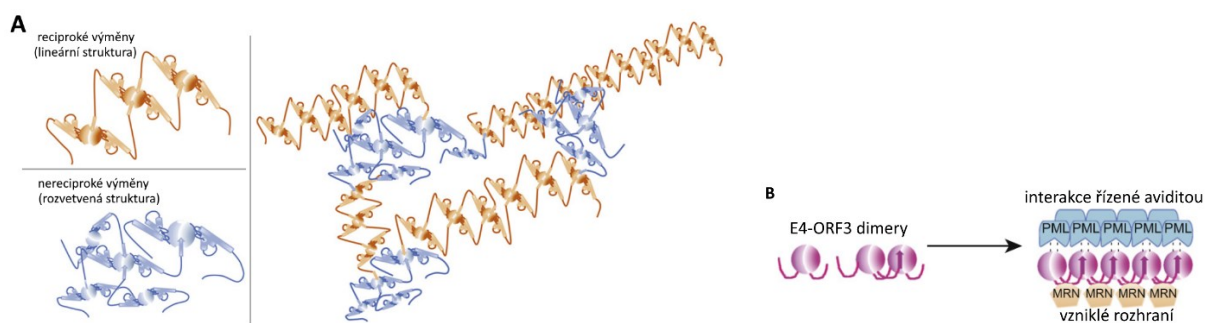
buněčného cyklu. Například, při nadměrné exprese PML dochází k redukci proteinů důležitých pro přechod do S-fáze, konkrétně kinázy Cdk2 (cyklin-dependentní kináza 2) a cyklinu E (Mu et al., 1997).

3 Interakce PML NBs a malých DNA virů

3.1 Adenoviry a jejich interakce s PML NBs

Do čeledi *Adenoviridae* patří neobalené viry o průměru přibližně 95 nm, vykazující ikosahedrální symetrii, z níž vyčnívají vlákna (fibers). Jejich genomem je lineární dsDNA (dvouřetězcová DNA), jejíž velikost se může pohybovat v rozmezí od 26 kbp (kilopárů bází) až po 48 kbp. Bylo ukázáno, že tyto patogeny mohou infikovat obratlovce všech skupin (shrnutí v Gallardo et al., 2021). Z hlediska lidského zdraví jsou adenoviry významní původci různých onemocnění jako například infekce horních dýchacích cest nebo gastrointestinálních potíží. Je velmi důležité zmínit, že jejich transkripce má časově oddělená stadia. V souvislosti s tím genom adenovirů má několik oblastí: časnou (E), střední (I) a pozdní (L). Než budou popsány interakce těchto virů s PML NBs, chtěl bych se taky zmínit o dvou konkrétních adenovirových (Ad) proteinech. Jedná se o E4-ORF3 (otevřený čtecí rámec) a E4-ORF6. Tyto proteiny vznikají ze stejné transkripční jednotky E4 a mají například funkce v modulaci imunitních odpovědí (shrnutí v Tatsis & Ertl, 2004).

Výsledkem adenovirové (Ad) infekce je redistribuce PML ze sférických PML NBs do vláknitých struktur. Bylo pozorováno, že pro tento proces je potřebný protein E4-ORF3 (Carvalho et al., 1995). Později bylo ukázáno, že E4-ORF3 protein lidského adenoviru typu 5 (HA5) přímo interaguje s PML, konkrétně s jeho izoformou PML-II (Hoppe et al., 2006). E4-ORF3 proteiny mají schopnost formovat nepravidelnou polymerní síť (**Obrázek 8**), a při tomto procesu prvním krokem je jejich dimerizace. Takové struktury plní velmi důležitou funkci během virové infekci. Jedná se o to, že tvoří aviditou řízené interakce s PML a rozhraní pro vazbu MRN komplexu (**Obrázek 8**) (Ou et al., 2012).



Obrázek 8: A) Schéma modelu formování polymerů E4-ORF3. Dimery tohoto proteinů mohou formovat útvary vyšších řadů, a to mechanismem výměn C-koncových „ocásků“. Při reciprokých výměnách vznikají lineární struktury, ale při nereciprokých dochází k formování rozvětvených útvarů. Kombinací obou typů výměn se může vytvořit nepravidelný polymer E4-ORF3. **B) Schéma modelu interakcí polymeru E4-ORF3 s MRN a PML.** Polymer E4-ORF3 interaguje s PML pomocí aviditou řízených interakcí a tvoří vazebné rozhraní pro MRN. Převzato a upraveno z (Ou et al., 2012).

O MRN jsem se již zmínil dříve a teď bych chtěl přiblížit význam tohoto komplexu v kontextu Ad infekce. Absence E4-ORF3 a E4-ORF6 proteinů vede k tomu, že Ad genomy tvoří konkatemery (Weiden & Ginsberg, 1994). Studie Strackeru a spolupracovníků (Stracker et al., 2002) navíc odhalilo, že mutace dalšího virového proteinu E1B-55K (protein o velikosti 55 kilodaltonů kódovaný transkripční

jednotkou E1B) vede ke konkatemerizaci Ad genomu. Dále bylo také zjištěno, že v buňkách, které neměly funkční Mre11 a Nbs1, se takové konkatemery nevyskytovaly. Z toho vyplývá, že MRN komplex je esenciální pro formování Ad konkatemerů, a proto může být cílem některých virových proteinů. Ve skutečnosti tomu tak je, a po infekci divokým Ad dochází k proteazomální degradaci Mre11 (Stracker et al., 2002). E4-ORF6 a E1B-55K se podílejí na interakcích s buněčnými proteiny Elongin B a C, Cul5 (cullin 5) a Rbx1 (RING-box protein 1), a tento multiproteinový komplex funguje jako E3 ubikvitin ligáza, která mimochodem zahajuje i ubikvitinaci p53, což může blokovat apoptózu (Querido et al., 2001). Takže, jakým mechanismem se Ad brání vůči MRN? **i)** E4-ORF3 je důležitý pro relokizaci MRN (Evans & Hearing, 2005). K relokizaci MRN s E4-ORF3 dochází jak v cytoplazmě, tak i v jádře (Araujo et al., 2005). V jádře je na začátku MRN spolu s E4-ORF3 lokalizován v PML NBs s pozmenou morfológií a za nějakou dobu se k nim připojuje i E1B-55K. Poté tyto proteiny přecházejí do cytoplazmy (Liu et al., 2005). **ii)** E1B-55K v tomto případě formuje aggresomy a sekvestrace MRN v takových aggresomech inhibuje funkci tohoto komplexu. Je pravděpodobně, že sekvestrace MRN v cytoplazmě chrání virovou DNA před aktivitou tohoto komplexu. Kromě toho tento proces urychluje proteazomální degradaci Mre11 závislou na ubikvitinaci výše zmíněnou E3 ubikvitin ligázou (Liu et al., 2005). Během infekce Ad5 navíc dochází k SUMOylaci Mre11 a Nbs1 a pro tento proces je právě vyžadována relokizace MRN zprostředkována E4-ORF3. Nicméně, konjugace těchto proteinů se SUMO během infekce má transienční charakter. Je spekulováno, že SUMOylace v tomto případě může usnadňovat proces zahájení degradaci MRN, například může mít význam v souvislosti s jaderným exportem tohoto komplexu (Sohn & Hearing, 2012). E4-ORF3 má vlastní enzymatické aktivity. Bylo pozorováno, že je to virová SUMO E3 ligáza a taky E4 elongáza (Sohn & Hearing, 2016). Kromě toho E4-ORF3 komplexy mají schopnost sekvestrovat buněčnou E3 SUMO ligázu PIAS3 (Higginbotham & O'Shea, 2015).

Když je v buňce navozen antivirový stav pomocí IFN- α nebo IFN- γ , tak to má za následek to, že absence funkčního E4-ORF3 vede k výraznému ohrožení replikace Ad genomu. Bylo postulováno, že narušení integrity PML NBs pomocí E4-ORF3 je mechanismem obrany proti antivirovým aktivitám těchto jaderných tělísek. Taky bych chtěl zmínit, že tato funkce E4-ORF3 je konzervována mezi Ad sérotypy (Ullman et al., 2007). Fenotyp adenoviru s mutantním E4-ORF3 během IFN odpovědi může být obnoven při absenci PML, a to zase ukazuje na význam PML v antivirové obraně (Ullman & Hearing, 2008).

Daxx je negativním regulátorem replikace Ad5. Stejně jako výše zmíněné p53 a Mre11 tento protein během infekce podléhá proteazomální degradaci. Pro takovou degradaci je vyžadován E1B-55K, ale tento děj je nezávislý na E4-ORF6 (Schreiner et al., 2010). Při infekci se E1B-55K nachází spolu s buněčným proteinem, kterým je STUbL RNF4 (RING-finger protein 4), ve specifických nerozpustných agregátech v jádře, a právě takový proces zprostředkovává interakci Daxx s touto hostitelskou E3 ubikvitin ligázou, což vede k jeho degradaci (Müncheberg et al., 2018). Nejenom Daxx, ale i další komponenta PML NBs, kterou je ATRX, může potlačovat replikaci adenoviru. ATRX/Daxx

komplex je během infekce lokalizován v promotorových regionech Ad genomu. Protože Daxx sám o sobě nemá DNA-vazebnou doménu, tak je pravděpodobně, že ATRX je tím molekulárním spojením tohoto celého komplexu s chromatinem. Takže, oba tyto proteiny mají roli v potlačení produktivní virové replikace a bylo usouzeno, že represivně působí na transkripci přes HDAC. Funkční ATRX/Daxx je důležitý pro remodelaci chromatinu, při jeho absenci bude nižší kondenzace genomu souviset s účinnější expresí Ad genů. Degradaci tohoto komplexu na rozdíl od degradace jenom samotného Daxx zprostředkovává právě E1B-55K/E4-ORF6 E3 ubikvitin ligáční komplex zmíněný výše (Schreiner et al., 2013). Kromě toho, adenovirový kapsidový protein VI adenovirů má také schopnost potlačovat aktivitu Daxx. Subpopulace těchto proteinů je po infekci zacílená do jádra, kde je poté lokalizována v blízkosti PML NBs. Protein VI interaguje s Daxx a může se podílet na jeho translokaci do cytoplazmy. Tento virový protein takto negativně působí na funkci Daxx, kterou je represe velmi časného promotoru E1A (Schreiner et al., 2012). Zde je nutné taky dodat to, že E1A transkripční jednotka je během Ad infekce transkribována jako první a její delece vede k defektní virové replikaci. Produkty exprese E1A mají velký význam v aktivaci exprese dalších Ad genů (shrnuto v Tatsis & Ertl, 2004).

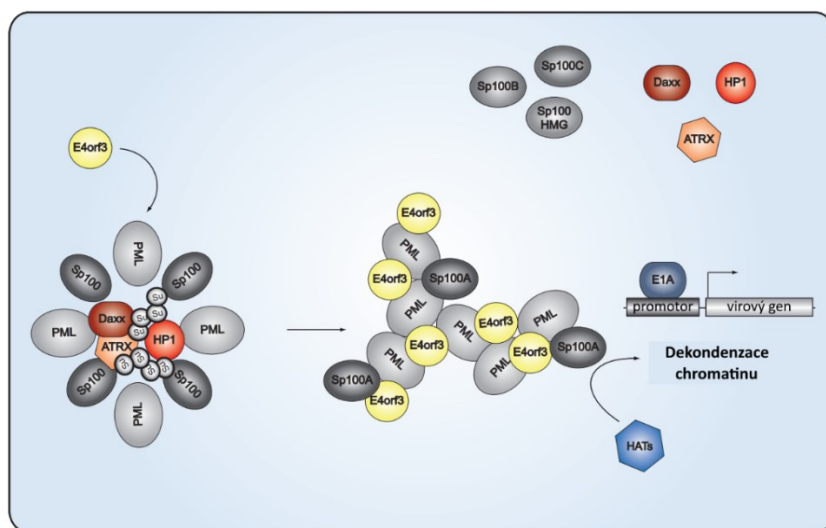
Ad transaktivátor E1A-13S (protein se sedimentačním koeficientem 13 Svedbergů kódovaný transkripční jednotkou E1A) je taky lokalizován v PML NBs, a to je nezávislé na expresi E1B-55K a E4-ORF3. E1A-13S interaguje s PML-II izoformou a v tomto případě se naopak ukazuje provirová funkce PML NBs, kdy adenovirus může zneužívat PML. Je pravděpodobně, že taková interakce má pozitivní vliv na regulaci transkripce virových genů, jejichž exprese je závislá na E1A (Berscheminski et al., 2013). PML sám o sobě nemá DNA-vazebnou aktivitu a podle autorů studie (Berscheminski et al., 2013) může v této situaci stabilizovat jiné transkripční faktory. Velmi zajímavým zjištěním bylo to, že izoforma PML-II mutovaná ve svém SIM může být účinnějším transaktivátorem virové exprese. Zdá se, že funkce PML jako platformy pro interakce E1A-13S s jinými transkripčními komplexy není závislá na jeho lokalizaci v PML NBs. Z toho taky může vyplývat i to, že interakce v těchto jaderných tělískách závislé na SIM mohou mít negativní vliv na pozitivní transkripční aktivitu PML (Berscheminski et al., 2013).

