# PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA UNIVERZITY KARVOVY V PRAZE

KATEDRA GENETIKY A MIKROBIOLOGIE

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

# Porovnání proteomů členů čeledi Polyomaviridae

Violeta Bakardjieva – Mihaylova

Školitel: RNDr. Alena Morávková, Ph.D.

**2009/2010**

Prohlašuji, že jsem pracovala samostatně za použití materiálů uvedených v seznamu literatury.

Praha 2010 Violeta Bakardjieva - Mihaylova

## Abstrakt

Polyomaviry jsou malé neobalené DNA viry. Nejvýznamnějšími zástupci jsou myší polyomavirus (MPyV), opičí vakuolující polyomavirus (SV40) a lidské viry BK, JC, KI, WU a poslední objevený virus karcinomu Merkelových buněk (MCCPyV). Velká část pozornosti věnované polyomavirům je zaměřená na jejich schopnost transformovat napadené buňky a v určitých případech nastartovat zhoubné bujení. Pro pochopení těchto mechanismů je nezbytné detailní poznání genomu těchto viru a funkce jednotlivých produktů vznikajících při infekci.

Tato práce se věnuje srovnání strukturních proteinů nejprostudovanějších polyomavirů s ohledem na jejich multifunkčnost a zapojení do většina dějů během životního cyklu viru.

## Klíčová slova

DNA viry, strukturní proteiny, polyomaviry, VP1, VP2, VP3

## Abstract

Polyomaviruses are small non–enveloped viruses. The most important representative are murine polyomavirus (MPyV), simian virus (SV40) and human viruses BK, JC, KI, WU and the newly discovered human Merkel cell virus (MCCPyV). Major attention payed to polyomaviruses is focused on their ability to transform affected cells and in some cases cause malignancy. For understanding of these events is necessary to acquire detail knowledge of their genome and appointment of individual protein products generate during infection.

This work is dedicated to the comparision of most studied structural proteins of polyomaviruses with reference to their multifunctionality and engagement to most events during virus life-cycle.

## Key words

DNA viruses, strustural proteins, polyomaviruses, VP1, VP2, VP3

1 Úvod: ..... 5
2 Polyomaviry: ..... 6
2.1 Polyomaviry jako lidské patogeny: ..... 7
3 Události během časné fáze infekce: ..... 11
3.1 Vstup do buňky: ..... 15
3.2 Vstup do jádra: ..... 15
4 Vlastnosti strukturních proteinů polyomavirů ..... 16
4.1 Hlavní strukturní protein VP1 ..... 17
4.1.1 Interakce VP1 s minoritními strukturními proteiny: ..... 22
5 Minoritní strukturní proteiny polyomavirů: VP2 a VP3 ..... 22
5.1 Myristilace VP2: ..... 24
5.2 Úloha minoritního proteinu VP3: ..... 25
5.2.1 Porovnání C – terminálního konce VP3 proteinu u mPyV a SV40: ..... 27
6 Závěr ..... 30
7 Seznam použité literatury: ..... 31

# 1 Úvod

Polyomaviry jsou malé neobalené DNA viry. Jejich genomem je dvouvláknová kruhová molekula DNA o velikosti přibližně 5,3 kilobází v superhelikalné podobě. Polyomaviry jsou široce rozšířeny mezi obratlovci jako jsou hlodavci, ptáci, opice i člověk. Tyto viry využívají ke své replikaci enzymy hostitelské buňky. Nejvýznamnějšími zástupci jsou myší polyomavirus (MPyV), opičí vakuolující polyomavirus (SV40) a lidské viry BK, JC, KI, WU a poslední objevený virus karcinomu Merkelových buněk (MCV). Myší polyomavirus (MPyV) a opičí vakuolující polyomavirus (SV40) byly jedny z prvních objevených DNA virů s tumorogenním potenciálem.

Viry vstupují do buňky reakcí svého hlavního kapsidového proteinu VP1 s gangliosidy na buněčném povrchu a putují přes endoplasmatické retikulum do buněčného jádra, kde začíná transkripce časných proteinů. Nejdůležitější z nich je velký T antigen. Tento multifunkční virový protein se přímo podílí na replikaci viru jako enzym, transkripční faktor a má také vliv na deregulaci a transformaci napadených buněk.

Je důležité poznamenat, že na základě výzkumu polyomavirů bylo umožněno použití SV40 pro přenos cizích genů do savčích buněk. Tato jejich vlastnost nastartovala výzkum na poli genové terapie. Při studiu SV40 bylo také objasněno mnoho molekulárních mechanismů jako je replikace eukaryotických genů, objev onkosupresoru p53 a objasnění funkce a struktury onkosupresoru Rb. Dále při studiu MPyV byla objevená signalizační dráha fosfotyrosin kináz.

# 2 Polyomaviry

Polyomavirový genom o přibližné velikosti 5 kbp obsahuje minum genů, nezbytných pro časné a pozdní fázi virové infekce. Organizace geonomu je pro všechny polyomaviry podobná, genom obvykle kóduje dva časné proteiny, velký T antigen (LT) a malý t antigen (st).

Proteiny syntetizované v pozdní fázi infekce jsou tři: hlavní strukturní protein VP1 a minoritní VP2 a VP3. Ikosahedrální virová kapsida je celkem složená z 360 molekul VP1, tyto proteiny tvoří strukturu, skládající se z 12 pentavalentních a 60 hexavalentních, tedy celkem 72 pentamer hlavního strukturního proteinu (Griffith et al., 1992). Karboxylový konec hlavního strukturního proteinu slouží k interakci s dalšími molekulami VP1 v pentametru (Liddington et al., 1991), N konec hlavního kapsidového proteinu interaguje na vnitřní straně kapsidy buď s proteinem VP2 nebo VP3, prostřednictvím jejich C konce. Pouze hlavní strukturní protein je exponován na povrchu virové kapsidy, kde interaguje se strukturami na vnější straně buňky, například s kyselinou sialovou vázanou na gangliosidech, sloužící jako receptor pro vstup myšího polyomaviru do buněk.

Časné proteiny slouží viru k zahájení replikace hlavně tím, že působí jako transkripční faktory ovlivňující buněčný replikační aparát. Replikace polyomavirů je zcela závislá na replikačních enzymech infikované buňky a probíhá v buněčném jádře. Genom polyomavirů je asociován s buněčnými histony H2A, H2B, H3 a H4. Tento komplex se označuje jako minichromosom a byl využit jako model studia replikace u eukaryot. Histon H1 nebyl v kapsidě polyomavirů objeven a předpokládá se, že hraje důležitou roli při procesu skládání virové kapsidy (Krude et al., 1993).

Geny kódující strukturní proteiny se v genomu polyomavirů překrývají. VP1 je kódován v jiné čtecí fázi než minoritní strukturní proteiny. Protein VP2 je shodný s proteinem VP3 až na 115 aminokyselin dlouhou unikátní oblast na N konci VP2. Další rozdílem je, že VP2 je myristilován na N koncovém glycínu. O této modifikaci se předpokládá, že je nezbytná k dosažení efektivní infekce napadené buňky.

## 2.1 Polyomaviry jako lidské patogeny

V poměrně krátké době posledních tří let byly objeveny tři nové lidské polyomaviry a to: KI virus, WU virus a Merkel cell virus. Tyto nově objevené viry se poněkud liší od dosud známých primátích polyomavirů tím, že nekódují sekvenci pro agnoprotein a viry WU a KI neprodukují regulační mRNA. Promořenost populace KIV, WUV je vysoká a předpokládá se, že primární infekce nastává v dětství respiračními cestami. Další, již déle známé lidské patogeny, jsou BK virus a JC virus (Johnson et al., 2010, review).

Virus BK byl poprvé izolován v roce 1971 z moči pacienta po transplantaci ledvin (Gardner et al., 1971). Infekce BK virem je všude na světě velice častá a dle některých studií protilátky proti němu jsou přítomné u téměř 100% testovaných osob ve věku nad 10 let (Gardner et al., 1973). Předpokládá se, že primární infekce BK virem nastává v dětství a probíhá nejprve v krčních mandlích, kde byly nalezeny receptory pro vstup viru (Goudsmit et al., 1982). V současné době je infekce BK virem okolností komplikující transplantaci ledvin a kostní dřeně.

Objev SV40 se datuje do začátku šedesátých let dvacátého století. Přestože je tento zástupce čeledi řazen mezi opičí viry (u opic způsobuje ledvinové nádory) je dokumentován i jeho výskyt v lidské populaci. SV40 byl v minulosti nedopatřením přítomen u vakcín proti dětské obrně, kdy se takto dostal do milionů lidí, u nichž se ustavila perzistentní infekce (Jonhson, 2010, review).

Objev tří nových polyomavirů se posuzuje jako výrazný pokrok ve virologii a je přisuzován hlavně pokroku v technikách molekulární biologie. Oba viry KI a WU byly objeveny náhodnou amplifikací, klonováním a sekvenováním nukleových kyselin ze vzorků z nosofaringálních sekretů z pacientů (Allander et al., 2007; Gaynor et al., 2007), kdy byla pozorována přítomnost cirkulární DNA molekuly s organizací charakteristickou pro viry a s regiony vysoce příbuznými se sekvencí dosud známých polyomavirů. Jména těchto dvou virů jsou odvozená od místa jejich objevu a to: Karolinska Institute pro KIV a Washington University pro WUV.

Poslední z nově identifikovaných polyomavirů MCV byl objeven při hledání přítomnosti infekčního agens v klinických případech karcinomu merklových buněk (MCC), kdy pouze tento virus je úzce spojován se vznikem nádorů u lidí. K hledání infekčního agens

u těchto typů nádorů vedlo pozorování, že incidence tohoto typu zhoubného bujení stoupá u pacientů imunosuprimovaných (Feng et al., 2008). Imunosuprese je také důležitým faktorem i u dalších lidských patogenů ze skupina polyomavirů jako například u „polyomavirus - associated nephropathy“ (PVAN) kde BKV je primárním důvodem tohoto onemocnění u pacientů po transplantaci ledvin (Trofe et al., 2006) nebo u „progressive multifocal leukoencephalopathy“ (PML) – infekce mozku projevující se u pacientů imunosuprimovaných a s AIDS, způsobené JCV (Eash et al., 2006).

Z výzkumů několika nezávislých skupin plyne zjištění, že infekce MCV je přítomná u většiny případů MCC, a to u 75 – 89% kožních nádorů (Shuda et al., 2009; Feng et al., 2008; Kassem et al., 2008). V práci Shuda et al z roku 2009 bylo poukázáno na to, že pouze nádorové buňky MCC exprimují velký T antigen viru MCV, naproti tomu okolní buňky byly negativní při použití protilátky proti LT antigenu MCV. Toto zjištění je považováno za důkaz tvrzení, že MCV je virus způsobující lidské nádory.

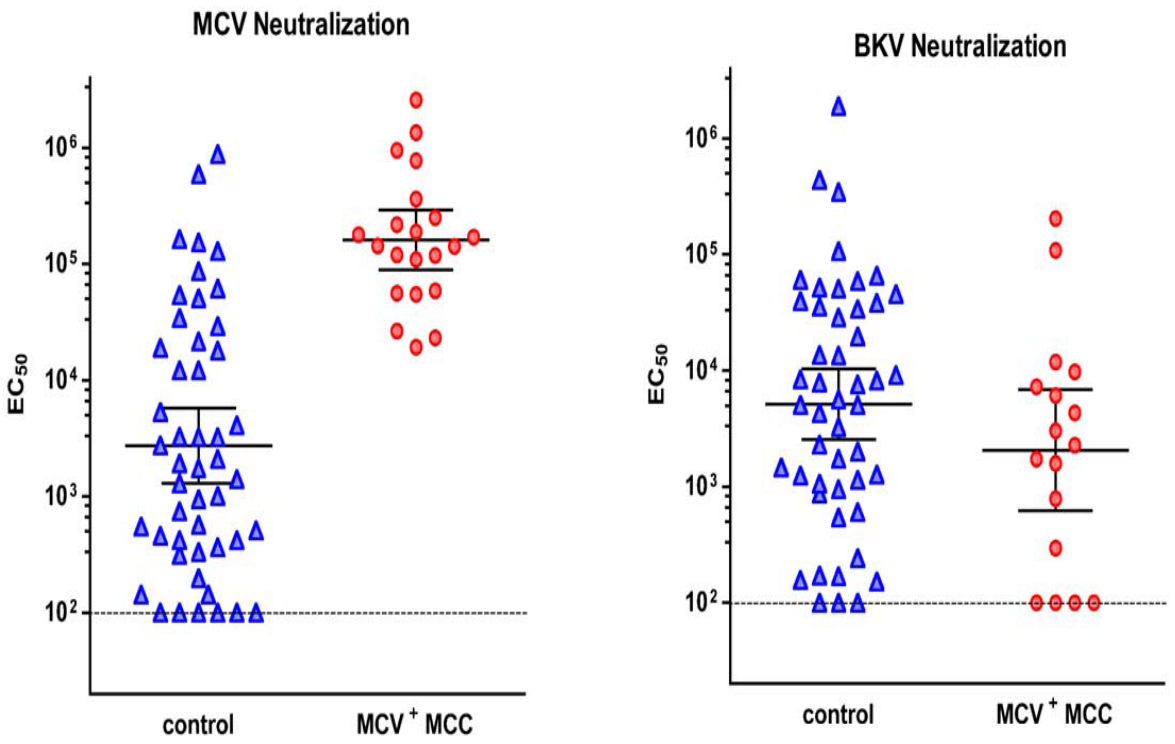
Podle práce autorů Pastrana et al z roku 2009 se za použití sérologické studie využívající strukturní proteiny z MCV ukazuje, že 50 - 90 % ze zkoumaných dospělých jedinců má specifické protilátky proti MCV. Toto zjištění napovídá, že infekce MCV je běžná, ale pouze zřídka vede ke vzniku MCC. Bylo však také zjištěno, že množství produkovaných protilátek je velice rozdílné u zkoumaných jedinců, kdy u pacientů trpících MCC byla protilátková odpověď mnohem silnější.

