

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

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



Lukáš Išler

Translokace virů přes jaderný pór do buněčného jádra
Virus translocation from cytoplasm to the cell nucleus

Bakalářská práce

Vedoucí práce: doc. RNDr. Jitka Forstová, CSc.

Praha 2020

Prohlášení

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

V Praze dne, 1. 6. 2020

Podpis

Děkuji vedoucí mé bakalářské práce doc. RNDr. Jitce Forstové, CSc. nejen za všechny cenné rady a připomínky, které mi při zpracování práce poskytla, ale také i za její trpělivost, vstřícnost a čas, který mi byla ochotna, navzdory mimořádné situaci minulých měsíců, věnovat.

Rád bych poděkoval i celé mé rodině, zejména ale mým rodičům, díky nimž mi je umožněno na této škole studovat a jejichž podpora, ať už finanční či dle mého ta nejdůležitější – rodičovská, mne úspěšně provedla mými třemi roky bakalářského studia.

Abstrakt

Pro replikační cyklus většiny DNA a některých RNA virů je životně důležité, aby pronikly do jádra hostitelské buňky. Při tomto kroku však musejí překonat jadernou membránu, kterou lze v interfázi buněčného cyklu projít pouze prostřednictvím jaderných pórů. Jednotlivé virové čeledi vyvinuly odlišné strategie, jak přes jaderný pór proniknout. V této práci, shrnující poznatky o průniku virů přes jaderný pór je ukázáno, že kromě interakce s transportními receptory interagují virové částice i přímo s některými proteiny jaderného póru neboli nukleoporiny (NUPs). Interakcí s virovými částicemi se účastní konkrétně jedna ze skupin nukleoporinů, tzv. FG NUPs, jejichž sekvence obsahuje přirozeně neuspořádané domény bohaté na repetice fenylalanin-glycin (FG), které vytvářejí selektivní bariéru jaderného póru. Jedná se hlavně o nukleoporiny NUP153, NUP214 a NUP358. Interakce virových částic s těmito nukleoporiny jim umožní tuto bariéru překonat a dopravit tak virový genom do jádra hostitelské buňky. Jedná se tedy o esenciální krok v rané fázi virového infekčního cyklu.

Klíčová slova: buněčné jádro, jaderný transport, jaderný pór, nukleoporiny, vstup viru do jádra, NUP153, NUP214, NUP358

Abstract

Replication cycles of most DNA and some RNA viruses require translocation of these viruses into the host cell nucleus. In this step viruses must cross the nuclear membrane. In the cell cycle interphase, it can be exceeded only by passing through nuclear pores. Individual virus families have developed different strategies to efficiently translocate through the nuclear pore. In this paper, summarizing the knowledge of viral penetration through the nuclear pore, it is shown that in addition to the interaction with transport receptors, viral particles interact directly with some proteins of the nuclear pore complex, called nucleoporins (NUPs). Especially, one group of nucleoporins, so-called FG NUPs, interacts with viral particles. Their sequence contains naturally disordered domains rich in phenylalanine-glycine (FG) repeats which create selective barrier of the nuclear pore complex. These are mainly nucleoporins NUP153, NUP214 and NUP358. Interaction of viral particles with these nucleoporins allow them to cross this barrier and deliver their viral genome to the host cell nucleus. It is therefore an essential step in the early phase of the viral infection cycle.

Keywords: cell nucleus, nuclear transport, nuclear pore complex, nucleoporins, virus nuclear entry, NUP153, NUP214, NUP358

Obsah

Abstrakt.....	iv
Obsah	v
Seznam použitých zkratek	vi
1 Úvod	1
2 Jaderný pór.....	3
2.1 Struktura jaderného póru.....	3
2.1.1 Nukleoporiny (NUPs).....	4
2.1.1.1 Strukturální nukleoporiny (scaffold NUPs)	5
2.1.1.2 Nukleoporiny obsahující FG repetice (FG NUPs).....	7
2.2 Princip transportu molekul do buněčného jádra.....	10
3 Translokační strategie přes jaderný pór u vybraných skupin virů	13
3.1 DNA viry.....	13
3.1.1 <i>Herpesviridae</i>	13
3.1.2 <i>Hepadnaviridae</i>	15
3.1.3 <i>Adenoviridae</i>	18
3.1.4 <i>Polyomaviridae</i>	21
3.2 RNA viry.....	24
3.2.1 <i>Orthomyxoviridae</i>	24
3.2.2 <i>Retroviridae</i>	26
3.2.2.1 Translokace HIV-1 do buněčného jádra.....	27
4 Závěr.....	30
Literatura	31