Během Ad infekce jenom Sp100A izoforma je lokalizovaná v PML NBs s narušenou morfologií (**Obrázek 9**), kdežto izoformy Sp100B, Sp100C a Sp100-HMG nejsou asociované s proteinem PML. S časem je značný počet takových alternativních PML NBs nalezen ve spojení s vnějším okrajem virových replikačních center (RCs) a Sp100A je stále asociován s těmito strukturami. Ostatní izoformy Sp100 jsou akumulované výhradně uvnitř RCs. Za tuto odlišnou separaci mohou patrně C-koncové domény těchto delších izoform Sp100. Dále bylo pozorováno, že se *de novo* syntetizována virová RNA nachází právě ve vnějších částech Ad RCs. Kromě toho se ukázalo, že během infekce Sp100A váže méně HP1 α . Je spekulováno, že Sp100-HP1 α komplex funguje jako represor virové replikace mechanismem chromatinové kondenzace. Adenovirus se narušením integrity tohoto komplexu může bránit před jeho represivními aktivitami a indukovat tak dekonkondenzaci chromatinu. Sp100A sám o sobě může vykazovat aktivační vlastnosti a působit pozitivně na Ad promotory, když se nachází v narušených

PML NBs. Bylo usuzováno, že tak může rekrutovat histon acetylázy (HATs), které formují příznivé transkripční prostředí (**Obrázek 9**) (Berscheminski et al., 2014).

Autoři navrhuji to, že Sp100A je lokalizován v aktivních místech virové transkripce, kterými jsou narušené PML NBs obklopující RCs, ale transkripční faktory Sp100B, Sp100C a Sp100-HMG ztrácejí svůj inaktivační potenciál, protože jsou vytlačeny z těchto regionů. Tento výzkum ukazuje, že adenovirus nejen působí proti mechanismům buněčné imunity, ale i může zneužívat komponenty PML NBs. Bylo taky pozorováno, že během infekce Sp100 ztrácejí svoji SUMOylaci, a to může snižovat počet interakcí mezi Sp100 a HP1 α . Autoři spekulují, že tato data podporují model, kde adenovirus indukuje deSUMOylaci některých komponent PML NBs, aby se určité represivní faktory jako například HP1, Daxx a ATRX nedostali do narušených PML NBs, kde mohou mít negativní vliv na virovou transkripci (**Obrázek 9**) (Berscheminski et al., 2014).

Adenovirový DNA-vazebný protein E2A je během infekce SUMOylován a je pravděpodobně, že může být potenciálním spojením mezi virovými RCs a narušenými PML NBs. Předpokládá se, že hraje velkou roli v lokalizaci těchto struktur vedle sebe. Bylo taky zjištěno, že tato posttranslační modifikace nemá negativní vliv na schopnost E2A vázat virový genom. E2A interaguje se Sp100A, a tak zvyšuje počet molekul v blízkosti transkripčně aktivních míst, což má pozitivní vliv na virovou genovou expresi (Stubbe et al., 2020). Samotný Ad genom nemá schopnost indukovat blízkou lokalizaci těchto útvarů, ale pro tento proces je vyžadován právě E2A. Taky bylo pozorováno, že k takové asociaci nedochází hned po infekci, ale teprve po 4 hodinách, což může souviset s tím, že je třeba čas na expresi E2A (Komatsu et al., 2016).



Obrázek 9: Model funkční reorganizace PML NBs během Ad infekce. E4-ORF3 narušuje integritu PML NBs a podle tohoto modelu při Ad infekci dochází k deSUMOylaci některých složek PML NBs, což vede k uvolňování komponent jako Daxx, ATRX a HP1, které by mohly represivně působit na virovou transkripci. Ze všech izoform Sp100 v PML NBs s narušenou morfologií zůstává jenom Sp100A, a tento protein pravděpodobně přes HATs pozitivně působí na virovou genovou expresi. Ostatní izoformy Sp100, které mohou mít negativní vliv na Ad transkripci jsou z této oblasti vytlačeny. Na obrázku je taky vidět, jak virový transaktivátor E1A má pozitivní vliv na genovou expresi. SU zde znamená SUMO. Převzato a upraveno z (Berscheminski et al., 2014).

3.2 Papilomaviry a jejich interakce s PML NBs

Papilomaviry mají neobalené viriony s ikosahedrální symetrií o průměru přibližně 55 nm. Jejich genomem je kruhová dsDNA o velikosti cca 8kbp. Tento genom se skládá z několika oblastí: regulační oblast, oblast časných genů (E) a oblast pozdních genů (L). Kapsidové proteiny těchto virů L1 a L2 jsou kódované pozdními geny. Papilomaviry replikují v buněčném jádru a jejich životní cyklus trvá několik

týdnů. Tyto patogeny se vyznačují tím, že mají replikační aktivity ve všech vrstvách epitelu. Nicméně, k tvorbě, maturaci a uvolnění jejich virionů může dojít povrchově terminálně diferencované epiteliální vrstvě. Lidských papilomavirů (HPVs) existuje více než 200 typů a mnohé z nich mohou vyvolávat nádorovou transformaci. Například, HR (vysoce rizikové) typy HPV jsou spojené s větším rizikem rozvoje karcinomu a mezi ně patří například celosvětově rozšířené typy 16 a 18. HPV může být původcem jak benigních, tak i maligních nádorů a v dnešní době existuje několik preventivních HPV vakcín (shrnuto v Mui et al., 2017).

Interakce papilomavirů s PML NBs byla poprvé pozorována na příkladu BPV (bovinní papilomavirus), nikoliv v souvislosti s HPV. Bylo ukázáno, že se virový minoritní kapsidový protein L2 při nadměrné expresi nachází v těchto útvarech, a to i za nepřítomnosti jakýchkoliv dalších virových komponent (Day et al., 1998). Efekt lokalizace L2 v PML NBs byl také studován na příkladu HPV33. V tomto případě bylo ukázáno, že samotný protein PML není ovlivněn virovým proteinem, ale mění se distribuce některých jiných komponent PML NBs. Konkrétně dochází k uvolnění Sp100 z těchto jaderných tělísek (Florin et al., 2002).

Poté bylo pozorováno, že PML NBs mají význam v časně fázi životního cyklu papilomavirů. L2 a virový genom se po infekci nacházejí v PML NBs a jejich cílení do těchto útvarů není závislé na sekvenci virové DNA. Tento proces je důležitý pro efektivní transkripci virového genomu (Day et al., 2004). L2 protein HPV16 je SUMOylován na pozici Lys 35 (Marusic et al., 2010). Bylo ukázáno, že mutace v tomto místě nemá vliv na kolokalizaci L2 a PML. L2 má i SIM motiv a zdá se, že právě tato oblast je esenciální pro asociaci virového proteinu s PML NBs (Bund et al., 2014).

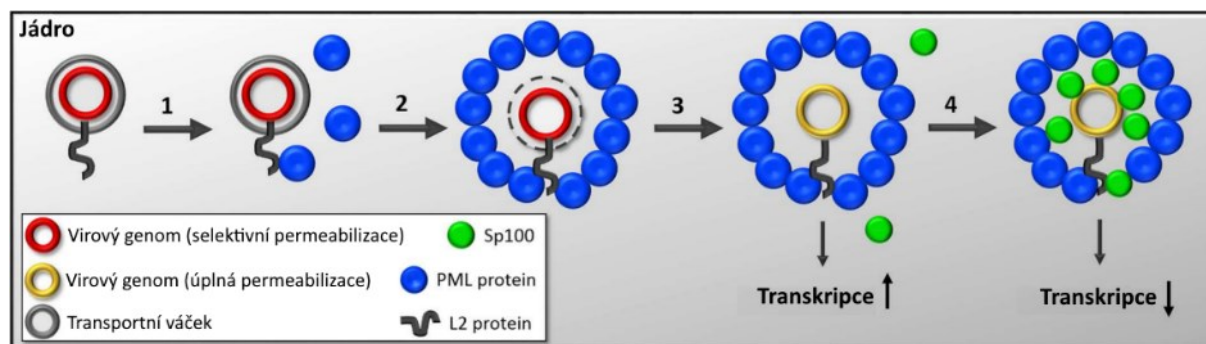
Bylo navrženo, že protein PML má protektivní funkce vůči virovému genomu. Po vstupu viru do jádra byla v buňkách, které neměly PML, pozorována redukce hladiny genomů HPV16. Tento fakt může naznačovat to, že virový genom neasociovaný s PML NBs je degradován. V nesmrtelných lidských keratinocytech HaCaT absence PML překvapivě indukuje interferonovou odpověď, a to pochopitelně negativně působí na průběh virové infekce. Pokud je zároveň použit INBC (ruxolitinib), což je inhibitor kinázy JAK1/2, tak nedochází ke snížení hladiny virové DNA i při absenci PML. Tyto skutečnosti vedly k návrhu zajímavého modelu, ve kterém PML NBs chrání virovou DNA před mechanismy imunity v jádře. Důležité je zmínit i to, že, pokud interferonová odpověď je inhibována, v buňkách bez PML virová transkripce není obnovena. Toto zjištění ukazuje na to, že PML nejen chrání virový genom před degradací, ale taky může mít pozitivní vliv na expresi papilomavirových genů. Ještě bych chtěl dodat, že na rozdíl od buněčné linie HaCaT v nesmrtelných lidských epiteliálních HeLa buňkách, které byly již transformované HPV18 onkogeny, při absenci PML nebyl pozorován pokles virové DNA, což může například souviset s tím, že v těchto buňkách je již narušená interferonová signalizace. Tím se papilomavirové interakce s PML NBs liší od interakcí jiných DNA virů s těmito jadernými tělísky v kontextu, u kterých absence PML naopak posiluje virovou infekci. To je celkem zajímavé zjištění (Bienkowska-Haba et al., 2017).

Experimenty, kde některé komponenty PML NBs byly inaktivované pomocí siRNA (malé interferující RNA) v buňkách HFK (lidské keratinocyty z předkožky), ukázaly, že snížení hladiny Daxx nebo Sp100 nemá vliv na integritu PML NBs a zase potvrdily ten fakt, že kompletní absence PML vede k rozpouštění těchto jaderných tělísek (Stepp et al., 2013). Jaký vliv má nepřítomnost Sp100 a Daxx na průběh papilomavírové infekci? Předpokládá se, že Sp100 negativně působí na virovou infekci, protože se při jeho absenci zvyšuje hladina exprese virových genů, a to se děje v časně fázi infekci. V těchto experimentech bylo pozorováno, že samotný PML má naopak pozitivní vliv na průběh virové infekci. Takže, komponenty PML NBs mohou mít odlišnou roli v časně fázi papilomavírové infekce. Absence Daxx mimochodem neměla vliv ani na transkripci ani na replikaci HPV18 (Stepp et al., 2013). Později bylo ukázáno, že Sp100 je asociován s RCs virového genomu v pozdní fázi infekce. Spekuluje se, že Sp100 takto vazbou na virový chromatin může být represorem virové transkripce nejenom na začátku, ale i právě v pozdní produktivní fázi závislé na diferenciaci buněk. Je pravděpodobně, že ty nejdéší izoformy Sp100 obsahující DNA-vazebnou SAND doménu mají takové represivní vlastnosti. Byla taky navržena hypotéza, že virus dokáže využívat antivirové vlastnosti Sp100 pro modulaci svého životního cyklu. Například taková represe transkripce může sloužit k přepnutí do udržovací fázi nebo se také dá předpokládat, že kondenzace virového chromatinu může být přípravou pro morfogenesi virionů. Navíc ještě bylo zjištěno, že většina izoform Sp100 je citlivá na IFN (Stepp et al., 2017).

Lidský papilomavirus je zvláštní tím, že vyžaduje mitózu pro vstup do jádra (Aydin et al., 2014). Po zahájení mitózy virový genom opouští trans-Golgiho síť a poté je asociován s mikrotubuly a putuje po nich ke kondenzovaným chromozomům, a pro toto je vyžadován L2 protein. Genom se nachází ve váčku až do ukončení buněčného dělení (DiGiuseppe et al., 2016). Kromě toho, po tuto celou dobu je s genomem taky vázán L1 protein (DiGiuseppe et al., 2017). Hlavní kapsidový protein L1 je spojen s genomem jenom během časně interfáze, ale L2 doprovází virovou DNA i nadále (Guion et al., 2019). Dynamika PML NBs během buněčného cyklu byla diskutována dříve v této bakalářské práci. Takže, teď otázkou je, jak dochází k tomu, že se virový genom nachází v PML NBs.

Ve studii (Guion et al., 2019) je ukázáno, že protein PML je zacílen k virovému genomu a tvoří komplexy, které ho obklopují. To je pravděpodobnější situace, než kdyby virové genomy byly rekrutovány do předem vytvořených PML útvarů. Když PML během časně interfáze je transportován zpět do jádra, tak je zacílen k virovému genomu a až poté se formují PML NBs. Předpokládá se, že PML nemá význam pro transport genomu do jádra, ale začíná plnit svoje funkce teprve v jádře, kde se již nachází virová DNA. Sp100 je rekrutován do těchto útvarů se zpožděním a kolokalizuje s virovým genomem až v pozdní interfázi. Zajímavým zjištěním bylo i to, že genom, kolem kterého se formují komplexy PML, je stále obalen ve váčku. Nabízí se model, ve kterém virová DNA je na začátku chráněná před sensory imunity endozomálním váčkem a poté PML komplexy (**Obrázek 10**). Tím je virový genom po opuštění váčku stále v bezpečném prostředí. Takový krok v tomto případě dovoluje

zahájení genové exprese. Spekuluje se, že HPV zneužívá PML pro regulaci časné transkripce a zpožděný nábor Sp100 do PML NBs slouží k přechodu do další fázi virové infekci (Guion et al., 2019).



Obrázek 10: Model sestavování PML NBs kolem váčku obsahujícího virový genom spolu s proteinem L2. Virová DNA je na začátku chráněna přes sensory imunity ve váčku. Poté PML transportované do jádra v časné interfázi formuje komplexy kolem tohoto genomu, který je stále obalen ve váčku. Po opuštění tohoto váčku je virová DNA stále chráněná. Sp100 je rekrutován do tohoto komplexu se zpožděním a je navrženo, že se takto virus chrání před jeho represivními účinky na transkripci. Asociace Sp100 s tímto komplexem by později mohla mít vliv na přechod do další fázi virové infekce. Převzato a upraveno z (Guion et al., 2019).

