

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Speciální chemicko-biologické obory
Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organismů



Tomáš Hron

Účast eukaryotických DNA opravných mechanismů ve virové replikaci
Implication of eukaryotic DNA repair machinery in viral replication

Bakalářská práce

Školitel: RNDr. Hana Španielová, PhD.

Praha, 2011

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, 30.4. 2011

Podpis

Abstrakt

Odpověď na poškození DNA eukaryot je důležitý mechanismus, který zajišťuje stabilitu genomu. Jeho složky jsou mimo jiné mobilizovány i v průběhu virové infekce jako reakce na cizorodou nukleovou kyselinu. Ukazuje se, že některé viry také aktivují DNA opravné mechanismy záměrně a využívají je pro zajištění svého replikačního cyklu. Tato aktivace je z velké části zprostředkována virovými proteiny, které přímo interagují s buněčnými faktory. Klíčové proteiny DNA opravných mechanismů jsou často asociovány s centry virové replikace a pravděpodobně se podílejí na jejím průběhu. Dále jsou také využívány pro navození vhodného prostředí k virové reprodukci v buňce. Konkrétní mechanismy, kterými se faktory DNA opravných drah podílejí na virové infekci, jsou však z velké části nejasné. V této práci jsou shrnuty principy interakce virů s eukaryotickou odpovědí na poškození DNA a popsány hlavní virové čeledě, které ji aktivují a využívají pro replikaci svého genomu.

Klíčová slova: odpověď na poškození DNA, oprava DNA, virová replikace, *Herpesviridae*, *Polyomaviridae*, *Papillomaviridae*, *Retroviridae*, ATM, ATR, DNA-PK

Abstract

Eukaryotic DNA damage response is an important mechanism which ensures genome stability. Its components are also mobilized during viral infection as a reaction against extraneous nucleic acid. Additionally, DNA repair machinery seems to be activated by some viruses purposely to provide their replication. This activation is mediated mainly by viral proteins which are able to interact with cellular factors. In many cases, key components of DNA damage mechanisms are associated with viral replication centre and likely participate in this process. Furthermore, cellular DNA damage signaling is exploited to provide competent environment for viral reproduction. However, particular mechanisms how these cellular factors participate in viral infection are still largely unclear. In this thesis, the principles of relationship between viral infection and eukaryotic DNA damage response are summarized and main viral families which are known to activate and utilize these mechanisms for its genom replication are described.

Keywords: DNA damage response, DNA repair, viral replication, *Herpesviridae*, *Polyomaviridae*, *Papillomaviridae*, *Retroviridae*, ATM, ATR, DNA-PK

Obsah

Seznam použitých zkratk.....	- 5 -
1. Úvod.....	- 8 -
2. Buněčná odpověď na poškození DNA eukaryot.....	- 8 -
2.1. Vlivy poškozující DNA.....	- 8 -
2.2. Princip odpovědi na poškození DNA.....	- 9 -
2.3. Opravné mechanismy	- 10 -
2.3.1. Oprava vyštěpením báze (BER)	- 11 -
2.3.2. Oprava jednořetězcových přerušení (SSBR).....	- 11 -
2.3.3. Oprava vyštěpením nukleotidu (NER).....	- 12 -
2.3.4. Homologní rekombinace (HR).....	- 13 -
2.3.5. Nehomologní spojování konců (NHEJ)	- 14 -
2.3.6. Oprava špatně zařazených nukleotidů (MMR)	- 14 -
3. Viry a buněčná odpověď na poškození DNA.....	- 15 -
3.1. Aktivace DDR při virové infekci.....	- 15 -
3.2. Vztah virů k DDR	- 16 -
4. DNA opravné mechanismy jako nástroj virové replikace.....	- 17 -
4.1. Retroviridae.....	- 17 -
4.1.1. ATM/ATR signalizace	- 17 -
4.1.2. Homologní rekombinace	- 18 -
4.1.3. Nehomologní spojování konců.....	- 18 -
4.1.4. Oprava vyštěpením báze	- 19 -
4.1.5. Další souvislosti	- 19 -
4.2. Papillomaviridae	- 19 -
4.2.1. ATM/ATR signalizace	- 20 -
4.2.2. Další souvislosti	- 20 -
4.4. Polyomaviridae.....	- 21 -
4.4.1. ATM/ATR signalizace	- 21 -
4.4.2. Homologní rekombinace	- 22 -
4.4.3. Další souvislosti	- 22 -
4.3. Herpesviridae	- 23 -
4.3.1. ATM/ATR signalizace	- 23 -
4.3.2. Homologní rekombinace	- 24 -
4.3.3. Nehomologní spojování konců.....	- 24 -
4.3.4. Další souvislosti	- 24 -
5. Závěr.....	- 25 -
Seznam použité literatury.....	- 28 -

Seznam použitých zkratek

53BP	p53 binding protein	p53 vazebný protein
AIDS	acquired immunodeficiency syndrome	syndrom získané imunodeficiencie
AP	apurinic/apyrimidinic	abazické místo
APE1	apurinic/apyrimidinic endonuclease 1	apurinová/apyrimidinová endonukleáza 1
ATM	ataxia-telangiectasia mutated	kináza spojená se syndromem ataxia telangiectasia
ATR	ataxia-telangiectasia and Rad3-related	kináza spojená se syndromem ataxia telangiectasia a příbuzná proteinu Rad3
ATRIP	ATR-interacting protein	protein interagující s ATR
BER	base excision repair	oprava vyštěpením báze
CtIP	C-terminal-binding-protein-interacting protein	protein interagující s C-konec vazebným proteinem
Cul7	cullin 7	protein culin 7
DDR	DNA damage response	odpověď na poškození DNA
DNA-PK	DNA-dependent protein kinase	DNA dependentní protein kináza
DSBs	double-strand breaks	dvouřetězcová přerušení DNA
EBV	Epstein-Barr virus	virus Epstein-Barrové
ERCC1	excision repair cross complementing group 1	protein uplatňující se v opravách DNA vyštěpením nukleotidu, který je kódován genem ERCC1
Exo1	DNA exonuclease 1	DNA exonukleáza 1
FEN1	flap endonuclease 1	DNA endonukleáza uplatňující se v opravách DNA vyštěpením báze
HIV	human immunodeficiency virus	virus lidské imunodeficiencie

HPV	human papillomavirus	lidský papillomavirus
HR	homologous recombination	homologní rekombinace
HSV	herpes simplex virus	herpes simplex virus
CHK1	checkpoint kinase 1	kináza kontrolního bodu buněčného cyklu 1
CHK2	checkpoint kinase 2	kináza kontrolního bodu buněčného cyklu 2
Lig1	DNA ligase 1	DNA ligáza 1
Lig3	DNA ligase 3	DNA ligáza 3
Lig4	DNA ligase 4	DNA ligáza 4
LT	large T antigen	velký T antigen
MHV-68	murine gammaherpesvirus 68	myší gammaherpesvirus-68
MMR	mismatch repair	oprava špatně zařazených nukleotidů
MSH	MutS homologue	homolog bakteriálního proteinu MutS
ND10	nuclear domain 10	jaderná doména 10
NER	nucleotide excision repair	oprava vyštěpením nukleotidu
NHEJ	nonhomologous end joining	nehomologní spojování konců
nt	nucleotides	nukleotidy
PARP1	poly(ADP-ribose)polymerase 1	poly(ADP-ribóza)polymeráza 1
PCNA	proliferating cell nuclear antigen	jaderný antigen množících se buněk
PIKKs	phosphatidylinositol 3-kinase-like kinases	fosfatidylinositol 3-kinázám podobné protein kinázy
PML	promyelocytic leukaemia	promyelotická leukémie
PML NBs	promyelocytic leukaemia nuclear bodies	promyelocytická leukemická jaderná tělíska
PNKP	polynucleotide kinase/phosphatase	polynukleotid kináza/fosfatáza
Polβ	DNA polymerase β	DNA polymerázy β

Polδ/ϵ	DNA poly merase δ/ϵ	DNA polymeráza δ/ϵ
pRB	retinoblastoma p rotein	retinoblastomový protein
RFC	replication factor C	replikační faktor C
RPA	replication p rotein A	replikační protein A
SMC1	structural m aintenance of chromosomes protein 1	protein udržující strukturu chromozómu 1
SSBR	single-strand b reak r epair	oprava jednořetězcových přerušení
SSBs	single-strand b reaks	jednořetězcová přerušení DNA
ssDNA	single-stranded D NA	jenořetězcová DNA
ST	small T antigen	malý T antigen
SV40	simian virus 40	opičí virus 40
TFIIH	transcription factor II H	transkripční faktor II H
TopBP1	topoisomerase-II beta-binding protein 1	protein vázající Topoizomerázu II β
UV	ultraviolet	ultrafialové záření
Vpr	viral protein R	virový protein R
XPA	xeroderma pigmentosum group A - complementing protein	protein asociovaný se syndromem xeroderma pigmentosum skupiny A
XPC	xeroderma pigmentosum group C - complementing protein	protein asociovaný se syndromem xeroderma pigmentosum skupiny C
XPF	xeroderma pigmentosum group F - complementing protein	protein asociovaný se syndromem xeroderma pigmentosum skupiny F
XPG	xeroderma pigmentosum group G - complementing protein	protein asociovaný se syndromem xeroderma pigmentosum skupiny G
XRCC1	X -ray repair cross-complementing protein 1	protein účastnící se oprav DNA vyštěpením báze a interagující s DNA ligázou 3
XRCC4	X -ray repair cross-complementing protein 4	protein účastnící se oprav dvouřetězcových přerušení DNA pomocí nehomologního spojování konců

1. Úvod

Prokaryotické i eukaryotické organismy mají vyvinuty opravné mechanismy, které zajišťují integritu buněčného genomu. V případě poškození DNA dochází k jejich mobilizaci a nahromadění efektorových proteinů v postiženém místě. Ty jsou dále zodpovědné za opravu DNA a signalizaci, která aktivuje složky regulace buněčného cyklu, čímž je zamezeno buňce vstoupit do mitózy v případě přetrvávajícího poškození. Pokud je narušení genomu neslučitelné s fungováním buňky a jeho oprava není možná, dochází k apoptóze.

Buněčná odpověď na poškození DNA je také aktivována během infekce většiny virů (shrnutí v Lilley *et al.* 2007). Ty jsou nuceny některé složky DNA opravných mechanismů potlačovat, aby nedocházelo k nechtěným úpravám jejich genomu či apoptóze hostitelských buněk. Ukazuje se však, že viry jsou schopné odpověď na poškození DNA cíleně aktivovat skrze své proteiny a využívat její složky pro svou replikaci.

Tato práce má za úkol shrnout poznatky o tom, jak se DNA opravné mechanismy buňky podílejí na virové replikaci a jakým způsobem jsou během produktivní infekce virem využívány. Jsou zde podrobně rozebrány čtyři čeledě savčích virů (*Retroviridae*, *Papillomaviridae*, *Polyomaviridae*, *Herpesviridae*), pro které se jeví interakce s buněčnými faktory odpovědi na poškození DNA nezbytná.

2. Buněčná odpověď na poškození DNA eukaryot

2.1. Vlivy poškozující DNA

Ve všech buňkách je DNA neustále vystavována mutagenům, které způsobují poškození genomu. DNA může být poškozena jak vlivy z vnějšího prostředí, tak i mutageny endogenního charakteru.

Častými mutageny, působícími z vnějšího prostředí, jsou některé druhy záření. V důsledku UV záření může v DNA docházet k dimerizaci pyrimidinových bází. Takto vzniklá poškození výrazně narušují její strukturu. Po ozáření UV mohou v buňce vznikat také volné radikály, které způsobují oxidativní poškození bází či jednořetězcová přerušení DNA (SSBs). K přerušení řetězce DNA dochází také po vystavení ionizujícímu záření. Mezi exogenní mutageny dále patří řada chemických látek.

Poškození DNA vzniká i vlivem endogenních faktorů. Důsledkem metabolických procesů dochází k nechtěným úpravám bází např. alkylací, hydroxylací či oxidativní deaminací. Také samovolná hydrolýza glykosidické vazby mezi bází a cukrfofátovou kostrou DNA je častým jevem, jehož výsledkem je vznik apurinových/apyrimidinových (AP) míst. (Voet a Voet 1995). Řada poškození navíc vzniká i během replikace. Pokud se v replikující se DNA již objevuje jednořetězcové přerušení, dochází k zastavení replikačního komplexu nebo tvorbě dvouřetězcových přerušení (double-strand breaks - DSBs) (Hoeijmakers 2001).

