

**Univerzita Karlova v Praze**

**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Biologie

Obor: Biologie



Marie Sejpková

Význam sumoylace pro infekci vybranými viry replikujícími se v buněčném jádře  
Significantion of sumoylation for infection by selected viruses replicated in the cell nucleus

Bakalářská práce

Školitel: Doc. RNDr. Jitka Forstová, CSc.

Praha, 2012

Děkuji Doc. RNDr. Jitce Forstové, CSc. za cenné rady a připomínky při psaní této práce.  
Zároveň děkuji za podporu svému otci Ing. Ladislavu Sejkovi.

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

V Praze, dne

.....

## Obsah

Seznam použitých zkratk.....	4
Abstrakt .....	5
1. Úvod.....	6
2. Sumoylace .....	6
2.1. Regulace sumoylace .....	7
2.2. Sumoylace a buněčné interakce .....	8
3. Sumoylace z hlediska vybraných virů replikujícími se v buněčném jádře .....	9
3.1. Adenoviridae .....	10
3.1.1. Časný protein E1B 55kDa lidského adenoviru 5 .....	10
3.1.2. Časný protein Gam1 ptačího adenoviru CELO .....	11
3.2. Virus Epstein-Barrové .....	13
3.2.1. Bezprostředně časné proteiny EB1 a Rta v počáteční fázi lytického cyklu .....	14
3.2.2. Proteiny latentní fáze, jaderné antigeny EBNA a latentní membránový protein LMP1 ..	17
3.3. Lidský cytomegalovirus .....	18
3.3.1. Bezprostředně časné proteiny IE1 a IE2 .....	18
3.3.2. Funkce obalového proteinu pp71 v bezprostředně časné fázi infekce.....	22
3.4. Papillomaviridae .....	22
3.4.1. Časná fáze infekce - interakce proteinů E1, E2 a E6 a buněčné sumoylace .....	23
3.4.2. Minoritní kapsidový protein L2.....	25
3.5. Influenza A .....	26
3.5.1. Exportní krok genomu z jádra z pohledu matrixového proteinu 1.....	26
3.5.2. Nestrukturní proteiny a sumoylace .....	27
3.6. Retroviridae .....	28
3.6.1. Virus lidské imunodeficiency .....	28
3.6.2. Mason-Pfizer monkey virus a Moloney Murine Leukemia virus .....	29
4. Závěr .....	31
5. Literární zdroje .....	32

## Seznam použitých zkratk

BPV	kravský papilomavirus
CA	kapsidový protein
CBP	CREB-binding protein
CDK	cyclin-dependent kinase
CELO	chicken embryo lethal orphan
Crm1	chromosome Region Maintenance 1
Daxx	death-domain-associated protein
E6AP	E6-associated protein
EBNA	jaderný antigen EBV
EBV	virus Epstein-Barrové
Env	obalový polyprotein
GFP	zelený fluorescenční protein
HCMV	lidský cytomegalovirus
HDAC	histon deacetyláza
HIV	virus lidské imunodeficiency
HPV	lidský papilomavirus
IFN- $\beta$	interferon- $\beta$
IRF3;7	regulační faktor interferonu 3; 7
JAK/STAT	Janus kinase/signal transducer and activator of transcription
IE	bezprostředně časný
LEDGF/p75	lens epithelium-derived growth factor/protein 75
LMP	latent membrane protein
MHC	hlavní histokompatibilní komplex
MLV	virus myši leukémie
Nef protein	negativní regulační faktor
NES	jaderný exportní signál (nuclear export signal)
oriLyt/P	lytický/latentní počátek replikace
PIAS	protein inhibitors of activated STAT
PK	proteinkináza
PML	promyelocytic leukemia protein
PML NB	PML tělíska
pRb	retinoblastoma protein
RanBP2	Ran binding protein 2
RanBPM	Ran binding protein M
RanGAP1	Ran GTPase activating protein 1
RRE	replication and transcription activator
Rta	Rta-responsive element
SAE	SUMO aktivační enzym
SENP	SUMO specifická peptidáza
SIM	SUMO interakční motiv
SOCS	suppressor of cytokine signalling
Sp100	speckled protein 100
STAT2	signal transducer and activator of transcription 2
SUMO	small ubiquitin-related modifier
TAF12	TATA-box binding protein associated factor 12
TNF- $\alpha$	tumor necrosis factor- $\alpha$
TRIM	tripartite motif-containing protein
Ubc9	ubiquitin conjugating enzyme 9
vRNP	viral ribonucleoprotein

## Abstrakt

Tato práce pojednává o vzájemném působení virů a hostitelské buňky ve vztahu k procesu sumoylace. Hlavním cílem je poukázat na ovlivnění jak replikační strategie daného viru, tak buněčného cyklu tímto mechanismem. Sumoylace je z hlediska řízení buňky klíčový proces, který zasahuje do hlavních drah regulace zahrnujících například p53, PML tělíska či epigenetické změny chromatinu. Pro virus má význam ve stabilizaci jeho proteinů, což ovlivňuje dobu jejich působení a přesnější načasování jednotlivých fází replikačního cyklu. Jedním z pohledů může být vlastní soutěž o SUMO protein (small ubiquitin like modifier) mezi buňkou a virem. Z hlediska viru v konečném důsledku vyústí sumoylace v potlačení antivirové obrany buňky, regulaci samotného buněčného cyklu, a to zejména během indukce apoptózy, a obecně k lepšímu šíření onemocnění. Objevených proteinů a jevů souvisejících se sumoylací neustále přibývá, stejně tak jako počet virů, které sumoylaci využívají. Využití či zneužití sumoylace virem ukazuje další možnost v manipulaci s buňkou a schopnost viru zasahovat do relativně stále neprobádaného stupně buněčné regulace.

Klíčová slova: sumoylace, adenoviry, herpesviry, papilomaviry, Influenza A, retroviry

## Abstract

This work introduces association between viruses and host cell with respect to sumoylation process. The main aim is referring to influence of this modification both on virus replication strategy and cell cycle. Sumoylation is essential process for cell regulation interfering with general regulation pathways including those performed by e.g. p53 or PML bodies and also epigenetic changes of chromatin. For viruses, sumoylation means stabilization of viral proteins and better timing each phase of viral cycle through viral protein. One point of view is competition of cell and virus for SUMO machinery. Viruses take advantage of sumoylation for inhibition antiviral defense of cells, regulation cell cycle mainly in apoptosis induction and in general for more successful infection. There are cumulating evidence of new proteins and phenomena connected with sumoylation mechanisms as well as viruses exploiting sumoylation for their benefit. Utilization and abuse of sumoylation by viruses point to future possibilities of cell manipulation and virus ability to intervene to this still relatively poorly understood type of cell regulation.

Key words: sumoylation, adenoviruses, herpesviruses, papillomaviruses, Influenza A, retroviruses

## 1. ÚVOD

Sumoylace je proces modifikace proteinů, skrze který buňka reguluje jejich funkci. Pojem je odvozen od zkratky SUMO, která v sobě ukrývá název pro *small ubiquitin-related modifier* protein. Poprvé byl pojem SUMO použit v práci zabývající se interakcí buněčných proteinů transportujících materiál do jádra. Pouze sumoylovaná forma buněčného proteinu RanGAP1, který vstup proteinům umožňuje, interaguje s proteinem RanBP2, který jako součást jaderného póru transport do jádra zprostředkovává (Matunis, 1996; Mahajan, 1997). Posléze se ukázalo, že sám protein RanBP2 může vystupovat v posledním kroku sumoylace jako SUMO E3 ligáza (viz níže) (Pichler, 2002). SUMO protein byl nezávisle objeven i dalšími skupinami, které rozšířily pozorovaný úhel vlivu sumoylace. V těchto studiích, kde byl SUMO protein nazýván odlišně (UBL1, PIC1, GMP1, sentrin), se sumoylace skrze modifikaci buněčných proteinů podílí na opravě dvouřetězcových DNA zlomů a homologní rekombinaci (Shen, 1996), působí proti indukci apoptózy (Okura, 1996) a interaguje s tumor supresorovými PML proteiny (Boddy, 1996).

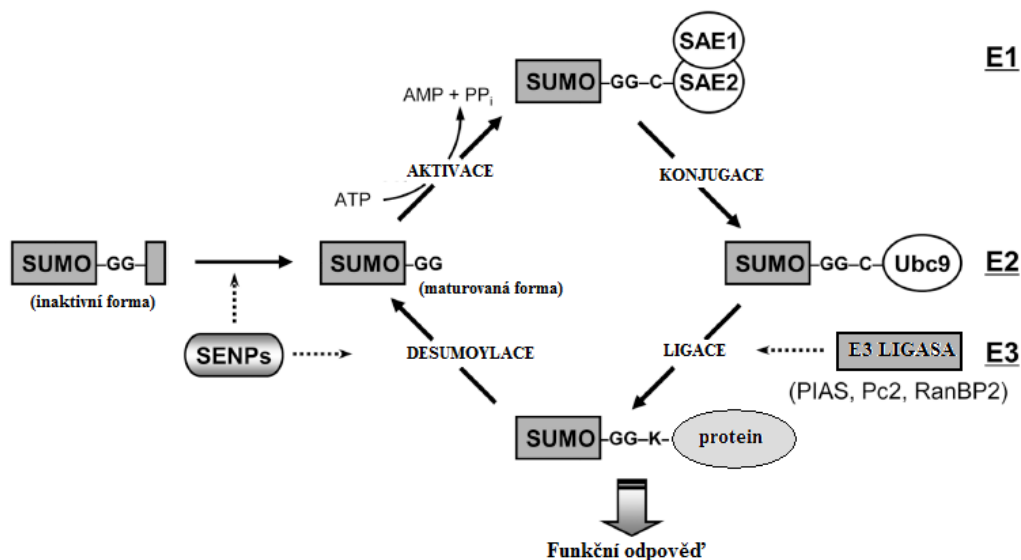
Sumoylace je stále poměrně nově objevený způsob posttranslační modifikace, který se intenzivně zkoumá. Na základě 18% sekvenční homologie SUMO proteinů s ubiquitinem se proteiny řadí do skupiny ubiquitin-like proteinů, mezi něž patří i proteiny zahrnující modifikace jako jsou neddylace a isgylace, které spojuje motiv dvou glycinových zbytků na C konci proteinu. Na rozdíl od ubiquitinu, který vazbou proteiny odsuzuje k degradaci, sumoylace může vystupovat opačně (neboť se váže na obdobná místa) a blokovat, nicméně i podporovat, nejen potenciální vazbu ubiquitinu, ale též acetylaci proteinu, a modifikovat tak jeho funkci. Role sumoylace se odráží v řízení růstu a odpovědi buňky na vnější i vnitřní signály v interakci s transkripčními faktory. Zasahuje do organizace chromozomů i modulace imunitní odpovědi. Typickým projevem je transport sumoylovaných proteinů na specifická místa v buňce.

Cílem práce je přiblížit interakci virů a sumoylace v souvislosti s dopadem na virový i buněčný cyklus. Sumoylace negativně ovlivňuje strategii virů ku prospěchu buňky. Jindy je virem využita či naopak potlačena v jeho prospěch. Intervence viru do buněčné sumoylace rozšiřuje naše poznání o cílech, způsobech a důsledcích zásahu do této regulace stejně jako o ní samotné.

## 2. SUMOYLACE

Sumoylace, při které dochází k vazbě SUMO na protein, je posttranslační modifikace skládající se ze tří enzymatických kroků zahrnujících aktivační protein E1, konjugační protein E2 (též Ubc9) a ligázu E3 (viz obr.1). E1 aktivační protein je heterodimer tvořený podjednotkami SAE1 a SAE2 (SUMO aktivační enzymy) přítomných v buněčném jádře (Moutty, 2011). Karboxylová skupina na C konci SUMO proteinu interaguje s ATP navázaným na SAE2 podjednotce, na které dochází

k vytvoření thioesterové vazby mezi SUMO proteinem a SH skupinou cysteinu SAE2 (Lois, 2005). Navázané SUMO na E1 je přeneseno na Ubc9 (Desterro, 1999), ze kterého za pomoci E3 ligázy dochází k vazbě na cílový protein (viz obr. 1). Popsaný způsob je obdobný u dalších ubiquitin-like proteinů, např. u samotného ubiquitinu. K SUMO vazbě dochází mezi glycinem na C konci SUMO a lyzinem cílového proteinu, obvykle v tzv. SUMO konsenzus motivu  $\psi$ KXE, kde  $\psi$  je symbolem pro hydrofobní aminokyselinu (typicky valin, isoleucin, leucin); K pro lyzin; X pro jakoukoliv aminokyselinu; a nakonec E pro glutamovou kyselinu.



Obr. 1: Kroky sumoylace. Působením SENP dochází k tvorbě maturovaných forem SUMO proteinů s typickým diglycinovým motivem (GG), který se po aktivaci ATP váže na SAE2 podjednotku E1 aktivačního proteinu. Komplex zahrnující SAE1/2 přenáší SUMO na E2 konjugací enzym (Ubc9), který za spolupráce E3 ligázy váže SUMO na lyzin (K) cílového proteinu. Vazbou dochází k modifikaci funkce proteinu. Desumoylací proteinu pomocí SENP se tvoří volný SUMO protein. Jako E3 ligázy vystupují proteiny PIAS, Pc2 a RanBP2. Upraveno dle Woo, 2010.

## 2.1. Regulace sumoylace

SUMO protein se váže na širokou skupinu proteinů a podporuje další interakce, které nemusí mít v určité fázi pozitivní vliv na buněčný cyklus (Mukhopadhyay, 2010). Sumoylace je regulována již na úrovni prekurzorů jednotlivých SUMO proteinů, kde dochází k odštěpení aminokyselin za diglycinovým motivem prostřednictvím enzymů SENP (SUMO specifická peptidáza) (Xu, 2005).

Sumoylace je reverzibilní krok a tzv. desumoylací provádí enzymy SENP. U člověka bylo objeveno sedm SENP, které se nacházejí na různých místech buňky, kde s různou specifitou interagují se SUMO proteiny (Shen L., 2006; Shen, 2009). Jejich negativní vliv uvádím na příkladu peptidázy SENP2, která desumoylací regulačního faktoru interferonu IRF3 snižuje interferonem- $\beta$  zprostředkovanou protivirovou odpověď a cílí IRF3 k degradaci (Ran, 2011). SENP2 negativně působí i na tvorbu tzv. Polycomb proteinů, z nichž některé vystupují jako E3 ligázy (Kang, 2010).

Na druhou stranu je potřeba uvést i pozitivní vliv těchto proteáz v protinádorové imunitě (Bawa-Khalfe, 2010).

Sumoylace, mimo jiné, konkuruje o lyzin na cílovém proteinu dalším možným modifikacím jako je ubiquitynlace (Kim, 2008), nebo acetylace (Wu S.-Y, 2009). Naopak fosforylace může sumoylaci pozitivně regulovat (Hietakangas, 2006).

Mezi proteiny a SUMO dochází navíc k nekovalentní vazbě prostřednictvím motivu SIM (SUMO interakční motiv), který je součástí některých proteinů (viz obr. 2A). Do SIM se mohou vázat sumoylované proteiny a touto cestou spolu interagovat (Lin, 2006).

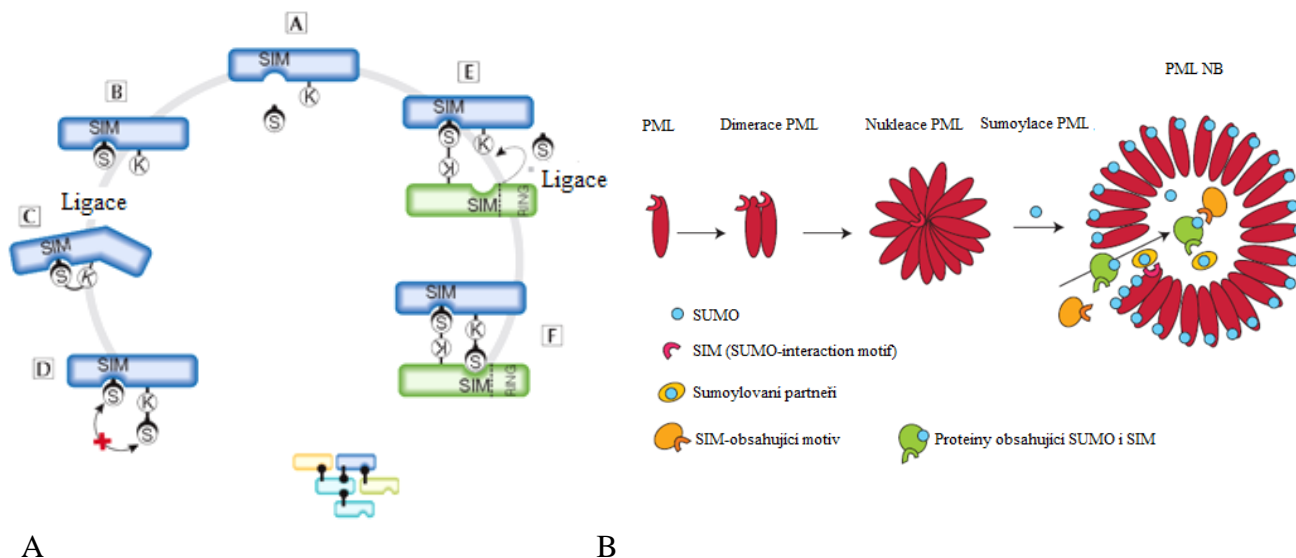
Sumoylace je ovlivněna i modifikací dalších komponent sumoylační dráhy, kdy např. fosforylace E3 ligázy PIAS $\alpha$  uvnitř SIM motivu způsobuje rozdílnou interakci mezi odlišnými typy SUMO proteinů (Hecker, 2006).