3.3 Polyomaviry a jejich interakce s PML NBs

Polyomaviry (PyVs) mají neobalené viriony, jejich kapsida o průměru přibližně 45 nm je ikosahedrální symetrie. Genomem je kruhová dsDNA o velikosti kolem 5,5 kbp. Je důležité také zmínit, že tato DNA je uvnitř virionů asociovaná s hostitelskými buněčnými histony, a to s výjimkou histonu H1. Genom těchto patogenů stejně jako v případě adenovirů a papillomavirů je rozdělen do několika oblastí: nekódující oblast, oblast časných genů a oblast pozdních genů. Transkripce časných a pozdních genů probíhá z opačných vláken. Produkty časných genů PyVs jsou T (tumorogenní) antigeny (T-ag), které mohou být různých velikostí. Například velký T-ag je důležitý pro zahájení virové replikace, regulaci pozdní virové transkripce, a navíc má schopnost interagovat s hostitelskými proteiny pro modulaci buněčného cyklu. Mezi produkty pozdních genů PyVs patří agnoprotein (není přítomný u všech PyVs) a kapsidové proteiny, které jsou představené majoritním VP1 a minoritními VP2 a VP3. Řada zástupců čeledi *Polyomaviridae* má potenciální schopnost zprostředkovávat transformaci buněk, ale zatím jediným PyV, který je průkazně spojen s rozvojem nádorů u lidí, je MCPyV (Polyomavirus Merkelových buněk). Dalšími příklady lidských PyVs mohou být JCPyV (JC polyomavirus) a BKPyV (BK polyomavirus). Polyomaviry mají široký hostitelský okruh, infikují obratlovce a jejich sekvence byly nalezeny i u bezobratlých. Živočišné viry SV40 (opičí virus 40) a MPyV (myší polyomavirus) jsou často využívané jako modelové viry (shrnutí v Prado et al., 2018).

Než budou popsány interakce PyVs s PML NBs, chtěl bych předem zmínit, že funkce těchto jaderných tělísek v kontextu polyomavirové infekce stále není objasněná. V některých studiích byl navržen pozitivní vliv PML NBs na průběh PyV infekce, ale na základě jiných se dá naopak spekulovat o jejich negativním působení na životní cyklus těchto patogenů.

Infekce JCPyV může vyvolat při imunosupresi progresivní multifokální leukoencefalopatii (Padgett et al., 1971). Role PML NBs v infekci JCPyV je stále kontroverzní, protože různá studia ukazují odlišné výsledky. V několika studiích bylo navrženo, že tato jaderná tělíska mohou podporovat průběh infekce. Spekuluje se možná role PML NBs v procesu formování kapsidy virionů tohoto patogenu (Shishido-

Hara et al., 2004). VP1 protein JCPyV je známý tím, že má unikátní NLS, který není efektivní pro zprostředkování transportu do jádra. Při absenci dalších kapsidových proteinů jako VP2 a VP3, tento majoritní protein je distribuován jak v jádře, tak i v cytoplazmě (Shishido-Hara et al., 2000). Bylo pozorováno, že se tento majoritní kapsidový protein nenachází v jádru všude, ale je akumulován ve specifických doménách, a zdá se, že taková akumulace je výsledkem kooperace mezi VP1, VP2 a VP3. Jaderné domény, o které se zde jedná, byly identifikovány jako PML NBs. Takže, virové strukturní proteiny se akumulují v PML NBs a je možné, že tento proces má význam v efektivní maturaci kapsidy. Chtěl bych taky dodat, že pro jaderný transport těchto strukturních proteinů a jejich následnou specifickou akumulaci v PML NBs je důležitá C-koncová sekvence VP2/VP3 (Shishido-Hara et al., 2004). Je zajímavé, že VP1 SV40 může být transportován do jádra, i když je produkován v buňkách bez minoritních proteinů (Ishii et al., 1996). Kromě toho, bylo taky navrženo, že PML NBs podporují replikaci virového genomu. Je zajímavé, že v oligodendrocytech infikovaných JCPyV s časem dochází k degradaci PML NBs, a to v době, kdy probíhá degenerace těchto buněk a následná demyelinizace. Tato degradace PML NBs asi nesouvisí s ubikvitin proteasomální dráhou. Je možné, že PML tělíska představují prostředí, které podporuje vývoj infekce, a až v době, kdy virové inkluze jsou formované, dochází k jejich degradaci. Zde může být, například, taky spekulována role PML NBs v kontextu progresivní multifokální leukoencefalopatie (Shishido-Hara et al., 2008). Chtěl bych také zmínit, že JCPyV moduluje buněčný cyklus v oligodendrocytech, což je zároveň spojené s rozšířením jádra a dále souvisí s morfologickými variacemi v PML NBs. Tato jaderná tělíska taky zvětšují svoji velikost. Produkce virového potomstva začíná v menších PML NBs a pokračuje se v rostoucích (Shishido-Hara et al., 2014).

Je zajímavé, že v jiné studii bylo pozorované, že protein PML není vyžadován pro efektivní produktivní infekci JCPyV. Navíc, eliminace PML měla dokonce za následek posílení infekce. Kromě toho, pozitivní regulace exprese genu pro PML pomocí IFN- β tuto infekci inhibovala (Gasparovic et al., 2009). Chtěl bych zde připomenout, že produkce PML je stimulována IFN (Chelbi-Alix et al., 1995). Podání IFN- β mělo za následek zvětšení počtu a velikosti PML NBs a bylo ukázáno, že IFN- β inhibuje infekci JCPyV právě způsobem závislým na PML. Proto PML NBs by mohly mít antivirové vlastnosti vůči tomuto patogenu. Dále bylo zjištěno, že velký T-ag (LT-ag) JCPyV je akumulován v jádru v určitých doménách, a ty se nacházejí blízko PML NBs. Při absenci PML jejich integrita není narušená, ale po podání IFN- β se tyto útvary stávají menší a lokalizují se blíže k PML NBs. Může být spekulováno, že se antivirová role těchto jaderných tělísek spočívá v sekvestraci virových proteinů (Gasparovic et al., 2009). Přesná role PML NBs v kontextu JCPyV pořád není objasněná a pro její určení jsou potřebná další studia.

Na rozdíl od JCPyV bylo popsáno ve studii Jianga a spolupracovníků (Jiang et al., 2011), že BKPyV indukuje funkční reorganizaci PML NBs. Při infekci dochází ke zvětšení velikosti a zmenšení počtu těchto jaderných tělísek. Autoři také pozorovali, že absence proteinu PML nemá zásadní vliv na průběh virové infekce. Asociace komponent BKPyV s PML NBs je závislá na čase. V časně fázi infekce PML

NBs kolokalisují s ložisky virového LT-ag. Později dochází právě k reorganizaci těchto struktur a v tuto dobu se PML NBs nacházejí v blízkosti genomu BKPyV. Ukázalo se, že pro tento proces je nutná probíhající virová replikace. Zajímavým zjištěním bylo to, že Daxx a Sp100 proteiny jsou uvolněny z PML NBs během Infekce. Děje se to zase při replikaci virového genomu a funkční význam tohoto procesu není jasný. Tyto buněčné faktory mohou fungovat jako inhibitory virové Infekce a to znamená, že se virus bude snažit inaktivovat jejich represivní vlastnosti. Je možný i opačný model, ve kterém disociace těchto komponent z PML NBs může mít nějaký pozitivní vliv na průběh pozdní fázi Infekce (Jiang et al., 2011).

U SV40 nebylo pozorováno, že by během jeho replikačního cyklu byla narušována integrita PML NBs. SV40 nemodifikuje strukturu těchto jaderných tělísek, ale má s nimi spojenou replikaci genomu (Ishov & Maul, 1996). Pro lokalizaci SV40 genomu do blízkosti PML NBs je potřebná přítomnost LT-ag vázajícího se „core“ replikačního počátku virové DNA (Tang et al., 2000). Je taky zajímavé, že LT-ag SV40 má schopnost indukovat DNA poškození a tvorbu ložisek Rad51, proteinu asociovaného s reparací DNA zlomů cestou homologní rekombinace (Boichuk et al., 2010). Bylo zjištěno, že pro tvorbu takových ložisek je kritický právě PML. Je možný model, kde SV40 zneužívá PML NBs, aby se dostal k buněčným faktorům DNA reparace (Boichuk et al., 2011). Rad51 je vyžadován pro efektivní replikaci tohoto viru (Boichuk et al., 2010).

Kromě toho byly pozorovány specifické jaderné distribuce virového LT-ag, p53 a PML v lidské fibroblastové linii (IDH4) podmíněně immortalizované LT-ag SV40 (Jiang et al., 1996). Charakteristikou této linie je to, že v ni dochází ke kontrolované produkci LT-ag SV40. V tomto systému specifický promotor genu pro tento protein je možné regulovat dexametasonem, což je steroidní látka (Shay et al., 1992). V proliferačních IDH4 buňkách, kde je produkován LT-ag, se tento virový protein dá nalézt v jádru v podobě teček, a ta místa jsou právě pozitivní i pro p53. Zajímavým zjištěním bylo to, že se takové útvary často nacházely vedle PML NBs. Naopak, v buňkách, kde promotor pro transkripci velkého T-ag nebyl stimulován dexametasonem, komplexy LT-ag a p53 skoro ani nebyly detekovatelné buňky neproliferovaly. Když v takových buňkách zase došlo k indukci LT-ag, tak na začátku tento virový protein a p53 byly rovnoměrně distribuované v jádře, ale s časem se vrátil jejich vztah s PML, což může souviset s obnovením mitotické aktivity. Na základě těchto pozorování bylo postulováno, že asociace komplexu L-ag a p53 s PML NBs je závislá na proliferační aktivitě buněk a může mít nějaký význam v buněčné transformaci. Samozřejmě, jsou potřebné další analýzy, které by se zabývaly detaily molekulárních mechanismů lokalizace těchto struktur vedle sebe a odhalením možného významu takového jevu (Jiang et al., 1996).

Je zajímavé, že LT-ag MPyV je taky asociován s proteinem, který má důležitou roli při DDR. Tentokrát se jedná nikoliv o Rad51 jako v případě SV40, ale o Mre11. Bylo taky pozorováno, že se takové komplexy spolu s virovým genomem lokalizují vedle PML NBs. Je důležité zde zmínit, že absence PML neměla žádný vliv na společnou lokalizaci výše zmíněných proteinů a MPyV DNA. Kromě toho nepřítomnost PML neovlivnila ani efektivitu virové replikace. Takže, PML může sloužit k identifikaci

míst replikace MPyV, ale pravděpodobně virový životní cyklus není závislý na přítomnosti tohoto buněčného proteinu. Je však například možné, že se nějaké klientské proteiny PML NBs mohou podílet na podpoře virové infekce (Erickson et al., 2012).

3.4 Anelloviry: Virus anemie kuřat (CAV) a jeho interakce s PML NBs

Anelloviry mají velmi malý genom o velikosti přibližně 2 až 3.9 kbp a tím genomem je kruhová jednořetězcová (-) DNA. Tyto viry infikují lidi, ale zatím nebylo asociované žádné onemocnění s nimi spojené. Jedním z rodu čeledi *Anelloviridae* je *Gyrovirus*, a do této taxonomické jednotky patří CAV, který je výjimečný právě tím, že může vyvolávat onemocnění u mladých kuřat (shrnuto v Kaczorowska & van der Hoek, 2020). Viriony CAV jsou neobalené a mají průměr kolem 25 nm. Velikost genomu tohoto viru je pouze 2.3 kbp a CAV se vyznačuje tím, že infikuje rychle se dělicí buňky. Jedním z CAV proteinů je apoptin, který je celkem rozsáhlé studován, protože má specifické schopnosti zabíjet nádorové buňky (shrnuto ve Feng et al., 2020).

Apoptin má význam v souvislosti s indukcí apoptózy (Noteborn et al., 1994). Bylo ukázáno, že tento protein pomocí svou C-koncovou doménou interaguje s APC/C (anafázi podporující komplex/cyklozom), a to konkrétně s jeho podjednotkou APC1 (podjednotka 1 anafázi podporujícího komplexu). Takto dochází k inhibici tohoto buněčného faktoru a posléze k zastavení G2/M přechodu a k apoptóze transformovaných buněk i bez přítomnosti p53 (Teodoro et al., 2004). Apoptin obsahuje funkční NLS a NES, a proto se může pohybovat mezi jádrem a cytoplazmou (Heilman et al., 2006). Kromě toho má tento protein poblíž N-konce úsek bohatý na leucin (LRS), který je důležitý pro jeho interakci s PML (Poon et al., 2005). Navíc bylo zjištěno, že apoptin může podléhat SUMOylaci (Janssen et al., 2007). Následkem přítomnosti apoptinu v transformovaných buňkách je sekvestrace APC/C komplexu v PML NBs. Je možné, že zacílení APC/C do PML NBs pomocí apoptinu hraje roli ve zprostředkování programované buněčné smrti, protože takovou sekvestrací tento komplex může být inhibován (Heilman et al., 2006). Bylo však taky ukázáno, že ani absence PML ani narušení interakce apoptinu s PML neinterferuje se schopností tohoto virového proteinu indukovat apoptózu ve transformovaných buňkách. Je pravděpodobně, že PML není vyžadován pro zprostředkování apoptózy v tomto kontextu, ale je možné, že stále má nějaký význam pro průběh CAV replikace (Janssen et al., 2007). Kromě toho otázka, jakou funkci apoptin má v samotném virovém cyklu, zůstává zatím taky neodpověděná. Je možné, že ve transformovaných buňkách nebo v buňkách s aktivovanou DDR apoptin interaguje s APC/C a to vede k zastavení G2/M přechodu, což může být prospěšné pro virovou replikaci. Dále apoptóza podporuje uvolnění virového potomstva z buněk a viry mohou poté být fagocytovány jako součásti apoptických tělísek (shrnuto ve Feng et al., 2020).