Obecně platí, že členové polyomavirové čeledi např. BKV a JCV mohou u lidí ustavovat latentní infekci, trvající desítky let, kdy tato je pod kontrolou imunitního systému a protilátky produkované proti strukturním proteinům těchto virů jsou v úměře s množstvím virových kapsid (Randhawa et al., 2008). U MCV se zdá, že infekce není kontrolována protilátkovou odpovědí, s výjimkou neutralizace infekčních virionů (Pastrana et al., 2009). Předpokládá se, že MCV stejně jako BKV a JCV mohou ustavovat latentní infekci v infikovaných buňkách, která je rezistentní vůči neutralizujícím protilátkám. Takovéto buňky se pak stávají trvalým zdrojem infekce.

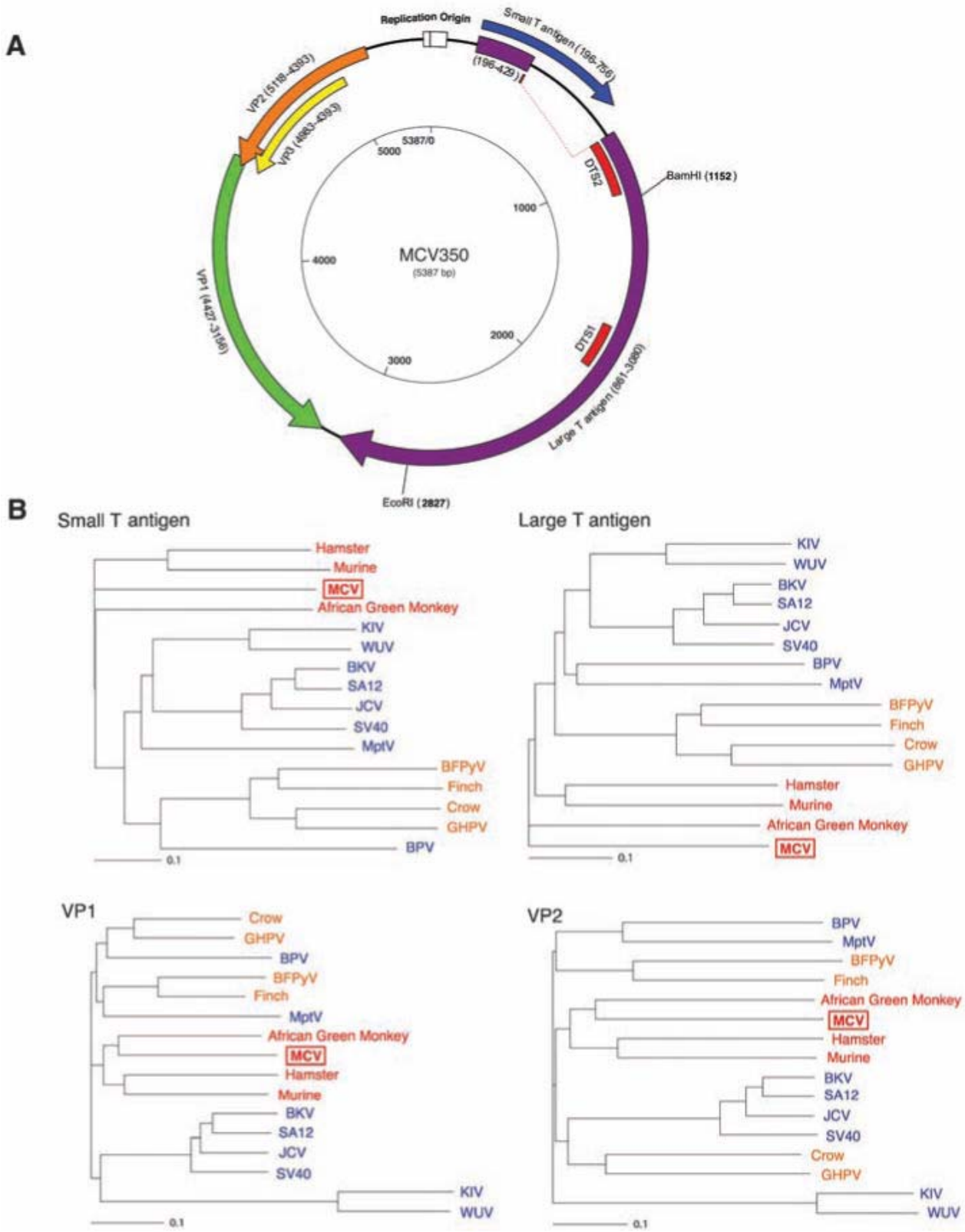
Předpokládá se, že výskyt MCC souvisí se specifickým selháním kontroly infekce MCV, rozdílné než u ostatních polyomavirů. Ze studie protilátkové odpovědi proti BKV u pacientů s MCC a kontrol bylo to zjištěno, že se tato reakce u obou skupin významně neliší. Naproti tomu výsledky neuralizačních testů MCV u pacientů s MCC a kontrol byly znatelně odlišné. Viz obr. 1. (Pastrana et al., 2009).

V práci Kassem et al z roku 2008 byla zkoumána 90bp delece v genu pro protein VP1 a byla porovnávaná sekvenční analýzou. Dalece nebo mutace jsou známé i u dalších zástupců polyomavirů a mohou hrát roli v procesu integrace virové DNA, v této práci bylo poprvé popsána delece právě v genu pro VP1 protein u MCV.

Předešlé práce ukazují na některé změny plynoucí z mutace genu pro VP1 protein, kdy například u JCV tato mutace ovlivňuje DNA vazebnou funkci VP1 nebo transport tohoto proteinu k jádru buňky. U viru SV40 bylo prokázáno ovlivnění minoritních strukturních proteinů VP1 a jejich cílení do ER.




Obr. 1. MCV pozitivní pacienti trvale vykazují vysoké hodnoty MCV neutralizačních protilátek. Převzato a upraveno z Pastrana et al., 2009




Obr. 2. (A) Schématické znázornění genomu MCV. (B) Stromy příbuznosti velkého T antigenu, malého T antigenu, VP1 proteinu a VP2 proteinu. Pro čtyři známé lidské polyomaviry (BKV, JCV, KIV a WUV, které jsou velice příbuzné SV40 – zobrazeny modře. Naproti tomu MCV je více příbuzný myšímu polyomaviru – zobrazeno červeně. Převzato a upraveno z Feng et al., 2009.

| Comparison | Percentage amino acid identity for VP1 |
|---|---|
| SV40 vs. BKV | 81 amino acid identity |
| BKV vs. JCV | 78 |
| KIV vs. WUV | 66 |
| KIV vs. JCV | 28 |
| KIV vs. MCV | 26 |
| JCV vs. MCV | 42 |
| LPV vs. MCV | 52 |

Tabulka 1. Srovnání aminokyselinové sekvence VP1 proteinů různých polyomavirů, projevujících se jako lidské patogeny. Převzato a upraveno z Johanson et al., 2010.

# 3 Události během časné fáze infekce

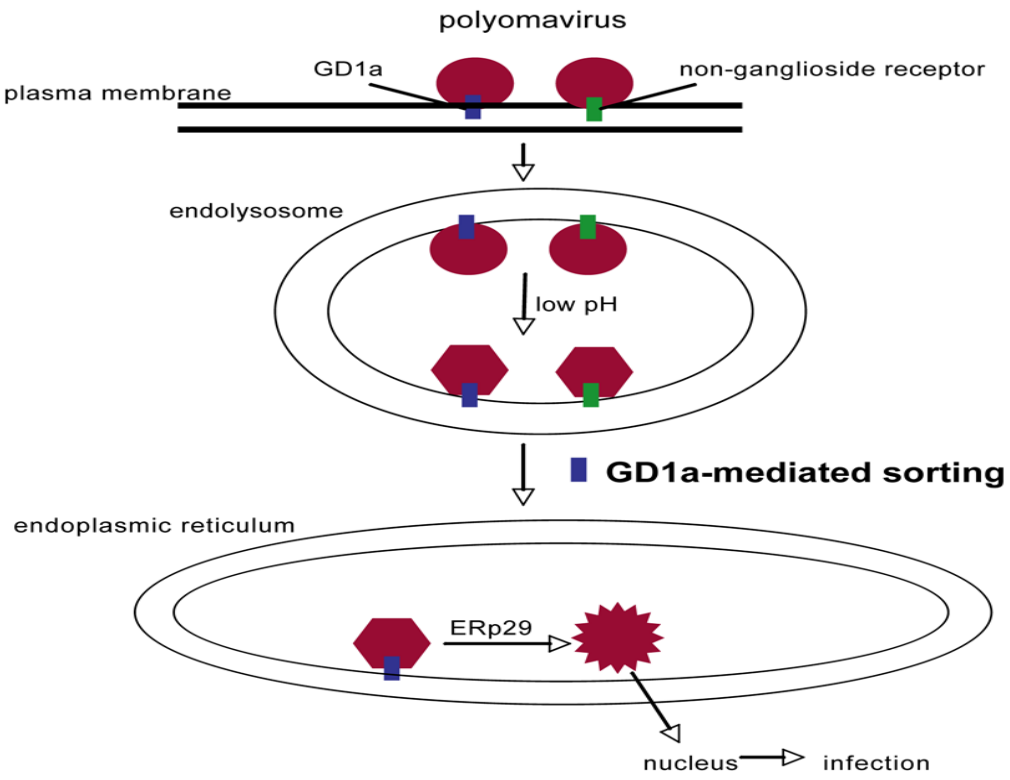
## 3.1 Vstup do buňky

Proces vstupu myšího polyomaviru do buněk se sestává z několika fází, kdy virus nejprve interaguje s receptorem obsahujícím sialovou kyselin vázanou na galaktosu, což je nezbytné pro další interakci se sekundárním receptorem α1β4 integrinem, rozeznávaným VP1-LDV motivem (Caruso et al., 2003). Přichycení viru na buněčný povrch se děje přes interakci hlavního strukturního proteinu VP1, konkrétněji kontaktem BC a HI smyčky nacházející se na povrchu proteinu (Stehle et al., 1994; Stehle and Harrison et al., 1997), se sialovou kyselinou na glykosfingolipidech GD1a a GT1b, identifikovaných jako specifické receptory tohoto viru (Tsai et al., 2003).

Schopnost vazby na rozvětvené řetězce GD1a a GT1b má souvislost se záměnou jedné aminokyseliny v pozici 91 na povrchu proteinu VP1 a tato mutace způsobuje výrazný pokles v tumorogenním potenciálu viru. Bylo zjištěno, že glycín v pozici 91 způsobuje nízkou tumorogenní schopnost viru, naopak, glutamová kyselina zvyšuje tumorogenní potenciál takového viru (Freund et al., 1991).

Struktura virové partikule v komplexu s modelem obou typů receptorů ukázala, že tyto receptorové fragmenty se váží do mělké prohlubně tvořené několika smyčkami na povrchu VP1 (Stehle et al., 1994; Stehle and Harrison, 1996).

Viriony myšího polyomaviru vstupují do buňky internalizací do hladkých monopinocytických váčků, které po vstupu fúzují s endolysosomy. Jako molekula tvořící tyto transportní váčky byl identifikován caveolin 1 (Richterová et al., 2001). U MPyV je pro další produktivní infekci vyžadováno kyselé pH endosomu, kde dochází i k strukturním změnám u viru, usnadňující jeho následné proniknutí do ER – viz. obrázek 3. (Quian et al., 2009). V pokusech bylo zjištěno, že přidání bafilomycinu A1 působí blok infekce MPyV a zvýšení endosomálního pH výrazně snižuje infektivitu, obzvláště v procesu transportu viru do buněčného jádra (Liebl et al., 2006).