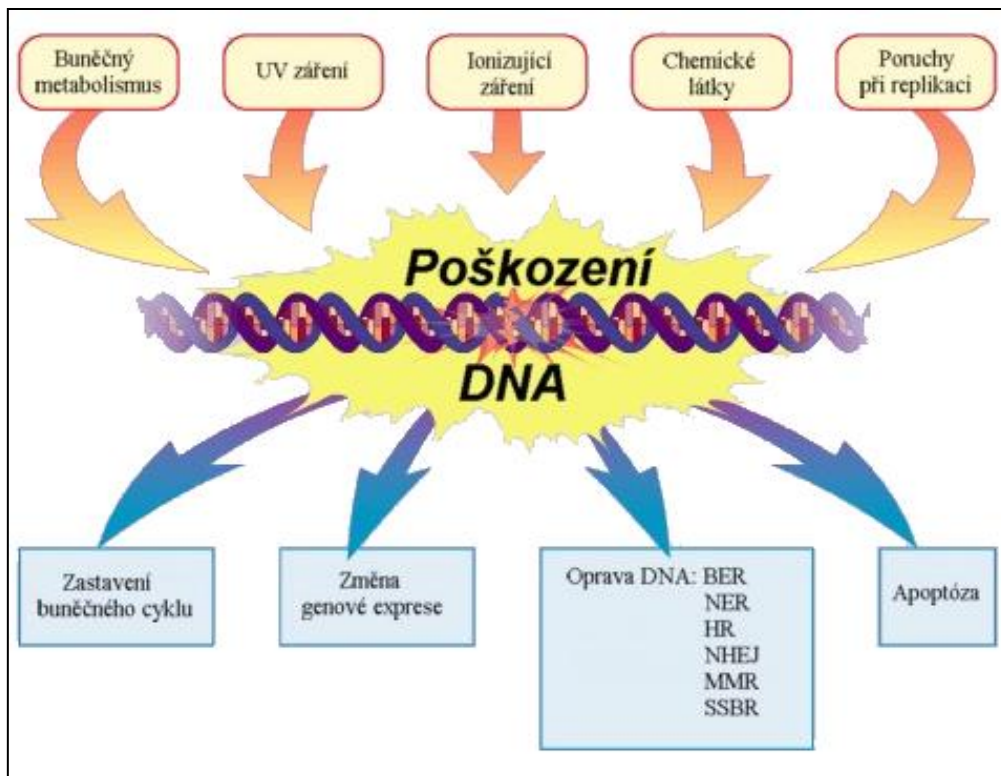
2.2. Princip odpovědi na poškození DNA

Aby byla zachována stabilita genomu a nedocházelo k jeho nevratným změnám, buňky vyvinuly účinné mechanismy, které dokážou abnormality v DNA odhalit a reagovat na ně. Odpověď na poškození DNA (DDR) zahrnuje mnoho proteinů a jejím výsledkem je okamžitá oprava nukleové kyseliny, zastavení buněčného cyklu nebo apoptóza (shrnuto v Sancar *et al.* 2004) (obr. 1). Hlavní složkou uplatňující se v regulaci DDR a signalizaci jsou proteiny z rodiny fosfatidylinositol 3 kinázám podobné protein kinázy (PIKKs) (shrnuto v Bakkenist a Kastan 2004). Mezi ně patří ATM kináza (ataxia-telangiectasia mutated), ATR kináza (ataxia-telangiectasia and Rad3-related) a DNA dependentní protein kináza. Společně s dalšími proteiny tyto kinázy fungují jako senzory poškození, které mobilizují efektorové složky DDR, jež mají za následek opravu DNA (tab. 1).

Další význam senzorů poškození spočívá v zahájení signalizační kaskády, která vyvolává rozsáhlé změny v kontextu celé buňky. Hlavními substráty ATM a ATR způsobujícími zastavení buněčného cyklu jsou CHK2 (checkpoint kinase 2) popř. CHK1 (checkpoint kinase 1). Dalším významným substrátem je antionkogen p53, který může směřovat buňku do apoptózy.

Některé z těchto proteinů (především substráty ATM kinázy) se vyskytují v jaderných tělískách, jejichž hlavní strukturní prvek je PML (promyelocytic leukaemia) protein. Tyto takzvané jaderné domény 10 (Ascoli a Maul 1991) neboli promyelocytická leukemická jaderná tělíska (PML NBs) se významně podílejí na zprostředkování odpovědi na poškození DNA (shrnuto v Delleire a Bazett-Jones 2004).

Přesné vybalancování DNA opravných drah je pro buňku zásadní. Jejich narušení, ať už v důsledku mutací či stresu, vede k nestabilitě genomu, patogenní senescenci či malignímu zvrhnutí (shrnuto v Seviour a Lin 2010).



Obrázek 1: Schéma hlavních příčin a důsledků odpovědi na poškození DNA. BER (base excision repair) – oprava vyštěpením báze, NER (nucleotide excision repair) – oprava vyštěpením nukleotidu, HR (homologous recombination) – homologní rekombinace, NHEJ (nonhomologous end joining) – nehomologní spojení konců, MMR (mismatch repair) – oprava špatně zařazených nukleotidů, SSBR (single-strand break repair) – oprava jednořetězcových přerušení. Převzato z R&D Systems 2003 Catalog a upraveno.

2.3. Opravné mechanismy

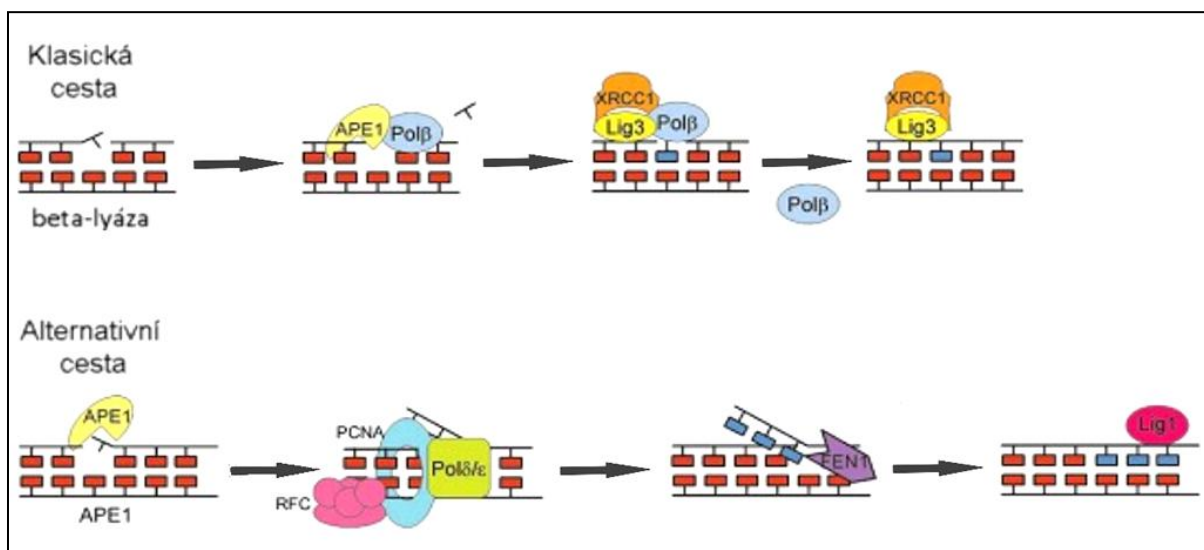
Po rozpoznání abnormality na DNA jsou okamžitě podniknuty kroky umožňující nápravu. Menší poškození bází způsobené např. alkylačními či oxidačními činidly jsou opravovány jejich vyštěpením. Tento mechanismus se označuje jako oprava vyštěpením báze (BER) (shrnutí v Sancar *et al.* 2004). Z části obdobně probíhá i oprava jednořetězcových přerušení (SSBR) (shrnutí v Caldecott 2008). Pokud je poškození bází rozsáhlejšího charakteru a dojde k výrazným změnám struktury DNA, uplatňuje se oprava vyštěpením nukleotidu (NER) (shrnutí v Sancar *et al.* 2004).

Vznik dvouvláknových přerušení významně ovlivňuje stabilitu genomu a může vést k chromozomálním přestavbám či ztrátě genetické informace. V buňkách se při jejich opravě uplatňují dva různé mechanismy: nehomologní spojení konců (NHEJ) a homologní rekombinace (HR) (shrnutí v Czornak *et al.* 2008).

I přes opravnou aktivitu DNA polymerázy δ/ϵ dochází při replikaci k nepřesnostem. Tak vznikají v DNA krátké inserce/delece či místa se špatně párujícími bázemi. Takovéto chyby jsou opravovány mechanismem opravy špatně zařazených nukleotidů (MMR) (shrnutí v Kunkel a Erie 2005).

2.3.1. Oprava vyštěpením báze (BER)

Savčí buňky mají sadu DNA glykosyláz, které specificky rozeznávají poškozené báze. Většina z nich má také β -lyázovou aktivitu umožňující hydrolytické uvolnění báze za vzniku apurinového/apyrimidinového (AP) místa. K vyštěpení AP fragmentu dochází za pomoci AP endonukleázy 1 (APE1). Oprava je dokončena pomocí DNA polymerázy β (Pol β) a ligázy 3 (Lig3), která se v místě poškození nachází v komplexu s proteinem XRCC1 (X-ray repair cross-complementing protein 1) (viz. obr. 2, klasická cesta). V případě samovolné ztráty báze se uplatňuje alternativní cesta (viz. obr. 2, alternativní cesta), kde APE1 štěpí AP místo v 5' pozici. DNA polymeráza δ/ϵ (Pol δ/ϵ) společně s proteinem PCNA (proliferating cell nuclear antigen) a replikačním faktorem C (RFC) dále syntetizuje několik nukleotidů směrem 3' od místa přerušení, přičemž vytěsněný řetězec je odstřižen endonukleázou FEN1 (flap endonuclease 1). Přerušení je spojeno DNA ligázou 1 (Lig1). (Sancar *et al.* 2004)



Obrázek 2: Schéma opravy vyštěpením báze. Obrázek znázorňuje mechanismus klasické a alternativní cesty, které následují po uvolnění poškozené báze pomocí DNA glykosylázy. Obdobným způsobem jsou opravovány jednořetězcová přerušení DNA. Mechanismus je popsán v textu. Převzato a upraveno (Sancar *et al.* 2004).

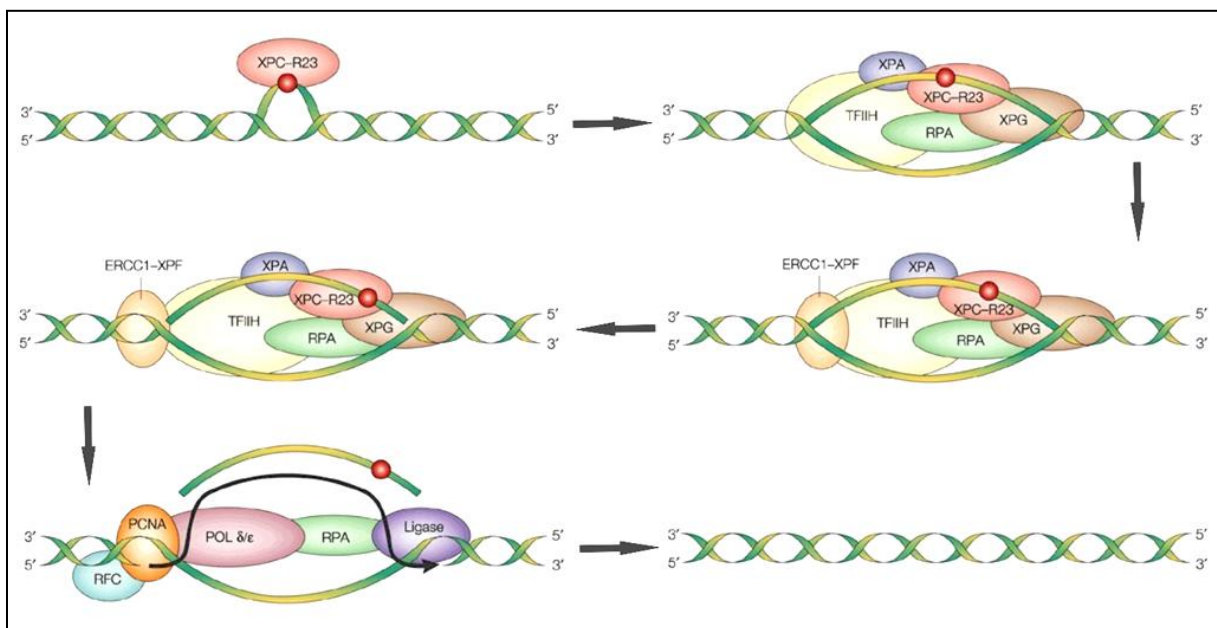
2.3.2. Oprava jednořetězcových přerušení (SSBR)

Jednořetězcová přerušení DNA mohou v buňce způsobit kolaps replikace či znemožnit transkripci poškozeného úseku. Mechanismus jejich opravy se částečně překrývá s BER.