3.5 Virus hepatitidy B (HBV) a jeho interakce s PML NBs

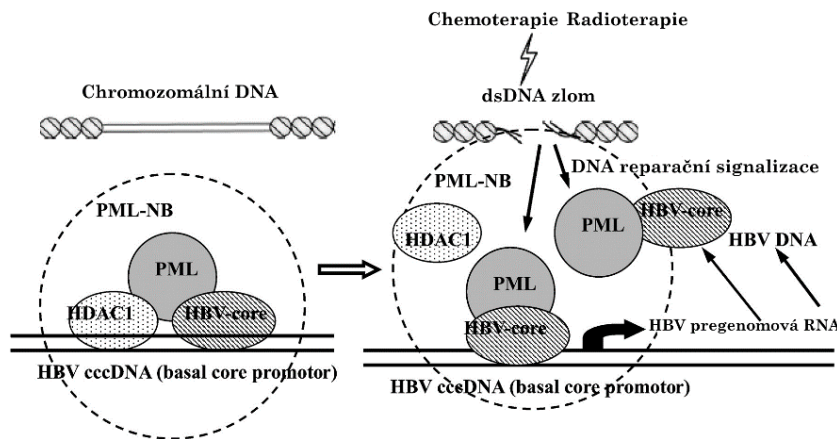
Oproti všem již zmíněným zde DNA virům je HBV unikátní, a to z toho důvodu, že má ve svém životním cyklu reverzní transkripci (RT). Viriony HBV jsou obalené a jejich průměr je přibližně 42 nm. Tento patogen patří do čeledi *Hepadnaviridae* a má genom o velikosti kolem 3.2 kbp. Genomem je relaxována kruhová DNA (rcDNA), jejíž (+) vlákno na rozdíl od (-) vlákna není úplně kompletní. HBV

genom kóduje DNA polymerázu (Pol), která má aktivitu reversní transkriptázy a je kovalentně připojená na 5' konec (-) vlákna. (+) vlákno virové DNA mimochodem má na 5' krátký RNA primer. Mezi další komponenty HBV patří strukturální protein (HBcAg) tvořící nukleokapsidu s ikosaedrální symetrií, nestrukturální sekretovaný protein (HBeAg), multifunkční regulační X protein (HBx) a povrchové glykoproteiny (HBsAg) tvořené třemi různě dlouhými verzemi téže sekvence (malý, střední a velký S protein). Po transportu do jádra, rcDNA HBV je reparována hostitelskými enzymy do podoby kovalentně uzavřené kruhové DNA (cccDNA), a během tohoto procesu dochází k odstranění výše zmíněných 5' koncových struktur. Je důležité taky zmínit, že HBV kopíruje svůj genom pomocí RT RNA intermediátů až v nově složené kapsidě. Template pro syntézu DNA v tomto případě je pregenomová RNA (pgRNA), ze které kromě toho jsou taky translatované HBcAg a Pol. V průběhu časné fázi infekci může také docházet k amplifikaci cccDNA takovým způsobem, že nové vytvořené nukleokapsidy jsou zase zacílené do jádra. Chronická HBV Infekce (CHB) může vést k rozvoji velmi závažných onemocnění je například cirhóza nebo hepatocelulární karcinom (HCC) (shrnutí v Datta et al., 2012).

Zajímavým zjištěním bylo to, že S100A10 (S100 vápník vázající protein A10) interaguje s Pol HBV při absenci dalších virových proteinů, a to vede k inhibici aktivity tohoto virového enzymu. Výsledkem takové interakce je přemístění určité frakci HBV Pol do PML NBs v jádře. Tato asociace je regulována cytosolickou koncentrací Ca^{2+} iontů. Při zvýšené koncentraci vápenatých kationtů se počet jaderných skvrn Pol-S100A10 snižuje, a to platí i opačně. Soudí se, že buněčný protein S100A10 může takto potlačovat aktivitu virové polymerázy. Pokud se vezme v úvahu to, že viry často zneužívají PML NBs, tak se dá předpokládat i zcela opačný model, kde takové interakce pomáhají transportu virového genomu do jádra pro zahájení transkripci. Fyziologický význam tohoto jevu ještě musí být prozkoumána (Choi et al., 2003).

Využití trojrozměrné konformní radioterapie (3D-CRT) v léčbě HCC může být příčinou reaktivace HBV (Kim et al., 2007). Kromě toho byla pozorována reaktivace HBV i ve spojení s chemoterapií (Yeo et al., 2009). V důsledku HBV infekce a reakce na poškození DNA se mění počet, velikost i obsah PML NBs, a tyto procesy mají určité paralely. Ukázalo se, že po radioterapii a chemoterapii dochází k rozsáhlým interakcím mezi PML, HDAC1, markerem pro chromatin s poškozením dsDNA γ -H2AX (fosforylovaný histon H2AX) a proteinem BRCA1 (protein náchylnosti k rakovině prsu typu 1) důležitým pro homologní DNA reparaci. Navíc se v takto nově formovaných PML NBs objevují HBcAg a virová DNA. Výsledkem takových asociací je celkem zajímavá pozitivní zpětnovazebná smyčka (**Obrázek 11**), které se zúčastní PML, HBcAg a HDAC. V souvislosti se signalizací vyvolané reakcí na poškození DNA, PML protein má význam ve zprostředkování iniciace pgRNA HBV transkripci, což vede ke vzniku HBcAg. Zaprvé, to posiluje virovou replikaci a, zadruhé, zvyšuje protein-proteinové interakce mezi HBcAg a PML, protože tento virový protein cílí na PML a může s ním interagovat. Taková interakce inhibuje PML-zprostředkovanou apoptózu a snižuje aktivitu HDAC závislou na PML, která ovlivňuje acetylační status „basal core“ promotoru kontrolujícího právě iniciaci transkripci

pgRNA. Zvrat represe virového promotoru zprostředkované enzymem HDAC vede ke zvýšení počtu virových transkriptů a amplifikaci HBcAg. Takže, v kontextu výše zmíněných druhů terapie se nabízí korelace mezi dynamikou PML NBs v důsledku poškození DNA a posílením HBV transkripce a replikace. Přímá interakce PML s virovým promotorem nebyla pozorována. Nicméně, PML jako součást PML NBs asociuje s HDAC1 a HBcAg, které mají schopnost vázat tento promotor (Chung & Tsai, 2009).

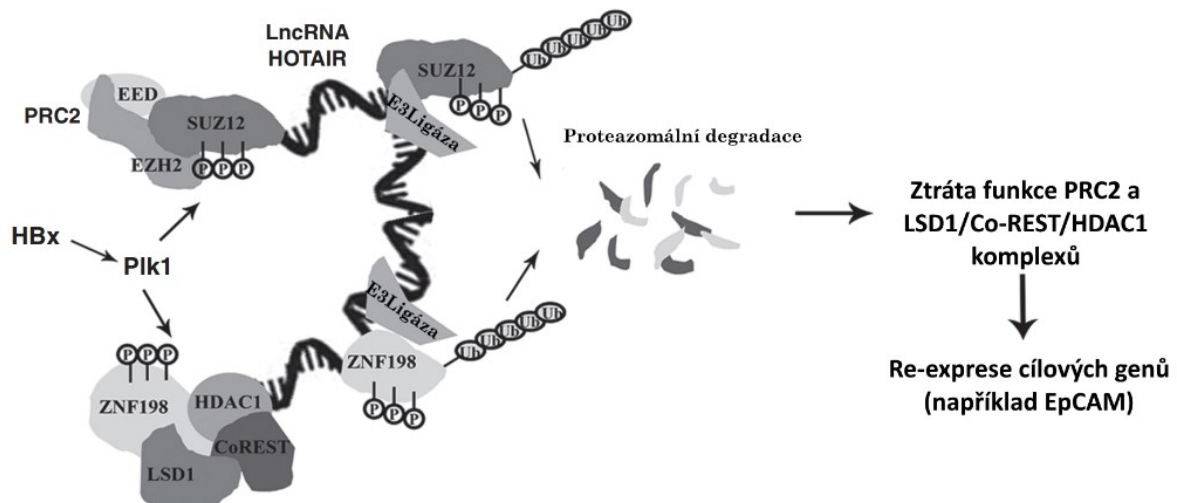


Obrázek 11: Model zpětnovazebné smyčky mezi PML, HDAC1 a HBcAg (na obrázku je popsán jako HBV-core). Za stavu bez stresových podnětů HDAC1 v PML NBs inhibuje „basal core“ promotor HBV. V důsledku DNA poškození a reparační signalizace však dochází k posílení exprese pgRNA, ze které vzniká HBcAg a pomocí RT i HBV DNA. HBcAg se dále cílí na PML a tím dochází k narušení interakce mezi HDAC1 a PML, což snižuje aktivitu HDAC1, a to ještě více posiluje virovou transkripci. Tento model by mohl přispívat k objasnění

reaktivace HBV při chemoterapie nebo radioterapie. Převzato a upraveno z (Chung & Tsai, 2009).

HBx je multifunkční regulační protein, který je vyžadován pro průběh virového životního cyklu. Kromě toho je pravděpodobné, že tento virový protein přispívá i k onkogennímu potenciálu HBV. Může se může například podílet na indukcii mitogenních drah a aktivaci některých genů, a to jak virových, tak i buněčných. HBx takovýmto způsobem ovlivňuje proliferační mechanismy buňky (shrnuto v Andrisani, 2013). Bylo zjištěno, že HBx zprostředkovává aktivaci hostitelské serin/threoninové kinázy Plk1 („polo-like“ kináza 1), a to má určitý význam v transformaci buněk (Studach et al., 2010). Jako substráty Plk1 mohou sloužit proteiny SUZ12 („polycomb“ protein SUZ12) a ZNF198 („zing finger“ protein 198) (Zhang et al., 2015). Jsou to komponenty PML NBs, které mají roli v remodelaci chromatinu. SUZ12 je spolu s EZH2 (histon methyl transferáza EZH2) a EED („polycomb“ protein EED) součástí PRC2 („polycomb“ represivní komplex 2). Funkci tohoto komplexu je trimethylace Lys 27 histonu 3 (H3K27me3) spojená s represí transkripce. Protein ZNF198 má význam v stabilizaci komplexu LSD1 (lysin demethyláza 1) -CoREST (REST korepresor 1) -HDAC1. Tento velký komplex je zajímavý tím, že má schopnost odebírat aktivační modifikace z chromatinu (shrnuto v Andrisani, 2013). Bylo pozorováno, že absence SUZ12 a ZNF198 vede k vadám DNA reparaci a také apoptózy zprostředkované proteinem p53. Je zajímavé, že během transformace zprostředkované proteinem HBx dochází ke snížení hladiny těchto proteinů, což koreluje s nárůstem hladiny Plk1. Na základě těchto pozorování bylo navrženo, že degradace SUZ12 a ZNF198 může souviset s aktivitou Plk1 (Wang et al., 2011). Později, bylo ukázáno, že tato kináza fosforyluje SUZ12 a ZNF198 (**Obrázek 12**), a to narušuje jejich asociaci s příslušnými komplexy, což dále vede k proteazomální degradaci těchto proteinů závislé na ubikvitinaci (Zhang et al., 2015). Zde je potřeba taky zmínit existenci dlouhé nekódující RNA (lncRNA) HOTAIR („HOX transcript antisense“ RNA). Je velmi zajímavé, že tato lncRNA funguje

jako platforma pro ubikvitinaci proteinů, protože je asociována s E3 ubikvitin ligázou (Yoon et al., 2013). Předpokládá se, že ubikvitinace fosforylovaných SUZ12 a ZNF198 je usnadněna právě HOTAIR (Obrázek 12), která funguje jako most mezi PRC2 a komplexem LSD1-CoREST-HDAC1. Bylo postulováno, že degradace těchto komplexů může způsobit re-expresi některých umlčených genů, jako například EpCAM (adhezivní molekula epiteliálních buněk), což může být spojeno s rozvojem nádorů. Zvýšená exprese EpCAM mimochodem může být pozorována při některých druzích HCC. Výše, popsaný model je celkem zajímavý, nicméně pro přesnější odhalení funkčních významů popsaných jevů jsou potřebné další analýzy (Zhang et al., 2015).



Obrázek 12: Model zprostředkované HBx a Plk1 degradace SUZ12 a ZNF198. HBx aktivuje kinázu Plk1, která fosforyluje SUZ12 a ZNF198 (znázorněno písmenkem 'p'), což vede k ubikvitinaci těchto proteinů (znázorněno písmenkem 'Ub'). Dále dochází k proteozomální degradaci SUZ12 a ZNF198, a tudíž ke ztrátě funkce komplexů PRC2 a LSD1-CoREST-HDAC1. Převzato a upraveno z (Zhang et al., 2015).

Během HBV infekce se buněčný komplex Smc5/6 (protein udržování struktury chromozomů 5/6) chová jako restriční faktor. Tento komplex inhibuje transkripci cccDNA HBV a virus se tomu brání tak, že zprostředkovává degradaci Smc5/6, na čemž se podílí HBx. V tomto případě HBx má schopnost interagovat s hostitelskou E3 ubikvitin ligázou a její nasměrováním na Smc5/6 může navozovat degradaci tohoto komplexu (Decorsière et al., 2016). Bylo pozorováno, že se Smc5/6 nachází v jádře hepatocytů spolu s PML a Sp100, což ukazuje na jeho lokalizaci v PML NBs. Kromě toho absence PML a Sp100 vede k rozptýlení tohoto komplexu v jádře. Takže, se zvažuje možná role spojení Smc5/6 s PML NBs pro represivní vlastnosti tohoto komplexu vůči HBV genomu. Bylo totiž ukázáno, že nepřítomnost PML a Sp100 indukuje expresi virových genů i při absenci HBx, který by způsoboval degradaci Smc5/6. Dále je nutné zmínit, že již bezprostředně po infekci již jsou detekovatelné HBx RNA a poté i samotný HBx protein, což ukazuje na to, že tento virový protein je produkován před transkripcí jiných genů. Zajímavou a neúplně vyřešenou otázkou je způsob počáteční exprese HBx, když tento protein je vyžadován pro inhibici represivní aktivity Smc5/6 k virové transkripci. Kromě toho ještě musí být prozkoumané detaily mechanismu, kterým Smc5/6 inhibuje transkripci genomu HBV. Zdá se, že PML NBs mají v tomto případě podpůrnou roli pro lokalizaci a funkci Smc5/6 (Niu et al., 2017).