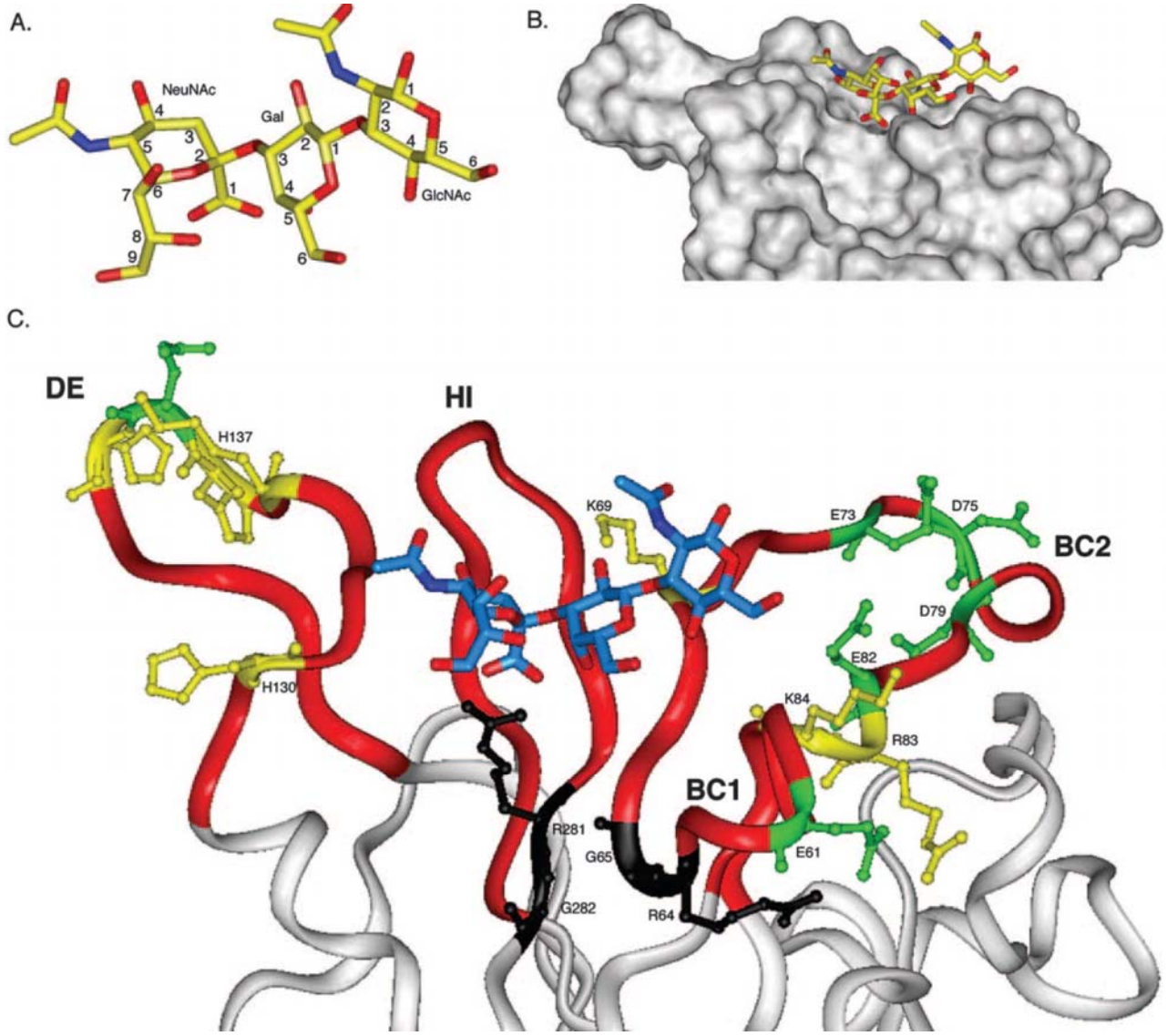

Obr. 3. Model cílení myšího polyomaviru z plasmatické membrány do ER. Polyomavirus se váže na gangliosid GD1a plasmatické mambrány a je transportován do endolysosomu, kde nízké pH způsobuje konformační změny viru, usnadňující další strukturní změny viru v ER. Převzato a upraveno z Qian et al., 2009.

Pro iniciaci infekce se VP1 váže ke glykolipidovému komplexu na plasmatické membráně a je transportován do lumen ER (Tsai et al., 2003). Transport do ER je esenciálním krokem infekce, protože inaktivace procesů probíhajících v této organele výrazně snižují infektivitu pronikajícího viru (Gilbert et al., 2006). Následně virus penetruje membránu ER,

proces dovolující viru vstup do cytoplasmy a následně do jádra. Při studiu MPyV bylo zjištěno, že receptor tohoto viru GD1a hraje důležitou úlohu při cílení viru do endolysosomu a následně do ER, což bylo dokázáno i za použití umělých perliček, vázajících se k receptoru GD1a a následně transportovaných také do ER. U této práce byl identifikován mechanismus cílení viru k příslušným organelám, umožňujícím produktivní infekci, závislý na molekule lipidové povahy, tedy na gangliosidovém receptoru (Qian et al., 2009). Při studiu molekulárního mechanismu cílení viru do ER receptorem GD1a se předpokládá, že mnohonásobná vazba jedné virové částice, obsahující 360 VP1 vazebných míst, k molekule GD1a ještě více zesiluje cílení GD1a glykolipidu do endolysomu. Proces shlukování mnoha molekul GD1 na povrchu jediné virové částice může vést k jednomu ze dvou předpokládaných mechanismů cílení viru do ER. První z nich je tvorba hydrofobního úseku v lipidové dvojvrstvě membrány endolysosomu, vedoucí k stimulaci transmembránové signalizace a tvorbě pučících váčků s virem cílených do ER. Alternativním modelem je ovlivnění fyzikálních vlastností membrány shluky molekul GD1a, způsobující invaginace na membráně a tvorbu váčků s virem cílených do ER, kdy tento mechanismus byl prokázán u shigela toxinu (Qian et al., 2009). Dále se ukázalo, že zásadní role receptoru GD1a je v transportu viru z endolysosomu do ER, kdy za použití buněk postrádajících tento gangliosidový receptor, proběhl transport viru do endolysosomu, kde byl další přenos zablokován.

Receptorem pro SV40 je gangliosid GM1 (Tsai et al., 2003). Tento virus vstupuje do buňky endocytozou, zabalením do caveolinových váčků, fúzí s kaveolou, postupuje vesikulárním transportem do hladkého endoplasmatického retikula, translokací do cytosolu a dále vstupuje do buněčného jádra (Schelhaas et al., 2007). Vstup SV40 do ER je také sensitivní k brefeldinu A, z toho se usuzuje na to, že transport probíhá cestou z ER do GA a je zprostředkován COP1 váčky ( Richards et al., 2002).

Jako receptory pro vstup BKV byly identifikovány dva konkrétní gangliosidy GD1b a GT1b, u kterých virus rozeznává karboxylovou část molekuly (Low et al., 2005). Pro svůj vstup virus využívá kaveosom a tento proces je závislý na funkčních mikrotubulech (Eash et al., 2004; 2005). Stejně jako u většiny ostatních zástupců i zde zásadní úlohu při interakci viru s buněčným povrchem hraje protein VP1 (Breau et al., 1992). Viz. obrázek 4. Po vstupu pokračuje virus cestou přes ER a GA do jádra, což bylo potvrzeno za použití inhibitoru transportu mezi ER a GA – Brefeldinem A. Po inhibici touto látkou byla též inhibována produktivní infekce BK virem (Low et al., 2005).




Obr. 4. Zobrazení oligosacharidové prohlubně pro vazbu VP1 BKV. (A) Struktura α(2,3) vázané sialové kyseliny na receptoru [NeuNAc-(α2,3)-Gal-(β1,3)-GlcNAc] pro vazbu BKV. Molekuly kyslíku jsou zobrazeny červeně, molekuly dusíku modře a uhlík je zobrazen žlutě. Molekuly dusíku jsou číslované a sialová kyselina je na uhlíku číslo 1. (B) Zobrazení interakce sialové kyseliny a galaktosových molekul receptoru s VP1. (C) Předpokládaný model vazby VP1 na receptor zobrazeno za použití SWISS-MODEL proteinového serveru. Převzato a upraveno z Dugan et al., 2007.

## 3.2 Vstup do jádra

Podle Kasamatsu et. al., (1998) SV 40 vstupuje do jádra přes komplex jaderného póru a tento proces může být inhibován vyčerpáním ATP, protilátkou proti nukleoporinu i působením aglutininu. Vstup se uskutečňuje běžnou cestou jako u jaderných proteinů, interakcí s importinem α2/β heterodimerem (Nakanishi et al., 2002), který je hojně přítomen v buňce (Gorlich et al., 1994). Předpokládá se, že při vstupu SV40 do jádra jsou zapojeny i další importiny z rodiny α , jakožto i strukturní komponenty komplexu jaderného póru (Nakanishi et al., 2002). Bylo zjištěno, že virová DNA v komplexu s prázdnými kapsidami, ale bez histonů vstupuje do jádra, a že tento proces je inhibován protilátkou proti VP3 (Nakanishi et al., 1996). Studie vstupu virového genomu do jádra mají za cíl objasnit stále ještě nejasný mechanismus tohoto vstupu u mnoha nukleoproteinových komplexů, včetně virů.

Aby mohlo dojít k úspěšné replikaci SV40, virový genom musí dosáhnout jádra a tak získat přístup k buněčnému replikačnímu systému. Z tohoto důvodu je také nutné aby došlo k rozvolnění virové kapsidy, což je děj probíhající v ER. Dochází k tomu přes vyčerpání $Ca^{2+}$ iontů a následné izomeraci disulfidických můstků vedoucí k rozvolnění pentamerů hlavního strukturního proteinu (Kawano et al., 2009).

# 4 Vlastnosti strukturních proteinů polyomavirů

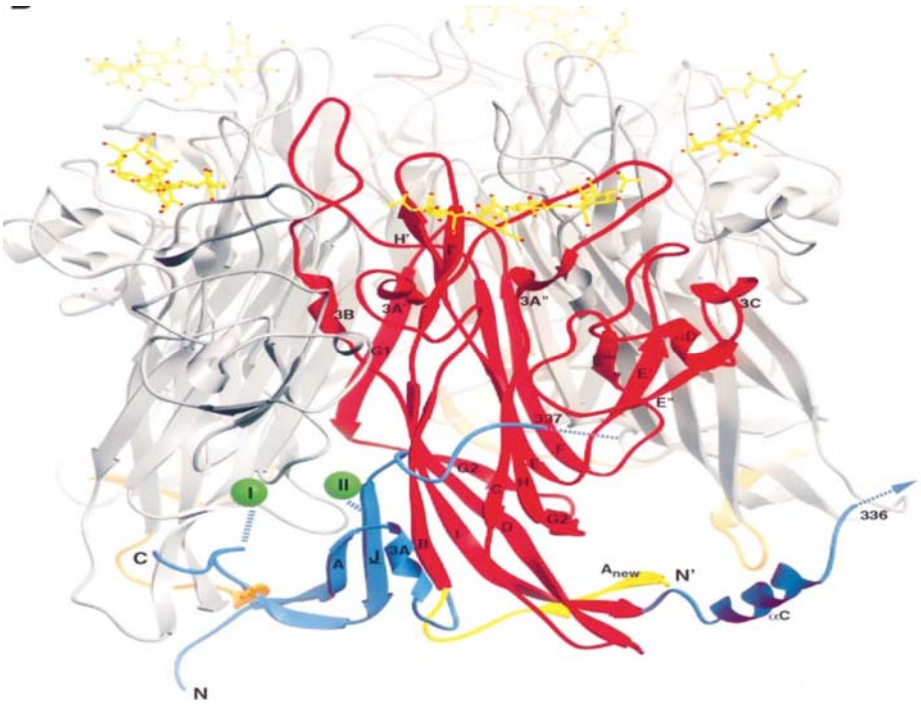
Po infekci buňky virem SV40, myším polyomavirem nebo BK virem a po translaci jsou všechny tři strukturní proteiny transportovány do buněčného jádra. Pro tento transport byla jako nezbytná identifikována sekvence na N konci VP1 proteinu a na C konci minoritních VP2 a VP3.

Virové partikule jsou vysoce organizované proteinové komplexy a jejich skládání je závislé na vnějších fyzikálních podmínkách (pH, iontová síla). U většiny zkoumaných polyomavirů byla provedena izolace virům podobných partikulí (VLPs), složených výhradně z majoritního kapsidového proteinu, ačkoliv detailní molekulární mechanismus tohoto procesu není dosud znám.

Tento děj probíhá po expresi VP1 molekul, například v hmyzích buňkách Sf9, infikovaných rekombinantním bakulovirem. Takto syntetizované VLPs jsou velice podobné normálním virovým partikulím, vznikajícím při množení divokého typu viru a slouží tak jako studijní model pro objasnění vstupu polyomavirů do buňky.