Hlavním senzorem SSBs je poly (ADP-ribóza) polymeráza 1 (PARP1). Důležitou roli hraje nejen v rozpoznání poškození, ale i v regulaci opravných mechanismů např. pomocí modifikace histonů. Volné konce DNA vlákna musí být ve většině případů nejprve upravena. To zajišťují různé enzymy podle typu poškození. Nejčastěji se v tomto kroku uplatňuje enzym polynukleotid kináza/fosfatáza (PNKP) či APE1. V dalších krocích je poškozená DNA opravena pomocí mechanismu vyštěpením báze, a to klasickou či alternativní cestou (viz. kapitola 2.3.1.). (Caldecott 2008)

2.3.3. Oprava vyštěpením nukleotidu (NER)

Tato dráha (viz. obr. 3) se uplatňuje především u poškození bází, které výrazně mění tvar DNA dvoušroubovice. Zahrnuje vystřížení 24-32nt úseku. Poškození je rozpoznáno kooperativní vazbou faktorů RPA (replikační protein A), XPA (xeroderma pigmentosum group A-complementing protein) a XPC-TFIIH (xeroderma pigmentosum group C-complementing protein – transkripční faktor II H) a má nespecifický charakter. Helikáza TFIIH je zodpovědná za rozvolnění DNA v poškozeném místě, což vede k vazbě XPG (xeroderma pigmentosum group G-complementing protein). Takto stabilizovaná struktura je schopna navázat komplex proteinů XPF (xeroderma pigmentosum group F-complementing protein) a ERCC1(excision repair cross complementing group 1), který iniciuje vyštěpení oligonukleotidu obsahujícího poškození. Chybějící část je poté dosyntetizována pomocí Pol δ/ϵ , PCNA a RFC. (Sancar *et al.* 2004)

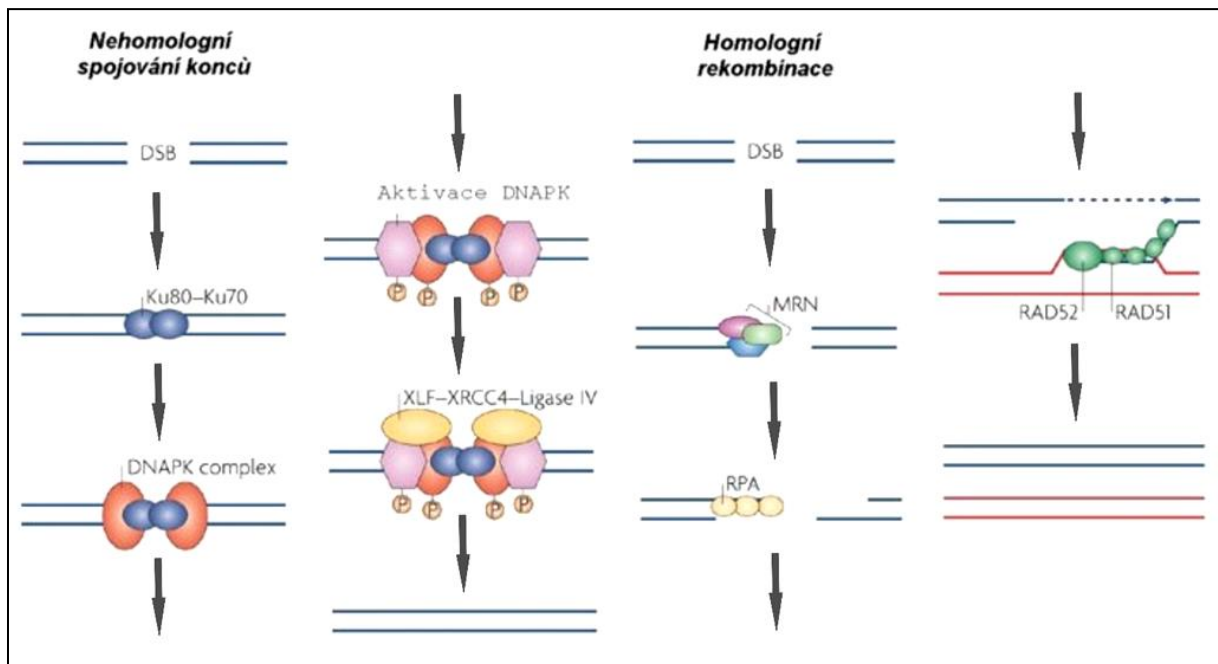


Obrázek 3: Schéma opravy vyštěpením nukleotidu. Mechanismus je popsán v textu. Převzato a upraveno (Friedberg 2001).

2.3.4. Homologní rekombinace (HR)

Prvotním senzorem dvouřetězcových přerušení DNA je MRN komplex tvořený proteiny Mre11, Rad50 a Nbs1. Rozpoznání poškození je umožněno skrze vazbu Mre11 na konce DNA, vzniklé v důsledku přerušení (Usui *et al.* 1998). MRN je dále zodpovědný za aktivaci ATM (ataxia-telangiectasia mutated) kinázy, která se následně akumuluje v místě DSBs (Lee a Paull 2005). ATM fosforyluje řadu cílových proteinů jako např. histonovou variantu H2AX či složky MRN. Fosforylovaný H2AX (γ H2AX) se nachází na DNA v blízkosti DSBs a je zodpovědný za masivní adsorpci opravných faktorů (Czornak *et al.* 2008).

Oprava DSBs probíhá homologní rekombinací (viz obr. 4, homologní rekombinace) pouze v G₂ a S fázi buněčného cyklu. Je podmíněna vznikem ssDNA přesahů, které jsou okamžitě stabilizovány pomocí RPA. Tato struktura je zodpovědná za aktivaci ATR kinázy a její akumulaci v místě poškození skrze ATR interagující protein (ATRIP). Odbourání části vlákna, vedoucí ke vzniku jednořetězcového úseku DNA (ssDNA), umožňuje vazba fosforylovaného CtIP (C-terminal-binding-protein-interacting protein) na komplex MRN-DNA (Czornak *et al.* 2008). K fosforylaci CtIP dochází pouze v G₂ a S fázi pomocí cyklin dependentní kinázy (Jackson, 2009). Následnou rekombinaci s homologním úsekem druhé molekuly DNA umožňují faktory RAD51, Rad52, Rad54 a BRCA1. Působením DNA polymerázy a dalších enzymů dochází k opravě DSBs podle homologní předlohy. (Czornak *et al.* 2008)



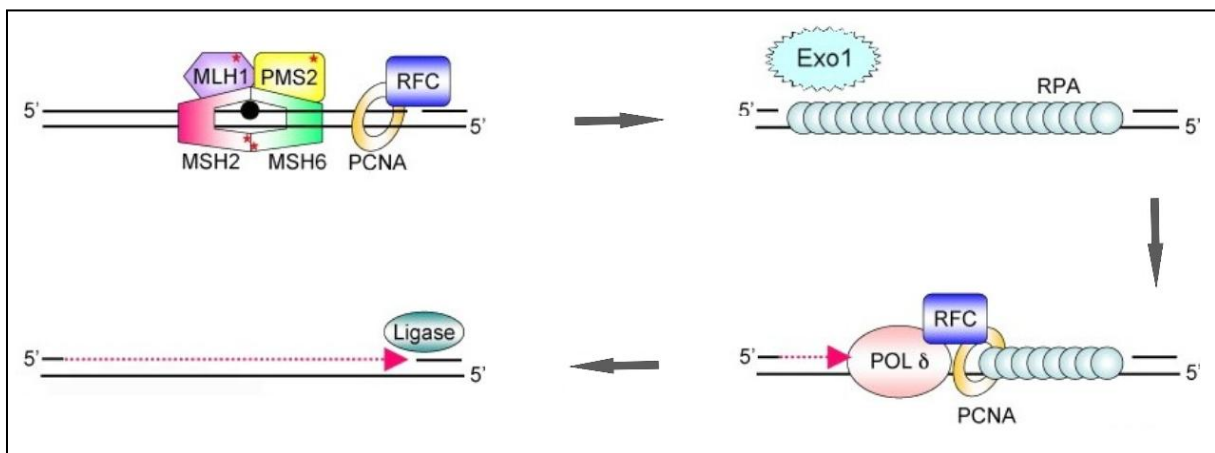
Obrázek 4: Schéma opravy dvouřetězcových přerušení DNA. Mechanismus homologní rekombinace a nehomologního spojení konců je vysvětlen v textu. Převzato a upraveno (Misteli a Soutoglou 2009).

2.3.5. Nehomologní spojování konců (NHEJ)

Tímto mechanismem (viz. obr. 4, nehomologní spojování konců) jsou opravována dvouřetězcová přerušení DNA v G1 fázi buněčného cyklu. Po aktivaci MRN komplexu a ATM kinázy nedochází ke vzniku ssDNA přesahů jako v případě homologní rekombinace. S konci DNA asociuje heterodimer Ku70/80, který umožňuje navázání DNA dependentní protein kinázy (DNA-PK). V následujícím kroku jsou k sobě, díky dimerizaci DNA-PK, konce DNA přiblíženy. Jejich ligaci umožňuje komplex ligázy 4 (Lig4) s proteinem XRCC4 (X-ray repair cross-complementing protein 4). (Czornak *et al.* 2008)

2.3.6. Oprava špatně zařazených nukleotidů (MMR)

Tento mechanismus (viz. obr. 5) se uplatňuje především při opravách chyb vzniklých v důsledku replikace. Předpokládá se, že je s replikací fyzicky propojen skrze vazbu jeho faktorů s PCNA, proteinem replikačního aparátu. Hlavní roli v rozeznání poškození DNA hrají homology bakteriálního proteinu MutS: MSH2, MSH3 a MSH6 (MutS homologe 2/3/6). Ty tvoří heterodimerní komplexy označované jako MutS α (MSH2-MSH6), popř. MutS β (MSH2-MSH3). Tyto komplexy specificky vážou poškozenou DNA v závislosti na přítomnosti ATP. Dalšími faktory, které napomáhají při opravě DNA, jsou některé homology bakteriálního proteinu MutL. V místech poškození se vyskytují jako heterodimery MutL α , MutL β a MutL γ . Po rozeznání poškozené DNA dochází k vyštěpení oligonukleotidu v místě chyby a vzniku ssDNA úseku. Na tomto kroku se také podílí některé nukleázy jako Exonukleáza 1 (Exo1). Chybějící část řetězce je dosyntetizována Pol δ . Je možné, že na odbourání poškozeného úseku a opětovné syntéze vlákna se podílí přímo replikační aparát, který s MMR faktory interaguje skrze PCNA. (Kunkel a Erie 2005)



Obrázek 5: Schéma opravy špatně zařazeného nukleotidu. Mechanismus je popsán v textu. Převzato a upraveno (Hsieh a Yamane 2008)

Tabulka 1: Přehled faktorů účastnících se opravy DNA

TYP POŠKOZENÍ	OPRAVNÝ MECHANISMUS	SENZORY A SIGNALIZAČNÍ MOLEKULY	EFEKTOROVÉ MOLEKULY	LITERATURA
špatně zařazená báze	MMR	MutS α , MutS β	MutL α , MutL β , MutL γ , FEN1, PCNA, RPA, Pol δ , DNA ligáza	(Kunkel and Erie 2005)
menší poškození bází	BER	DNA glykosyláza	APE1, Pol β , Pol δ/ϵ , PCNA, RFC, Lig1, Lig3, FEN1, XRCC1	(Sancar et al. 2004)
pyrimidinové dimery a jiná rozsáhlejší poškození DNA	NER	RPA, XPA, XPC	TFIIH, XPG, XPF, ERCC1, Pol δ/ϵ , PCNA, RFC	(Sancar et al. 2004)
jednořetězcové přerušení DNA	SSBR	PARP1	PNKP, APE1, Pol β , Pol δ/ϵ , PCNA, RFC, FEN1, Lig1, Lig3, XRCC1	(Caldecott 2008)
dvouřetězcové přerušení DNA	NHEJ	MRN komplex, ATM, γ H2AX	Ku70, Ku80, DNA-PK, Lig4, XRCC4	(Bakkenist and Kastan 2004) (Czornak et al. 2008)
	HR	MRN komplex, ATM, ATR, γ H2AX, ATRIP	CtIP, RPA, Rad51, Rad52, Rad54, BRCA1	(Bakkenist and Kastan 2004) (Czornak et al. 2008) (Jackson 2009)

3. Viry a buněčná odpověď na poškození DNA

3.1. Aktivace DDR při virové infekci

Odpověď na poškození DNA (DDR) je regulována především kinázami z rodiny PIKKs. Tyto kinázy jsou aktivovány bezprostředně po odhalení poškození, nebo se na něm přímo podílejí jako senzory. Zdá se však, že aktivace dalších složek DDR není závislá na přítomnosti poškození, ale spíše na vazbě senzorů k DNA (Soutoglou a Misteli 2008). DNA opravné mechanismy tedy mohou být mobilizovány i jiným způsobem než přítomností poškozené DNA.

