

**Univerzita Karlova**  
**Přírodovědecká fakulta**

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



**Anna Kertisová**

Helikáza DHX9 a její role ve virových infekcích  
Helicase DHX9 and its role in viral life cycles

Bakalářská práce

Vedoucí práce: RNDr. Lenka Horníková, Ph.D.

Praha, 2020



## **Prohlášení**

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 25. 5. 2020

Anna Kertisová

## **Poděkování**

Ráda bych poděkovala vedoucí práce RNDr. Lence Horníkové, Ph.D. za poskytnuté rady. Dále děkuji rodině za podporu a trpělivost během celého studia, příteli za podporu a formální náležitosti bakalářské práce a Mladě Filípkové za jazykovou korekturu.

## Abstrakt

Helikázy jsou proteiny, které zajišťují odvíjení vláken víceřetězcových konformací nukleových kyselin. DHX9 je zástupcem helikáz s DExD/H motivem. Jako substrát rozeznává molekuly RNA, DNA a hybridní struktury. V jádře eukaryotických buněk se DHX9 účastní vytváření replikační vidličky či působí v komplexu transkripčních faktorů a propojuje jiné proteiny s RNA polymerázou II. Následně DHX9 reguluje posttranskripční úpravy RNA. Po přechodu do cytoplasmu napomáhá správnému průběhu translace strukturovaných mRNA.

Vzhledem k tomu, že se DHX9 účastní procesů spojených s nukleovými kyselinami, je zkoumána její úloha v životním cyklu virů. Zároveň je součástí antivirových signalizačních drah buňky. DHX9 poskytuje výhodu RNA virům a retrovirům v jejich replikačním cyklu různými způsoby. Signifikantní je vazba DHX9 na sekundární struktury virových RNA a jejich případná remodelace, která vede k podpoře virové replikace, transkripce i translace. Oproti tomu DNA viry využívají DHX9 k regulaci hostitelské exprese a minimalizaci její antivirové funkce. Pochopení vztahů hostitelských proteinů a virů může vést do budoucna k efektivnějšímu cílení terapeutických preparátů proti virovým infekcím.

**Klíčová slova:** helikázy, DExD/H-box motiv, DHX9, viry, životní cyklus viru

## **Abstract**

Helicases are proteins that provide strands-unwinding of polystranded conformations of nucleic acids. DHX9 is a representative of helicases with a DExD/H-box motif. It accepts molecules of RNA, DNA and hybrid structures as a substrate. Inside the nucleus of the eukaryotic cell, DHX9 participates in the formation of the replication fork or it acts in a complex of transcriptional factors and it connects other proteins with RNA polymerase II. Subsequently DHX9 regulates post-transcriptional RNA processing. After a shuttle to the cytoplasm it assists in a correct course of translation of structured mRNAs.

Since DHX9 is involved in nucleic acids-related processes, its role in viral life cycles is investigated. Also it is a part of antiviral signaling pathways of the cell. DHX9 provides an advantage for RNA viruses and retroviruses in their replicative cycle in various manners. The binding of DHX9 on secondary structures of viral RNAs and their eventually remodeling, which causes promotion of viral replication, transcription and translation, is significant. In contrast to that, DNA viruses use DHX9 to regulate host protein expression and minimize its antiviral function. Understanding of relationship could lead to more effective aiming of the therapeutic drugs against viral infections.

**Key words:** helicases, DExD/H-box motif, DHX9, viruses, viral life cycle

## Seznam zkratek

A3B	apolipoprotein B mRNA-editing enzym catalytic polypeptide-like 3B (protein editující RNA)
ADAR	adenosine deaminase acting on RNA (adenosideamináza působící na RNA)
Ago-2	protein argonaute-2
Asp	kyselina asparagová
ATP	adenosine triphosphate (adenosintrifosfát)
BLAST	basic local alignment search tool (algoritmus pro porovnávání aminokyselinových sekvencí)
cAMP	cyclic adenosine monophosphate (cyklický adenosinmonofosfát)
CBP	CREB-binding protein (CREB vazebný protein)
cDNA	complementary DNA (komplementární DNA)
C-konec	karboxylový konec
CpG	cytosine-phosphate-guanine (cytosin-fosfát-guanin)
CREB	cAMP response element-binding protein (cAMP responzivní element vázající protein)
CTE	constitutive transport element (konstitutivní transportní element)
DHX9	DExH-box protein 9
D-loops	displacement loops (třívláknová struktura DNA)
DNA	deoxyribonucleic acid (deoxyribonukleová kyselina)
dsRBD	dsRNA-binding domain (doména vázající dsRNA)
dsRNA	double-stranded RNA (dvouřetězcová RNA)
EBV	Epstein-Baar virus (virus Epstein-Baarové)
EGFR	epidermal growth factor receptor (epidermální růstový faktor)
FMVD	foot-and-mouth disease virus (virus slintavky a kulhavky)
G-kvadruplex	guaninový kvadruplex
Glu	kyselina glutamová
GRIA2	glutamate receptor subunit 2 (ionotropní glutamátový receptor 2)
gRNA	genomic RNA (genomová RNA)
HA2	helicase-associated domain 2 (doména asociovaná s helikázovým jádrem)

HAP95	A-kinase anchoring protein 95-like protein (protein podobný A-kinázovému kotvícímu proteinu 95)
HBV	hepatitis B virus (virus hepatitidy B)
HBx	hepatitis B virus X protein (protein X viru hepatitidy B)
HCV	hepatitis C virus (virus hepatitidy C)
His	histidin
HIV-1	human immunodeficiency virus type 1 (virus lidské imunitní nedostatečnosti typu 1)
CHIKV	Chikungunya virus
IGS-rRNA	intergenic spacer ribosomal RNA (intergenové mezerníky ribozomální RNA)
IL-6	interleukin-6
LARP6	La-related protein 6 (La-související protein 6)
LTR	long terminal repeat (dlouhé koncové repetice)
MBD2a	methyl-CpG-binding domain protein 2a (methyl-CpG-vázající doména proteinu 2a)
MDM2	mouse double minute 2 homolog (protein působící jako ubiquitin ligáza)
<i>MDR1</i>	multidrug resistance protein 1 gene (gen pro protein 1 multi lékové rezistence)
MEF1	<i>MDR1</i> promoter-enhancing factor (enhancer promotoru <i>MDR1</i> )
miRNA	micro-RNA (mikroRNA)
MLE	maleless protein (protein ovlivňující genovou dózi u <i>Drosophila melanogaster</i> )
mRNA	messenger RNA (mediátorová RNA)
MTAD	minimal trans-activating domain (minimální transaktivační doména)
MyD88	myeloid differentiation primary response 88 (adaptorový protein signální kaskády)
N protein	nucleocapsid protein (nukleokapsidový protein)
NES	nuclear export signal (jaderný exportní signál)
NF45	nuclear factor 45 (jaderný faktor 45)
NF90	nuclear factor 90 (jaderný faktor 90)



NFAR-1	nuclear factor associated with dsRNA 1 (jaderný faktor asociovaný s dsRNA 1)
NF-κB	nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (jaderný faktor kappa B)
N-konec	aminový konec
NLS	nuclear localization signal (jaderný lokalizační signál)
NS1	nonstructural protein 1 (nestrukturní protein 1)
nsP2	nonstructural protein 2 (nestrukturní protein 2)
nsP3	nonstructural protein 3 (nestrukturní protein 3)
Nsp9	nonstructural protein 9 (nestrukturní protein 9)
NTD	nuclear transport domain (jaderná transportní doména)
NTP	nucleoside triphosphate (nukleosidtrifosfát)
Nup98	nucleoporin 98 (nukleoporin 98)
OB-fold	oligonucleotide/oligosaccharide-binding fold (doména vázající oligonukleotidy či oligosacharidy)
Oct4	octamer-binding transcription factor 4 (oktamer vazebný transkripční faktor 4)
PBS	primer binding site (vazebné místo pro primer)
PCE	post-transcriptional control element (posttranskripční kontrolní element)
PCNA	proliferating cell nuclear antigen (jaderný antigen proliferující buňky)
PKR	protein kinase RNA-activated (proteinkináza aktivovaná přítomností dsRNA)
PML NBs	promyelocytic leukemia nuclear bodies (jaderná telíska promyelotické leukémie)
pre-mRNA	precursor messenger RNA (prekurzor mediátorové RNA)
PRRSV	porcine reproductive and respiratory syndrome virus (virus prasečího reprodukčního a respiračního syndromu)
RGG-box	arginine-glycin-glycin-binding box (doména vázající sekvenci arginin-glycin-glycin)
RISC	RNA-induced silencing complex (komplex štěpící RNA)
R-loops	RNA loops (třívláknová struktura DNA a RNA)

RNA	ribonucleic acid (ribonukleová kyselina)
RRE	Rev response element (Rev responzivní element)
rRNA	ribosomal RNA (ribozomální RNA)
SF1	superfamily 1 (klasifikovaná skupina helikáz)
SF2	superfamily 2 (klasifikovaná skupina helikáz)
SF3	superfamily 3 (klasifikovaná skupina helikáz)
SF3B3	splicing factor 3B subtype 3 (sestřihový faktor)
SFPQ	splicing factor proline and glutamine rich (sestřihový faktor)
siRNA	small interfering RNA (malá interferující RNA)
SMN protein	survival motor neuron protein (protein přežití motoneuronu)
TAP	herpesvirus saimiri Tip-associated protein (protein vázající CTE retrovirů)
TAR	trans-activation response element (transaktivační responzivní element)
Tat	trans-activator of transcription (transaktivátor transkripce)
TIP5	transcription termination factor I-interacting protein 5 (protein interagující s transkripčním terminačním faktorem)
Top1	DNA topoisomerase 1 (DNA topoizomeráza 1)
TRBP	transactivation response element RNA-binding protein (protein vázající se na transaktivační responzivní element)
tRNA	transfer RNA (transferová RNA)
UTR	untranslated region (nepřekládané oblasti)
VA RNA	virus-associated RNA (RNA virového původu)
vPK	viral proteinkinase (virová proteinkináza)
WRN	Werner syndrome helicase (helikáza Wernerova syndromu)

# Obsah

1	Úvod.....	1
2	Role DHX9 v buněčných procesech .....	2
2.1	Helikázy .....	2
2.2	Helikáza DHX9 .....	2
2.3	Struktura a obecné vlastnosti DHX9.....	3
2.4	Úloha DHX9 v replikaci buněčné DNA.....	7
2.5	Úloha DHX9 v transkripci .....	8
2.6	Úloha DHX9 v posttranskripčních úpravách RNA.....	10
2.7	Úloha DHX9 v translaci.....	12
3	DHX9 a viry .....	15
3.1	RNA viry.....	15
3.1.1	Viry napadající člověka.....	15
3.1.2	Viry napadající hospodářská zvířata .....	18
3.2	<i>Retroviridae</i> .....	19
3.2.1	Virus lidské imunitní nedostatečnosti typu 1 (HIV-1) .....	20
3.3	<i>Hepadnaviridae</i> .....	23
3.3.1	Virus hepatitidy B (HBV) .....	23
3.4	DNA viry .....	24
4	DHX9 a její zapojení v antivirové obraně .....	26
5	Závěr .....	27
6	Seznam literatury .....	30



# 1 Úvod

Helikázy jsou enzymy, které katalyzují odvíjení vláken nukleových kyselin. Z dvouřetězcových struktur vytváří oddělené jednovláknové molekuly. Tato reakce je energeticky náročná, proto helikázy využívají jako zdroj energie hydrolýzu fosfodiesterové vazby nukleosidtrifosfátů. Jsou velice důležitou součástí metabolismu nukleových kyselin. Helikázy se významně podílí například na replikaci DNA, kdy odvíjením vláken vytváří replikační vidličku a prostor pro syntézu komplementárních vláken. Avšak helikázy jsou nezastupitelné jak v jaderných, tak v cytoplasmatických procesech, které vyžadují změnu uspořádání nukleových kyselin.

Viry jsou obligátní vnitrobuněční parazité. Jejich životní cyklus je více či méně závislý na enzymatickém vybavení hostitelské buňky. Bez hostitele nejsou schopny zdvojovat svoji genetickou informaci či exprimovat proteiny. Během infekce jsou viry schopné přizpůsobovat podmínky v buňce, aby byly pro jejich replikační cyklus co nejvýhodnější. Kromě využívání hostitelských proteinů ve svůj prospěch, mohou viry také ovlivňovat, jaké proteiny budou hostitelem produkovány. Dále jsou některé viry schopny regulovat přirozenou obranyschopnost hostitele vůči nim.

Celý životní cyklus virů včetně replikace nukleové kyseliny probíhá v buňce. Z toho důvodu je zajímavé si položit otázku, zda a jakým způsobem se zapojují hostitelské helikázy ve virové infekci.

Tato práce se zaměřuje na helikázu DHX9 a její roli v replikačním cyklu virů. První část se zabývá úlohou DHX9 v buněčných procesech jako jsou replikace DNA, transkripce, posttranskripční úpravy a translace. V druhé části je poté diskutováno zapojení DHX9 ve virové infekci. DHX9 se zapojuje v životním cyklu RNA i DNA virů z různých čeledí. Způsoby, jakými tato helikáza participuje v infekci, jsou rovněž různorodé. DHX9 zastává dvojí roli, je využívána ve prospěch virů, a oproti tomu se také podílí na antivirové obraně.

## 2 Role DHX9 v buněčných procesech

### 2.1 Helikázy

Helikázy jsou enzymy schopné pomocí energie z hydrolýzy fosfodiesterové vazby nukleosidtrifosfátů, nejčastěji z ATP, rozvolňovat dvoušroubovice a jiné sekundární struktury nukleových kyselin. Rovněž napomáhají narušovat komplexy nukleových kyselin s proteiny či protein-proteinové interakce. Pro jejich funkčnost je tedy důležité, aby obsahovaly NTP-vazebnou oblast a zároveň aktivní místo vázající nukleovou kyselinu. Rozštěpením nukleosidtrifosfátu na nukleosiddifosfát a fosfát je uvolněna energie, která je využita pro změnu konformace enzymu, který rozrušuje duplexy nukleových kyselin. Ze své podstaty participují helikázy v dějích, kde je potřeba remodelovat struktury nukleových kyselin, například v replikaci, transkripci, translaci či opravách DNA (Patel & Donmez, 2006).

Gorbalenya a Koonin v roce 1993 zavedli základní klasifikaci helikáz na základě podobností jejich aminokyselinových sekvencí. Popsali tři „super-family“ helikáz: SF1, SF2 a SF3, a dvě menší rodiny: „DnaB-like“ a „Rho-like“ (Gorbalenya & Koonin, 1993). Nicméně s přibývajícími znalostmi proteinových struktur byla klasifikace pozměněna a nyní rozeznáváme 6 „super-family“ helikáz (Singleton *et al.*, 2007). Označení prvních dvou skupin však zůstalo, zástupci mají v jádru proteinu dvě konzervované RecA-like domény vázající jak nukleosidtrifosfát, tak nukleové kyseliny jako substrát. V rámci těchto domén se nachází konzervované motivy typické pro danou rodinu helikáz (Jankowsky & Fairman-Williams, 2010). Do skupiny SF2 patří také DExH-box helikázy pojmenované dle sekvence aminokyselin (Asp-Glu-X-His) v motivu II. (Jankowsky, 2000).

### 2.2 Helikáza DHX9

DHX9 („DExH-box protein 9“), označována coby RNA helikáza A či jaderná DNA helikáza II, je helikáza, která je závislá na štěpení  $\gamma$ -fosfátu nukleosidtrifosfátů, a to jak adenosintrifosfátu, tak i guanosintrifosfátu, cytidintrifosfátu, uridintrifosfátu a všech jejich deoxy-alternativ (Zhang & Grosse, 1991). Díky výskytu DExH sekvence v katalytickém jádru ji řadíme mezi enzymy skupiny SF2 (Zhang & Grosse, 1997; Schütz *et al.*, 2010).

Gen pro lidskou DHX9 se nachází na dlouhém rameni prvního chromozomu v oblasti 25 a na dlouhém rameni třináctého chromozomu v oblasti 22 se nachází její

pseudogen (Lee *et al.*, 1999). Myší homolog je kódován rovněž na prvním chromozomu (Lee *et al.*, 1998b).

