

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

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



Anna Fabiánová

Vlastnosti a funkce středního T antigenu myšního polyomaviru

Properties and function of middle T antigen of the murine  
polyomavirus

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Školitel: Doc. RNDr. Jitka Forstová, CSc.

Praha 2012

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci na téma „Vlastnosti a funkce středního T antigenu myšího polyomaviru“ 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 Červeném Kostelci, dne 12.5.2012

Podpis

Děkuji Doc. RNDr. Jitce Forstové, CSc. za cenné připomínky a rady při vypracování bakalářské práce.

## Obsah

Seznam použitých zkratek.....	2
Abstrakt.....	5
1. Úvod.....	6
2. Polyomaviry .....	6
2.1. Historie.....	6
2.2. Nově objevené polyomaviry .....	7
2.3. Stavba virionu a genom.....	7
2.4. Replikační cyklus myšího polyomaviru.....	9
3. Střední T antigen .....	11
3.1. Struktura a asociace s buněčnými membránami .....	11
3.2. Funkce .....	12
4. Interakce s proteiny .....	13
4.1. Interakce s protein fosfatázou 2A .....	13
4.2. Interakce s kinázami rodiny Src .....	16
4.3. Interakce s Shc proteinem .....	18
4.4. Interakce s fosfatidilinositol 3 kinázou .....	20
4.5. Interakce s fosfolipázou Cyl .....	21
4.6. Interakce s proteinem 14-3-3 .....	22
4.7. DNAJ doména MT antigenu .....	22
4.8. Oblast MT antigenu bohatá na prolin.....	23
4.9. Shrnutí interakce středního T antigenu s proteiny .....	23
5. Nádorová transformace indukovaná MT antigenem.....	24
5.1. Obecné charakteristiky.....	24
5.2. Interakce rakovinných buněk se stroma .....	26
5.3. Schopnost metastázovat .....	26
6. Závěr .....	28
7. Seznam užití literatury.....	30

## Seznam použitých zkratk

(pokud není uveden český výraz, nepoužívá se)

<b>Arg</b>	arginine	arginin
<b>Akt 1,2,3; PKB</b>	protein kinase B	protein kináza B
<b>AP – 1</b>	activating protein 1	aktivační protein 1
<b>ARF</b>	adenosine diphosphate ribosylation factor	
<b>Asn</b>	asparagine	asparagin
<b>Asp</b>	aspartic acid	kyselina asparagová
<b>C-konec</b>	carboxyl terminus	karboxylový konec
<b>CH1</b>	central prolin rich region	centrální oblast bohatá na prolin
<b>CSF – 1</b>	colony stimulating factor	
<b>c- Src kináza</b>	cell sarcoma kinase	
<b>cys</b>	cysteine	cystein
<b>DNA</b>	deoxyribonucleic acid	deoxyribonukleová kyselina
<b>ECM</b>	extracellular matrix	extracelulární matrix
<b>EGF</b>	epidermal growth factor	epidermální růstový faktor
<b>ER</b>	endoplasmic reticulum	endoplazmatické retikulum
<b>Ets2</b>	v-ets erythroblastosis virus E26 oncogene homolog 2 (avian)	
<b>FAK kináza</b>	focal adhesion kinase	
<b>Gab 1</b>	Grb-2 associated binding protein 1	
<b>GDP</b>	guanosine diphosphate	guanosin difosfát
<b>Glu</b>	glutamic acid	kyselina glutamová
<b>Gly</b>	glycine	glycin
<b>Grb2</b>	Growth factor receptor-bound protein 2	
<b>GTP</b>	guanosine triphosphate	guanosin trifosfát
<b>HaPyV</b>	hamster polyomavirus	polyomavirus křečka
<b>Hck kináza</b>	hemopoietic cell kinase	
<b>HpyV6</b>	human polyomavirus 6	lidský polyomavirus 6
<b>HpyV7</b>	human polyomavirus 7	lidský polyomavirus 7

<b>HpyV9</b>	human polyomavirus 9	lidský polyomavirus 9
<b>Hsc70</b>	70 – kDa „heat shock“ protein	70 – kDa velký protein „tepelného šoku“
<b>IL2</b>	interleukin 2	interleukin 2
<b>IL3</b>	interleukin 3	interleukin 3
<b>KIPyV</b>	Karolinska Institut polyomavirus	polyomavirus Karolinska Institut
<b>Lck kináza</b>	lymphocyte-specific protein tyrosine kinase	
<b>Leu</b>	leucine	leucin
<b>LT antigen</b>	large T antigen	velký T antigen
<b>Lys</b>	lysine	lysin
<b>MAP kinase</b>	mitogen activated protein kinase	
<b>MCC</b>	Merckel cell carcinoma	
<b>MCPyV</b>	Merckel cell polyomavirus	polyomavirus Merkelových buňek
<b>MDM2</b>	murine double minute 2 protein	
<b>Met</b>	methionine	methionin
<b>MLV</b>	murine leukemia virus	virus myši leukémie
<b>MMTV-PyVMT</b>	mouse mammary tumour virus – polyoma middle T	
<b>MMP</b>	metalloproteinase	metaloproteinázy
<b>MpyV</b>	mouse polyomavirus	myší polyomavirus
<b>mRNA</b>	messenger ribonucleic acid	mediátorová ribonukleová kyselina
<b>MT antigen</b>	middle T antigen	střední T antigen
<b>Neu, ErbB2, HER2</b>	Human epidermal growth factor receptor	
<b>N-konec</b>	amino – terminus	amino konec
<b>PEA1</b>	polyomavirus enhancer A binding protein 1	
<b>PDK1</b>	pyruvate dehydrogenase lipoamide kinase isozyme 1	pyruvát dehydrogenáza lipoamid kináza 1
<b>PH domain</b>	plackstrin homology domain	
<b>PI3K</b>	phosphoinositide 3-kinase	fosfatidyl inositol 3 kináza

<b>PKC</b>	protein kinaseC	protein kináza C
<b>PLC<math>\gamma</math>1</b>	phospholipase C $\gamma$ 1	fosfolipáza C $\gamma$ 1
<b>PP2A</b>	protein phosphatase 2A	protein fosfatáza 2A
<b>Pro</b>	proline	prolin
<b>PTB doména</b>	phosphotyrosine – binding domain	
<b>PTK</b>	protein tyrosine kinase	protein tyrosin kináza
<b>Rb</b>	retinoblastoma tumor suppressor	
<b>RR</b>	regulatory region	RR oblast
<b>RTK</b>	receptor tyrosine kinase	tyrosin kinázový receptor
<b>S fáze</b>	synthesis phase	fáze syntézy
<b>SH1 doména</b>	src homology domain 1	doména homologní se src 1
<b>SH2 doména</b>	src homology domain 2	doména homologická se src 2
<b>SH3 doména</b>	src homology domain 3	doména homologická se src 3
<b>ShcA</b>	src homology 2 domain – containing transforming protein A	
<b>Sos1</b>	son of sevenless homolog 1	
<b>SRF</b>	serum response faktor	faktor odpovídající na serum
<b>ST antigen</b>	small T antigen	malý T antigen
<b>SV40</b>	Simian virus 40	Simian virus 40
<b>Taz</b>	tafazzin	
<b>T buňka</b>	T lymphocyte	T lymfocyt
<b>TCR</b>	T cell antigen receptor	T buněčný antigen receptor
<b>Thr</b>	threonine	threonin
<b>TSPyV</b>	Trichodysplasia spinulosa – associated polyomavirus	polyomavirus spojený s Trichodysplasií spinulosa
<b>Tyr</b>	tyrosine	tyrosin
<b>VP1</b>	viral protein 1	protein viru 1
<b>VP2</b>	viral protein 2	protein viru 2
<b>VP3</b>	viral protein 3	protein viru 3
<b>WUPyV</b>	Washington University polyomavirus	polyomavirus Washington University
<b>WW doména</b>	domain tryptophan - tryptophan	tryptofan – tryptofan doména
<b>Y</b>	tyrosine	tyrosin

## **Abstrakt**

Polyomaviry jsou malé DNA viry, které jsou schopné indukovat širokou škálu nádorů. U myšího polyomaviru (MPyV) se v indukci nádorové transformace uplatňuje zejména střední T antigen (MT antigen). MT antigen nemá vlastní enzymatickou aktivitu. Jeho funkce spočívá v aktivaci drah signální transdukce buňky, díky jeho schopnosti interagovat s určitými buněčnými proteiny. K těmto proteinům patří například protein fosfatáza 2A (PP2A), Src kináza, fosfatidyl inositol 3 kináza (PI3K), protein Shc, 14-3-3 protein nebo fosfolipáza C $\gamma$ 1 (PLC $\gamma$ 1). Tato práce je zaměřena na interakci MT antigenu s těmito buněčnými proteiny a na dopad této interakce na transformaci buněk. Protože je MT antigen silným onkogenem, práce se zabývá i charakterem transformovaných buněk a vývojem nádoru v epitelu mléčné žlázy myši.

**Klíčová slova:** polyomaviry, MT antigen, PP2A, PI3K, PLC $\gamma$ 1, protein Shc, protein 14-3-3 protein

## **Abstract**

Polyomaviruses are small DNA viruses, which are able to induce a broad variety of tumors. The main oncoprotein of the mouse polyomavirus (MPyV) is middle T antigen (MT antigen) which is able to transform cells. MT antigen has not an enzymatic activity of its own. It is able to activate signal transduction of host cells through its interactions with certain cellular proteins. These proteins include protein phosphatase 2A (PP2A), Src kinase, phosphatidylinositol 3 kinase (PI3K), Shc protein, 14-3-3 protein and phospholipase C $\gamma$ 1 (PLC $\gamma$ 1). This work is focused on interaction between MT antigen and cellular proteins and on the impact of this interaction on cell transformation. Since MT antigen is a potent oncogene, the work also deals with the character of transformed cells and tumor development in mouse mammary epithelium.

**Keywords:** polyomaviruses, MT antigen, PP2A, PI3K, PLC $\gamma$ 1, Shc protein, 14-3-3 protein



## 1. Úvod

Střední T antigen je spolu s velkým a malým T antigenem produktem rané transkripce myšího polyomaviru (*Tooze, 1981 cit. v Knipe a Howley, 2007*). Produkty rané transkripce deregulují buněčné procesy v buňce a připravují tak viru vhodné prostředí pro replikaci jeho DNA. Každý z těchto antigenů má určité funkce a mechanismy, kterými tento úkol plní. Střední T antigen je schopen aktivovat dráhu signální transdukce a transformovat buňky, velký T antigen má, mimo jiné, schopnost deregulovat buněčný cyklus, indukovat vstup buněk do S fáze a immortalizovat buňky. Součinnost všech tří T antigenů je schopna v buňkách nepermissivních pro reprodukční cyklus myšího polyomaviru navodit úplnou nádorovou transformaci.

Vzhledem k tomu, že jsou polyomaviry zcela závislé na buněčných proteinech a i replikace virového genomu je prováděna buněčným replikačním aparátem, je tato činnost časných virových antigenů řešením, jak umožnit viru přístup k mnoha buněčným enzymům potřebným k replikaci. Jinak řečeno, buňka v S-fázi má pohotovou zásobu replikačních enzymů, které virus může zneužít pro replikaci jeho DNA.

Po mnoho let jsou polyomaviry výtečným materiálem pro studium základních eukaryotických procesů, jako je transkripce, DNA replikace a úpravy RNA, a jsou zároveň důležitým modelem pro studium buněčné transformace. To dokazuje už to, že funkce proteinů jako je p53, Rb (retinoblastoma tumor suppressor) nebo fosfatidyl inositol 3 kináza, byly objeveny právě při výzkumu polyomavirů (*Jingwei et al., 2009*).

Studium středního T antigenu nám umožní pohled na funkci různých buněčných proteinů a drah signální transdukce buňky a zavede nás do problematiky vzniku a vývoje nádorové transformace. Některé tyto znalosti je možné mimo jiné aplikovat i na výzkum lidské rakoviny, jako je například karcinom prsu.

## 2. Polyomaviry

### 2.1. Historie

První zmínky o polyomavirech se váží k roku 1953. Prvním objevitelem byl Ludwik Gross, který si při výzkumu viru myší leukémie (murine leukemia virus, MLV) všiml, že za určitých podmínek se u myší vyvíjí nádor slinných nebo průdušních žláz namísto obvyklé leukémie. Po izolaci zjistil, že tyto nádory způsobuje virus s úplně jinými vlastnostmi, než má MLV (*Gross, 1953*).

Název polyomavirus tento patogen získal až díky Stewartovi, který zjistil, že tento virus dokáže u myši vytvořit mnoho typů nádorů (*Stewart et al., 1958*). Název tedy vznikl složením řeckého výrazu poly, který znamená mnoho, a výrazu oma, který symbolizuje slovo rakovina. Tento konkrétní typ polyomaviru je nyní nazýván myší polyomavirus (mouse polyomavirus, MPyV), a je zároveň polyomavirem, kterým se v této práci budu zabývat především.

Dalším intensivně studovaným polyomavirem je Simian virus 40 (SV40), který byl objeven v roce 1960 Sweetem a Hillemanem (*Sweet a Hilleman, 1960*). Tento virus byl izolován z jaterních buněk opice makak rhesus, které byly naočkovány kontaminovanou vakcínou polyomaviru. Onkogenní aktivita viru byla prokázána až při vpravení do buněk novorozených křečků (*Eddy et al., 1962*).

Následně objevené polyomaviry infikují celou škálu hostitelů. Patří sem například opice, člověk, dobytek, králíci, a dokonce i ptáci, konkrétně andulky. Zajímavým typem je polyomavirus křečka (hamster polyomavirus, HaPyV), který tím, že jeho viriony lze nalézt až v diferencovaných vrstvách tkáně, připomíná strategii papilomavirů (*Graffi et al., 1968*).