Složky DDR bývají často aktivovány jako odpověď na virovou infekci (shrnuto v Lilley *et al.* 2007). Příčiny mohou být v principu dvojího typu: i) reakce na virovou DNA, ii) reakce na virové proteiny, které jsou schopné DDR přímo či nepřímo indukovat.

Virová DNA je pro buňku cizorodá struktura a její topologie či složení může evokovat poškození. Mnohé viry (např. *Adenoviridae*, *Herpesviridae*, *Retroviridae*) mají lineární genom, jehož konce připomínají dvouřetězcové přerušení DNA. U mutantního adenoviru, který je neschopný potlačit DNA opravné mechanismy buňky, má tato skutečnost za následek spojování konců jeho genomu mezi sebou (Stracker *et al.* 2002). Retrovirová cDNA, vzniklá

za pomoci virem zprostředkované reverzní transkripce, zase podléhá cirkularizaci, na které se podílejí složky mechanismu nehomologního spojení konců (Li *et al.* 2001). Buňka tedy aktivně reaguje na přítomnost nukleové kyseliny některých virů a rozeznává ji jako poškozenou. Za masivní aktivaci DDR je však zodpovědná především replikace virového genomu (Daikoku *et al.* 2006; Jul-Larsen *et al.* 2004; Wilkinson a Weller 2004).

Některé viry si vyvinuly účinné mechanismy, jak pomocí svých proteinů DDR aktivovat a usměrňovat. U některých virových proteinů se ukazuje, že jsou schopny indukovat dvouřetězcové přerušení DNA (Boichuk *et al.* 2010; Nakai-Murakami *et al.* 2007). To může být jedna z příčin mobilizace složek účastnících se oprav DSBs. V mnoha případech se však ukazuje, že virové faktory přímo interagují s klíčovými složkami DDR, které se nacházejí na vrcholu signalizačních kaskád jako ATM kináza či MRN komplex (Moody a Laimins 2009; Tarakanova *et al.* 2007; Taylor a Knipe, 2004). V důsledku těchto interakcí dochází k cílené mobilizaci složek DDR při virové infekci.

3.2. Vztah virů k DDR

DNA opravné mechanismy vyvolané v průběhu infekce mohou způsobovat nechtěné změny ve virovém genomu. Aby k tomu nedocházelo, viry pomocí svých proteinů faktory DDR vyvazují a cílí do proteozomální degradační dráhy (Parkinson *et al.* 1999; Stracker *et al.* 2002; Wilkinson a Weller 2006). Odpověď na poškození DNA je také zodpovědná za navození apoptózy či pozastavení buněčného cyklus v G₁ fázi, kdy se neexprimují faktory potřebné pro buněčnou i virovou replikaci. Na těchto procesech se výrazně podílí antionkogen p53, který je součástí ATM/ATR kinázové dráhy (shrnutí v Sancar *et al.* 2004). Řada virů kóduje proteiny, které s p53 interagují a usměrňují jeho funkci (Dey *et al.* 2002; Kudoh *et al.* 2005; Scheffner *et al.* 1990).

Na druhou stranu se však ukazuje, že některé virové rodiny využívají určité složky DDR ve svůj prospěch. Odpověď na poškozenou DNA může vést k pozastavení buněčného cyklu v S či G₂ fázi. Toho se účastní řada faktorů včetně kináz CHK2 a CHK1, které jsou aktivovány pomocí klíčových proteinů zajišťující mobilizaci DNA opravných mechanismů (shrnutí v Sancar *et al.* 2004). Tato zástava buněčného cyklu zabrání zahájení mitózy a poskytuje vhodné podmínky pro lytickou replikaci, což je některými viry využíváno (Bartz *et al.* 1996; Li *et al.* 2008; Okubo *et al.* 2003). Dále se ukazuje, že faktory DNA opravných mechanismů se podílejí přímo na virové replikaci či integraci do genomu hostitele a jejich inaktivace má pro infekci negativní vliv (shrnutí v Lilley *et al.* 2007).

4. DNA opravné mechanismy jako nástroj virové replikace

4.1. Retroviridae

Čeď *Retroviridae* zahrnuje obalené RNA viry obratlovců, které využívají reverzní transkripci pro přepis svého genomu do DNA. Často mají vysokou hostitelskou specifitu a napadají především lymfatické buňky. Patří sem i virus lidské imunodeficiency (HIV), který způsobuje syndrom získané imunodeficiency (AIDS). Jejich genom je po vstupu do buňky přepsán do dvouřetězcové DNA a přenesen do jádra, kde dochází k integraci do hostitelského genomu. Takto může virus dlouhou dobu přetrvávat v latentní fázi. Virový genom kóduje kromě kapsidových a obalových proteinů také reverzní transkriptázu potřebnou pro jeho přepis do cDNA a integrázu, která zajišťuje následné včlenění virové cDNA do genomu hostitele. Oba tyto enzymy jsou obsaženy v kapsidě virionu. Většina retrovirů kóduje také řadu dalších proteinů podílejících se na infekci. Jedním z nich je virový protein R (Vpr) viru HIV, který se účastní transportu cDNA z cytoplazmy do jádra a je ve velké míře přítomen v kapsidách virionu. (o čeledi retroviridae v Knipe *et al.* 2007)

Nezbytným krokem při infekci je integrace virové cDNA do genomu hostitele. Ta probíhá v několika krocích za účasti enzymu integrázy. Výsledkem je struktura obsahující několikanukleotidové ssDNA mezery, které lemují integrovaný úsek, a nepárující 2 nukleotidy dlouhé 5' konce virového genomu. V poslední fázi tedy dochází k tzv. postintegrační opravě, která je závislá na buněčných faktorech a dává vzniknout neporušené DNA obsahující přepsaný retrovirový genom. (shrnutí v Skalka a Katz 2005)

4.1.1. ATM/ATR signalizace

Během infekce HIV-1 dochází k významné aktivaci ATM/ATR kinázy a fosforylaci jejich substrátů jako Nbs1, p53 či histonu H2AX (Lau *et al.* 2005; Nakai-Murakami *et al.* 2007). Jak shrnují Skalka a Katz (2005), v replikačním cyklu retrovirů nalezneme několik událostí, které mohou tuto aktivaci DNA opravných mechanismů vyvolat. Jednou z nich je přítomnost volných konců virové cDNA v jádře, které mohou být rozeznány jako dvouřetězcová přerušení. DNA opravné mechanismy jsou nejspíše mobilizovány také v důsledku integrace viru.

Práce Nakai-Murakami *et al.* (2007) ukazuje, že i pouhá přítomnost Vpr viru HIV-1 je schopna indukovat odpověď na poškození DNA nezávisle na virové infekci. Při jeho expresi regulované tetracyklinovým promotorem v buňkách dochází k aktivaci ATM i ATR kinázy,

což ústí ve fosforylaci a akumulaci jejich substrátů do agregátů v jádře. U buněk exprimujících Vpr byla také odhalena jeho schopnost produkovat dvouřetězcová přerušeni DNA (Tachiwana *et al.* 2006). Aktivace ATM/ATR kinázové dráhy může být tedy způsobena právě tímto jevem.

Studie používající inhibitory kináz z rodiny PIKKs, RNA interferenci či ATM deficientní buněčné linie naznačují, že ATM a ATR jsou pro retrovirovou infekci potřebné a omezení jejich aktivity výrazně snižuje schopnost integrace virové DNA (Daniel *et al.* 2003; Daniel *et al.* 2005; Lau *et al.* 2005; Nunnari *et al.* 2005). Při jejich nepřítomnosti či inaktivaci během infekce dochází také k apoptóze buněk, která je nejspíše vyvolána chybnou integrací viru (Daniel *et al.* 2003; Lau *et al.* 2005). Toto téma je však do dnes velmi kontroverzní a některé studie jsou s tímto tvrzením v rozporu (DeHart *et al.* 2005). Nedávná práce Yanga *et al.* (2010) ukazuje, že aktivita ATM a ATR kinázy je pro infekci retrovirů nezbytná pouze u některých typů buněk.

4.1.2. Homologní rekombinace

Je známo, že protein Vpr viru HIV-1 je schopen mobilizovat složky DNA opravných mechanismů, které se uplatňují při homologní rekombinaci (RPA, Rad51) a tím podpořit rekombinační děje v buňce (Nakai-Murakami *et al.* 2007). Význam těchto faktorů pro retrovirový životní cyklus však prokázán nebyl. Nepřítomnost proteinu Rad52, který se homologní rekombinace účastní, se naopak jeví pro virovou integraci výhodná (Lau *et al.* 2004). Dá se tedy předpokládat, že aktivace homologně rekombinačních dějů je pouze průvodním jevem infekce a přímo se neúčastní integrace či reverzní transkripce viru.

4.1.3. Nehomologní spojování konců

Jedním z klíčových proteinů, které se účastní nehomologního spojování konců, je DNA-PK. U myších buněk obsahujících delecii v této kináze byla po retrovirové infekci pozorována zvýšená frekvence apoptózy (Daniel *et al.* 1999). Skutečnost, že k tomuto jevu dochází pouze u virů schopných integrace, dává tušit význam DNA-PK v postintegrační opravě. Pokud tato kináza chybí, poškození DNA vzniklé v důsledku integrace pravděpodobně iniciuje apoptózu. Integrací indukovaná apoptóza byla pozorována i u buněk se sníženou expresí ATM kinázy (Lau *et al.* 2005). DNA-PK i ATM se uplatňují při opravách dvouvláknových poškození nehomologním spojováním konců, což naznačuje účast tohoto mechanismu v integraci viru či postintegrační opravě DNA.

V souladu s tím je i práce Hasegawy *et al.* (2005), která potvrzuje význam DNA-PK pro integraci Friendova leukemického viru na myším modelu. Na druhou stranu však také poukazuje na fakt, že tato kináza není pro integraci absolutně nezbytná.

4.1.4. Oprava vyštěpením báze

Struktura, která vzniká bezprostředně po integraci retroviru do genomu hostitele, obsahuje krátké ssDNA úseky a dvounukleotidové nepárující 5' konce virové DNA. Takovéto uspořádání je velmi podobné meziprojektu oprav mechanismem vyštěpení báze. Proteiny účastníci se této dráhy by se tedy mohly při virové integraci uplatňovat. Je známo několik prací, které *in vitro* potvrzují, že proteiny účastníci se BER, jsou schopny postintegrační opravy u umělých substrátů (Faust a Triller 2002; Yoder a Bushman, 2000). Jestli je tomu tak i při retrovirové infekci, však zatím není známo.

4.1.5. Další souvislosti

Proteiny účastníci se odpovědi na poškození DNA nemusí být retroviry využívány pouze v souvislosti s integrací. Rozsáhlá analýza hostitelských faktorů ovlivňujících časné fáze replikace HIV-1, ve které bylo využito RNA interference (Konig *et al.* 2008), poukazuje na to, že některé složky DNA opravných mechanismů se podílejí i na reverzní transkripci.

Další význam buněčných faktorů pro retroviry, především pak ATR kinázové dráhy, tkví v deregulaci buněčného cyklu. Při infekci HIV-1 totiž dochází k zástavě buněčného cyklu v G₂ fázi, a to v závislosti na přítomnosti Vpr proteinu (Bartz *et al.* 1996).