## 4.1 Hlavní strukturní protein VP1

Je nejhojněji syntetizovaným strukturním proteinem v infikované buňce, který může být posttranslačně modifikován řadou úprav, například fosforylací nebo acetylací, což může hrát roli při přichycování virionů k buněčnému povrchu, nebo může ovlivňovat schopnost viru hemaglutinovat krvinky. Krystalografická studie myšího polyomaviru a SV40 odhalila trojrozměrnou strukturu VP1 a s ním spojenou strukturu virionu. Polypeptidové řetězce VP1 se uspořádávají do β barelu, což umožňuje rozsáhlé kontakty mezi jednotlivými monomery VP1 v složeném pentameru. Monomery proteinu VP1 jsou spolu v kontaktu přes C terminální konec každého z nich, toto spojení se uskutečňuje pomocí posledních 63 zbytků každého monomeru, které vyčnívají a pronikají do dalšího pentameru, kde tvoří β list-viz obr.5. (Liddington et al., 1991; Stehle et al., 1996).




Obr. 5. Superpozice plně složeného pentameru z VP1. Převzato a upraveno ze Stehle and Harrison, 1996

### 4.1.1 Interakce VP1 s minoritními strukturními proteiny

Skládání virových partikulí u MPyV nastane krátce po nasyntetizování strukturních proteinů v cytoplasmě napadené buňky (Fattaey, et al., 1989; McMillen et al., 1977). Málo je známo o mechanismu skládání virové DNA, histonech hostitelské buňky a virových kapsidových proteinech. Předpokládá se, že skládání nastává uvnitř jádra a zahrnuje přidávání strukturních proteinů k minichromosomu (Garcea et al., 1983; Yuen et al., 1985; McMillen et al., 1974).

Pentamer složený z proteinu VP1 je schopen utvořit kapsidu, není však schopen do ní enkapsidovat DNA. Bylo zjištěno, že tvorba viru podobným partikulí z VP1 exprimovaného v hmyzích buňkách je inhibována přítomností virové DNA (McKenna et al.,1992). Z tohoto důvodu se předpokládá, že minoritní proteiny nejsou nezbytné při skládání VLP, ale mají důležitou úlohu při skládání minichromosomu, interakci s VP1 a interakci mezi DNA a minichromosomem (Cai et al., 1994). Při pokusech byly izolovány intermediáty skládajícího se polyomaviru a bylo zjištěno, že poměr minoritních proteinů je nejvyšší u časných fázích skládání virové kapsidy, což svědčí o tom, že tyto proteiny mají funkci při zakládání skládající se partikule (Yean et al., 1985). Toto zjištění bylo potvrzeno i mapou elektronové density virionů (Griffith et al., 1992).

Dále víme, že proteiny VP1 a VP2 spolu interagují už v cytoplasmě před transportem do buněčného jádra (Cai et al., 1994).

U myšího polyomaviru (na rozdíl od primátích polyomavirů) se předpokládá, že pouze hlavní kapsidový protein a histony mají DNA vazebnou doménu a minoritní proteiny postrádají schopnost vazby na DNA (Chang et al., 1993).

Porovnání myšího polyomaviru s virem SV40 ukázalo, že s hlavním strukturním proteinem interagují různé domény VP2 a VP3. Minoritní proteiny myšího polyomaviru postrádají C-terminální aminokyselinovou sekvenci přítomnou u těchto u viru SV40 (Gharakhanian et al., 1990). Toto zjištění ukazuje na zcela odlišný mechanismus skládání virové partikule.

Předpokládá se, že VP2 a VP3 SV40 iniciují skládání virionu ve spojení s buněčnými histony v podobě minichromosomu a následně se účastní molekula VP1, tvořící vnější proteinový obal viru (Cai et al., 1994). Bylo zjištěno, že minoritní proteiny interagují s VP1

specificky i při pokusech s heterologní směsí dalších proteinů. Komplex proteinů VP1 a VP3 může být specificky vyvázán protilátkou proti VP1, což poukazuje na pevnost a biologickou významnost této vazby ( Barouch et al., 1994).

Účinné dopravení VP2 a VP3 do buněčného jádra, závisí u myšího polyomaviru na navázání k proteinu VP1 (Delos et al 1993). Provedené pokusy ukazují na teoretickou možnost vazby každého proteinu VP1 s jedním z minoritních proteinů, což v praxi není možné, protože množství minoritních proteinů umožňuje vazbu pouze jednoho z nich k jednomu pentameru z VP1. Další překážkou je velikost prohlubně ve struktuře VP1 pentameru, nedovolující vazbu více než jednoho z minoritních proteinů (Griffith et al., 1992).

Hlavní strukturní protein VP1 BKV je rozdělen do pěti strukturních domén BC, DE, EF, GH a HI, stejně jako u ostatních polyomavirů. Tyto smyčky spojují ostatní části proteinu VP1. Sekvence DNA pro protein VP1 se podílí na antigenní variabilitě BKV izolátů a na následném rozdělení do čtyř skupin (I – IV), kdy podle studie Krautkramer a kol. z roku 2008, u které byla analyzována prevalence mutací v BC smyčce, bylo zjištěno, že největší podíl izolátů spadá do I. skupiny – 66,67%, následuje subtyp izolátů z IV. skupiny – 33,33%. Analýza v tomto případě probíhala u 45 pacientů po transplantaci ledvin a výsledky zde citované byly v souladu s předešlými studiemi (Ikegaya et al., 2006; Krumbholz et al., 2006).

Předpokládá se, že sekvence aminokyselin mezi 61 a 83 aminokyselinovým zbytkem je rozhodující pro antigenní specificitu izolátů (Jin et al., 1993). Předpokládá se také, že vnější smyčky VP1 mají velice důležitou roli při vazbě na receptor a udržování stability virové partikule, jak plyne i z práce Stehle et al. z roku 1994 prováděné na myším polyomaviru.

Ve studii koleltivu Tremolada z roku 2009, byla amplifikována sekvence VP1 proteinu z moči pacientů po transplantaci ledvin u kterých došlo k projevu PVAN i u takových bez projevu PVAN. Poté bylo zkoumáno, zda aminokyselinové změny v pěti vnějších smyčkách proteinu VP1 přispívají ke vzniku PVAN. Změny v aminokyselinové sekvenci byly prokázány u obou skupin pacientů - s PVAN a kontrolní skupiny, kdy tyto mutace byly v úsecích BC, DE a EF smyčky, zatímco úseky GH a HI smyčky byly vysoce konzervovány a nenašly se zde žádné mutace. Mutace skupiny pacientů s PVAN K69R, D75N, E75Q v BC smyčce a H139N v DE smyčce byly unikátní pro tuto skupinu a toto zjištění je také v souladu s dalšími pracemi např. Krautkamer et al., 2009 a Randhawa et al., 2002.

In vitro studie BKV jiného kolektivu Dugan et al z roku 2007 poukázaly na důležitost aminokyselinového zbytku na pozici 69 proteinu VP1, kdy substituce v této pozici může vést k snížení schopnosti viru k vazbě na buněčný receptor a může tímto způsobem ovlivnit šíření viru. Mutací aminokyselin uvnitř BC, DE a HI smyčky VP1 proteinu BKV byly identifikovány motivy důležité pro proliferaci viru a pro správné skládání virionu. Některé z takto připravených mutant byly méně úspěšné při lytickém uvolňování z buňky a měly menší infektivitu. Mutace uvnitř BC smyčky v pozicích 61, 64, 65, 69 a 79 v pokusech Krautkamer et al., 2009, způsobovaly nestabilitu kapsid a poruchy při přichycování na buněčný povrch v pokusech in vitro.

Podle sekvenační studie mají VP1 proteiny viru SV40 a BK 82% homologii viz obr. 6 a jsou strukturně identické z 88%.

Strukturní proteiny BKV byly úplně analyzovány ve studii Fang et al 2010, kde bylo identifikováno 16 subtypů VP1 proteinu, také byly identifikovány modifikace v strukturních proteinech VP2 a VP3. Pro protein VP1 byly charakterizovány tyto modifikace: karboxymethylace, methylace, oxidace, dioxidace, formylace, karboxyethylace, methylthiolace a přidání cysteinu. Pro protein VP2 byly charakterizovány úpravy: karboxymethylace, formylace, oxidace, dioxidace a fosforylace. Acetylace, karboxymethylace, formylace, dioxidace, oxidace a fosforylace byly popsány pro protein VP3.

```
                10        20        30        40        50        60
SV40    MAPTKRKGSCPGAAPKKPKEPVQVPKLVIKGGIEVLGVKTGVDSFTEVECFLNPQMGNPD
        :::::::: :::::::::::::::::::.::::.::: :::::::..::::::::::.::.::
BKV     MAPTKRKGECPGAAPKKPKEPVQVPKLLIKGGVEVLEVKTGVDAITEVECFLNPEMGDPD
                 10        20        30        40        50        60

               70        80        90       100       110       120
SV40    EHQKGLSKSLAAEKQFTDDSPDKDQLPCYSVARIPLPNLNEDLTCGNILMWEAVTVKTEV
        :. .:.: .:.::..:..::.. .::::::.::::::::::::::::::.::::::::.:::
BKV     ENLRGFSLKLSAENDFSSDSPERKMLPCYSTARIPLPNLNEDLTCGNLLMWEAVTVQTEV
                 70        80        90       100       110       120

              130       140       150       160       170       180
SV40    IGVTAMLNLHSGTQKTHENGAGKPIQGSNFHFFAVGGEPLELQGVLANYRTKYPAQTVTP
        ::.:.::::::.:.::.::.:.::::::::::::::::::::::.:::: :::.:::  :.::
BKV     IGITSMLNLHAGSQKVHEHGGGKPIQGSNFHFFAVGGEPLEMQGVLMNYRSKYPDGTITP
                 130       140       150       160       170       180

              190       200       210       220       230       240
SV40    KNATVDSQQMNTDHKAVLDKDNAYPVECWVPDPSKNENTRYFGTYTGGENVPPVLHITNT
        :: :..:: ::::::: :::.::::::::::::::.:::.::::::.::::::::::::.:::
BKV     KNPTAQSQVMNTDHKAYLDKNNAYPVECWVPDPSRNENARYFGTFTGGENVPPVLHVTNT
                 190       200       210       220       230       240

              250       260       270       280       290       300
SV40    ATTVLLDEQGVGPLCKADSLYVSAVDICGLFTNTSGTQQWKGLPRYFKITLRKRSVKNPY
        ::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::.:: ::::: ::::::::::
BKV     ATTVLLDEQGVGPLCKADSLYVSAADICGLFTNSSGTQQWRGLARYFKIRLRKRSVKNPY
                 250       260       270       280       290       300

             310       320       330       340       350       360
SV40    PISFLLSDLINRRTQRVDGQPMIGMSSQVEEVRVYEDTEELPGDPDMIRYIDEFGQTTTRM
        :::::::::::::::::::::: :: ::::::::.. ::.::::::::::::. ::  :.:
BKV     PISFLLSDLINRRTQRVDGQPMYGMESQVEEVRVFDGTERLPGDPDMIRYIDKQGQLQTKM
                 310       320       330       340       350       360
```

Obr. 6. Srovnání VP1 z SV40 a VP1 BKV. Vnější smyčky VP1 jsou vystínované, BC smyčka je mezi aminokyselinovými zbytky 57 a 89, HI smyčky je mezi zbytky 127 a 146, DE smyčky je mezi zbytky 269 a 283. Aminokyseliny identické pro oba viry jsou označeny dvěma tečkami, konzervované aminokyseliny jsou označeny jednou tečkou. Aminokyseliny, které nejsou označeny tečkou jsou specifické pro daný virus. Převzato a upraveno z Dogan et al., 2007.

Pro virus SV40 bylo pro srovnání popsáno šest subtypů proteinu VP1 v rozmezí pH 6,7 až 6,9 v práci O´Farrell a Goodman 1976.