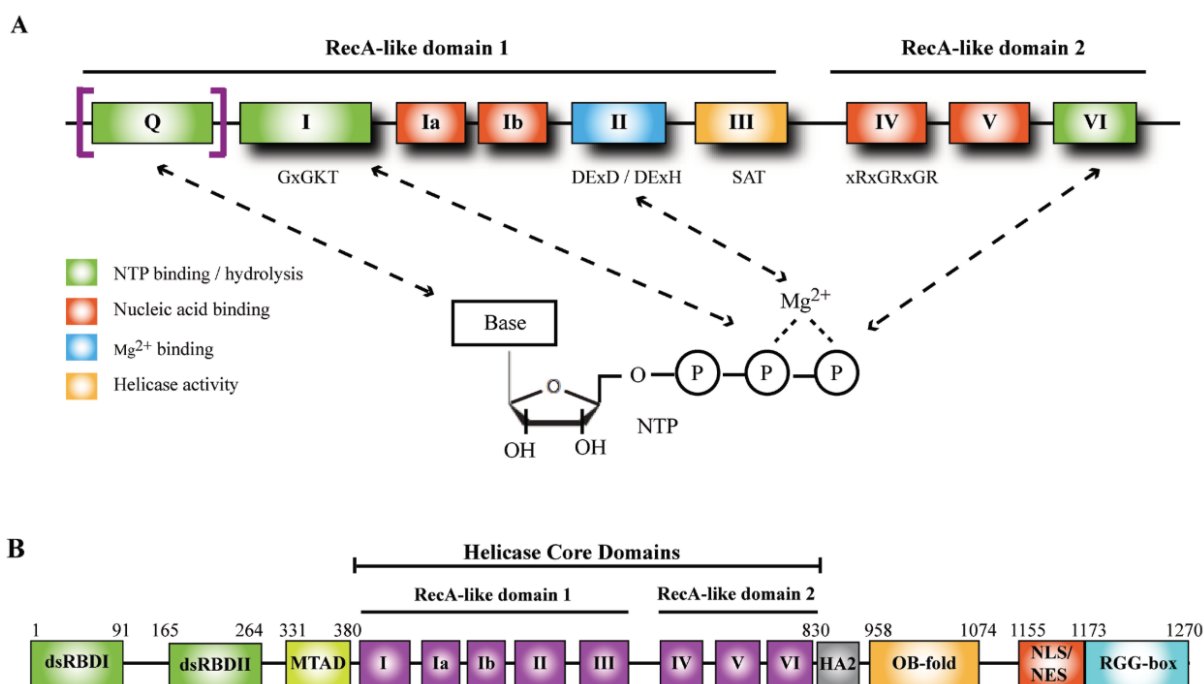
Poprvé byla DHX9 popsána v roce 1991. Z telecího brzlíku byla izolována DNA helikáza, jejíž aktivita byla stimulována přítomností DNA i RNA. Byla nazvána jadernou DNA helikázou II (Zhang & Grosse, 1991). Rok poté byla detekována v jádrech lidských rakovinných HeLa buněk RNA helikáza A, která dle výsledků rozvolňovala dvoušroubovici ribonukleové kyseliny (Lee & Hurwitz, 1992). Následně se ukázalo, že lidská RNA helikáza A je z 85% shodná s proteinem maleless (MLE) ovlivňujícím kompenzaci genové dóze *Drosophily melanogaster* (Lee & Hurwitz, 1993). Konečné rozuzlení přinesla práce Zhang *et al.* (1995), která dokládá aminokyselinovou sekvenční totožnost těchto tří enzymů. Nicméně homology této helikázy byly prokázány i v buňkách jiných organismů, jako například u *Mus musculus* či *Ceanorhabditis elegans* (Lee *et al.*, 1998b; Walstrom *et al.*, 2005). Pomocí BLAST algoritmu byly určeny homology lidské DHX9 též u modelových organismů: *Saccharomyces cerevisiae*, *Arabidopsis thaliana*, *Oryza sativa* a *Plasmodium falciparum* (Umate *et al.*, 2011).

Protein maleless asociuje s chromozomem X samců *Drosophily melanogaster* a podporuje transkripci jeho genů, čímž kompenzuje nižší počet gonozomálních produktů oproti samičkám (Kuroda *et al.*, 1991). Taktéž hraje zásadní úlohu v přežívání samčích zárodků, recesivní homozygoti s mutovaným MLE hynou v rané fázi (Fukunaga *et al.*, 1975). Avšak nefunkčnost DHX9 způsobuje letalitu také u savčích embryí. Myší homolog se účastní brzké fáze embryonálního vývoje, kdy jeho absence způsobuje narušení průběhu gastrulace (Lee *et al.*, 1998a). Viditelné morfologické změny jsou pozorovatelné i v mutantních lidských buněčných kulturách. Buňky fibroblastů se sníženou expresí DHX9 jsou menší, ploché, nepravidelného tvaru a rychleji stárnou (Lee *et al.*, 2014).

### 2.3 Struktura a obecné vlastnosti DHX9

Lidská DHX9 je složena z 1287 aminokyselin, její molekulová hmotnost dosahuje 140 kDa a jakožto zástupce DExH skupiny má své aktivní jádro složeno ze dvou RecA-like domén, které ještě můžeme rozdělit do osmi konzervovaných motivů (Zhang *et al.*, 1995; Tanner & Linder, 2001). Tyto domény jsou téměř totožné a každá je sestavena z pěti ústředních  $\beta$ -skládaných listů střídajících se s pěti  $\alpha$ -šroubovicemi (Schütz *et al.*, 2010). Zároveň jsou propojeny variabilním spojením, které vytváří prohlubeň ve struktuře enzymu, kde se nachází vazebné místo pro nukleosidtrifosfát (motiv I) i oblast vazby

nukleových kyselin (motiv VI) (Zhang & Grosse, 1997; Jankowsky & Fairman-Williams, 2010). Na rozdíl od jiných reprezentantů DExH rodiny, DHX9 helikáza neobsahuje Q motiv zodpovědný za vazbu specificky adenosintrifosfátu. Je schopna využívat i další NTPs (Lee & Hurwitz, 1992; Tanner *et al.*, 2003). Nukleosidtrifosfáty jsou rozeznávány pouze pomocí patrových interakcí mezi  $\pi$  elektrony aromatických kruhů bází a argininu 456 helikázy DHX9. Současně koordinaci  $\beta$ -fosfátu zajišťuje lysin 417 patřící do Walkerova motivu A v rámci motivu I (Schütz *et al.*, 2010). Charakteristická sekvence kyseliny asparagové, kyseliny glutamové, isoleucinu a histidinu se nachází v motivu II, který interaguje s dvojmocným kationtem hořčíku udržujícím integritu nukleosidtrifosfátů (**obr. 1**) (Schütz *et al.*, 2010).

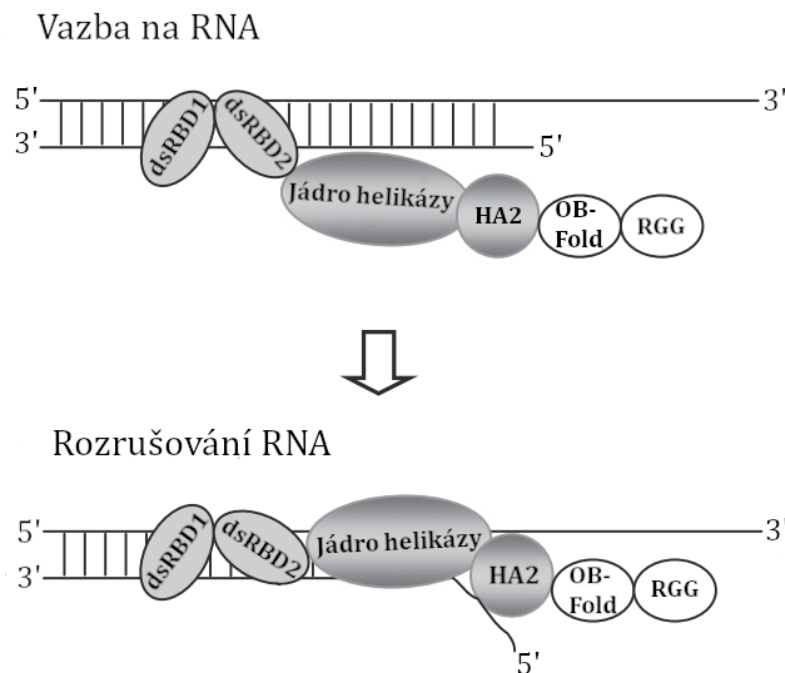


**Obr. 1: Znázornění funkčních domén helikázy DHX9 a jejich vztah k nukleosidtrifosfátu. A)** Model helikázového jádra. DHX9 je složena ze dvou „RecA-like“ domén a neobsahuje Q motiv, jako jiní zástupci DEXH skupiny, váže všechny NTPs. S  $\beta$ -fosfátem interaguje motiv I (Walkerův motiv A). Typická sekvence DExH motivu II asociuje s hořčnatými ionty a poslední motiv VI váže  $\gamma$ -fosfát nukleosidtrifosfátu. **B)** Model celého uspořádání DHX9 včetně přídatných domén na N a C-konci. Od aminového konce: dvě domény vázající dvouvláknové RNA (dsRBDs); minimální transaktivací doména (MTAD); helikázové jádro; „helicase-asociated domain 2“ (HA2); doména vázající oligonukleotidy/oligosacharidy (OB-fold); jaderný lokalizační a exportní signál (NLS/NES); doména vázající přednostně jednovláknové nukleové kyseliny (RGG-box). Převzato z (Lee & Pelletier, 2016).

Centrum enzymu obklopují na N-konci dvě domény vázající dvoušroubovici RNA (dále jen dsRBD) a na C-konci „helicase-associated domain 2“ (HA2), OB-fold vázající oligonukleotidy či oligosacharidy (Gibson & Thompson, 1994; Zhang & Grosse, 1997; Xing *et al.*, 2014c). Asi 100 aminokyselin na C-konci vytváří takzvaný RGG-box, tedy oblast, kde



se dva po sobě jdoucí glycininy střídají s argininem (Zhang & Grosse, 1997). RGG-box se oproti dsRBDs váže přednostně na jednovláknové nukleové kyseliny (Zhang & Grosse, 1997). Avšak helikáza vykazuje rozvolňovací aktivitu i bez těchto přídatných domén, krom HA2 domény, u které se ukázalo, že její delece způsobuje funkční inaktivaci (**obr. 2**) (Xing *et al.*, 2014c). Přesto tyto domény napomáhají zvyšovat afinitu DHX9 k substrátu (Zhang & Grosse, 1997; Xing *et al.*, 2014c).



**Obr. 2: Model zapojení přídatných domén v helikázové aktivitě.** dsRBDs rozeznávají a vážou se na dvoušroubovici RNA, která je následně rozvolňována katalytickým jádrem enzymu a připojenou doménou HA2. C-koncové domény nenapomáhají rozvolňování. Převzato z (Xing *et al.*, 2014c).

Jako substrát jsou využívány dvouvláknové molekuly DNA, RNA či jejich hybridy, kdy se helikázová aktivita projevuje přednostně ve směru od 3' konce k 5' konci (Lee & Hurwitz, 1992; Zhang & Grosse, 1994). Dále jsou rozeznávány třívláknové struktury DNA, kde se vyskytuje Hoogsteenovo párování bází a jednovláknový přesah na 3' konci alespoň jednoho vlákna (Zanto *et al.*, 2011). Biologicky důležitou se jeví i afinita helikázy k R-smyčkám (R-loops), které jsou tvořeny dvojřetězcovou DNA, ve které je vsunuto jedno vlákno molekuly RNA. Jedná se například o intermediát transkripce (Chakraborty & Grosse, 2011; Vespucio *et al.*, 2015). Oproti tomu hybridní molekuly podobné Okazakiho fragmentům jsou rozvolňovány velice slabě, přítomnost DHX9 však zvyšuje efektivitu WRN helikázy v jejich rozvazování (Chakraborty & Grosse, 2010). S menší účinností jsou vázány D-smyčky („D-loops“), které jsou přirozenou součástí

rekombinačních procesů, zde vzniká obdoba R-smyčky tvořená pouze molekulami DNA (Kowalczykowski, 2000; Chakraborty & Grosse, 2011). V neposlední řadě bylo potvrzeno překonávání DNA i RNA guaninových kvadruplexů *in vitro* (Chakraborty & Grosse, 2011).

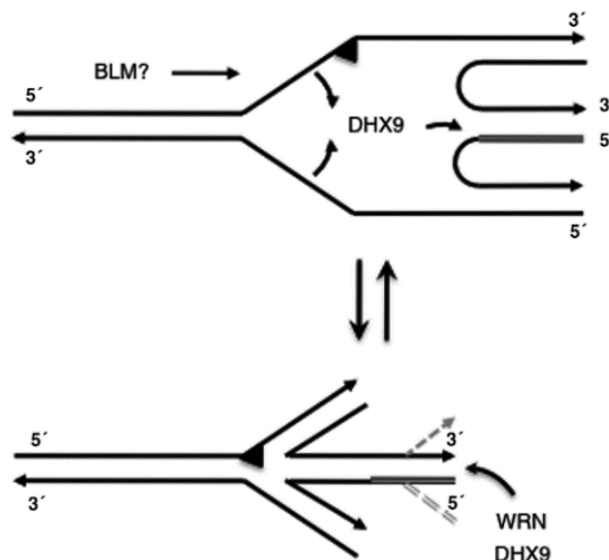
Pomocí imunofluorescence byla DHX9 prvotně lokalizována v nukleoplasmě (Zhang *et al.*, 1995). Avšak existence jaderného lokalizačního (NLS) i exportního signálu (NES) poukazuje na schopnost enzymu migrovat mezi jádrem a cytoplasmou (Tang *et al.*, 1999). Tuto domněnku potvrzuje zjištění, že se DHX9 váže na pre-mRNA a následně na hotovou mRNA, se kterou se poté dostává do cytoplasmy. Při zastavení transkripce či během mitózy je v jádře nedostatek RNA, ke které má helikáza afinitu, čili se ve větším množství shromažďuje mimo jádro (Zhang *et al.*, 1999b). V lidských HeLa a MCF-7 buňkách byl zaznamenán výskyt proteinu také v centrozomu společně s helikázou Wernerova syndromu (WRN) a fosforylovaným histonem  $\gamma$ H2AX. Zde se DHX9 objevuje především v interfázi a s průběhem mitózy se její koncentrace v centrozomu snižuje (Zhang *et al.*, 2007). Jaderný import DHX9 je ovlivněn metylací argininů v RGG-boxu C-koncové oblasti, na které se podílí především protein arginin methyltransferáza 1. Když je methylovaná zabráněna, snižuje se schopnost proteinu vstupovat do jádra (Smith *et al.*, 2004). Zároveň přenos do jádra probíhá klasickou  $\alpha/\beta$ -importinovou dráhou, kdy je jaderný lokalizační signál rozeznáván konkrétně importinem- $\alpha 3$  (Aratani *et al.*, 2006).

V myších buňkách 3T3 se DHX9, která má prodloužený RGG-box oproti lidské variantě, vyskytuje především v jadérku a pravděpodobně se účastní produkce ribozomální RNA (Zhang *et al.*, 1999a). Přesto byla v jadérku detekována taktéž u lidských HeLa buněk za stavu umlčení RNA polymerázy II a u fibroblastů DS1 za přirozených podmínek (Fuchsová & Hozák, 2002). Konkrétně je lidská DHX9 spojená s denzním fibrilárním komponentem na okraji jadérka. Do těchto míst je organizována pomocí F-aktinových vláken, ke kterým vykazuje afinitu (Zhang *et al.*, 2001, 2004; Fuchsová & Hozák, 2002). Přesun do jadérka je usměrňován i jadernou transportní doménou (NTD) na C-konci a existencí především dsRBDII na N-konci helikázy. Delece obou těchto domén vede k neschopnosti přemístění enzymu do jadérka (Liu *et al.*, 2007). Naopak k translokaci z jadérka do nukleoplasmy přispívá nízká koncentrace guanosintrifosfátu. To naznačuje, že motivy, které vážou nukleosidtrifosfáty mají regulační funkci v přemístění proteinu v rámci jádra (Huang & Mitchell, 2008). V jaderném umístění hraje roli také nukleoporin Nup98, který s helikázou vytváří komplex působící

v nukleoplasmě. Nup98 rovněž stimuluje ATPázovou aktivitu DHX9 (Capitanio *et al.*, 2017).

## 2.4 Úloha DHX9 v replikaci buněčné DNA

Díky interakci s jinými proteiny se DHX9 podílí na procesu replikace. Helikáza Wernerova syndromu (WRN) je součástí replikačního komplexu, zároveň asociuje přímo s dsRBDII na aminovém konci a RGG-boxem na C-konci DHX9. Tato vazba podněcuje exonukleázovou aktivitu WRN od 3' konce k 5' konci nukleové kyseliny (Friedemann *et al.*, 2005). Paralelně DHX9 napomáhá rozvolňování struktur vznikajících při replikaci jako jsou Okazakiho fragmenty či „chicken-foot“, a tím umožňuje překonávání překážek během syntézy (**obr. 3**) (Chakraborty & Grosse, 2010). Obě helikázy asociují s proliferačním buněčným jaderným antigenem (PCNA) jakožto důležitým enzymem replikace a oprav DNA (Loor *et al.*, 1997; Lebel *et al.*, 1999; Essers *et al.*, 2005). WRN navíc dává možnost DNA polymeráze  $\delta$  rychleji polymerovat nové vlákno DNA (Kamath-Loeb *et al.*, 2000). Dále byl prokázán vztah mezi DHX9 a topoizomerázou II $\alpha$ , která odstraňuje pozitivní nadšroubovicové vinutí DNA formující se před replikační vidličkou, čímž usnadňuje postup polymerázové mašinerie (Zhou *et al.*, 2003; Mcclendon *et al.*, 2005). Na základě těchto skutečností se DHX9 jeví jako významný prvek komplexního proteinového systému replikace.



**Obr. 3: Schéma remodelace replikační vidličky pomocí helikázy Wernerova syndromu a DHX9.** Společně jsou schopné překonávat „chicken-foot“ struktury od 3' konce vlákna, které mohou narušovat průběh replikace. Převzato a upraveno z (Chakraborty & Grosse, 2010).

Ztráta helikázy DHX9 vede v lidských MRC-1 buňkách ke stárnutí spuštěním odpovědi proteinu p53. V její nepřítomnosti dochází k poklesu zdvojování dědičné informace, protože je komponentou faktorů replikačního počátku (originu) (Lee *et al.*, 2014). DHX9 interaguje například s enzymem Ku86, který je podjednotkou DNA dependentní protein kinázy a je též součástí komplexu zajišťujícího nehomologní spojování konců při reparaci dvouřetězcových zlomů DNA (Zhang *et al.*, 2003; Fattah *et al.*, 2010).

## 2.5 Úloha DHX9 v transkripci

Kromě replikace je dále DHX9 spojena s transkripcí. Svou minimální transaktivační doménou (MTAD) přímo interaguje s RNA polymerázou II (Aratani *et al.*, 2001; Schütz *et al.*, 2010).