4.2. Papillomaviridae

Lidské papillomaviry (HPV) jsou malé DNA viry zodpovědné za vznik naprosté většiny anogenitálních nádorů (Walboomers *et al.* 1999). V bazálních epitelálních buňkách se jejich genom replikuje episomálním způsobem. Spolu s diferenciací infikovaných buněk se spouští i exprese kapsidových proteinů a replikace, nezávislá na buněčném dělení. (shrnutí v McBride 2008) Mezi časně exprimované proteiny patří E1 a E2, které zajišťují iniciaci virové replikace (Berg a Stenlund 1997). E2 je dále zodpovědný za správné rozdělení kopií virového genomu během mitózy (Parish *et al.* 2006) a regulaci transkripce virových onkoproteinů E6 a E7 (shrnutí v Thierry 2009). E6 a E7 modulují buněčný cyklus v prospěch viru vyvazováním antionkogenu p53 (Scheffner *et al.* 1990) resp. retinoblastomového proteinu (pRb) (Dyson *et al.* 1989) a mohou způsobovat nádorovou transformaci buněk. (o čeledi papillomaviridae v Knipe *et al.* 2007)

4.2.1. ATM/ATR signalizace

Při infekci vysoce rizikovými typy HPV dochází k aktivaci klíčových složek DNA reparačních mechanismů, především ATM, ATR kinázy a jejich substrátů (Moody a Laimins 2009; Spardy *et al.* 2008). Tato aktivace vede k formování PML tělísek obsahujících ATM, fosforylovaný histon H2AX, kinázu CHK2 a další proteiny účastníci se oprav dvouřetězcových přerušeni DNA. U diferencovaných keratinocytů infikovaných HPV-31 tyto proteiny kolokalizují s virovým genomem (Moody a Laimins 2009) a dá se předpokládat, že napomáhají jeho replikaci. V souladu s tím je i fakt, že po opůsobení buněk inhibitorem ATM kinázy je virová replikace výrazně utlumena (Moody a Laimins 2009). Zda je tomu opravdu tak a jakým způsobem se složky ATM dráhy podílejí na replikaci viru, je stále nejasné. Je však zřejmé, že k aktivaci ATM/ATR kinázové signalizace dochází především prostřednictvím časně exprimovaných virových proteinů, což dokazují nedávné práce, ve kterých byla pozorována mobilizace složek DDR v buňkách exprimujících papillomavirové proteiny E6 a E7 (Moody a Laimins 2009; Spardy *et al.* 2008). Nejedná se tedy pouze o reakci buňky na virovou DNA.

4.2.2. Další souvislosti

PML tělíška a s nimi asociované faktory účastníci se oprav dvouřetězcových přerušeni DNA jsou také spojována s alternativním prodlužováním telomer. Tento mechanismus nevyužívá enzymu telomerázy a zajišťuje neztrátovou replikaci telomer v některých typech buněk (Zhong *et al.* 2007). Aktivace DNA opravných mechanismů a tvorba virem indukovaných PML tělísek může tedy hrát roli i v prolomení antiproliferační bariéry buňky pomocí alternativního prodlužování telomer (Spardy *et al.* 2008).

Další složkou DNA opravných mechanismů, která má spojitost s papillomavirovou infekcí, je Topoizomeráza II β vazebný protein 1 (TopBP1). Ten je schopen vázat DNA (Yamane a Tsuruo 1999) a uplatňuje se mimo jiné v aktivaci ATR signalizační dráhy během poškození DNA (Kumagai *et al.* 2006). Při infekci HPV-16 je vázán virovým proteinem E2, s kterým působí jako transkripční koaktivátor (Boner *et al.* 2002). Přítomnost TopBP1 také ovlivňuje vazbu E2 na chromatin (Donaldson *et al.* 2007), což může mít význam při zachování počtu kopií virového genomu při mitóze v latentní fázi.

4.4. Polyomaviridae

Polyomaviridae je čeleď malých DNA virů obratlovců. Mezi lidské polyomaviry patří BK a JC virus, jejichž název je složen z iniciál pacientů, z kterých byly poprvé izolovány. Virový genom je tvořen kruhovou dvouvláknovou molekulou DNA, která mimo jiné kóduje několik časně exprimovaných proteinů účastnících se replikace a regulace transkripce. Jedním z nejvíce prostudovaných zástupců této čeledě je opičí virus SV40 (Simian virus 40). Ten kóduje 2 hlavní časně exprimované proteiny: velký T antigen (LT) a malý T antigen (ST). LT obsahuje DNA vazebnou doménu a je klíčovým faktorem pro iniciaci virové replikace. Dále je schopen vázat řadu buněčných faktorů jako antionkogen p53 či retinoblastomový protein pRb a upravovat tím prostředí buňky ve svůj prospěch. Mezi další proteiny, u nichž byla prokázána interakce s LT, patří složka ubiquitin ligázového komplexu cullin-7 (Cul7) (Ali *et al.* 2004) a kináza Bub1 (Cotsiki *et al.* 2004), která se účastní signalizace v kontrolním bodě tvorby dělicího vřeténka. Jejich role v polyomavirové infekci však není zcela jasná. (o čeledi polyomaviridae v Knipe *et al.* 2007)

4.4.1. ATM/ATR signalizace

Velký T antigen viru SV40 je zodpovědný za rozsáhlou aktivaci ATM/ATR kinázové dráhy, a to i v nepřítomnosti virového replikačního počátku (Boichuk *et al.* 2010; Hein *et al.* 2009). LT přímo váže protein Nbs1 (Wu *et al.* 2004), který je součástí MRN komplexu a podílí se na aktivaci ATM kinázy. Účast na mobilizaci složek DNA opravných mechanismů má i vazba mezi LT a kinázou Bub1. Ta vede, dosud nejasným způsobem, k fosforylaci histonu H2AX a antionkogenu p53 (Hein *et al.* 2009). Tyto skutečnosti naznačují, že LT aktivně interaguje s ATM/ATR dráhou nezávisle na virové replikaci. Složky DNA opravných mechanismů však mohou být mobilizovány i nepřímo. SV40 LT antigen exprimovaný v lidských fibroblastech je totiž zodpovědný za vznik dvouvláknových přerušení DNA (Boichuk *et al.* 2010), které jsou rozeznávány MRN komplexem, v důsledku čehož dochází k aktivaci ATM dráhy.

Zdá se, že ATM kináza hraje ve virové infekci významnou roli. V její nepřítomnosti je pozorováno razantní snížení virové replikace (Shi *et al.* 2005; Zhao *et al.* 2008), což koreluje s poklesem aktivovaných forem jejích substrátů. Aktivní forma ATM je také zodpovědná za fosforylaci SV40 LT na serinu v pozici 120 (Shi *et al.* 2005). Tato aminokyselina je konzervovaná v rámci celé čeledě a její modifikace hraje významnou roli v iniciaci replikace (Virshup *et al.* 1992).

Při infekci SV40 dochází také k aktivaci ATR kinázy. To se projevuje ve fosforylaci proteinů p53 a CHK1, které jsou jedny z jejích substrátů. Tato aktivace se zdá být závislá na

vazbě mezi LT a kinázou Bub1 (Hein *et al.* 2009). Překvapivě efektivita infekce SV40 není po umlčení exprese ATR pomocí siRNA ovlivněna (Boichuk *et al.* 2010).

4.4.2. Homologní rekombinace

Pro celou čeleď je charakteristická asociace PML tělísek s místem virové replikace (Jul-Larsen *et al.* 2004). V těchto tělískách se v průběhu infekce nachází množství proteinů účastnících se oprav dvouvláknových přerušeni DNA (Boichuk *et al.* 2010; Zhao *et al.* 2008). Vezmeme-li dále v potaz prokázaný výskyt ssDNA úseků v místech virové replikace, jejichž tvorba je závislá na přítomnosti PML proteinu (Jul-Larsen *et al.* 2004), dá se předpokládat, že zde dochází k homologně rekombinačním opravám. HR by mohla hrát důležitou roli v replikaci a následných opravách nově vzniklé virové DNA. V souladu s tím je i fakt, že protein Rad51, jeden z klíčových faktorů HR, je nezbytný pro efektivní replikaci SV40 (Boichuk *et al.* 2010). Na druhou stranu se však ukazuje, že během infekce SV40 dochází k LT závislé proteozomální degradaci složek MRN komplexu (Zhao *et al.* 2008), který se uplatňuje v počátečních fázích HR. Účast homologní rekombinace ve virové replikaci tedy není plně objasněna.

4.4.3. Další souvislosti

Čeleď *Polyomaviridae* interaguje s ATM/ATR kinázou a jejími substráty na mnoha úrovních, přičemž některé faktory jsou pro virovou replikaci nepostradatelné. Využití těchto složek DNA opravných mechanismů však nemusí zahrnovat pouze rekombinační děje. Signalizační dráhy, na jejichž počátku stojí ATM kináza, mohou ústit v zástavu buněčného cyklu v S fázi, která je výhodná pro virovou replikaci. Práce Dahla *et al.* (2005) ukazuje, že mutace v proteinu SMC1 (Structural maintenance of chromosomes protein 1), který je substrátem ATM dráhy a účastní se zástavy buněčného cyklu v S fázi, vede k razantnímu snížení infektivity myšího polyomaviru. Pro navození vhodného prostředí pro replikaci viru SV40 je také zásadní signalizace ATR skrze p53 izoformu $\Delta p53$ (Rohaly *et al.* 2005), která se podílí na regulaci kontrolního bodu v S fázi buněčného cyklu (Rohaly *et al.* 2010). Proteiny DNA opravných drah mohou hrát dále významnou roli při iniciaci replikace. Kromě výše zmíněné fosforylace LT pomocí ATM se ukazuje pro start replikace významný i Nbs1 protein. Wu *et al.* (2004) naznačují, že by vazba mezi LT a Nbs1 mohla napomáhat v prolomení buněčného mechanismu, který brání opětovnému startu replikace z jednoho počátku. Jak ukazuje jejich práce, intaktní Nbs1 je nezbytný pro zabránění reiniciace replikace a vzniku polyploidních buněk. Retrovirovým vektorem zprostředkovaná exprese LT tuto funkci Nbs1 potlačuje. Pro potvrzení těchto domněnek však bude potřeba dalšího zkoumání.

4.3. Herpesviridae

Čeď *Herpesviridae* se dělí na 3 podčeď (alphaherpesvirinae, betaherpesvirinae a gammaherpesvirinae) a zahrnuje řadu savčích patogenů. Mezi významné zástupce lidských alphaherpesvirů patří herpes simplex virus 1 a 2 (HSV-1/2), ty jsou častými původci oparů. Dalšími zástupci této čeďe podílejícími se na vzniku nádorů či infekční mononukleózy jsou virus Epstein-Barrové (gammaherpesvirinae) a lidský cytomegalovirus (betaherpesvirinae). *Herpesviridae* si v genomu kódují vlastní DNA polymerázu a ssDNA vazebný protein. Pro celou čeď je dále charakteristická schopnost latence, kdy se jejich genom, tvořený dvouvláknovou lineární DNA, replikuje společně s genomem buňky. Po navození produktivní infekce dochází k masivnímu nárůstu kopií virového genomu v buňce.

Při této lytické fázi se v místě virové replikace formují multiproteinové agregáty (Takagi *et al.* 1991), které zahrnují jak proteiny viru, tak i buněčné faktory. Jakým mechanismem replikace probíhá, není zcela jasné. Předpokládá se však, že v ní hrají významnou roli rekombinační procesy (Dutch *et al.* 1995). (o čeďi herpesviridae v Knipe *et al.* 2007)

4.3.1. ATM/ATR signalizace

Herpesviridae je další čeďí, u které se účast faktorů DNA opravných drah ukazuje zásadní pro životní cyklus viru. V latentní fázi, kdy virus replikuje svou DNA společně s buňkou, nebyla aktivace DNA opravných mechanismů prokázána. U některých gammaherpesvirů se však přítomnost složek DDR, jako histonové varianty H2AX (Tarakanova *et al.* 2010) či p53 vazebného proteinu (53BP) (Bailey *et al.* 2009), ukazuje potřebná pro ustavení latence nebo přechod do lytického cyklu.