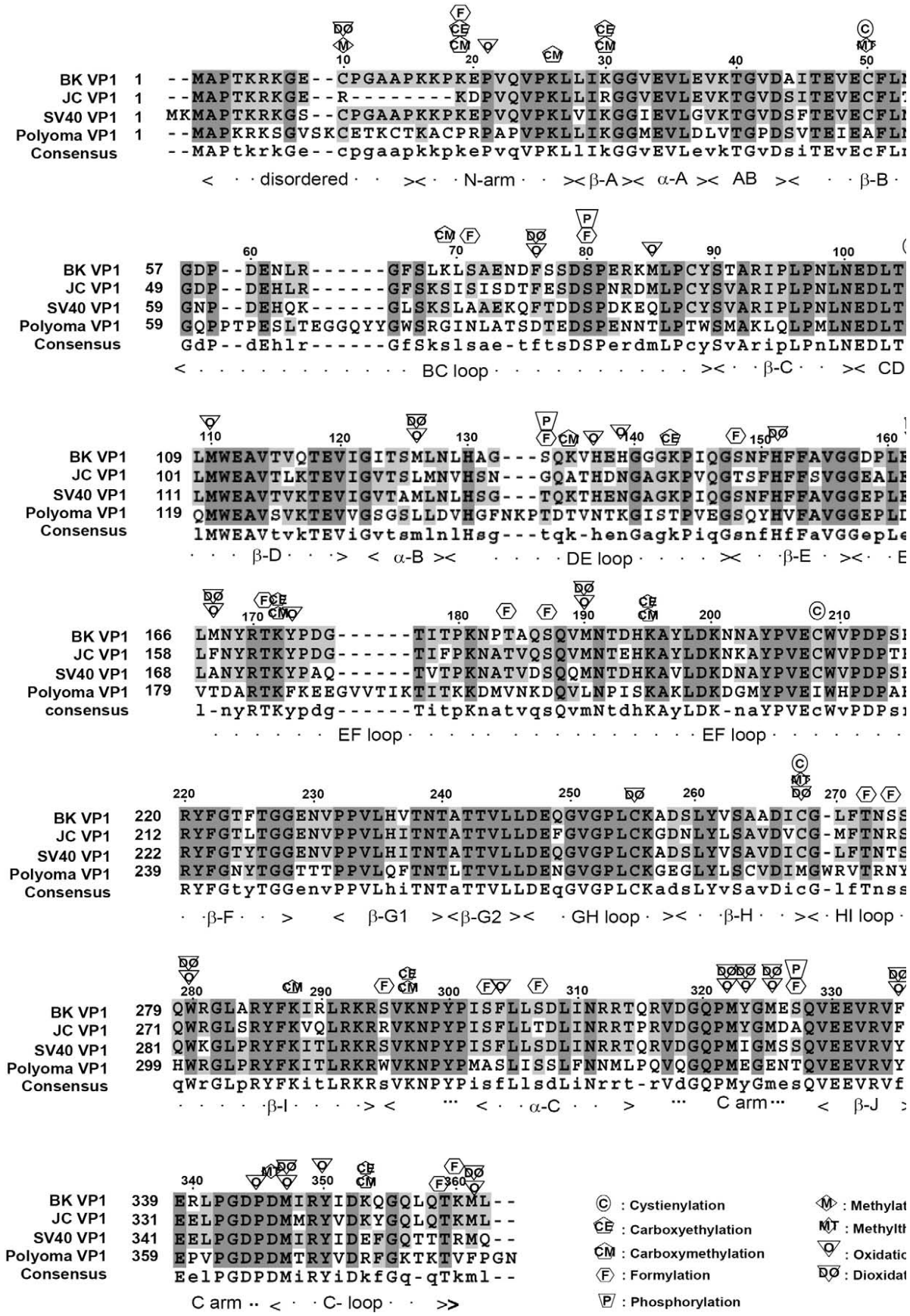
Předpokládá se, že rozdílné poddruhy proteinu VP1 mohou hrát roli v životním cyklu polyomavirů. Změny v heterogenitě VP1 pravděpodobně mají vliv na rozměr plaků, kdy toto bylo prokázáno pro virus SV40 (Barban et al., 1973) a pro myší polyomavirus (Hewick et al., 1977).

Jako fosforylační místa VP1 proteinu byly identifikovány aminokyseliny Ser-80, Ser-133, Ser-327. Ve srovnání s jinými zástupci čeledi jako jsou JC, SV40 a myším polyomavirem se ukázalo, že aminokyselinový zbytek Ser-80 je zachován u těchto zástupců, zatímco Ser-133 a Ser-327 nebyly zachovány. Viz obr. 7.

Předpokládá se, že fosforylace aminokyselin na povrchu virových částic může ovlivňovat vazbu na receptor. Zdá se, že polymorfismus hlavního kapsidového proteinu VP1, obzvláště v případě BC, DE a HI smyčky u lidských polyomavirů JC a BK , má vliv na průběh infekce (Boldorini et al., 2009).

Mnoho z virových proteinů bylo modifikováno oxidací, ale význam této modifikace není zcela jasný. Předpokládá se, že oxidace souvisí se stárnutím a poškozením proteinu a proto je nutné další zkoumání strukturních proteinů modifikovaných oxidací (Li et al., 2009).

Bylo prokázáno, že rekombinantní protein VP1 exprimovaný v E. coli má schopnost samouspořádávat se do VLPs (Ou et al., 1999), a proto se předpokládá, že post-translační modifikace (PTM) VP1 proteinu není rozhodující pro tvorbu kapsid (Salunke et al., 1986). Bylo zjištěno, že fosforylovaný VP1 polyomaviru způsobuje malý defekt ve skladbě virionů (Li et al., 1995) a tento jev se projevuje snížením transformační aktivity viru (Garcea et al., 1985)




Obr. 7. Zobrazení modifikací VP1 BKV a srovnání sekvence tohoto proteinu s ostatními polyomaviry. Převzato a upraveno z Fang et al., 2010.

# 5 Minoritní strukturní proteiny polyomavirů VP2 a VP3

## 5.1 Myristilace VP2

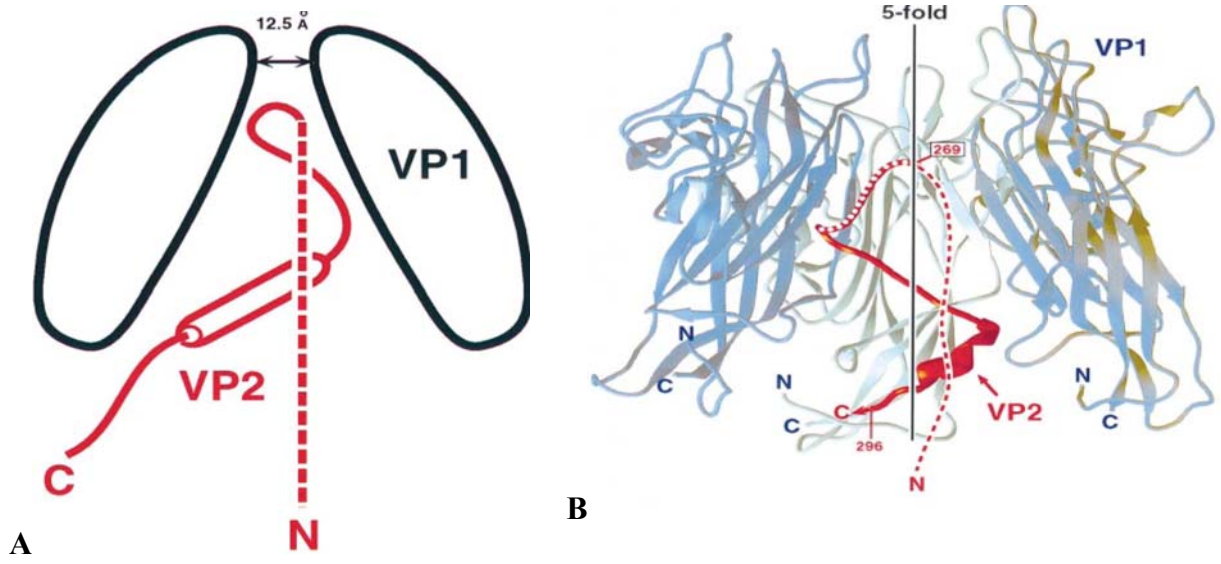
Mnoho z buněčných proteinů je acylovaných a u většiny případů tato modifikace souvisí s interakcí proteinu s membránou. Čím dál tím více je ale jasnější fakt, že připojení 14-ti uhlíkové kyseliny myristilové k virovým proteinům má i další funkce mimo kotvení proteinu do membrán. U mnoha virových proteinů zapojených do skládání virových partikulí, jako například gag protein u retrovirů, VP4 protein u piconavirů, nebo pre-S1 protein u viru hepatitidy B, byla zjištěná modifikace myristilací (Krauzewicz et al., 1990).

Myristilace polyomavirového proteinu VP2 je kotranslační úpravou a spočívá v přidání mastné kyseliny na N konec proteinu enzymem N – myristyl transferázou na koncový glycín po předchozím odstranění methioninu (Resh et.al., 1999). Při znalosti chemického charakteru myristilové kyseliny a znalosti, že se na protein váže kovalentně, je logický předpoklad její hydrofóbní interakce s plasmatickou membránou, jadernou membránou a membránou pinocytotických váčků, stejně tak s buněčným cytoskeletem a receptory, předpokládá se i možnost ovlivnění terciální struktury VP2 proteinu touto modifikací (Krauzewicz et al., 1990).

Pro studium funkce této modifikace byly provedeny studie s viry - u nich byla provedena místně specifická mutace, vedoucí k záměně glycínu za kyselinu glutamovou. Takto byla znemožněná další modifikace myristilací (Mannová et al., 2002). Následnou infekcí permisivních buněk takto mutovaným virem, bylo pozorováno, že porucha myristilace VP2 nezpůsobuje úplnou ztrátu infektivity viru, ale mutovaný virus má 1/10 z efektivity divokého typu viru. Předpokládaným důvodem ztráty infektivity je pozměněná morfologie mutantního viru, způsobující narušení stability vazby viru na buněčný receptor a sníženou stabilitu virových partikulí. Jako hlavní etapy virové infekce, u nich se předpokládá funkce myristilace, jsou přichycení viru na buněčný povrch, vstup a rozbalení viru (Krauzewicz et al., 1990).

Jestliže N-terminální myristilace VP2 má roli při penetraci membrány, předpokládá se, že musí být nějakým způsobem exponována na povrch virionu, nebo musí z něj být uvolněná.

Skutečnost, že větší část z N-terminálního konce VP2 může být flexibilní a ne těsně svinutá usnadňuje možnost úniku VP2 zevnitř virionu. Za předpokladu silné interakce mezi VP2 a VP1 uvolnění C terminálního segmentu VP2 z tohoto komplexu vypadá nepravděpodobně (Chen et al., 1998). Ze studie stejného kolektivu vyplývá, že mezi jednotlivými VP1 proteiny tvořící pentameru existuje asi 12Å mezera dovolující únik nesloženému polypeptidovému řetězci. Vlásenkovitá struktura VP2 ukazuje na model výstupu tohoto proteinu z mezery, kdy jako poslední z prohlubně vystupuje N-terminální část vázaná na C-terminální úsek. Předpokládaná struktura vlásenky je znázorněná na obr 8.