## 2.2. Sumoylace a buněčné interakce

V jádře se nachází struktury nazývané jako PML tělíska (PML NB) neboli tzv. nuclear domains 10 (jaderné struktury 10). Podílejí se na celé řadě buněčných pochodů a také stimulují antivirovou odpověď buňky. Proto se je některé viry snaží narušit (Regad, 2001). PML NB jsou tvořeny proteiny ovlivňujícími transkripci a buněčný cyklus, a to zejména proteiny PML (zprostředkovávají transport onkoproteinu Mdm2 do jádérka, kde nemůže negativně působit na p53 protein a cílit jej k degradaci; Bernardi, 2004), Daxx (jeho SIM motiv interaguje se sumoylovanými transkripčními faktory a dochází tak k represi transkripce; Lin, 2006), Sp100 (interferonem stimulovaný antigen blokující aktivitu virů; Tavalai, 2011) a p53 (tumor supresor a regulátor odpovědi na stres buňky; Karawajew, 2005). Předpokládá se, že tvorba těchto jaderných struktur je závislá na sumoylaci, kdy výše zmíněné proteiny schopné sumoylace a vzájemné interakce skrze sumoylované formy těchto proteinů a vlastní SIM motivy vedou ke vzniku PML NB - viz obr.2B (Shen T.H., 2006).

PML proteiny podporují sumoylaci různých buněčných proteinů a nedávná studie ukazuje, že někteří členové skupiny TRIM proteinů stejně jako PML, které do skupiny patří, vykazují E3 ligázovou aktivitu a efektivně modifikují p53 i Mdm2 (Chu, 2011). Zdá se, že sumoylace podporuje interakci mezi Mdm2 a PML proteiny, která negativně působí na funkci koaktivátora transkripce CBP, a jež je doprovázena exportem PML z jádra (Wei, 2003). Specifická lokalizace peptidázy SENP2, případně SENP3, a sumoylované formy Mdm2 uvnitř PML NB vede k desumoylaci tohoto proteinu a jeho asociaci s p53 vedoucí k degradaci p53 a utlumení transkripce závislé na p53 (Jiang, 2011; Nishida, 2011). Transformaci buněk při nádorovém bujení lze řídit pomocí interakce mezi onkoproteinem, který podporuje vazbu mezi Ubc9/SUMO, kdy dochází ke zvýšení sumolace Mdm2 a následně skrze Mdm2 zprostředkované ubiquitin závislé degradaci regulačního p53 (Ding, 2012).





Obr. 2A: Interakce SIM motivu. A: Protein obsahující SIM doménu a potenciálně sumoylovatelný lyzin (K). B: Vazba SUMO (S) do SIM. C: Interakce navázaného SUMO v SIM s K téhož proteinu. D: Tato vazba může být regulována přímou sumoylací K. E: Do SIM motivu se váže sumoylovaný protein. F: Posílení této asociace proteinů další SUMO zprostředkovanou interakcí. Upraveno dle Kerscher, 2007.

Obr.2B: Model formování PML tělísek (PML NB). SIM motiv obsahující PML protein postupně polymerizuje a následně je sumoylován. Prostřednictvím navázaných SUMO a SIM motivů interagují různé proteiny společně za vzniku PML NB. Upraveno dle Lallemand-Breitenbach, 2010.

Čtyři známé lidské typy SUMO proteinů jsou kódovány na odlišných místech lidského genomu (Su, 2002; Bohren, 2004) a na potenciálně cílové proteiny se váží s různou afinitou (Saitoh, 2000) dle míry preferencí k okolní sekvenci lyzinu (Schwamborn, 2008) a míry sekvenční homologie (Bohren, 2004). SUMO se váže na transkripční regulační proteiny, které ovlivňují kondenzaci chromatinu (Kitchen, 2010). Samotné SUMO-1 se nachází v oblasti mitotického vřeténka, zatímco SUMO-2/3 v oblasti centromery a kondenzovaného chromatinu (Zhang, 2008). Málo prozkoumaný SUMO-4 se vyskytuje především v buňkách ledvin a mutovaná forma genu (záměna methioninu za valin v pozici 55) se u asijské části populace spojuje s onemocněním diabetes mellitus I a II (Bohren, 2004; Noso, 2007).

### 3. SUMOYLACE Z HLEDISKA VYBRANÝCH VIRŮ REPLIKUJÍCÍCH SE V BUNĚČNÉM JÁDŘE

Následující část se věnuje vlivu sumoylace na cyklus vybraných virů nejen skrz přímou asociaci virových proteinů se SUMO, ale i úrovni buněčné sumoylace. Mezi vybrané jsem zařadila reprezentanty DNA i RNA virů, které jsou ve vztahu k sumoylaci nejvíce studovány. Jedná se o zástupce adenovirů, herpesvirů a papilomavirů, dále virus Influenza A a retroviry.

### 3.1. Adenoviridae

Viry čeledi Adenoviridae mají neobalené ikosahedrální kapsidy obsahující virový genom v podobě lineární dsDNA. Do buňky se viriony dostávají receptorem zprostředkovanou endocytózou. Částečně rozvolněné virové částice se přesouvají k jádru po mikrotubulech pomocí molekulárního motoru dyneinu (Bremner, 2009). Do jádra vstupuje za spolupráce buněčných proteinů jaderným pórem virová DNA (Strunze, 2011). Zde probíhá transkripce a to ve dvou fázích - časná a pozdní. V časná fázi se tvoří proteiny, které ovlivňují cyklus buňky, její antivirovou obranu, a které se podílejí na replikaci viru, včetně virem kódované DNA polymerázy. V pozdní fázi transkripce se tvoří strukturální proteiny důležité pro morfogenezi virionů. V jádře dochází i k maturaci virionů, které se uvolňují po smrti buňky (Knipe a Howley, Fields Virology, 2007, str. 2355-2377).

Efekt sumoylace na infekční cyklus adenovirů je zkoumán na dvou virových proteinech. Jedním z nich je časný protein E1B 55kDa lidského adenoviru typu 5. Druhým cílem bádání se stal časný protein Gam1 ptačího adenoviru CELO (chicken embryo lethal orphan virus).

#### 3.1.1. Časný protein E1B 55kDa lidského adenoviru 5

Časný protein E1B 55kDa stimuluje v časná fázi infekce represi apoptózy, programované buněčné smrti, asociací s buněčným regulačním proteinem p53. Potlačení transkripce závislé na p53 prostřednictvím E1B 55kDa se týká především genů pro antivirovou obranu (Miller, 2009). Vedle toho E1B 55kDa spolu s časným proteinem E4 Orf6 a buněčnými proteiny tvoří komplex vystupující jako ubiquitin E3 ligáza, která vazbou ubiquitinu cílí protein p53 k degradaci do proteazomu (Querido, 2001). K proteazomální degradaci je prostřednictvím E1B 55kDa, tentokát nezávisle na časném E4 Orf6, směřován i buněčný protein Daxx (Schreiner, 2010), který jako součást komplexu PML tělísek stimuluje apoptózu (Khelifi, 2005). Daxx blokuje časnou fázi replikace inhibicí transkripce časných proteinů na rozdíl od pozdní fáze infekce, kde jeho negativní vliv nebyl pozorován (Schreiner, 2010).

Protein E1B 55kDa spolu s E4 Orf6 mimo jiné usnadňuje vstup do pozdní fáze virového replikačního cyklu selektivním exportem virových pozdních mRNA z jádra (Gonzalez, 2006). Jaderný exportní signál NES, který oba proteiny obsahují, je rozeznáván buněčným proteinem Crm1, který zprostředkovává export z jádra a který je inhibován leptomycinem B. V přítomnosti leptomycinu B se protein E1B 55kDa obsahující NES motiv akumuluje v jádře (Krätzer, 2000; Weigel, 2000). Pozdější studie překvapivě ukazuje, že i přesto NES motivy těchto proteinů na export virových pozdních mRNA a replikaci viru nemají podstatný vliv (Schmid, 2011).

Časný protein E1B 55kDa je sám sumoylován na lyzinu 104 v sekvenci VKRE odpovídající motivu  $\psi$ KxE - konsensu pro SUMO. Znemožnění sumoylace tohoto lyzinu snižuje schopnost

proteinu E1B 55kDa transformovat buňky spolu s časným proteinem E1A a inhibovat p53 zprostředkovanou transaktivaci. Klíčový pro sumoylaci není jen lyzin 104, ale i jemu předcházející valin. E1B 55kDa se nachází uvnitř cytoplasmatických tělísek, zatímco v přítomnosti SUMO-1 se nachází v jaderných strukturách (Endter, 2001).

E1B 55kDa figuruje jak v procesu sumoylace (Muller, 2008), tak ubiquitylaci jiných proteinů (Querido, 2001). Bez vlivu dalších virových proteinů podporuje sumoylaci lyzinu 386 proteinu p53. Tato sumoylace je patrně specifická pro p53, neboť v přítomnosti E1 55kDa není sumoylován regulační protein buněčného cyklu - pRb (Muller, 2008). Je-li E1B 55kDa mutován v lyzinu 104, je jeho schopnost indukovat vazbu SUMO/p53 snížena, což koreluje s nemožností vstupu této formy do jádra (Endter, 2001). Význam schopnosti sumoylace p53 virovým proteinem rozšiřuje následná studie, kde *in vitro* E1B 55kDa vystupuje jako SUMO E3 ligáza proteinu p53 (Pennella, 2010). Zde sumoylovaná forma p53 interaguje s PML tělísky a poté je exportována z jádra. Transkripce závislá na p53 je inhibována sumoylací p53 prostřednictvím E1B 55kDa. K účinné vazbě dochází mezi dimerem E1B 55kDa, který se váže na N konce molekul p53 tvořících tetramery. Souběžná studie podporuje asociaci E1B 55kDa s PML NB, neboť ukazuje jeho přímou interakci s různými formami PML proteinů. Interakce s typem PML IV, který zvyšuje umístění časného virového proteinu do PML tělísek, je podporována sumoylací E1B 55kDa (Wimmer, 2010). Představu potvrzují i výsledky starší práce poukazující na negativní vliv časného proteinu E4 Orf6, který sumoylaci E1B 55kDa brání, zatímco v nepřítomnosti E4 Orf6 interaguje E1B 55kDa s PML proteiny (Lethbridge, 2003).

Mutované formy E1B 55kDa, které nejsou schopné vázat Daxx, ztratily nejen schopnost degradovat Daxx, ale i transformovat buňky. Jedna z dosud nepotvrzených hypotéz je ta, ve které sumoylace E1B 55kDa vystupuje jako nezbytný krok v transformaci buněk a kde je degradace Daxx závislá na sumoylované formě E1B 55kDa (Schreiner, 2011).

Sumoylace E1B 55kDa vystupuje jako regulátor jaderného importu a přesunu na specifická místa v jádře, a také podporuje onkogenní potenciál E1B. Využitím sumoylace protein E1B 55kDa účinně narušuje buněčnou regulaci na různých úrovních. Virus aktivitu E1B 55kDa nejspíše sám reguluje prostřednictvím E4 Orf6.

### 3.1.2. Časný protein Gam1 ptačího adenoviru CELO

Kompletní sekvence genomu ptačího adenoviru CELO (chicken embryo lethal orphan virus) ukazuje na homologii s genomem lidského adenoviru 5 kromě koncových úseků genomu. Genom CELO viru nekóduje sekvence typické pro časné geny adenoviru 5, jako jsou geny pro časné proteiny E1, E3 a E4 (Chiocca, 1996). Na základě prvotních studií časný genový produkt Gam1 zkoumaný v primárních lidských fibroblastech vystupoval jako funkční homolog časného proteinu

E1B 19 kDa adenoviru 5, který blokuje aktivaci apoptózy (Chen, 1995). Přispívá k tomu fakt, že Gam1 blokuje signalizaci faktoru nádorové nekrózy- $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ ; TNF- $\alpha$ ), který se účastní aktivace apoptózy (Chiocca, 1997). Protein Gam1 blokuje také deacetylaci histonů přímou interakcí s histon deacetylázou HDAC1. Pro interakci je podstatných prvních 53 aminokyselin proteinu HDAC1, což zahrnuje oblast dimerizace a enzymatickou aktivitu HDAC (Luo, 2009). Předpokládá se, že prostřednictvím tohoto vlivu na úroveň acetylace, dochází ke zvýšené transkripci z různých promotorů pozorované při zvýšené hladině Gam-1 (Chiocca, 2002). Potlačení HDAC aktivity vede ke snížení antivirové odpovědi buňky (Shestakova, 2001). HDAC1 obsahuje dva konsenzus motivy pro SUMO a v přítomnosti Gam1 se sumoylované formy HDAC1 nevytvářejí. Inhibiční efekt Gam1 na HDAC je i přesto nejasný, neboť sumoylace HDAC nemá patrně na funkci HDAC vliv. Inhibitor HDAC, látka trichostatin A, má obdobný pozitivní vliv na replikaci viru jako jeho časný protein Gam1. Působení trichostatinu A na buňky infikované virem, který není schopný produkovat protein Gam-1, ruší defekt ve virové replikaci (Colombo, 2002). V přítomnosti Gam1 klesá celkové množství sumoylovaných proteinů v buňce a dochází k úbytku PML NB a proteinu Daxx v jádře. Nezávisle na PML proteinech dochází k přemístění SUMO-1 do cytoplasmy (Colombo, 2002).

Proč v přítomnosti jaderně umístěného Gam1 proteinu (Chiocca, 1997) klesá celkové množství sumoylovaných proteinů v buňce (Colombo, 2002)? Gam1 přímo interaguje s aktivačním enzymem E1 a blokuje tvorbu SUMO-E1 vazby. Gam1 v procesu sumoylace nevystupuje jako SUMO proteáza, ani nesoutěží o SUMO s ostatními proteiny, ale patrně inhibuje aktivitu E1 enzymu. Tuto hypotézu podporuje i fakt, že již vytvořené komplexy SUMO-E1 nejsou přítomností Gam1 proteinu ovlivněny (Boggio, 2004). Potlačení sumoylace zvyšuje náchylnost buněk k apoptóze (Wu, 2007). V přítomnosti Gam1 je pozorován i úbytek samotných podjednotek aktivačního enzymu E1, tedy SAE1 a SAE2, stejně jako Ubc9 proteinu, bez vlivu na degradaci jejich mRNA (Boggio, 2004; Boggio, 2007). Gam1 tedy vystupuje jako inhibitor E1 a blokuje sumoylaci *de novo*. Domněnku, že Gam1 zprostředkovává degradaci těchto proteinů v proteazomu, podporuje fakt, že inhibitor proteazomální degradace látka MG132 má pozitivní vliv na přítomnost těchto proteinů (Boggio, 2004). Na C konci obsahuje Gam1 tzv. SOCS doménu (suppressor of cytokine signalling), kterou interaguje s buněčnými proteiny. Vytváří také komplex E3 ubiquitin ligázy (Boggio 2007), obdobný jako je E1B 55kDa/E4 Orf6 lidského adenoviru 5 (viz výše). Důležitá je hydrofobní část SOCS motivu, který mimo jiné obsahuje BC-box vázající komplex elonginu B a C a který se nachází i u časného proteinu E4 Orf6 a je vyžadován pro E3 ubiquitin ligázovou aktivitu (Blanchette, 2004). Degradace SAE1 a SAE2 závisí na jejich ubiquitylaci a protein Gam1 je cílí k tomuto komplexu. Aktivace transkripce některých promotorů je inhibována sumoylací určitých transkripčních aktivátorů. Sumoylace transkripčního faktoru SP3 vede k blokaci jeho aktivity. Virový protein Gam1

interakcí s E1 aktivačním enzymem sumoylaci SP3 znemožňuje a indukuje tak na SP3 závislou transkripci (Boggio, 2004). Transkripční faktor SP3 podporuje expresi regulačního proteinu SOCS3 (Ehltng, 2005), který inhibuje JAK-STAT signalizaci, jež vystupuje jako prostředník v přenosu signálu do jádra a zahájení transkripce genů (O'Shea, 2002). Poškození této signalizace vede k negativnímu vlivu na imunitní odpověď buňky (Minegishi, 2009). Inhibicí sumoylace proteinů může být vysvětlena i pozorovaná degradace PML NB jako sekundární efekt tohoto jevu.

Bylo pozorováno, že v již transformovaných buňkách nepůsobí Gam1 proti apoptóze, ale naopak ji může podporovat (Wu, 2007).

Gam1 potlačuje buněčný růst nejen blokováním sumoylace proteinů (Boggio, 2004), ale i prostřednictvím aktivace kaspáz, což koreluje se zvýšenou úmrtností buněk (Wu, 2007). Působením inhibitoru kaspáz tento efekt Gam1 mizí. Virový protein je schopný podporovat funkce kaspázy 3 a zvyšuje citlivost buňky nejen na poškození způsobené UV zářením, ale i k účinku chemických látek používaných při léčbě (Wu, 2007).

Gam1 zasahuje a účinně potlačuje proces sumoylace proteinů již od vlastního počátku aktivace sumoylační dráhy. Tato interakce negativně působí na různorodé složky buňky a přispívá ke zvýšené infekčnosti viru.