Pro celou čeď je v lytickém cyklu charakteristická aktivace proteinů účastnících se oprav dvouvláknových přerušení DNA (Kudoh *et al.* 2009; Lilley *et al.* 2005; Shirata *et al.* 2005; Tarakanova *et al.* 2007). Při běžné reakci na poškození DNA je tato dráha spouštěna především působením ATM a ATR kinázy (shrnutí v Czornak *et al.* 2008). Během infekce však roli aktivátorů DDR částečně přebírají některé virové proteiny. Jedním z nich je kináza viru Epstein-Barrové (EBV) BGLF4 (Asai *et al.* 2006) a její homolog u myšího gammaherpesviru-68 (MHV-68). U nich bylo prokázáno, že jsou schopné indukovat fosforylaci histonu H2AX (Tarakanova *et al.* 2007), faktoru zprostředkovávajícího vazbu složek opravy DSBs v místě poškození.

Práce Kudoha *et al.* (2005) a Shiraty *et al.* (2005) ukazují, že inhibice ATM kinázy či umlčení její exprese nemá na infektivitu EBV ani HSV-1 dopad. Její aktivita tedy není pro

replikaci těchto virů nezbytná. Ani aktivita ATR kinázy se nezdá být zásadní, přestože při její nepřítomnosti dochází u HSV-1 k mírnému snížení infektivity (Mohani *et al.* 2010).

4.3.2. Homologní rekombinace

Na rozdíl od ATM se však jeví nepostradatelné efektorové proteiny účastníci se homologní rekombinace (Rad51, RPA a Mre11) (Kudoh *et al.* 2009; Lilley *et al.* 2005; Taylor a Knipe 2004). Ty jsou během infekce asociovány s replikačními centry viru (Kudoh *et al.* 2009; Lilley *et al.* 2005; Wilkinson a Weller 2004). Zajímavé je, že u HSV-1 tato mobilizace není zcela závislá na přítomnosti DNA (Wilkinson a Weller 2004). Virus tedy pomocí svých proteinů aktivně hromadí DNA opravné faktory účastníci se homologní rekombinace v místech replikace. Tomu nasvědčuje i schopnost některých virových proteinů jako HSV-1 ssDNA vazebného proteinu ICP8 (Gupte *et al.* 1991) vázat tyto faktory (Taylor a Knipe 2004). Již dříve bylo poukázáno na to, že během herpesvirové replikace dochází k rekombinačním událostem (Dutch *et al.* 1995; Severini *et al.* 1996). Fakt, že proteiny Rad51, RPA a MRN komplex, jež se účastní homologní rekombinace, jsou aktivně hromaděny v místě virové replikace, naznačuje jejich účast v těchto dějích. Zda je tomu opravdu tak a jaký je mechanismus této replikace spřažené s rekombinací je však předmětem dalšího zkoumání.

4.3.3. Nehomologní spojování konců

Naopak proteiny účastníci se nehomologního spojování konců (NHEJ), alternativního mechanismu opravy dvouvláknových přerušení DNA, nejsou při herpesvirové replikaci mobilizovány. Nepřítomnost proteinu Ku70, jehož účast je v NHEJ nepostradatelná, výrazně podporuje infekci HSV-1 (Taylor a Knipe 2004). Při infekci HSV-1 navíc dochází k degradaci DNA-PK, další komponenty NHEJ (Parkinson *et al.* 1999). Tyto skutečnosti naznačují, že DNA opravné mechanismy uplatňující se v nehomologním spojování konců jsou pro infekci nežádoucí a virus je cíleně potlačuje.

4.3.4. Další souvislosti

V místech lytické replikace EBV byly dále objeveny proteiny, které se účastní oprav špatně zařazených nukleotidů (Daikoku *et al.* 2006). V buňce tyto faktory napomáhají bezchybné replikaci buněčného genomu, ale hrají také určitou roli v rekombinačních procesech (Alani *et al.* 1997). Jejich souvislost s replikací herpesvirů je zatím nepříliš prozkoumána.

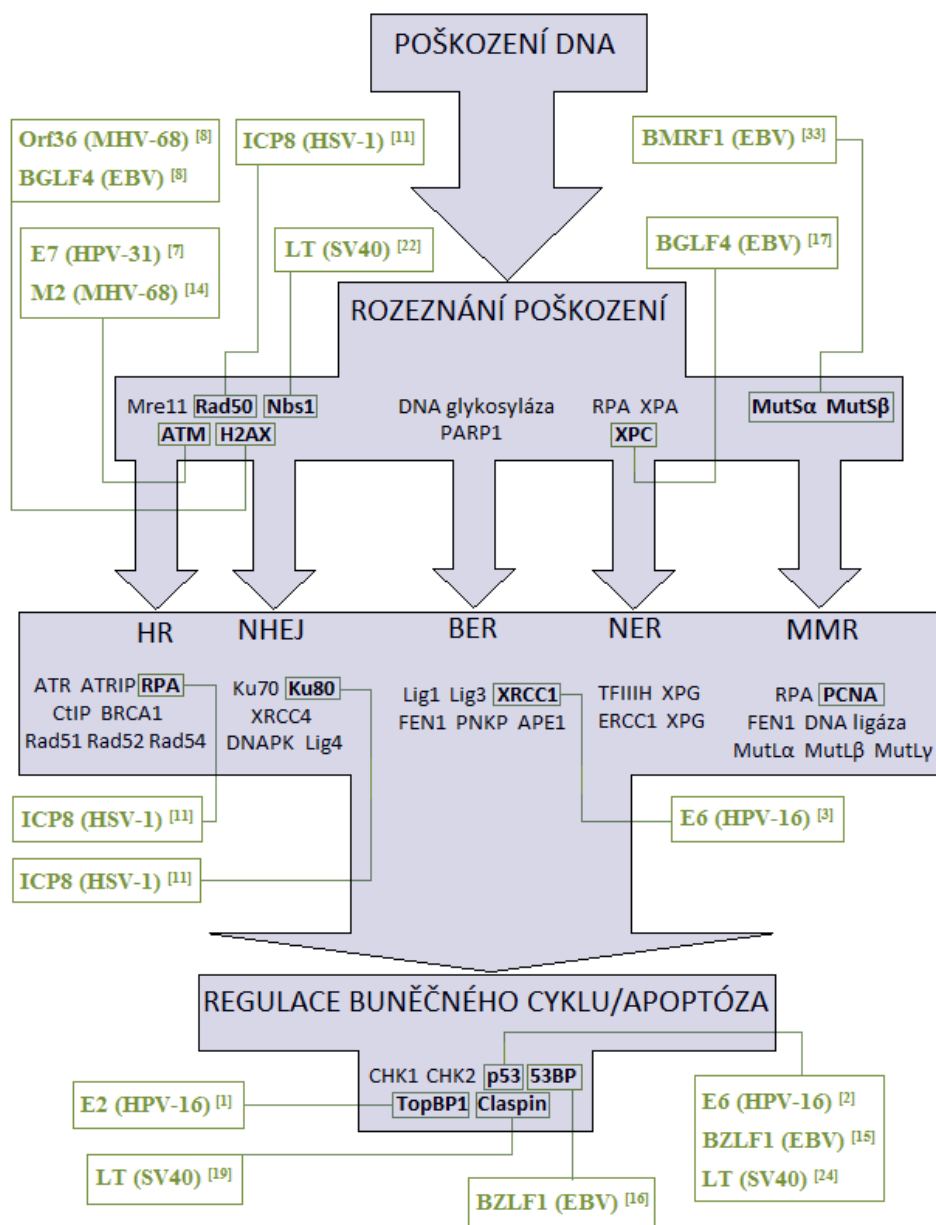
Ač se přítomnost ATM nezdá být pro některé herpesviry nezbytná, Li *et al.* (2008) ukazují, že se během infekce HSV-1 uplatňuje v G₂/M zástavě buněčného cyklu. Tato aktivita je

zprostředkovaná virovým proteinem ICP0 (HSV-1) a vyžaduje fosforylaci CHK2 kinázy, jednoho z hlavních substrátů ATM.

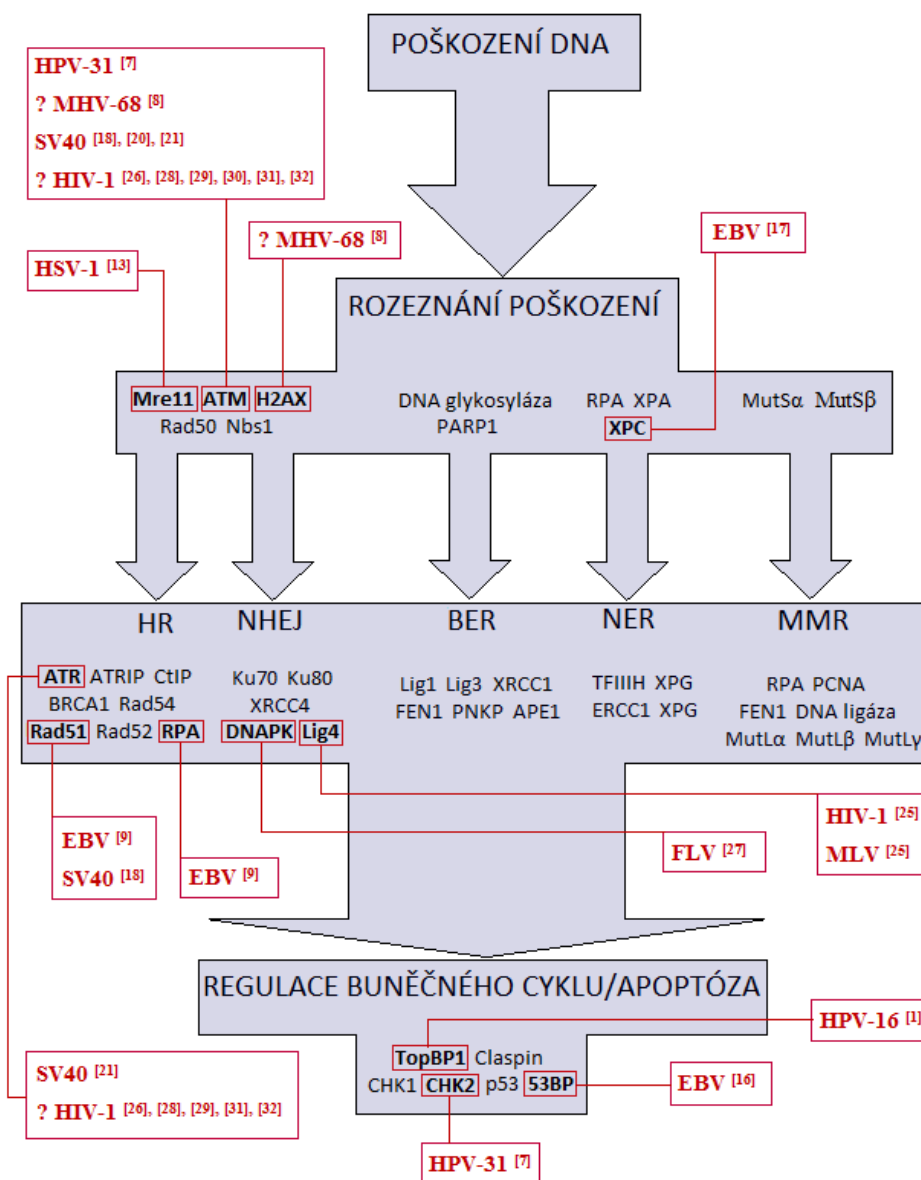
5. Závěr

U všech výše zmíněných virových čeledí (*Retroviridae*, *Papillomaviridae*, *Polyomaviridae*, *Herpesviridae*) dochází během produktivní infekce k aktivaci buněčné odpovědi na poškození DNA, a to především složek zodpovědných za opravu dvouřetězcových přerušeni DNA. V aktivaci a regulaci těchto mechanismů hraje klíčovou úlohu ATM/ATR kinázová dráha (shrnuto v Bakkenist a Kasten 2004). ATM, ATR a další složky DDR jsou mobilizovány v důsledku replikace virového genomu, jejíž produkty buňka pravděpodobně rozeznává jako abnormální. Pozoruhodnější je však skutečnost, že k aktivaci DDR dochází i skrze virové proteiny. Tento jev byl prokázán u proteinů Vpr (HIV), E6/7 (HPV) a LT (SV40) ve studiích, které využívali jejich na virové replikaci nezávislé exprese v permisivních buněčných liniích (Boichuk *et al.* 2010; Hein *et al.* 2009; Moody a Laimins 2009; Nakai-Murakami *et al.* 2007; Spardy *et al.* 2008). Je známa také řada dalších virových proteinů, jež přímo interagují se složkami DDR a pravděpodobně tak regulují jejich aktivitu (obr. 6). V nedávné době se také ukazuje, že viry mohou skrze své proteiny aktivovat DDR i nepřímo. LT (SV40) a Vpr (HIV) jsou totiž schopné indukovat v buňce dvouřetězcová přerušeni DNA (Boichuk *et al.* 2010; Tachiwana *et al.* 2006). Jakým způsobem k tomu dochází a zda se indukce dvouřetězcových přerušeni DNA objevuje i u jiných virů je zatím nejasné. Další výzkum by mohl odhalit pravý význam tohoto fenoménu.