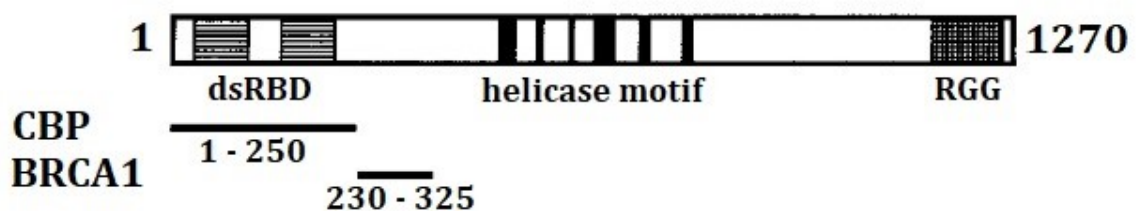
Hybridní molekuly složené z jednoho RNA vloženého mezi dvoušroubovici DNA se v buňkách objevují v podobě takzvaných R-smyček, které jsou normální složkou transkripce. Avšak nahromadění R-smyček může být jedním z důvodů genomové nestability (Aguilera & García-Muse, 2012). DHX9 prokazatelně rozvolňuje R-smyčky *in vitro*. Je předpokládáno, že *in vivo* spolupracuje s RNA polymerázami a tak urychluje přepisování DNA do RNA (Chakraborty & Grosse, 2011). Přítomnost DHX9 byla prokázána v průběhu transkripce *in vivo*, stejně tak byla určena její konkrétní funkce v tomto ději. Účastní se na odstraňování hybridních struktur během terminace transkripce. Zároveň nedostatečnost enzymu DHX9 a současná inhibice proteinu Top1 způsobuje akumulaci R-smyček, což vede k poškození DNA. DHX9 tedy zastává důležitou roli i v ochraně dědičné informace (Cristini *et al.*, 2018).

DHX9 je jedním z transkripčních faktorů a regulátorů exprese genů odpovídajících na buněčnou signalizaci, která vytváří jako druhé posly cyklický adenosinmonofosfát (cAMP). Tvoří spojovací článek mezi CREB-vazebným proteinem (CBP), p300 a RNA polymerázou II (Nakajima *et al.*, 1997). *In vivo* je CBP vázaný na N-konec DHX9 mezi aminokyselinami 1-250. Současně v oblasti mezi 331 a 380 aminokyselinami DHX9 se nachází minimální transaktivační doména (MTAD), která zprostředkovává kontakt mezi helikázou a RNA polymerázou II (Aratani *et al.*, 2001; Schütz *et al.*, 2010). Transkripce může být aktivovaná jak interakcí s RNA polymerázou II, tak samotnou helikázovou aktivitou DHX9 (Aratani *et al.*, 2001). Pro transaktivaci jsou klíčové aromatické aminokyseliny v MTAD, a to tryptofany v polohách 332, 339 a 342. Jejich aromatický

charakter dovoluje vzájemné působení  $\pi$  elektronů ve vazbě s RNA polymerázou II či přímo transaktivaci (Aratani *et al.*, 2003). Methylace CRE elementu, který je konzervovanou sekvencí DNA, brání navázání CREB. Protein MBD2a potlačuje transkripci z methylovaného CRE elementu. Pokud však CRE element není methylovaný, tak je exprese genů závislých na CREB ještě zesilována proteinem MBD2a zapojením se k transkripčním faktorům díky asociaci s helikázou DHX9 (Fujita *et al.*, 2003).

Nukleoporin Nup98, který ovlivňuje umístění helikázy v jádře, stimuluje hydrolyzu ATP helikázou, čímž podporuje její aktivační vlastnosti v přepisu DNA (Capitano *et al.*, 2017). Kromě toho Nup98 i DHX9 asociují s CBP, usuzuje se tak, že nukleoporin reguluje právě transkripci závislou na CREB (Nakajima *et al.*, 1997; Kasper *et al.*, 1999; Capitanio *et al.*, 2017).

Obdobně jako CBP je přes vazbu k DHX9 korigovaný kontakt mezi tumor-supresorovým proteinem rakoviny prsu BRCA1 a RNA polymerázou II. BRCA1 spojen s N-koncem helikázy DHX9, ale v jiné oblasti než CBP (Anderson *et al.*, 1998). Vazebná doména pro CBP se nachází mezi aminokyselinami 1 až 250, na rozdíl od vazebné domény BRCA1, která se vyskytuje v oblasti 230-325 aminokyselin (**obr. 4**) (Nakajima *et al.*, 1997; Anderson *et al.*, 1998). DHX9 se společně s BRCA1 podílí na nápravě poškozené DNA dvojřetězcovými zlomy pomocí homologní rekombinace (Chakraborty & Hiom, 2019).



**Obr. 4: Znáznornění umístění vazebných domén pro proteiny CBP a BRCA1 v primární struktuře helikázy DHX9.** CREB-binding protein se váže v oblasti 1 až 250 aminokyseliny. BRCA1 protein se váže mezi 230 až 325 aminokyselinou. Upraveno a převzato z (Aratani *et al.*, 2001).

Mimo jiné je přes vazbu s DHX9 propojen také protein přežití motoneuronu (SMN) s RNA polymerázou II (Pellizzoni *et al.*, 2001). Nízká koncentrace proteinu SMN způsobuje onemocnění spinální svalové atrofie (Coover *et al.*, 1997).

Dále byla potvrzena spojitost DHX9 s dalšími transkripčními faktory jako jsou například receptor epiteliárního růstového faktoru (EGFR) (Huo *et al.*, 2010), diferenační faktor osteoblastů (Osterix) (Amorim *et al.*, 2007) či transkripční komplex

MEF1, který reguluje přepis z genu pro mnohočetnou lékovou rezistenci *MDR1* (Zhong & Safa, 2004). Stejně tak je DHX9 přítomna při expresi genů řízených jaderným faktorem  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B), kdy asociuje s podjednotkou p65 (Tetsuka *et al.*, 2004).

Helikáza ovlivňuje přepis DNA kromě toho i přímou vazbou na promotorovou sekvenci. Předpokládá se, že v promotoru genu *p16<sup>INK4a</sup>* přispívá k formování transkripčního komplexu, a tím expresi tumor supresorového proteinu p16 (Myö & Baylin, 2001). V odpovědi buněk na interferon  $\alpha$  se DHX9 v jádře přemísťuje do transkripčně aktivních takzvaných „promyleocytic leukemia nuclear bodies“ (PML NBs), kde se účastní přepisu genů souvisejících pravděpodobně s protivirovou obranou (Fuchsová *et al.*, 2002).

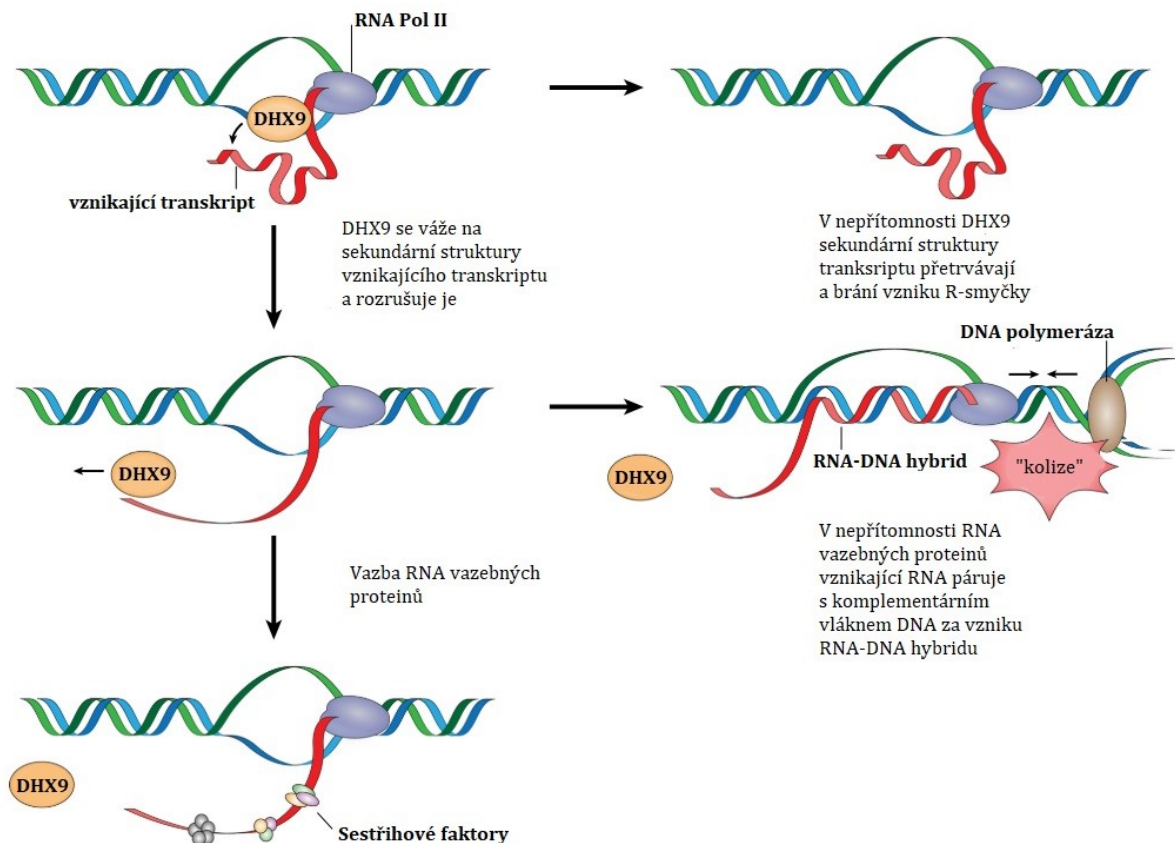
## 2.6 Úloha DHX9 v posttranskripčních úpravách RNA

Mimo přímé syntézy zastává DHX9 úlohu také v úpravách pre-mRNA na mRNA. Byla prokázána afinita k oběma typům RNA (Zhang *et al.*, 1999b) a rovněž byla nalezena v komplexu pre-spliceosomu (Hartmuth *et al.*, 2002). Dalším důkazem je, že absence helikázy DHX9 nebo nukleoporinu Nup98 zvyšuje koncentraci mRNA s neodstraněnými introny, z čehož vyplývá jejich součinnost v procesu sestřihu (Capitano *et al.*, 2017).

V buňkách DHX9 asociuje s RNA polymerázou II až do začátku transkripce a následně se během elongace od ní odděluje. V tomto bodě je důležitá pro nasedání sestřihových faktorů, zejména SF3B3 a SFPQ, na vznikající vlákno RNA a podporuje stabilitu jejího jednovláknového uspořádání. V případě, že je buňka ochuzena o sestřihové faktory, je helikáza spojena s RNA polymerázou II i po dobu prodlužovací fáze, kdy rozrušuje vznikající sekundární struktury RNA. To může vést k invaginaci vlákna RNA mezi dvoušroubovici DNA, a tím k tvorbě R-smyčky, čímž se vytváří překážka pro budoucí replikaci genomu (**obr. 5**) (Chakraborty *et al.*, 2018).

Dále DHX9 participuje na řízení sestřihu prekurzorové mediátorové RNA ionotropního glutamátového receptoru GRIA2. V intronu 13 této pre-mRNA se formuje smyčka na základě komplementární sekvence. Zde dochází aktivitou adenosindeaminázy působící na RNA (ADAR2) k výměně adeninu za inosin. Tím se změní sekvence sestřihového místa a k úpravám nedojde. DHX9 *in vitro* narušuje tyto smyčky, tudíž napomáhá navázání sestřihových faktorů na mRNA, a zároveň nedovoluje editaci dvouvláknové vlásenky (Bratt & Hman, 2003). Oproti tomu novější poznatky poukazují na to, že regulace editace pomocí enzymů ADAR helikázou DHX9 *in vivo* není tak

jednoznačná. Je navrhováno, že ovlivnění výměny adeninu za inosin v prekurzorové mRNA závisí na tom, zda je substrát vázán proteinem ADAR1, či ADAR2. Helikáza interaguje s oběma typy enzymů po vazbě na RNA a svou helicázovou aktivitou pozměňuje organizaci transkriptu směrem k vzniku požadovaných struktur pro editační proteiny. Umlčení DHX9 vede k potlačení výměny nukleotidů pomocí ADAR1, naproti tomu zesiluje editaci substrátů proteinem ADAR2. Náležitá regulace úprav nukleotidové sekvence mRNA je podstatná v předcházení rakovinného bujení (Hong *et al.*, 2018).



**Obr. 5: Model vytváření R-smyčky za nepřítomnosti sestřihových faktorů.** DHX9 asociuje k vznikajícímu vláknku mRNA a napomáhá nasedání post-transkripčních faktorů. V nepřítomnosti DHX9 není zabráněno vzniku sekundárních struktur mRNA. Pokud chybí sestřihové enzymy, je lineární vlákno schopno invaginovat do DNA za vzniku R-smyčky. Převzato a upraveno z (Chakraborty *et al.*, 2018).

DHX9 přispívá ke správné terminaci transkripce a úpravám mediátorové RNA, která obsahuje Alu struktury. Tyto sekvence patří mezi nejrozšířenější rozptýlené repetitivní sekvence retrotraspozomálního původu v lidském genomu (Batzer & Deininger, 2002). Jestliže mají buňky nedostatek DHX9, narůstá počet nesprávně sestřižených transkriptů, které obsahují ve své 3' nepřekládané oblasti cirkulární

struktury Alu elementů. Helikáza aktivně rozplétá vlásenky Alu elementů, které maskují sestřihová místa (Aktaş *et al.*, 2017).

Spojitosť DHX9 s periferií jádérka také naznačuje, že se podílí na post-transkripčních úpravách ribozomální RNA (rRNA) (Fuchsová & Hozák, 2002; Zhang *et al.*, 2004). Při vývoji embryonálních kmenových buněk je DHX9 součástí maturace intergenových mezerníků rRNA (IGS-rRNA) a produkce „promoter-associated RNA“, která je komplementární k promotoru ribozomální DNA. Protein TIP5 ve spoluúčasti s pRNA a DHX9 modeluje heterochromatinové oblasti, kde se nachází geny pro rRNA (Savić *et al.*, 2014; Leone *et al.*, 2017). Pokud jsou embryonální kmenové buňky deficientní v DHX9, nedochází k odpovídajícímu formování chromatinu v místě rRNA genů, a tak je negativně ovlivněn jejich přechod z pluripotentní fáze v diferenciované buňky (Leone *et al.*, 2017).

Na karboxylovém konci helikázy se vyskytuje jaderný lokalizační i exportní signál, z toho důvodu je uvažována funkce DHX9 v transportu mRNA z jádra do cytoplasmy (Tang *et al.*, 1999). Úvahu podporuje objevení helikázy na periferii jádra a v jaderných pórech, kde mimo nukleoporin Nup98 asociuje taktéž s jaderným filamentárním aktinem (Zhang *et al.*, 2001; Capitanio *et al.*, 2017).

Jako významný fenomén v regulaci genové exprese se jeví produkce mikroRNA. V první fázi zrání miRNA se uplatňuje proteinový komplex DROSHA, jehož součástí je DHX9 vazebný partner BRCA1. DHX9 podněcuje přeměnu prekurzoru miRNA přes interakci s BRCA1 v komplexu DROSHA (Shinji Kawai; Atsuo Amano, 2012). Dále se slučuje s komponenty RISC komplexu jako jsou proteiny Dicer, Ago-2 a TRBP (Robb & Rana, 2007). DHX9 pomocí svých dvou domén vázajících dsRNA (dsRBD I a II) rozeznává siRNA, kterou následně částečně rozvazuje a dovoluje proteinu Ago-2 zapojení do komplexu (Fu & Yuan, 2013). V důsledku DHX9 stimuluje správnou skladbu a aktivaci RISC komplexu, která vede k úspěšnému umlčování mediátorové RNA (Robb & Rana, 2007).

## **2.7 Úloha DHX9 v translaci**

Díky schopnosti rozeznávat a vázat různá uspořádání nukleových kyselin koriguje DHX9 translaci, protože má možnost odstraňovat stérické bariéry pro úspěšné nasedání ribozomů.



V 5' nepřekládané oblasti (5' UTR) mRNA kolagenu typu I se po transkripci vytváří jednoduchá vlásenka (Stefanovic *et al.*, 1999). DHX9 se váže na protein LARP6, který se s vysokou afinitou sdružuje právě s touto strukturou (Cai *et al.*, 2010; Manojlovic & Stefanovic, 2012). Společně se účastní sestavování polyribosomálního komplexu a iniciace translace. Bez helikázy se snižuje koncentrace proteinových produktů kolagenu typu I, tudíž je v jeho expresi nepostradatelná (Manojlovic & Stefanovic, 2012).

Obdobně jsou pomocí dsRBDs domén rozpoznávány strukturovanější 5' UTR v podobě takzvaných „post-transcriptional control elements“ (PCE) (Ranji *et al.*, 2011). Taková uspořádání se objevují u virových transkriptů či přepisu buněčného genu pro transkripční faktor JunD, který je zodpovědný za kontrolu růstu (Short & Pfarr, 2002; Bolinger *et al.*, 2007). Po navázání DHX9 na mRNA je započata rozvolňovací aktivita na základě spotřebování ATP, která dovoluje strukturní přeuspořádání PCE (Ranji *et al.*, 2011). Tím DHX9 významně podněcuje asociaci ribosomů s mRNA, následné hledání prvního startovacího kodónu a formaci polyzomů. Rovněž je uvažovaná role DHX9 v opětovném využití ribosomů v zacykleném uspořádání transkriptu (Hartman *et al.*, 2006). Stejně tak DHX9 participuje s translačním kontrolním proteinem 80 v buněčné odpovědi na genomové poškození. Spolu přispívají k remodelaci „internal ribosome binding site“ na mRNA pro protein p53 v reakci na poničení DNA. Při jejich nadprodukci se zvyšuje syntéza p53 (Halaby *et al.*, 2015).

Nepřímo je ovlivňovaná tvorba transkripčního faktoru Oct4, jenž působí ve vývoji embryonálních kmenových buněk a udržuje je v pluripotentním stavu (Niwa *et al.*, 2000). Oproti předchozím příkladům se na mRNA pro Oct4 formuje regulační sekundární struktura v 3' nepřekládané oblasti. Translace je pak stimulovaná specifickou vazbou proteinu Lin28 na tuto strukturu (Qiu *et al.*, 2010). Svým karboxylovým koncem Lin 28 interaguje s N i C-koncem DHX9 (Jin *et al.*, 2011). DHX9 podněcuje aktivitu Lin28, při jejím umlčení dochází k poklesu stimulace translace proteinem Lin28 (Qiu *et al.*, 2010). DHX9 je rekrutovaná pomocí Lin28 do translačního komplexu polyzomů. Redukce exprese Lin28 způsobuje pokles jeho asociace s polyzomy, a zároveň snížení výskytu DHX9 v translačním komplexu. Lin28 zřejmě usnadňuje translaci interakcí s DHX9, která je schopna remodelovat sekundární struktury RNA a předchází vzniku překážek na molekule mRNA v průběhu translace (Jin *et al.*, 2011).