## **2.2. Nově objevené polyomaviry**

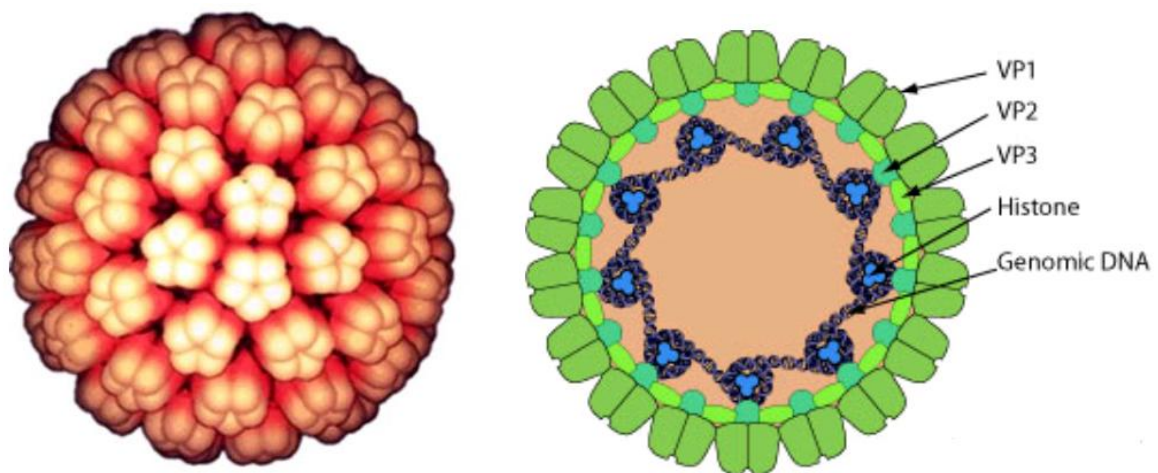
V nedávné době bylo objeveno sedm nových lidských polyomavirů. Patří k nim polyomavirus KI (Karolinska Institut polyomavirus, KIPyV) a polyomavirus WU (Washington University polyomavirus, WUPyV), které byly izolovány z výměšků dýchacích cest u pacientů s onemocněním dýchacích cest (*Sauvage et al., 2011*). Dalším virem je polyomavirus Merkelových buněk (Merkel cell polyomavirus, MCPyV) izolovaný z agresivního karcinomu kůže (Merkel cell carcinoma; MCC). Genom tohoto viru byl nalezen integrovaný v genomu MCC (*Babakir-Mina et al., 2011*). Následoval objev dalšího lidského polyomaviru Trichodysplasia spinulosa – associated polyomavirus (TSPyV), spojovaného s onemocněním kůže trichodysplasia spinulosa, které postihuje zejména obličej. Nedávno byl TSPyV objeven i v mimokožní tkáni (*Fischer et al., 2012*). Nejpozději objevenými polyomaviry jsou lidské polyomaviry 6, 7 a 9 (HPyV6, HPyV7, HPy9). Viry HPyV6 a HPyV7 byly stejně jako TSPyV izolovány z kůže (*Moens et al., 2011*).

## **2.3. Stavba virionu a genom**

Polyomaviry jsou malé neobalené viry (40-45 nm), jejichž genomem je dvouvláknová kruhová DNA. Kapsida má ikosahedrální symetrii a skládá se ze tří proteinů, VP1 (viral

protein 1), VP2 (viral protein 2) a VP3 (viral protein 3) (*Tooze, 1981 cit. v Knipe a Howley, 2007*).

Kapsida je složena ze 72 kapsomer, každá kapsomera je pentamer hlavního strukturního proteinu VP1. Pouze protein VP1 je vystaven na povrchu polyomavírové kapsidy. Minoritní proteiny VP2 a VP3 (delší a kratší forma téže sekvence) se nacházejí uvnitř kapsidy. Vždy jeden minoritní strukturní protein, VP2 nebo VP3, je nekovalentně připojen společným C-koncem (karboxylovým koncem) k centrální dutině pentameru VP1. N-konce (amino- konce) obou minoritních proteinů směřují dovnitř virové částice (*viz obr. 1; Stehle et al., 1996*).



### **Obr. 1: Struktura polyomaviru**

Nalevo je zobrazena kapsida polyomaviru skládající se ze 72 pentamerů proteinu VP1.

Převzato z <http://www.human-healths.com/bk-virus-infection/bk-virus-infection.php>

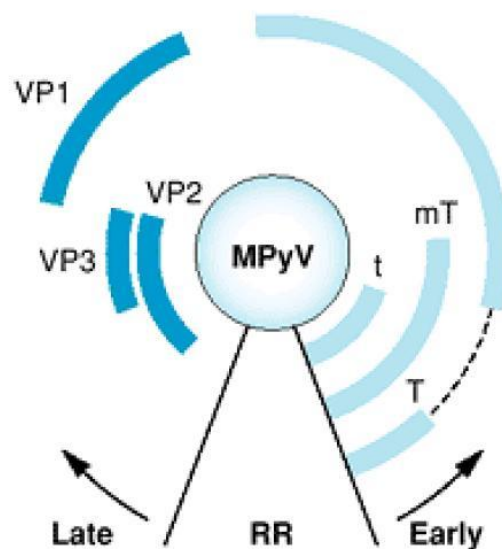
V pravé části je zobrazeno uspořádání proteinů v kapsidě viru. Na povrchu se nachází proteiny VP1, pod nimi střídavě VP2 a VP3 proteiny a v samém středu se nachází DNA viru obalená histony.

Převzato z [http://viralzone.expasy.org/all\\_by\\_species/58.html](http://viralzone.expasy.org/all_by_species/58.html)

Uvnitř kapsidy se nachází virová DNA v komplexu se všemi typy buněčných histonů, kromě histonu H1. Genom polyomaviru je velký přibližně 5 tisíc párů bází a dělí se do tří částí (*viz obr. 2*). Raná (early) část je oblast, jejíž transkripce probíhá před replikací viru a produkty syntetizované z časných mRNA (mediátorové ribonukleové kyseliny) se nazývají T antigeny. Tyto proteiny ovlivňují transkripci a replikaci viru, ale také buněčné procesy, jako je replikace buněčné DNA či buněčný cyklus. Dalo by se říci, že pozměňují prostředí buňky

tak, aby bylo příznivé pro replikaci viru. Další částí je pozdní (late) oblast. Geny této oblasti jsou exprimovány výrazně až po zahájení replikace viru a jejich produkty jsou proteiny kapsidy (VP1, VP2 a VP3). Časná a pozdní oblast jsou odděleny regulační oblastí (RR), jež zahrnuje počátek replikace (ori), časný a pozdní promotor a ostatní regulační elementy, jako je např. enhancer (Tooze, 1981 cit. v Knipe a Howley, 2007).

Každý polyomavirus kóduje malý T antigen (small T antigen, ST), velký T antigen (large T antigen, LT) a proteiny VP1, VP2 a VP3. V ostatních produktech translace se ale jednotlivé polyomaviry liší. MPyV a HaPyV obsahují na rozdíl od polyomavirů primátů střední T antigen (middle T antigen, MT), který je jejich hlavním onkogenem (Habel, 1965).

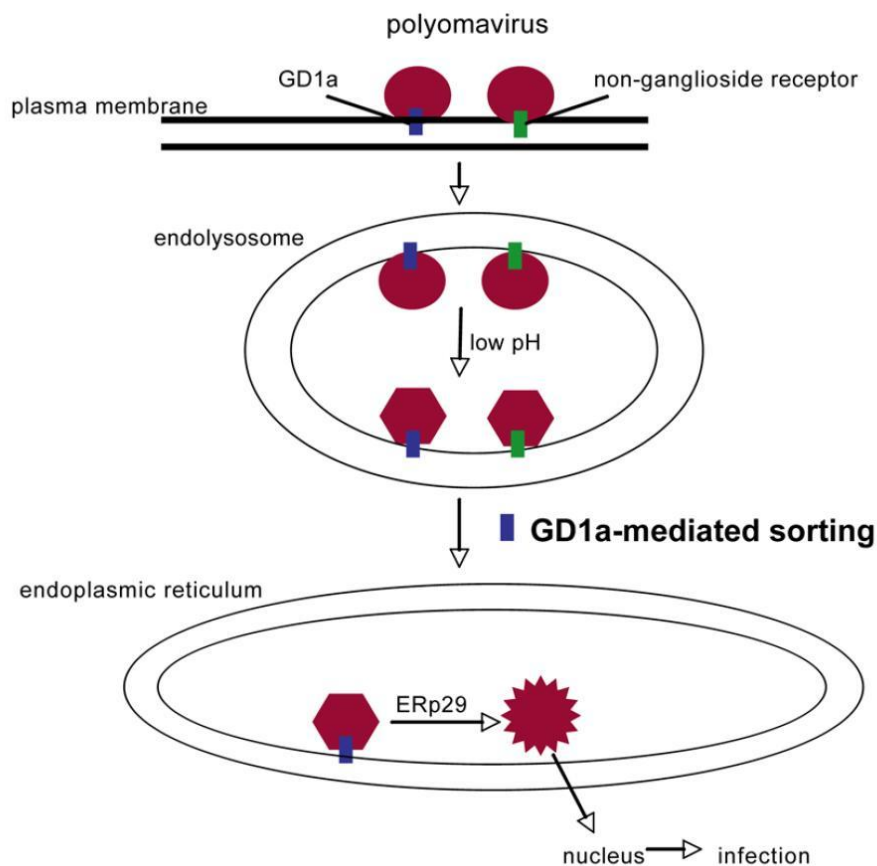


**Obr. 2: Zobrazení genomu Myšího polyomaviru**

Na levé straně se nacházejí produkty pozdní oblasti, trukturní proteiny VP1, VP2 a VP3 a na pravé straně produkty rané oblasti, velký, střední a malý T antigen. Šipky naznačují směr transkripce. Mezi nimi se nachází netranskribovaná regulační oblast (RR). Převzato z Knipe a Howley (2007).

## 2.4. Replikační cyklus myšího polyomaviru

Myší polyomavirus (MPyV) vstupuje do buňky receptor zprostředkovanou endocytózou. Jeho protein VP1 je odpovědný za interakci s receptorem na povrchu buňky, kterým je gangliosid GD1a. MPyV je dále dopraven do časných endozomů pozdního endolysosomálního kompartmentu, kde snížené pH navodí jeho konformační změnu, a následně je dopraven do endoplazmatického retikula (ER), kde dojde k částečnému rozvolnění, a soudí se, že odtud pronikne skrz membránu ER do cytoplasmy a poté je dopraven přes jaderné póry do jádra. Předpokládá se, že gangliosid GD1a je zodpovědný za transport polyomaviru z lysozomu do ER (viz obr. 3; Qian et al., 2009).



**Obr. 3: Receptor zprostředkovaná endocytóza myšího polyomaviru**

Na schématu je znázorněno schema endocytického pohybu virionů. Myší polyomaviry byly endocytovány po vazbě na receptor gangliosid GD1a, nebo přes interakci s jinou povrchovou molekulou zakončenou kyselinou sialovou. Do ER se dostaly jen ty viry, které byly navázaný na receptor GD1a. Převzato z Qian et al. (2009).

V jádře buňky začne probíhat raná transkripce virové DNA. Polyomaviry jsou malé viry zcela závislé na buňce. Většina enzymů použitých pro replikaci, transkripci a translaci jsou tedy buněčného původu. Pro transkripci genomu viru je používána buněčná RNA polymeráza II (*shnuto v Knipe a Howley, 2007*). Transkripce je zahajována z raného promotoru. Tento promotor je u MPyV regulován buněčnými faktory, jako je například PEA1 protein (polyomavirus enhancer A binding protein 1). Ten se váže na enhancer polyomaviru, a tím aktivuje transkripci a replikaci virového genomu (*Martin et al., 1988*).

Po dokončení transkripce jsou primární transkripty upraveny polyadenylací a alternativním sestřihem. Translace proteinů probíhá v cytoplasmě a proteiny jsou následně dopraveny do cílových míst. LT antigen se nachází převážně v jádře, ST antigen v jádře a cytoplasmě a MT antigen v plazmatické membráně (*shnuto v Fields a Knipe, 1991*).

Po zahájení rané transkripce nastane replikace virové DNA. Pro replikaci je velmi důležitý protein LT antigen, který indukuje vstup buňky do S fáze, a tím zajistí viru její enzymy potřebné k replikaci (*Decaprio et al., 1988*). Kromě toho LT antigen iniciuje replikaci virového genomu tím, že přivede buněčný replikační aparát k virovému replikačnímu počátku (ori), do kterého se LT antigen váže. Helikázová aktivita LT antigenu způsobí rozvolnění DNA řetězců v ori (*shrnuto v Simmons, 2000*). Replikace probíhá z ori oběma směry a končí po setkání dvou replikačních vidliček (*Crawford et al., 1973*).

Po nastartování replikace virus zahájí pozdní transkripci. Produkty pozdní transkripce, strukturální proteiny VP1, VP2 a VP3, jsou syntetizovány v cytoplasmě a poté jsou transportovány do jádra. V jádře pak probíhá morfogeneze virionů. Mechanismus vzniku virových částic není jasný, předpokládá se, že kapsida se zformuje kolem kondenzovaného virového minichromosomu, kde se nachází virová genomová DNA v komplexu s buněčnými histony (kromě histonu H1) (*shrnuto v Knipe a Howley, 2007*). Cyklus viru končí lyzí buňky (*Mattern et al., 1966*).