Obr. 8. (A) Schéma interakce VP1 a VP2 proteinu s vyznačeným otvorem na vrchu petameru. (B) Stuhový model, VP2 znázorněn červeně a tři monomery VP1 interagující s VP2 modře na obou stranách a světle modře uprostřed. Přerušovaná čára reprezentuje nedefinovanou část molekuly. Převzato a upraveno z Chen et al., 1998.

```
PY-2a   MGAaLtiLvDLieglaEvstlTGLSaeaIlsGEA...lAalDgeItaL.tlEGvmssetAlAtmgiseevYg....f
Avian   MGAiisaiagLf....ElgalgGLaV......DAavntAeiEafIgeLvlqD..fsvaEifdAIetsgipLAn....
Bovis   MGAlLtiLaEvf....ElAtaTGLSaeaIltGEAfttAellqahIanLvevgel.svaEAlAAtevTseaFealqsi
Kilham  MGAfLavLaEvf....DlAsiTGLSVesIlsGEAlttAellqshInnLvvygGl.teaEAlArVevTpqaFaaltsl
ASV     MGAaLalLgDLvasvsEaAaaTGFSVaeIaaGEA...AAaiEvqIasLatvEGitttsEAiAAIglTpqtYa....v
BKV     MGAaLalLgDLvasvsEaAaaTGFSVaeIaaGEA...AAaiEvqIasLatvEGitstsEAiAAIglTpqtYa....v
JCV     MGAaLalLgDLvatvsEaAaaTGFSVaeIaaGEA...AAtiEveIasLatvEGitstsEAiAAIglTpetYa....v
SV40    MGAaLtlLgDLiatvsEaAaaTGFSVaeIaaGEA...AAaiEvqlasvatvEGlt.tsEAiAAIglTpqaYa....v
Cons    MGA-L--L-DL-----E-A--TG-SV--I--GEA---A---E--I--L---EG-----EA-AA---T---Y------

                                  115 → VP3
PY-2a   qgaStislgiqrYL..hneeVptv....nrnMALipWrdpallDIYFPGvnqFahalnvv..hdWghgLLhsVgryv
Avian   sapSliaasvkaFags...pva...agnn..MALqvWrdq..mDILFPGaewFsnaVhninPlaWaqsLYeqVgqsi
Bovis   itltatssalypstwkhstpsanl....nqeMALvpYigD..lDIFFPGaetisrfVysiDPfrWasyLYniVgrav
Kilham  tvgaavsaalypYywsyrtpVadl....n..MALqiWypD..lDILFPGalpFarfVnyiDPanWaadLYraVgryf
ASV     tgiSslaqvgyrFfsdwdhkVstvglyqqsgMALelFnpDeyyDILFPGvntFvnnIqylDPrhWgpsLFatIsqal
BKV     sgiSslaqvgyrFfsdwdhkVstvglyqqsgMALelFnpDeyyDILFPGvntFvnnIqylDPrhWgpsLFatIsqal
JCV     tggSaiaqlgyrFfadwdhkVstvglfqqpaMALqlFnpEdyyDILFPGvnaFvnnIhylDPrhWgpsLFstIsqaf
SV40    tgvSavaqvgyrFfsdwdhkVstvglyqqpgMAvdlYrpDdyyDILFPGvqtFvhsVqylDPrhWgptLFnaIsqaf
Cons    ---S--------F-------V----------MAL--W--D---DILFPG---F---V---DP--W---LF-------

                                                                  233
PY-2a   rELtvRqthtFlDgLARLLEntrWvVsnapqsaidainrgassassgysslsdYYrqlglnppqrraLfnriegsmg
Avian   taLivyqsrgiyDiLARaLEtarWtlttaavdtYqtlks..............YYgeLpavsgRveafrryhevaqg
Bovis   tDiagRtaqsihhtiAnFLEnvrWtVshlgtnLYsglhn..............YYrqLpplnppqsrelarrLgvpq
Kilham  rELamRsvtsLsEtLsqYFEnarWaVsglfnfFvswtrk..............llfpvrpvsnstetisknLghpqp
ASV     qELqrRterfFrDsLARFLEettWtIvnapinFYnyiqd..............YYsnLspirpsmvrqvaeregthv
BKV     qELqrRterfFrDsLARFLEettWtIvnapinFYnyiqq..............YYsdLspirpsmvrqvaeregtrv
JCV     qEiqrRtqklFvEsLARFLEettWaIvnspanLYnyisd..............YYsrLspvrpsmvrqvaqregtyi
SV40    qELerRtqryLrDsLARFLEettWtVinapvnWYnslqd..............YYstLspirptmvrqvanreglqi
Cons    -EL--R------D-LAR-LE---W---------Y-----..............YY--L--------------------

                266                                 302                 319
PY-2a   de.........SGEvIkfyqAqvvshQRvtPdWMLPLiLGLYGdiTPtwatvieEdgpqkKkrr.............
Avian   .egpqem....tGqtIEqqtpPGGAmQRhAndWLLPLiLGLYGdlTPewryqlkErlnvpKrkrklpttsagtspps
Bovis   ...........SaEYVEkygAPGGAeQRvAPdWLLPLLLGLYGdlTPaweaeveEeeneqdeeeyeppqkrikrtak
Kilham  ...........SatYVtkvdpPGGAnQRsAPdWMLPLLLGLYGdlTPswkdtleEleaeedgshsqkan..vakprp
ASV     md.lrnkesvhSGEFIEktiAPGGAnQRtAPqWMLPLLLGLYGtvTPaleay..EdgpnqKkrrvsrgssqkakgtr
BKV     md.lrnqqsvhSGEFIEktiAPGGAnQRtAPqWMLPLLLGLYGtvTPaleac..EdgpnqKkrrvsrgssqkakgtr
JCV     ..ldlktpnvqSGEFIErsiAPGGAnQRsAPqWMLPLLLGLYGtvTPaleay..EdgpnkKkrr........kegpr
SV40    weaqsqspnvqSGEFIEkfeAPGGAnQRtAPqWMLPLLLGLYGsvTsalkay..EdgpnkKkrklsrgssqktkgts
Cons    -----------SGEFIE---APGGA-QR-AP-WMLPLLLGLYG--TP-------E----------------------
```

Obr. 9. Sekvenční srovnání VP2 osmi polyomavirů. Hydrofóbní úsek je podtržen a čtvercem je ohraničena část nejvíce konzervovaných aminokyselin. Převzato a upraveno z Chen et al., 1998.

## 5.2 Vliv minoritních proteinů na skládání virových partikulí

Bylo zjištěno, že minoritní proteiny nejsou esenciální pro sestavení virům podobným partikulím v hmyzích buňkách Sf9, ale koexprese VP1 s VP2 je nutná pro to, aby proběhly všechny posttranslační úpravy hlavního kapsidového proteinu (Forstová et al. 1993).

Vliv VP2 na skládání virové partikule je značný. V práci Kawano et al., 2006, prováděné na viru SV40, bylo zjištěno, že při syntéze vysoce čištěných molekul VP1 a při podmínkách fyziologického pH a koncentrace solí se tyto molekuly nedokáží samouspořádávat do VLPs. Při hodnotách pH 5 dochází k vytváření dlouhých tubulárních struktur složených z molekul VP1. To je pravděpodobně způsobeno konformací C terminálního konce VP1, který je v těchto hodnotách pH schopen vytvářet tubulární struktury.

K tomuto předpokladu též přispívá zjištění, že molekuly VP1 s mutací na C konci své aminokyselinové sekvence přednostně tvoří tubulární struktury v buňkách Sf9.

Při hodnotách pH 7 VP1 molekuly netvoří pentamery. Je to pravděpodobně způsobeno tím, že konformace molekuly za těchto podmínek nedovoluje interakci jednotlivých molekul k tvorbě pentamerů. Po přidání VP2 molekul při těchto podmínkách docházelo k samouspořádávání VLPs. Předpokladem je že molekula VP2 interaguje s pentamerou VP1 molekul a tímto pomáhá k vzájemné interakci jednotlivých pentamer a složení partikule. Dále víme, že vzájemné interakce mezi proteiny VP2 uvnitř partikulí přispívají k vytvoření sférických útvarů, velice podobných těm, které jsou tvořeny in vivo při skládání virových partikulí.

Skládání virových partikulí v jádře napadené buňky není zcela objasněné. Studium viru SV40 a myšího polyomaviru ukázalo na možnost tvorby subvirionového komplexu, složeného z hlavního strukturního proteinu VP1 a jednoho z minoritních VP2 nebo VP3. Tento komplex se tvoří v cytoplasmě a následně vstupuje do jádra, kde proběhne úplné složení virionu.

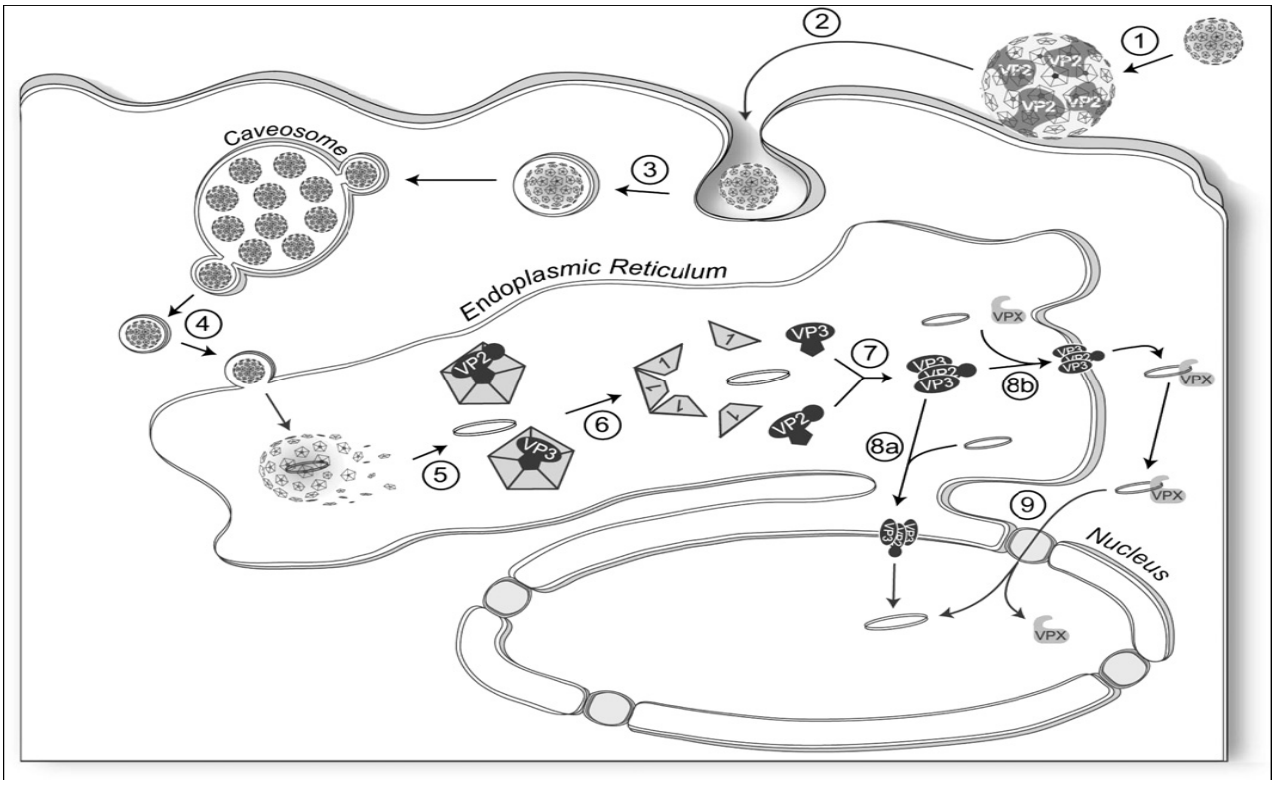
Z hlediska podobnosti proteinů VP2 a VP3 a maximální úspornosti genomu polyomavirů, bylo zkoumáno, proč virus kóduje oba minoritní proteiny a bylo poukázáno na již předtím zmíněné funkce myristilovaného konce VP2 proteinu a zároveň na to, že v kapsidě není dostatek místa pro 72 proteinů s myristilovaným N koncem. Proto se předpokládá, že společná část strukturních proteinů funguje při vazbě na VP1 a unikátní konec VP2 se zapojuje v časných fázích infekce (Barouch et al., 1994).

## 5.3 Úloha minoritního proteinu VP3

Jako jedna z hlavních dosud prokázaných funkcí VP3 proteinu je jeho interakce s buněčnými importiny při vstupu komplexu strukturních proteinů s virovou DNA do jádra (Nakanishi et al., 2002). Další možnou funkcí tohoto proteinu je stimulace interakce VP1 a PARP (poly ADP-ribóza polymeráza) (Gordon-Shaag et al., 2003). Tato má následně vliv na regulaci exprese virových proteinů (Carbone et al., 2006). V práci Huerfano et al., z roku 2009 bylo zjištěno, že minoritní proteiny VP2 a VP3 myšího polyomaviru, produkované za nepřítomnosti jiných virových komponent interagují s membránami buněčných organel a

působí jako viroporiny. Takovýmto způsobem minoritní proteiny MPyV mohou fungovat jako účinné spouštěče apoptózy, kdy tento proces nastává po uvolnění vápenatých iontů z ER, nebo uvolněním cytochromu c z mitochondrií. Schopnost minoritních proteinů usmrcovat napadenou buňku značně klesá během infekce, kdy jsou tyto proteiny syntetizovány za přítomnosti hlavního kapsidového proteinu. Tehdy se minoritní proteiny stávají součástí virové kapsidy a jejich působení jako viroporinů se projevuje během pozdní fáze infekce, kdy přispívají k uvolnění virového potomstva do okolí napadené buňky (Huerfano et al., 2009). Mutační analýzou viru SV40, bylo prokázáno, že přítomnost minoritních proteinů je esenciální. Jejich funkce je přitom za normálních podmínek infekce pod kontrolou VP1. Protein VP2 výrazně zvyšuje vazbu viru na buněčný povrch, zatímco VP3 tento proces výrazně redukuje. Oba minoritní proteiny se posttranslačně zabudovávají do membrán ER, přičemž tento proces je regulován VP1, kdy vyvázání minoritních proteinů pentametry z VP1 zabraňuje jejich integraci do ER (Daniels et al., 2006). Viz. obrázek 10. Při dalších pokusech, kdy byly exprimovány proteiny z pozdní fáze infekce v bakteriálních buňkách E.coli, bylo zjištěno, že VP2 a VP3 způsobují permeabilizaci bakteriálních membrán. Zjištěna byla i unikátní schopnost VP3 lyzovat bakteriálních buňky, kdy tento proces probíhá nezávisle na eukaryotické signalizaci a drahách indukovaných při buněčné smrti (Daniels et al., 2006).

I když je známo, že kapsidové proteiny SV40 i ostatních polyomavirů jsou nezbytné při maturaci virionů, stále zde existují pochybnosti o funkcích jednotlivých strukturních proteinů. V práci Nakanishi et al., 2007 byly analyzovány partikule bez VP2/3 proteinů a u takovýchto partikulí bylo ukázáno, že protein VP1 je nezbytný pro zabalení virového genomu v komplexu s histony a pro vstup viru do buňky. Partikule postrádající VP2/3 proteiny nebyly schopny iniciace exprese velkého T-antigenu v jádře a také neměly schopnost asociovat se s hostitelskými importiny. Jako hlavní role VP2/3 proteinů se zde předpokládá jejich schopnost směřovat virovou DNA do buněčného jádra. V této práci bylo dále poukázáno na neživotaschopnost mutantních partikulí složených pouze z hlavního strukturního proteinu VP1. Další skutečností bylo i pozorování změn ve struktuře virionu, nastávajících v cytoplasmě, kdy se předpokládá, že tyto změny jsou kontrolovány přes Ca-vazebná místa na VP1. Strukturní změny vedou k odhalení NLS proteinu VP3 a tímto způsobem k dopravení komplexu VP1-VP2/3 a virové DNA k jádru, interakcí s buněčnými importiny (Nakanishi et al., 2002).