Stálou komponentou PML NBs je protein Sp110 (skvrnitý protein o velikosti 110 kilodaltonů), který se podílí na modulaci genové exprese (Bloch et al., 2000). Bylo ukázáno, že Sp110 hraje také roli v HBV infekci. Když je tento protein lokalizován v PML NBs, tak je konjugován se SUMO, ale při virové infekci je deSUMOylován a uvolněn z PML NBs. Je nutné zmínit, že k takové relokizaci může dojít jenom v přítomnosti HBx, který právě interaguje se Sp110. HBx pravděpodobně takto zneužívá chromatin vazebné vlastnosti tohoto faktoru, což vede k tomu, že může být rekrutován k buněčným genům. Tam tento virový protein je asociován s dalšími transkripčními komplexy, a to má vliv na genovou expresi samotné buňky. Takovým způsobem virus tvoří vhodné prostředí pro vývoj infekci. Umlčení Sp110 má za následek snížení schopnosti HBx k lokalizaci s různými buněčnými geny. Působení na transkripci v tomto případě může být jak pozitivním, tak i negativním. Například, zvýšení exprese některých genů, může podporovat proliferaci a následně indukovat rozvoj nádoru. Naopak, bylo zjištěno, že umlčení Sp110 vede k posílení exprese některých ISG genů, kam cílí HBx, a tím pádem to znamená, že Sp110 může pomáhat HBV inhibovat expresi genů sensitivních na IFN. Souhrnně řečeno, Sp110 má význam v souvislosti s rekrutováním HBx k buněčným genům, a to posiluje nebo inhibuje jejich expresi (Sengupta et al., 2017).

Velmi nedávno bylo pozorováno, že Bay 38-7690 (heteroaryldihydropyrimidin, HAP) inhibuje maturaci HBV nukleokapsidy (Deres et al., 2003). Tato chemikálie nejenom indukuje degradaci HBcAg, ale i způsobuje formování agregátů těchto HBV komponent, a ty jsou asociované s PML NBs. Takový proces by mohl mít potenciální vliv i na složení těchto jaderných tělísek a jejich funkce, například, v souvislosti s apoptózou nebo odpovědí na poškození DNA (Huber et al., 2018).

4 Závěr

PML NBs jsou jaderné útvary, které nemají membránu a jejich hlavní součástí je samozřejmě protein PML, který tvoří primární lešení těchto struktur. Kromě toho v PML NBs jsou lokalizované různé další klientské proteiny (více než 170), a ty se tam nacházejí buď transientně nebo konstitutivně. Dynamika těchto útvarů je závislá na fázi buněčného cyklu a na různých podmínkách, jako například infekce buňky virem. Model biogeneze PML NBs se vyvíjí již dlouhou dobu a stále nejsou jasné všechny detaily tohoto procesu. V dnešní době převládá názor, že pro tvorbu primárního lešení z proteinů PML nejsou vyžadované SUMO-SIM interakce, ale je esenciální intaktní struktura RBCC motivu PML. Pomocí disulfidických můstků a různých nekovalentních interakcí, tvoří protein PML útvary vyšších řadů, a až poté díky SUMOylaci a přítomnosti SIM motivů dochází k rekrutování klientských proteinů do PML NBs. Je zajímavé, že se na formování PML NBs může podílet taky i celkem nový v biologii model LLPS, podle kterého nad určitou prahovou koncentrací proteiny mohou být fázově separované. Zde je potřeba zmínit, že *in vitro* směsi polySUMO-polySIM polymery právě vykazují vlastnosti tvořit takové bimolekulární kondenzáty. Fyziologické funkce PML NBs jsou velmi rozmanité. Tyto struktury mají význam v souvislosti s apoptózou a odpovědí na poškození DNA, podílejí se na regulaci organizace chromatinu a genové exprese. Navíc některé komponenty PML NBs souvisí s interferonovou odpovědí. PML NBs však mají nejenom antivirové, ale i provirové vlastnosti.

Cílem této bakalářské práce se bylo primárně soustředit na mnohostranné interakce těchto útvarů s malými DNA viry. Samozřejmě, pro hlubší a celkové pochopení těchto procesů jsou potřebná další studia. Interakce DNA virů s jadernými tělisky PML musí být komplexní minimálně z toho důvodu, že tyto buněčné struktury jsou velmi dynamické a proměnlivé, a tím například mohou být vysvětlené konfliktní výsledky. Navíc fyziologické významy některých takových interakcí ještě musejí být prozkoumané, a kromě toho často různé modely v tomto kontextu jsou zatím jenom hypotetické. Různé čeledi malých DNA virů odlišně interagují s PML NBs. Některé viry rozrušují nebo reorganizují tyto struktury, čímž se brání jejich antivirovým vlastnostem a při tomto procesu může taky docházet k degradaci některých komponent PML NBs. Kromě toho určité proteiny PML NBs mohou být naopak uzurpované viry, které je využívají pro podporu vlastní transkripce nebo replikace.

HAdV indukuje reorganizaci PML NBs ze sférických útvarů do vláknitých. V kontextu těchto jaderných tělísek jsou důležité takové virové proteiny jako E4-ORF3, E4-ORF4 a E1B-55K. Dva poslední zmíněné asociují s buněčnými faktory a tvoří tak E3 ubikvitin ligázu, která působí degradaci různých hostitelských proteinů včetně p53, což může vést k inhibici apoptózy. E4-ORF3 právě indukuje změnu morfologie PML NBs a je důležitý pro průběh infekce během antivirového stavu navozeného IFN signalizací. Bylo pozorováno, že PML NBs nejsou přímo asociované s RCs HAdV, ale obklopují je. Adenovirus taky dokáže zneužívat Sp100A a PML-II pro pozitivní regulaci své genové exprese. Daxx a ATRX jsou naopak represory virové infekce, a z toho důvodu adenovirus iniciuje jejich degradaci. Takže, HAdV narušuje integritu PML NBs, degraduje některé proteiny a jiné uzurpuje pro vlastní účely.

V kontextu lidského papilomaviru jsou PML NBs naopak pravděpodobně důležité pro virovou replikaci. Po infekci jsou v těchto strukturách lokalizované L2 protein a virový genom. Je hypotéza, že na začátku infekce virová DNA je chráněná ve váčku a po opuštění tohoto kompartmentu již pomocí PML. Zdá se, že PML taky může mít pozitivní roli v regulaci exprese virových genů, kdyžto Sp100 je tomto případě naopak represorem. Je možné, že zpožděný nábor Sp100 do PML NBs takto potlačuje jeho inhibiční vlastnosti vůči virové transkripci. Později by virus však mohl využívat takové represivní účinky Sp100 pro přepnutí do další fázi infekce.

Informace o některých interakcích polyomavirů s PML NBs mají kontroverzní charakter. Obecně, u polyomavirů se interakcí s PML NBs zúčastní virový LT-ag. SV40 nenarušuje integritu PML NBs, ale má s nimi asociovanou replikaci, což je výhoda například proto, že se takto může dostat k buněčným faktorům potřebným pro reparaci poškození DNA. V kontextu JCPyV není jasné, jestli PML NBs mají provirové nebo antivirové vlastnosti. V PML NBs dochází k produkci virového potomstva a zároveň bylo pozorováno, že absence proteinu PML může posílit virovou infekci. Navíc stimulace produkce PML pomocí IFN- β inhibuje infekci. BKPyV oproti jiným polyomavirům indukuje funkční reorganizaci PML NBs a pro tento proces je potřebná probíhající virová replikace. Během takové reorganizace dochází k uvolnění Daxx a Sp100 z těchto jaderných tělísek. Replikace MPyV sice může být identifikována pomocí PML NBs, ale bylo pozorováno, že absence proteinu PML nemá zásadní vliv na průběh infekce.

CAV, zástupce anellovirů, kóduje apoptin, který může sekvestrovat APC/C1 komplex v nádorových buňkách do PML NBs. Zde je možná spekulace o roli těchto jaderných tělísek v regulaci apoptózy v kontextu tohoto viru. Bylo však ukázáno, že absence PML nemá vliv na schopnosti apoptinu indukovat programovanou buněčnou smrt. Takže, fyziologický význam interakce apoptinu s PML ještě není úplně jasný.

Otázka týkající se obecného a celkového pohledu na to, jak různé proteiny HBV interagují s PML NBs zatím není úplně vyřešená. Například, při chemoterapii nebo radioterapii PML NBs souvisí s reaktivací HBV. Dále, virový protein HBx indukuje degradaci restrikčního faktoru Smc5/6 a uzurpuje Sp110 pro využití jeho chromatin vazebných vlastností. Kromě toho HBx aktivuje buněčnou Plk1 kinázu, která fosforyluje SUZ12 a ZFN198, což vede k jejich proteazomální degradaci prostřednictvím ubikvitinace. Takový proces může vést k re-expresi některých umlčených genů, což může způsobit rozvoj nádorů. Fyziologický význam interakcí některých proteinů HBV s PML NBs ještě musí být určen a, samozřejmě, musí být taky otestovány některé navržené modely.

Závěrem, PML NBs jsou velmi unikátní jaderné struktury, protože to není pouze jeden protein nebo komplex, ale je to masivní a dynamická asociace různých buněčných faktorů. Při studiu interakcí PML NBs s malými DNA viry se právě musí počítat s touto dynamikou. Myslím si, že takové studium může mít velký vliv na pochopení detailů životních cyklů virů, což je důležité pro různé medicínské aplikace. V současné době však komplexní interakce PML NBs s DNA viry jsou stále velmi málo prozkoumané.

5 Literatura

(* = přehledové články)

- Ahmad, K., & Henikoff, S. (2002). The histone variant H3.3 marks active chromatin by replication-independent nucleosome assembly. *Molecular Cell*, 9(6), 1191–1200.
- Altabef, M., Garcia, M., Lavau, C., Bae, S. C., Dejean, A., & Samarut, J. (1996). A retrovirus carrying the promyelocyte-retinoic acid receptor PML-RARalpha fusion gene transforms haematopoietic progenitors in vitro and induces acute leukaemias. *The EMBO Journal*, 15(11), 2707–2716.
- *Andrisani, O. M. (2013). Deregulation of epigenetic mechanisms by the Hepatitis B virus X protein in hepatocarcinogenesis. *Viruses*, 5(3), 858–872.
- *Aragón, L. (2018). The Smc5/6 Complex: New and old functions of the enigmatic long-distance relative. *Annual Review of Genetics*, 52, 89–107.
- Araujo, F. D., Stracker, T. H., Carson, C. T., Lee, D. v., & Weitzman, M. D. (2005). Adenovirus type 5 E4orf3 protein targets the Mre11 complex to cytoplasmic aggresomes. *Journal of Virology*, 79(17), 11382–11391.
- Aydin, I., Weber, S., Snijder, B., Samperio Ventayol, P., Kühbacher, A., Becker, M., Day, P. M., Schiller, J. T., Kann, M., Pelkmans, L., Helenius, A., & Schelhaas, M. (2014). Large scale RNAi reveals the requirement of nuclear envelope breakdown for nuclear import of human papillomaviruses. *PLoS Pathogens*, 10(5), e1004162.
- Berscheminski, J., Groitl, P., Dobner, T., Wimmer, P., & Schreiner, S. (2013). The adenoviral oncogene E1A-13S interacts with a specific isoform of the tumor suppressor PML to enhance viral transcription. *Journal of Virology*, 87(2), 965–977.
- Berscheminski, J., Wimmer, P., Brun, J., Ip, W. H., Groitl, P., Horlacher, T., Jaffray, E., Hay, R. T., Dobner, T., & Schreiner, S. (2014). Sp100 isoform-specific regulation of human adenovirus 5 gene expression. *Journal of Virology*, 88(11), 6076–6092.
- Bienkowska-Haba, M., Luszczek, W., Keiffer, T. R., Guion, L. G. M., DiGiuseppe, S., Scott, R. S., & Sapp, M. (2017). Incoming human papillomavirus 16 genome is lost in PML protein-deficient HaCaT keratinocytes. *Cellular Microbiology*, 19(5), e12708.
- Bloch, D. B., Nakajima, A., Gulick, T., Chiche, J. D., Orth, D., de La Monte, S. M., & Bloch, K. D. (2000). Sp110 localizes to the PML-Sp100 nuclear body and may function as a nuclear hormone receptor transcriptional coactivator. *Molecular and Cellular Biology*, 20(16), 6138–6146.
- Boichuk, S., Hu, L., Hein, J., & Gjoerup, O. v. (2010). Multiple DNA damage signaling and repair pathways deregulated by simian virus 40 large T antigen. *Journal of Virology*, 84(16), 8007–8020.
- Boichuk, S., Hu, L., Makielski, K., Pandolfi, P. P., & Gjoerup, O. v. (2011). Functional connection between Rad51 and PML in homology-directed repair. *PloS One*, 6(10), e25814.
- Boisvert, F. M., Hendzel, M. J., & Bazett-Jones, D. P. (2000). Promyelocytic leukemia (PML) nuclear bodies are protein structures that do not accumulate RNA. *The Journal of Cell Biology*, 148(2), 283–292.
- Bryan, T. M., Englezou, A., Dalla-Pozza, L., Dunham, M. A., & Reddel, R. R. (1997). Evidence for an alternative mechanism for maintaining telomere length in human tumors and tumor-derived cell lines. *Nature Medicine*, 3(11), 1271–1274.
- Bryan, T. M., Englezou, A., Gupta, J., Bacchetti, S., & Reddel, R. R. (1995). Telomere elongation in immortal human cells without detectable telomerase activity. *The EMBO Journal*, 14(17), 4240–4248.
- Bund, T., Spoden, G. A., Koynov, K., Hellmann, N., Boukhallouk, F., Arnold, P., Hinderberger, D., & Florin, L. (2014). An L2 SUMO interacting motif is important for PML localization and infection of human papillomavirus type 16. *Cellular Microbiology*, 16(8), 1179–1200.
- Carbone, R., Pearson, M., Minucci, S., & Pelicci, P. G. (2002). PML NBs associate with the hMre11 complex and p53 at sites of irradiation induced DNA damage. *Oncogene*, 21(11), 1633–1640.
- Carvalho, T., Seeler, J. S., Ohman, K., Jordan, P., Pettersson, U., Akusjärvi, G., Carmo-Fonseca, M., & Dejean, A. (1995). Targeting of adenovirus E1A and E4-ORF3 proteins to nuclear matrix-associated PML bodies. *The Journal of Cell Biology*, 131(1), 45–56.
- *Chang, H. R., Munkhjargal, A., Kim, M.-J., Park, S. Y., Jung, E., Ryu, J.-H., Yang, Y., Lim, J.-S., & Kim, Y. (2018). The functional roles of PML nuclear bodies in genome maintenance. *Mutation Research*, 809, 99–107.
- Chang, K. S., Fan, Y. H., Andreeff, M., Liu, J., & Mu, Z. M. (1995). The PML gene encodes a phosphoprotein associated with the nuclear matrix. *Blood*, 85(12), 3646–3653.
- Chelbi-Alix, M. K., Pelicano, L., Quignon, F., Koken, M. H., Venturini, L., Stadler, M., Pavlovic, J., Degos, L., & de Thé, H. (1995). Induction of the PML protein by interferons in normal and APL cells. *Leukemia*, 9(12), 2027–2033.