Analogicky funkci DHX9 v sestřihu transkriptů s Alu sekvencemi, je ulehčovaná i jejich translace. DHX9 rozplétá cirkulární struktury Alu elementů, které mají tendenci

inhibovat translační proces (Aktaş *et al.*, 2017). Bylo pozorováno, že helikáza překonává guaninové kvadruplexy také *in vivo*, což buňky využívají k usměrňování překladu mRNA s takovým uspořádáním. G-kvadruplexy zpomalují ribozomy „upstream“ od hlavního otevřeného čtecího rámce a následně způsobují jejich předčasnou disociaci. Jestliže jsou kvadruplexy rozvazovány, nic nebrání skenování ribozomu a iniciaci patřičné proteosyntézy (Murat *et al.*, 2018).

### 3 DHX9 a viry

Viry jakožto vnitrobuněční parazité, kteří nekódují vlastní proteosyntetický aparát, jsou závislé na enzymatickém vybavení buňky. DHX9 je součástí nejdůležitějších buněčných procesů od syntézy nové genetické informace přes její přepis až po konečnou syntézu proteinů. Na těchto dějích se podílí především schopností remodelovat různé sekundární struktury vzniklé na nukleových kyselinách, ale také spoluprací s dalšími buněčnými proteiny. Role DHX9 je proto uvažována také v regulaci virových infekcí. Nejprozkoumanější skupinou v tomto ohledu jsou retroviry s nejvýznamnějším zástupcem virem lidské imunitní nedostatečnosti typu 1 (HIV-1). Avšak DHX9 se účastní životního cyklu virů napříč čeleděmi a hostiteli včetně člověka. Její zapojení v infekci bylo potvrzeno u virů s RNA i DNA genomem. Současně participuje na jaderných, ale rovněž na cytoplasmatických procesech virové infekce.

#### 3.1 RNA viry

##### 3.1.1 Viry napadající člověka

Genom obaleného viru hepatitidy C (HCV), řazeného do čeledi *Flaviviridae*, tvoří jednovláknová RNA v pozitivním smyslu (+ssRNA). Životní cyklus viru probíhá v cytoplasmě. RNA je v 5' i 3' nepřekládaných oblastech bohatě strukturovaná a tyto oblasti jsou využívány k regulaci translace a replikace viru (Major & Feinstone, 1997). Přestože je DHX9 primárně jaderným enzymem, byla její přítomnost identifikována ve vazbě s 3' UTR virové RNA v cytoplasmě (Harris *et al.*, 2006). Zároveň je schopna vázat se také na dvouvláknové struktury v 5' UTR (Li *et al.*, 2014). Isken *et al.* popsali roli DHX9 v životním cyklu HCV. Společně s jadernými faktory NF90/NFAR-1 a NF45 tvoří DHX9 komplex, který se váže na terminální struktury virové RNA v cytoplasmě. Komplex zprostředkovává interakci mezi 5' a 3' koncem RNA za vzniku zacyklené struktury. V tomto uspořádání DHX9 podporuje replikaci HCV. Pokud je v buňkách helicázy nedostatek, dochází k poklesu syntézy virového genomu (Isken *et al.*, 2007). Důležitost DHX9 v replikaci viru hepatitidy C byla dále potvrzena metodou RNA interference, kdy po umlčení helicázy došlo k postupnému snížení replikační aktivity viru (He *et al.*, 2008).

DHX9 se specificky váže na strukturu v 3' UTR oblasti RNA viru horečky dengue společně s jadernými faktory NF90 a NF45, jako v případě HCV patřícího ke stejné čeledi. Avšak oproti viru hepatitidy C nebyl detekován přesun helicázy z jádra do cytoplasmy.

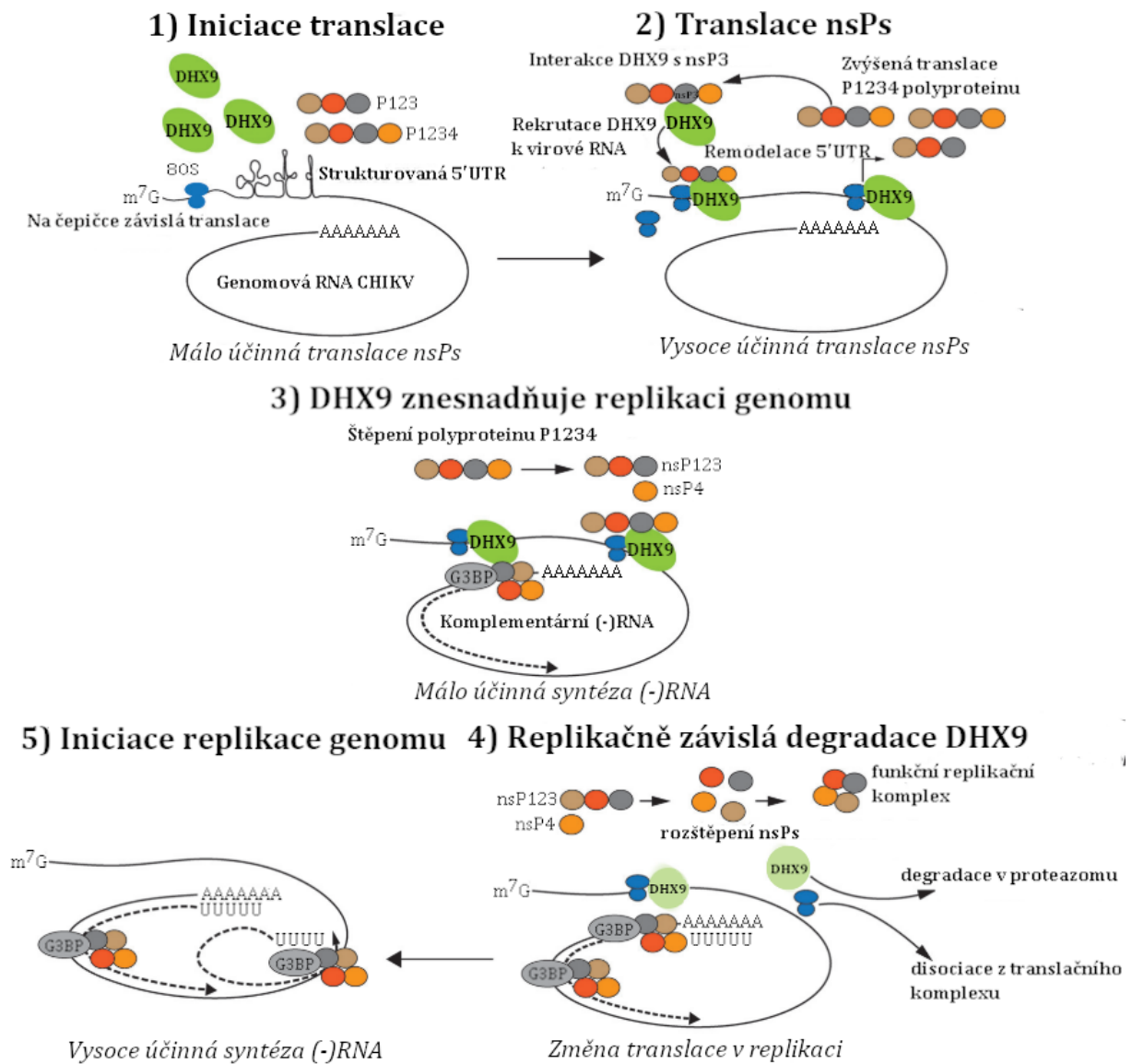
Není ale vyloučeno, že se DHX9 účastní životního cyklu viru horečky dengue podobně jako dalších zástupců čeledi *Flaviviridae* (Gomila *et al.*, 2011).

Obdobně byla popsána asociace DHX9 s RNA viru hepatitidy E, který je řazen do čeledi *Hepeviridae* a jehož genom je taktéž tvořen +ssRNA. Na základě proteomické analýzy byla DHX9 identifikována jako vazebný partner strukturované 3' UTR na virové RNA. Je předpokládáno, že zastává stejnou úlohu jako v životním cyklu viru hepatitidy C. Regulační funkce DHX9 v replikaci HEV se ale zatím prokázat nepodařilo. Zároveň u pacientů trpících hepatitidou způsobenou HEV byla zpozorovaná lehce zvýšená exprese DHX9 (Paingankar & Arankalle, 2015).

Chikungunya virus (CHIKV) je obalený virus z čeledi *Togaviridae*, jehož genom je tvořen jednořetězcovou RNA v pozitivním smyslu. Je přenášen komáry rodu *Aedes* a u člověka způsobuje v akutní fázi vysoké horečky a bolesti kloubů a svalů. Chikungunya virus kóduje čtyři nestrukturní proteiny, dva strukturní proteiny E1 a E2 a dva malé peptidy E3 a 6k. Nestrukturní protein 2 (nsP2) má helikázovou a proteázovou funkci, naopak nestrukturní protein 3 (nsP3) se zapojuje v syntéze RNA svou schopností vázat se na RNA. (Thiberville *et al.*, 2013; Rupp *et al.*, 2015). DHX9 je schopna interagovat s proteiny nsP2 i nsP3 Chikungunya viru v nepřítomnosti ostatních virových proteinů či RNA. nsP2 snižuje koncentraci DHX9 v jádře patrně aktivací proteazomové dráhy. Oproti tomu nsP3 způsobuje redistribuci helikázy do oblasti aktivní replikace viru v cytoplasmě. DHX9 interaguje s hypervariabilní doménou na C-konci nestrukturního proteinu 3. V infikovaných buňkách helikáza asociuje s komplexem nsP3 a strukturovaným 5' koncem virové RNA. Vzhledem k tomu, že DHX9 negativně ovlivňuje virovou replikaci, v buňkách s umlčenou helikázou dochází k nárustu počtu virové RNA. Na rozdíl od replikace se ale DHX9 pozitivně účastní časných fází infekce, kdy stimuluje translaci nestrukturních proteinů. DHX9 rozvolňuje sekundární struktury na virové RNA, které brání efektivní proteosyntéze. DHX9 je tak nejspíš důležitým enzymem regulujícím změnu z virové translace na replikaci genomu (**obr. 6**) (Matkovic *et al.*, 2019).

Genom viru chřipky typu A z čeledi *Orthomyxoviridae* je rozdělen do 8 genomových segmentů tvořených jednovláknovou RNA v negativním smyslu (-ssRNA). Kóduje 10-12 proteinů, mezi kterými je nestrukturní protein 1 (NS1) zajišťující více funkcí, včetně regulace replikace a exprese virových proteinů (Matsuoka *et al.*, 2013). DHX9 interaguje s NS1 na základě vazby na virovou RNA, avšak nezávisle na ostatních virových enzimech. Helikáza se aktivně podílí v životním cyklu viru chřipky. Umlčení DHX9 *in vitro*

vede v buňkách k redukci koncentrace virových mRNA i genomových komplementárních RNA. Bylo navrženo, že DHX9 remodeluje komplexy virových nukleoproteinů s RNA a sekundární struktury na RNA, tím podporuje transkripci i replikaci virové RNA. Stimulace transkripce probíhá nezávisle na vazebném partnerovi DHX9 nestrukturním proteinu 1 (Lin *et al.*, 2012).



**Obr. 6: Model regulace časných fází infekce Chikungunya viru pomocí helikázy DHX9.** DHX9 napomáhá rozrušovat sekundární struktury na genomové RNA viru, čímž napomáhá zefektivňovat translaci nestrukturních proteinů (nsPs) v rané fázi infekce. Během translace DHX9 znesnadňuje syntézu komplementárního vlákna RNA. Po maturaci nestrukturních proteinů dochází k degradaci DHX9 v proteozomu a zefektivnění replikace. Převzato a upraveno z (Matkovic *et al.*, 2019).

### 3.1.2 Viry napadající hospodářská zvířata

DHX9 je využívána také dalšími RNA viry. Virus slintavky a kulhavky (FMDV) je zástupcem +ssRNA virů z čeledi *Picornaviridae*, který napadá sudokopytníky včetně hospodářsky významných druhů jako jsou tur domácí, ovce domácí či prase domácí. Z virové RNA jsou translatované čtyři strukturní proteiny (VP1-VP4) a dále nestrukturní proteiny, mezi nimiž jsou proteiny 2C a 3A, které se účastní syntézy virové RNA (Grubman & Baxt, 2004). Infekce FMDV v buňkách indukuje akumulaci DHX9 v cytoplasmě namísto v jádře. Zároveň se jedná o molekuly helikázy v nemethylovaném stavu, tudíž neschopné vstupovat do jádra (Smith *et al.*, 2004). Na demethylaci se podílí enzym „Jumonji C-domain containing protein 6“. Během infekce dochází ke stabilizaci jeho lokalizace v jádře. Zde se váže na RGG-box na C-konci DHX9 a demethyluje argininy, čímž dochází k vyloučení helikázy z jádra do cytoplasmy. Pokud je demethyláza inhibována, DHX9 je držena v jádře, což vede k poklesu virové exprese a infekivity (Lawrence *et al.*, 2014). Kolokalizace DHX9 s nestrukturními virovými proteiny 2C a 3A naznačuje, že participuje v replikačním procesu na membránových strukturách. Dále se helikáza váže na S fragment v 5' UTR virové RNA. Umlčení DHX9 dokazuje, že je nezbytnou součástí životního cyklu viru. V její nepřítomnosti dochází ke snižování virového titru. Současně byl pozorován také pokles v produkci virových proteinů, pravděpodobně vlivem nedostatku virové mRNA. Tato pozorování byla dále ověřena pomocí bovinního viru 1, který je zástupcem stejné čeledi. Jelikož se výsledky experimentů u obou zástupců této čeledi shodují, jeví se role DHX9 jako univerzální i pro ostatní zástupce picornavirů (Lawrence & Rieder, 2009).

Virus prasečího moru je dalším zástupcem z čeledi *Flaviviridae*, u kterého byla identifikována DHX9 ve vazbě na genomovou RNA. Helikáza asociuje s 3'UTR oblastí, která je zodpovědná za iniciaci replikace. Dále se váže také na Ia a III doménu v 5' UTR, které kromě replikace regulují také translaci virové RNA. DHX9 se patrně účastní obou těchto procesů, protože její umlčení vede k poklesu jak virové replikace, tak i exprese proteinů (Sheng *et al.*, 2013).

Nebezpečné pro hospodářská zvířata je také onemocnění způsobované virem prasečího reprodukčního a respiračního syndromu (PRRSV) z čeledi *Arteriviridae*. Genomem tohoto viru je +ssRNA. Z mnoha otevřených čtecích rámců je translatováno až čtrnáct nestrukturních proteinů včetně nestrukturního proteinu 9 (Nsp9), který viru slouží jako RNA dependentní RNA polymeráza. Dále virus kóduje strukturní

nukleokapsidový protein (N) a proteiny asociované s membránovým obalem (Dea *et al.*, 2000; Fang & Snijder, 2010). DHX9 interaguje s nukleokapsidovým proteinem. V infikovaných buňkách, za přítomnosti N proteinu, je zaznamenán viditelný nárůst koncentrace helikázy DHX9 v cytoplasmě. Nukleokapsidový protein se váže na Nsp9, který se podílí na virové replikaci. Výsledky výzkumů naznačují, že DHX9 je rekrutována proteinem N do replikačně-transkripčního komplexu, kde interaguje s proteinem Nsp9. DHX9 podporuje syntézu genomových RNA a dlouhých subgenomových transkriptů viru, umlčení helikázy nemělo vliv na produkci krátkých subgenomových mRNA. Autoři studie navrhuje, že nukleokapsidový protein napomáhá udržet replikační komplex na RNA tempátu, a zároveň přitahuje helikázu DHX9, která zprostředkovává odstranění překážek pro syntézu. Tím je podpořena změna syntézy mRNA na produkci dlouhých subgenomových transkriptů a celogenomových RNA (Liu *et al.*, 2016).

### **3.2 *Retroviridae***

Retroviry jsou obalené viry s jednovláknovým RNA genomem. Každá kapsida nese dvě kopie ssRNA, na které nasedá původně hostitelská tRNA. Po vstupu do buňky dochází k přepisu genomové RNA viru do DNA pomocí reverzní transkripce a dále k začlenění DNA do genomu hostitele. tRNA slouží jako primer pro reverzní transkripci. Na koncích virové RNA se nachází dlouhé repetitivní sekvence (LTRs), které jsou hlavním regulačním centrem díky bohatým sekundárním strukturám. Pomocí LTRs je řízena reverzní transkripce, nasedání primerů či replikace viru (Temin, 1982).

DHX9 je přitahovaná k cis-elementu tzv. konstitutivnímu transportnímu elementu (CTE) transkriptů retrovirů typu D jako je například Mason-Pfizer opičí virus. Touto přímou vazbou DHX9 napomáhá v transportu nesestřižené mRNA z jádra do cytoplasmy (Tang, 1997). Dalším proteinem, který se váže na CTE je enzym TAP (Grüter *et al.*, 1998). Svým karboxylovým koncem DHX9 asociuje s N-koncem TAP proteinu (Tang & Wong-Staal, 2000). Společně s proteinem HAP95 pravděpodobně formují komplex zajišťující transport mRNA obsahující CTE přes jaderný pór. HAP95 se neváže přímo na RNA, ale interaguje s jadernou transportní doménou (NTD) helikázy DHX9. Zároveň zvýšení exprese obou těchto enzymů vede k akumulaci nesestřižených retrovirových transkriptů v cytoplasmě, a tím i k jejich častější translaci (Westberg *et al.*, 2000; Yang *et al.*, 2001).