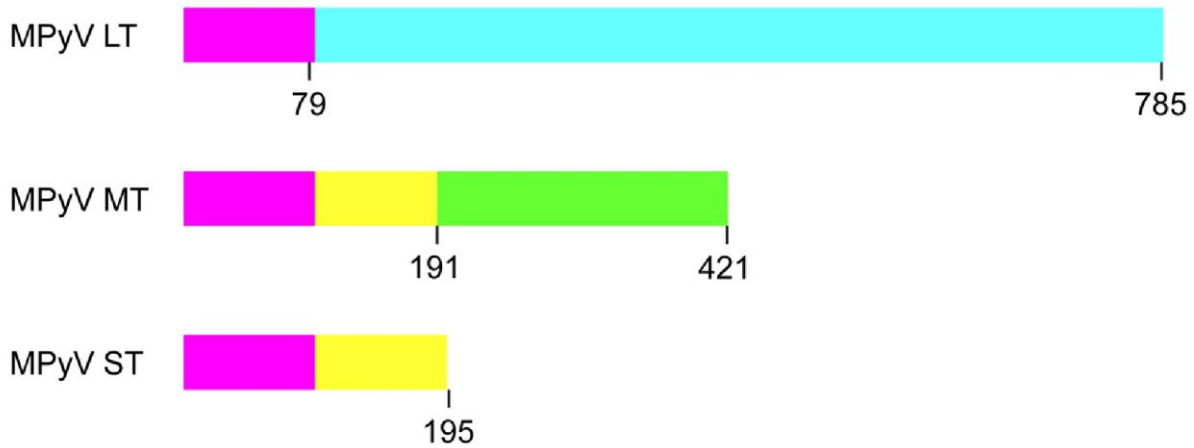
### 3. Střední T antigen

#### 3.1. Struktura a asociace s buněčnými membránami

Střední T antigen je protein o velikosti 421 aminokyselin a spolu s ST antigenem a LT antigenem je kódován v tzv. rané transkripční oblasti genomu myšího polyomaviru. Díky tomu, že mRNA těchto proteinů vznikají alternativním sestřihem ze společného primárního transkriptu, sdílí MT antigen s ostatními antigeny určité oblasti. S ST antigenem a LT antigenem sdílí 79 aminokyselin na jejich N-konci tzv. J doménu. Spolu s ST antigenem potom sdílí aminokyseliny 80-191. Poslední úsek, aminokyseliny 192 až 421, je unikátních (*viz obr. 4*).

MT antigen je transmembránový protein zakotven v cytoplasmatické membráně pomocí hydrofobní transmembránové domény na C-konci. Většina molekuly MT antigenu se nachází na intracelulární straně. Asociace MT antigenu s membránou a interakce jeho cytosolické části s buněčnými proteiny je podmínkou pro transformační účinky MT antigenu (*Carmichael et al., 1982*). Nedávno bylo dokázáno, že na extracelulární straně se nachází 6 C-koncových aminokyselin, jejichž přítomnost je rovněž důležitá pro transformační účinky MT antigenu (*Zhou et al., 2011*).

MT antigen je schopen se vázat i do vnitrobuněčných membrán, jako jsou například membrány endoplazmatického retikula (ER), zasazen do ER ovšem není schopen buňku transformovat (viz str. 24; Zhou et al., 2011).



**Obr. 4: T antigeny MPyV**

Fialovou barvou je znázorněna tzv. J doména (1-79 aminokyselin) společná pro všechny T antigeny. Modrá oblast je specifická pro LT antigen (80-785 aminokyselin) a zelená oblast pro MT antigen (192-421 aminokyselin). Žlutá barva vyznačuje společné sekvence MT a ST antigenů. Převzato z Jingwei et al. (2009).

### 3.2. Funkce

Nejvýraznější funkcí MT antigenu je schopnost transformovat buňky. Konstruovaný mutantní MPyV s funkčním malým a velkým T antigenem, ale nefunkčním středním T antigenem (jeho nefunkčnost byla dána neschopností navázat se na membránu buňky) nebyl schopen transformovat nepermissivní buňky. Tento pokus dokazuje, že z celého polyomaviru je za buněčnou transformaci odpovědný MT antigen (Carmichael et al., 1982).

LT antigen má n rozdíl od MT antigenu schopnost buňky immortalizovat. Mutantní MPyV, který nedává vzniknout funkčnímu LT antigenu, je stále schopen transformovat buňky a indukovat tumory (Freund et al., 1992a).

Nicméně bylo zjištěno, že k efektivní transformaci buněk potřebuje střední T antigen součinnost malého T antigenu. Žádný z raných transkriptů myšího polyomaviru neinaktivuje protein p53. Tento onkosupresor funguje v odpovědi na stresové faktory, jako je například poškození DNA, tím, že navozuje apoptózu (programovanou buněčnou smrt). Pro virus je tedy přítomnost tohoto proteinu velmi nevýhodná. Protein p53 je aktivován proteinem ARF, který váže jeho inhibitor MDM2. MT antigen aktivuje ARF - p53 buněčnou dráhu, což zeslabuje transformační účinky (Lomax a Fried, 2001). ST antigen tuto dráhu blokuje, a díky

tomu napomáhá k úspěšné transformaci buněk. Je možné, že je tato dráha blokována interakcí ARF s protein fosfatázou 2A (PP2A), se kterou ST antigen interaguje (*Moule et al., 2004*).

MT antigen sám dokáže indukovat signální dráhu, která vede k zabránění apoptózy, ale tato dráha není závislá na proteinu p53 (*viz str. 21*).

MT antigen má i jiné funkce v produktivním replikačním cyklu MPyV, které nesouvisí přímo s transformací buněk. Tyto funkce se týkají například replikace, transkripce a persistence viru. Mutantní polyomavirus se zkráceným MT nedokázal indukovat nádory v novorozenech myších a zároveň chyboval v replikaci viru a navození virové persistence (*Freund et al., 1992b*). Mutantní polyomaviry s defektními MT a ST antigeny v genetickém pozadí kmenu polyomaviru A2 měly defekt v morfogenezi virionů, zpožďovaly se v expresi LT antigenu a vyznačovaly se posuny v přechodu z rané do pozdní části transkripce (*Chen a Fluck, 2001*).

#### **4. Interakce s proteiny**

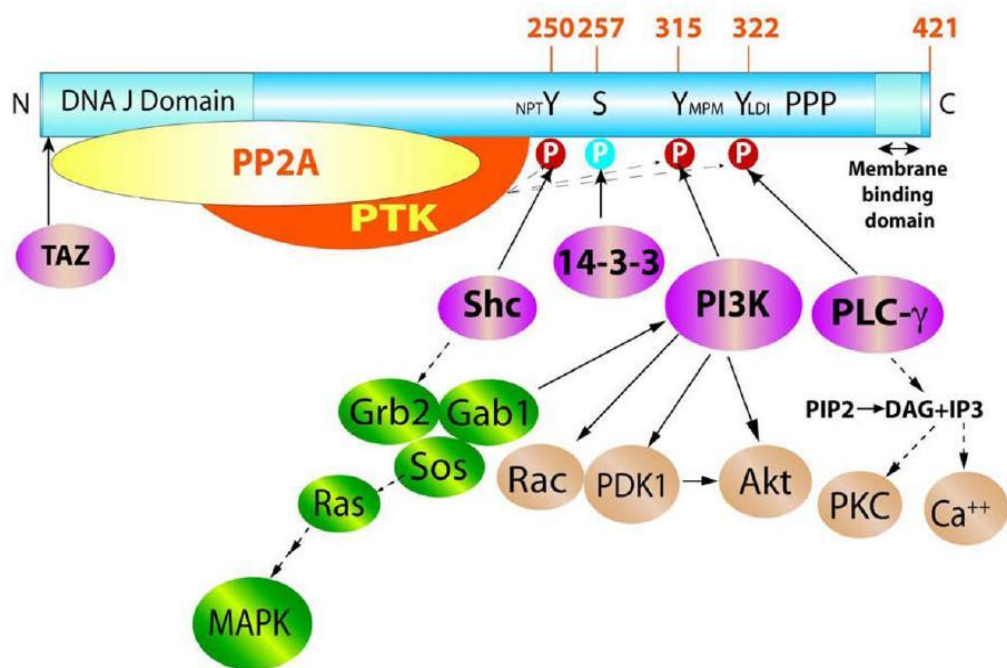
Střední T antigen sám o sobě nemá katalytickou aktivitu. Jeho transformační funkce je výsledkem interakcí s buněčnými proteiny drah signální transdukce (*Glenn a Eckhart, 1995*).

K těmto proteinům patří například protein fosfatáza 2A (PP2A), Src kináza, fosfatidyl inositol 3 kináza (PI3K), protein Shc (src homology 2 domain – containing transforming protein), 14-3-3 protein nebo fosfolipáza C $\gamma$ 1 (PLC $\gamma$ 1) (*viz obr. 5*).

##### **4.1. Interakce s protein fosfatázou 2A**

Prvním proteinem vázajícím se na MT antigen je protein fosfatáza 2A (PP2A) (*viz obr. 5*). Interaguje s ním v cytoplasmě ještě před jeho asociací s membránou ER. Tento fakt pravděpodobně souvisí s tím, že je PP2A spolu s transmembránovou doménou MT antigenu zodpovědná za následnou lokalizaci MT antigenu do cytoplasmatické membrány. Mutanty MT antigenu neschopné vázat PP2A byly lokalizovány výhradně ve vnitřních buněčných membránách jako je ER (*viz obr. 6; Zhou et al., 2011*).





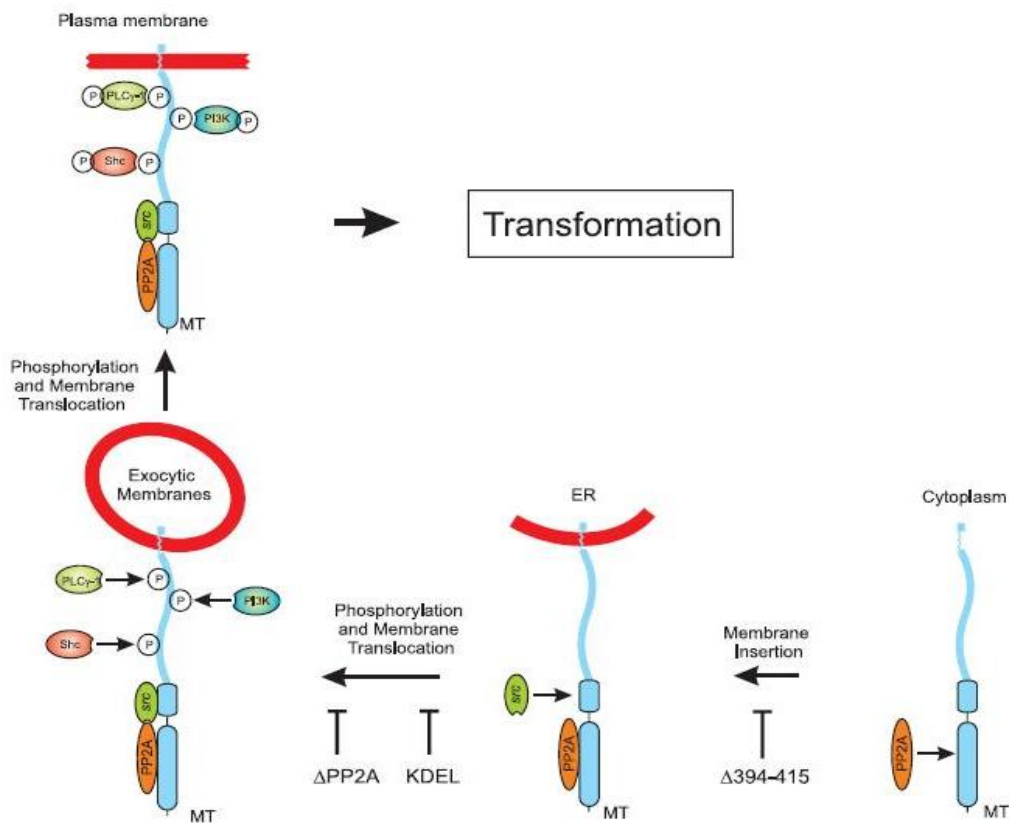
**Obr. 5: Interakce MT antigenu s proteiny aktivované signální dráhy**

Na MT antigenu písmena Y označují fosforylované tyrosiny, S fosforylovaný serin a písmena PPP oblast bohatou na prolin. Písmena PTK demonstrují protein tyrosin kinázu a PDK1 pyruvát dehydrogenázu lipoamid kinázu 1. Převzato z Jingwei et al. (2009).

PP2A je důležitá buněčná serin/threonin protein fosfatáza, která ovlivňuje mnoho buněčných dějů, jako je například transkripce, translace nebo replikace (*Schaffhausen a Roberts, 2009*). Potlačení její funkce může v kombinaci s některými onkoproteiny dokonce způsobit transformaci buněk (*Mumby, 2007*).

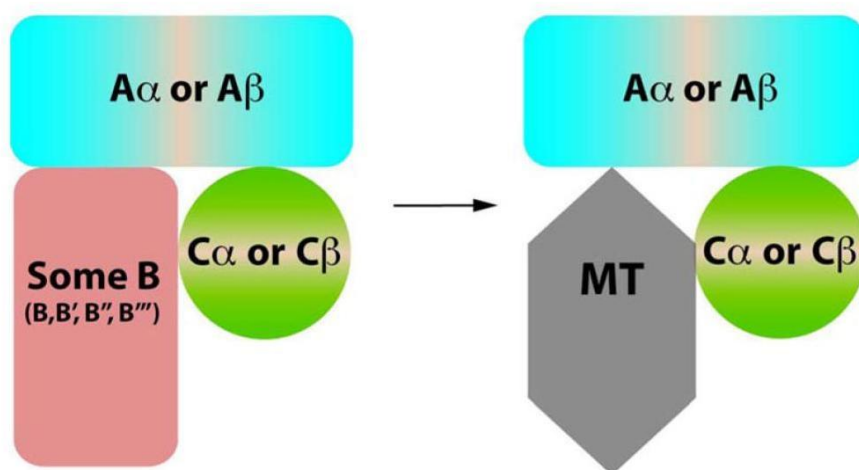
PP2A je trimerický ABC komplex složený z katalytické podjednotky C, regulační podjednotky B a regulační podjednotky A, která slouží jako kostra spojující podjednotky B a C dohromady. Podjednotky A (63 kDa) a C (36 kDa) mají každá dvě izoformy a podjednotky B jsou rozděleny do čtyř rodin (54, 55, 72 a 74 kDa) (*Glenn a Eckhart, 1995; Schaffhausen a Roberts, 2009*).

Vazba PP2A na MT antigen probíhá na jeho N-konci (*viz obr. 5*). Konkrétně je do interakce zahrnuto prvních 25 aminokyselin MT antigenu, aminokyseliny 105 až 111 (Cys-Arg-Met-Pro-Leu-Thr-Cys) a malé oblasti na N-konci bohaté na cystein (*Glenn a Eckhart, 1995*). Interakce MT antigenu s PP2A je velmi důležitá pro jeho schopnost transformovat buňky. Pokud není MT antigen schopen tuto fosfatázu navázat, ztrácí transformační schopnost (*Campbell et al., 1995*).