Obr. 10. Model vstupu a penetrace membrány ER virem SV40. (1) Vazba na napadenou buňku je zprostředkovaná virovou kapsidou v té části, kde je navázán protein VP2. (2) Navázaný virus proniká membránou a vstupuje do kaveoly. (3) Virus je následně endocytován a transportován do kaveozomu. (4) Dopravení viru do ER. (5) V ER dochází k rozvolnění kapsidy za pomoci buněčného chaperonu. (6) Dále se rozvolňuje pentametr složený z VP1 a jsou uvolněny i minoritní proteiny. (7) VP2 a VP3 oligomerizují a vkládají se do membrány ER. (8a) Minoritní proteiny vstupují přímo do jádra nebo (8b) putují přes cytoplasmu, kde pomocí NLS transportují virový genom do jádra. Převzato a upraveno z Daniels et al., 2006.

### 5.3.1 Porovnání C – terminálního konce VP3 proteinu u MPyV a SV40

U myšího polyomaviru bylo zjištěno, že posledních 23 aminokyselinových zbytků z C – konce VP3 není nezbytných k vazbě na VP1, a že interakce těchto dvou proteinů je hydrofobního charakteru (Barouch et al., 1994). Narozdíl od tohoto zjištění se ukázalo, že delece 13-ti koncových aminokyselin z C – konce VP3 proteinu u viru SV40 brání vazbě na VP1. Dále je známo, že VP1-VP3 interagující úseky u SV40 jsou značně nabité a bazického

charakteru (Gharakhanian et al., 1990). Předpokládá se, že solné můstky tvořené mezi minoritním a majoritním proteinem hrají důležitou roli při této interakci u viru SV40. Na obrázku 11. je porovnání sekvencí C – terminálního konce VP3 proteinu u myšího polyomaviru a viru SV40 (Barouch et al., 1994).

```
                140                150        160        170        180
Polyoma VP3:    GPTPAAHIQ-----D ESGEVIKFYQ AQVVSHQRVT PDWMLPLILG LYGDITPTWA
SV40 VP3:       QVTERWEAQSQSPNV QSGEFIEKFE APGGANQRTA PQWMLPLLLG LYGSVTS--A
                139                154        164        174        184

                190        200
Polyoma VP3:    TVIEEDGPQK KKRRL*
SV40 VP3:       LKAYEDGPNK KKRKLSRGSS QKTKGTSASA KARHKRRNRS SRS*
                192        202        212        222        232
```

Obr. 11. Srovnání C – terminálního konce VP3 proteinu myšího polyomaviru a SV40. Je zde patrná jejich podobná sekvence a rozdílná délka. Převzato z Barouch et al., 1994.

Strukturní proteiny SV40 jsou všechny schopné interakce a vazby na DNA a tato vazba není sekvenčně specifická. Posledních 40 aminokyselin z C - konce obou z proteinů VP2 a VP3 hraje roli v skládání DNA (Clever et al., 1993). Koncových 13 aminokyselin z C - konce proteinů VP2 a VP3 interaguje s VP1 (Gharakhaniam et al., 1990). Na základě těchto skutečností se předpokládá, že minoritní proteiny nejprve interagují s minichromosomem skrz svoje DNA vazebné domény a následně se uskutečňuje vazba minichromosomu s navázanými VP2 a VP3 s pentamerem složeným z VP1 proteinů (Clever et al.,1993). Při analýze mutantů s delecemi v C - koncových 13-ti aminokyselinách VP2/3, bylo zaznamenáno, že VP2/3 hrají důležitou roli při morfogenezi virionů. Změna klíčových aminokyselin v tomto 13-ti aminokyselinovém zbytku totiž vede k výraznému snížení afinity strukturních proteinů k DNA, zatímco možnost vazby k VP1 nebyla výrazně ovlivněná. To vedlo k závěru, že DNA vazebná doména a doména interagující s VP1 jsou funkčně oddělené. Dále se zjistilo, že viry mutantní v sekvenci VP2/3 neschopné vázat DNA, také nejsou schopné produktivní infekce, což potvrzuje domněnku, že vazba DNA k VP2/3 hraje důležitou roli při skládání virionů (Dean et al., 1994). U SV40 jaderný lokalizační signál přítomný v sekvenci kapsidových proteinů funguje ve dvou fázích infekce. Při směřování

virového genomu do jádra a při směřování nově nasyntetizovaných strukturních proteinu. V pozdějších fázích infekce interakce mezi VP1 a VP3 umožňuje směřování do jádra i VP3 proteinům s poškozeným NLS, v případě navázání na VP1 s funkčním NLS (Ishu et al., 1994).

Z provedených pokusů plyne, že C – terminální úsek VP2/3 u SV40 obsahuje tři funkční domény; doménu interagující s hlavním strukturním proteinem, část obsahující signál, cílící tyto proteiny do jádra, a DNA vazebnou doménu (Gharakhanian et al., 1990; Clever et al., 1993).

Při zkoumání vlastností myšího polyomaviru bylo zjištěno, že VP2/3 proteiny tohoto viru postrádají posledních 28 aminokyselin na C – konci, přítomných u SV40. To způsobuje i rozdíl mezi těmito jinak velice příbuznými viry. Zatímco minoritní proteiny SV40 váží DNA, u myšího polyomaviru minoritní proteiny nemají tuto schopnost. Proto také strukturní proteiny myšího polyomaviru tvoří komplexy s VP1 bezprostředně po nasyntetizování v cytoplasmě a takto využívají jaderného lokalizačního signálu přítomného na VP1 (Barouch et al., 1994).

Porovnání SV40 C – terminální sekvence na konci minoritních proteinů se stejnou sekvencí u příbuzných BK a JC viru, ukazuje, že v sekvenci 13 aminokyselin, 5 z nich je konzervovaných u všech zástupců, což poukazuje na důležitost tohoto úseku pro vazbu k DNA. Dále z pokusů vyplynulo, že poškození DNA vazebné domény SV40 znemožňuje viru tvořit plaky (Dean et al., 1994). Tato skutečnost opět podporuje teorii, že poškození zmíněného úseku minoritního proteinu hraje důležitou roli v morfogenezi virionů (Huang et al., 1972).

# 6 Závěr

V této práci jsou shrnuty vlastnosti především strukturních proteinů polyomavirů, s ohledem na jejich funkce během životního cyklu viru. Měla jsem za cíl porovnat společné i specifické vlastnosti těchto virových produktů u většiny významných zástupců čeledi včetně nově objevených lidských patogenů.

Cílem také bylo poukázat na multifunkčnost hlavně minoritních proteinů, které jsou zapojeny, jak se zdá, do většiny dějů probíhajících během životního cyklu viru. Předpokládá se, že jejich role se projevuje během vstupu viru do buňky, pohybu viru během infekce, dopravení virového genomu do jádra, vstupu virové DNA do jádra, morfogenezi kapsid i navození smrti napadené buňky.

Ačkoliv ne všechny dosud zmiňované funkce strukturních proteinů jsou plně prokázáné, studium těchto virových produktů i celkově virů této čeledi, má za cíl dosáhnout jejich detailní poznání a tímto přispět k prevenci a léčbě onemocnění jimi způsobovaných.

# 7 Seznam použité literatury

Allander T, Andreasson K, Gupta S, Bjerkner A, Bogdanovic G, Persson MA, Dalianis T, Ramqvist T, Andersson B. Identification of a third human polyomavirus.J Virol. 2007 Apr;81(8):4130-6. Epub 2007 Feb 7.

Barban S.: Electrophoretic differences in the capsid proteins of simian virus 40 plaque mutants. J Virol. 1973 Jun;11(6):971-7.

Barouch DH, Harrison SC Interactions among the major and minor coat proteins of polyomavirus. J Virol. 1994 Jun;68(6):3982-9.

Boldorini R, Allegrini S, Miglio U, Paganotti A, Veggiani C, Mischitelli M, Monga G, Pietropaolo V.: Genomic mutations of viral protein 1 and BK virus nephropathy in kidney transplant recipients. J Med Virol. 2009 Aug;81(8):1385-93.

Breau WC, Atwood WJ, Norkin LC.: Class I major histocompatibility proteins are an essential component of the simian virus 40 receptor. J Virol. 1992 Apr;66(4):2037-45.

Cai X, Chang D, Rottinghaus S, Consigli RA.: Expression and purification of recombinant polyomavirus VP2 protein and its interactions with polyomavirus proteins. J Virol. 1994 Nov;68(11):7609-13.

Carbone M, Reale A, Di Sauro A, Sthandier O, Garcia MI, Maione R, Caiafa P, Amati P.: PARP-1 interaction with VP1 capsid protein regulates polyomavirus early gene expression. J Mol Biol. 2006 Nov 3;363(4):773-85. Epub 2006 Jun 30.

Caruso M, Cavaldesi M, Gentile M, Sthandier O, Amati P, Garcia MI.: Role of sialic acid-containing molecules and the alpha4beta1 integrin receptor in the early steps of polyomavirus infection. J Gen Virol. 2003 Nov;84(Pt 11):2927-36.

Clever J, Dean DA, Kasamatsu H.: Identification of a DNA binding domain in simian virus 40 capsid proteins Vp2 and Vp3. J Biol Chem. 1993 Oct 5;268(28):20877-83.

Daniels R, Rusan NM, Wadsworth P, Hebert DN.: SV40 VP2 and VP3 insertion into ER membranes is controlled by the capsid protein VP1: implications for DNA translocation out of the ER. Mol Cell. 2006 Dec 28;24(6):955-66.

Dean DA, Kasamatsu H.: Signal- and energy-dependent nuclear transport of SV40 Vp3 by isolated nuclei. Establishment of a filtration assay for nuclear protein import. J Biol Chem. 1994 Feb 18;269(7):4910-6.

Delos SE, Montross L, Moreland RB, Garcea RL.: Expression of the polyomavirus VP2 and VP3 proteins in insect cells: coexpression with the major capsid protein VP1 alters VP2/VP3 subcellular localization. Virology. 1993 May;194(1):393-8.

Dugan AS, Gasparovic ML, Tsomaia N, Mierke DF, O'Hara BA, Manley K, Atwood WJ.: Identification of amino acid residues in BK virus VP1 that are critical for viability and growth. J Virol. 2007 Nov;81(21):11798-808. Epub 2007 Aug 15.

Eash S, Manley K, Gasparovic M, Querbes W, Atwood WJ.: The human polyomaviruses. Cell Mol Life Sci. 2006 Apr;63(7-8):865-76.

Eash S, Querbes W, Atwood WJ.: Infection of vero cells by BK virus is dependent on caveolae. J Virol. 2004 Nov;78(21):11583-90.

Fang CY, Chen HY, Wang M, Chen PL, Chang CF, Chen LS, Shen CH, Ou WC, Tsai MD, Hsu PH, Chang D.: Global analysis of modifications of the human BK virus structural proteins by LC-MS/MS. Virology. 2010 Apr 8. [Epub ahead of print]

Fattaey AR, Consigli RA.: Synthesis, posttranslational modifications, and nuclear transport of polyomavirus major capsid protein VP1. J Virol. 1989 Jul;63(7):3168-75.

Feng H, Shuda M, Chang Y, Moore PS.: Clonal integration of a polyomavirus in human Merkel cell carcinoma. Science. 2008 Feb 22;319(5866):1096-100. Epub 2008 Jan 17.

Forstová J, Krauzewicz N, Wallace S, Street AJ, Dilworth SM, Beard S, Griffin BE.: Cooperation of structural proteins during late events in the life cycle of polyomavirus. J Virol. 1993 Mar;67(3):1405-13.

Freund R, Garcea RL, Sahli R, Benjamin TL.: A single-amino-acid substitution in polyomavirus VP1 correlates with plaque size and hemagglutination behavior. J Virol. 1991 Jan;65(1):350-5.

Garcea RL, Benjamin TL.: Host range transforming gene of polyoma virus plays a role in virus assembly. Proc Natl Acad Sci U S A. 1983 Jun;80(12):3613-7.

Gardner SD, Field AM, Coleman DV, Hulme B.: New human papovavirus (B.K.) isolated from urine after renal transplantation. Lancet. 1971 Jun 19;1(7712):1253-7.