Seznam použitých zkratek

5S RNA	5S ribozomální ribonukleová kyselina	5S ribosomal ribonucleic acid
AdV	adenovirus	adenovirus
ATP	adenosintrifosfát	adenosine triphosphate
BKPyV	BK polyomavirus	BK polyomavirus
CA	kapsidový protein HIV-1	HIV-1 capsid protein
CAS	protein mající roli při buněčné apoptóze a jaderném transportu	cellular apoptosis susceptibility protein
cccDNA	kovalentně uzavřená kruhová DNA	covalently closed circular DNA
cDNA	komplementární deoxyribonukleová kyselina vzniklá reverzní transkripcí RNA	complementary deoxyribonucleic acid produced by reverse transcription RNA
CP	kapsidový protein HBV	HBV core protein
CPSF6	podjednotka sestřihového faktoru pro sestřih a polyadenylaci 3' konce RNA	cleavage and polyadenylation specificity factor 6
CRM1	jaderný exportní protein	chromosomal maintenance 1
CypA	cyclophilin A (peptidylprolyl izomeráza A)	cyclophilin A (peptidylprolyl isomerase A)
DNA	deoxyribonukleová kyselina	deoxyribonucleic acid
dsDNA	dvouřetězcová deoxyribonukleová kyselina	double-stranded deoxyribonucleic acid
E	kyselina glutamová	glutamic acid
ELYS	nukleoporin Y-komplexu	embryonic large molecule derived from yolk sac
ER	endoplazmatické retikulum	endoplasmic reticulum
et. al	et alii (a kolektiv)	and others
FG	fenylalanin-glycin	phenylalanine-glycine
FITC	fluorescein isothiokyanát	fluorescein isothiocyanate
G	glycin	glycine
GDP	guanosindifosfát	guanosine diphosphate
GFP	zelený fluorescenční protein	green fluorescent protein
GLFG	glycin-leucin-fenylalanin-glycin	glycine-leucine-phenylalanine-glycine
GTP	guanosintrifosfát	guanosine triphosphate
HBV	virus hepatitidy B	hepatitis B virus
HeLa	buněčná linie lidských epiteliálních buněk	Henrietta Lacks' s cells
HIV-1	virus lidské imunitní nedostatečnosti	human immunodeficiency virus
Hsc70	příbuzný protein rodiny proteinů teplotního šoku Hsp70	heat shock cognate 70
Hsp105	protein teplotního šoku 105	heat shock protein 105
Hsp40	protein teplotního šoku 40	heat shock protein 40
IAV	virus chřipky typu A	influenza A virus

imp α	importin α	importin α
imp β	importin β	importin β
IN	integráza HIV-1	HIV-1 integrase
IR	vnitřní kruh	inner ring
JCPyV	polyomavirus JC	JC polyomavirus
K	lysin	lysine
kDa	kilodaltony	kilodaltons
KHC	těžké řetězce kinesinu	kinesin heavy chains
KIF5C	izoforma 5C těžkého řetězce kinesinu	kinesin heavy chain isoform 5C
KLC	lehké řetězce kinesinu	kinesin light chains
KLC2	lehký řetězec 2 kinesinu	kinesin light chain 2
L	leucin	leucine
LT	velký T (tumorový) antigen	large T (tumor) antigen
Lys	lysin	lysine
M	methionin	methionine
MA	matrixový protein HIV-1	HIV-1 matrix protein
MDa	megadaltony	megadaltons
Mib1	E3 ubiquitin-protein ligáza	mind bomb 1
MLV	virus myší leukémie	murine leukemia virus
MPyV	myší polyomavirus	murine polyomavirus
mRNA	informační ribonukleová kyselina	messenger ribonucleic acid
např.	například	for example
NDC1	transmembránový protein jaderného póru	nuclear division cycle 1
NLS	jaderný lokalizační signál	nuclear localization signal
nm	nanometr	nanometer
NP	nukleoprotein	nucleoprotein
NPC	jaderný pór	nuclear pore complex
Nsp1	kvasinkový homolog nukleoporinu NUP62	nucleoskeletal-like 1
NTF2	jaderný transportní faktor	nuclear transport factor 2
NUP	nukleoporin	nucleoporin
NUPs	nukleoporiny	nucleoporins
Obr.	obrázek	figure
P	prolin	proline
PA	kyselá podjednotka RNA dependentní RNA polymerázy	polymerase acidic protein
PB1	bazická podjednotka 1 RNA dependentní RNA polymerázy	polymerase basic protein 1
PB2	bazická podjednotka 2 RNA dependentní RNA polymerázy	polymerase basic protein 2
Phe	fenylalanin	phenylalanine
PIC	pre-integrační komplex HIV-1	HIV-1 preintegration complex