- Chen, Y., Wright, J., Meng, X., & Leppard, K. N. (2015). Promyelocytic leukemia protein isoform II promotes transcription factor recruitment to activate interferon beta and interferon-responsive gene expression. *Molecular and Cellular Biology*, 35(10), 1660–1672.
- Choi, J., Chang, J.-S., Song, M.-S., Ahn, B.-Y., Park, Y., Lim, D.-S., & Han, Y. S. (2003). Association of Hepatitis B virus polymerase with promyelocytic leukemia nuclear bodies mediated by the S100 family protein p11. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 305(4), 1049–1056.
- Chung, Y.-L., & Tsai, T.-Y. (2009). Promyelocytic leukemia nuclear bodies link the DNA damage repair pathway with Hepatitis B virus replication: implications for Hepatitis B virus exacerbation during chemotherapy and radiotherapy. *Molecular Cancer Research : MCR*, 7(10), 1672–1685.
- *Collados Rodríguez, M. (2020). The fate of speckled protein 100 (Sp100) during herpesviruses infection. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 10, 607526.
- *Corpet, A., Kleijwegt, C., Roubille, S., Juillard, F., Jacquet, K., Texier, P., & Lomonte, P. (2020). PML nuclear bodies and chromatin dynamics: catch me if you can! *Nucleic Acids Research*, 48(21), 11890–11912.
- Corpet, A., Olbrich, T., Gwerder, M., Fink, D., & Stucki, M. (2014). Dynamics of histone H3.3 deposition in proliferating and senescent cells reveals a DAXX-dependent targeting to PML-NBs important for pericentromeric heterochromatin organization. *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)*, 13(2), 249–267.
- *Datta, S., Chatterjee, S., Veer, V., & Chakravarty, R. (2012). Molecular biology of the Hepatitis B virus for clinicians. *Journal of Clinical and Experimental Hepatology*, 2(4), 353–365.
- Day, P. M., Baker, C. C., Lowy, D. R., & Schiller, J. T. (2004). Establishment of papillomavirus infection is enhanced by promyelocytic leukemia protein (PML) expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(39), 14252–14257.
- Day, P. M., Roden, R. B., Lowy, D. R., & Schiller, J. T. (1998). The papillomavirus minor capsid protein, L2, induces localization of the major capsid protein, L1, and the viral transcription/replication protein, E2, to PML oncogenic domains. *Journal of Virology*, 72(1), 142–150.
- de Thé, H., Lavau, C., Marchio, A., Chomienne, C., Degos, L., & Dejean, A. (1991). The PML-RAR alpha fusion mRNA generated by the t(15;17) translocation in acute promyelocytic leukemia encodes a functionally altered RAR. *Cell*, 66(4), 675–684.
- Deaton, A. M., Gómez-Rodríguez, M., Mieczkowski, J., Tolstorukov, M. Y., Kundu, S., Sadreyev, R. I., Jansen, L. E., & Kingston, R. E. (2016). Enhancer regions show high histone H3.3 turnover that changes during differentiation. *ELife*, 5, e15316.
- Decorsière, A., Mueller, H., van Breugel, P. C., Abdul, F., Gerossier, L., Beran, R. K., Livingston, C. M., Niu, C., Fletcher, S. P., Hantz, O., & Strubin, M. (2016). Hepatitis B virus X protein identifies the Smc5/6 complex as a host restriction factor. *Nature*, 531(7594), 386–389.
- Dellaire, G., Ching, R. W., Ahmed, K., Jalali, F., Tse, K. C. K., Bristow, R. G., & Bazett-Jones, D. P. (2006). Promyelocytic leukemia nuclear bodies behave as DNA damage sensors whose response to DNA double-strand breaks is regulated by NBS1 and the kinases ATM, Chk2, and ATR. *The Journal of Cell Biology*, 175(1), 55–66.
- Dellaire, G., Ching, R. W., Dehghani, H., Ren, Y., & Bazett-Jones, D. P. (2006). The number of PML nuclear bodies increases in early S phase by a fission mechanism. *Journal of Cell Science*, 119(Pt 6), 1026–1033.
- Dellaire, G., Eskiw, C. H., Dehghani, H., Ching, R. W., & Bazett-Jones, D. P. (2006). Mitotic accumulations of PML protein contribute to the re-establishment of PML nuclear bodies in G1. *Journal of Cell Science*, 119(Pt 6), 1034–1042.
- Deres, K., Schröder, C. H., Paessens, A., Goldmann, S., Hacker, H. J., Weber, O., Krämer, T., Niewöhner, U., Pleiss, U., Stoltefuss, J., Graef, E., Koletzki, D., Masantschek, R. N. A., Reimann, A., Jaeger, R., Gross, R., Beckermann, B., Schlemmer, K.-H., Haebich, D., & Rübsamen-Waigmann, H. (2003). Inhibition of Hepatitis B virus replication by drug-induced depletion of nucleocapsids. *Science (New York, N.Y.)*, 299(5608), 893–896.
- DiGiuseppe, S., Bienkowska-Haba, M., Guion, L. G. M., Keiffer, T. R., & Sapp, M. (2017). Human papillomavirus major capsid protein L1 remains associated with the incoming viral genome throughout the entry process. *Journal of Virology*, 91(16), e00537-17.
- DiGiuseppe, S., Luszczek, W., Keiffer, T. R., Bienkowska-Haba, M., Guion, L. G. M., & Sapp, M. J. (2016). Incoming human papillomavirus type 16 genome resides in a vesicular compartment throughout mitosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(22), 6289–6294.
- Drané, P., Ouararhni, K., Depaux, A., Shuaib, M., & Hamiche, A. (2010). The death-associated protein DAXX is a novel histone chaperone involved in the replication-independent deposition of H3.3. *Genes & Development*, 24(12), 1253–1265.
- Dunham, M. A., Neumann, A. A., Fasching, C. L., & Reddel, R. R. (2000). Telomere maintenance by recombination in human cells. *Nature Genetics*, 26(4), 447–450.

- Duprez, E., Saurin, A. J., Desterro, J. M., Lallemand-Breitenbach, V., Howe, K., Boddy, M. N., Solomon, E., de Thé, H., Hay, R. T., & Freemont, P. S. (1999). SUMO-1 modification of the acute promyelocytic leukaemia protein PML: implications for nuclear localisation. *Journal of Cell Science*, *112* (Pt 3), 381–393.
- el Bougrini, J., Dianoux, L., & Chelbi-Alix, M. K. (2011). PML positively regulates interferon gamma signaling. *Biochimie*, *93*(3), 389–398.
- Erickson, K. D., Bouchet-Marquis, C., Heiser, K., Szomolanyi-Tsuda, E., Mishra, R., Lamothe, B., Hoenger, A., & Garcea, R. L. (2012). Virion assembly factories in the nucleus of polyomavirus-infected cells. *PLoS Pathogens*, *8*(4), e1002630.
- Eskiw, C. H., Dellaire, G., & Bazett-Jones, D. P. (2004). Chromatin contributes to structural integrity of promyelocytic leukemia bodies through a SUMO-1-independent mechanism. *The Journal of Biological Chemistry*, *279*(10), 9577–9585.
- Evans, J. D., & Hearing, P. (2005). Relocalization of the Mre11-Rad50-Nbs1 complex by the adenovirus E4 ORF3 protein is required for viral replication. *Journal of Virology*, *79*(10), 6207–6215.
- Everett, R. D., Lomonte, P., Sternsdorf, T., van Driel, R., & Orr, A. (1999). Cell cycle regulation of PML modification and ND10 composition. *Journal of Cell Science*, *112* (Pt 24), 4581–4588.
- *Feng, C., Liang, Y., & Teodoro, J. G. (2020). The role of apoptin in Chicken anemia virus replication. *Pathogens (Basel, Switzerland)*, *9*(4), 294.
- Florin, L., Schäfer, F., Sotlar, K., Streeck, R. E., & Sapp, M. (2002). Reorganization of nuclear domain 10 induced by papillomavirus capsid protein I2. *Virology*, *295*(1), 97–107.
- *Gallardo, J., Pérez-Illana, M., Martín-González, N., & San Martín, C. (2021). Adenovirus structure: what is new? *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(10), 5240.
- Gasparovic, M. L., Maginnis, M. S., O'Hara, B. A., Dugan, A. S., & Atwood, W. J. (2009). Modulation of PML protein expression regulates JCV infection. *Virology*, *390*(2), 279–288.
- Grisolano, J. L., Wesselschmidt, R. L., Pelicci, P. G., & Ley, T. J. (1997). Altered myeloid development and acute leukemia in transgenic mice expressing PML-RAR alpha under control of cathepsin G regulatory sequences. *Blood*, *89*(2), 376–387.
- Grötzinger, T., Jensen, K., & Will, H. (1996). The interferon (IFN)-stimulated gene Sp100 promoter contains an IFN-gamma activation site and an imperfect IFN-stimulated response element which mediate type I IFN inducibility. *The Journal of Biological Chemistry*, *271*(41), 25253–25260.
- Guion, L., Bienkowska-Haba, M., DiGiuseppe, S., Florin, L., & Sapp, M. (2019). PML nuclear body-residing proteins sequentially associate with HPV genome after infectious nuclear delivery. *PLoS Pathogens*, *15*(2), e1007590.
- Guldner, H. H., Szosteki, C., Grötzinger, T., & Will, H. (1992). IFN enhance expression of Sp100, an autoantigen in primary biliary cirrhosis. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *149*(12), 4067–4073.
- Haupt, Y., Alexander, W. S., Barri, G., Klinken, S. P., & Adams, J. M. (1991). Novel zinc finger gene implicated as myc collaborator by retrovirally accelerated lymphomagenesis in E mu-myc transgenic mice. *Cell*, *65*(5), 753–763.
- Heilman, D. W., Teodoro, J. G., & Green, M. R. (2006). Apoptin nucleocytoplasmic shuttling is required for cell type-specific localization, apoptosis, and recruitment of the anaphase-promoting complex/cyclosome to PML bodies. *Journal of Virology*, *80*(15), 7535–7545.
- Higginbotham, J. M., & O'Shea, C. C. (2015). Adenovirus E4-ORF3 Targets PIAS3 and together with E1B-55K remodels SUMO interactions in the nucleus and at virus genome replication domains. *Journal of Virology*, *89*(20), 10260–10272.
- Hollenbach, A. D., McPherson, C. J., Mientjes, E. J., Iyengar, R., & Grosveld, G. (2002). Daxx and histone deacetylase II associate with chromatin through an interaction with core histones and the chromatin-associated protein Dek. *Journal of Cell Science*, *115*(Pt 16), 3319–3330.
- Hoppe, A., Beech, S. J., Dimmock, J., & Leppard, K. N. (2006). Interaction of the adenovirus type 5 E4 Orf3 protein with promyelocytic leukemia protein isoform II is required for ND10 disruption. *Journal of Virology*, *80*(6), 3042–3049.
- Huber, A. D., Wolf, J. J., Liu, D., Gres, A. T., Tang, J., Boschert, K. N., Puray-Chavez, M. N., Pineda, D. L., Laughlin, T. G., Coonrod, E. M., Yang, Q., Ji, J., Kirby, K. A., Wang, Z., & Sarafianos, S. G. (2018). The heteroaryldihydropyrimidine Bay 38-7690 induces Hepatitis B virus core protein aggregates associated with promyelocytic leukemia nuclear bodies in infected cells. *MSphere*, *3*(2), e00131-18.
- Ishii, N., Minami, N., Chen, E. Y., Medina, A. L., Chico, M. M., & Kasamatsu, H. (1996). Analysis of a nuclear localization signal of simian virus 40 major capsid protein Vp1. *Journal of Virology*, *70*(2), 1317–1322.
- Ishov, A. M., & Maul, G. G. (1996). The periphery of nuclear domain 10 (ND10) as site of DNA virus deposition. *The Journal of Cell Biology*, *134*(4), 815–826.