**Obr. 6: Schéma vazby jednotlivých proteinů na MT antigen**

Schéma je vedeno zprava. MT antigen je syntetizován v cytoplasmě na volných polyzomech, dále je veden přes endoplazmatické retikulum do exocytických membrán a nakonec do cytoplasmatické membrány. MT antigen mutovaný v hydrofobní oblasti ( $\Delta 395-414$ ) se neváže na membrány. MT antigen neschopný vázat PP2A ( $\Delta PP2A$ ) nebo mutant se zavedenou sekvencí KDEL není schopen opustit membránu ER. Převzato ze Zhou et al. (2011).



**Obr. 7: Interakce MT antigenu s PP2A**

MT antigen se váže na PP2A výměnou za její B podjednotku. A, B a C jsou podjednotky PP2A. Vyznačeny jsou i izoformy podjednotek A a C ( $\alpha$  a  $\beta$ ) a rodina podjednotek B (B, B', B'' a B'''). Převzato z Jingwei et al. (2009).

MT antigen se váže na podjednotky A a C PP2A tím, že nahradí regulační podjednotku B (viz obr. 7; Walter et al., 1990). S podjednotkou B sdílí motiv DKGG (aminokyseliny 44-47, Asp-Lys-Gly-Gly) (Glenn a Eckhart, 1995). Toto ovšem neplatí u rodiny B podjednotky 74 kDa, která s MT nemá homologii (Hendrix et al., 1993). Podjednotka A se skládá z 15 repetitivních sekvencí. Každá repetice je složena ze dvou alfa helixů. Helixy jsou mezi sebou spojeny smyčkami (intra – repeat loops), stejně tak jednotlivé repetice (inter repeat loops). MT antigen (i ST antigen) se váže na oblast druhé až osmé repetice (Zhou et al., 2003).

Vazba PP2A na MT antigen je podmínkou pro vazbu dalšího proteinu – tyrozin kinázy z rodiny Src (viz obr. 5 na str. 14). Proto MT antigen bez PP2A není schopen indukovat transformaci buněk. I přes svou katalytickou aktivitu se zdá, že PP2A slouží v komplexu s MT antigenem pouze jako kostra pro navázání Src kináz (Schaffhausen a Roberts, 2009, Ogris et al., 1997)

Katalytická aktivita PP2A by se ale neměla podceňovat. U malého T antigenu viru SV40 bylo prokázáno, že dokáže inhibovat nebo využívat katalytickou aktivitu PP2A. ST antigen váže PP2A podobným způsobem jako MT antigen. Ten ovšem váže obě dvě izoformy A podjednotky narozdíl od ST antigenu, který váže pouze podjednotku A alfa (Zhou et al., 2003). ST antigen například inhibuje defosforylaci LT antigenu a p53 tím, že svou interakcí inhibuje aktivitu formy PP2A složené pouze z podjednotky A a C (Scheidtmann et al., 1991). Dále inhibuje defosforylaci lehkého řetězce myosinu, myelinu a histonu H1, opět díky inhibici výše zmíněné formy PP2A (Yang et al., 1991). ST antigen také dokáže směřovat AC formu PP2A na androgenový receptor, a tím zprostředkovat jeho defosforylaci (Yang et al., 2005).

Otázkou však zůstává, jakým způsobem dokáže MT antigen měnit aktivitu PP2A. Zatím bylo zaznamenáno, že MT antigen interaguje s lipinem, a v důsledku této interakce je lipin defosforylován (Schaffhausen a Roberts, 2009). Lipin je fosfatáza, která defosforyluje kyselinu fosfatidovou v membráně, a tím dává vznik diacylglycerolu. Tento enzym hraje roli v regulaci metabolismu lipidů, ale funguje také jako transkripční faktor v jádře (Harris a Finck, 2011). Podrobnosti interakce lipinu s MT antigenem však ještě nejsou úplně známy.

#### **4.2. Interakce s kinázami rodiny Src**

Dalším buněčným proteinem asociovaným s MT antigenem je tyrosin kináza z rodiny Src (viz obr. 5 na str. 14). MT antigen asocijuje s kinázami Src (sarcoma kinase), Yes, Fyn,

ale neasocijuje s kinázami Lck (lymphocyte-specific protein tyrosine kinase) a Hck (hemopoietic cell kinase) (Louie et al., 1988, Dunant et al., 1996). Myší polyomavirus preferenčně váže Src (Courtneidge a Smith, 1983) a Yes (Kornbluth et al., 1987) a v menším měřítku váže Fyn (Cheng et al., 1988). Naopak polyomavirus křečka váže pouze Fyn (Courtneidge et al., 1991). MT antigen polyomaviru sice interaguje s více druhy kináz, ale po deleci genu pro kinázu c-Src bylo v zárodečných buňkách zjištěno, že nikoli kináza Yes, ale kináza Src je zodpovědná za indukci tumorů (Guy et al., 1994 cit. v Marcotte a Muller, 2008)

Src kináza je asociována s plasmatickou membránou a vnitrobuněčnými membránami (Kaplan et al., 1990). Interakce kinázy s MT antigenem je nezbytná pro transformaci buněk v kultuře a pro vývoj nádorů (Dunant et al., 1996). Tato interakce se odehrává v endoplazmatickém retikulu v momentě, kdy už je MT antigen zasazen do membrány (viz obr. 5 na str. 15; Zhou et al., 2011).

Prvních 14 aminokyselin na N-konci těchto tyrosin kináz a myristilace N-koncového glycinu jsou zodpovědné za asociaci s membránou (Kaplan et al., 1990). Za nimi se na N-konci nachází unikátní doména, zodpovědná za funkční specializaci kináz, SH3 (src homology 3) doména a SH2 (src homology 2) doména. Na C-konci kináz se nachází katalytická kinázová doména SH1 (src homology 1) následovaná 11 aminokyselinami C-koncové domény, která mimo jiné obsahuje i regulační fosforylační místo - tyrosin 527 (Y527) (Dunant et al., 1996).

Kinázy většinou využívají domény SH2 a SH3 pro interakci s jinými proteiny. V případě interakce s MT antigenem se ovšem tyto domény neuplatňují. Src se na MT antigen váže blízko C-konce, v oblasti aminokyselin 248-525, okolo oblasti kinázové domény (Dunant et al., 1996). Do vazby je překvapivě zahrnut i N-konec kinázy. Tento fakt byl zjištěn konstrukcí fúzní kinázy Src–Lck sestavené z N-konce Src kinázy a C-konce Lck kinázy. Lck samotná s MT neinteraguje, ve spojení s N-koncem Src kinázy ovšem ano (Louie et al., 1988).

Pro vazbu Src kináz na MT antigen je důležitá jeho předchozí vazba s PP2A. Src kinázy neexistují v komplexu s MT antigenem bez navázané fosfatázy. Pro vazbu kináz ovšem není potřeba katalytická aktivita této fosfatázy (Ogris et al., 1999). Na molekule MT antigenu jsou za interakci zodpovědné aminokyseliny 185-210 blízké jeho N-konci a jeho J doména (prvních 79 aminokyselin) (Glover et al., 1999; Whalen et al., 2005).

Na rozdíl od PP2A je pro transformaci buněk katalytická aktivita Src kinázy důležitá (Eckhart et al., 1979). Src kináza fosforyluje substrát pomocí své kinázové domény (Dunant

*et al., 1996*). Cílem její kinázové aktivity je MT antigen a kináza samotná. Nejdůležitějšími místy fosforylace na MT antigenu jsou tyrosiny 250, 315 a 322 (Y250, Y315, Y322) (*Harvey et al., 1984*). Další funkcí Src kinázy je aktivace FAK kinázy (focal adhesion kinase), která je důležitá pro přechod nádoru do plně transformovaného fenotypu (*viz str. 28*).

Aktivita Src kinázy je regulována především dvěma způsoby, fosforylací tyrosinu 527 a tyrosinu 416. Fosforylací tyrosinu 527 je inhibována aktivita kinázy, naopak fosforylace tyrosinu 416 má aktivační účinky. Je známo, že je aktivita Src kinázy v komplexu s MT antigenem zvýšena. Je tedy možné, že MT zvyšuje aktivitu tím, že zabraňuje fosforylací Y527 (*Courtneidge, 1985*). Samotná vazba kinázy na MT antigen je regulována fosforylací Y527. Fosforylace na tomto tyrosinu vede k jeho interakci s SH2 doménou a vzniku tzv. uzavřené konfigurace kinázy, na kterou se MT nedokáže navázat (*Liu et al., 1993, Roussel et al., 1991*). SH3 doména hraje v této konfiguraci stabilizující roli, jak bylo zjištěno u kinázy Lck (*Eck et al., 1994*). Tuto teorii podporuje fakt, že mutanty Src, které nemají SH2 a SH3 doménu, lépe váží MT antigen (*Dunant et al., 1996*).

MT antigen dále podporuje aktivitu Src kinázy fosforylací tyrosinu 416 (*Cartwrigh et al., 1986; Roskoski et al. 2005*).

#### **4.3. Interakce s Shc proteinem**

Na tyrosin 250 středního T antigenu, který je fosforylován Src protein kinázou, nasedá protein ShcA (Src homology 2 (SH2) – containing transforming protein A) (*viz obr. 5 na str. 14.; Campbell et al., 1994*).

Existují tři izoformy proteinu ShcA, p46, p52 a p66 (*Pelicci et al., 1992*). Tyto izoformy jsou složeny z N-koncové PTB domény (phosphotyrosine – binding domain), z centrální oblasti bohaté na prolin (CH1) a z C terminální SH2 domény (*Pelicci et al., 1992; Nicholson et al., 2001*).

ShcA jsou známy tím, že váží fosforylovanou NPXY (Asn-Pro-libovolná aminokyselina-Tyr) sekvenci na tyrosin kinázovém receptoru pomocí N-koncové PTB domény (*Pawson, 1995 cit. v Nicholson et al., 2001*). Na MT antigenu rozeznávají podobný motiv - NPTY (Asn-Pro-Thr-Tyr). Mutace v jakékoli aminokyselině NPTY motivu zabrání transformaci buněk, což poukazuje na důležitost proteinu ShcA pro transformaci MT antigenem (*Campbell et al., 1994*).

ShcA obsahuje dvě oblasti, které jsou fosforylovány Src kinázou. Jednak je to oblast CH1, ve které se nachází dva tyrosiny, Y 239 a Y240 (*van der Geer et al., 1996*) a jednak je

to C-koncová oblast s tyrosinem 317 u člověka nebo tyrosinem 313 u myši (*Salcini et al., 1994*).

Všechny tři fosforylované tyrosiny na ShcA interagují s SH2 doménou adaptorového proteinu Grb2 (growth factor receptor - bound protein 2) (*Nicholson et al., 2001*). Grb2 dále váže protein Sos1 (son of sevenless homolog 1) pomocí domény SH3. Sos1 patří do skupiny proteinů „Ras - guanine nucleotide exchange faktor“ (*Schlessinger, 1993*). Tato skupina proteinů mění GDP za GTP na Ras proteinech, a tím je aktivuje (*Chardin et al., 1993*). Díky vazbě Grb2 na Sos1 se Sos1 přiblíží k membráně, kde aktivuje Ras protein. Tato signální transdukce nakonec vede k aktivaci Map kinázové kaskády (mitogen activated protein kinase) (*viz obr. 5 na str. 14; Aronheim et al., 1994*). Map kinázy jsou protein kinázy, které jsou součástí drah signální transdukce řídící diferenciaci buněk, buněčné dělení a buněčnou smrt (*Pearson et al., 2001*). Je známo, že je Grb2 součástí signální transdukce, která zabraňuje vzniku apoptózy a které se zároveň účastní také Map kináza. Konkrétně je tato signální transdukce vedena skrz interleukin 3 (IL3), protein Shc, Grb2, Ras a nakonec Map kinázu, která aktivuje gen pro protein c – Fos (*Gotoh et al., 1996*).

Dalším proteinem, který je Grb2 schopen vázat je adaptórový protein Gab1 (Grb-2 associated binding protein 1). Gab1 je v komplexu s MT fosforylovaný na tyrosinu, a díky tomu je schopen vázat SH2 doménu PI3K (fosfatidyl inositol 3 kinázy) (*Ong et al., 2001b*). Předpokládá se, že je Gab1 fosforylovaný Src kinázou, která se nachází v komplexu s MT (*Ong et al., 2001a*). Setkáváme se zde tedy s jiným způsobem aktivace PI3K, než je interakce přímo s MT antigenem (*viz obr. 5 na str. 14*).

Komponenty jako jsou proteiny Shc a Grb2 nebo domény PTB a SH2 jsou typické pro signální transdukce aktivované tyrosin kinázovými receptory (RTK). Dalo by se tedy říci, že se MT antigen chová jako takovýto aktivovaný receptor (*Pawson, 1995 cit. v Nicholson et al., 2001*).

Signální transdukce vyvolaná fosforylací Y250 MT antigenu hraje důležitou roli v transformaci buněk. Mutace v sekvenci NPTY zabránila vazbě Shc na MT antigen. Díky tomu nebyly buňky, v nichž byl tento mutant exprimován, transformovány (*Campbell et al., 1994 cit. v Bronson et al., 1997*). Překvapením ovšem je, že je tento mutant schopen indukce nádorů jaterních epitelálních buněk u novorozenech myši (*Bronson et al., 1997*).

Projev mutace závisí na typu tkáně, ve které je mutant exprimován. Mutací v tyrosinu 250 byla snížena frekvence nebo velikost tumoru v játrech, brzlíku a v nadledvince a naopak byla zvýšena frekvence nebo velikost tumoru na pokožce a v kostech (*Bronson et al., 1997*).

Projev mutace také závisí na tom, z jakého druhu organismu testované buňky pocházejí. Mutace v tyrosinu 250 způsobila transformaci lidských buněk, ale nezpůsobila už transformaci buněk myších (*Utermark et al., 2007*).