Dále DHX9 participuje, podobně jako u JunD, v translaci retrovirových mRNA, které tvoří strukturu PCE na 5' konci. Bolinger *et al.* potvrdili, že nasedání DHX9 na tyto

struktury je důležité pro proteosyntézu retikuloendoteliozního viru A či lidského T-buněčného lymfotropního viru typu I (Bolinger *et al.*, 2007). Předpokládá se, že helikáza přeuspořádává PCE a dovoluje ribozomům řádně fungovat na mRNA různých typů lymfotropních retrovirů (Hartman *et al.*, 2006; Bolinger *et al.*, 2007).

### 3.2.1 Virus lidské imunitní nedostatečnosti typu 1 (HIV-1)

DHX9 je hojně využívána virem lidské imunitní nedostatečnosti typu 1 v různých fázích jeho životního cyklu. Účastní se jak regulace transkripce a replikace virového genomu, tak na nasedání tRNA ve virionu.

*In vitro* se DHX9 váže na struktury mRNA HIV-1, jako jsou TAR, „primer binding site“ (PBS), „leader“, Rev responsivní element (RRE) a oblasti kódující polyprotein Gag-Pol a části reverzní transkriptázy. Oproti tomu *in vivo* je schopna vázat se pouze na struktury v 5' UTR a slaběji RRE. Je pravděpodobné, že je tento rozdíl způsoben nepřítomností buněčných kofaktorů helikázy v *in vitro* podmínkách. Pro vazbu všech těchto struktur jsou kruciální obě dsRBDs domény. Mutace v dsRBDs oblastech na N-konci helikázy znemožňují nasedání tRNA<sup>Lys3</sup> na genomovou RNA (Xing *et al.*, 2012).

Patrně vazba DHX9 na virovou RNA přetrvává z jádra až po včlenění genomu do kapsidy a vzniku virionu. Helikáza byla nalezena jako součást virionu (Roy *et al.*, 2006).

Díky schopnosti vázat se na dvoušroubovicovou RNA zastává DHX9 úlohu v transkripci závislé na virovém proteinu Tat. Ten se váže na TAR strukturu a stimuluje procesivitu RNA polymerázy II, bez něj je přepis virových mRNA neefektivní (Marcello *et al.*, 2001). DHX9 interaguje pomocí dsRBDII s TAR strukturou na vznikající virové mRNA v oblasti dlouhých terminálních repetitiv na 5' konci. Pro tuto vazbu je vyžadována přítomnost lysinu 236, který je součástí právě dsRBDII. DHX9 je zřejmě jedním z enzymů, které se účastní Tat akce a podporuje transkripci HIV-1. Její přítomnost v jádře zvyšuje produkci virové mRNA (Fujii *et al.*, 2001).

Dále byl zkoumán vliv mutací v „linker region“ DHX9 na proces transkripce. „Linker region“ se vyskytuje mezi dsRBDII a první RecA-like doménou jádra helikázy a tvoří ho přibližně 100 aminokyselin uspořádaných do šesti  $\alpha$ -helixů (**obr. 1**). V oblasti čtvrtého a pátého helixu se nachází minimální transaktivační doména, která zprostředkovává interakci mezi DHX9 a RNA polymerázou II (Aratani *et al.*, 2001; Xing *et al.*, 2013). Mutace těchto dvou helixů způsobuje snížení produkce virových transkriptů oproti nemutované helikáze. Tato data ukazují, že se DHX9 účastní transkripce HIV-1 také



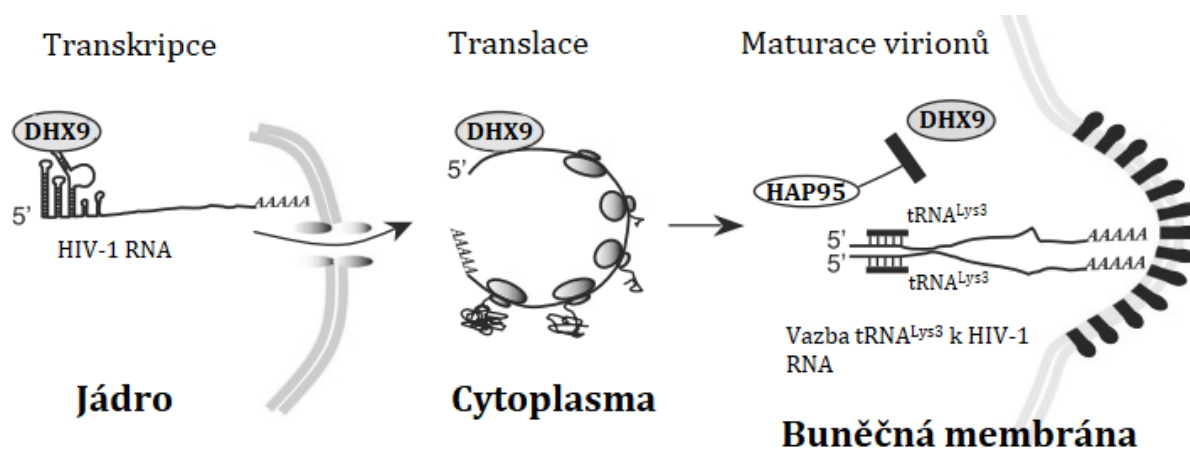
interakcí s RNA polymerázou II pomocí MTAD (Xing *et al.*, 2013). To potvrdila i studie zabývající se úlohou domény OB-fold helikázy DHX9 v životním cyklu viru. Bylo zjištěno, že domény na C-konci DHX9 se transkripce HIV-1 neúčastní, ale přítomnost DHX9 podporuje vazbu RNA polymerázy II na provirovou DNA (Xing *et al.*, 2014a).

HIV-1 využívá protein Rev pro translokaci a expresi nesestřižených či málo sestřižených mRNA z jádra. Rev protein se váže na sekvenci RRE, která se vyskytuje na prekurzorech mRNA (Fischer *et al.*, 1994). *In vivo* je DHX9 schopna navázat se na RRE nezávisle na přítomnosti Rev proteinu, avšak slaběji než v případě konstitutivních transportních elementů jednodušších retrovirů. Pro ovlivňování Rev funkce využívá DHX9 svoji helikázovou aktivitu. Současně působí DHX9 pozitivně na post-transkripční úrovni, kdy navyšuje koncentraci nesestřižených a jednou sestřižených transkriptů, ale nemění celkové množství virové mRNA (Li *et al.*, 1999).

DHX9 napomáhá reorganizovat 5' UTR, a to zejména RU5 oblast dlouhých terminálních repetitivních mRNA HIV-1, která vykazuje podobnost k post-transkripčním kontrolním elementům. Mechanismus je analogický k interakci s PCE jiných retrovirů. DHX9 rozvolňuje prostorové překážky vytvářející se na mRNA, a tím vytváří optimální substrát pro ribozomy a podporuje proteosyntézu (Bolinger *et al.*, 2010). Zároveň byla prokázána spojitost DHX9 s Gag produktem HIV-1, a to přímo ve virových částicích. Proto je uvažováno, že se DHX9 zapojuje do skládání virové partikule. Zde se spolu Gag a DHX9 vážou na genomovou RNA, nicméně DHX9 asociuje s RNA také nezávisle na Gag proteinu (Roy *et al.*, 2006). Vazba je stechiometrická, tedy jedna molekula DHX9 interaguje s jednou molekulou gRNA. Na rozdíl od Gag proteinu se helikáza neúčastní dimerizace virové RNA do partikul (Boeras *et al.*, 2016).

V nepřítomnosti helikázy dochází ke snížení infekivity HIV-1, což naznačuje její důležitost v životním cyklu viru (Roy *et al.*, 2006; Bolinger *et al.*, 2010). Přesto není pro inkorporaci genomové RNA do virových částic DHX9 potřeba, zamezení její exprese nevede k poruchám zabalení (Bolinger *et al.*, 2010). Původně byl pokles infekivity přisuzován narušení reverzní transkripce, protože v důsledku deficitu DHX9 bylo detekováno snížení produkce komplementární DNA (cDNA) v časných fázích infekce (Roy *et al.*, 2006). Následně však Xing *et al.* zjistili, že DHX9 v součinnosti s Gag proteinem zprostředkovává nasedání tRNA<sup>Lys3</sup>, která slouží jako primer pro reverzní transkripci. DHX9 se prostřednictvím dsRBDs domén váže specificky na PBS nezávisle na polyproteinu Gag, tato oblast je zodpovědná za asociaci primeru k virové RNA (Boeras

*et al.*, 2016). Helikáza způsobuje změny konformace v oblasti PBS, čímž napomáhá Gag proteinu navázat tRNA ke genomové RNA (Xing *et al.*, 2011). Patříčné nasednutí primeru ovlivňují druhý a třetí  $\alpha$ -helix „linker region“ ve struktuře DHX9, jejich mutace způsobuje nesprávnou aktivitu helikázy. Avšak mutace nevede ke ztrátě schopnosti začlenit DHX9 do kapsidy (Xing *et al.*, 2013). Po navázání tRNA na virovou RNA je aktivita DHX9 blokována proteinem HAP95, se kterým se společně v partikulích nachází. HAP95 pravděpodobně brání helikáze narušovat vzniklý dvoušroubovicový komplex virové a transferové RNA (**obr. 7**) (Xing *et al.*, 2014b). Důvodem snížené infekivity HIV-1 v důsledku nepřítomnosti DHX9 tedy patrně není narušení procesu reverzní transkripce jako takové, ale nemožnost správného nasednutí primeru v podobě tRNA<sup>Lys3</sup>.



**Obr. 7: Model interakce DHX9 s RNA HIV-1.** DHX9 v jádře interaguje s TAR sekvencí a podporuje transkripci. Následně po migraci RNA do cytoplasmy stimuluje translaci vazbou na 5' UTR. Při maturaci virionů iniciuje nasedání tRNA<sup>Lys3</sup>, poté je její funkce blokována proteinem HAP95, aby nedocházelo k disociaci primeru. Převzato a upraveno z (Xing *et al.*, 2014b).

Přesto recentní poznatky ukazují, že se DHX9 reverzní transkripce účastní. Po vstupu HIV-1 do DHX9 deficientních buněk dochází k poklesu koncentrace produktů brzké reverzní transkripce oproti buňkám se zachovalou expresí DHX9. Helikáza má pozitivní vliv na reverzní transkriptázu, zvyšuje její procesivitu. V přítomnosti DHX9 nedochází k častému zastavování se reverzní transkriptázy, čímž DHX9 urychluje syntézu cDNA. Dále DHX9 napomáhá překonávat sekundární struktury na RNA, a to především v 3' UTR. Zde se vyskytují sekvence bohaté na guaninové báze vytvářející G-kvadruplexy, které DHX9 rozvazuje. Současně odstraňuje molekuly nukleokapsidových proteinů na templátové RNA (Brady *et al.*, 2019). DHX9 přizpůsobuje podmínky pro efektivní reverzní transkripci.

### 3.3 *Hepadnaviridae*

#### 3.3.1 Virus hepatitidy B (HBV)

Virus hepatitidy B je obalený virus, který do buňky vstupuje v podobě dvouvláknového DNA genomu. Takto přetrvává v jádře, kde se transkribuje pomocí hostitelské RNA polymerázy II. Do kapsidy je začleňována pre-genomová RNA, která je následně reverzní transkripcí přepsána do DNA (Beck & Nassal, 2007).

HBV během transkripce přirozeně vytváří kromě mRNA také molekuly nekódující cirkulární RNA. Nekódující je z důvodu, že neobsahuje 5' ani 3' konec, a tudíž nepodléhá translaci. Helikáza DHX9 asociuje s cirkulární RNA a reguluje jejich výskyt. V buňkách s umlčenou produkcí DHX9 dochází k navýšení přítomnosti cirkulárních RNA, které způsobuje snížení produkce virových proteinů. DHX9 je tak důležitým regulátorem virové proteosyntézy. Předpokládá se, že zamezuje vzniku nežádoucích cirkulárních molekul RNA, které negativně ovlivňují koncentraci translace-schopných mRNA HBV (Sekiba *et al.*, 2018).

Jaterní buňky infikované HBV vykazují zvýšenou expresi helikázy DHX9. Na nadprodukcí DHX9 se post-transkripčně podílí zejména virový protein X (HBx). HBx blokuje aktivitu proteinu (MDM2), který působí jako E3-ubikvitin ligáza. V důsledku je zamezeno ubikvitinaci DHX9, a tím zvyšuje stabilitu a prodloužení životnosti tohoto enzymu (Shen *et al.*, 2019).

DHX9 se také účastní replikace HBV. Nepřítomnost helikázy vede ke snížení koncentrace virové DNA, avšak nedochází ke změnám množství RNA. Přesto, že je mechanismus účinku DHX9 na replikaci HBV stále nejasný, je zjevné, že je závislý na helikázové aktivitě a přítomnosti DHX9 v jádře (Shen *et al.*, 2019). Zároveň je stimulace replikace helikázkou DHX9 podmíněná asociací s nukleoporinem Nup98, který podněcuje její helikázovou aktivitu (Capitanio *et al.*, 2017; Shen *et al.*, 2019).

„Apolipoprotein B mRNA-editing enzym catalytic polypeptide-like 3B“ (A3B) je buněčný enzym, jehož činnost vede k degradaci virové DNA a narušení replikačního cyklu viru hepatitidy B (Lucifora *et al.*, 2014; Chen *et al.*, 2018). DHX9 se svým N i C-koncem váže na protein A3B. Interakce je podpořena právě v době infekce HBV. Nicméně DHX9 nemá vliv na funkci A3B, neomezuje deaminaci. Helikáza spíše zamezuje, aby se A3B navázal na pre-genomovou RNA HBV, čímž potlačuje jeho antivirovou funkci. Regulace produkce viru pomocí DHX9 se tedy jeví pravděpodobněji v potlačování nepříznivých podmínek pro replikaci (Chen *et al.*, 2020).

### 3.4 DNA viry

*Adenoviridae* jsou neobalené viry, jejichž genom je tvořen dvouřetězcovou molekulou DNA (dsDNA). Během pozdní fáze infekce adenoviry produkují malé regulační tzv. „virus-associated RNA“ (VA RNA), které přepisuje hostitelská RNA polymeráza III. Dvě varianty VA RNA<sub>I</sub> a VA RNA<sub>II</sub> vytvářejí dvouvláknové vlásenkovité struktury. VA RNA<sub>I</sub> se podílí na utlumování protivirové odpovědi závislé na interferonech (Mathews & Shenk, 1991). DHX9 asociuje s VA RNA<sub>I</sub> i VA RNA<sub>II</sub>, které inhibují její helikázovou aktivitu. VA RNA<sub>II</sub> vykazuje silnější tlumící aktivitu než VA RNA<sub>I</sub>. Předpokládá se, že potlačení helikázové aktivity DHX9 využívají adenoviry taktéž ke zmírnění buněčné protivirové obrany (Liao *et al.*, 1998).

Virus myxomatózy patřící do čeledi *Poxviridae* způsobuje především onemocnění králíků. Permisivní k tomuto viru jsou však i lidské buňky, například rakovinné (Sypula *et al.*, 2004). Virový protein M029 hraje důležitou roli v replikaci virového genomu v cytoplasmě různých typů savčích buněk. Viry s mutací v enzymu M029 jsou neschopné množit se v lidských, primátích ani myších buňkách. Dále se M029 váže na proteinkinázu R (PKR), jež se účastní protivirové obrany. DHX9 interaguje přímou vazbou s proteinem M029. Rovněž se v infikovaných lidských THP-1 monocytech pravděpodobně podílí na replikaci viru. Nepřítomnost helikázy v buňkách, které mají zároveň umlčenou expresi PKR vede k poklesu replikační aktivity výrazněji u M029-mutovaného viru. Zároveň byl detekován pokles koncentrace virových proteinů, avšak ne virové mRNA. DHX9 tedy patrně reguluje proteosyntézu viru myxomatózy za specifických podmínek (Rahman *et al.*, 2013). Oproti tomu umlčení DHX9 v permisivních rakovinných HeLa a v semi-permisivních 786-0 buňkách vede ke zvyšování virového titru. Úloha DHX9 v životním cyklu viru myxomatózy se tak zdá být spíše negativní, kdy zjevně utlumuje replikační potenciál viru (Rahman *et al.*, 2017).

Do čeledi *Poxviridae* patří také virus vaccinie, který kóduje protein E3. Tento enzym je orthologem proteinu M029 viru myxomatózy. Proto se Dempsey *et al.* domnívají, že se DHX9 podílí na replikaci také viru vaccinie, ale tato hypotéza nebyla zatím experimentálně dokázána. E3 potlačuje produkci prozánětlivého cytokinu interleukinu-6. Stejný fenotyp vykazují infikované buňky s umlčenou expresí DHX9. To naznačuje, že E3 interaguje s DHX9 a inhibuje její funkci v přirozené obraně buňky proti viru vaccinie (Dempsey *et al.*, 2018).

Virus Kaposiho sarkomu z čeledi *Herpesviridae*, konkrétně podčeledi *γ-herpesvirinae*, způsobuje nádorové onemocnění především u pacientů trpících syndromem získaného selhání imunity (Chang *et al.*, 1994). U zdravých jedinců přetrvává v jádře v latentní fázi v podobě epizomu (Decker *et al.*, 1996). Virus kóduje vlastní proteinkinázu (vPK), se kterou interaguje helikáza DHX9. vPK se váže na DHX9 N-koncovou oblastí. V infikovaných buňkách je detekovatelná kolokalizace vPK a DHX9 v jadérku. Virová proteinkináza je schopna ovlivňovat expresi hostitelských genů, která je regulovaná transkripčním faktorem CREB, prostřednictvím vazby na DHX9. Ta tvoří spojovací článek mezi CBP a RNA polymerázou II (Nakajima *et al.*, 1997; Jong *et al.*, 2010). Patrně přímá interakce vPK s DHX9 vede k neschopnosti helikázy podporovat transkripci. Virus Kaposiho sarkomu tedy dokáže regulovat hostitelskou expresi proteinů (Jong *et al.*, 2010).