- Ishov, A. M., Sotnikov, A. G., Negorev, D., Vladimirova, O. v, Neff, N., Kamitani, T., Yeh, E. T., Strauss, J. F., & Maul, G. G. (1999). PML is critical for ND10 formation and recruits the PML-interacting protein daxx to this nuclear structure when modified by SUMO-1. *The Journal of Cell Biology*, 147(2), 221–234.
- Ishov, A. M., Vladimirova, O. v, & Maul, G. G. (2004). Heterochromatin and ND10 are cell-cycle regulated and phosphorylation-dependent alternate nuclear sites of the transcription repressor Daxx and SWI/SNF protein ATRX. *Journal of Cell Science*, 117(Pt 17), 3807–3820.
- Jang, M.-S., Ryu, S.-W., & Kim, E. (2002). Modification of Daxx by small ubiquitin-related modifier-1. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 295(2), 495–500.
- Janssen, K., Hofmann, T. G., Jans, D. A., Hay, R. T., Schulze-Osthoff, K., & Fischer, U. (2007). Apoptin is modified by SUMO conjugation and targeted to promyelocytic leukemia protein nuclear bodies. *Oncogene*, 26(11), 1557–1566.
- Jeanne, M., Lallemand-Breitenbach, V., Ferhi, O., Koken, M., le Bras, M., Duffort, S., Peres, L., Berthier, C., Soillihi, H., Raught, B., & de Thé, H. (2010). PML/RARA oxidation and arsenic binding initiate the antileukemia response of As₂O₃. *Cancer Cell*, 18(1), 88–98.
- Jensen, K., Shiels, C., & Freemont, P. S. (2001). PML protein isoforms and the RBCC/TRIM motif. *Oncogene*, 20(49), 7223–7233.
- Jiang, M., Entezami, P., Gamez, M., Stamminger, T., & Imperiale, M. J. (2011). Functional reorganization of promyelocytic leukemia nuclear bodies during BK virus infection. *MBio*, 2(1), e00281-10.
- Jiang, W. Q., Szekely, L., Klein, G., & Ringertz, N. (1996). Intranuclear redistribution of SV40T, p53, and PML in a conditionally SV40T-immortalized cell line. *Experimental Cell Research*, 229(2), 289–300.
- Jul-Larsen, A., Grudic, A., Bjerkvig, R., & Bøe, S. O. (2009). Cell-cycle regulation and dynamics of cytoplasmic compartments containing the promyelocytic leukemia protein and nucleoporins. *Journal of Cell Science*, 122(Pt 8), 1201–1210.
- *Kaczorowska, J., & van der Hoek, L. (2020). Human anelloviruses: diverse, omnipresent and commensal members of the virome. *FEMS Microbiology Reviews*, 44(3), 305–313.
- Kamitani, T., Kito, K., Nguyen, H. P., Wada, H., Fukuda-Kamitani, T., & Yeh, E. T. (1998). Identification of three major sentrinization sites in PML. *The Journal of Biological Chemistry*, 273(41), 26675–26682.
- Kamitani, T., Nguyen, H. P., Kito, K., Fukuda-Kamitani, T., & Yeh, E. T. (1998). Covalent modification of PML by the sentrin family of ubiquitin-like proteins. *The Journal of Biological Chemistry*, 273(6), 3117–3120.
- Kamitani, T., Nguyen, H. P., & Yeh, E. T. (1997). Preferential modification of nuclear proteins by a novel ubiquitin-like molecule. *The Journal of Biological Chemistry*, 272(22), 14001–14004.
- Karow, J. K., Chakraverty, R. K., & Hickson, I. D. (1997). The Bloom's syndrome gene product is a 3'-5' DNA helicase. *The Journal of Biological Chemistry*, 272(49), 30611–30614.
- Kastner, P., Perez, A., Lutz, Y., Rochette-Egly, C., Gaub, M. P., Durand, B., Lanotte, M., Berger, R., & Chambon, P. (1992). Structure, localization and transcriptional properties of two classes of retinoic acid receptor alpha fusion proteins in acute promyelocytic leukemia (APL): structural similarities with a new family of oncoproteins. *The EMBO Journal*, 11(2), 629–642.
- Kim, J. H., Park, J.-W., Kim, T. H., Koh, D. W., Lee, W. J., & Kim, C.-M. (2007). Hepatitis B virus reactivation after three-dimensional conformal radiotherapy in patients with Hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma. *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics*, 69(3), 813–819.
- Knipscheer, P., Flotho, A., Klug, H., Olsen, J. v, van Dijk, W. J., Fish, A., Johnson, E. S., Mann, M., Sixma, T. K., & Pichler, A. (2008). Ubc9 sumoylation regulates SUMO target discrimination. *Molecular Cell*, 31(3), 371–382.
- Komatsu, T., Nagata, K., & Wodrich, H. (2016). An adenovirus DNA replication factor, but not incoming genome complexes, targets PML nuclear bodies. *Journal of Virology*, 90(3), 1657–1667.
- Kuo, H.-Y., Chang, C.-C., Jeng, J.-C., Hu, H.-M., Lin, D.-Y., Maul, G. G., Kwok, R. P. S., & Shih, H.-M. (2005). SUMO modification negatively modulates the transcriptional activity of CREB-binding protein via the recruitment of Daxx. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(47), 16973–16978.
- Kurihara, M., Kato, K., Sanbo, C., Shigenobu, S., Ohkawa, Y., Fuchigami, T., & Miyanari, Y. (2020). Genomic profiling by ALaP-Seq reveals transcriptional regulation by PML bodies through DNMT3A exclusion. *Molecular Cell*, 78(3), 493-505.e8.
- Lallemand-Breitenbach, V., Zhu, J., Puvion, F., Koken, M., Honoré, N., Doubeikovsky, A., Duprez, E., Pandolfi, P. P., Puvion, E., Freemont, P., & de Thé, H. (2001). Role of promyelocytic leukemia (PML) sumolation in nuclear body formation, 11S proteasome recruitment, and As₂O₃-induced PML or PML/retinoic acid receptor alpha degradation. *The Journal of Experimental Medicine*, 193(12), 1361–1371.

- LaMorte, V. J., Dyck, J. A., Ochs, R. L., & Evans, R. M. (1998). Localization of nascent RNA and CREB binding protein with the PML-containing nuclear body. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *95*(9), 4991–4996.
- Lång, A., Eriksson, J., Schink, K. O., Lång, E., Blicher, P., Poleć, A., Brech, A., Dalhus, B., & Bøe, S. O. (2017). Visualization of PML nuclear import complexes reveals FG-repeat nucleoporins at cargo retrieval sites. *Nucleus (Austin, Tex.)*, *8*(4), 404–420.
- Lang, M., Jegou, T., Chung, I., Richter, K., Münch, S., Udvarhelyi, A., Cremer, C., Hemmerich, P., Engelhardt, J., Hell, S. W., & Rippe, K. (2010). Three-dimensional organization of promyelocytic leukemia nuclear bodies. *Journal of Cell Science*, *123*(Pt 3), 392–400.
- Le, X. F., Yang, P., & Chang, K. S. (1996). Analysis of the growth and transformation suppressor domains of promyelocytic leukemia gene, PML. *The Journal of Biological Chemistry*, *271*(1), 130–135.
- Lewis, P. W., Elsaesser, S. J., Noh, K.-M., Stadler, S. C., & Allis, C. D. (2010). Daxx is an H3.3-specific histone chaperone and cooperates with ATRX in replication-independent chromatin assembly at telomeres. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *107*(32), 14075–14080.
- Li, C., Peng, Q., Wan, X., Sun, H., & Tang, J. (2017). C-terminal motifs in promyelocytic leukemia protein isoforms critically regulate PML nuclear body formation. *Journal of Cell Science*, *130*(20), 3496–3506.
- Li, H., Leo, C., Zhu, J., Wu, X., O'Neil, J., Park, E. J., & Chen, J. D. (2000). Sequestration and inhibition of Daxx-mediated transcriptional repression by PML. *Molecular and Cellular Biology*, *20*(5), 1784–1796.
- Li, Y., Ma, X., Chen, Z., Wu, H., Wang, P., Wu, W., Cheng, N., Zeng, L., Zhang, H., Cai, X., Chen, S.-J., Chen, Z., & Meng, G. (2019). B1 oligomerization regulates PML nuclear body biogenesis and leukemogenesis. *Nature Communications*, *10*(1), 3789.
- Lin, D.-Y., Huang, Y.-S., Jeng, J.-C., Kuo, H.-Y., Chang, C.-C., Chao, T.-T., Ho, C.-C., Chen, Y.-C., Lin, T.-P., Fang, H.-I., Hung, C.-C., Suen, C.-S., Hwang, M.-J., Chang, K.-S., Maul, G. G., & Shih, H.-M. (2006). Role of SUMO-interacting motif in Daxx SUMO modification, subnuclear localization, and repression of sumoylated transcription factors. *Molecular Cell*, *24*(3), 341–354.
- Liu, Y., Shevchenko, A., Shevchenko, A., & Berk, A. J. (2005). Adenovirus exploits the cellular aggresome response to accelerate inactivation of the MRN complex. *Journal of Virology*, *79*(22), 14004–14016.
- Louria-Hayon, I., Grossman, T., Sionov, R. V., Alsheich, O., Pandolfi, P. P., & Haupt, Y. (2003). The promyelocytic leukemia protein protects p53 from Mdm2-mediated inhibition and degradation. *The Journal of Biological Chemistry*, *278*(35), 33134–33141.
- *Mahmud, I., & Liao, D. (2019). DAXX in cancer: phenomena, processes, mechanisms and regulation. *Nucleic Acids Research*, *47*(15), 7734–7752.
- *Mao, Y. S., Zhang, B., & Spector, D. L. (2011). Biogenesis and function of nuclear bodies. *Trends in Genetics : TIG*, *27*(8), 295–306.
- Marusic, M. B., Mencin, N., Licen, M., Banks, L., & Grm, H. S. (2010). Modification of human papillomavirus minor capsid protein L2 by sumoylation. *Journal of Virology*, *84*(21), 11585–11589.
- *Michalska, A., Blaszczyk, K., Wesoly, J., & Bluysen, H. A. R. (2018). A positive feedback amplifier circuit that regulates interferon (IFN)-stimulated gene expression and controls type I and type II IFN responses. *Frontiers in Immunology*, *9*, 1135.
- Mirzoeva, O. K., & Petrini, J. H. (2001). DNA damage-dependent nuclear dynamics of the Mre11 complex. *Molecular and Cellular Biology*, *21*(1), 281–288.
- Mu, Z. M., Le, X. F., Vallian, S., Glassman, A. B., & Chang, K. S. (1997). Stable overexpression of PML alters regulation of cell cycle progression in HeLa cells. *Carcinogenesis*, *18*(11), 2063–2069.
- *Mui, U. N., Haley, C. T., & Tyring, S. K. (2017). Viral oncology: molecular biology and pathogenesis. *Journal of Clinical Medicine*, *6*(12), 111.
- Müller, S., Matunis, M. J., & Dejean, A. (1998). Conjugation with the ubiquitin-related modifier SUMO-1 regulates the partitioning of PML within the nucleus. *The EMBO Journal*, *17*(1), 61–70.
- Müncheberg, S., Hay, R. T., Ip, W. H., Meyer, T., Weiß, C., Brenke, J., Masser, S., Hadian, K., Dobner, T., & Schreiner, S. (2018). E1B-55K-mediated regulation of RNF4 SUMO-targeted ubiquitin ligase promotes human adenovirus genee. *Journal of Virology*, *92*(13), e00164-18.
- Niu, C., Livingston, C. M., Li, L., Beran, R. K., Daffis, S., Ramakrishnan, D., Burdette, D., Peiser, L., Salas, E., Ramos, H., Yu, M., Cheng, G., Strubin, M., Delaney, W. E., & Fletcher, S. P. (2017). The Smc5/6 complex restricts HBV when localized to ND10 without inducing an innate immune response and is counteracted by the HBV X protein shortly after infection. *PLoS One*, *12*(1), e0169648.