Velkou roli hraje interakce s ostatními proteiny, například s fosfatidyl inositol 3 kinázou. Když byla k mutaci v tyrosinu 250 přidána ještě mutace zabraňující vazbu na tuto kinázu (mutace v tyrosinu 315), nedošlo k vyvinutí žádných epiteliálních tumorů (*Bronson et al., 1997*).

#### **4.4. Interakce s fosfatidilinositol 3 kinázou**

Na další fosforylovaný tyrosin MT antigenu - tyrosin Y315 nasedá svou SH2 doménou fosfatidyl inositol 3 kináza IA (IA PI3K) (*viz obr. 5 na str. 14; Utermark et al., 2007*).

Do rodiny PI3K patří tři třídy: I, II a III. Třída I je rozdělena do dvou subrodin A a B podle toho, s jakým receptorem kinázy interagují. Pouze kináza IA PI3K je aktivována tyrosin kinázovým receptorem a MT antigenem. Tato kináza se skládá z regulační adaptérové podjednotky p85 a katalytické podjednotky p110 (*Engelman et al., 2006; Kaplan et al., 1987*). Interakce s MT antigenem je zprostředkována pomocí SH2 domény podjednotky p85 (*Courtneidge a Heber, 1987 cit. v Utermark 2007*).

Funkce PI3K je fosforylovat 3 hydroxy skupinu fosfatidilinositolu a fosfoinositidů. (*Engelman et al., 2006*) Podjednotka p110 katalyzuje fosforylaci fosfatidylinositolu 4,5-bisfosfátu na formu fosfatidylinositol 3,4,5-trisfosfát. Tento druhý posel aktivuje Akt kinázu (známou též pod jménem protein kináza B, PKB) a další efekторы (*viz obr. 5; Utermark et al., 2007*). Na spojitost Akt kinázy s MT antigenem poukazuje pokus s MT antigenem mutovaným v Y315, kdy byl zaregistrován silný úbytek aktivní Akt serine/threonine kinázy. Tento úbytek se neobjevil v divokém typu MT antigenu nebo MT antigenem mutovaném v tyrosinu Y250 (*Dahl et al., 1998*).

Akt kináza se na fosfatidylinositol 3,4,5-trisfosfát váže pomocí své PH domény (plackstrin homology domain). Je to serin/threonine protein kináza, která reguluje mnoho buněčných funkcí, jako je životnost buňky, buněčné dělení, migrace nebo buněčný metabolismus (*shrnutí v Maroulakou et al., 2007*).

Kináza Akt má tři izoformy – Akt1, Akt2 a Akt3. Isoformy Akt1 a Akt2 mají každá jinou funkci, ale vzájemně se doplňují. Akt1 podporuje buněčnou proliferaci, životnost buňky

i indukci tumorů, zatímco Akt2 také podporuje tumorigenezi a vznik metastází. (Maroulakou et al., 2007).

PI3K dále aktivuje malý GTP/GDP vazebný protein Rac (viz obr. 5 na str. 14). PI3K ho aktivuje skrz fosfatidylinositol 3,4,5-trisfosfát, který aktivuje PH domény „nucleotide exchange“ faktorů. Protein Rac je například zahrnut v dráze aktivující expresi proteinu SRF (serum response factor), který slouží jako transkripční faktor ovlivňující gen pro protein c-Fos. Tato dráha ovšem ještě není plně prozkoumána. Důležité je, že exprese dominantně negativního Rac, zabraňuje transformaci buněk (Urich et al., 1997, Jingwei et al., 2009).

Další funkcí signální transdukce iniciované PI3K je zabránění apoptózy. Apoptóza je v buňce navozena během buněčného vývoje za určitých patologických stavů jako je poškození DNA, virová infekce nebo při aktivaci onkogenu (*shrnuto v Dahl et al., 1998*). Inhibice fosforylace fosfatidilinositolů nebo samotné PI3K měla za následek indukci apoptózy v buňkách, a tedy jejich menší životaschopnost. V buňkách produkujících divoký typ MT antigenu, MT antigen mutovaný v Y250, ani v buňkách neprodukujících MT antigen, se tyto vlastnosti neprojevovaly. Je tedy zřejmé, že MT antigen má určité mechanismy jak zabraňovat apoptóze, a PI3K je jejich součástí. Tento mechanismus není závislý na aktivitách p53 (*Dahl et al., 1998*).

Po předešlých informacích je zřejmé, že interakce MT antigenu s PI3K je důležitá pro jeho schopnost transformovat buňky. Mutovaný MT antigen neinteragující s PI3K nedostatečně transformuje buňky a má nižší schopnost indukovat nádory (*Dahl et al., 1998, Utermark et al., 2007*).

*In vivo* jsou mutanty MPyV, jejichž MT antigen neinteraguje s PI3K, spojeny s menší úmrtností laboratorních myší a nádory vznikají s menší frekvencí. Indukce nádorů se liší podle typu tkáně. Efekt mutace se velmi silně projevil např. v slinných a mléčných žlázách, nadledvinkách, a naopak měl slabší efekt např. v brzlíku (*Freund et al., 1992b*).

#### **4.5. Interakce s fosfolipázou C $\gamma$ 1**

Fosforylace dalšího tyrosinu, Y322, na molekule MT antigenu způsobí navázání fosfolipázy C $\gamma$ 1 (PLC $\gamma$ 1) skrz její SH2 doménu (viz obr. 5 str. 14; *Su et al., 1995*).

Fosfolipáza C $\gamma$ 1 je enzym, který katalyzuje hydrolýzu fosfatidylinositolu – 4,5 – bisfosfát na 1,4,5 – inositoltrifosfát a diacylglycerol. Tyto molekuly potom slouží dál v signalizaci jako druzí poslí (*Krawczyk a Matuszyk, 2011*).



U Jurkat T buněk (T lymfocytů) je PLC $\gamma$ 1 součástí dráhy, která stimuluje genovou expresi interleukinu 2 (IL2). IL2 je cytokin, signální molekula, jejíž exprese vede k aktivaci T buněk a jejich proliferaci. Tato dráha začíná aktivací receptoru TCR (T cell antigen receptor), který aktivuje protein tyrosin kinázy (PTK). K této skupině kináz patří také kinázy z rodiny Src (*Wange a Samelson, 1996, Kennedy et al., 1998*). PTK dále aktivují PLC $\gamma$ 1, jejíž sekundární posli aktivují protein kinázu C (PKC) a zvyšují extracelulární koncentraci iontů Ca<sup>2+</sup> v buňce. Tyto dvě komponenty dále ovlivňují genovou expresi IL2 (*Noh et al., 1995*).

U Jurkat T buněk, které postrádaly TCR, ale produkovaly MT antigen, byla zaregistrována vyšší exprese IL2 než u kontrolních buněk. Mutovaný MT antigen neschopný vázat Shc a PLC $\gamma$ 1 neaktivoval promotor genu pro IL2. Tento fakt spolu s podobností členů signální transdukce TCR a MT antigenu naznačuje, že by MT antigen mohl sloužit v T buňkách jako náhradní TCR (*Kennedy et al., 1998*).

Byl pozorován i vliv fosfolipázy C $\gamma$ 1 na schopnost MT antigenu transformovat buňky. Mutovaný MT antigen neschopný vázat PLC $\gamma$ 1 (mající místo tyrosinu 322 fenylalanin) méně transformuje buňky s nižší účinností než divoký typ MT antigenu (*Su et al., 1995*).

#### **4.6. Interakce s proteinem 14-3-3**

Další fosforylovanou aminokyselinou MT antigenu je serin v pořadí 257. Fosforylace tohoto serinu způsobí navázání proteinu 14-3-3 (*viz obr. 5 na str. 14; Cullere et al., 1998*).

Poteiny 14-3-3 tvoří rodinu proteinů exprimovaných ve všech eukaryotických buňkách. Mají schopnost vázat řadu funkčně odlišných signálních proteinů, včetně kináz, fosfatáz a transmembránových receptorů (*Obsil a Obsilova, 2011*). Homology proteinu u kvasinek hrají roli například v načasování mitózy (*Pallas et al., 1994*). Role tohoto proteinu v transformaci buněk se ovšem nezdá být tak důležitá jako u jiných proteinů vázajících se na MT antigen. Mutace v serinu 257 nesnížila schopnost MT antigenu transformovat buňky a indukovat tumory *in vitro*, nicméně zabránila vzniku tumorů ve slinné žláze myši (*Cullere et al., 1998*).

#### **4.7. DNAJ doména MT antigenu**

N-koncová DNAJ tvořená doména MT antigenu je důležitá pro vazbu PP2A a Src kináz (*viz výše*). Dále je důležitá pro vazbu Taz proteinu (tafazzinu) a proteinu Hsc70 (70 – kDa heat shock proteinu) (*viz obr. 5 na str. 14*).

Taz protein se váže na 2. - 4. aminokyselinu MT antigenu svojí doménou WW

(doména s dvěma tryptofany) (*Tian et al., 2004*). Tento protein má rozmanité funkce. Spolu s 14-3-3 proteinem působí jako regulátor transkripce genů pro faktory, které vedou k diferenciaci mezenchymálních buněk na osteoblasty a adipocyty (*Hong et al., 2005*), působí degradaci proteinu polycystinu 2 skrz interakci s E3 ubiquitin ligázou (*Tian et al., 2007*) a podporuje transformaci, migraci a invazivitu některých typů buněk (*Chan et al., 2008*). Protein Taz aktivovaný defosforylací podporuje buněčné dělení (*Lei et al., 2008*). Mutantní MT antigen neschopný vázat protein Taz, netransformoval buňky. Jelikož Taz váže všechny tři časné antigeny polyomaviru, není jisté, jestli je za všechny výše zmíněné efekty odpovědná právě interakce s MT antigenem (*Tian et al., 2007; Tian et al., 2004*).

Dalším proteinem, který s velkou pravděpodobností interaguje s J doménou MT antigenu, je 70 – kDa heat shock protein (Hsc70) (*Schaffhausen a Robert, 2009*). V buňkách infikovaných virem SV40 a myším polyomavirem se zvyšuje exprese genu pro Hsc70 (*Khandjian a Turler, 1983*). Hsc70 asociuje pouze s mutovaným MT antigenem, který není schopen vázat PP2A (*Campbell et al., 1995*). Je možné, že je to díky tomu, že se mutovaný MT antigen v důsledku nepřítomnosti PP2A špatně složí, a Hsc70 se na něj proto naváže. Další možností je, že se díky nepřítomnosti PP2A uvolní na MT antigenu pro Hsc70 vazebné místo (*Pallas et al., 1989*). Další podmínkou vazby Hsc70 na MT antigen je vyšší koncentrace MT antigenu. Při vyšší expresi MT antigenu v lidských 293 buňkách spolu s MT antigenem tvořili komplex proteiny o velikostech 72 a 74 – kDa, považované právě za proteiny Hsc70 (*Pallas et al., 1989*).

#### **4.8. Oblast MT antigenu bohatá na prolin**

Oblast bohatá na prolin se nachází mezi 332. - 347. aminokyselinou blízko C-konce MT antigenu (*viz obr. 5 na str. 14*). Tato oblast se nachází i v LT antigenu (*Schaffhausen a Roberts, 2009*).

Buňky infikované mutovaným polyomavirem, ve kterém byly deletovány tři proliny z této oblasti v MT a LT antigenu neztratily schopnost být immortalizovány a nebyla inhibována replikace virové DNA. Mutantní polyomavirus byl ovšem defektní v transformaci buněk a tumorigenezi a indukoval méně tumorů s delší latencí. V některých tkáních neindukoval nádory vůbec a v některých je indukoval s redukovanou frekvencí. To dokazuje, že byly ovlivněny funkce MT antigenu, a nikoli LT antigenu, a zároveň to dokazuje důležitost oblasti bohaté na prolin pro transformaci buněk (*Yi a Freund, 1998*).

#### **4.9. Shrnutí interakce středního T antigenu s proteiny**

Jak již bylo zmíněno dříve, MT antigen je syntetizován v cytoplasmě na volných polysomech a následně je posttranslačně vložen do membrány ER, odkud putuje pomocí endocytických váčků do cytoplazmatické membrány. MT antigen mutovaný v místě vazby na PP2A, nebo s přidanou peptidovou signální sekvencí KDEL (Lys-Asp-Glu-Leu), díky níž se proteiny pohybují pouze ve váčcích ER, neputuje do dalších endocytických membrán, ale zůstává v endoplazmatickém retikulu. Takto mutovaný MT antigen netransformuje buňky (*viz obr. 6 na str. 15; Zhou et al., 2011*).

V endoplazmatickém retikulu jsou na MT antigenu vázány PP2A a tyrosin kináza Src, ale chybí interakce s proteinem ShcA, PI3K a PLC $\gamma$ 1. Poslední tři jmenované proteiny se na MT antigen váží přes tyrosiny fosforylované kinázou Src. Při zkoušce kinázových aktivit se ukázalo, že je kináza Src je v ER aktivní. Nepřítomnost těchto proteinů tedy zřejmě není dána nedostatečnou aktivitou kinázy, ale špatným přístupem proteinů k vazebnému místu na MT antigenu (*Zhou et al., 2011*).

Strategie transformace buněk, kterou MT antigen používá, spočívá v aktivaci buněčných kináz, jako je FAK kináza, či kináza Akt (*viz str. 20 a 28*), zabránění apoptóze buňky (*viz str. 21*), aktivace exprese genu proteinu IL2 (*viz str. 22*) a aktivace buněčného protoonkogenu c-fos, jehož spojení s MT ještě nebylo plně prozkoumáno (*viz str. 19 a 21*). Proteiny c-Fos dimerizují s proteiny c-Jun a vytváří transkripční faktor AP-1 (activating protein 1). Tento faktor například ovlivňuje dělení a diferenciaci buněk (*Deng a Lin, 2006*).