### **3.2. Virus Epstein-Barrové**

Virus Epstein-Barrové (EBV) patří do čeledi Herpesviridae. Je to obalený virus, jehož genomem je dsDNA. Jeho virion se skládá z několika desítek proteinů a oblast mezi ikosahedrální kapsidou a obalem je vyplněna tegumentem (Johannsen, 2004). Receptorem zprostředkovanou fúzí se virus dostává do buněk, kde se kapsida rozvolní a lineární DNA vstupuje do jádra, kde cirkularizuje. Obecně jsou herpesviry viry schopny navodit latentní a lytickou fázi. V latentní fázi se genom virů v buňce udržuje v podobě episomů v jádře a při buněčném dělení je distribuován do dceřiných buněk. Lytický cyklus, který končí smrtí hostitelské buňky, začíná expresí tzv. bezprostředně časných proteinů. Ty vystupují jako transaktivátory časných genů. Po translaci se časné proteiny vrací zpět do jádra, kde dochází k replikaci virové DNA a přepisu pozdních genů. Lineární DNA je enkapsidována v jádře a kapsidy se obalují jadernou membránou. Toto platí i pro níže diskutovaný cytomegalovirus (viz kap. 3.3.).

Genom EBV je v latentní fázi replikován z oriP, a v lytické fázi ze dvou oriLyt. Geny latentní fáze kódují mimo jiné i šest jaderných antigenů EBNA a dva latentní membránové proteiny LMP, jež stimulují růst buněk a působí proti apoptóze (Cancian, 2011). Pro přechod do lytické fáze je nezbytný bezprostředně časný protein EB1 kódovaný Zta genem, který stimuluje transkripci vlastního genu a genu pro bezprostředně časný protein Rta vazbou na příslušné promotory (Heather, 2009; Chen, 2009a). EB1 se váže na promotor časného genu BMRF1 a stimuluje jeho transkripci.

Produkt tohoto transkriptu (DNA polymerase processivity factor BMRF1) zvyšuje aktivitu katalytické podjednotky virové DNA polymerázy (Tsurumi, 1994).

### 3.2.1. Bezprostředně časné proteiny EB1 a Rta v počáteční fázi lytického cyklu

Bezprostředně časný protein EB1 efektivně narušuje PML tělíska (PML NB) v lytické fázi replikace, v korelaci se ztrátou sumoylovaných forem PML. Pro rozptýlení PML NB je důležitých prvních 86 aminokyselin transaktivační domény EB1. V transfekovaných buňkách produkující protein EB1 byla detekována ztráta SUMO/PML. Deficit je způsoben soutěží o SUMO-1 mezi EB1 a PML, kdy se v přítomnosti EB1 snižuje množství SUMO/PML. Nicméně sumoylace EB1 není příčinou narušení PML NB (Adamson, 2001). V buňkách obsahujících EB1 se zároveň nachází vyšší hladina PML proteinů (Bowling, 2006). Množství EB1 koreluje se zvyšováním hladiny PML proteinů, ale i s mírou rozptýlení PML NB (Adamson, 2001). Zdá se, že EB1 stabilizuje PML protein přímou interakcí (Bowling, 2006). Zvýšení proteinů PML v důsledku exprese EB1 navíc doprovází zvýšené množství různých izoform PML. Tato téměř lineární korelace zaniká v buňkách exprimujících antivirový glykoprotein - interferon  $\beta$  (IFN- $\beta$ ), kdy při zvyšování hladiny EB1 nedochází k rozptýlení PML NB. INF- $\beta$  je schopný aktivovat expresi PML proteinů (Vannucchi, 2000) a zvýšená úroveň PML potlačuje nepříznivé působení EB1. Přitom nebyl zaznamenán žádný negativní vliv INF- $\beta$  na expresi genu BMRF1, a ani EB1 neblokuje INF- $\beta$  zprostředkovanou aktivaci PML (Bowling, 2006). Buňky však neprodukují dostatečné množství IFN- $\beta$  k naprosté prevenci narušení PML NB. Navíc EB1 blokuje transkripci proteinů IRF3 a IRF7 (vystupují jako regulační proteiny interferonové obrany), čímž snižuje aktivaci INF- $\beta$  odpovědi a antivirové odpovědi buňky (Bentz, 2010). Destabilizace PML NB zprostředkovaná EB1 neovlivňuje prezentaci MHC I, avšak mění expresi p21 (regulace buněčného cyklu) a A20 (potlačení indukce apoptózy) (Bowling, 2006).

Sumoylace EB1 probíhá na lyzinu 12 v sekvenci DVKFT, přesto testy naznačují přítomnost dalších sumoylovaných forem EB1 (Adamson, 2001; Hagemeyer, 2010). Význam sumoylace pro funkci EB1, případně virovou replikaci, byl neznámý a přisuzoval se zvýšené stabilitě, lokalizaci EB1 s PML proteiny, případně narušení funkcí buněčných proteinů, kteří soutěží s EB1 o SUMO-1 (Adamson, 2001). Odpovědi přinesla až další studie pod vedením Adamsona. Ta ukázala, že sumoylace EB1 nemá vliv na jeho stabilitu ani na lokalizaci v buňce. Překvapivým zjištěním studie bylo pozorování o 16-krát silnější aktivace exprese z BMRF1 promotoru mutovanou formou EB1 (neschopnou sumoylace) v porovnání s kontrolou. Sumoylace EB1 snižuje jeho schopnost transaktivovat virové promotory genů pro BMRF1, bezprostředně časný Rta protein (Adamson, 2005) a ssDNA vazebný protein (Murata, 2010). Přesto paradoxně podporuje přechod do lytické fáze. Na druhou stranu samotný SUMO-1 přechod z latence nepodporuje, a zvýšená tvorba BMRF1 produktu není závislá na sumoylaci lyzinu 12 proteinu EB1. Sumoylace tak nejspíše ovlivňuje interakci EB1

s transkripčními faktory, nebo mění jeho DNA vazebné schopnosti. Avšak v infikované buňce se neexprimuje EB1 sám a společná transfekce EB1 a Rta ve výsledku exprese genu BMRF1 slabě zvyšuje. V rámci této studie se objevila možnost sumoylace produktu genu BMRF1. Modifikovaný produkt může být více stabilní, akumulovat se, a jeho množství se tak bude zvyšovat bez závislosti na EB1 (Adamson, 2005).

Protein EB1 je modifikován nejen SUMO-1, ale i SUMO-2/3. Peptidázy SENP1 a SENP2 tuto vazbu zcela ruší a desumoylace EB1 podporuje jeho transkripční funkci a transkripci virového genomu (Hagemeier, 2010; Murata, 2010).

EB1 aktivuje expresi virových genů interakcí s transkripčním koaktivátorem CBP (Creb binding protein) (Adamson, 1999). SUMO/EB1 oslabuje interakci CBP s histon deacetylázou a hladina SUMO/EB1 pozitivně koreluje s indukcí lytického cyklu (Murata, 2010). Muratova studie ukazuje, že se preferenčně na sumoylovanou formu EB1 váží histon deacetylázy HDAC3 a HDAC7 a negativní vliv sumoylace na EB1 souvisí právě s touto interakcí. Trichostatin A, který se používá k indukcii lytické cyklu EBV, je inhibitorem histon deacetyláz, které snižují úroveň acetylace histonů obecně spojenou s inhibicí transkripce (Han, 2007). Trichostatin A v transfekovaných buňkách ruší negativní působení sumoylace na EB1. Inhibice transkripce sumoylací EB1 je zprostředkována HDAC, nicméně vazba SUMO/EB1 na cílové promotory není potlačena HDAC (Murata, 2010). Sumoylací zprostředkovaná acetylace chromatinu tak ovlivňuje na EB1 závislou transkripci. Sumoylace není závislá na fosforylaci EB1 a záměna treoninu v pozici 14, který je *in vivo* silně fosforylován (El-Guindy, 2006), úroveň sumoylace EB1 nemění (Hagemeier, 2010; Murata, 2010).

Genom viru EBV kóduje vlastní protein kinázu (PK), která přímo fosforyluje serin 209 proteinu EB1 a inhibuje transkripci EB1 (Asai, 2009). Bylo zjištěno, že exprese PK výrazně snižuje sumoylací EB1, a díky tomu, prostřednictvím EB1, zvyšuje transkripci Rta a celkově podporuje přechod do lytické fáze (Hagemeier, 2010). Mechanismus vlivu PK na EB1 není znám. Fosforylace serinu v pozici 209 sumoylací EB1 neovlivňuje. Na sumoylací buněčných proteinů PK nepůsobí. Nedávná studie ukázala, že PK obsahuje dva SIM motivy a narušení PML tělísek prostřednictvím PK závisí na její interakci se SUMO (Li, 2012). Studie Hagemeiera poukazuje na nízké množství detekovaného sumoylovaného EB1 a také na skutečnost, že SUMO E3 ligáza EB1 nebyla dosud nalezena (Hagemeier, 2010). Strukturální homolog EB1 u příbuzného lidského herpesviru 8 vystupuje jako SUMO E3 ligáza a prostřednictvím SIM motivu specificky váže SUMO-2/3 (Chang, 2010).

Bezprostředně časný protein Rta inhibuje tvorbu regulačních proteinů buněčného cyklu p53 a pRb a podílí se na indukcii smrti buňky (Chen, 2009b; Guo, 2011). Nemodifikovaná forma zaujímá rovnoměrné rozmístění v cytoplasmě a v jádře se shlukuje do bodových útvarů „dots“ (angl. bod). Spolu s Ubc9 se nachází i na jaderné membráně, a s PIAS1 navíc i uvnitř jádra. SUMO-1, které je v

cytoplasmě i v jádře, tvoří spolu s Rta rozsáhlé bodové útvary „large dots“. Rta neobsahuje typickou sekvenci pro kovalentní vazbu SUMO -  $\psi$ KXE. Tento replikační a transkripční aktivátor je nejspíše polysumoylován a to v pozicích K19, K213 a K517. *In vitro* i *in vivo* v linii buněk 293T a P3HR1 interaguje Rta s Ubc9, PIAS1 a SUMO. Zvýšená exprese těchto proteinů zvyšuje schopnost Rta aktivovat transkripci prostřednictvím sekvence RRE (Rta responsive element) (Chang, 2004).

V oblasti aminokyselin 255-415 obsahuje Rta vazebné místo pro PIAS1. Rta interaguje s dalšími druhy - PIAS $\alpha$  a PIAS $\beta$ , které stejně jako PIAS1 vystupují jako SUMO E3 ligázy. Mutované formy PIAS1 *in vitro* nestimulovaly sumoylaci Rta. Pro zvýšení transaktivační schopnosti Rta je PIAS1 nezbytná (Chang, 2004). Rta s ligázou PIAS $\alpha$  umisťuje do jádra, zatímco s PIAS $\beta$  lokalizuje v jaderné membráně. Oba typy těchto PIAS zvyšují sumoylaci Rta a jeho vazbu na virové promotory a na buněčný promotor genu pro protein p21 (Liu, 2006).

*In vivo* v P3HR1 buňkách se nachází spolu s Rta v jaderných “dots” i buněčný protein RanBPM. Tento protein se účastní jaderného transportu a v závislosti na poškození DNA vystupuje jako aktivátor apoptózy (Atabakhsh, 2009). V přítomnosti RanBPM se zvyšuje sumoylace Rta i jeho transaktivační funkce. RanBPM interaguje s Ubc9 a může vystupovat jako SUMO E3 ligáza, inhibovat SUMO proteázy, či stabilizovat Rta. Indukce lytického cyklu viru může být zprostředkována i vlivem RanBPM na expresi Rta (Chang, 2008). Vstup do lytické fáze zprostředkovaný sumoylací Rta zachytila již dřívější práce Adamsona, která na rozdíl od skupiny Changa detekovala zanedbatelný vliv sumoylace Rta na transkripci produktu BMRF1 genu (Adamson, 2005).

Nedávné studie však hypotézu o tom, že sumoylace proteinu Rta zvyšuje jeho transkripčně aktivační funkci, nepodporují. Vychází z pozorované interakce mezi virovým proteinem LF2 a Rta. Obalový protein LF2 blokuje regulační funkci IRF7 a jím zprostředkovanou odpověď interferonu alfa (Wu L., 2009). Protein LF2 potlačuje prostřednictvím Rta navozenou lytickou fázi replikace viru, neboť se přímo váže na promotory obsahující RRE sekvence (Calderwood, 2008). Dále LF2 preferenčně stimuluje sumoylaci Rta proteiny SUMO-2/3, kdy dochází k akumulaci SUMO/Rta komplexů v buňce. Sumoylace Rta zprostředkovaná proteinem LF2, která se odehrává na čtyřech lyzinech (426, 446, 517, 530) aktivační domény Rta, není přítom pro inhibici přechodu do lytické fáze replikace důležitá (Heilmann, 2010). Tyto studie předkládají hypotézu, že sumoylovaná forma Rta vystupuje představením doklad LF2 zprostředkované represe vstupu do lytické fáze replikace viru.

Výše uvedené závěry různých studií poukazují na důležitost ostatních virových proteinů, které mění efekt a význam sumoylace, a tím i vliv na replikační cyklus viru. Sumoylace samotného E1B brání vstupu do lytické fáze, avšak v přítomnosti Rta tento negativní efekt mizí. Obdobně sumoylace samotného Rta, která přechod z latentní fáze podporuje, se v přítomnosti LF2 jeví jako neutrální.



### 3.2.2. Proteiny latentní fáze, jaderné antigeny EBNA a latentní membránový protein LMP1

Možnost sumoylace jaderného antigenu EBNA-3C zmiňuje studie zabývající se aktivací transkripce genu pro latentní membránový protein LMP1 (Lin, 2002). Protein EBNA-3C podporuje přechod latentně infikovaných buněk do S fáze buněčného cyklu blokováním na ubiquitinu závislé proteozomální degradace buněčného regulátoru cyklinu D1 (Saha, 2011), a interaguje s faktory nezbytnými pro růst lymfoblastoidních buněk (Calderwood, 2011). Spolu s jaderným antigenem EBNA-2 se účastní aktivace promotoru genu pro LMP1. Oblast aminokyselin 365-545 EBNA-3C je důležitá nejen pro vazbu SUMO-1/2/3, ale i pro aktivaci promotoru genu pro LMP1 (Lin, 2002; Rosendorff, 2004). Sumoylace je podstatná pro jadernou lokalizaci proteinu EBNA-3C (Rosendorff, 2004). Přestože EBNA-3C neobsahuje typický konsensus  $\psi$ KXE pro vazbu SUMO (stejně jako EBNA-2) a konjugované formy SUMO-1/EBNA-3C nebyly detekovány, zvyšuje přítomnost EBNA-3C akumulaci SUMO-1 v buňce. Přesto se zdá, že sumoylace neovlivňuje EBNA-3C zprostředkovanou koaktivaci LMP1 promotoru (Lin, 2002; Rosendorff, 2004). Koaktivační doména EBNA-3C kóduje sekvenci aminokyselin 507-DDDVIEVID-515, která je homologní se sekvencí proteinu SUMO (viz obr. 3). Právě DVIEV sekvence je důležitá pro vazbu SUMO-1/Ubc9, nicméně EBNA-3C s Ubc9 přímo neinteraguje. Substituce aminokyselin v této oblasti (E3 Cm1, E3 Cm2; obr. 3) snižuje nejen zprostředkovanou aktivaci transkripce LPM1, ale i úroveň sumoylace. Vazebná doména pro SUMO je důležitá pro vazbu transkripčního koaktivátoru p300, která nezávisí na sumoylaci p300 (Rosendorff, 2004).

SUMO1	E84	E	D	V	I	E	V	Y	Q92
SUMO3	D79	E	D	T	I	D	V	Y	F87
E3C	D507	<u>D</u>	<u>D</u>	<u>V</u>	<u>I</u>	<u>E</u>	<u>V</u>	<u>I</u>	<u>D</u> 515
E3Cm1	A	A	A	V	I	E	V	I	D
E3Cm2	D	D	A	V	I	A	V	I	A

Obr.3: Analogie sekvencí mezi lidského SUMO-1,3 a B95.8 izolátu EBNA-3C (zde E3C). Pořadí aminokyselin 509-513EBNA-3C je identické s aminokyselinami v pozici 86-90 SUMO-1. Podtržené aminokyseliny značí konzervované oblasti EBNA-3C mezi herpesvirem paviána a člověka. Substituované formy E3 Cm1, E3 Cm2. Upraveno dle Rosendorff, 2004.

EBNA-3C nejspíše reguluje aktivitu EBNA-2 tím, že vyvazuje sumoylované represory (Girdwood,2003) a podporuje pozitivní efekt transkripčních koaktivátorů p300/CBP na EBNA2 (Wang, 2000). Jiná teorie spatřuje přínos EBNA-3C v jeho akumulaci na LPM1 promotoru a koaktivaci transkripce prostřednictvím interakcí se sumoylovanými proteiny (Rosendorff, 2004). Mimo jiné, zvýšená exprese EBNA-3C narušuje PML tělíska. Protein EBNA-3C možná zprostředkovává desumoylaci či degradaci PML, a je případně schopný nahrazovat funkce EBNA-LP, který ovlivňuje umístění Sp100 proteinů, které jsou také součástí PML tělísek (Echendu, 2008).

Také komplexy SUMO/EBNA-2 nebyly přímo detekovány. Pouze záměna lyzinu v pozici 480 za arginin z celkově šesti lyzinů EBNA-2 přemísťuje protein do cytoplasmy a snižuje jeho transaktivační funkci na promotoru LMP1 o 30% (Hille, 2002). Zvýšená exprese SUMO-1,

SUMO-3 a Ubc9 spolu s EBNA-2 aktivují LMP1 promotor (Rosendorff, 2004).