- Noteborn, M. H., Todd, D., Verschueren, C. A., de Gauw, H. W., Curran, W. L., Veldkamp, S., Douglas, A. J., McNulty, M. S., van der EB, A. J., & Koch, G. (1994). A single Chicken anemia virus protein induces apoptosis. *Journal of Virology*, *68*(1), 346–351.
- Osterwald, S., Deeg, K. I., Chung, I., Parisotto, D., Wörz, S., Rohr, K., Erfle, H., & Rippe, K. (2015). PML induces compaction, TRF2 depletion and DNA damage signaling at telomeres and promotes their alternative lengthening. *Journal of Cell Science*, *128*(10), 1887–1900.
- Ou, H. D., Kwiatkowski, W., Deerinck, T. J., Noske, A., Blain, K. Y., Land, H. S., Soria, C., Powers, C. J., May, A. P., Shu, X., Tsien, R. Y., Fitzpatrick, J. A. J., Long, J. A., Ellisman, M. H., Choe, S., & O’Shea, C. C. (2012). A structural basis for the assembly and functions of a viral polymer that inactivates multiple tumor suppressors. *Cell*, *151*(2), 304–319.
- Padgett, B. L., Walker, D. L., ZuRhein, G. M., Eckroade, R. J., & Dessel, B. H. (1971). Cultivation of papova-like virus from human brain with progressive multifocal leucoencephalopathy. *Lancet (London, England)*, *1*(7712), 1257–1260.
- *Patra, U., & Müller, S. (2021). A tale of usurpation and subversion: SUMO-dependent integrity of promyelocytic leukemia nuclear bodies at the crossroad of infection and immunity. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, *9*, 696234.
- Poon, I. K. H., Oro, C., Dias, M. M., Zhang, J., & Jans, D. A. (2005). Apoptin nuclear accumulation is modulated by a CRM1-recognized nuclear export signal that is active in normal but not in tumor cells. *Cancer Research*, *65*(16), 7059–7064.
- *Prado, J. C. M., Monezi, T. A., Amorim, A. T., Lino, V., Paladino, A., & Boccardo, E. (2018). Human polyomaviruses and cancer: an overview. *Clinics (Sao Paulo, Brazil)*, *73*(suppl 1), e558s.
- Puto, L. A., & Reed, J. C. (2008). Daxx represses RelB target promoters via DNA methyltransferase recruitment and DNA hypermethylation. *Genes & Development*, *22*(8), 998–1010.
- Querido, E., Blanchette, P., Yan, Q., Kamura, T., Morrison, M., Boivin, D., Kaelin, W. G., Conaway, R. C., Conaway, J. W., & Branton, P. E. (2001). Degradation of p53 by adenovirus E4orf6 and E1B55K proteins occurs via a novel mechanism involving a Cullin-containing complex. *Genes & Development*, *15*(23), 3104–3117.
- Sahin, U., Ferhi, O., Jeanne, M., Benhenda, S., Berthier, C., Jollivet, F., Niwa-Kawakita, M., Faklaris, O., Setterblad, N., de Thé, H., & Lallemand-Breitenbach, V. (2014). Oxidative stress-induced assembly of PML nuclear bodies controls sumoylation of partner proteins. *The Journal of Cell Biology*, *204*(6), 931–945.
- Schreiner, S., Bürck, C., Glass, M., Groitl, P., Wimmer, P., Kinkley, S., Mund, A., Everett, R. D., & Dobner, T. (2013). Control of human adenovirus type 5 gene expression by cellular Daxx/ATRAX chromatin-associated complexes. *Nucleic Acids Research*, *41*(6), 3532–3550.
- Schreiner, S., Martinez, R., Groitl, P., Rayne, F., Vaillant, R., Wimmer, P., Bossis, G., Sternsdorf, T., Marcinowski, L., Ruzsics, Z., Dobner, T., & Wodrich, H. (2012). Transcriptional activation of the adenoviral genome is mediated by capsid protein VI. *PLoS Pathogens*, *8*(2), e1002549.
- Schreiner, S., Wimmer, P., Sirma, H., Everett, R. D., Blanchette, P., Groitl, P., & Dobner, T. (2010). Proteasome-dependent degradation of Daxx by the viral E1B-55K protein in human adenovirus-infected cells. *Journal of Virology*, *84*(14), 7029–7038.
- Seeler, J. S., Marchio, A., Sitterlin, D., Transy, C., & Dejean, A. (1998). Interaction of SP100 with HP1 proteins: a link between the promyelocytic leukemia-associated nuclear bodies and the chromatin compartment. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *95*(13), 7316–7321.
- Sengupta, I., Das, D., Singh, S. P., Chakravarty, R., & Das, C. (2017). Host transcription factor Speckled 110 kDa (Sp110), a nuclear body protein, is hijacked by Hepatitis B virus protein X for viral persistence. *The Journal of Biological Chemistry*, *292*(50), 20379–20393.
- Shay, J. W., West, M. D., & Wright, W. E. (n.d.). Re-expression of senescent markers in deinduced reversibly immortalized cells. *Experimental Gerontology*, *27*(5–6), 477–492.
- Shen, T. H., Lin, H.-K., Scaglioni, P. P., Yung, T. M., & Pandolfi, P. P. (2006). The mechanisms of PML-nuclear body formation. *Molecular Cell*, *24*(3), 331–339.
- Shishido-Hara, Y., Hara, Y., Larson, T., Yasui, K., Nagashima, K., & Stoner, G. L. (2000). Analysis of capsid formation of human polyomavirus JC (Tokyo-1 strain) by a eukaryotic expression system: splicing of late RNAs, translation and nuclear transport of major capsid protein VP1, and capsid assembly. *Journal of Virology*, *74*(4), 1840–1853.
- Shishido-Hara, Y., Higuchi, K., Ohara, S., Duyckaerts, C., Hauw, J.-J., & Uchihara, T. (2008). Promyelocytic leukemia nuclear bodies provide a scaffold for human polyomavirus JC replication and are disrupted after development of viral inclusions in progressive multifocal leucoencephalopathy. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, *67*(4), 299–308.

- Shishido-Hara, Y., Ichinose, S., Higuchi, K., Hara, Y., & Yasui, K. (2004). Major and minor capsid proteins of human polyomavirus JC cooperatively accumulate to nuclear domain 10 for assembly into virions. *Journal of Virology*, 78(18), 9890–9903.
- Shishido-Hara, Y., Yazawa, T., Nagane, M., Higuchi, K., Abe-Suzuki, S., Kurata, M., Kitagawa, M., Kamma, H., & Uchihara, T. (2014). JC virus inclusions in progressive multifocal leukoencephalopathy: scaffolding promyelocytic leukemia nuclear bodies grow with cell cycle transition through an S-to-G2-like state in enlarging oligodendrocyte nuclei. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 73(5), 442–453.
- Sohn, S.-Y., & Hearing, P. (2012). Adenovirus regulates sumoylation of Mre11-Rad50-Nbs1 components through a paralogue-specific mechanism. *Journal of Virology*, 86(18), 9656–9665.
- Sohn, S.-Y., & Hearing, P. (2016). The adenovirus E4-ORF3 protein functions as a SUMO E3 ligase for TIF-1 γ sumoylation and poly-SUMO chain elongation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(24), 6725–6730.
- Song, J., Durrin, L. K., Wilkinson, T. A., Krontiris, T. G., & Chen, Y. (2004). Identification of a SUMO-binding motif that recognizes SUMO-modified proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(40), 14373–14378.
- Song, J. J., & Lee, Y. J. (2003). Role of the ASK1-SEK1-JNK1-HIPK1 signal in Daxx trafficking and ASK1 oligomerization. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(47), 47245–47252.
- Song, J. J., & Lee, Y. J. (2004). Tryptophan 621 and serine 667 residues of Daxx regulate its nuclear export during glucose deprivation. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(29), 30573–30578.
- Stadler, M., Chelbi-Alix, M. K., Koken, M. H., Venturini, L., Lee, C., Saïb, A., Quignon, F., Pelicano, L., Guillemain, M. C., & Schindler, C. (1995). Transcriptional induction of the PML growth suppressor gene by interferons is mediated through an ISRE and a GAS element. *Oncogene*, 11(12), 2565–2573.
- Stepp, W. H., Meyers, J. M., & McBride, A. A. (2013). Sp100 provides intrinsic immunity against human papillomavirus infection. *MBio*, 4(6), e00845-13.
- Stepp, W. H., Stamos, J. D., Khurana, S., Warburton, A., & McBride, A. A. (2017). Sp100 colocalizes with HPV replication foci and restricts the productive stage of the infectious cycle. *PLoS Pathogens*, 13(10), e1006660.
- Sternsdorf, T., Jensen, K., Reich, B., & Will, H. (1999). The nuclear dot protein sp100, characterization of domains necessary for dimerization, subcellular localization, and modification by small ubiquitin-like modifiers. *The Journal of Biological Chemistry*, 274(18), 12555–12566.
- Sternsdorf, T., Jensen, K., & Will, H. (1997). Evidence for covalent modification of the nuclear dot-associated proteins PML and Sp100 by PIC1/SUMO-1. *The Journal of Cell Biology*, 139(7), 1621–1634.
- Stracker, T. H., Carson, C. T., & Weitzman, M. D. (2002). Adenovirus oncoproteins inactivate the Mre11-Rad50-NBS1 DNA repair complex. *Nature*, 418(6895), 348–352.
- Stubbe, M., Mai, J., Paulus, C., Stubbe, H. C., Berscheminski, J., Karimi, M., Hofmann, S., Weber, E., Hadian, K., Hay, R., Groitl, P., Nevels, M., Dobner, T., & Schreiner, S. (2020). Viral DNA binding protein SUMOylation promotes PML nuclear body localization next to viral replication centers. *MBio*, 11(2), e00049-20.
- Studach, L., Wang, W.-H., Weber, G., Tang, J., Hullinger, R. L., Malbrue, R., Liu, X., & Andrisani, O. (2010). Polo-like kinase 1 activated by the Hepatitis B virus X protein attenuates both the DNA damage checkpoint and DNA repair resulting in partial polyploidy. *The Journal of Biological Chemistry*, 285(39), 30282–30293.
- Szosteck, C., Krippner, H., Penner, E., & Bautz, F. A. (1987). Autoimmune sera recognize a 100 kD nuclear protein antigen (sp-100). *Clinical and Experimental Immunology*, 68(1), 108–116.
- Tang, Q., Bell, P., Tegtmeyer, P., & Maul, G. G. (2000). Replication but not transcription of simian virus 40 DNA is dependent on nuclear domain 10. *Journal of Virology*, 74(20), 9694–9700.
- *Tatsis, N., & Ertl, H. C. J. (2004). Adenoviruses as vaccine vectors. *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy*, 10(4), 616–629.
- Teodoro, J. G., Heilman, D. W., Parker, A. E., & Green, M. R. (2004). The viral protein Apoptin associates with the anaphase-promoting complex to induce G2/M arrest and apoptosis in the absence of p53. *Genes & Development*, 18(16), 1952–1957.
- Ulbricht, T., Alzrigat, M., Horch, A., Reuter, N., von Mikecz, A., Steimle, V., Schmitt, E., Krämer, O. H., Stamminger, T., & Hemmerich, P. (2012). PML promotes MHC class II gene expression by stabilizing the class II transactivator. *The Journal of Cell Biology*, 199(1), 49–63.
- Ullman, A. J., & Hearing, P. (2008). Cellular proteins PML and Daxx mediate an innate antiviral defense antagonized by the adenovirus E4 ORF3 protein. *Journal of Virology*, 82(15), 7325–7335.
- Ullman, A. J., Reich, N. C., & Hearing, P. (2007). Adenovirus E4 ORF3 protein inhibits the interferon-mediated antiviral response. *Journal of Virology*, 81(9), 4744–4752.

- Wang, P., Benhenda, S., Wu, H., Lallemand-Breitenbach, V., Zhen, T., Jollivet, F., Peres, L., Li, Y., Chen, S.-J., Chen, Z., de Thé, H., & Meng, G. (2018). RING tetramerization is required for nuclear body biogenesis and PML sumoylation. *Nature Communications*, *9*(1), 1277.
- Wang, R., Li, K., Zhou, C., Xue, J., Ji, C., & Chen, J. (2011). Cdc20 mediates D-box-dependent degradation of Sp100. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *415*(4), 702–706.
- Wang, W.-H., Studach, L. L., & Andrisani, O. M. (2011). Proteins ZNF198 and SUZ12 are down-regulated in Hepatitis B virus (HBV) X protein-mediated hepatocyte transformation and in HBV replication. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, *53*(4), 1137–1147.
- Weiden, M. D., & Ginsberg, H. S. (1994). Deletion of the E4 region of the genome produces adenovirus DNA concatemers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *91*(1), 153–157.
- Xu, Z.-X., Timanova-Atanasova, A., Zhao, R.-X., & Chang, K.-S. (2003). PML colocalizes with and stabilizes the DNA damage response protein TopBP1. *Molecular and Cellular Biology*, *23*(12), 4247–4256.
- Yang, X., Khosravi-Far, R., Chang, H. Y., & Baltimore, D. (1997). Daxx, a novel Fas-binding protein that activates JNK and apoptosis. *Cell*, *89*(7), 1067–1076.
- Yeager, T. R., Neumann, A. A., Englezou, A., Huschtscha, L. I., Noble, J. R., & Reddel, R. R. (1999). Telomerase-negative immortalized human cells contain a novel type of promyelocytic leukemia (PML) body. *Cancer Research*, *59*(17), 4175–4179.
- Yeo, W., Chan, T. C., Leung, N. W. Y., Lam, W. Y., Mo, F. K. F., Chu, M. T., Chan, H. L. Y., Hui, E. P., Lei, K. I. K., Mok, T. S. K., & Chan, P. K. S. (2009). Hepatitis B virus reactivation in lymphoma patients with prior resolved Hepatitis B undergoing anticancer therapy with or without rituximab. *Journal of Clinical Oncology : Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, *27*(4), 605–611.
- Yoon, J.-H., Abdelmohsen, K., Kim, J., Yang, X., Martindale, J. L., Tominaga-Yamanaka, K., White, E. J., Orjalo, A. v, Rinn, J. L., Kreft, S. G., Wilson, G. M., & Gorospe, M. (2013). Scaffold function of long non-coding RNA HOTAIR in protein ubiquitination. *Nature Communications*, *4*, 2939.
- Zhang, H., Diab, A., Fan, H., Mani, S. K. K., Hullinger, R., Merle, P., & Andrisani, O. (2015). PLK1 and HOTAIR accelerate proteasomal degradation of SUZ12 and ZNF198 during Hepatitis B virus-induced liver carcinogenesis. *Cancer Research*, *75*(11), 2363–2374.
- Zhang, X., Zhao, D., Xiong, X., He, Z., & Li, H. (2016). Multifaceted histone H3 methylation and phosphorylation readout by the plant homeodomain finger of human nuclear antigen Sp100C. *The Journal of Biological Chemistry*, *291*(24), 12786–12798.
- Zhong, S., Hu, P., Ye, T. Z., Stan, R., Ellis, N. A., & Pandolfi, P. P. (1999). A role for PML and the nuclear body in genomic stability. *Oncogene*, *18*(56), 7941–7947.