Dalším zástupcem podčeledi *γ-herpesvirinae* je virus Epstein-Baarové (EBV). Nepřítomnost DHX9 v hostitelských buňkách zvyšuje produkci virionů EBV. Potlačování virové produkce není způsobeno ovlivňováním virové replikace, ale spíše inhibicí exprese mRNA pozdních genů. Při infekci EBV DHX9 zastává tedy antivirovou funkci. Současně DHX9 v jádře asociuje s virovým proteinem SM. Obdobně vPK viru Kaposiho sarkomu, protein SM inhibuje expresi genů regulovanou transkripčním faktorem CREB. SM působí jako antagonist DHX9, a tím ovlivňuje přirozenou produkci proteinů hostitelské buňky (Fu *et al.*, 2019).

Z čeledi *Herpesviridae* byla možná regulativní funkce DHX9 popsána také u lidského cytomegaloviru. Společně s helikázou DDX3X se DHX9 váže na virové mRNA. Infekce cytomegalovirem obecně zvyšuje asociaci RNA vazebných proteinů jako je DHX9 s mRNA. Avšak úloha DHX9 v životním cyklu cytomegaloviru nebyla zatím objasněna (Lenarcic *et al.*, 2015).

## 4 DHX9 a její zapojení v antivirové obraně

Během virových infekcí zastává DHX9 dvojí funkci. Její helikázová aktivita je s výhodou využívána některými viry pro usnadnění jejich produkce. Avšak DHX9 je buněčný enzym, který má schopnost rozeznávat DNA i RNA molekuly, čímž napomáhá buňce bojovat proti mikrobiální nákaze stimulací přirozené imunity (Zhang & Grosse, 1994).

V cytoplasmě dendritických buněk se DHX9 podílí na rozpoznání virových DNA i RNA. V lidských plazmacytoidních dendritických buňkách se DHX9 váže na sekvence bohaté na cytosin a guanin. Dále interaguje s adaptorovým proteinem MyD88, společně patrně tvoří část signální kaskády. Umlčení DHX9 v dendritických buňkách po infekci herpes simplex virem způsobí snížení přirozené imunitní odpovědi na přítomnost viru a poklesu produkce prozánětlivých cytokinů: interleukinu-6 (IL-6), faktoru nádorové nekrózy či interferonu- $\alpha$  (Kim *et al.*, 2010). Tyto výsledky značí, že je DHX9 důležitým cytoplasmatickým senzorem cizorodé DNA. Zhang *et al.* potvrdili roli DHX9 jako senzoru cizorodé RNA u myeloidních dendritických buněk. Helikáza odpovídá na přítomnost virové RNA asociací s enzymem „interferon- $\beta$  promoter stimulator 1“ a následnou stimulací produkce interferonů typu 1. Odezva DHX9 byla testována po infekci reovirem a virem chřipky typu A. Nepřítomnost helikázy vede k poklesu aktivace signální dráhy NF- $\kappa$ B a interferonů (Zhang *et al.*, 2011).

Také bylo ukázáno, že exprese interleukinu-6 přímo závisí na přítomnosti DHX9. V buňkách s umlčenou expresí DHX9 byla detekována nižší hladina IL-6. Helikáza napomáhá expresi IL-6 interakcí s podjednotkou p65 v signální kaskádě NF- $\kappa$ B stimulované receptory rozeznávajícími molekulární vzory asociované s patogenem (Dempsey *et al.*, 2018). Dále bylo pozorováno, že v buňkách, které již jsou stimulovány interferonem- $\alpha$ , dochází k translokaci DHX9 do PML NBs, kde patrně podněcuje transkripci genů souvisejících s antivirovou obranou pomocí asociace CBP s RNA polymerázou II (Fuchsová *et al.*, 2002).

Rovněž byla DHX9 potvrzena jako substrát proteinkinázy R. PKR fosforyluje dsRBDII na N-konci helikázy, což vede ke snížení afinity helikázy k dsRNA. DHX9 napomáhá transkripci HIV-1 vazbou na TAR sekvenci, která vykazuje dvouvláknový charakter (Fujii *et al.*, 2001). PKR fosforylací dsRBDII snižuje schopnost DHX9 podílet se na transaktivaci genů HIV-1 (Sadler *et al.*, 2009).

DHX9 působí jak ve prospěch některých virů, tak se výrazně účastní boje proti nim.

## 5 Závěr

Helikáza DHX9 je zástupcem rodiny helikáz s DExH motivem. Účastní se mnoha důležitých buněčných reakcí, proto je uvažována její funkce rovněž v životním cyklu virů. Bližší pochopení vztahů mezi viry a hostitelskými proteiny může vést k rozuzlení replikačních strategií virů. Zároveň se nabízí efektivnější vývoj terapeutických preparátů proti virovým infekcím.

Přestože je DHX9 převážně jaderný enzym, díky jadernému exportnímu signálu je schopna se přemisťovat do cytoplasmy. Jako substrát slouží molekuly DNA, RNA, ale i hybridní a třívláknové struktury. V buňce se DHX9 účastní mnoha důležitých procesů. Je součástí replikačního komplexu, kde interaguje s helikázou Wernerova syndromu. Přímou vazbou asociuje s RNA polymerázou II a účastní se transkripce společně s různými transkripčními faktory. DHX9 zprostředkovává interakci transkripčního faktoru CBP či BRCA1 s polymerázou. Helikáza se účastní správného ukončení transkripce a následných úprav RNA. DHX9 svou helikázovou aktivitou ovlivňuje sestřih mRNA obsahující Alu elementy. Současně reguluje editaci RNA proteinem ADAR1 i ADAR2 a vznik miRNA. Dále participuje také na expresi ribozomální RNA. DHX9 remodeluje sekundární struktury vzniklé na mRNA pro kolagen typu I, JunD či Oct4, čímž usnadňuje nasedání ribozomů a následnou translaci. Rozvíjením guaninových kvadruplexů a Alu elementů odstraňuje překážky pro ribozomy v průběhu proteosyntézy.

V cytoplasmě je DHX9 schopna vázat se na strukturované konce RNA viru hepatitidy C a viru dengue v komplexu s jadernými faktory. DHX9 asociuje také s 3' koncem viru hepatitidy E a viru prasečího moru. DHX9 reguluje časnou fázi infekce Chikungunya viru, kdy podporuje translaci remodelací 5' konce virové RNA společně s nestrukturními proteiny, a zároveň potlačuje replikaci. V životním cyklu chřipkového viru typu A DHX9 ovlivňuje produkci jak transkriptů, tak komplementárních genomových RNA. Role DHX9 byla také popsána při infekci RNA virem, které napadají hospodářská zvířata. FMDV rekrutuje DHX9 v cytoplasmě demethylací argininů na C-konci helikázy. Zde se opět podílí na replikaci virové RNA. Stejně tak DHX9 podněcuje produkci dlouhých genomových a subgenomových RNA PRRSV. DHX9 se váže na CTE retrovirů typu D a zprostředkovává translokaci nesestřižených virových mRNA do cytoplasmy. Zde následně vazbou na strukturu PCE usnadňuje jejich translaci. Nejprozkoumanější je vztah mezi DHX9 a virem HIV-1. Helikáza asociuje s virovou RNA již v jádře, kde podporuje transkripci mRNA interakcí s TAR elementem. Během virové transkripce DHX9 udržuje

RNA polymerázu II ve vazbě na provirovou DNA. Taktéž má DHX9 pozitivní vliv na translokaci nesestřížených transkriptů z jádra do cytoplasmy a následné translaci. DHX9 interaguje s virovým Gag, společně se podílí na správném nasedání tRNA ke gRNA HIV-1. Rovněž DHX9 podporuje procesivitu reverzní transkriptázy a odstraňuje sterické překážky během reverzní transkripce. V případě viru hepatitidy B se DHX9 podílí na replikaci virového genomu, zabraňuje degradaci virové RNA proteinem A3B. Snižuje koncentraci virových cirkulárních RNA, které nejsou schopné se translatovat. DNA viry upřednostňují jinou strategii. Viry z čeledi *Adenoviridae* inhibují DHX9 pomocí VA RNA. DHX9 interaguje s proteinem M029 viru myxomatózy a patrně ovlivňuje virovou replikaci. DHX9 asociuje s proteinem E3 viru vaccinie, který helikázu inhibuje. Virus Kaposiho sarkomu využívá inhibici DHX9 k regulaci exprese hostitelských proteinů. DHX9 taktéž negativně působí na produkci virionů EBV, proto virus potlačuje její aktivitu proteinem SM.

Avšak pokud není DHX9 využívána ve prospěch virů, působí v buňce v obraně proti nim. V dendritických buňkách působí DHX9 v cytoplasmě jako senzor cizorodé DNA i RNA. Dále se podílí na produkci prozánětlivých cytokinů, které stimulují imunitní systém.

Je zřetelný rozdíl mezi vztahem RNA a DNA virů k DHX9. Interakce RNA virů a retrovirů s DHX9 je založená především na vazbě na sekundární struktury vytvářející se na RNA. Těmito viry je DHX9 s výhodou využívána k remodelaci vlásenek, které mají často regulační funkci, ale mohou působit překážku v replikaci, transkripci i translaci virového genomu. Oproti tomu zmínění zástupci DNA virů potlačují funkci DHX9, aby zmírnili její antivirový potenciál, popřípadě ji využívají k regulaci hostitelské exprese. Důvodem může být skutečnost, že DNA viry věrněji mimikují chování hostitelských nukleových kyselin. Využívají tak pro buňku přirozený replikační a transkripční aparát, aniž by DHX9 poskytovala výraznou výhodu v životním cyklu virů. Zároveň uvedení zástupci čeledi *Adenoviridae*, *Poxviridae* a *Herpesviridae* kódují vlastní DNA polymerázy pro replikaci jejich genomu a není zatím jasné, zda je DHX9 potřebná k tomuto procesu (Choi, 2012)

Další výzkum by tedy bylo vhodné zaměřit na objasnění vztahu DHX9 k replikačnímu procesu diskutovaných DNA virů. Následně by bylo zajímavé určit, zda hraje DHX9 nějakou úlohu u čeledí DNA virů, které jsou replikačně závislé na hostitelské buňce jako *Parvoviridae*, *Papillomaviridae* či *Polyomaviridae* (Choi, 2012). Zároveň rozšíření poznatků o výhodné kooperaci DHX9 s RNA viry a retroviry může vést k návrhu



nových terapeutických preparátů založených na zablokování vazebných míst enzymu k sekundárním strukturám na virových RNA a umožnit cílenou inhibici virových infekcí.

## 6 Seznam literatury

\***Aguilera, A. and García-Muse, T.** (2012) 'R Loops: From Transcription Byproducts to Threats to Genome Stability', *Molecular Cell*, 46(2), p. 115–124. doi: 10.1016/j.molcel.2012.04.009.

**Aktaş, T., Avşar Ilık, İ., Maticzka, D., Bhardwaj, V., Pessoa Rodrigues, C., et al.** (2017) 'DHX9 suppresses RNA processing defects originating from the Alu invasion of the human genome', *Nature*, 544(7648), p. 115–119. doi: 10.1038/nature21715.

**Amorim, B. R., Okamura, H., Yoshida, K., Qiu, L., Morimoto, H., et al.** (2007) 'The transcriptional factor Osterix directly interacts with RNA helicase A', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 355(2), p. 347–351. doi: 10.1016/j.bbrc.2007.01.150.

**Anderson, S. F., Schlegel, B. P., Nakajima, T., Wolpin, E. S. and Parvin, J. D.** (1998) 'BRCA1 protein is linked to the RNA polymerase II holoenzyme complex via RNA helicase A', *Nature Genetics*, 19(3), p. 254–256. doi: 10.1038/930.

**Aratani, S., Fujii, R., Fujita, H., Fukamizu, A. and Nakajima, T.** (2003) 'Aromatic residues are required for RNA helicase A mediated transactivation.', *International journal of molecular medicine*, 12(2), p. 175–180. doi: 10.3892/ijmm.12.2.175.

**Aratani, S., Fujii, R., Oishi, T., Fujita, H., Amano, T., et al.** (2001) 'Dual Roles of RNA Helicase A in CREB-Dependent Transcription', *Molecular and cellular biology*, 21(14), p. 4460–4469. doi: 10.1128/MCB.21.14.4460-4469.2001.

**Aratani, S., Oishi, T., Fujita, H., Nakazawa, M., Fujii, R., et al.** (2006) 'The nuclear import of RNA helicase A is mediated by importin- $\alpha$ 3', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 340(1), p. 125–133. doi: 10.1016/j.bbrc.2005.11.161.

\***Batzer, M. A. and Deininger, P. L.** (2002) 'Alu repeats and human genomic diversity', *Nature Reviews. Genetics*, 3(5), p. 370–379. doi: 10.1038/nrg798.

\***Beck, J. and Nassal, M.** (2007) 'Hepatitis B virus replication', *World Journal of Gastroenterology*, 13(1), p. 48–64. doi: 10.3748/wjg.v13.i1.48.

**Boeras, I., Song, Z., Moran, A., Franklin, J., Brown, W. C., et al.** (2016) 'DHX9/RHA Binding to the PBS-Segment of the Genomic RNA during HIV-1 Assembly Bolsters Virion Infectivity', *Journal of Molecular Biology*, 428(11), p. 2418–2429. doi: 10.1016/j.jmb.2016.04.011.

**Bolinger, C., Sharma, A., Singh, D., Yu, L. and Boris-Lawrie, K.** (2010) 'RNA helicase A modulates translation of HIV-1 and infectivity of progeny virions', *Nucleic Acids Research*, 38(5), p. 1686–1696. doi: 10.1093/nar/gkp1075.

**Bolinger, C., Yilmaz, A., Roberts Hartman, T., Butsch Kovacic, M., Fernandez, S., et al.** (2007) 'RNA helicase A interacts with divergent lymphotropic retroviruses and promotes translation of human T-cell leukemia virus type 1', *Nucleic Acids Research*, 35(8), p. 2629–2642. doi: 10.1093/nar/gkm124.

**Brady, S., Singh, G., Bolinger, C., Song, Z., Boeras, I., et al.** (2019) 'Virion-associated, host-derived DHX9/RNA helicase A enhances the processivity of HIV-1 reverse transcriptase on genomic RNA', *Journal of Biological Chemistry*, 294(30), p. 11473–11485. doi: 10.1074/jbc.ra119.007679.

**Bratt, E. and Hman, M. O.** (2003) 'Coordination of editing and splicing of glutamate receptor pre-mRNA', *RNA*, 9(3), p. 309–318. doi: 10.1261/rna.2750803.

**Cai, L., Fritz, D., Stefanovic, L. and Stefanovic, B.** (2010) 'Binding of LARP6 to the Conserved 5' Stem-Loop Regulates Translation of mRNAs Encoding Type I Collagen', *Journal of Molecular Biology*, 395(2), p. 309–326. doi: 10.1016/j.jmb.2009.11.020.

**Capitanio, J. S., Montpetit, B. and Wozniak, R. W.** (2017) 'Human Nup98

regulates the localization and activity of DExH/D-box helicase DHX9', *eLife*, 6, p. 1–39. doi: 10.7554/eLife.18825.001.

**Chakraborty, P. and Grosse, F.** (2010) 'WRN helicase unwinds Okazaki fragment-like hybrids in a reaction stimulated by the human DHX9 helicase', *Nucleic Acids Research*, 38(14), p. 4722–4730. doi: 10.1093/nar/gkq240.

**Chakraborty, P. and Grosse, F.** (2011) 'Human DHX9 helicase preferentially unwinds RNA-containing displacement loops (R-loops) and G-quadruplexes', *DNA Repair*, 10(6), p. 654–665. doi: 10.1016/j.dnarep.2011.04.013.

**Chakraborty, P. and Hiom, K.** (2019) 'DHX9-dependent recruitment of BRCA1 to RNA is required to promote DNA end resection in homologous recombination', *bioRxiv*. doi: 10.1101/2019.12.20.884593.

**Chakraborty, P., Huang, J. T. J. and Hiom, K.** (2018) 'DHX9 helicase promotes R-loop formation in cells with impaired RNA splicing', *Nature Communication*, 9(1), p. 1–14. doi: 10.1038/s41467-018-06677-1.

**Chang, Y., Cesarman, E., Pessin, M. S., Lee, F., Culpepper, J., et al.** (1994) 'Identification of Herpesvirus-Like DNA Sequences in AIDS-Associated Kaposi ' s Sarcoma', *Science*, 266(5192), p. 1865–1869.

**Chen, Y., Hu, Jie, Cai, X., Huang, Y., Zhou, X., et al.** (2018) 'APOBEC3B edits HBV DNA and inhibits HBV replication during reverse transcription', *Antiviral Research*, 149, p. 16–25. doi: 10.1016/j.antiviral.2017.11.006.

**Chen, Y., Shen, B., Zheng, X., Long, Q., Xia, J., et al.** (2020) 'DHX9 interacts with APOBEC3B and attenuates the anti-HBV effect of APOBEC3B', *Emerging microbes & infection*, 9(1), p. 366–377. doi: 10.1080/22221751.2020.1725398.

**\*Choi, K. H.** (2012) 'Viral Polymerases', *Advances in experimental medicine and biology*, 726, p. 267–304. doi: 10.1007/978-1-4614-0980-9\_12.

**Coovert, D. D., Le, T. T., McAndrew, P. E., Strasswimmer, J., Crawford, T. O., et al.** (1997) 'The survival motor neuron protein in spinal muscular atrophy', *Human molecular genetics*, 6(8), p. 1205–1214. doi: 10.1093/hmg/6.8.1205.

**Cristini, A., Groh, M., Kristiansen, M. S. and Gromak, N.** (2018) 'RNA/DNA Hybrid Interactome Identifies DXH9 as a Molecular Player in Transcriptional Termination and R-Loop-Associated DNA Damage', *Cell Reports*, 23(6), p. 1891–1905. doi: 10.1016/j.celrep.2018.04.025.

**\*Dea, S., Gagnon, C. A., Mardassi, H., Pirzadeh, B. and Rogan, D.** (2000) 'Current knowledge on the structural proteins of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus: comparison of the North American and European isolates', *Archives of Virology*, 145(4), p. 659–988. doi: 10.1007/s007050050662.