Sám zmiňovaný latentní membránový protein LMP1 váže Ubc9 a vazba zesiluje jeho onkogenní potenciál. Exprese LMP1 zvyšuje množství sumoylovaných buněčných proteinů (Bentz, 2011).

### 3.3. Lidský cytomegalovirus

Lidský cytomegalovirus (HCMV) se rovněž řadí do čeledi Herpesviridae. Jeho životní cyklus je obdobný jako u viru EBV, a proto jej nebudu znovu popisovat (viz kap. 3.2). Bezprostředně časné (IE) proteiny fungují jako transaktivátory dalších virových proteinů. V práci se zaměřím na dva z nich. Jedná se o multifunkční proteiny IE72 (IE1) a IE286 (IE2). Tyto fosfoproteiny se snaží narušit buněčný cyklus interakcí s hostitelskými proteiny, jako jsou p53 nebo Mdm2 (Zhang, 2006; Hwang E.-S., 2009). První z nich narušuje PML tělíska (Lee, 2007); druhý je nezbytný pro expresi virových genů (Barrassa, 2005). Vliv obou proteinů byl prokázán i na cyklus viru HIV v buňkách infikovaných oběma viry (Walker, 1992; Dal Monte, 1997). Dále se krátce zmíním i o sumoylaci pozdního obalového proteinu pp71.

#### 3.3.1. Bezprostředně časné proteiny IE1 a IE2

První zmínka o sumoylaci IE1 pochází z práce, která se věnuje vlivu IE1 na narušování asociace mezi proteiny Sp100, PML a SUMO-1 v PML tělíscích (PML NB). Protein IE1 již několik hodin po infekci, ještě před expresí IE2, poškozuje PML NB, a též inhibuje transkripční represi zprostředkovanou PML (Müller, 1999). Tato schopnost nezávisí na vazbě SUMO/IE1, která neovlivňuje ani jeho cílení do jádra. Sumoylace IE1 se odehrává na lyzinu 450 (K450) konsenzuální sekvence VKSE (Xu, 2001). Pro sumoylaci IE1 jsou zřejmě důležité i další aminokyseliny v řetězci (Lee, 2004a). Další práce zabývající se sumoylací IE1 dochází k závěru, že modifikace K450 neovlivňuje jeho schopnost narušovat struktury PML NB, replikaci viru, ani stabilitu samotného IE1 proteinu. Poukazuje na možné negativní působení mezi sumoylací a fosforylací IE1 (Spengler, 2002). Souběžná studie naopak vliv fosforylace IE1 a IE2 na sumoylaci nepotvrzuje (Heider, 2002).

Studie pod vedením Nevelsa rozvíjí výše zmíněné výsledky, kde SUMO/IE1 neovlivňuje distribuci IE1 v buňce, struktury PML NB, ani aktivaci virových, případně buněčných promotorů. Mutantní virus, ve kterém IE1 není sumoylován v pozici K450, roste pomaleji a infikuje menší množství fibroblastů než nezměněný HCMV. Příčina defektního růstu ale tkví v nedostatečném množství IE2 proteinu, jehož snížené množství bylo detekováno, a je v souladu s pozorováním závislosti mezi zvyšujícím se množstvím SUMO/IE1 a akumulací IE2 v buňce. Vazba SUMO/IE1 není přímo nezbytná pro replikaci v lytické fázi, ale pozitivně působí na plnou funkci IE1, a tím účinnější infekci HCMV ve fibroblastech (Nevels, 2004).

Zajímavá je potenciální schopnost IE1 poškozovat PML NB hostitelské buňky prostřednictvím asociace SUMO a PML proteinů, a to ne jejich cílením k degradaci do proteazomu. IE1 brání akumulaci SUMO/PML v buňkách infikovaných HCMV prostřednictvím desumoylace PML. Protein IE1 narušuje PML NB a blokuje sumoylaci proteinů PML a Sp100. Záměna leucinu v pozici 174 za prolin má na tyto funkce IE1 negativní efekt (Müller, 1999), na rozdíl od záměny K450, kde je ponechána schopnost ovlivňovat PML NB a účinně působit desumoylaci PML (Lee, 2004a). Virus obsahující delecí aminokyselin 290-320 v rámci IE1 (IE1(290-320)) nebyl infekční na rozdíl od genu se záměnou K450 za arginin. Desumoylace PML a narušení PML NB jsou v souladu s defektní funkcí proteinu PML jako represoru transkripce, a transaktivací buněčných a virových promotorů. Pro interakci s PML i desumoylaci se jeví jako nezbytná hydrofobní část C konce IE1. Zkrácená forma IE1 (1-420 aminokyselin) se váže na PML dvakrát až třikrát silněji než celý řetězec IE1, což naznačuje inhibiční funkci C koncové domény IE1 (Lee, 2004a).

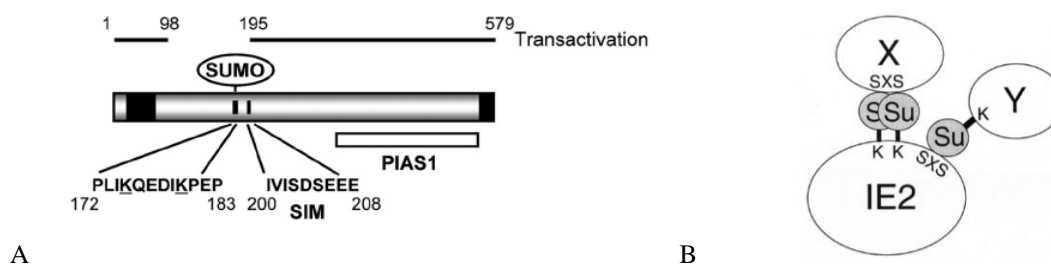
Přesná interakce IE1 - PML není zcela jasná. Představa kompetice o protein SUMO mezi IE1 a PML je patrně nesprávná (Xu, 2001), jak bylo zjištěno detekcí stejného množství SUMO-IE1 u delecí formy IE1 (290-320) jako u nemutované formy (Lee, 2004a; Nevels, 2004). Komplex IE1-PML může být cílem proteáz SUMO, či IE1 interaguje s proteiny odpovědnými za desumoylaci. Protein IE1 může ovlivňovat fosforylaci PML, kdy sám vystupuje jako kináza, nebo může, jako specifická proteáza, narušovat interakci SUMO-PML. Nicméně neobsahuje tři typické aminokyseliny histidin, asparagin a cystein jako ostatní SENP (Drag, 2008).

Pozdější studie tyto možnosti vyvrací, a poukazuje na to, že předchozí pozorování (Lee, 2004a) je zkresleno kontaminací a neschopností oddělit sumoylované PML, a to hlavně díky desumoylujícím enzymům. Dle závěrů práce Kanga, IE1 neinhibuje sumoylaci PML, neovlivňuje desumoylační aktivitu proteinů vůči PML, ani nevystupuje jako SUMO proteáza *in vitro*, avšak stále přitom narušuje PML NB. *In vivo* je IE1 schopný interferovat s PML nezávisle na vazbě SUMO-PML (Kang, 2006).

Protein IE1 interaguje s na transkripčním faktorem STAT2, čímž účinně potlačuje interferonem stimulovanou expresi genů. Sumoylace IE1 této interakci brání, čímž se jeví jako účinná ochrana buňky působící negativně na růst viru (Huh, 2008).

Bezprostředně časný virový protein IE2 interaguje s proteiny SUMO a Ubc9 (Hofmann, 2000). Vznikající 105 kDa produkt odpovídající SUMO/IE2 se nachází nejen v *in vitro* studiích, ale i v HCMV infikovaných fibroblastech člověka. V kvasinkových buňkách interaguje SUMO-1 třicetkrát silněji s IE2 než SUMO-2/3. *In vitro* preference pro SUMO-1 pozorovány nebyly. Jev je vysvětlován rozdílem v asociaci kvasinkového proteinu Ubc9 k lidským SUMO1 a SUMO-2/3, a také ve stabilitě těchto proteinů v kvasinkách. Dvě akceptorová místa sumoylace se nachází v

obecném motivu  $\psi$ KxE a obsahují lyzin v pozici 175 a 180 (viz obr. 4A). Záměna jen jednoho lyzinu za arginin v těchto motivech neovlivňuje interakci IE2 s virovým proteinem pUL84 (nezbytným pro replikaci viru v lytické fázi) a ani dimerizaci IE2. Mutace obou dvou lyzinů značně snižuje schopnost proteinu aktivovat transkripci. Autoři se domnívali, že sumoylace buď zvyšuje stabilitu proteinu nebo přispívá k jeho dimerizaci. Studie též upozornily na difúzní rozmístění SUMO v jádře a poukázaly na možnou interakci mezi buněčnými proteiny a IE2 prostřednictvím sumoylace. Na obr. 4B je ilustrován model potenciální role SUMO-1 jako spojovacího článku pro interakci IE2 a buněčných proteinů (Hofmann, 2000; Ahn, 2001).



Obr. 4A: Popis míst IE2 spojených s efektem sumoylace. Dvě konjugací místa - podtržený lyzin (K175, K180), SIM motiv (IVISDSEEE), oblast vazby PIAS1, tmavé části - transaktivací domény. Oblasti IE2 vyžadované pro transaktivaci: 1-98 a 195-579. Převzato z Kim (2010).

Obr. B: Potenciální role SUMO-1 jako spojovacího článku pro interakci IE2 a buněčných proteinů. SUMO kovalentně váže lyzinové zbytky (K) nebo interaguje s motivem SIM uvnitř IE2 (IVISDSEEE - SXS). Buněčné proteiny obsahující SIM (X) a sumoylované formy (Y) jsou schopné interagovat s IE2 prostřednictvím SUMO. Převzato z Ahn (2001).

Rozšiřující práce ukazuje, že PIAS1, která vystupuje jako SUMO E3 ligáza, zesiluje úroveň sumoylace IE2 a zvyšuje IE2 zprostředkovanou aktivaci promotorů genů pro virovou polymerázu a buněčný cyklin E, který je důležitý pro vstup buňky do S fáze (Lee, 2003).

Následná studie naopak vliv sumoylace na akumulaci IE2, cyklus viru v infikovaných lidských fibroblastech, a hladinu sumoylovaných buněčných proteinů nepotvrzuje (Lee, 2004b). Tato práce zaznamenala podstatné snížení transaktivace promotoru cyklinu E prostřednictvím IE2 v přítomnosti SUMO-1 a Ubc9, a nepatrné působení na promotor genu pro polymerázu.

Jiný úhel pohledu na sumoylaci IE2 přináší zkoumání jeho mutovaných forem a odlišných forem z různých virových izolátů - viz obr. 5 (Barassa, 2003). Varianta IE2 viru Towne je o 40 až 60% účinnější v transkripční aktivitě v porovnání s nemutovanou formou. Varianta AD169 IE2 aktivuje promotory časných i pozdních virových genů dvakrát až třikrát více než forma Towne. Pro zjištění, které aminokyseliny jsou klíčové, bylo vytvořeno několik dalších mutovaných forem IE2, na nichž byla testována nejen jejich transkripční aktivita, ale i možná modifikace sumoylací a fosforylací (obr. 5). Mutace T541A zvyšovala třikrát více transkripční aktivitu než měl IE2 viru Towne a vedla i ke zvýšení sumoylace, zatímco mutace K455E vedla k její redukci. Mutace A463T sumoylaci a transkripční aktivitu snižuje, ale toto snížení je částečně kompenzováno další mutací T541A. Záměna T za A v pozici 541, kdy se A vyskytuje v IE2 kmene AD169 i v nemutovaném IE2, koreluje se

zvýšením sumoylace. I přesto hladina sumoylace forem Towne a AD169 je obdobná. Možné vysvětlení je takové, že K455 může být potenciálním místem sumoylace, zatímco mutace E455 může měnit konformaci celého IE2 proteinu, a tím ovlivňovat sumoylaci.

Záměna T za A v pozici 541 a následné zvýšení sumoylace a transaktivační funkce IE2 byla potvrzena pozdější studií (Lee, 2004b), což je ostatně důvodem, proč AD169 dosahuje zvýšené transaktivace v porovnání s Towne.

Sequences	68	242	455*	463*	541*	# Serines at 258*
IEP86 Towne	R	M	K	A	T	7
IEP86 AD169	Q	M	E	A	A	8
IEP86 Original cDNA	R	I	E	T	A	7
<b>cDNAs made:</b>						
IEP86 Towne cDNA	R	M	K	A	T	7
T541A	R	M	K	A	A	7
A463T	R	M	K	T	T	7
K455E	R	M	E	A	T	7
M242I	R	I	K	A	T	7
+S258	R	M	K	A	T	8
K455E/T541A	R	M	E	A	A	7
K455E/T541A +S258	R	M	E	A	A	8
A463T/T541A	R	M	K	T	A	7
K455E/A463T	R	M	E	T	T	7
IEP86 AD169 cDNA	Q	M	E	A	A	8

\*Towne AA numbering;  
AD169 is +1 after 258.

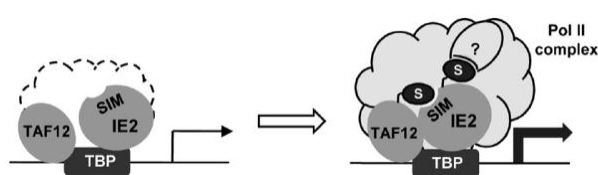
Obr.5: Varianty a mutované formy IE2 využité ve studii. Nahoře: rozdílné zastoupení aminokyselin mezi typy IE2 Towne, AD169 a OcDNA (originální cDNA). Dole: mutované formy. Číslování pozic aminokyselin dle Towne IEP86. V pozici 258 navíc serin AD169, proto dále plus 1 aminokyselina (hvězdička). Převzato z Barassa, (2003).

Výše uvedené studie ukazují, že záměna lyzinu za arginin v poloze 175 a 180 proteinu IE2 snižuje hladinu jeho sumoylace, ale neruší ji zcela. Tuto skutečnost

vysvětluje objevení SIM motivu (SUMO interacting motif), na jehož možnou existenci poukazuje již dřívější studie (Ahn, 2001). Nekovalentní interakce zprostředkovaná SIM může regulovat účinnost sumoylace IE2, ale i jeho fosforylaci a stabilitu, a pro dosažení plné úrovně sumoylace IE2 je nezbytná. Defektní formy IE2 jak v oblasti míst sumoylace K175/180, tak SIM motivu, narušují iniciaci exprese IE genů a mají negativní vliv na replikaci viru (Berndt, 2009). Ztráta kovalentní a nekovalentní SUMO interakce vede k snížení tvorby virových proteinů patrně v důsledku snížené schopnosti IE2 aktivovat transkripci (Hofmann, 2000; Ahn, 2001).

Na studie navazuje práce Kima potvrzující předchozí závěry nezbytnosti kovalentní modifikace SUMO/IE2 a nekovalentní asociace IE2 se SUMO přes SIM motiv pro účinnou transaktivační funkci IE2 a replikaci viru. Poruchy v SIM, či sekvence pro sumoylaci a SIM, značně snižují aktivaci časných virových promotorů. V přítomnosti mutované formy IE2 v SIM motivu je detekováno menší množství SUMO/IE2 i dalších virových proteinů. Buněčná RNA polymeráza II je při transkripci genu pro virovou polymerázu méně účinná v porovnání s nemutovanou formou IE2. Tyto výsledky směřují k úvaze o mnohem větším vlivu SIM na cyklus viru než jen zprostředkování sumoylace IE2 (Kim, 2010). Studie přináší zjištění o interakci sumoylovaného proteinu TAF12 s virovým IE2. Protein TAF12 je součástí transkripčních faktorů a interaguje s IE2 nezávisle na své vlastní možné sumoylaci na lyzinu 19 (Boyer-Guittaut, 2005). SUMO/TAF12 interaguje, na rozdíl od své nemutované formy, s IE2 prostřednictvím jeho SIM motivu. Zprostředkovaná interakce zajistí účinnější aktivaci promotoru genu pro virovou polymerázu proteinem IE2 v porovnání s mutovanou TAF12, ve které je lyzin v pozici 19 vyměněn za arginin (Kim, 2010). Prostřednictvím SIM může IE2 interagovat s transkripčními represory či aktivátory (viz obr. 6). Výsledky studie naznačují

návrat k myšlence potenciální role SUMO jako spojovacího článku pro interakci IE2 a buněčných proteinů (Ahn, 2001).



Obr.6: Hypotetický model role nekovalentní asociace IE2 a TAF12-SUMO. Vazba s TAF12-SUMO prostřednictvím SIM motivu IE2 může přispívat k zvýšení stability transkripčního iniciačního komplexu obsahujícího RNA polymerázu II. IE2 a TAF12 mohou asociovat s TBF (TATA-box binding protein). Převzato z Kim (2010).

Přesný význam sumoylace pro replikaci viru není zcela jasný. Jedním z projevů sumoylace IE1 je snížená infekčnost viru. Naopak sumoylace IE2 má na replikaci viru pozitivní efekt a to díky kovalentní i nekovalentní interakci se SUMO proteiny.

### 3.3.2. Funkce obalového proteinu pp71 v bezprostředně časné fázi infekce

Obalový protein pp71 stimuluje po vstupu cytomegaloviru do buňky expresi bezprostředně časných genů (IE). Buněčný regulační protein Daxx s navázanou histon deacetylázou nejspíše bezprostředně inhibuje přepis časných genů (Saffert, 2006). Virový pp71 se váže na buněčný Daxx a zprostředkovává jeho degradaci v proteozomu (Saffert, 2006; Hwang, 2007). Ukázalo se, že protein pp71 podporuje sumoylaci Daxx před expresí IE genů během počáteční fáze infekce. Avšak stimulace Daxx sumoylace není patrně vyžadována pro pp71 zprostředkovanou degradaci Daxx ani pro expresi IE genů (Hwang J., 2009).