Správná funkce DNA opravných mechanismů je pro zmíněné viry výhodná, často dokonce nepostradatelná (obr. 7). Replikace SV40 a některých herpesvirů se ukazuje být závislá na faktorech účastnících se homologní rekombinace (Boichuk *et al.* 2010; Kudoh *et al.* 2009; Lilley *et al.* 2005). Některé proteiny zajišťující opravu DNA pomocí nehomologního spojování konců jsou pravděpodobně využívány při integraci retrovirové DNA (Daniel *et al.* 1999; Hasegawa *et al.* 2005). Konkrétní mechanismus, kterým se složky DDR na virové replikaci či integraci podílejí, je však stále nejasný. Polyomaviry, některé herpesviry a retroviry jsou dále schopné skrze signalizační dráhy DNA opravných mechanismů navodit zástavu buněčného cyklu a vytvořit tak podmínky vhodné k replikaci (Bartz *et al.* 1996; Dahl *et al.* 2005; Li *et al.* 2008). Účast buněčné odpovědi na poškození DNA ve virovém životním cyklu je tedy komplexní a její aspekty zůstávají z velké části stále nepochopeny.



Obrázek 6: Souhrn virových proteinů interagujících se složkami DNA opravných mechanismů. Schéma v šedém poli zobrazuje buněčné faktory účastnící se oprav DNA pomocí homologní rekombinace (HR), nehomologního spojení konců (NHEJ), opravy vyštěpením báze (BER), opravy vyštěpením nukleotidu (NER) a opravy špatně zařazených nukleotidů (MMR). Dále jsou zde uvedeny některé proteiny, jež úzce spolupracují s těmito mechanismy a regulují buněčný cyklus či vstup do apoptózy (CHK1, CHK2, p53 aj.). V zelených rámečcích jsou uvedeny viry a jejich proteiny, u kterých byla objevena (nebo se předpokládá) přímá interakce s faktory DNA opravných mechanismů. Literatura: ^[1](Boner *et al.* 2002), ^[2](Scheffner *et al.* 1990), ^[3](Iftner *et al.* 2002), ^[7](Moody a Laimins 2009) ^[8](Tarakanova *et al.* 2007), ^[11](Taylor a Knipe 2004), ^[14](Liang *et al.* 2006), ^[15](Kudoh *et al.* 2005), ^[16](Bailey *et al.* 2009), ^[17](Lu *et al.* 2007), ^[19](Hein *et al.* 2009), ^[22](Wu *et al.* 2004), ^[24](Linzer a Levine 1979), ^[33](Daikoku *et al.* 2006).



Obrázek 7: Přehled faktorů DNA opravných mechanismů prokazatelně podporujících virovou infekci. Schéma v šedém poli zobrazuje buněčné faktory účastnící se oprav DNA pomocí homologní rekombinace (HR), nehomologního spojení konců (NHEJ), opravy vyštěpením báze (BER), opravy vyštěpením nukleotidu (NER) a opravy špatně zařazených nukleotidů (MMR). Dále jsou zde uvedeny některé proteiny, jež úzce spolupracují s těmito mechanismy a regulují buněčný cyklus či vstup do apoptózy (CHK1, CHK2, p53 aj.). Červené rámečky obsahují názvy virů, u kterých nepřítomnost či snížení aktivity daných buněčných faktorů negativně ovlivňuje infekci. Otazník před zkratkou viru označuje případy s rozporupnými výsledky. Literatura: ^[1](Boner *et al.* 2002), ^[7](Moody a Laimins 2009), ^[8](Tarakanova *et al.* 2007), ^[9](Kudoh *et al.* 2009), ^[13](Lilley *et al.* 2005), ^[16](Bailey *et al.* 2009), ^[17](Lu *et al.* 2007), ^[18](Boichuk *et al.* 2010), ^[20](Zhao *et al.* 2008), ^[21](Dahl *et al.* 2005), ^[25](Li *et al.* 2001), ^[26](Yang *et al.* 2010), ^[27](Hasegawa *et al.* 2005), ^[28](Daniel *et al.* 2005), ^[29](Nunnari *et al.* 2005), ^[30](Lau *et al.* 2005), ^[31](DeHart *et al.* 2005), ^[32](Daniel *et al.* 2003).

Seznam použité literatury

- Alani E, Lee S, Kane MF, Griffith J, Kolodner RD (1997) Saccharomyces cerevisiae MSH2, a mismatched base recognition protein, also recognizes Holliday junctions in DNA. *Journal of Molecular Biology* **265**: 289-301
- Ali SH, Kasper JS, Arai T, DeCaprio JA (2004) Cu17/p185/p193 binding to simian virus 40 large T antigen has a role in cellular transformation. *Journal of Virology* **78**: 2749-2757
- Asai R, Kato A, Kato K, Kanamori-Koyama M, Sugimoto K, Sairenji T, Nishiyama Y, Kawaguchi Y (2006) Epstein-Barr virus protein kinase BGLF4 is a virion tegument protein that dissociates from virions in a phosphorylation-dependent process and phosphorylates the viral immediate-early protein BZLF1. *Journal of Virology* **80**: 5125-5134
- Ascoli CA, Maul GG (1991) Identification of a novel nuclear domain. *Journal of Cell Biology* **112**: 785-795
- Bailey SG, Verrall E, Schelcher C, Rhie A, Doherty AJ, Sinclair AJ (2009) Functional Interaction between Epstein-Barr Virus Replication Protein Zta and Host DNA Damage Response Protein 53BP1. *Journal of Virology* **83**: 11116-11122
- Bakkenist CJ, Kastan MB (2004) Initiating cellular stress responses. *Cell* **118**: 9-17
- Bartz SR, Rogel ME, Emerman M (1996) Human immunodeficiency virus type 1 cell cycle control: Vpr is cytostatic and mediates G(2) accumulation by a mechanism which differs from DNA damage checkpoint control. *Journal of Virology* **70**: 2324-2331
- Berg M, Stenlund A (1997) Functional interactions between papillomavirus E1 and E2 proteins. *Journal of Virology* **71**: 3853-3863
- Boichuk S, Hu LA, Hein J, Gjoerup OV (2010) Multiple DNA Damage Signaling and Repair Pathways Deregulated by Simian Virus 40 Large T Antigen. *Journal of Virology* **84**: 8007-8020
- Boner W, Taylor ER, Tsirimonaki E, Yamane K, Campo MS, Morgan IM (2002) A functional interaction between the human papillomavirus 16 transcription/replication factor E2 and the DNA damage response protein TopBP1. *Journal of Biological Chemistry* **277**: 22297-22303
- Caldecott KW (2008) Single-strand break repair and genetic disease. *Nature Reviews Genetics* **9**: 619-631
- Cotsiki M, Lock RL, Cheng Y, Williams GL, Zhao J, Perera D, Freire R, Entwistle A, Golemis EA, Roberts TM, Jat PS, Gjoerup OV (2004) Simian virus 40 large T antigen targets the spindle assembly checkpoint protein Bub1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**: 947-952

Czornak K, Chughtai S, Chrzanowska KH (2008) Mystery of DNA repair: the role of the MRN complex and ATM kinase in DNA damage repair. *Journal of Applied Genetics* **49**: 383-396

Dahl J, You J, Benjamin TL (2005) Induction and utilization of an ATM signaling pathway by polyomavirus. *Journal of Virology* **79**: 13007-13017

Daikoku T, Kudoh A, Sugaya Y, Iwahori S, Shirata N, Isomura H, Tsurumi T (2006) Postreplicative mismatch repair factors are recruited to Epstein-Barr virus replication compartments. *Journal of Biological Chemistry* **281**: 11422-11430

Daniel R, Kao G, Taganov K, Greger JG, Favorova O, Merkel G, Yen TJ, Katz RA, Skalka AM (2003) Evidence that the retroviral DNA integration process triggers an ATR-dependent DNA damage response. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**: 4778-4783

Daniel R, Katz RA, Skalka AM (1999) A role for DNA-PK in retroviral DNA integration. *Science* **284**: 644-647

Daniel R, Marusich E, Argyris E, Zhao RY, Skalka AM, Pomerantz RJ (2005) Caffeine inhibits human immunodeficiency virus type 1 transduction of nondividing cells. *Journal of Virology* **79**: 2058-2065

DeHart JL, Andersen JL, Zimmerman ES, Ardon O, An DS, Blackett J, Kim B, Planelles V (2005) The ataxia telangiectasia-mutated and Rad3-related protein is dispensable for retroviral integration. *Journal of Virology* **79**: 1389-1396

Dellaire G, Bazett-Jones DP (2004) PML nuclear bodies: dynamic sensors of DNA damage and cellular stress. *Bioessays* **26**: 963-977

Dey D, Dahl J, Cho S, Benjamin TL (2002) Induction and bypass of p53 during productive infection by polyomavirus. *Journal of Virology* **76**: 9526-9532

Donaldson MM, Boner W, Morgan IM (2007) TopBP1 regulates human papillomavirus type 16 E2 interaction with chromatin. *Journal of Virology* **81**: 4338-4342

Dutch RE, Bianchi V, Lehman IR (1995) Herpes-simplex virus type-1 dna-replication is specifically required for high-frequency homologous recombination between repeated sequences. *Journal of Virology* **69**: 3084-3089

Dyson N, Howley PM, Munger K, Harlow E (1989) The Human Papilloma virus-16 E7-oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene-product. *Science* **243**: 934-937

Faust EA, Triller H (2002) Stimulation of human flap endonuclease 1 by human immunodeficiency virus type 1 integrase: Possible role for flap endonuclease 1 in 5'-end processing of human immunodeficiency virus type 1 integration intermediates. *Journal of Biomedical Science* **9**: 273-287

Friedberg EC (2001) How nucleotide excision repair protects against cancer. *Nature Reviews Cancer* **1**: 22-33

Gupte SS, Olson JW, Ruyechan WT (1991) The major Herpes-simplex virus type-1 dna-binding protein is a zinc metalloprotein. *Journal of Biological Chemistry* **266**: 11413-11416

Hasegawa M, Yamaguchi S, Aizawa S, Ikeda H, Tatsumi K, Noda Y, Hirokawa K, Kitagawa M (2005) Resistance against friend leukemia virus-induced leukemogenesis in DNA-dependent protein kinase (DNA-PK)-deficient scid mice associated with defective viral integration at the Spi-1 and Fli-1 site. *Leukemia Research* **29**: 933-942

Hein J, Boichuk S, Wu JP, Cheng Y, Freire R, Jat PS, Roberts TM, Gjoerup OV (2009) Simian Virus 40 Large T Antigen Disrupts Genome Integrity and Activates a DNA Damage Response via Bub1 Binding. *Journal of Virology* **83**: 117-127

Hoeijmakers JHJ (2001) Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature* **411**: 366-374

Hsieh P, Yamane K (2008) DNA mismatch repair: Molecular mechanism, cancer, and ageing. *Mechanisms of Ageing and Development* **129**: 391-407

Iftner T, Elbel M, Schopp B, Hiller T, Loizou JI, Caldecott KW, Stubenrauch F (2002) Interference of papillomavirus E6 protein with single-strand break repair by interaction with XRCC1. *Embo Journal* **21**: 4741-4748

Jackson SP (2009) The DNA-damage response: new molecular insights and new approaches to cancer therapy. *Biochemical Society Transactions* **37**: 483-494

Jul-Larsen A, Visted T, Karlsen BO, Rinaldo CH, Bjerkvig R, Lonning PE, Boe SO (2004) PML-nuclear bodies accumulate DNA in response to polyomavirus BK and simian virus 40 replication. *Experimental Cell Research* **298**: 58-73

Knipe DM, Howley PM, Griffin DE, Lamb RA, Martin MA, Roizman B, Straus SE. (2007) Field's Virology. Lippincott Williams a Wilkins, Vol. 2, p. 3177.