**Decker, L. L., Shankar, P., Khan, G., Freemanfl, R. B., Dezube, B. J., et al.** (1996) 'The Kaposi Sarcoma-associated Herpesvirus (KSHV) Is Present as an Intact Latent Genome in KS Tissue but Replicates in the Peripheral Blood Mononuclear Cells of KS Patients', *The Journal of experimental medicine*, 184(1), p. 283–288. doi: 10.1084/jem.184.1.283.

**Dempsey, A., Keating, S. E., Carty, M. and Bowie, A. G.** (2018) 'Poxviral protein E3-altered cytokine production reveals that DExD/H-box helicase 9 controls Toll-like receptor-stimulated immune responses', *Journal of Biological Chemistry*, 293(39), p. 14989–15001. doi: 10.1074/jbc.RA118.005089.

**Essers, J., Theil, A. F., Baldeyron, C., Van Cappellen, W. A., Houtsmuller, A. B., et al.** (2005) 'Nuclear Dynamics of PCNA in DNA Replication and Repair', *Molecular and cellular biology*, 25(21), p. 9350–9359. doi: 10.1128/MCB.25.21.9350-9359.2005.

**\*Fang, Y. and Snijder, E. J.** (2010) 'The PRRSV replicase: Exploring the

multifunctionality of an intriguing set of nonstructural proteins', *Virus Research*, 154(1–2), p. 61–76. doi: 10.1016/j.virusres.2010.07.030.

**Fattah, F., Lee, E. H., Weisensel, N., Wang, Y. and Lichter, N.** (2010) 'Ku Regulates the Non-Homologous End Joining Pathway Choice of DNA Double-Strand Break Repair in Human Somatic Cells', *PLoS Genet*, 6(2). doi: 10.1371/journal.pgen.1000855.

**Fischer, U., Meyer, S., Teufel, M., Heckel, C., Lührmann, R., et al.** (1994) 'Evidence that HIV-1 Rev directly promotes the nuclear export of unspliced RNA', *The EMBO Journal*, 13(17), p. 4105–4112. doi: 10.1002/j.1460-2075.1994.tb06728.x.

**Friedemann, J., Grosse, F. and Zhang, S.** (2005) 'Nuclear DNA helicase II (RNA helicase A) interacts with Werner syndrome helicase and stimulates its exonuclease activity', *Journal of Biological Chemistry*, 280(35), p. 31303–31313. doi: 10.1074/jbc.M503882200.

**Fu, Q. and Yuan, Y. A.** (2013) 'Structural insights into RISC assembly facilitated by dsRNA-binding domains of human RNA helicase A (DHX9)', *Nucleic Acids Research*, 41(5), p. 3457–3470. doi: 10.1093/nar/gkt042.

**Fu, W., Verma, D., Burton, A., Swaminathan, S. and Longnecker, R. M.** (2019) 'Cellular RNA Helicase DHX9 Interacts with the Essential Epstein-Barr Virus (EBV) Protein SM and Restricts EBV Lytic Replication', *Journal of Virology*, 93, p. 1244–1262. doi: 10.1128/JVI.01244-18.

**Fuchsová, B. and Hozák, P.** (2002) 'The localization of nuclear DNA helicase II in different nuclear compartments is linked to transcription', *Experimental Cell Research*, 279(2), p. 260–270. doi: 10.1006/excr.2002.5617.

**Fuchsová, B., Novák, P., Kafková, J. and Hozák, P.** (2002) 'Nuclear DNA helicase II is recruited to IFN-activated transcription sites at PML nuclear bodies', *The Journal of Cell Biology*, 158(3), p. 463–473. doi: 10.1083/jcb.200202035.

**Fujii, R., Okamoto, M., Aratani, S., Oishi, T., Ohshima, T., et al.** (2001) 'A Role of RNA Helicase A in cis-Acting Transactivation Response Element-mediated Transcriptional Regulation of Human Immunodeficiency Virus Type 1', *Journal of Biological Chemistry*, 276(8), p. 5445–5451. doi: 10.1074/jbc.M006892200.

**Fujita, H., Fujii, R., Aratani, S., Amano, T., Fukamizu, A., et al.** (2003) 'Antithetic Effects of MBD2a on Gene Regulation', *Molecular and cellular biology*, 23(8), p. 2645–2657. doi: 10.1128/MCB.23.8.2645-2657.2003.

**Fukunaga, A., Tanaka, A. and Oishi, K.** (1975) 'Maleless, a recessive autosomal mutant of *Drosophila melanogaster* that specifically kills male zygotes', *Genetics*, 81(1), p. 135–141.

**Gibson, T. J. and Thompson, J. D.** (1994) 'Detection of dsRNA-binding domains in RNA helicase a and *Drosophila* maleless: Implications for monomeric RNA helicases', *Nucleic Acids Research*, 22(13), p. 2552–2556. doi: 10.1093/nar/22.13.2552.

**Gomila, R. C., Martin III, G. W. and Gehrke, L.** (2011) 'NF90 Binds the Dengue Virus RNA 3' Terminus and Is a Positive Regulator of Dengue Virus Replication', *PLoS ONE*, 6(2). doi: 10.1371/journal.pone.0016687.

**\*Gorbalenya, A. E. and Koonin, E. V.** (1993) 'Helicases: amino acid sequence comparisons and structure-function relationships', *Current Opinion in Structural Biology*, 3(3), p. 419–429. doi: 10.1016/S0959-440X(05)80116-2.

**\*Grubman, M. J. and Baxt, B.** (2004) 'Foot-and-Mouth Disease', *Clinical Microbiology Reviews*, 17(2), p. 465–493. doi: 10.1128/CMR.17.2.465-493.2004.

**Grüter, P., Taberner, C., Von Kobbe, C., Schmitt, C., Saavedra, C., et al.** (1998) 'TAP, the human homolog of Mex67p, mediates CTE-dependent RNA export from the nucleus', *Molecular Cell*, 1(5), p. 649–659. doi: 10.1016/S1097-2765(00)80065-9.

- Halaby, M.-J., Li, Y., Harris, B. R., Jiang, S., Miskimins, W. K., et al.** (2015) 'Translational Control Protein 80 Stimulates IRES-Mediated Translation of p53 mRNA in Response to DNA Damage', *BioMed research international* 2015. doi: 10.1155/2015/708158.
- Harris, D., Zhang, Z., Chaubey, B. and Pandey, V. N.** (2006) 'Identification of Cellular Factors Associated with the 3-Nontranslated Region of the Hepatitis C Virus Genome', *Molecular & cellular proteomics*, 5(6), p. 1006–1018. doi: 10.1074/mcp.M500429-MCP200.
- Hartman, T. R., Qian, S., Bolinger, C., Fernandez, S., Schoenberg, D. R., et al.** (2006) 'RNA helicase A is necessary for translation of selected messenger RNAs', *Nature Structural and Molecular Biology*, 13(6), p. 509–516. doi: 10.1038/nsmb1092.
- Hartmuth, K., Urlaub, H., Vornlocher, H.-P., Will, C. L., Gentzel, M., et al.** (2002) 'Protein composition of human prespliceosomes isolated by a tobramycin affinity-selection method', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(26), p. 16719–16724. doi: 10.1073/pnas.262483899.
- He, Q. S., Tang, H., Zhang, J., Truong, K., Wong-Staal, F., et al.** (2008) 'Comparisons of RNAi approaches for validation of human RNA helicase A as an essential factor in hepatitis C virus replication', *Journal of Virological Methods*, 154(1–2), p. 216–219. doi: 10.1016/j.jviromet.2008.08.005.
- Hong, H., An, O., Chan, T. H. M., Ng, V. H. E., Kwok, H. S., et al.** (2018) 'Bidirectional regulation of adenosine-to-inosine (A-to-I) RNA editing by DEAH box helicase 9 (DHX9) in cancer', *Nucleic Acids Research*, 46(15), p. 7953–7969. doi: 10.1093/nar/gky396.
- Huang, M. and Mitchell, B. S.** (2008) 'Guanine nucleotide depletion mediates translocation of nucleolar proteins, including RNA helicase A (DHX-9)', *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids*, 27(6–7), p. 704–711. doi: 10.1080/15257770802145132.
- Huo, L., Wang, Y.-N., Xia, W., Hsu, S.-C., Lai, C.-C., et al.** (2010) 'RNA helicase A is a DNA-binding partner for EGFR-mediated transcriptional activation in the nucleus', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(37), p. 16125–16130. doi: 10.1073/pnas.1000743107.
- Isken, O., Baroth, M., Grassmann, C. W., Weinlich, S., Ostareck, D. H., et al.** (2007) 'Nuclear factors are involved in hepatitis C virus RNA replication', *RNA*, 13(10), p. 1675–1692. doi: 10.1261/rna.594207.
- \*Jankowsky, E.** (2000) 'The DExH/D protein family database', *Nucleic Acids Research*, 28(1), p. 333–334. doi: 10.1093/nar/28.1.333.
- \*Jankowsky, E. and Fairman-Williams, M. E.** (2010) 'An Introduction to RNA Helicases: Superfamilies, Families, and Major Themes', in *RNA helicases*. Royal Society of Chemistry, p. 1–31. doi: 10.1039/9781849732215-00001.
- Jin, J., Jing, W., Lei, X.-X., Feng, C., Peng, S., et al.** (2011) 'Evidence that Lin28 stimulates translation by recruiting RNA helicase A to polysomes', *Nucleic Acids Research*, 39(9), p. 3724–3734. doi: 10.1093/nar/gkq1350.
- Jong, J. E., Park, J., Kim, S. and Seo, T.** (2010) 'Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus viral protein kinase interacts with RNA helicase A and regulates host gene expression', *Journal of Microbiology*, 48(2), p. 206–212. doi: 10.1007/s12275-010-0021-1.
- Kamath-Loeb, A. S., Johansson, E., Burgers, P. M. J. and Loeb, L. A.** (2000) 'Functional interaction between the Werner Syndrome protein and DNA polymerase delta', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(9), p. 4603–4608. doi: 10.1073/pnas.97.9.4603.

**Kasper, L. H., Brindle, P. K., Schnabel, C. A., Pritchard, C. E. J., Cleary, M. L., et al.** (1999) 'CREB Binding Protein Interacts with Nucleoporin-Specific FG Repeats That Activate Transcription and Mediate NUP98-HOXA9 Oncogenicity', *Molecular and cellular biology*, 19(1), p. 764–776. doi: 10.1128/MCB.19.1.764.

**Kim, T., Pazhoor, S., Bao, M., Zhang, Z., Hanabuchi, S., et al.** (2010) 'Aspartate-glutamate-alanine-histidine box motif (DEAH)/RNA helicase A helicases sense microbial DNA in human plasmacytoid dendritic cells', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(34), p. 15181–15186. doi: 10.1073/pnas.1006539107.

**\*Kowalczykowski, S. C.** (2000) 'Initiation of genetic recombination and recombination-dependent replication', *Trends in Biochemical Sciences*, 25(4), p. 156–165. doi: 10.1016/S0968-0004(00)01569-3.

**Kuroda, M. I., Kernan, M. J., Kreber, R., Ganetzky, B. and Baker, B. S.** (1991) 'The maleless protein associates with the X chromosome to regulate dosage compensation in *Drosophila*', *Cell*, 66(5), p. 935–947. doi: 10.1016/0092-8674(91)90439-6.

**Lawrence, P., Conderino, J. S. and Rieder, E.** (2014) 'Redistribution of demethylated RNA helicase A during foot-and-mouth disease virus infection: Role of Jumonji C-domain containing protein 6 in RHA demethylation', *Virology*, 452–453, p. 1–11. doi: 10.1016/j.virol.2013.12.040.

**Lawrence, P. and Rieder, E.** (2009) 'Identification of RNA Helicase A as a New Host Factor in the Replication Cycle of Foot-and-Mouth Disease Virus', *Journal of Virology*, 83(21), p. 11356–11366. doi: 10.1128/JVI.02677-08.

**Lebel, M., Spillare, E. A., Harris, C. C. and Leder, P.** (1999) 'The Werner Syndrome Gene Product Co-purifies with the DNA Replication Complex and Interacts with PCNA and Topoisomerase I', *The Journal of Biological Chemistry*, 274(53), p. 37795–37799. doi: 10.1074/jbc.274.53.37795.

**Lee, C. G., Da, V., Soares, C., Newberger, C., Manova, K., et al.** (1998a) 'RNA helicase A is essential for normal gastrulation', *Developmental Biology*, 95(23), p. 13709–13713. doi: 10.1073/pnas.95.23.13709.

**Lee, C. G., Eki, T., Okumura, K., Nogami, M., Da Costa Soares, V., et al.** (1999) 'The human RNA helicase a (DDX9) gene maps to the prostate cancer susceptibility locus at chromosome band 1q25 and its pseudogene (DDX9P) to 13q22, respectively', *Somatic Cell and Molecular Genetics*, 25(1), p. 33–39. doi: 10.1023/b:scam.0000007138.44216.3a.

**Lee, C. G., Eki, T., Okumura, K., Soares, V. D. C. and Hurwitz, J.** (1998b) 'Molecular analysis of the cDNA and genomic DNA encoding mouse RNA helicase A', *Genomics*, 47(3), p. 365–371. doi: 10.1006/geno.1997.5139.

**Lee, C. G. and Hurwitz, J.** (1992) 'A new RNA helicase isolated from HeLa cells that catalytically: Translocates in the 3' to 5' direction', *Journal of Biological Chemistry*, 267(7), p. 4398–4407.

**Lee, C. G. and Hurwitz, J.** (1993) 'Human RNA helicase A is homologous to the maleless protein of *Drosophila*', *Journal of Biological Chemistry*, 268(22), p. 16822–16830.

**Lee, T., Di Paola, D., Malina, A., Mills, J. R., Kreps, A., et al.** (2014) 'Suppression of the DHX9 Helicase Induces Premature Senescence in Human Diploid Fibroblasts in a p53-dependent Manner', *The Journal of Biological Chemistry*, 289(33), p. 22798–814. doi: 10.1074/jbc.M114.568535.

**\*Lee, T. and Pelletier, J.** (2016) 'The biology of DHX9 and its potential as a therapeutic target', *Oncotarget*, 7(27), p. 42716–42739. doi: 10.18632/oncotarget.8446.

**Lenarcic, E. M., Ziehr, B. J. and Moorman, N. J.** (2015) 'An unbiased proteomics approach to identify human cytomegalovirus RNA-associated proteins', *Virology*, 481, p.

13–23. doi: 10.1016/j.virol.2015.02.008.

**Leone, S., Bär, D., Slabber, C. F., Dalcher, D. and Santoro, R.** (2017) 'The RNA helicase DHX9 establishes nucleolar heterochromatin, and this activity is required for embryonic stem cell differentiation', *EMBO reports*, 18(7), p. 1248–1262. doi: 10.15252/embr.201744330.

**Li, J., Tang, H., Mullen, T.-M., Westberg, C., Reddy, T. R., et al.** (1999) 'A role for RNA helicase A in post-transcriptional regulation of HIV type 1', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(2), p. 709–714. doi: 10.1073/pnas.96.2.709.

**Li, Y., Masaki, T., Shimakami, T. and Lemon, S. M.** (2014) 'hnRNP L and NF90 Interact with Hepatitis C Virus 5'-Terminal Untranslated RNA and Promote Efficient Replication', *Journal of Virology*, 88(13), p. 7199–7209. doi: 10.1128/JVI.00225-14.

**Liao, H.-J., Kobayashi, R. and Mathews, M. B.** (1998) 'Activities of adenovirus virus-associated RNAs: Purification and characterization of RNA binding proteins', *Biochemistry*, 95(15), p. 8514–8519. doi: 10.1073/pnas.95.15.8514.

**Lin, L., Li, Y., Pyo, H.-M., Lu, X., Raman, S. N. T., et al.** (2012) 'Identification of RNA Helicase A as a Cellular Factor That Interacts with Influenza A Virus NS1 Protein and Its Role in the Virus Life Cycle', *Journal of Virology*, 86(4), p. 1942–1954. doi: 10.1128/jvi.06362-11.

**Liu, L., Tian, J., Nan, H., Tian, M., Li, Y., et al.** (2016) 'Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus Nucleocapsid Protein Interacts with Nsp9 and Cellular DHX9 To Regulate Viral RNA Synthesis', *Journal of Virology*, 90(11), p. 5384–5398. doi: 10.1128/jvi.03216-15.

**Liu, Z., Kenworthy, R., Green, C. and Tang, H.** (2007) 'Molecular determinants of nucleolar translocation of RNA helicase A', *Experimental Cell Research*, 313(17), p. 3743–3754. doi: 10.1016/j.yexcr.2007.07.037.

**Loor, G., Zhang, S.-J., Zhang, P., Toomey, N. L. and Lee, M. Y. W. T.** (1997) 'Identification of DNA replication and cell cycle proteins that interact with PCNA', *Nucleic Acids Research*, 25(24), p. 5041–5046. doi: 10.1093/nar/25.24.5041.

**Lucifora, J., Xia, Y., Reisinger, F., Zhang, K., Stadler, D., et al.** (2014) 'Specific and Nonhepatotoxic Degradation of Nuclear Hepatitis B Virus cccDNA', *Science*, 343(6176), p. 1221–1228. doi: 10.1126/science.1243462.

**\*Major, M. E. and Feinstone, S. M.** (1997) 'The molecular virology of hepatitis C', *Hepatology*, 25(6), p. 1527–1538. doi: 10.1002/hep.510250637.

**Manojlovic, Z. and Stefanovic, B.** (2012) 'A novel role of RNA helicase A in regulation of translation of type I collagen mRNAs', *RNA*, 18(2), p. 321–334. doi: 10.1261/rna.030288.111.

**\*Marcello, A., Zoppé, M. and Giacca, M.** (2001) 'Multiple Modes of Transcriptional Regulation by the HIV-1 Tat Transactivator', *IUBMB Life*, 51(3), p. 175–181. doi: 10.1080/152165401753544241.

**\*Mathews, M. B. and Shenk, T.** (1991) 'Adenovirus Virus-Associated RNA and Translation Control', *Journal of virology*, 65(11), p. 5657–5662. doi: 10.1128/JVI.65.11.5657-5662.1991.