## 3.4. Papillomaviridae

Tato velice diverzifikovaná čeleď zahrnuje mimo jiné více než 100 typů lidských papilomavirů (HPV). Tyto viry mají nádorový potenciál a některé vysoce rizikové papilomaviry jsou příčinou např. karcinomu děložního čípku. Jejich genomová kruhová dsDNA asociovaná s buněčnými histony se ukrývá v malé neobalené ikosahedrálční kapsidě. Papilomaviry infikují epitelální buňky a jejich replikační cyklus je závislý na jejich diferenciaci. Jednotlivé etapy životního cyklu viru jsou řízené dělením a migrací bazálních buněk k povrchu epitelu. Část dceřiných buněk zůstává v bazální části, kde se v jejich jádře virus udržuje v podobě episomu a funguje jako trvalý zdroj infekce. Časné virové proteiny E1 a E2 jsou produkovány od začátku infekce, posléze se k nim připojují i další nestrukturní regulační proteiny časné fáze E6 a E7, které zpožďují přirozenou diferenciaci keratinocytů. Morfogeneze virionů probíhá až v terminálně diferenciovanych keratinocytech. V pozdní fázi se tvoří dva strukturální proteiny L1 a L2. Kapsida papilomavirů je tvořena 360 molekulami hlavního kapsidového proteinu L1. Minoritní strukturální protein L2 je exponován na

povrchu kapsidy jenom z části. Tyto tumorogenní viry jsou schopné přežít i v latentní formě (Stubenrauch, 1999; Doobar, 2005).

Vliv sumoylace je zkoumán i na bovinním papilomaviru (BPV), který se vyskytuje u kopytníků.

#### 3.4.1. Časná fáze infekce - interakce proteinů E1, E2 a E6 a buněčné sumoylace

Časný protein E1 se skládá z N koncové domény nezbytné pro replikaci virové DNA *in vivo*, centrální DNA vazebné domény a C koncové domény s helikázovou aktivitou (Fradet-Turcotte, 2010). Hromadění E1 v jádře negativně působí na růst buňky jejím setrváváním v S fázi (Fradet-Turcotte, 2010). V souladu s tím vystupuje pozitivní efekt sumoylace E1 u BPV (bovine papilomaviru) obsahující dvě NES sekvence, které zvyšuje interakci s jaderným exportním proteinem Crm1 (Rosas-Acossta, 2008).

Vazbu mezi E1 HPV-16 a Ubc9 zaznamenala již studie Yasugi, ve které byl vysloven předpoklad vlivu této interakce na replikaci, či cílení E1 k degradaci (Yasugi, 1996). Pozdější studie potvrzují prvotní domněnku ovlivnění virové replikace a buněčného cyklu, kde sumoylace hraje důležitou roli v transportu E1.

Protein E1 bovinního papilomaviru interaguje s Ubc9 *in vivo* a *in vitro*. Mutantní formy neinteragující s Ubc9 ovlivňují lokalizaci E1 v buněčném jádře. Představa interakce Ubc9 s hydrofobními sekvencemi dvou KL/LK (lyzin-leucin) proteinu E1 byla ověřena přípravou dvojitéch mutantů ve všech nalezených KL/LK pozicích E1 a pouze mutovaná forma v pozicích 420/421 se nevázála na Ubc9. Pro sumoylaci se zdá být tato sekvence podstatná (Rangasamy, 2000a). To potvrzuje i následná studie, kdy sumoylace v této pozici snižovala či úplně inhibovala schopnost proteinu E1 iniciovat replikaci. Konstrukce fúzního proteinu E1 s fluorescenčním proteinem GFP umožnila detekovat distribuci mutovaných forem v cytoplasmě buňky, na rozdíl od jaderné lokalizace nemutované formy E1 (Rangasamy, 2000b).

Pro interakci E1 a SUMO-1 byla nalezena čtyři možná místa. *In vitro* vznikající 102kDa produkt E1/SUMO-1 detekovaný elektroforézou a protilátkami vůči E1 byl rozkládán specifickou proteázou Ulp1, která specificky štěpí sumoylované ne však ubiquitinilované proteiny (Li, 1999). V buněčné linii COS-1 vznikal obdobný produkt, který stechiometricky odpovídal dvěma navázaným SUMO-1 proteinům (Rangasamy, 2000a). Jen mutovaná forma E1 vzniklá záměnou lyzinu za arginin v pozici 514 (K514R) nebyla sumoylována a neindukovala replikaci papilomavirového genomu. Tato forma se totiž akumuluje v cytoplasmě v okolí jaderné membrány a do jádra nevstupuje. (Rangasamy, 2000b).

Také E1 protein lidských papilomavirů váže Ubc9 a to v místě vyžadovaném pro oligomerizaci E1 do hexamerů. V kvasinkových buňkách se vazba uskutečňuje v centrální doméně a na C konci proteinu. Na rozdíl od BPV mutované formy E1 HPV11 a HPV16 zůstávají lokalizovány v jádře a

pozice K559 E1 u viru HPV11, která je analogická k pozici K514 E1 BPV, není důležitá pro akumulaci v jádře (Yu, 2007; Fradet-Turcotte, 2009).

Bylo ukázáno, že s E1 proteinem interagují i SUMO E3 ligázy. Ligázy skupiny PIAS (kromě PIASy) se váží na E1 viru HPV11 a zprostředkovávají sumoylaci, přednostně vazbu SUMO-1. (Rosas-Costa, 2005).

Hlavní úloha časného proteinu E2 spočívá v regulaci virové transkripce. Také se účastní nepřímo replikace, tím že stabilizuje E1 protein v replikačním počátku. Nedávná studie se zabývá interakcí E2-Ubc9 *in vitro* u různých typů papilomavirů. Proteiny E2 HPV obsahují různá potenciální místa pro možnou sumoylaci, ale nekódují obecně konzervované sekvence pro vazbu SUMO. Vysoce rizikové viry (BPV1, HPV11, HPV16, HPV18) měly několik společných potenciálních míst a interagovaly s Ubc9 *in vitro* (Wu, 2008). Studie se dále zaměřuje na možnost sumoylace E2 prostřednictvím Ubc9 u virů BPV1 a HPV18. Protein E2 těchto virů je *in vitro* sumoylován a SUMO bylo odstranitelné působením specifické proteázy Ulp1. Dále byl protein E2 viru HPV16 v buněčné linii HeLa buněk sumoylován SUMO-1,2,3 a vazbou s proteázou SENP1 došlo k desumoylaci proteinu. Hlavním cílem sumoylace se stal lyzin 292, jehož pozice je konzervovaná i mezi dalšími dvanácti vysoce rizikovými HPV viry. Mutací v tomto místě proteinu E2 viru HPV16 má za následek snížení schopnosti E2 aktivovat i blokovat transkripci. Mutovaná forma E2 nenarušuje vazbu na DNA či buněčnou lokalizaci a E2 je exprimován ve stejném množství jako nezměněná forma (Wu, 2008). Tuto práci rozšiřuje studie, kde, bez ovlivnění transkripce E2, zvýšení sumoylace zvyšuje množství E2 proteinů a blokuje jejich degradaci. (Wu, Y.-C., 2009). Spolu s těmito výsledky a poznatky měnící se úrovně modifikace SUMO v diferencujících keratinocytech (Deyrieux, 2007) dochází k závěru, že změny v hladině buněčné sumoylace mohou ovlivňovat stabilitu samotného E2 v závislosti na různých vnějších signálech či buněčné diferenciaci (Wu, Y.-C., 2009).

Regulační E6 protein je onkoprotein papilomavirů. Váže se na buněčný protein E6AP (E6 associated protein) a společně specificky vyvazují p53. E6AP vystupuje jako ubiquitin-protein ligáza (E3) a přenáší ubiquitin na p53, který je tak cílen k degradaci do proteazomu (Scheffner, 1993). Protein E6 inhibuje funkci p53 i nezávisle na degradaci, a to snížením fosforylace p53, což účinně brání v jeho vazbě na promotor genu pro buněčný protein p21 a regulaci buněčného cyklu (Ajay, 2012). Naopak dřívější studie naznačuje, že protein E6 může zprostředkovat fosforylaci na různých místech p53 (Zhang, 2009).

E6 proteiny virů HPV-16/18 interagují s Ubc9 a snižují jeho množství. Exprese E6 v podstatě redukuje úroveň všech sumoylovaných proteinů v buňce. *In vitro* je interakce Ubc9 a E6 nezávislá na



dalších faktorech. Hypotéza, že redukce Ubc9 je způsobena degradací proteazomem zprostředkovanou interakcí s E6 nebyla zatím potvrzena. U proteinu E6 viru HPV-6 podobná interakce s Ubc9 pozorována nebyla (Heaton, 2011).

Efekt sumoylace se u odlišných forem HPV virů různí. Zdá se, že v časně fázi infekce sumoylace působí pozitivně na replikaci viru, kdy usnadňuje vstup virových proteinů do jádra a pozitivně působí na proteiny, které se účastní replikace genomu. Zajímavá je hypotéza stimulace sumoylace virových proteinů v závislosti na diferenciaci buněk. Viry navíc prostřednictvím E6 efektivně snižují hladinu sumoylovaných proteinů v buňce.

#### 3.4.2. Minoritní kapsidový protein L2

Bylo publikováno, že minoritní kapsidový protein L2 interaguje s buněčnými faktory, jako jsou Daxx, Sp100, a jeho jaderné umístění v PML tělískách umožňuje jeho sbalení do virových částic (Florin, 2002; Becker, 2003). Hlavní kapsidový protein L1 je do PML tělísek přiváděn interakcí s L2 (Day, 1998).

Nedávná studie se zabývala sumoylací L2 viru HPV-16. Mezi 473 aminokyselinami tvořícími protein L2 HPV-16 o molekulové hmotnosti 80 kDa se nachází sekvence 34-PKVE-37, která jako jediná v celé sekvenci genu pro L2 HPV-16 odpovídá typickému akceptorovému místu sumoylace -  $\psi$ KXE. V přítomnosti SUMO-1,2,3 se tvoří 100 kDa formy, které jsou působením SENP2 odstraněny, stejně jako záměnou lyzinu v pozici 35 za arginin. *In vivo* je L2 protein modifikován SUMO-1 jen slabě na rozdíl od silné vazby k SUMO2/3 (Marušič, 2010). Tato skutečnost koreluje s výsledky studie, ve které keratinocyty během diferenciaci aktivují promotory SUMO-2/3, ale ne SUMO-1, a zvyšují množství proteázy SENP1 (Deyrieux, 2007). Lokalizace L2, obdobně jako jeho interakce s nestrukturním proteinem E2, nebyla mutovanou formou L2 ovlivněna. S proteinem L1 byla schopna interagovat pouze nesumoylovaná forma L2. Avšak protein L2 mutovaný v pozici K35 (neschopný sumoylace) byl nestabilní (Marušič, 2010). Mutace sama o sobě může znamenat nestabilitu proteinu bez ohledu na případnou sumoylaci. Otázkou zůstává i jaké množství L2 je sumoylováno v reálné infikované buňce (Rubio, 2011).

### 3.5. Influenza A

Influenza A je obalený RNA virus čeledi Orthomyxoviridae. Jeho segmentovaný genom je tvořen osmi minus ssRNA, z nichž vzniká celkově jedenáct proteinů. Obal viru obsahuje tři virové transmembránové povrchové proteiny: hemagglutinin, neuraminidasu a matrixový protein 2 (M2). Hned pod nimi se nachází matrixový protein 1 (M1). Helikální virové ribonukleoproteinové komplexy (vRNPs) skládající se z virové RNA a nukleoproteinu (NP) tvoří jádro virionu. Genom viru kóduje RNA dependentní RNA polymerázu. S každým nukleoproteinovým komplexem jsou asociováni tři podjednotky RNA polymerázy (PB1, PB2 a PA). Uvnitř virionu se nachází ještě nestrukturní protein (NEP).

Virus se prostřednictvím hemagglutininového glykoproteinu, který rozeznává na povrchu buňky zbytky kyseliny sialové, dostává receptorem zprostředkovanou endocytózou do buňky. Kyselé prostředí endosomu indukuje konformační změny hemagglutininu a způsobí expozici fúzních peptidů hemagglutininu k endosomální membráně. Navíc protein M2 tvoří selektivní kanál pro protonové ionty, které se dostávají dovnitř virionu a umožňují rozvolnění asociace mezi M1 a vRNP. Fúzí endosomální membrány a virového obalu jsou do cytosolu uvolněny vRNPs, které poté vstupují za pomoci buněčných proteinů do jádra (Samji, 2009). V jádře probíhá transkripce virových mRNA. Endonukleázová aktivita PB2 odštěpuje 5'čepičkové struktury spolu s několika nukleotidy hostitelských pre-mRNA a na jejich 3'konce připojuje nukleotidy podle segmentu minus ssRNA. PB1 iniciuje transkripci a prodlužuje řetězec, PA podjednotka je v komplexu neaktivní. Při replikaci genomů se uplatňuje PA podjednotka, která bez přítomnosti primeru iniciuje replikaci a to jak řetězců v plus, tak i minus smyslu. PB1 opět prodlužuje řetězce a PB2 přítomná v komplexu je při replikaci neaktivní. Otázka přepnutí transkripce na replikaci není zcela zodpovězena a modely se různí (Samji, 2009; Resa-Infante, 2011). V nedávné studii přisuzují tuto roli kromě nukleoproteinu i virem kódované malé vRNA (Perez, 2010).

Vzniklé vRNPs jsou za vzniku komplexu vRNP -M1-NEP, který rozeznává buněčný protein Crm1, transportovány do cytoplasmy. Mechanismus sbalení virových segmentů není ještě zcela jasný. K vypuštění virionů z buňky přispívá cytoskelet (Nayak, 2009).

#### 3.5.1. Exportní krok genomu z jádra z pohledu matrixového proteinu 1

Matrixový protein 1 (M1) nemá afinitu k cytoplasmatické membráně a při absenci ostatních virových proteinů se nalézá v jádře a perinukleárním prostoru. Na cytoplasmatickou membránu jej cílí M2 protein (Wang, 2010). M1 obsahuje jaderný lokalizační signál, který jej cílí do jádra a na nějž se váže NEP (Akarsu, 2003). Právě ten obsahuje ve své C koncové doméně jaderný exportní signál NES (Shimizu, 2011).

Skupina vedená Chung-Yi Wu zjistila, že sumoylace M1 na pozici lyzinu - K242 představuje kritický krok pro vytvoření komplexu M1 s vRNP, který je posléze za spolupráce dalších proteinů exportován z jádra. Přestože mutované formy M1 zaujímaly stejné pozice v buňce, nedocházelo k jejich sumoylaci a jejich následná vazba s vRNP byla oslabena. Interakce M1 cytoplasmatickou částí proteinu obalového hemaglutininu nezávisí na sumoylaci M1. Stejně tak nukleoprotein podílející se na exportu z jádra nebyl sumoylován. Redukce tvorby virionů po umlčení sumoylace koreluje s akumulací virových proteinů a vRNA v buňce (Wu, 2011). Sumoylace je tedy nezbytná pro životní cyklus viru a to v jeho závěrečných fázích.

M1 má mimo jiné proapoptické vlastnosti. Protein teplotního šoku 70 (heat shock protein 70), který v buňkách vyvazuje aktivační faktor 1 apoptické proteázy (apoptosis protease-activating factor 1) a zabraňuje tak indukci apoptózy, interaguje s M1. Interakce jednak snižuje export komplexu M1-vRNP z jádra (Watanabe, 2006), jednak přispívá k buněčné smrti (Halder, 2011).

### 3.5.2. Nestrukturní proteiny a sumoylace

I další proteiny viru Influenza A mohou být *in vitro* a *in vivo* sumoylované (Pal, 2010; Pal, 2011). Jedná se o nestrukturní protein NS1, nestrukturní protein NEP podílející se na exportu vRNA z jádra, a podjednotku polymerázy PB1 (jen za přítomnosti dalších podjednotek PB2 a PA).

Multifunkční protein NS1, díky schopnosti interagovat s hostitelskými proteiny a RNA, hraje důležitou roli nejen v potlačení antivirové odpovědi buňky (jako antogonista IFN- $\alpha/\beta$ , aktivuje fosfatidylinositol-3 kinázy), ale též zasahuje do syntézy virové RNA, translace a sestřihu virové mRNA a do morfogeneze virionů (Hale, 2008). Sám do virionu inkorporován není.

NS1 viru H5N1 je v infikované buňce sumoylován SUMO -1,2,3 a interaguje s Ubc9 a SENP1. Deficience sumoylace vede k nestabilitě NS1 a k narušení jeho schopnosti inhibovat genové exprese buňky (Xu, 2011). Dva lyzinové zbytky (K) v jeho C koncové doméně slouží jako cílová místa pro SUMO-1, která jsou konzervovaná i u většiny v této studii zkoumaných typů NS1 proteinů virů Influenza A (H5N1, H9N2), a to v akceptorových místech na pozici K219 a K221. Jen u některých virů jsou cílová místa pro sumoylaci v pozici K217 a K219. Nicméně protein NS1 viru S-OIV A/Sichuan/1/2009(H1N1) se zkrácenou C koncovou doménou o jedenáct aminokyselin nebyl sumoylován, a to ani po obnovení domény. Je možné, že další, jiné znaky tohoto viru ovlivňují tento proces (Lam, 2011). Často bývá ale delece C koncové domény u některých subtypů viru chřipky obdobná či dokonce rozsáhlejší (Dundon, 2009).