Konig R, Zhou YY, Elleder D, Diamond TL, Bonamy GMC, Ireland JT, Chiang CY, Tu BP, De Jesus PD, Lilley CE, Seidel S, Opaluch AM, Caldwell JS, Weitzman MD, Kuhlen KL, Bandyopadhyay S, Ideker T, Orth AP, Miraglia LJ, Bushman FD, Young JA, Chanda SK (2008) Global analysis of host-pathogen interactions that regulate early-stage HIV-1 replication. *Cell* **135**: 49-60

Kudoh A, Fujita M, Zhang LM, Shirata N, Daikoku T, Sugaya Y, Isomura H, Nishiyama Y, Tsurumi T (2005) Epstein-Barr virus lytic replication elicits ATM checkpoint signal transduction while providing an S-phase-like cellular environment. *Journal of Biological Chemistry* **280**: 8156-8163

Kudoh A, Iwahori S, Sato Y, Nakayama S, Isomura H, Murata T, Tsurumi T (2009) Homologous Recombinational Repair Factors Are Recruited and Loaded onto the Viral DNA Genome in Epstein-Barr Virus Replication Compartments. *Journal of Virology* **83**: 6641-6651

Kumagai A, Lee J, Yoo HY, Dunphy WG (2006) TopBP1 activates the ATR-ATRIP complex. *Cell* **124**: 943-955

- Kunkel TA, Erie DA (2005) DNA mismatch repair. *Annual Review of Biochemistry* **74**: 681-710
- Lau A, Kanaar R, Jackson SP, O'Connor MJ (2004) Suppression of retroviral infection by the RAD52 DNA repair protein. *Embo Journal* **23**: 3421-3429
- Lau A, Swinbank KM, Ahmed PS, Taylor DL, Jackson SP, Smith GCM, O'Connor MJ (2005) Suppression of HIV-1 infection by a small molecule inhibitor of the ATM kinase. *Nature Cell Biology* **7**: 493-U457
- Lee JH, Paull TT (2005) ATM activation by DNA double-strand breaks through the Mre11-Rad50-Nbs1 complex. *Science* **308**: 551-554
- Li H, Baskaran R, Krisky DM, Bein K, Grandi P, Cohen JB, Glorioso JC (2008) Chk2 is required for HSV-1ICP0-mediated G2/M arrest and enhancement of virus growth. *Virology* **375**: 13-23
- Li L, Olvera JM, Yoder KE, Mitchell RS, Butler SL, Lieber M, Martin SL, Bushman FD (2001) Role of the non-homologous DNA end joining pathway in the early steps of retroviral infection. *Embo Journal* **20**: 3272-3281
- Liang XZ, Pickering MT, Cho NH, Chang H, Volkert MR, Kowalik TF, Jung JU (2006) Deregulation of DNA damage signal transduction by herpesvirus latency-associated M2. *Journal of Virology* **80**: 5862-5874
- Lilley CE, Carson CT, Muotri AR, Gage FH, Weitzman MD (2005) DNA repair proteins affect the lifecycle of herpes simplex virus 1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**: 5844-5849
- Lilley CE, Schwartz RA, Weitzman MD (2007) Using or abusing: viruses and the cellular DNA damage response. *Trends in Microbiology* **15**: 119-126
- Linzer DIH, Levine AJ (1979) Characterization of a 54k dalton cellular sv40 tumor-antigen present in SV40-transformed cells and uninfected embryonal carcinoma-cells. *Cell* **17**: 43-52
- Lu CC, Chen YC, Wang JT, Yang PW, Chen MR (2007) Xeroderma pigmentosum C is involved in Epstein-Barr virus DNA replication. *Journal of General Virology* **88**: 3234-3243
- McBride AA (2008) Replication and Partitioning of Papillomavirus Genomes. In *Advances in Virus Research, Vol 72* Vol. 72, pp 155-205. San Diego: Elsevier Academic Press Inc
- Misteli T, Soutoglou E (2009) The emerging role of nuclear architecture in DNA repair and genome maintenance. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **10**: 243-254
- Mohni KN, Livingston CM, Cortez D, Weller SK (2010) ATR and ATRIP Are Recruited to Herpes Simplex Virus Type 1 Replication Compartments Even though ATR Signaling Is Disabled. *Journal of Virology* **84**: 12152-12164

- Moody CA, Laimins LA (2009) Human Papillomaviruses Activate the ATM DNA Damage Pathway for Viral Genome Amplification upon Differentiation. *Plos Pathogens* **5**
- Nakai-Murakami C, Shimura M, Kinomoto M, Takizawa Y, Tokunaga K, Taguchi T, Hoshino S, Miyagawa K, Sata T, Kurumizaka H, Yuo A, Ishizaka Y (2007) HIV-1 Vpr induces ATM-dependent cellular signal with enhanced homologous recombination. *Oncogene* **26**: 477-486
- Nunnari G, Argyris E, Fang JH, Mehlman KE, Pomerantz RJ, Daniel R (2005) Inhibition of HIV-1 replication by caffeine and caffeine-related methylxanthines. *Virology* **335**: 177-184
- Okubo E, Lehman JM, Friedrich TD (2003) Negative regulation of mitotic promoting factor by the checkpoint kinase Chk1 in simian virus 40 lytic infection. *Journal of Virology* **77**: 1257-1267
- Parish JL, Bean AM, Park RB, Androphy EJ (2006) ChIR1 is required for loading papillomavirus E2 onto mitotic chromosomes and viral genome maintenance. *Molecular Cell* **24**: 867-876
- Parkinson J, Lees-Miller SP, Everett RD (1999) Herpes simplex virus type 1 immediate-early protein Vmw110 induces the proteasome-dependent degradation of the catalytic subunit of DNA-dependent protein kinase. *Journal of Virology* **73**: 650-657
- Rohaly G, Chemnitz J, Dehde S, Nunez AM, Heukeshoven J, Deppert W, Dornreiter I (2005) A novel human p53 isoform is an essential element of the ATR-intra-S phase checkpoint. *Cell* **122**: 21-32
- Rohaly G, Korf K, Dehde S, Dornreiter I (2010) Simian Virus 40 Activates ATR-Delta p53 Signaling To Override Cell Cycle and DNA Replication Control. *Journal of Virology* **84**: 10727-10747
- Sancar A, Lindsey-Boltz LA, Unsal-Kacmaz K, Linn S (2004) Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. *Annual Review of Biochemistry* **73**: 39-85
- Scheffner M, Werness BA, Huibregtse JM, Levine AJ, Howley PM (1990) The E6 oncoprotein encoded by Human Papillomavirus type-16 and type-18 promotes the degradation of p53. *Cell* **63**: 1129-1136
- Severini A, Scraba DG, Tyrrell DLJ (1996) Branched structures in the intracellular DNA of herpes simplex virus type 1. *Journal of Virology* **70**: 3169-3175
- Seviour EG, Lin SY (2010) The DNA damage response: Balancing the scale between cancer and ageing. *Aging-Us* **2**: 900-907
- Shi YL, Dodson GE, Rundell K, Tibbetts RS (2005) Ataxia-telangiectasia-mutated (ATM) is a T-antigen kinase that controls SV40 viral replication in vivo. *Journal of Biological Chemistry* **280**: 40195-40200

Shirata N, Kudoh A, Daikoku T, Tatsumi Y, Fujita M, Kiyono T, Sugaya Y, Isomura H, Ishizaki K, Tsurumi T (2005) Activation of ataxia telangiectasia-mutated DNA damage checkpoint signal transduction elicited by herpes simplex virus infection. *Journal of Biological Chemistry* **280**: 30336-30341

Skalka AM, Katz RA (2005) Retroviral DNA integration and the DNA damage response. *Cell Death and Differentiation* **12**: 971-978

Soutoglou E, Misteli T (2008) Activation of the cellular DNA damage response in the absence of DNA lesions. *Science* **320**: 1507-1510

Spardy N, Duensing A, Hoskins EE, Wells SI, Duensing S (2008) HPV-16 E7 Reveals a Link between DNA Replication Stress, Fanconi Anemia D2 Protein, and Alternative Lengthening of Telomere-Associated Promyelocytic Leukemia Bodies. *Cancer Research* **68**: 9954-9963

Stracker TH, Carson CT, Weitzman MD (2002) Adenovirus oncoproteins inactivate the Mre11-Rad50-NBS1 DNA repair complex. *Nature* **418**: 348-352

Tachiwana H, Shimura M, Nakai-Murakami C, Tokunaga K, Takizawa Y, Sata T, Kurumizaka H, Ishizaka Y (2006) HIV-1 Vpr induces DNA double-strand breaks. *Cancer Research* **66**: 627-631

Takagi S, Takada K, Sairenji T (1991) Formation of intranuclear replication compartments of Epstein-Barr-virus with redistribution of BZLF1 and BMRF1 gene-products. *Virology* **185**: 309-315

Tarakanova VL, Leung-Pinecla V, Hwang S, Yang CW, Matatall K, Basson M, Sun R, Piwnica-Worms H, Sleckman BP, Virgin HW (2007) gamma-herpesvirus kinase actively initiates a DNA damage response by inducing phosphorylation of H2AX to foster viral replication. *Cell Host & Microbe* **1**: 275-286

Tarakanova VL, Stanitsa E, Leonardo SM, Bigley TM, Gauld SB (2010) Conserved gammaherpesvirus kinase and histone variant H2AX facilitate gammaherpesvirus latency in vivo. *Virology* **405**: 50-61

Taylor TJ, Knipe DM (2004) Proteomics of herpes simplex virus replication compartments: Association of cellular DNA replication, repair, recombination, and chromatin remodeling proteins with ICP8. *Journal of Virology* **78**: 5856-5866

Thierry F (2009) Transcriptional regulation of the papillomavirus oncogenes by cellular and viral transcription factors in cervical carcinoma. *Virology* **384**: 375-379

Usui T, Ohta T, Oshiumi H, Tomizawa J, Ogawa H, Ogawa T (1998) Complex formation and functional versatility of Mre11 of budding yeast in recombination. *Cell* **95**: 705-716

Virshup DM, Russo AAR, Kelly TJ (1992) Mechanism of activation of Simian Virus-40 dna-replication by protein phosphatase-2a. *Molecular and Cellular Biology* **12**: 4883-4895

Voet D, Voet J (1995) Biochemie. Vol. 1, 1 edn, 1089-1095, p 1323. Praha: Victoria Publishing

Walboomers JMM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, Snijders PJF, Peto J, Meijer C, Munoz N (1999) Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *Journal of Pathology* **189**: 12-19

Wilkinson DE, Weller SK (2004) Recruitment of cellular recombination and repair proteins to sites of herpes simplex virus type 1 DNA replication is dependent on the composition of viral proteins within prereplicative sites and correlates with the induction of the DNA damage response. *Journal of Virology* **78**: 4783-4796

Wilkinson DE, Weller SK (2006) Herpes simplex virus type I disrupts the ATR-dependent DNA-damage response during lytic infection. *Journal of Cell Science* **119**: 2695-2703

Wu XH, Avni D, Chiba T, Yan F, Zhao QP, Lin YF, Heng H, Livingston D (2004) SV40 T antigen interacts with Nbs1 to disrupt DNA replication control. *Genes a Development* **18**: 1305-1316

Yamane K, Tsuruo T (1999) Conserved BRCT regions of TopBP1 and of the tumor suppressor BRCA1 bind strand breaks and termini of DNA. *Oncogene* **18**: 5194-5203

Yang YX, Guen V, Richard J, Cohen EA, Berthoux L (2010) Cell context-dependent involvement of ATR in early stages of retroviral replication. *Virology* **396**: 272-279

Yoder KE, Bushman FD (2000) Repair of gaps in retroviral DNA integration intermediates. *Journal of Virology* **74**: 11191-11200

Zhao X, Madden-Fuentes RJ, Lou BX, Pipas JM, Gerhardt J, Rigell CJ, Fanning E (2008) Ataxia telangiectasia-mutated damage-signaling kinase- and proteasome-dependent destruction of Mre11-Rad50-Nbs1 Subunits in simian virus 40-infected primate cells. *Journal of Virology* **82**: 5316-5328

Zhong ZH, Jiang WQ, Cesare AJ, Neumann AA, Wadhwa R, Reddel RR (2007) Disruption of telomere maintenance by depletion of the MRE11/RAD50/NBS1 complex in cells that use alternative lengthening of telomeres. *Journal of Biological Chemistry* **282**: 29314-29322