### **5. Nádorová transformace indukovaná MT antigenem**

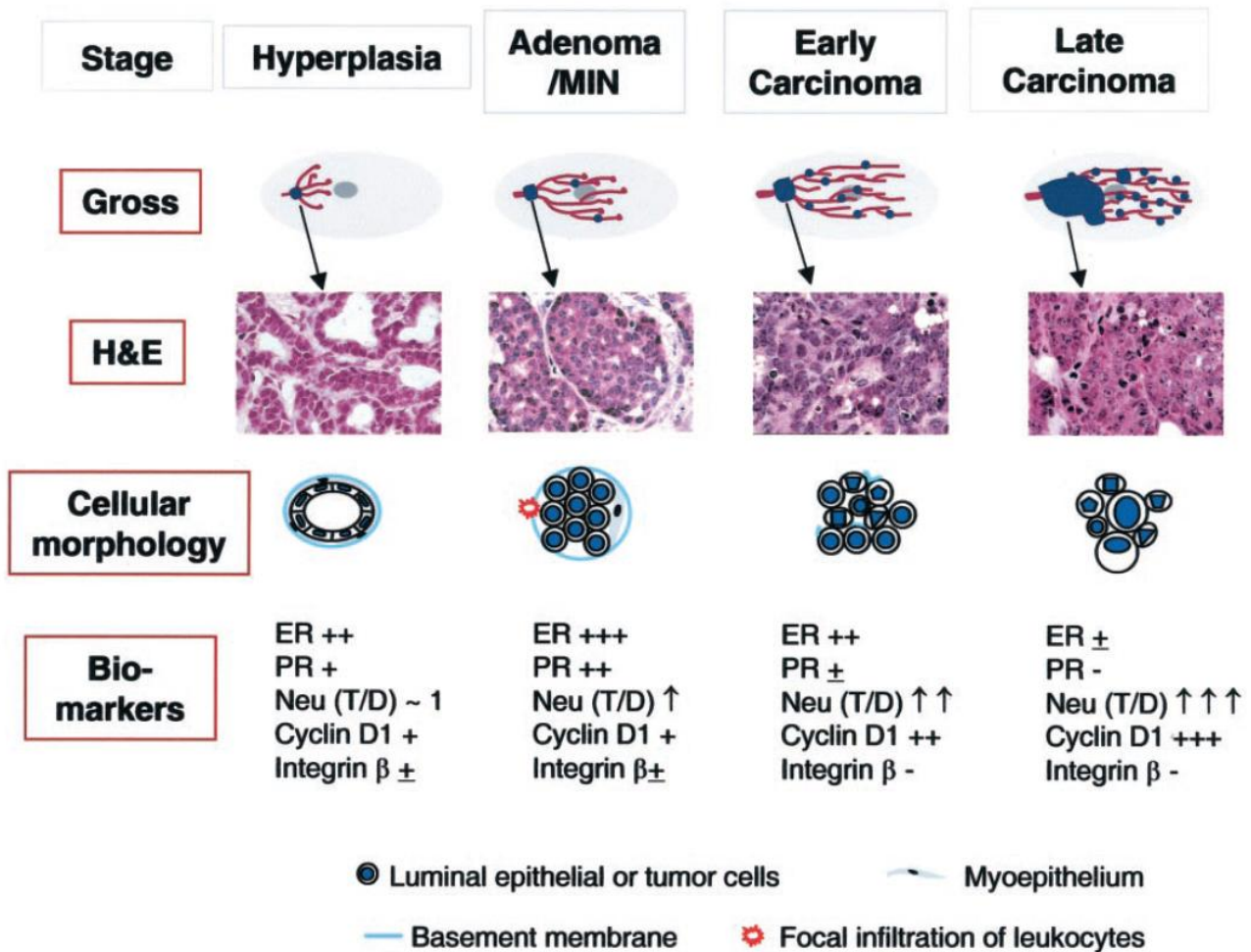
#### **5.1. Obecné charakteristiky**

MT antigen působí jako silný onkogen v epitelu mléčné žlázy. Myší model exprimující střední T antigen polyomaviru v epitelu mléčné žlázy myši pomocí MMTV (mouse mammary tumour virus), označovaný jako MMTV-PyVMT (mouse mammary tumour virus – polyoma middle T), je využíván pro pochopení molekulárních mechanismů lidské rakoviny prsu (*Callahan a Smith, 2000*).

Tento model se vyznačuje zvýšenou transformací buněk, rychlým nástupem nádoru a vysokou mírou vzniku metastáz do plic (*Guy et al., 1992; Marcotte a Muller, 2008*).

Vývoj nádoru iniciovaný MT antigenem má čtyři stádia. Začíná hyperplazií

a pokračuje přes adenom, raný karcinom až do pozdního karcinomu. Tato stádia se liší charakterem lézí, buněčnou morfologií, charakterem nádorového stroma a mírou exprese určitých faktorů (viz obr. 8; Lin et al., 2003).



**Obr. 8: Vývoj nádoru v modelu MMTV-PyVMT**

U jednotlivých stádií vývoje nádoru je pod sebou vyznačen vývoj lézí v mléčné žláze, buněčná morfologie (zde si lze všimnout ztrátu integrity s bazální membránou) a změna exprese estrogenu (ER), progesteronu (PR), proteinu Neu, cyklinu D1 a integrinu β. Převzato z Lin et al. (2003).

Jak u myšího MMTV-PyVMT modelu, tak i u lidské rakoviny prsu je zaznamenána snížená exprese estrogenu a progesteronu (30% u lidské rakoviny prsu a 80% u myšího modelu) a zvýšená exprese Neu (ErbB2, HER2, Human Epidermal Growth Factor Receptor 2) a cyklinu D1 (20% u lidské rakoviny prsu) (Menard et al., 2000). Tyto změny jsou patrné obzvláště při počáteční fázi maligní transformace (stádium raného karcinomu). Změna

exprese těchto faktorů vede ke zvýšenému dělení nádorových buněk a ztrátě poziční identity (Lin et al., 2003).

Nejvýraznější změny v nádorovém stroma jsou spojené se změnou adenomu na raný karcinom. Tyto změny se vyznačují ztrátou exprese integrinu-1, ztrátou integrity bazální membrány a neúplným obklopením myoepitelem. Lokální ztráta integrity bazální membrány je spojena se zvýšením neovaskularizace a zvýšením množství zánětlivých a leukocytárních buněk. Všechny tyto změny vedou k větší invazivitě buněk (Lin et al., 2003).

## **5.2. Interakce rakovinných buněk se stroma**

Velmi důležité jsou interakce mezi stroma a rakovinnými buňkami. Stroma je tvořeno podpůrnými buňkami – fibroblasty, buňkami imunitního systému nebo endoteliálními buňkami (Bissel a Radisky, 2001). Mezi tyto interakce patří například parakrinní signalizace mezi makrofágy (viz níže), nebo interakce s transkripčním faktorem Ets2 (v-ets erythroblastosis virus E26 oncogene homolog 2 (avian)) (Man et al., 2003).

V MMTV-PyVMT modelu nedostatečná exprese faktoru Ets2 omezuje vývoj nádoru a nepřítomnost tohoto faktoru ve stroma zabraňuje růstu nádoru (Neznanov et al., 1999). Dále Ets2 ovlivňuje expresi metaloproteináz makrofágy a hraje také roli v angiogenezi (Man et al., 2003).

## **5.3. Schopnost metastázovat**

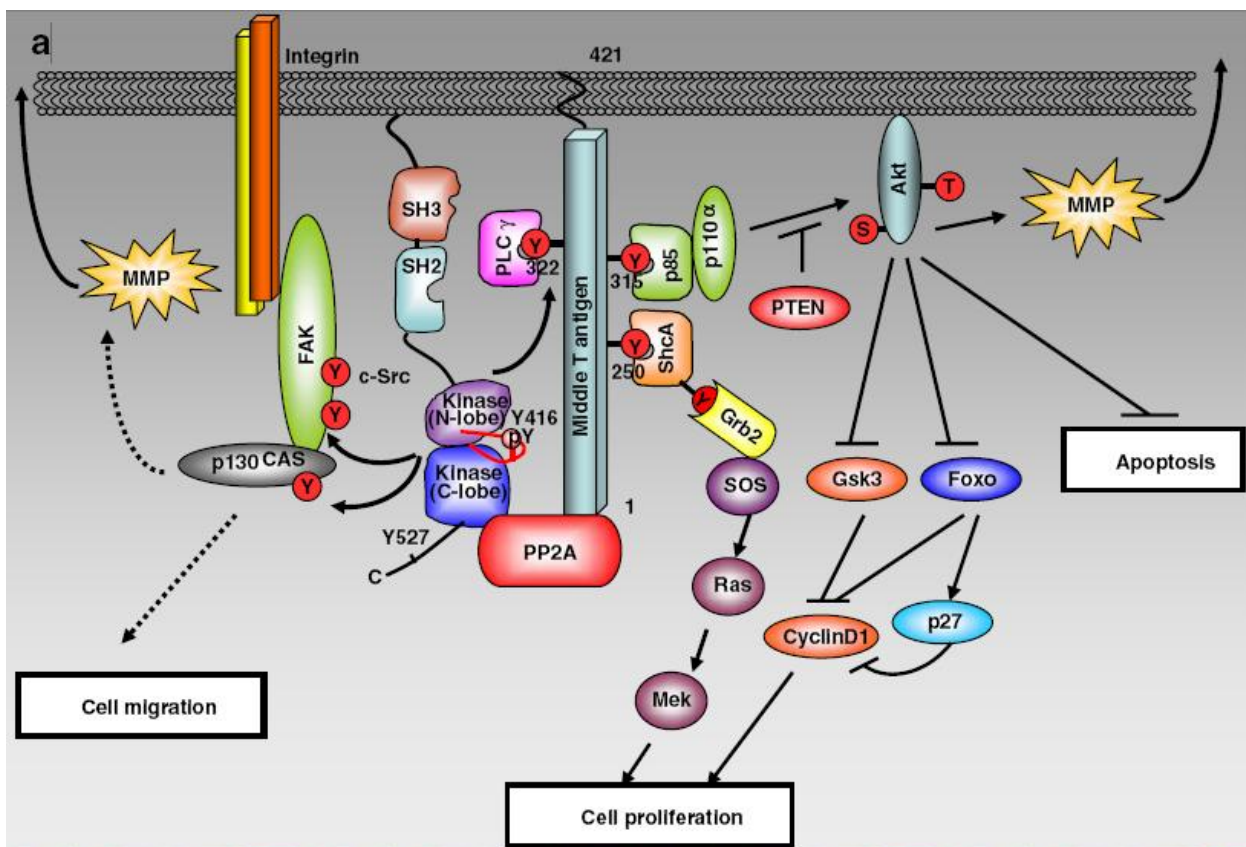
Model MMTV-PyVMT se od jiných myších modelů liší vysokou schopností tvořit metastáze do plic (Guy et al., 1992). Přestože je schopnost metastázovat považována za záležitost pozdních fází nádorové transformace, buňky tohoto modelu jsou schopné tvořit metastáze již ve velmi časném stádiu (Husemann et al., 2008).

Proces tvoření metastází se dá rozdělit do několika kroků. Začíná průnikem buněk z původního nádoru do okolní tkáně (invazí buněk), pokračuje vstupem buněk do cév (intravazace), šířením v krevním řečišti, únikem z cév (extravazace) a nakonec vznikem kolony na metastazickém místě (Jingwei et al., 2009).

Významný podíl na vznik metastází v modelu MMTV-PyVMT má růstový faktor CSF-1 (colony stimulating factor) exprimovaný rakovinnými buňkami. Exprese tohoto růstového faktoru nemá vliv na vznik nebo růst primárních tumorů, ale hraje roli v přeměně nádoru na invazivní metastázující karcinom (Lin et al., 2001). Tento faktor nepůsobí pouze v autokrinní signalizaci, ale také jako chemoatraktant přitahující makrofágy k rakovinným

buňkám (Pollard, 1997). Tomu svědčí to, že ztráta CSF-1 v modelu MMTV-PyVMT vede k nepřítomnosti makrofágů v tomto modelu (Lin et al., 2001). Jinak řečeno CSF-1 se uplatňuje v parakrinní signalizaci mezi makrofágy a rakovinnými buňkami. Rakovinné buňky sekretují CSF-1, který interaguje s receptory na makrofágách. Tato interakce stimuluje sekreci epidermálního růstového faktoru (EGF), který má své receptory na rakovinných buňkách (Wyckoff et al., 2004). EGF v rakovinných buňkách zajišťuje jejich motilitu a invazivitu skrz bazální membránu do krevního systému (Chan et al., 1998). U myši bez CSF-1 nebyl pozorován průnik makrofágů do místa tumoru, byla opožděna přeměna nádoru do maligního stavu a zároveň opožděn vznik plicních metastází (Lin et al., 2001).

Makrofágy hrají ve schopnosti nádoru metastázovat několik rolí. Díky schopnosti sekretovat mnoho různých produktů, jako jsou proteázy, růstové faktory a jiné signální molekuly, hrají makrofágy klíčovou roli v angionogenezi (Sunderkotter et al., 1994). Dále se předpokládá, že makrofágy exprimují proteázy, které narušují bazální membrány (Lin et al., 2003).



**Obr. 9: Interakce MT antigenu s proteiny a aktivace signální dráhy**

Oproti obr. 5 zde přibylo znázornění návaznosti dráhy signální transdukce aktivované MT antigenem na FAK kinázu aktivovanou Src kinázou. Převzato z Marcotte a Muller (2008).



Do skupiny proteáz patří enzymy degradující extracelulární matrix (ECM). Nejdůležitější z nich jsou metaloproteázy (MMP), katepsiny nebo plasmin. Aby mohly rakovinné buňky dosáhnout invaze a metastáze, degradují tyto enzymy stroma okolo nich, a buňky poté mohou proniknout do krevního řečiště (*Marcotte a Muller, 2008*). Exprese inhibitorů metaloproteáz v MMTV-PyVMT modelu způsobí snížení tvorby metastáz do plic a snížení růstu tumorů (*Yamazaki et al., 2004*). Stejně tak růst tumorů v katepsin B deficientním prostředí má opožděný nástup nádorů a sníženou tvorbu metastáz do plic (*Vasiljeva et al., 2006*). Schopnost indukovat metastáze do plic byla snížena i u plasminogen deficientní myši MMTV-PyVMT modelu (*Bugge et al., 1998*). Všechny výše zmíněné poznatky poukazují na důležitost těchto proteáz při tumorigenezi, úspěšné invazi a vzniku metastáz.