Sumoylace je klíčová pro infekčnost viru, a to alespoň u některých izolátů viru Influenza A.

### 3.6. Retroviridae

Genomem čeledi jsou dvě kopie identické lineární plus ssRNA. Životní cyklus je rozdělen do časně a pozdní fáze. Obalené viriony mají uvnitř ikosahedrální nukleokapsidu. Receptorem zprostředkovanou fúzí se nukleokapsidy dostávají do cytoplasmy, kde dochází reverzní transkripcí virového genomu k tvorbě lineární dsDNA. Integrací dsDNA do hostitelského genomu končí časná fáze. Integrovaná forma virového genomu se nazývá provirus. Z proviru syntetizuje hostitelská DNA dependentní RNA polymeráza II primární transkript, který buď slouží pro sestřih, nebo je přímo exportován z jádra pro translaci a později, jako genomová RNA, pro enkapsidaci. Po vypuštění dochází k maturaci virionu zahrnující mimo jiné i proteolytické štěpení polyproteinů (Knipe a Howley, Fields Virology, 2007, str. 2007-24).

#### 3.6.1. Virus lidské imunodeficiency

Virus lidské imunodeficiency (HIV) patří do rodu Lentivirus a je schopný infikovat i nedělicí se buňky. Po vzniku provirové DNA se spolu s integrázou vytváří preintegrační komplex, který je transportován do jádra. Komplexní proteomová analýza identifikovala mezi buněčnými faktory interagujícími s HIV buněčný protein RanBP2 se SUMO E3 ligázovou aktivitou (König, 2008). Protein RanBP2 se zapojuje do jaderného importu a exportu a jeho úbytek ovlivňuje výběr místa integrace proviru HIV-1 (Ocwieja, 2011). Integráza zajišťuje klíčový krok v replikaci, neboť zprostředkovává integraci provirové DNA do buněčného genomu. K posílení vazby na chromatin ji napomáhá buněčný kofaktor LEDGF/p75 (Astiazaran, 2011).

Integráza (IN) je kovalentně modifikována *in vitro* i *in vivo* na třech lyzinech (3K) v pozicích 46, 136 a 244 jak SUMO-1, tak SUMO-2/3, a to uvnitř konzervovaného motivu ΨKxE jako typického akceptorového místa sumoylace. Záměna lyzinu (K) za arginin (R) (IN<sub>3KR</sub>, HIV-1<sub>3KR</sub>) v těchto pozicích neovlivňuje buněčnou lokalizaci či stabilitu IN (Zamborlini, 2011).

Byl připraven plazmid kódující mutovanou integrázu provirové DNA a reportérový gen pro fluorescenční protein GFP namísto negativního regulačního faktoru Nef, a také obdobné plazmidy se změnou kodonu pro glutamovou kyselinu na glutamin v konzervovaném motivu integrázy (IN<sub>3EQ</sub>, HIV-1<sub>3EQ</sub>). Transkripce příslušným plazmidem snížila množství infikovaných buněk (měřeno průtokovou cytometrií) a to na 57 % u forem s IN<sub>3KR</sub> a 33 % u IN<sub>3EQ</sub> oproti kontrolnímu plazmidu s nemutovanou provirovou DNA. V porovnání s kontrolou byla infekčnost HIV-1<sub>3KR</sub> snížena na 32 % po 48 h a 41 % po 96 h. Redukce infekčnosti mutovaných forem se vysvětluje značně sníženým stupněm integrace proviru. Přitom mutované formy nevykazovaly odlišnou katalytickou aktivitu IN ani pozměněnou afinitu k LEDGF/p75, což naznačuje, že defekt je v časně fázi virové replikace před integrací proviru, ale již po reverzní transkripci (Zamborlini, 2011). Je třeba uvést, že virový protein

Nef, který byl nahrazen genem pro GFP, zvyšuje infekčnost HIV-1 svým vlivem na komponenty vznikajícího virionu (Qi, 2008). Oproti očekávání konjugované formy integrázy a SUMO nebyly detekovány. Viriony obsahovaly obdobné množství sbalené RNA a ani vypuštění a maturace virových částic nebyla narušena mutacemi akceptorových míst pro SUMO uvnitř IN (Zamborlini, 2011). Na tuto studii navazuje nepublikovaná zpráva přinášející informaci o interakci mezi proteinem skupiny PIAS a IN, kdy PIAS3 zvyšuje sumoylaci IN (Beauclair, 2011).

Polyprotein Gag obsahuje na svém C-konci malou, na prolin bohatou p6 doménu. Ta je nezbytná pro pučení a vznik nových virových částic, a inkorporaci Vpr (který se uplatňuje v importu virové DNA do jádra) do vznikajícího virionu (Fritz, 2010). Skupina pod vedení Gurera zjistila, že protein p6 je kovalentně modifikován vazbou SUMO-1 na lyzin 27 (K27). Interakce p6 s proteiny Ubc9 a Daxx je závislá na sumoylaci této pozice. Nadměrná exprese SUMO-1 neměla detekovatelný efekt na uspořádání virionu či na stupeň ubiquitylaci p6, která také využívá pozice lyzinu (Ott, 2000). V postižených buňkách ale snížila infekčnost virionů HIV-1. Tento inhibiční efekt předpokládá závislost na přítomnosti sumoylovaného K27 proteinu p6. Blok infekce nenastal ve vstupu viru do buňky ani v importu cDNA do jádra, ale v důsledku nižšího množství produkovaných cDNA. Redukce cDNA byla způsobena redukcí reverzní transkripce (Gurer, 2005).

Buňky, u nichž exprese Ubc9 byla umlčena interferující RNA, produkovaly normální počet virionů. Tyto částice však byly 8 až 10krát méně infekční než viriony produkované v přítomnosti Ubc9. Pro syntézu Gag, enkapsidaci virové RNA či pučení virionů není Ubc9 nezbytný a ve virových částicích nebyl detekován. Naproti tomu viriony produkované při absenci Ubc9 obsahovaly značně menší počet obalových glykoproteinů (Env polyprotein gp160 je štěpen na obalové proteiny gp120 a gp41). Ubc9 podporuje stabilitu glykoproteinů v přítomnosti Gag v pozdní fázi virové replikace, inkorporaci obalových glykoproteinů do virových částic a přispívá k plně infekčním virionům HIV-1 (Jaber, 2009). Mechanismus vlivu Gag na stabilitu gp120 v absenci Ubc9 není znám, předpokládá se interakce komplexu Gag/Ubc9 s Env poté co opustí Golgiho aparát.

Sumoylace virových proteinů HIV zvyšuje infekčnost viru, kdy pozitivně ovlivňuje integraci provirové DNA do hostitelského genomu.

### 3.6.2. Mason-Pfizer monkey virus a Moloney Murine Leukemia virus

Jedna z dřívějších studií se zabývala sumoylací u Mason-Pfizer monkey viru (MPMV). MPMV patří do rodu Betaretrovirus. U těchto virů jsou formovány kapsidy v cytoplasmě blízko jaderné membrány. Prokapsidy jsou aktivně transportovány k povrchu buňky, kde pučí viriony. Ubc9

interaguje v pozdní fázi replikace s polyproteinem Gag blízko jaderné membrány a *in vitro* se váže na doménu pro kapsidový protein. Pravděpodobně ovlivňuje tvorbu virových částic (Weldon, 2003).

Další retrovirus, Moloney Murine Leukemia virus, patří do rodu Gammaretrovirus. Maturovaný kapsidový protein CA (odštěpený z polyproteinu Gag) se účastní časně fáze infekce a interaguje s Ubc9 a PIAS. Pro interakci jsou důležité aminokyselinové zbytky na pozicích 215 až 220 CA (konsenzus IFNKRE). Záměna lyzinu za arginin ve vazebném místě ovlivňují replikaci viru (190 - GRKLERLEDLKNKTLGDLVREAEEKIFNKRE<sup>T</sup> - 221). Zpožděnou replikaci vykazovaly K218R a dvojité mutanty K (193, 218)R, K (201, 218)R; ostatní (K193R, K201R a dvojitý mutant K (193, 201)R) neměly na průběh replikace vliv. Mutované formy K3R (záměna K 193,201, 218) a K5R (záměna K193,201, 203, 214, 218) byly v replikaci zcela defektní, a nebyly u nich detekovány žádné kruhové DNA. Samostatně žádný ze tří lyzinů (K 193,201, 218) nebyl pro replikaci nutný (Yueh, 2006). Sumoylace CA je tedy klíčová pro časně fáze infekce před vstupem do jádra a integrací provirové DNA, ale již po reverzní transkripci.

Sumoylace působí na cyklus Murine Leukemia Virus (MLV) i negativně, a to v případě typu N-MLV (N-tropic strain). Antivirová funkce lidského proteinu TRIM5 $\alpha$  účinně potlačuje infekci viru N-MLV a HIV-1 (Yap, 2004). V linii buněk 293T zvýšení exprese SUMO-1 brání N-MLV infekci. Záměna lyzinu v pozici 110 uvnitř genu pro CA omezuje aktivitu TRIM5 $\alpha$  vůči N-MLV, a tak i blok zprostředkovaný SUMO-1, který nastává v časně fázi infekce po vstupu do buňky, ale předchází reverzní transkripci (Arriagada, 2011). Zvýšená exprese SUMO-1 neovlivňuje úroveň exprese TRIM5 $\alpha$ . Ve studii byly identifikovány tři možné SIM motivy proteinu TRIM5 $\alpha$ . Mutace SIM1 a SIM2 ruší antivirovou funkci TRIM5 $\alpha$  vůči N-MLV. Z výsledků vyplývá, že alespoň část funkce TRIM5 $\alpha$  je zprostředkována vazbou SIM motivů a sumoylovaného kapsidového proteinu.

#### 4. ZÁVĚR

Výše uvedený text dokládá schopnost virů interagovat se složkami buněčné sumoylace. Počáteční studie spíše podporovaly myšlenku potlačení a využití následků ne-sumoylace ve prospěch viru, pozdější spatřují vliv sumoylace v represivním kroku buňky. Infekčnost adenovirů a papilomavirů je ovlivněna zásahy virových proteinů do sumoylační dráhy buněčných proteinů. Vedle toho má sumoylace virových proteinů pozitivní efekt na replikační cyklus virů jako u viru Influenza A a retrovirů.

Nepřítomnost kontextu dalších virových proteinů či zvýšená exprese vybraného proteinu ve studiích mohlo reálné působení sumoylace na jeho funkce v buňce zkreslit, neboť u propletených vztahů sumoylovaných proteinů pozorujeme jak pozitivní, tak zároveň negativní dopad na sledovanou funkci, jak je vidět u proteinů viru Epstein-Barrové a lidského cytomegaloviru.

Přestože velká část experimentů probíhala v buňkách, stále nejsme schopni poodhalit smysl sumoylace virových proteinů, ani jejich vlivu na buňku. Viry využívají sumoylační dráhu k deregulaci buněčného cyklu. Na druhé straně sumoylované buněčné proteiny podporují antivirovou obranu buňky.

U některých virů nebyly detekovány konjugované formy SUMO/virový protein. Tato skutečnost se připisuje dynamickému systému sumoylace, kdy zvýšená úroveň sumoylace proteinů vede k vyčerpání volného SUMO proteinu a následně ke zvýšení aktivity SUMO specifických proteáz. Zůstává otázkou jaké množství virových proteinů je reálně sumoylováno.

Studie se často zaměřují na hledání SUMO konzervovaného konsenzu uvnitř sekvence virového proteinu. V posledních letech se zabývají možnostmi sumoylovaných proteinů s jinými proteiny přes SIM motiv. I přes mnohé studie prezentující obdobné výsledky se vynořují protichůdné informace a koncepce, které dosavadní nahlížení podstatně mění.

I u jiných než výše zmíněných virů byl zaznamenán nějaký vztah k sumoylaci, nicméně se obvykle jedná jen o jednorázovou studii, která nebyla dále rozvíjena. Význam sumoylace je ve stavu intenzivního bádání.

## 5. LITERÁRNÍ ZDROJE

- Adamson, A.L. & Kenney, S. The Epstein-Barr Virus BZLF1 Protein Interacts Physically and Functionally with the Histone Acetylase CREB-Binding Protein. *Journal of Virology* 73, 6551-6558 (1999).
- Adamson, A.L. & Kenney, S. Epstein-barr virus immediate-early protein BZLF1 is SUMO-1 modified and disrupts promyelocytic leukemia bodies. *Journal of Virology* 75, 2388-2399 (2001).
- Adamson, A.L. Effects of SUMO-1 upon Epstein-Barr virus BZLF1 function and BMRF1 expression. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 336, 22-28 (2005).
- Ahn, J.H., et al. Evaluation of interactions of human cytomegalovirus immediate-early IE2 regulatory protein with small ubiquitin-like modifiers and their conjugation enzyme Ubc9. *Journal of Virology* 75, 3859-3872 (2001).
- Ajay, A.K., Meena A.S., Bhat M.K. Human papillomavirus 18 E6 inhibits phosphorylation of p53 expressed in HeLa cells. *Cell & bioscience* 2 (2012).
- Akarsu, H. et al. Crystal structure of the M1 protein-binding domain of the influenza A virus nuclear export protein (NEP/NS2). *The European Molecular Biology Organization Journal* 22, 4646-4655 (2003).
- Arriagada, G., Muntean, L.N. & Goff, S.P. SUMO-Interacting Motifs of Human TRIM5 $\alpha$  are Important for Antiviral Activity. *PLoS Pathogens* 7, 14 (2011).
- Asai, R., Kato, A. & Kawaguchi, Y. Epstein-Barr virus protein kinase BGLF4 interacts with viral transactivator BZLF1 and regulates its transactivation activity. *The Journal of general virology* 90, 1575-1581 (2009).
- Astiazaran, P. et al. HIV-1 integrase modulates the interaction of the HIV-1 cellular cofactor LEDGF/p75 with chromatin. *Retrovirology* 8, 27 (2011).
- Atabakhsh, E., Bryce, D.M., Lefebvre, K.J. & Schild-Poulter, C. RanBPM has proapoptotic activities that regulate cell death pathways in response to DNA damage. *Molecular cancer research MCR* 7, 1962-1972 (2009).
- Barrasa, M.I., Harel, N., Yu, Y. & Alwine, J.C. Strain variations in single amino acids of the 86-kilodalton human cytomegalovirus major immediate-early protein (IE2) affect its functional and biochemical properties: implications of dynamic protein conformation. *Journal of Virology* 77, 4760-4772 (2003).
- Barrasa, M.I., et al. The Phosphorylation Status of the Serine-Rich Region of the Human Cytomegalovirus 86-Kilodalton Major Immediate-Early Protein IE2/IEP86 Affects Temporal Viral Gene Expression. *Journal of Virology* 79, 1428-1437 (2005).
- Bawa-Khalife, Yeh, E.T. SUMO losing balance: SUMO proteases disrupt SUMO homeostasis to facilitate cancer development and progression. *Genes Cancer* 1 748-752 (2010).
- Beauchair et al.: PIAS3 modulate HIV-1 integrase SUMOylation. *Retrovirology* 8(Suppl 2):P4 (2011).
- Becker, K.A., Florin, L., Sapp, C. & Sapp, M. Dissection of human papillomavirus type 33 L2 domains involved in nuclear domains (ND) 10 homing and reorganization. *Virology* 314, 161-167 (2003).
- Bentz, G.L., Liu, R., Hahn, A.M., Shackelford, J. & Pagano, J.S. Epstein-Barr virus BRLF1 inhibits transcription of IRF3 and IRF7 and suppresses induction of interferon-beta. *Virology* 402, 121-128 (2010).
- Bentz, G.L., Whitehurst, C. & Pagano, J.S. Epstein-Barr Virus LMP1 C-terminal Activating Region-3 contributes to LMP1-mediated cellular migration via its interaction with Ubc9. *Journal of Virology* 85 (19), 10144-10153 (2011).
- Bernardi, R. et al. PML regulates p53 stability by sequestering Mdm2 to the nucleolus. *Nature Cell Biology* 6, 665-672 (2004).
- Berndt, A., Hofmann-Winkler, H., Tavalai, N., Hahn, G. & Stamminger, T. Importance of covalent and noncovalent SUMO interactions with the major human cytomegalovirus transactivator IE2p86 for viral infection. *Journal of Virology* 83, 12881-12894 (2009).
- Blanchette, P. et al. Both BC-Box Motifs of Adenovirus Protein E4orf6 Are Required To Efficiently Assemble an E3 Ligase Complex That Degrades p53. *Molecular and Cellular Biology* 24, 9619-9629 (2004).
- Boddy, M.N., Howe, K., Etkin, L.D., Solomon, E. & Freemont, P.S. PIC 1, a novel ubiquitin-like protein which interacts with the PML component of a multiprotein complex that is disrupted in acute promyelocytic leukaemia. *Oncogene* 13, 971-982 (1996).
- Boggio, R., et al. A mechanism for inhibiting the SUMO pathway. *Molecular Cell* 16, 549-561 (2004).
- Boggio, R., Passafaro, A. & Chiocca, S. Targeting SUMO E1 to ubiquitin ligases: a viral strategy to counteract sumoylation. *The Journal of Biological Chemistry* 282, 15376-15382 (2007).