**Matkovic, R., Bernard, E., Fontanel, S., Eldin, P., Chazal, N., et al.** (2019) 'The Host DHX9 DExH-Box Helicase Is Recruited to Chikungunya Virus Replication Complexes for Optimal Genomic RNA Translation', *Journal of Virology*, 93(4), p. 1764–1782. doi: 10.1128/JVI.01764-18.

**\*Matsuoka, Y., Matsumae, H., Katoh, M., Eisfeld, A. J., Neumann, G., et al.** (2013) 'A comprehensive map of the influenza A virus replication cycle', *BMC systems biology*,

7(97). doi: 10.1186/1752-0509-7-97.

**McClendon, A. K., Chapin Rodriguez, A. and Osheroff, N.** (2005) 'Human Topoisomerase II alpha Rapidly Relaxes Positively Supercoiled DNA', *The Journal of Biological Chemistry*, 280(47), p. 39337–39345. doi: 10.1074/jbc.M503320200.

**Murat, P., Marsico, G., Herdy, B., Ghanbarian, A., Portella, G., et al.** (2018) 'RNA G-quadruplexes at upstream open reading frames cause DHX36-and DHX9-dependent translation of human mRNAs', *Genome biology*, 19(1), p. 229. doi: 10.1186/s13059-018-1602-2.

**Myö, S. and Baylin, S. B.** (2001) 'Sequence-specific DNA Binding Activity of RNA Helicase A to the p16 INK4a Promoter', *The Journal of Biological Chemistry*, 276(2), p. 1634–1642. doi: 10.1074/jbc.M004481200.

**Nakajima, T., Uchida, C., Anderson, S. F., Chee-Gun, L., Hurwitz, J., et al.** (1997) 'RNA helicase A mediates association of CBP with RNA polymerase II', *Cell*, 90(6), p. 1107–1112. doi: 10.1016/S0092-8674(00)80376-1.

**Niwa, H., Miyazaki, J. I. and Smith, A. G.** (2000) 'Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells', *Nature Genetics*, 24(4), p. 372–376. doi: 10.1038/74199.

**Paingankar, M. S. and Arankalle, V. A.** (2015) 'Identification and characterization of cellular proteins interacting with Hepatitis E virus untranslated regions', *Virus Research*, 208, p. 98–109. doi: 10.1016/j.virusres.2015.06.006.

**\*Patel, S. S. and Donmez, I.** (2006) 'Mechanisms of helicases', *Journal of Biological Chemistry*, 281(27), p. 18265–18268. doi: 10.1074/jbc.R600008200.

**Pellizzoni, L., Charroux, B., Rappsilber, J., Mann, M. and Dreyfuss, G.** (2001) 'A Functional Interaction between the Survival Motor Neuron Complex and RNA Polymerase II', *The Journal of Cell Biology*, 152(1), p. 75–85. doi: 10.1083/jcb.152.1.75.

**Qiu, C., Ma, Y., Wang, J., Peng, S. and Huang, Y.** (2010) 'Lin28-mediated post-transcriptional regulation of Oct4 expression in human embryonic stem cells', *Nucleic Acids Research*, 38(4), p. 1240–1248. doi: 10.1093/nar/gkp1071.

**Rahman, M. M., Bagdassarian, E., Ali, M. A. M. and Mcfadden, G.** (2017) 'Identification of host DEAD-box RNA helicases that regulate cellular tropism of oncolytic Myxoma virus in human cancer cells', *Scientific reports*, 7(1), p. 1–14. doi: 10.1038/s41598-017-15941-1.

**Rahman, M. M., Liu, J., Chan, W. M., Rothenburg, S. and McFadden, G.** (2013) 'Myxoma Virus Protein M029 Is a Dual Function Immunomodulator that Inhibits PKR and Also Conscripts RHA/DHX9 to Promote Expanded Host Tropism and Viral Replication', *PLoS Pathogens*, 9(7). doi: 10.1371/journal.ppat.1003465.

**Ranji, A., Shkriabai, N., Kvaratskhelia, M., Musier-Forsyth, K. and Boris-Lawrie, K.** (2011) 'Features of Double-stranded RNA-binding Domains of RNA Helicase A Are Necessary for Selective Recognition and Translation of Complex mRNAs', *The Journal of Biological Chemistry*, 286(7), p. 5328–5337. doi: 10.1074/jbc.M110.176339.

**Robb, G. B. and Rana, T. M.** (2007) 'RNA Helicase A Interacts with RISC in Human Cells and Functions in RISC Loading', *Molecular Cell*, 26(4), p. 523–537. doi: 10.1016/j.molcel.2007.04.016.

**Roy, B. B., Hu, J., Guo, X., Russell, R. S., Guo, F., et al.** (2006) 'Association of RNA Helicase A with Human Immunodeficiency Virus Type 1 particles', *The Journal of Biological Chemistry*, 281(18), p. 12625–12635. doi: 10.1074/jbc.M510596200.

**\*Rupp, J. C., Sokoloski, K. J., Gebhart, N. N., Hardy Correspondence, R. W. and Hardy, R. W.** (2015) 'Alphavirus RNA synthesis and non-structural protein functions', *Journal of General Virology*, 96(Pt 9), p. 2483–2500. doi: 10.1099/jgv.0.000249.



- Sadler, A. J., Latchoumanin, O., Hawkes, D., Mak, J. and Williams, B. R. G.** (2009) 'An Antiviral Response Directed by PKR Phosphorylation of the RNA Helicase A', *PLoS Pathog*, 5(2). doi: 10.1371/journal.ppat.1000311.
- Savić, N., Bär, D., Leone, S., Frommel, S. C., Weber, F. A., et al.** (2014) 'LncRNA maturation to initiate heterochromatin formation in the nucleolus is required for exit from pluripotency in ESCs', *Cell Stem Cell*, 15(6), p. 720–734. doi: 10.1016/j.stem.2014.10.005.
- Schütz, P., Wahlberg, E., Karlberg, T., Hammarström, M., Collins, R., et al.** (2010) 'Crystal structure of human RNA helicase A (DHX9): Structural basis for unselective nucleotide base binding in a DEAD-box variant protein', *Journal of Molecular Biology*, 400(4), p. 768–782. doi: 10.1016/j.jmb.2010.05.046.
- Sekiba, K., Otsuka, M., Ohno, M., Kishikawa, T., Yamagami, M., et al.** (2018) 'DHX9 regulates production of hepatitis B virus-derived circular RNA and viral protein levels', *Oncotarget*, 9(30), p. 20953–20964. doi: 10.18632/oncotarget.25104.
- Shen, B., Chen, Y., Hu, Jie, Qiao, M., Ren, J., et al.** (2019) 'Hepatitis B virus X protein modulates upregulation of DHX9 to promote viral DNA replication', *Cellular Microbiology*, 22(3). doi: 10.1111/cmi.13148.
- Sheng, C., Yao, Y., Chen, B., Wang, Y., Chen, J., et al.** (2013) 'RNA helicase is involved in the expression and replication of classical swine fever virus and interacts with untranslated region', *Virus Research*, 171(1), p. 257–261. doi: 10.1016/j.virusres.2012.11.014.
- Shinji Kawai; Atsuo Amano** (2012) 'BRCA1 regulates microRNA biogenesis via the DROSHA microprocessor complex', *The Journal of Cell Biology*, 197(2), p. 201–208. doi: 10.1083/jcb.201110008.
- Short, J. D. and Pfarr, C. M.** (2002) 'Translational Regulation of the JunD Messenger RNA', *The Journal of Cell Biology*, 277(36), p. 32697–32705. doi: 10.1074/jbc.M204553200.
- \*Singleton, M. R., Dillingham, M. S. and Wigley, D. B.** (2007) 'Structure and Mechanism of Helicases and Nucleic Acid Translocases', *Annual Review of Biochemistry*, 76(1), p. 23–50. doi: 10.1146/annurev.biochem.76.052305.115300.
- Smith, W. A., Schurter, B. T., Wong-Staal, F. and David, M.** (2004) 'Arginine methylation of RNA helicase A determines its subcellular localization', *Journal of Biological Chemistry*, 279(22), p. 22795–22798. doi: 10.1074/jbc.C300512200.
- Stefanovic, B., Hellerbrand, C. and Brenner, D. A.** (1999) 'Regulatory Role of the Conserved Stem-Loop Structure at the 5 End of Collagen 1 mRNA', *Molecular and Cellular Biology*, 19(6), p. 4334–4342. doi: 10.1128/mcb.19.6.4334.
- Sypula, J., Wang, F., Ma, Y., Bell, J. and Mcfadden, G.** (2004) 'Myxoma virus tropism in human tumor cells', *Gene Therapy and Molecular Biology*, 8, p. 103–114.
- Tang, H.** (1997) 'A Cellular Cofactor for the Constitutive Transport Element of Type D Retrovirus', *Science*, 276(5317), p. 1412–1415. doi: 10.1126/science.276.5317.1412.
- Tang, H., McDonald, D., Middlesworth, T., Hope, T. J. and Wong-Staal, F.** (1999) 'The Carboxyl Terminus of RNA Helicase A Contains a Bidirectional Nuclear Transport Domain', *Molecular and Cellular Biology*, 19(5), p. 3540–3550. doi: 10.1128/mcb.19.5.3540.
- Tang, H. and Wong-Staal, F.** (2000) 'Specific Interaction between RNA Helicase A and Tap, Two Cellular Proteins That Bind to the Constitutive Transport Element of Type D Retrovirus', *The Journal of biological chemistry*, 275(42), p. 32694–32700. doi: 10.1074/jbc.M003933200.

**Tanner, N. K., Cordin, O., Banroques, J., Doère, M. and Linder, P.** (2003) 'The Q motif: A newly identified motif in DEAD box helicases may regulate ATP binding and hydrolysis', *Molecular Cell*, 11(1), p. 127–138. doi: 10.1016/S1097-2765(03)00006-6.

\***Tanner, N. K. and Linder, P.** (2001) 'DExD/H box RNA helicases: From generic motors to specific dissociation functions', *Molecular Cell*, 8(2), p. 251–262. doi: 10.1016/S1097-2765(01)00329-X.

\***Temin, H. M.** (1982) 'Function of the Retrovirus Long Terminal Repeat', *Cell*, 28(1), p. 1–3. doi: 10.1016/0092-8674(82)90367-1.

**Tetsuka, T., Uranishi, H., Sanda, T., Asamitsu, K., Yang, J.-P., et al.** (2004) 'RNA helicase A interacts with nuclear factor  $\kappa$ B p65 and functions as a transcriptional coactivator', *European Journal of Biochemistry*, 271(18), p. 3741–3751. doi: 10.1111/j.1432-1033.2004.04314.x.

\***Thiberville, S. D., Moyen, N., Dupuis-Maguiraga, L., Nougairede, A., Gould, E. A., et al.** (2013) 'Chikungunya fever: Epidemiology, clinical syndrome, pathogenesis and therapy', *Antiviral Research*, 99(3), p. 345–370. doi: 10.1016/j.antiviral.2013.06.009.

**Umate, P., Tuteja, N. and Tuteja, R.** (2011) 'Genome-wide comprehensive analysis of human helicases', *Communicative and Integrative Biology*, 4(1), p. 1–20. doi: 10.4161/cib.13844.

\***Vespucio, A., Santos-Pereira, J. M. and Aguilera, A.** (2015) 'R loops: new modulators of genome dynamics and function', *Nature Publishing Group*, 16, p. 583–597. doi: 10.1038/nrg3961.

**Walstrom, K. M., Schmidt, D., Bean, C. J. and Kelly, W. G.** (2005) 'RNA helicase A is important for germline transcriptional control, proliferation, and meiosis in *C. elegans*', *Mechanisms of Development*, 122(5), p. 707–720. doi: 10.1016/j.mod.2004.12.002.

**Westberg, C., Yang, J.-P., Tang, H., Reddy, T. R. and Wong-Staal, F.** (2000) 'A Novel Shuttle Protein Binds to RNA Helicase A and Activates the Retroviral Constitutive Transport Element', *The Journal of biological chemistry*, 275(28), p. 21396–21401. doi: 10.1074/jbc.M909887199.

**Xing, L., Liang, C. and Kleiman, L.** (2011) 'Coordinate Roles of Gag and RNA Helicase A in Promoting the Annealing of tRNA 3 Lys to HIV-1 RNA', *Journal of Virology*, 85(4), p. 1847–1860. doi: 10.1128/JVI.02010-10.

**Xing, L., Niu, M. and Kleiman, L.** (2012) 'In Vitro and In Vivo Analysis of the Interaction between RNA Helicase A and HIV-1 RNA', *Journal of Virology*, 86(24), p. 13272–13280. doi: 10.1128/JVI.01993-12.

**Xing, L., Niu, M. and Kleiman, L.** (2014a) 'Role of the OB-fold of RNA helicase a in the synthesis of HIV-1 RNA', *Biochimica et Biophysica Acta*, 1839(11), p. 1069–1078. doi: 10.1016/j.bbagr.2014.08.008.

**Xing, L., Niu, M., Zhao, X. and Kleiman, L.** (2013) 'Roles of the linker region of RNA helicase A in HIV-1 RNA metabolism', *PLoS ONE*, 8(11). doi: 10.1371/journal.pone.0078596.

**Xing, L., Zhao, X., Guo, F. and Kleiman, L.** (2014b) 'The role of A-kinase anchoring protein 95-like protein in annealing of tRNA<sup>Lys3</sup> to HIV-1 RNA', *Retrovirology*, 11(1), p. 1–13. doi: 10.1186/1742-4690-11-58.

**Xing, L., Zhao, X., Niu, M. and Kleiman, L.** (2014c) 'Helicase associated 2 domain is essential for helicase activity of RNA helicase A', *Biochimica et Biophysica Acta*, 1844(10), p. 1757–1764. doi: 10.1016/j.bbapap.2014.07.001.

**Yang, J.-P., Tang, H., Reddy, T. R. and Wong-Staal, F.** (2001) 'Mapping the Functional Domains of HAP95, a Protein That Binds RNA Helicase A and Activates the Constitutive Transport Element of Type D Retroviruses', *The Journal of Biological*

*Chemistry*, 276(33), p. 30694–30700. doi: 10.1074/jbc.M102809200.

**Zanto, T. P., Hennigan, K., Östberg, M., Clapp, W. C. and Gazzaley, A.** (2011) 'Human DHX9 helicase unwinds triple-helical DNA structures', *Biochemistry*, 46(4), p. 564–574. doi: 10.1021/bi100795m.

**Zhang, S., Buder, K., Burkhardt, C., Schlott, B., Gö Rlach ¶, M., et al.** (2001) 'Nuclear DNA Helicase II/RNA Helicase A Binds to Filamentous Actin', *The Journal of Biological Chemistry*, 12(1), p. 843–853. doi: 10.1074/jbc.M109393200.

**Zhang, S. and Grosse, F.** (1991) 'Purification and characterization of two DNA helicases from calf thymus nuclei', *Journal of Biological Chemistry*, 266(30), p. 20483–20490.

**Zhang, S. and Grosse, F.** (1994) 'Nuclear DNA Helicase II Unwinds both DNA and RNA', *Biochemistry*, 33(13), p. 3906–3912. doi: 10.1021/bi00179a016.

**Zhang, S. and Grosse, F.** (1997) 'Domain structure of human nuclear DNA helicase II (RNA helicase A)', *Journal of Biological Chemistry*, 272(17), p. 11487–11494. doi: 10.1074/jbc.272.17.11487.

**Zhang, S., Hemmerich, P. and Grosse, F.** (2007) 'Werner syndrome helicase (WRN), nuclear DNA helicase II (NDH II) and histone  $\gamma$ H2AX are localized to the centrosome', *Cell Biology International*, 31(10), p. 1109–1121. doi: 10.1016/j.cellbi.2007.03.027.

**Zhang, S., Herrmann, C. and Grosse, F.** (1999a) 'Nucleolar localization of murine nuclear DNA helicase II (RNA helicase A)', *Journal of Cell Science*, 112(16), p. 2693–2703.

**Zhang, S., Herrmann, C. and Grosse, F.** (1999b) 'Pre-mRNA and mRNA binding of human nuclear DNA helicase II (RNA helicase A)', *Journal of Cell Science*, 112(7), p. 1055–1064.

**Zhang, S., Köhler, C., Hemmerich, P. and Grosse, F.** (2004) 'Nuclear DNA helicase II (RNA helicase A) binds to an F-actin containing shell that surrounds the nucleolus', *Experimental Cell Research*, 293(2), p. 248–258. doi: 10.1016/j.yexcr.2003.10.018.

**Zhang, S., Maacke, H. and Grosse, F.** (1995) 'Molecular cloning of the gene encoding nuclear DNA helicase II. A bovine homologue of human RNA helicase A and Drosophila Mle protein', *Journal of Biological Chemistry*, 270(27), p. 16422–16427. doi: 10.1074/jbc.270.27.16422.

**Zhang, S., Schlott, B., Go, M., Rlach, È. and Grosse, F.** (2003) 'DNA-dependent protein kinase (DNA-PK) phosphorylates nuclear DNA helicase II/RNA helicase A and hnRNP proteins in an RNA-dependent manner', *Nucleic Acids Research*, 32(1), p. 1–10. doi: 10.1093/nar/gkg933.

**Zhang, Z., Yuan, B., Lu, N., Facchinetti, V. and Liu, Y.-J.** (2011) 'DHX9 pairs with IPS-1 to sense double-stranded RNA in myeloid dendritic cells', *Journal of immunology*, 187(9), p. 4501–4508. doi: 0.4049/jimmunol.1101307.

**Zhong, X. and Safa, A. R.** (2004) 'RNA Helicase A in the MEF1 Transcription Factor Complex Up-regulates the MDR1 Gene in Multidrug-resistant Cancer Cells', *The Journal of Biological Chemistry*, 279(17), p. 17134–17141. doi: 10.1074/jbc.M311057200.

**Zhou, K., Choe, K.-T., Zaidi, Z., Wang, Q., Mathews, M. B., et al.** (2003) 'RNA helicase A interacts with dsDNA and topoisomerase IIa', *Nucleic Acids Research*, 31(9), p. 2253–2260. doi: 10.1093/nar/gkg328.

\* - označeny rešerše