Důležitým enzymem hrajícím roli v přechodu nádoru do metastazujícího stádia je kináza FAK (focal adhesion kinase). MT antigen interaguje s kinázou FAK skrz interakci se Src kinázou (*viz obr. 9*). FAK kináza hraje roli v přechodu nádoru ze stadia hyperplazie do plně transformovaného fenotypu (*Lahlou et al., 2007*).

## 6. Závěr

Z výše uvedených informací vyplývá, že MT antigen využívá buněčné proteiny jako nástroj k vstupu virů do S fáze buňky a k přístupu k buněčným enzymům, za účelem hladkého průběhu replikace viru.

MT antigen, integrovaný do cytoplazmatické membrány buňky se chová jako aktivovaný tyrosin kinázový receptor. Protože ale sám nemá kinázovou aktivitu, rekrutuje Src kinázu, která mu fosforylací jeho tyrosinů zprostředkuje interakci mnohých proteinů participujících na signální transdukcii. Díky tomu může MT antigen aktivovat například Map kinázovou dráhu ovlivňující buněčné dělení a apoptózu, kinázu PI3K, která dokáže inhibovat apoptózu nebo aktivovat izoformy Akt kinázy, které podporují transformaci buněk indukci tumorů či vznik metastáz, a samotná Src kináza aktivuje FAK kinázu, která přispívá k tumorigenezi.

Procesy, jako je zabránění programované buněčné smrti, aktivace drah signální transdukcce a podpora buněčného dělení, jsou nezbytné pro efektivní replikaci viru. V nepermissivních buňkách, ve kterých není z nějakého důvodu dokončen replikační cyklus MpyV, který končí buněčnou smrtí, však produkce pro MT antigen spolu s LT a ST dává

vznik transformovaným buňkám.

Studium nádorové transformace na myším modelu exprimujícím MT antigen a studium interakcí MT antigenu s proteiny přináší mnoho zajímavých informací o mechanismech buněčné transformace a o tom, jakým způsobem vznikají nádory. I přesto, že tento model pracuje na genetickém pozadí myši, nachází se zde mnoho podobností v mechanismech, interakcích a funkcích drah signálních transdukci s nádorovými procesy u člověka. Myší model exprimující MT antigen v epitelu mléčné žlázy je možné alespoň z části aplikovat na lidský karcinom prsu.

Problematika středního T antigenu je stále aktuální téma, a jak indikuje například nedávná práce Zhou et al. (2001), která ukázala, že MT antigen má ještě extracelulární část, jejíž dosud neznámá interakce je také důležitou podmínkou schopnosti MT antigenu účinně transformovat buňky, lze očekávat od tohoto modelu ještě další nové poznatky, které mohou prohloubit naše porozumění mechanismům nádorové transformace.



## 7. Seznam užité literatury

- Aronheim A., Engelberg D., Li N., al-Alawi N., Schlessinger J., Karin M. (1994) Membrane targeting of the nucleotide exchange factor Sos is sufficient for activating the Ras signaling pathway. *Cell* 78, 949-61.
- Babakir-Mina M., Ciccozzi M., Perno C.F., Ciotti M. (2011) The novel KI, WU, MC polyomaviruses: possible human pathogens? *New Microbiol.* 34, 1-8.
- Bissell M. J., Radisky D. (2001) Putting tumours in context. *Nat. Rev. Cancer* 1, 46–54.
- Bronson R., Dawe C., Carroll J., Benjamin T. (1997) Tumor induction by a transformation-defective polyoma virus mutant blocked in signaling through shc. *PNAS USA* 94, 7954–8.
- Bugge T.H., Lund L.R., Kombrinck K.K., Nielsen B.S., Holmback K., Drew A.F. et al. (1998) Reduced metastasis of polyoma virus middle T antigen-induced mammary cancer in plasminogen-deficient mice. *Oncogene* 16, 3097–104.
- Callahan R., Smith G. H. (2000) MMTV-induced mammary tumorigenesis: gene discovery, progression to malignancy and cellular pathways. *Oncogene* 19, 992–1001.
- Campbell K. S., Auger K. R., Hemmings B. A., Roberts T. M., Pallas D. C. (1995) Identification of regions in polyomavirus middle T and small t antigens important for association with protein phosphatase 2A. *Journal of Virology* 69, 3721–3728.
- Campbell K.S., Ogris E., Burke B., Su W., Auger K.R., Druker B.J. et al. (1994) Polyoma middle T antigen interacts with SHC via the NPTY motif in middle T. *Proc Natl Acad Sci USA* 91, 6344–8.
- Carmichael G., Schaffhausen B., Dorsky D., Oliver D., Benjamin T., (1982) The role of the carboxy terminus of middle T antigen of polyoma virus. *PNAS USA* 79, 3579-3583.
- Cartwright C. A., Kaplan P. L., Cooper J. A., Hunter T., Eckhart W. (1986). Altered sites of tyrosine phosphorylation in pp60c-src associated with polyoma middle tumor antigen. *Mol. Cell. Biol.* 6, 1562-1570.
- Chan S.W., Lim C.J., Guo K., Ng C.P., Lee I., Hunziker W., Zeng Q., Hong W. (2008) A role for TAZ in migration, invasion, and tumorigenesis of breast cancer cells. *Cancer Res.* 68, 2592–2598.
- Chan A.Y., Raft S., Bailly M., Wyckoff J.B., Segall J.E., Condeelis J.S. (1998) EGF stimulates an increase in actin nucleation and filament number at the leading edge of the lamellipod in mammary adenocarcinoma cells. *J. Cell Sci.* 111, 199–211.
- Chardin P., Camonis J. H., Gale N. W., van Aelst L., Schlessinger J., Wigler M. H., Bar-Sagi. D. (1993) Human Sos1: a guanine nucleotide exchange factor for Ras that binds to Grb2. *Science* 260, 1338-1343.

- Chen L., Fluck M.M. (2001) Role of middle T–small T in the lytic cycle of polyomavirus: control of the early-to-late transcriptional switch and viral DNA replication. *J. Virol.* 75, 8380–8389.
- Cheng S. H., Harvey R., Espino P. C., Semba K., Yamamoto T., Toyoshima K., Smith A. E. (1988) Peptide antibodies to the human c-fyn gene product demonstrate pp59c-fyn is capable of complex formation with the middle-T antigen of polyomavirus. *EMBO J.* 7, 3845–3855.
- Courtneidge S. A., Goutebroze L., Cartwright A., Heber A., Scherneck S., Feunteun J. (1991) Identification and characterization of the hamster polyomavirus middle T antigen. *Journal of Virology* 65, 3301–3308.
- Courtneidge S. A., Heber A. (1987) An 81 kd protein complexed with middle T antigen and pp60c-src: a possible phosphatidylinositol kinase. *Cell* 50, 1031–1037.
- Courtneidge S. A. (1985) Activation of the pp60c-src kinase by middle T antigen binding or by dephosphorylation. *EMBO J* 4, 1471–7.
- Courtneidge S. A., Smith A. E. (1983). Polyoma virus transforming protein associates with the product of the c-src cellular gene. *Nature* 303, 435–439.
- Crawford L. V., Syrett C., Wilde A. (1973) The replication of polyoma DNA. *Journal of General Virology* 21, 515-521.
- Cullere X., Rose P., Thathamangalam U., Chatterjee A., Mullane K.P., Pallas D.C., et al. (1998) Serine 257. phosphorylation regulates association of polyomavirus middle T antigen with 14-3-3 proteins. *Journal of Virology* 72, 558–63.
- Dahl J., Jurczak A., Cheng L., Baker D., Benjamin T. (1998) Evidence of a role for phosphatidylinositol 3- kinase activation in the blocking of apoptosis by polyomavirus middle T antigen. *Journal of Virology* 72, 3221–6.
- DeCaprio J. A., Ludlow J. W., Figge J. (1988) SV40 large tumor antigen forms a specific complex with the product of the retinoblastoma susceptibility gene. *Cell* 54, 275-83.
- Deng L.-X., Lin J.-H. (2006) Expression of c-fos gene associated with the proliferation and differentiation of cartilage. *Chinese Journal of Clinical Rehabilitation* 10, 138-141.
- Dunant N.M., Senften M., Ballmer-Hofer K. (1996) Polyomavirus middle-T antigen associates with the kinase domain of Src-related tyrosine kinases. *Journal of Virology* 70, 1323–1330.
- Eck M. J., Atwell S. K., Shoelson S. E., Harrison S. C. (1994). Structure of the regulatory domains of the Src family tyrosine kinase Lck. *Nature* 368, 764–769.
- Eckhart W, Hutchinson M. A., Hunter T. (1979) An activity phosphorylating tyrosine in polyoma T antigen immunoprecipitates. *Cell* 18, 925-33.
- Eddy B.E., Borman G.S., Grubbs G.E. et al. (1962) Identification of the oncogenic substance in rhesus monkey kidney cell cultures as simian virus 40. *Virology* 17, 65-75.

- Engelman, J. A., Luo J., Cantley, L. C. (2006) The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism. *Nat. Rev. Genet.* 7, 606–619.
- Fields B.N., Knipe D. M. (1991) *Fundamental virology*. Raven Press, 1064 s.
- Fischer M.K., Kao G.F., Nguyen H.P., Drachenberg C.B., Rady P.L., Tyring S.K., Gaspari A.A. (2012) Specific Detection of Trichodysplasia Spinulosa-Associated Polyomavirus DNA in Skin and Renal Allograft Tissues in a Patient With Trichodysplasia Spinulosa. *Arch Dermatol.* 20, Epub. ahead of print.
- Freund R., Bronson R. T., Benjamin T. L. (1992a) Separation of immortalization from tumor induction with polyoma large T mutants that fail to bind the retinoblastoma gene product. *Oncogene* 7, 1979–1987.
- Freund R., Sotnikov A., Bronson R.T., Benjamin T.L. (1992b) Polyoma virus middle T is essential for virus replication and persistence as well as for tumor induction in mice. *Virology* 191, 716–723.
- Glenn G. M., Eckhart. W. (1995) Amino-terminal regions of polyomavirus middle T antigen are required for interactions with protein phosphatase 2A. *Journal of Virology* 69,3729–3736.
- Glover H.R., Brewster C.E., Dilworth S.M. (1999) Association between src-kinases and the polyoma virus oncogene middle T-antigen requires PP2A and a specific sequence motif. *Oncogene* 18, 4364–4370.
- Gotoh N., Tojo A., Shibuyal M. (1996) A novel pathway from phosphorylation of tyrosine residues 239/240 of Shc, contributing to suppress apoptosis by IL-3. *The EMBO Journal* 15, 6197-6204.
- Graffi A., Schramm T., Graffi I. et al. (1968) Virus-associated skin tumors of the Syrian hamster: preliminary note. *J Natl Cancer Inst;* 40, 867-73.
- Gross L. A. (1953) Filterable agent, recovered from Ak leukemic extracts, causing salivary gland carcinomas in C3H mice. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 83, 414-21.
- Guy C.T., Cardiff R.D., Muller W.J. (1992) Induction of mammary tumors by expression of polyomavirus middle T oncogene: a transgenic mouse model for metastatic disease. *Mol. Cell. Biol.* 12, 954–961.
- Guy C.T., Muthuswamy S.K., Cardiff R.D., Soriano P., Muller W.J. (1994) Activation of the c-Src tyrosine kinase is required for the induction of mammary tumors in transgenic mice. *Genes Dev* 8, 23–32.
- Habel K. (1965) Specific complement-fixing antigens in polyoma tumors and transformed cells. *Virology* 25, 55-61.

Harris T. E., Finck B. N. (2011) Dual function lipin proteins and glycerolipid metabolism. *Trends Endocrinol. Metab.* 22, 226-33.

Harvey R., Oostra G. L., Belsham G. J., Gillett P., Smith, A. E. (1984). An antibody to a synthetic peptide recognizes polyoma virus middle T antigen and reveals multiple in vitro tyrosine phosphorylation sites. *Mol. Cell. Biol.* 4, 1334–1342.

Hendrix P., Mayer-Jaekel R. E., Cron P., Goris J., Hofsteenge J., Merlevede W., Hemmings B. A. (1993) Structure and expression of a 72-kD regulatory subunit of protein phosphatase 2A. *J. Biol. Chem.* 268, 15267–15276.

Hong J.H., Hwang E.S., McManus M.T., Amsterdam A., Tian Y., Kalmukova R., Mueller E., Benjamin T., Spiegelman B.M., Sharp P.A., Hopkins N., Yaffe M.B. (2005) TAZ, a transcriptional modulator of mesenchymal stem cell differentiation. *Science* 309, 1074–1078.

Human healths (internetový zdroj)

<http://www.human-healths.com/bk-virus-infection/bk-virus-infection.php>

Husemann Y., Geigl J.B., Schubert F., Musiani P., Meyer M., Burghart E. et al. (2008) Systemic spread is an early step in breast cancer. *Cancer Cell* 13, 58–68.

Jingwei Ch., DeCaprio J. A., Fluck M. M., Schaffhausen B.S. (2009) Cellular Transformation by Simian Virus 40 and Murine Polyoma Virus T antigens review. *Semin Cancer Biol.* 19, 218-228.

Kaplan J. M., Varmus H. E., Bishop J. M. (1990) The Src protein contains multiple domains for specific attachment to membranes. *Mol. Cell. Biol.* 10, 1000–1009.

Kaplan D. R., Whitman M., Schaffhausen B., Pallas D. C., White M., Cantley L., Roberts T. M. (1987) Common in growth factor stimulation and oncogenic transformation: 85 kd phosphoprotein and phosphatidylinositol activity. *Cell* 50, 1021–1029.

Kennedy A.P., Sekulic A., Irvin B.J., Nilson A.E., Dilworth S.M., Abraham R.T. (1998) Polyomavirus middle T antigen as a probe for T cell antigen receptor-coupled signaling pathways. *J. Biol. Chem.* 273, 11505–11513.