- Bohren, K.M., Nadkarni, V., Song, J.H., Gabbay, K.H. & Owerbach, D. A M55V polymorphism in a novel SUMO gene (SUMO-4) differentially activates heat shock transcription factors and is associated with susceptibility to type I diabetes mellitus. *The Journal of Biological Chemistry* 279, 27233-27238 (2004).
- Bowling, B.L. & Adamson, A.L. Functional interactions between the Epstein-Barr virus BZLF1 protein and the promyelocytic leukemia protein. *Virus Research* 117, 244-253 (2006).
- Boyer-Guittaut, M. et al. SUMO-1 Modification of Human Transcription Factor (TF) IID Complex Subunits. *The Journal of Biological Chemistry* 280, 9937-9945 (2005).
- Bremner, K.H. et al. Adenovirus transport via direct interaction of cytoplasmic dynein with the viral capsid hexon subunit. *Cell host microbe* 6, 523-535 (2009).
- Calderwood, M.A. et al. Epstein-Barr virus nuclear protein 3C binds to the N-terminal (NTD) and beta trefoil domains (BTD) of RBP/CSL; only the NTD interaction is essential for lymphoblastoid cell growth. *Virology* 414, 19-25 (2011).
- Calderwood, M.A., Holthaus, A.M. & Johannsen, E. The Epstein-Barr virus LF2 protein inhibits viral replication. *Journal of Virology* 82, 8509-8519 (2008).
- Cancian, L., Bosshard, R., Lucchesi, W., Karstegl, C.E. & Farrell, P.J. C-Terminal Region of EBNA-2 Determines the Superior Transforming Ability of Type 1 Epstein-Barr Virus by Enhanced Gene Regulation of LMP-1 and CXCR7. *PLoS Pathogens* 7, 21 (2011).
- Colombo, R., Boggio, R., Seiser, C., Draetta, G.F. & Chiocca, S. The adenovirus protein Gam1 interferes with sumoylation of histone deacetylase 1. *EMBO Reports* 3, 1062-1068 (2002).
- Dal Monte, P., Landini, M.P., Sinclair, J., Virelizier, J.L. & Michelson, S. TAR and Sp1-independent transactivation of HIV long terminal repeat by the Tat protein in the presence of human cytomegalovirus IE1/IE2. *AIDS* 11, 297-303 (1997).
- Day, P.M., Roden, R.B.S., Lowy, D.R. & Schiller, J.T. The Papillomavirus Minor Capsid Protein, L2, Induces Localization of the Major Capsid Protein, L1, and the Viral Transcription/Replication Protein, E2, to PML Oncogenic Domains. *Journal of Virology* 72, 142-150 (1998).
- Desterro, J.M., Rodriguez, M.S., Kemp, G.D. & Hay, R.T. Identification of the enzyme required for activation of the small ubiquitin-like protein SUMO-1. *The Journal of Biological Chemistry* 274, 18785-18792 (1999).
- Deyrieux, A.F., Rosas-Acosta, G., Ozbun, M.A. & Wilson, V.G. Sumoylation dynamics during keratinocyte differentiation. *Journal of Cell Science* 120, 125-136 (2007).
- Ding, B., Sum, Y., Huang, J. Overexpression of SKI oncoprotein leads to P53 degradation through regulation of MDM2 sumoylation. *The Journal of biological chemistry* M111.301523 (2012).
- Doorbar, J. The papillomavirus life cycle. *Journal of clinical virology the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology* 32 Suppl 1, S7-S15 (2005).
- Drag, M. & Salvesen, G.S. DeSUMOylating enzymes--SENPs. *IUBMB Life* 60, 734-742 (2008).
- Dundon, W.G. & Capua, I. A Closer Look at the NS1 of Influenza Virus. *Viruses* 1, 1057-1072 (2009).
- Ehltling, C., Häussinger, D. & Bode, J.G. Sp3 is involved in the regulation of SOCS3 gene expression. *The Biochemical journal* 387, 737-745 (2005).
- Echendu, C.W. & Ling, P.D. Regulation of Sp100A Subnuclear Localization and Transcriptional Function by EBNA-LP and Interferon. *Journal of interferon cytokine research the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research* 28, 667-678 (2008).
- El-Guindy, A.S., Paek, S.Y., Countryman, J. & Miller, G. Identification of constitutive phosphorylation sites on the Epstein-Barr virus EB1 protein. *The Journal of Biological Chemistry* 281, 3085-3095 (2006).
- Endter, C., Kzhyshkowska, J., Stauber, R. & Dobner, T. SUMO-1 modification required for transformation by adenovirus type 5 early region 1B 55-kDa oncoprotein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98, 11312-11317 (2001).
- Florin, L., Schäfer, F., Sotlar, K., Streeck, R.E. & Sapp, M. Reorganization of nuclear domain 10 induced by papillomavirus capsid protein L2. *Virology* 295, 97-107 (2002).
- Fradet-Turcotte, A., Brault, K., Titolo, S., Howley, P.M. & Archambault, J. Characterization of papillomavirus E1 helicase mutants defective for interaction with the SUMO-conjugating enzyme Ubc9. *Virology* 395, 190-201 (2009).
- Fradet-Turcotte, A., Moody, C., Laimins, L.A. & Archambault, J. Nuclear Export of Human Papillomavirus Type 31 E1 Is Regulated by Cdk2 Phosphorylation and Required for Viral Genome Maintenance. *Journal of Virology* 84, 11747-11760 (2010).

- Fritz, J.V. et al. HIV-1 Vpr oligomerization but not that of Gag directs the interaction between Vpr and Gag. *Journal of Virology* 84, 1585-1596 (2010).
- Girdwood, D. et al. P300 transcriptional repression is mediated by SUMO modification. *Molecular Cell* 11, 1043-1054 (2003).
- Gonzalez, R., Huang, W., Finnen, R., Bragg, C. & Flint, S.J. Adenovirus E1B 55-Kilodalton Protein Is Required for both Regulation of mRNA Export and Efficient Entry into the Late Phase of Infection in Normal Human Fibroblasts. *Society* 80, 964-974 (2006).
- Guo, Q., Sun, X., Yuan, C. Zhou, H., Jie, G., Jiang, G. Effect of Rta protein of Epstein-Barr virus on the cell cycle in HeLa cells. *Acta virologica* 55(4), 311-316 (2011).
- Gurer, C., Berthoux, L. & Luban, J. Covalent modification of human immunodeficiency virus type 1 p6 by SUMO-1. *Journal of Virology* 79, 910-917 (2005).
- Hagemeyer, S.R. et al. Sumoylation of the Epstein-Barr Virus BZLF1 Protein Inhibits Its Transcriptional Activity and Is Regulated by the Virus-Encoded Protein Kinase. *Journal of Virology* 84, 4383-4394 (2010).
- Halder, U.C., Bagchi, P., Chattopadhyay, S., Dutta, D. & Chawla-Sarkar, M. Cell death regulation during influenza A virus infection by matrix (M1) protein: a model of viral control over the cellular survival pathway. *Cell death disease* 2, e197 (2011).
- Hale, B.G., Randall, R.E., Ortín, J. & Jackson, D. The multifunctional NS1 protein of influenza A viruses. *The Journal of general virology* 89, 2359-2376 (2008).
- Han, S. et al. HDAC inhibitors TSA and sodium butyrate enhanced the human IL-5 expression by altering histone acetylation status at its promoter region. *Immunology Letters* 108, 143-150 (2007).
- Heather, J., Flower, K., Isaac, S. & Sinclair, A.J. The Epstein-Barr virus lytic cycle activator Zta interacts with methylated ZRE in the promoter of host target gene *egr1*. *The Journal of general virology* 90, 1450-1454 (2009).
- Heaton, P.R., Deyrieux, A.F., Bian, X.-L. & Wilson, V.G. HPV E6 proteins target Ubc9, the SUMO conjugating enzyme. *Virus Research* 158, 199-208 (2011).
- Hecker, C.-M., Rabiller, M., Haglund, K., Bayer, P. & Dikic, I. Specification of SUMO1- and SUMO2-interacting motifs. *The Journal of Biological Chemistry* 281, 16117-16127 (2006).
- Heider J.A., Yu Y., Shenk T., Alwine J.C. Characterization of a human cytomegalovirus with phosphorylation site mutations in the immediate-early 2 protein. *Journal of Virology* 76, 928-932 (2002).
- Heilmann, A.M.F., Calderwood, M.A. & Johannsen, E. Epstein-Barr virus LF2 protein regulates viral replication by altering Rta subcellular localization. *Journal of Virology* 84, 9920-9931 (2010).
- Hietakangas, V. et al. PDSM, a motif for phosphorylation-dependent SUMO modification. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 45-50 (2006).
- Hille, A., Badu-Antwi, A., Holzer, D. & Grässer, F.A. Lysine residues of Epstein-Barr virus-encoded nuclear antigen 2 do not confer secondary modifications via ubiquitin or SUMO-like proteins but modulate transcriptional activation. *The Journal of general virology* 83, 1037-1042 (2002).
- Hofmann, H., Flöss, S. & Stamminger, T. Covalent modification of the transactivator protein IE2-p86 of human cytomegalovirus by conjugation to the ubiquitin-homologous proteins SUMO-1 and hSMT3b. *Journal of Virology* 74, 2510-24 (2000).
- Huh, Y.H. et al. Binding STAT2 by the acidic domain of human cytomegalovirus IE1 promotes viral growth and is negatively regulated by SUMO. *Journal of Virology* 82, 10444-10454 (2008).
- Hwang, E.-S. et al. Human Cytomegalovirus IE1-72 Protein Interacts with p53 and Inhibits p53-Dependent Transactivation by a Mechanism Different from That of IE2-86 Protein. *Journal of Virology* 83, 12388-12398 (2009).
- Hwang, J. & Kalejta, R.F. Proteasome-dependent, ubiquitin-independent degradation of Daxx by the viral pp71 protein in human cytomegalovirus-infected cells. *Virology* 367, 334-338 (2007).
- Hwang, J. & Kalejta, R.F. Human Cytomegalovirus Protein pp71 Induces Daxx SUMOylation. *Journal of Virology* 83, 6591-6598 (2009).
- Chang, L.-K. et al. Post-translational modification of Rta of Epstein-Barr virus by SUMO-1. *The Journal of Biological Chemistry* 279, 38803-38812 (2004).
- Chang, L.-K. et al. Enhancement of transactivation activity of Rta of Epstein-Barr virus by RanBPM. *Journal of Molecular Biology* 379, 231-242 (2008).

- Chang, P.-C. et al. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (KSHV) encodes a SUMO E3 ligase that is SIM-dependent and SUMO-2/3-specific. *The Journal of Biological Chemistry* 285, 5266-5273 (2010).
- Chen, C., Li, D. & Guo, N. Regulation of cellular and viral protein expression by the Epstein-Barr virus transcriptional regulator Zta: implications for therapy of EBV associated tumors. *Cancer biology therapy* 8, 987-995 (2009a).
- Chen, G., Branton, P.E. & Shore, G.C. Induction of p53-independent apoptosis by hygromycin B: suppression by Bcl-2 and adenovirus E1B 19-kDa protein. *Experimental Cell Research* 221, 55-59 (1995).
- Chen, Y.-L. et al. The Epstein-Barr virus replication and transcription activator, Rta/BRLF1, induces cellular senescence in epithelial cells. *Cell cycle Georgetown Tex* 8, 58-65 (2009b).
- Chiocca, S. et al. The complete DNA sequence and genomic organization of the avian adenovirus CELO. *Journal of Virology* 70, 2939-2949 (1996).
- Chiocca, S., Baker, A. & Cotten, M. Identification of a novel antiapoptotic protein, GAM-1, encoded by the CELO adenovirus. *Journal of Virology* 71, 3168-3177 (1997).
- Chiocca, S. et al. Histone deacetylase 1 inactivation by an adenovirus early gene product. *Current Biology* 12, 594-598 (2002).
- Chu, Y. & Yang, X. SUMO E3 ligase activity of TRIM proteins. *Oncogene* 30, 1108-1116 (2011).
- Jaber, T. et al. Human Ubc9 contributes to production of fully infectious human immunodeficiency virus type 1 virions. *Journal of Virology* 83, 10448-10459 (2009).
- Jiang, M., Chiu, S.-Y. & Hsu, W. SUMO-specific protease 2 in Mdm2-mediated regulation of p53. *Cell Death and Differentiation* 18, 1005-1015 (2011).
- Johannsen, E., Luftig, M., Chase, M. R., Weicksel, S., Cahir-McFarland, E., Illanes, D., Sarracino, D., Kieff, E. Proteins of purified Epstein-Barr virus. *Proc.Natl.Acad. Sci.U.S.A.* 101, 16286-16291 (2004).
- Kang, H. et al. Inhibition of SUMO-independent PML oligomerization by the human cytomegalovirus IE1 protein. *The Journal of general virology* 87, 2181-2190 (2006).
- Kang, X. et al. SUMO-specific protease 2 is essential for suppression of polycomb group protein-mediated gene silencing during embryonic development. *Molecular Cell* 38, 191-201 (2010).
- Karawajew, L., Rhein, P., Czerwony, G. & Ludwig, W.-D. Stress-induced activation of the p53 tumor suppressor in leukemia cells and normal lymphocytes requires mitochondrial activity and reactive oxygen species. *Blood* 105, 4767-4775 (2005).
- Kerscher, O. SUMO junction-what's your function? New insights through SUMO-interacting motifs. *EMBO Reports* 8, 550-555 (2007).
- Khelifi, A.F., D'Alcontres, M.S. & Salomoni, P. Daxx is required for stress-induced cell death and JNK activation. *Cell Death and Differentiation* 12, 724-733 (2005).
- Kim, E.T., Kim, Y.-E., Huh, Y.H. & Ahn, J.-H. Role of Noncovalent SUMO Binding by the Human Cytomegalovirus IE2 Transactivator in Lytic Growth. *Journal of Virology* 84, 8111-8123 (2010).
- Kim, M. J., Chia, I.V. & Costantini, F. SUMOylation target sites at the C terminus protect Axin from ubiquitination and confer protein stability. *The FASEB journal official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 22, 3785-3794 (2008).
- Kitchen, N.S. & Schoenherr, C.J. Sumoylation modulates a domain in CTCF that activates transcription and decondenses chromatin. *Journal of Cellular Biochemistry* 111, 665-675 (2010).
- Knipe D.M. and Howley P. *Fields Virology*. 5th edition. Lippincott Williams and Wilkins, a Wolters Kluwer business, Philadelphia, 2007, ISBN 978-0-7817-6060-7
- König, R. et al. Global analysis of host-pathogen interactions that regulate early-stage HIV-1 replication. *Cell* 135, 49-60 (2008).
- Krätzer, F. et al. The adenovirus type 5 E1B-55K oncoprotein is a highly active shuttle protein and shuttling is independent of E4orf6, p53 and Mdm2. *Oncogene* 19, 850-857 (2000).
- Lallemand-Breitenbach, V. & De Thé, H. PML Nuclear Bodies. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 2, a000661 (2010).
- Lam, W.Y., Yeung, A.C.M. & Chan, P.K.S. Apoptosis, cytokine and chemokine induction by non-structural 1 (NS1) proteins encoded by different influenza subtypes. *Virology Journal* 8, 554 (2011).
- Lee, H.-R. et al. Ability of the Human Cytomegalovirus IE1 Protein To Modulate Sumoylation of PML Correlates with Its Functional Activities in Transcriptional Regulation and Infectivity in Cultured Fibroblast Cells. *Journal of Virology* 78, 6527-6542 (2004a).