Gaynor AM, Nissen MD, Whiley DM, Mackay IM, Lambert SB, Wu G, Brennan DC, Storch GA, Sloots TP, Wang D.: Identification of a novel polyomavirus from patients with acute respiratory tract infections. PLoS Pathog. 2007 May 4;3(5):e64.

Gharakhanian E, Kasamatsu H.: Two independent signals, a nuclear localization signal and a Vp1-interactive signal, reside within the carboxy-35 amino acids of SV40 Vp3. Virology. 1990 Sep;178(1):62-71.

Gilbert J, Ou W, Silver J, Benjamin T.: Downregulation of protein disulfide isomerase inhibits infection by the mouse polyomavirus. J Virol. 2006 Nov;80(21):10868-70. Epub 2006 Aug 23.

Gordon-Shaag A, Yosef Y, Abd El-Latif M, Oppenheim A. The abundant nuclear enzyme PARP participates in the life cycle of simian virus 40 and is stimulated by minor capsid protein VP3. J Virol. 2003 Apr;77(7):4273-82.

Görlich D, Prehn S, Laskey RA, Hartmann E.: Isolation of a protein that is essential for the first step of nuclear protein import. Cell. 1994 Dec 2;79(5):767-78.

Griffith JP, Griffith DL, Rayment I, Murakami WT, Caspar DL.: Inside polyomavirus at 25-A resolution. Nature. 1992 Feb 13;355(6361):652-4.

Hewick RM, Waterfield MD, Miller LK, Fried M.: Correlation between genetic loci and structural differences in the capsid proteins of polyoma virus plaque morphology mutants. Cell. 1977 Jun;11(2):331-8.

Huang ES, Nonoyama M, Pagano JS.: Structure and function of the polypeptides in simian virus 40. II. Transcription of subviral deoxynucleoprotein complexes in vitro. J Virol. 1972 Jun;9(6):930-7.

Huérfano S, Castañeda A, Castañeda E.: Experimental infection of almond trees seedlings (Terminalia catappa) with an environmental isolate of Cryptococcus neoformans var. gattii, serotype C. Rev Iberoam Micol. 2001 Sep;18(3):131-2.

Chang D, Cai X, Consigli RA.: Characterization of the DNA binding properties of polyomavirus capsid protein. J Virol. 1993 Oct;67(10):6327-31.

Chen XS, Stehle T, Harrison SC.: Interaction of polyomavirus internal protein VP2 with the major capsid protein VP1 and implications for participation of VP2 in viral entry. EMBO J. 1998 Jun 15;17(12):3233-40.

Chen XS, Stehle T, Harrison SC.: Interaction of polyomavirus internal protein VP2 with the major capsid protein VP1 and implications for participation of VP2 in viral entry. EMBO J. 1998 Jun 15;17(12):3233-40.

Ikegaya H, Saukko PJ, Tertti R, Metsärinne KP, Carr MJ, Crowley B, Sakurada K, Zheng HY, Kitamura T, Yogo Y.: Identification of a genomic subgroup of BK polyomavirus spread in European populations. J Gen Virol. 2006 Nov;87(Pt 11):3201-8.

Jin L, Gibson PE, Knowles WA, Clewley JP. BK virus antigenic variants: sequence analysis within the capsid VP1 epitope. J Med Virol. 1993 Jan;39(1):50-6.

Johnson EM.: Structural evaluation of new human polyomaviruses provides clues to pathobiology. Trends Microbiol. 2010 Feb 20. [Epub ahead of print]

Kasamatsu H, Nakanishi A.: How do animal DNA viruses get to the nucleus? Annu Rev Microbiol. 1998;52:627-86.

Kassem A, Schöpflin A, Diaz C, Weyers W, Stickeler E, Werner M, Zur Hausen A.: Frequent detection of Merkel cell polyomavirus in human Merkel cell carcinomas and identification of a unique deletion in the VP1 gene. Cancer Res. 2008 Jul 1;68(13):5009-13.

Kawano MA, Inoue T, Tsukamoto H, Takaya T, Enomoto T, Takahashi RU, Yokoyama N, Yamamoto N, Nakanishi A, Imai T, Wada T, Kataoka K, Handa H.: The VP2/VP3 minor capsid protein of simian virus 40 promotes the in vitro assembly of the major capsid protein VP1 into particles. J Biol Chem. 2006 Apr 14;281(15):10164-73. Epub 2006 Feb 14.

Kawano MA, Xing L, Tsukamoto H, Inoue T, Handa H, Cheng RH.: Calcium bridge triggers capsid disassembly in the cell entry process of simian virus 40. J Biol Chem. 2009 Dec 11;284(50):34703-12. Epub 2009 Oct 12.

Krautkrämer E, Klein TM, Sommerer C, Schnitzler P, Zeier M.: Mutations in the BC-loop of the BKV VP1 region do not influence viral load in renal transplant patients. J Med Virol. 2009 Jan;81(1):75-81.

Krauzewicz N, Streuli CH, Stuart-Smith N, Jones MD, Wallace S, Griffin BE.: Myristylated polyomavirus VP2: role in the life cycle of the virus. J Virol. 1990 Sep;64(9):4414-20.

Krude T, de Maddalena C, Knippers R.: A nucleosome assembly factor is a constituent of simian virus 40 minichromosomes. Mol Cell Biol. 1993 Feb;13(2):1059-68.

Krumbholz A, Zell R, Egerer R, Sauerbrei A, Helming A, Gruhn B, Wutzler P.: Prevalence of BK virus subtype I in Germany. J Med Virol. 2006 Dec;78(12):1588-98.

Li et al., 2009 Association of simian virus 40 vp1 with 70-kilodalton heat shock proteins and viral tumor antigens.

Liddington RC, Yan Y, Moulai J, Sahli R, Benjamin TL, Harrison SC.: Structure of simian virus 40 at 3.8-A resolution. Nature. 1991 Nov 28;354(6351):278-84.

Liebl D, Difato F, Horníková L, Mannová P, Stokrová J, Forstová J. Mouse polyomavirus enters early endosomes, requires their acidic pH for productive infection, and meets transferrin cargo in Rab11-positive endosomes. J Virol. 2006 May;80(9):4610-22.

Mannová P, Liebl D, Krauzewicz N, Fejtová A, Stokrová J, Palková Z, Griffin BE, Forstová J. Analysis of mouse polyomavirus mutants with lesions in the minor capsid proteins. J Gen Virol. 2002 Sep;83(Pt 9):2309-19.

McMillen J, Consigli RA.: Characterization of polyoma DNA-protein complexes. I. Electrophoretic identification of the proteins in a nucleoprotein complex isolated from polyoma-infected cells. J Virol. 1974 Dec;14(6):1326-36.

McMillen J, Consigli RA.: Immunological reactivity of antisera to sodium dodecyl sulfate-derived polypeptides of polyoma virions. J Virol. 1977 Mar;21(3):1113-20.

Nakanishi A, Clever J, Yamada M, Li PP, Kasamatsu H.: Association with capsid proteins promotes nuclear targeting of simian virus 40 DNA. Proc Natl Acad Sci U S A. 1996 Jan 9;93(1):96-100.

Nakanishi A, Itoh N, Li PP, Handa H, Liddington RC, Kasamatsu H.: Minor capsid proteins of simian virus 40 are dispensable for nucleocapsid assembly and cell entry but are required for nuclear entry of the viral genome. J Virol. 2007 Apr;81(8):3778-85. Epub 2007 Jan 31.

Nakanishi A, Shum D, Morioka H, Otsuka E, Kasamatsu H. Interaction of the Vp3 nuclear localization signal with the importin alpha 2/beta heterodimer directs nuclear entry of infecting simian virus 40. J Virol. 2002 Sep;76(18):9368-77.

O'Farrell PZ, Goodman HM.: Resolution of simian virus 40 proteins in whole cell extracts by two-dimensional electrophoresis: heterogeneity of the major capsid protein. Cell. 1976 Oct;9(2):289-98.

Ou WC, Wang M, Fung CY, Tsai RT, Chao PC, Hseu TH, Chang D.: The major capsid protein, VP1, of human JC virus expressed in Escherichia coli is able to self-assemble into a capsid-like particle and deliver exogenous DNA into human kidney cells. J Gen Virol. 1999 Jan;80 ( Pt 1):39-46.

Pastrana DV, Tolstov YL, Becker JC, Moore PS, Chang Y, Buck CB.: Quantitation of human seroresponsiveness to Merkel cell polyomavirus. PLoS Pathog. 2009 Sep;5(9):e1000578. Epub 2009 Sep 11.

Qian M, Cai D, Verhey KJ, Tsai B. A lipid receptor sorts polyomavirus from the endolysosome to the endoplasmic reticulum to cause infection. PLoS Pathog. 2009 Jun;5(6):e1000465. Epub 2009 Jun 5.

Randhawa P, Bohl D, Brennan D, Ruppert K, Ramaswami B, Storch G, March J, Shapiro R, Viscidi R.: longitudinal analysis of levels of immunoglobulins against BK virus capsid proteins in kidney transplant recipients. Clin Vaccine Immunol. 2008 Oct;15(10):1564-71. Epub 2008 Aug 27.

Randhawa PS, Khaleel-Ur-Rehman K, Swalsky PA, Vats A, Scantlebury V, Shapiro R, Finkelstein S.: DNA sequencing of viral capsid protein VP-1 region in patients with BK virus interstitial nephritis. Transplantation. 2002 Apr 15;73(7):1090-4.

Resh MD. Fatty acylation of proteins: new insights into membrane targeting of myristoylated and palmitoylated proteins. Biochim Biophys Acta. 1999 Aug 12;1451(1):1-16.

Richards AA, Stang E, Pepperkok R, Parton RG.: Inhibitors of COP-mediated transport and cholera toxin action inhibit simian virus 40 infection. Mol Biol Cell. 2002 May;13(5):1750-64.

Richterová Z, Liebl D, Horák M, Palková Z, Stokrová J, Hozák P, Korb J, Forstová J.: Caveolae are involved in the trafficking of mouse polyomavirus virions and artificial VP1 pseudocapsids toward cell nuclei. J Virol. 2001 Nov;75(22):10880-91.

Robert Daniels, Nasser M. Rusan, Anne-Kathrin Wilbuer, Leonard C. Norkin, Patricia Wadsworth, and Daniel N. Hebert: Simian Virus 40 Late Proteins Possess Lytic Properties That Render Them Capable of Permeabilizing Cellular Membranes JOURNAL OF VIROLOGY, July 2006, p. 6575–6587 Vol. 80, No. 13

Robert Daniels, Nasser M. Rusan,Patricia Wadsworth, and Daniel N. Hebert1,: SV40 VP2 and VP3 Insertion into ER Membranes Is Controlled by the Capsid Protein VP1:Implications for DNA Translocation out of the ER Molecular Cell 24, 955–966, December 28, 2006 Ş2006 Elsevier Inc. DOI 10.1016/j.molcel.2006.11.001

Salunke DM, Caspar DL, Garcea RL.: Self-assembly of purified polyomavirus capsid protein VP1. Cell. 1986 Sep 12;46(6):895-904.

Shuda M, Arora R, Kwun HJ, Feng H, Sarid R, Fernández-Figueras MT, Tolstov Y, Gjoerup O, Mansukhani MM, Swerdlow SH, Chaudhary PM, Kirkwood JM, Nalesnik MA, Kant JA, Weiss LM, Moore PS, Chang Y.: Human Merkel cell polyomavirus infection I. MCV T antigen expression in Merkel cell carcinoma, lymphoid tissues and lymphoid tumors. Int J Cancer. 2009 Sep 15;125(6):1243-9.

Schelhaas M, Malmström J, Pelkmans L, Haugstetter J, Ellgaard L, Grünewald K, Helenius A.: Simian Virus 40 depends on ER protein folding and quality control factors for entry into host cells. Cell. 2007 Nov 2;131(3):516-29.

Stehle T, Gamblin SJ, Yan Y, Harrison SC.: The structure of simian virus 40 refined at 3.1 A resolution. Structure. 1996 Feb 15;4(2):165-82.

Stehle T, Harrison SC.: High-resolution structure of a polyomavirus VP1-oligosaccharide complex: implications for assembly and receptor binding. EMBO J. 1997 Aug 15;16(16):5139-48.

Stehle T, Yan Y, Benjamin TL, Harrison SC.: Structure of murine polyomavirus complexed with an oligosaccharide receptor fragment.Nature. 1994 May 12;369(6476):160-3.

Trofe J, Hirsch HH, Ramos E.: Polyomavirus-associated nephropathy: update of clinical management in kidney transplant patients. Transpl Infect Dis. 2006 Jun;8(2):76-85.

Tsai B, Gilbert JM, Stehle T, Lencer W, Benjamin TL, Rapoport TA.: Gangliosides are receptors for murine polyoma virus and SV40. EMBO J. 2003 Sep 1;22(17):4346-55.

Yuen LK, Consigli RA.: Identification and protein analysis of polyomavirus assembly intermediates from infected primary mouse embryo cells. Virology. 1985 Jul 15;144(1):127-38.