Khandjian E.W., Turler H. (1983) Simian virus 40 and polyoma virus induce synthesis of heat shock proteins in permissive cells. *Mol. Cell. Biol.* 3, 1–8.

Knipe D. M., Howley P. M. (2007) *Fields Virology*. Lippincott Williams and Wilkinns and Wolters Kluwer Business, Philadelphia, 3177 s.

Kornbluth S., Sudol M., Hanafusa H. (1987) Association of the polyomavirus middle-T antigen with c-yes protein. *Nature* 325, 171–173.

Krawczyk P., Matuszyk J. (2011) The mechanism of phospholipase C $\gamma$ 1 activation. *Postepy Hig Med Dosw* 65, 470-7.

Lahlou H., Sanguin-Gendreau V., Zuo D., Cardiff R.D., McLean G.W., Frame M.C. et al. (2007) Mammary epithelial-specific disruption of the focal adhesion kinase blocks mammary

tumor progression. *Proc Natl Acad Sci* 104, 20302–7.

Lei Q.Y., Zhang H., Zhao B., Zha Z.Y., Bai F., Pei X.H., Zhao S., Xiong Y., Guan K.L. (2008) TAZ promotes cell proliferation and epithelial–mesenchymal transition and is inhibited by the hippo pathway. *Mol. Cell. Biol.* 28, 2426–2436.

Lin E.Y., Jones J.G., Li P., Zhu L., Whitney K.D., Muller W.J. et al. (2003) Progression to malignancy in the polyoma middle T oncoprotein mouse breast cancer model provides a reliable model for human diseases. *Am J Pathol* 163, 2113–26.

Lin E. Y., Nguyen A.V., Russell R.G., Pollard J.W. (2001) Colony-stimulating factor 1 promotes progression of mammary tumors to malignancy. *J Exp Med* 193, 727–40.

Liu X., S. Brodeur R., Gish G., Zhou S., Cantley L. C., Laudano A. P., Pawson T. (1993) Regulation of c-Src tyrosine kinase activity by the Src SH2 domain. *Oncogene* 8, 1119–1126.

Roskoski Jr. R. (2005) Src kinase regulation by phosphorylation and dephosphorylation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 331, 1-14.

Lomax M. a Fried M. (2001) Polyoma virus disrupts ARF signaling to p53. *Oncogene* 20, 4951–4960.

Louie R.R., King C.S., MacAuley A., Marth J. D., Perlmutter R.M., EckhartW., Cooper J.A. (1988) p56 Lck protein-tyrosine kinase is cytoskeletal and does not bind to polyomavirus middle T antigen. *Journal of Virology* 62, 4673–4679.

Man A. K., Young L.J., Tynan J.A., Lesperance J., Egeblad M., Werb Z. et al. (2003) Ets2-dependent stromal regulation of mouse mammary tumors. *Mol Cell Biol* 23, 8614–25.

Marcotte, R., Muller, W.J. (2008) Signal transduction in transgenic mouse models of human breast cancer implications for human breast cancer. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* 1532, 337–342.

Maroulakou I.G., Oemler W., Naber S.P., Tschlis P.N. (2007) Akt1 ablation inhibits, whereas Akt2 ablation accelerates, the of mammary adenocarcinomas in mouse mammary tumor virus (MMTV)-ErbB2/neu and MMTV polyoma middle T transgenic mice. *Cancer Res* 67, 167-77.

Martin M.E., Piette J., Yaniv M. et al. (1988) Activation of the polyomavirus enhancer by a murine activator protein 1 (AP1) homolog and two contiguous proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 5, 5839-43.

Mattern C.F., Takemoto K.K., Daniel W.A. (1966) Replication of polyoma virus in mouse embryo cells: electron microscopic observations. *Virology* 30, 242-256.

Menard S., Tagliabue E., Campiglio M., Pupa S.M. (2000) Role of HER2 gene overexpression in breast carcinoma. *J Cell Physiol* 182, 150–162.

Moens U., Ludvigsen M., Van Ghelue M. (2011) Human polyomaviruses in skin diseases. *Patholog Res Int.* 12, 1-12.

Moule M.G., Collins C.H., McCormick F., Fried M. (2004) Role for PP2A in ARF signaling to p53. *PNAS USA* 101, 14063–14066.

Mumby M. (2007) PP2A: unveiling a reluctant tumor suppressor. *Cell* 130, 21–24.

Neznanov N., Man A. K., Yamamoto H., Hauser C. A., Cardiff R. D., Oshima R. G. (1999) A single targeted Ets2 allele restricts development of mammary tumors in transgenic mice. *Cancer Res* 59, 4242–4246.

Nicholson P.R., Empereur S., Glover H.R., Dilworth S.M. (2001) ShcA tyrosine phosphorylation sites can replace ShcA binding in signalling by middle T-antigen. *Embo J* 20, 6337–46.

Noh D.-Y., Shin S. H., Rhee S. G. (1995) Phosphoinositide-specific phospholipase C and mitogenic signaling. *Biochim. Biophys. Acta* 1242, 99–114.

Obsil T., Obsilova V. (2011) Structural basis of 14-3-3 protein functions. *Seminars in Cell and Developmental Biology* 7, 663-672.

Ogris E., Gibson D.M., Pallas D.C. (1997) Protein phosphatase 2A subunit assembly: the catalytic subunit carboxy terminus is important for binding cellular B subunit but not polyomavirus middle tumor antigen. *Oncogene* 15, 911–917.

Ogris E., Mudrak I., Mak E., Gibson D., Pallas D.C. (1999) Catalytically inactive protein phosphatase 2A can bind to polyomavirus middle tumor antigen and support complex formation with pp60(c-src). *J. Virol.* 73, 7390–7398.

Ong S. H., Dilworth S., Hauck-Schmalenberger I., Pawson T., Kiefer F. (2001a) ShcA and Grb2 mediate polyoma middle T antigen-induced endothelial transformation and Gab1 tyrosine phosphorylation. *Embo J* 20, 6327–36.

Ong S. H., Hadari Y. R., Gotoh N., Guy G. R., Schlessinger J., Lax I. (2001b) Stimulation of phosphatidylinositol 3-kinase by fibroblast growth factor receptors is mediated by coordinated recruitment of multiple docking proteins. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 98, 456-459

Pallas D.C., Fu H., Haehnel L.C., Weller W., Collier R.J., Roberts T.M. (1994) Association of polyomavirus tumor antigen with 14-3-3 proteins. *Science* 265, 535–537.

Pallas D.C., Morgan W., Roberts T.M. (1989) The cellular proteins which can associate specifically with polyomavirus middle T antigen in human 293 cells include the major human 70-kilodalton heat shock proteins. *Journal Virology* 63, 4533–4539.

Pawson T. (1995) Protein modules and signalling network. *Nature* 373, 573-580.

Pearson G., Robinson F., Gibson T. B., Xu B., Karandikar M., Berman K., Cobb M. H. (2001) Mitogen-Activated Protein (Map) Kinase Pathways: Regulation And Physiological Functions. *Endocrine Reviews* 22, 153–183.

Pelicci G., Lanfrancone L., Grignani F., McGlade J., Cavallo F., Forni G., Nicoletti I.,

Grignani F., Pawson T., Pelicci P.G. (1992) A novel transforming protein (SHC) with an SH2 domain is implicated in mitogenic signal transduction. *Cell* 70, 93-104.

Pollard J. W. (1997) Role of colony-stimulating factor-1 in reproduction and development. *Mol. Reprod. Dev.* 46, 54-61.

Qian M., Cai D., Verhey K.J., Tsai B. (2009) A Lipid Receptor Sorts Polyomavirus from the Endolysosome to the Endoplasmic Reticulum to Cause Infection. *PLoS Pathog* 5.

Salcini A.E., McGlade J., Pelicci G., Nicoletti I., Pawson T., Pelicci P. G. (1994) Formation of Shc-Grb2 complexes is necessary to induce neoplastic transformation by overexpression of Shc proteins. *Oncogene* 9, 2827-36.

Schlessinger J. (1993) How receptor tyrosine kinases activate Ras. *Trends Biochem. Sci.* 18, 273-275.

Roussel R. R., Brodeur S. R., Shalloway D., Laudano A. P. (1991) Selective binding of activated pp60c-src by an immobilized synthetic phosphopeptide modeled on the carboxyl terminus of pp60c-src. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 10696–10700.

Sauvage V., Foulongne V., Cheval J., Ar Gouilh M., Pariente K., Dereure O., Manuguerra J.C., Richardson J., Lecuit M., Burguière A., Caro V., Eloit M. (2011) Human polyomavirus related to African green monkey lymphotropic polyomavirus. *Emerg Infect Dis.* 17, 1364-70.

Schaffhausen B. S., Roberts T. M. (2009) Minireview Lessons from polyoma middle T antigen on signaling transformation: A DNA tumor virus contribution to the war on cancer. *Virology* 384, 304–316.

Scheidtmann K. H., Mumby M. C., Rundell K., Walter G. (1991) Dephosphorylation of simian virus 40 large T antigen and p53 protein by protein phosphatase 2A: inhibition by small-t antigen. *Mol. Cell. Biol.* 11, 1996–2003.

Simmons, D. T. (2000) SV40 large T antigen functions in DNA replication and transformation. *Advances in virus research* 55, 75-134.

Stehle T., Gamblin S.J., Yan Y. et al. (1996) The structure of simian virus 40 refined at 3.1 Å resolution. *Structure* 15, 165-82.

Su W., Liu W., Schaffhausen B., Roberts T. (1995) Association of polyomavirus middle tumor antigen with phospholipase C gamma 1. *J Biol Chem* 270, 12331–5.

Sunderkotter, C., Steinbrink K., Goebeler M., Bhardwaj R., Sorg C. (1994) Macrophages and angiogenesis. *J. Leukoc. Biol.* 55, 410–422.

Stewart S. E., Eddy B.E., Borgese N.G. (1958) Neoplasms in mice inoculated with a tumor agent carried in tissue culture. *J Natl Cancer Inst;* 20, 1223-43.

Sweet B. H., Hilleman M. R. (1960) The vacuolating virus, SV40. *Proceedings of the Society of Experimental Biology and Medicine* 105, 420-427.

Tian Y., Li D., Dahl J., You J., Benjamin T. (2004) Identification of TAZ as a binding partner of the polyomavirus T antigens. *Journal of Virology* 78, 12657–64.

Tian Y., Kolb R., Hong J.H., Carroll J., Li D., You J., Bronson R., Yaffe M.B., Zhou J., Benjamin T. (2007) TAZ promotes PC2 degradation through aSCFbeta-Trcp E3 ligase complex. *Mol. Cell. Biol.* 27, 6383–6395.

Tooze J. (1981) *DNA Tumor Viruses*. Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1073 s.

Urich M., Senften M., Shaw P.E., Ballmer-Hofer K. (1997) A role for the small GTPase Rac in polyomavirus middle-T antigen-mediated activation of the serum response element and in cell transformation. *Oncogene* 14, 1235–41.

Utermark T., Schaffhausen B.S., Roberts T.M., Zhao J.J. (2007) The p110alpha isoform of phosphatidylinositol 3-kinase is essential for polyomavirus middle T antigen-mediated transformation. *Journal of Virology* 81, 7069–76.

van der Geer P., Wiley S., Gish G. D., Pawson T. (1996). The Shc adaptor protein is highly phosphorylated at conserved twin tyrosine residues (Y239/240) that mediate protein-protein interactions. *Curr. Biol.* 6, 1435–1444.

Vasiljeva O., Papazoglou A., Kruger A., Brodoefel H., Korovin M., Deussing J. et al. (2006) Tumor cell-derived and macrophage-derived cathepsin B promotes progression and lung metastasis of mammary cancer. *Cancer Res* 66, 5242–50.

Viral Zone (internetový zdroj)  
[http://viralzone.expasy.org/all\\_by\\_s](http://viralzone.expasy.org/all_by_s)

Walter G., Ruediger R., Slaughter C., Mumby M. (1990). Association of protein phosphatase 2A with polyoma virus medium tumor antigen. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87, 2521–2525.

Wange R. L., Samelson L. E. (1996) Complex Complexes: Signaling at the TCR. *Immunity* 5, 197–205.

Whalen K.A., de Jesus R., Kean J.A., Schaffhausen B.S. (2005) Genetic analysis of the polyomavirus DnaJ domain. *J. Virol.* 79, 9982–9990.

Wyckoff J., Wang W., Lin E.Y., Wang Y., Pixley F., Stanley E.R. et al. (2004) A paracrine loop between tumor cells and macrophages is required for tumor cell migration in mammary tumors. *Cancer Res* 64, 7022–9.

Yamazaki M., Akahane T., Buck T., Yoshiji H., Gomez D.E., Schoeffner D.J. et al. (2004) Long-term exposure to elevated levels of circulating TIMP-1 but not mammary TIMP-1 suppresses growth of mammary carcinomas in transgenic mice. *Carcinogenesis* 25, 1735–46.

Yang S. I., Lickteig R. L., Estes R., Rundell K., Walter G., Mumby M. C. (1991) Control of protein phosphatase 2A by simian virus 40 small-t antigen. *Mol. Cell. Biol* 11, 1988–1995.

Yang C. S., Vitto M. J., Busby S. A., Garcia B. A., Kesler C. T., Gioeli D., Shabanowitz J., Hunt D. F., Rundell K., Brautigan D. L., Paschal B. M. (2005) Simian virus 40 small t



antigen mediates conformation-dependent transfer of protein phosphatase 2A onto the androgen receptor. *Mol. Cell. Biol.* 25, 1298–1308.

Yi X., Freund R. (1998) Deletion of proline-rich domain in polyomavirus T antigens results in virus partially defective in transformation and tumorigenesis. *Virology* 248, 420-431.

Zhou Y. A., Ichaso N., Adamarek A., Zila V., Forstova J., Dibb N.J., Dilworth S.M. (2011) Polyomavirus Middle T-Antigen Is a Transmembrane Protein That Binds Signaling Proteins in Discrete Subcellular Membrane Sites. *Journal of Virology* 85, 3046–3054.