- Lee, H.-R. & Ahn, J.-H. Sumoylation of the major immediate-early IE2 protein of human cytomegalovirus Towne strain is not required for virus growth in cultured human fibroblasts. *The Journal of general virology* 85, 2149-2154 (2004b).
- Lee, H.-R. et al. N-terminal determinants of human cytomegalovirus IE1 protein in nuclear targeting and disrupting PML-associated subnuclear structures. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 356, 499-504 (2007).
- Lee, J.M. et al. PIAS1 enhances SUMO-1 modification and the transactivation activity of the major immediate-early IE2 protein of human cytomegalovirus. *FEBS Letters* 555, 322-8 (2003).
- Lethbridge, K.J., Scott, G.E. & Leppard, K.N. Nuclear matrix localization and SUMO-1 modification of adenovirus type 5 E1b 55K protein are controlled by E4 Orf6 protein. *The Journal of general virology* 84, 259-268 (2003).
- Li, R. et al. SUMO binding by the Epstein-Barr virus protein kinase BGLF4 is crucial for BGLF4 function. *Journal of Virology* SUMO Binding by the Epstein-Barr Virus Protein Kinase BGLF4 is Crucial for BGLF4 Function. *Journal of virology*. ISSN 0022538X, DOI: 10.1128/JVI.00314-12 (2012).
- Li, S.J. & Hochstrasser, M. A new protease required for cell-cycle progression in yeast. *Nature* 398, 246-251 (1999).
- Lin, D.Y. et al. Role of SUMO-interacting motif in Daxx SUMO modification, subnuclear localization, and repression of sumoylated transcription factors. *Molecular Cell* 24, 341-354 (2006).
- Lin, J., Johannsen, E., Robertson, E. & Kieff, E. Epstein-Barr Virus Nuclear Antigen 3C Putative Repression Domain Mediates Coactivation of the LMP1 Promoter with EBNA-2. *Journal of Virology* 76, 232-242 (2002).
- Liu, S.-T. et al. Sumoylation of Rta of Epstein-Barr virus is preferentially enhanced by PIASxbeta. *Virus Research* 119, 163-170 (2006).
- Lois, L.M. & Lima, C.D. Structures of the SUMO E1 provide mechanistic insights into SUMO activation and E2 recruitment to E1. *the European Molecular Biology Organization Journal* 24, 439-451 (2005).
- Luo, Y. et al. Trans-regulation of histone deacetylase activities through acetylation. *The Journal of Biological Chemistry* 284, 34901-34910 (2009).
- Mahajan, R., Delphin, C., Guan, T., Gerace, L. & Melchior, F. A small ubiquitin-related polypeptide involved in targeting RanGAP1 to nuclear pore complex protein RanBP2. *Cell* 88, 97-107 (1997).
- Marušič, M.B., Mencin, N., Ličen, M., Banks, L. & Grm, H.Š. Modification of human papillomavirus minor capsid protein L2 by sumoylation. *Journal of Virology* 84, 11585-11589 (2010).
- Matunis, M.J., Coutavas, E. & Blobel, G. A novel ubiquitin-like modification modulates the partitioning of the Ran-GTPase-activating protein RanGAP1 between the cytosol and the nuclear pore complex. *The Journal of Cell Biology* 135, 1457-1470 (1996).
- Miller, D.L., Rickards, B., Mashiba, M., Huang, W. & Flint, S.J. The adenoviral E1B 55-kilodalton protein controls expression of immune response genes but not p53-dependent transcription. *Journal of Virology* 83, 3591-3603 (2009).
- Minegishi, Y. & Karasuyama, H. Defects in Jak-STAT-mediated cytokine signals cause hyper-IgE syndrome: lessons from a primary immunodeficiency. *International Immunology* 21, 105-112 (2009).
- Moutty, M.C., Sakin, V. & Melchior, F. Importin  $\alpha/\beta$  mediates nuclear import of individual SUMO E1 subunits and of the holo-enzyme. *Molecular Biology of the Cell* 22, 652-660 (2011).
- Mukhopadhyay, D., Arnautov, A. & Dasso, M. The SUMO protease SENP6 is essential for inner kinetochore assembly. *The Journal of Cell Biology* 188, 681-692 (2010).
- Muller, S. & Dobner, T. The adenovirus E1B-55K oncoprotein induces SUMO modification of p53. *Cell cycle Georgetown Tex* 7, 754-758 (2008).
- Müller, S. & Dejean, A. Viral Immediate-Early Proteins Abrogate the Modification by SUMO-1 of PML and Sp100 Proteins, Correlating with Nuclear Body Disruption. *Journal of Virology* 73, 5137-5143 (1999).
- Murata, T. et al. Transcriptional repression by sumoylation of Epstein-Barr virus BZLF1 protein correlates with association of histone deacetylase. *The Journal of Biological Chemistry* 285, 23925-23935 (2010).
- Nayak, D.P., Balogun, R.A., Yamada, H., Zhou, Z.H. & Barman, S. Influenza virus morphogenesis and budding. *Virus Research* 143, 147-161 (2009).
- Nevels, M., Brune, W. & Shenk, T. SUMOylation of the human cytomegalovirus 72-kilodalton IE1 protein facilitates expression of the 86-kilodalton IE2 protein and promotes viral replication. *Journal of Virology* 78, 7803-7812 (2004).
- Nishida, T. & Yamada, Y. The nucleolar SUMO-specific protease SMT3IP1/SENP3 attenuates Mdm2-mediated p53 ubiquitination and degradation. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 406, 285-291 (2011).

- Noso, S. et al. Association of small ubiquitin-like modifier 4 (SUMO4) variant, located in IDDM5 locus, with type 2 diabetes in the Japanese population. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 92, 2358-2362 (2007).
- Ocwieja, K.E. et al. HIV Integration Targeting: A Pathway Involving Transportin-3 and the Nuclear Pore Protein RanBP2. *PLoS Pathogens* 7, 14 (2011).
- Okura, T. et al. Protection against Fas/APO-1- and tumor necrosis factor-mediated cell death by a novel protein, sentrin. *The Journal of Immunology* 157, 4277-4281 (1996).
- O'Shea, J.J., Gadina, M. & Schreiber, R.D. Cytokine signaling in 2002: new surprises in the Jak/Stat pathway. *Cell* 109 Suppl, S121-31 (2002).
- Ott, D.E., et al. Ubiquitination of HIV-1 and MuLV Gag. *Virology* 278, 111-121 (2000).
- Pal, S., Rosas, J.M. & Rosas-Acosta, G. Identification of the non-structural influenza A viral protein NS1A as a bona fide target of the Small Ubiquitin-like MOdifier by the use of dicistronic expression constructs. *Journal of Virological Methods* 163, 498-504 (2010).
- Pal, S., Santos, A., Rosas, J.M., Ortiz-Guzman, J. & Rosas-Acosta, G. Influenza A virus interacts extensively with the cellular SUMOylation system during infection. *Virus Research* 158, 12-27 (2011).
- Pennella, M.A., Liu, Y., Woo, J.L., Kim, C.A. & Berk, A.J. Adenovirus E1B 55-Kilodalton Protein Is a p53-SUMO1 E3 Ligase That Represses p53 and Stimulates Its Nuclear Export through Interactions with Promyelocytic Leukemia Nuclear Bodies. *Journal of Virology* 84, 12210-12225 (2010).
- Perez, J.T. et al. Influenza A virus-generated small RNAs regulate the switch from transcription to replication. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107, 11525-11530 (2010).
- Pichler, A., Gast, A., Seeler, J.S., Dejean, A. & Melchior, F. The nucleoporin RanBP2 has SUMO1 E3 ligase activity. *Cell* 108, 109-20 (2002).
- Qi, M. & Aiken, C. Nef enhances HIV-1 infectivity via association with the virus assembly complex. *Virology* 373, 287-297 (2008).
- Queredo, E. et al. Degradation of p53 by adenovirus E4orf6 and E1B55K proteins occurs via a novel mechanism involving a Cullin-containing complex. *Genes & Development* 15, 3104-3117 (2001).
- Ran, Y. et al. SENP2 negatively regulates cellular antiviral response by deSUMOylating IRF3 and conditioning it for ubiquitination and degradation. *Journal of molecular cell biology* 3, 283-92 (2011).
- Rangasamy, D., Woytek, K., Khan, S.A. & Wilson, V.G. SUMO-1 modification of bovine papillomavirus E1 protein is required for intranuclear accumulation. *The Journal of Biological Chemistry* 275, 37999-38004 (2000a).
- Rangasamy, D. Bovine papillomavirus E1 protein is sumoylated by the host cell Ubc9 protein. *Journal of Biological Chemistry* 275, 30487-30495. (2000b).
- Regad, T. & Chelbi-Alix, M.K. Role and fate of PML nuclear bodies in response to interferon and viral infections. *Oncogene* 20, 7274-86 (2001).
- Resa-Infante, P., Jorba, N., Coloma, R. & Ortin, J. The influenza virus RNA synthesis machine: advances in its structure and function. *Rna Biology* 8, 207-215 (2011).
- Rosas-Acosta, G., Langereis, M.A., Deyrieux, A. & Wilson, V.G. Proteins of the PIAS family enhance the sumoylation of the papillomavirus E1 protein. *Virology* 331, 190-203 (2005).
- Rosas-Acosta, G. & Wilson, V.G. Identification of a nuclear export signal sequence for bovine papillomavirus E1 protein. *Virology* 373, 149-162 (2008).
- Rosendorff, A. et al. EBNA3C Coactivation with EBNA2 Requires a SUMO Homology Domain. *Journal of Virology* 78, 367-377 (2004).
- Rubio, I. et al. The N-terminal region of the human papillomavirus L2 protein contains overlapping binding sites for neutralizing, cross-neutralizing and non-neutralizing antibodies. *Virology* 409, 348-359 (2011).
- Saffert, R.T. & Kalejta, R.F. Inactivating a Cellular Intrinsic Immune Defense Mediated by Daxx Is the Mechanism through Which the Human Cytomegalovirus pp71 Protein Stimulates Viral Immediate-Early Gene Expression. *Journal of Virology* 80, 3863-3871 (2006).
- Saha, A. et al. Epstein-Barr Virus Nuclear Antigen 3C Facilitates G1-S Transition by Stabilizing and Enhancing the Function of Cyclin D1. *PLoS Pathogens* 7, 18 (2011).
- Saitoh, H. & Hinchev, J. Functional heterogeneity of small ubiquitin-related protein modifiers SUMO-1 versus SUMO-2/3. *The Journal of Biological Chemistry* 275, 6252-6258 (2000).

- Samji, T. Influenza A: Understanding the Viral Life Cycle. *The Yale journal of biology and medicine* 82, 153-159 (2009).
- Shimizu, T., Takizawa, N., Watanabe, K., Nagata, K. & Kobayashi, N. Crucial role of the influenza virus NS2 (NEP) C-terminal domain in M1 binding and nuclear export of vRNP. *FEBS Letters* 585, 41-46 (2011).
- Shen, L., Dong, C., Liu, H., Naismith, J. & Hay, R. The structure of SENP1-SUMO-2 complex suggests a structural basis for discrimination between SUMO paralogs during processing. *The Biochemical journal* 397, 279-288 (2006).
- Shen, L.N., Geoffroy, M.-C., Jaffray, E.G. & Hay, R.T. Characterization of SENP7, a SUMO-2/3-specific isopeptidase. *The Biochemical journal* 421, 223-30 (2009).
- Shen, T.H., et al. The mechanisms of PML-nuclear body formation. *Molecular Cell* 24, 331-339 (2006).
- Shen, Z., Pardington-Purtymun, P.E., Comeaux, J.C., Moyzis, R.K. & Chen, D.J. UBL1, a human ubiquitin-like protein associating with human RAD51/RAD52 proteins. *Genomics* 36, 271-279 (1996).
- Shestakova, E., Bandu, M.-T., Doly, J. and Bonnefoy, E. Inhibition of histone deacetylation induces constitutive derepression of the beta interferon promoter and confers antiviral activity. *Journal of Virology* 75, 3444-3452 (2001).
- Schmid, M. et al. The E3 ubiquitin ligase activity associated with the adenoviral E1B-55K-E4orf6 complex does not require CRM1-dependent export. *Journal of Virology* 85, 7081-7094 (2011).
- Schreiner, S. et al. Proteasome-Dependent Degradation of Daxx by the Viral E1B-55K Protein in Human Adenovirus-Infected Cells. *Journal of Virology* 84, 7029-7038 (2010).
- Schreiner, S. et al. Adenovirus Type 5 Early Region 1B 55K Oncoprotein-Dependent Degradation of Cellular Factor Daxx Is Required for Efficient Transformation of Primary Rodent Cells. *Journal of Virology* 85, 8752-8765 (2011).
- Schwamborn, K. et al. SUMO assay with peptide arrays on solid support: insights into SUMO target sites. *Journal of Biochemistry* 144, 39-49 (2008).
- Spengler, M.L., et al. SUMO-1 modification of human cytomegalovirus IE1/IE72. *Journal of Virology* 76, 2990-2996 (2002).
- Strunze, S. et al. Kinesin-1-Mediated Capsid Disassembly and Disruption of the Nuclear Pore Complex Promote Virus Infection. *Cell Host Microbe* 10, 210-223 (2011).
- Stubenrauch, F. & Laimins, L.A. Human papillomavirus life cycle: active and latent phases. *Seminars in Cancer Biology* 9, 379-386 (1999).
- Su, H.-L. & Li, S.S.-L. Molecular features of human ubiquitin-like SUMO genes and their encoded proteins. *Gene* 296, 65-73 (2002).
- Tavalai, N., et al. Evidence for a Dual Antiviral Role of the Major Nuclear Domain 10 Component Sp100 during the Immediate-Early and Late Phases of the Human Cytomegalovirus Replication Cycle. *Journal of Virology* 85, 9447-9458 (2011).
- Tsurumi, T., Daikoku, T. & Nishiyama, Y. Further characterization of the interaction between the Epstein-Barr virus DNA polymerase catalytic subunit and its accessory subunit with regard to the 3'-to-5' exonucleolytic activity and stability of initiation complex at primer terminus. *Journal of Virology* 68, 3354-3363 (1994).
- Vannucchi, S. et al. Interferon-beta induces S phase slowing via up-regulated expression of PML in squamous carcinoma cells. *Oncogene* 19, 5041-5053 (2000).
- Walker, S., et al. A 10-base-pair element of the human immunodeficiency virus type 1 long terminal repeat (LTR) is an absolute requirement for transactivation by the human cytomegalovirus 72-kilodalton IE1 protein but can be compensated for by other LTR regions in transactivation by the 80-kilodalton IE2 protein. *Journal of Virology* 66, 1543-1550 (1992).
- Wang, D. et al. The Lack of an Inherent Membrane Targeting Signal Is Responsible for the Failure of the Matrix (M1) Protein of Influenza A Virus To Bud into Virus-Like Particles. *Journal of Virology* 84, 4673-4681 (2010).
- Wang, L., Grossman, S.R. & Kieff, E. Epstein-Barr virus nuclear protein 2 interacts with p300, CBP, and PCAF histone acetyltransferases in activation of the LMP1 promoter. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 430-435 (2000).
- Watanabe, K. et al. Identification of Hsc70 as an influenza virus matrix protein (M1) binding factor involved in the virus life cycle. *FEBS Letters* 580, 5785-90 (2006).
- Wei, X. et al. Physical and functional interactions between PML and MDM2. *The Journal of Biological Chemistry* 278, 29288-29297 (2003).
- Weigel, S. & Dobbstein, M. The Nuclear Export Signal within the E4orf6 Protein of Adenovirus Type 5 Supports Virus Replication and Cytoplasmic Accumulation of Viral mRNA. *Journal of Virology* 74, 764-772 (2000).

- Weldon, R.A., Sarkar, P., Brown, S.M. & Weldon, S.K. Mason-Pfizer monkey virus Gag proteins interact with the human sumo conjugating enzyme, hUbc9. *Virology* 314, 62-73 (2003).
- Wimmer, P. et al. SUMO modification of E1B-55K oncoprotein regulates isoform-specific binding to the tumour suppressor protein PML. *Oncogene* 29, 5511-5522 (2010).
- Woo, C.-H. & Abe, J.-I. SUMO--a post-translational modification with therapeutic potential? *Current Opinion in Pharmacology* 10, 146-155 (2010).
- Wu, C.-Y., Jeng, K.-S. & Lai, M.M.-C. The SUMOylation of matrix protein M1 modulates the assembly and morphogenesis of influenza A virus. *Journal of Virology* 85, 6618-6628 (2011).
- Wu, F., Chiocca, S., Beck, W.T. & Mo, Y.-Y. Gam1-associated alterations of drug responsiveness through activation of apoptosis. *Molecular Cancer Therapeutics* 6, 1823-1830 (2007).
- Wu, L. et al. Epstein-Barr Virus LF2: an Antagonist to Type I Interferon. *Journal of Virology* 83, 1140-1146 (2009).
- Wu, S.-Y. & Chiang, C.-M. Crosstalk between sumoylation and acetylation regulates p53-dependent chromatin transcription and DNA binding. *The European Molecular Biology Organization Journal* 28, 1246-1259 (2009).
- Wu, Y.-C., Bian, X.-L., Heaton, P.R., Deyrieux, A.F. & Wilson, V.G. Host cell sumoylation level influences papillomavirus E2 protein stability. *Virology* 387, 176-183 (2009).
- Wu, Y.-C., Roark, A.A., Bian, X.-L. & Wilson, V.G. Modification of papillomavirus E2 proteins by the small ubiquitin-like modifier family members (SUMOs). *Virology* 378, 329-338 (2008).
- Xu, K. et al. Modification of Nonstructural Protein 1 of Influenza A Virus by SUMO1. *Journal of Virology* 85, 1086-1098 (2011).
- Xu, Y. et al. Proteasome-independent disruption of PML oncogenic domains (PODs), but not covalent modification by SUMO-1, is required for human cytomegalovirus immediate-early protein IE1 to inhibit PML-mediated transcriptional repression. *Journal of Virology* 75, 10683-10695 (2001).
- Xu, Z. & Au, S. . Mapping residues of SUMO precursors essential in differential maturation by SUMO-specific protease, SENP1. *The Biochemical journal* 386, 325-330 (2005).
- Yap, M.W., Nisole, S., Lynch, C. & Stoye, J.P. Trim5alpha protein restricts both HIV-1 and murine leukemia virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 10786-10791 (2004).
- Yasugi, T. & Howley, P.M. Identification of the structural and functional human homolog of the yeast ubiquitin conjugating enzyme UBC9. *Nucleic Acids Research* 24, 2005-2010 (1996).
- Yu, J.-H., et al. Mitogen-Activated Protein Kinases Activate the Nuclear Localization Sequence of Human Papillomavirus Type 11 E1 DNA Helicase To Promote Efficient Nuclear Import. *Journal of Virology* 81, 5066-5078 (2007).
- Yueh, A. et al. Interaction of moloney murine leukemia virus capsid with Ubc9 and PIASy mediates SUMO-1 addition required early in infection. *Journal of Virology* 80, 342-352 (2006).
- Zamborlini, A. et al. Impairment of human immunodeficiency virus type-1 integrase SUMOylation correlates with an early replication defect. *The Journal of Biological Chemistry* 286, 21013-21022 (2011).
- Zhang, G. et al. HPV-16E6 can induce multiple site phosphorylation of p53. *Oncology Reports* 21, 371-377 (2009).
- Zhang, X.-D. et al. SUMO-2/3 modification and binding regulate the association of CENP-E with kinetochores and progression through mitosis. *Molecular Cell* 29, 729-741 (2008).
- Zhang, Z. et al. Evidence that the Human Cytomegalovirus IE2-86 Protein Binds mdm2 and Facilitates mdm2 Degradation. *Journal of Virology* 80, 3833-3843 (2006).