Pom	transmembránový protein jaderného póru	pore membrane protein
pUL6	protein tvořící portálový komplex	portal complex protein
pUL25	protein tegumentu kódovaný genem UL25	tegument protein encoded by UL25 gene
pUL36 (= VP1/2)	protein tegumentu kódovaný genem UL36	tegument protein encoded by UL36 gene
Q	glutamin	glutamine
R	arginin	arginine
Rae1	exportní faktor pro ribonukleovou kyselinu	ribonucleic acid export 1
Ran	jaderný protein vázající guanosintrifosfát	guanosine triphosphate-binding nuclear protein
RanBP1	protein 1 vázající GTPázu Ran	Ran binding protein 1
RanBP2	protein 2 vázající GTPázu Ran	Ran binding protein 2
RanGAP1	protein katalyzující hydrolyzu GTP na GDP a anorganický fosfát	Ran GTPase activating protein 1
RanGDP	protein Ran s navázaným guanosindifosfátem	Ran protein bound to guanosine diphosphate
RanGEF	faktor měnící vazbu Ran na guanosindifosfát za vazbu Ran na guanosintrifosfát	Ran guanine nucleotide exchange factor
RanGTP	protein Ran s navázaným guanosintrifosfátem	Ran protein bound to guanosine triphosphate
rcDNA	kruhová dvouvláknová dsDNA s úseky ssDNA	relaxed circular partially double-stranded DNA
RNA	ribonukleová kyselina	ribonucleic acid
RNPs	ribonukleoproteinové částice	ribonucleoprotein particles
vRNPs	virové ribonukleoproteinové částice	viral ribonucleoprotein particles
RT	reverzní transkriptáza	reverse transcriptase
S	serin	serine
<i>S</i>	Svedbergova jednotka	Svedberg unit
Sec13	nukleoporin vázaný v Y-komplexu	nucleoporin bound in Y-complex
Seh1	nukleoporin vázaný v Y-komplexu	nucleoporin bound in Y-complex
shRNA	molekula RNA s vlásenkou využívaná pro snížení genové exprese v procesu RNA interference	short hairpin RNA
siRNA	dvouvláknová molekula RNA využívaná pro snížení genové exprese v procesu RNA interference	small interfering RNA
snRNA	malá jaderná ribonukleová kyselina	small nuclear ribonucleic acid
spol.	spolupracovníci	co-workers
SR	serin-arginin	serine-arginine
ssDNA	jednořetězcová deoxyribonukleová kyselina	single-stranded deoxyribonucleic acid
SVG	buněčná linie lidských zárodečných gliových buněk	human fetal glial cells

SV40	opičí polyomavirus 40	simian virus 40
<i>T</i>	triangulační číslo	triangular number
T	threonin	threonine
TAP	transportérový komplex spojený s úpravou antigenu	transporter associated with antigen processing
Tpr	hlavní nukleoporin jaderného koše	translocated promotor region (nucleoporin)
TPRs	opakované strukturní motivy fungující jako místa pro interakce protein-protein	tetratricopeptide repeats
TRN-SR2	transportin SR2	transportin SR2
UL19	gen kódující hlavní strukturní protein VP5	gene encoding major structural protein VP5
UL36	gen kódující protein tegumentu pUL36 (VP1/2)	gene encoding tegument protein pUL36 (VP1/2)
V	valin	valine
vDNA	virová deoxyribonukleová kyselina	viral deoxyribonucleic acid
VLPs	viru podobné částice	virus-like particles
VP1	hlavní strukturní protein	viral protein 1
VP2	minoritní strukturní protein	viral protein 2
VP3	minoritní strukturní protein	viral protein 3
VP5	hlavní strukturní protein	viral protein 5
Vpr	protein pre-integračního komplexu HIV-1	viral protein R
wt	divoký typ (vyskytující se v přírodě)	wild-type (common in nature)
wtVLPs	viru podobné částice složené z nemodifikovaných ani nemutovaných virových proteinů	wild-type virus-like particles
Y	tyrosin	tyrosine

1 Úvod

O virech nelze jednoznačně říct, zda se jedná o živé či neživé organismy. Pokud bychom se podívali na definici živých soustav, našli bychom zde zcela zásadní vlastnost, která je jedním ze základních znaků definujících živý organismus, ale kterou viry samy o sobě schopné vykonávat nejsou, a tou je reprodukce. Tato vlastnost je striktně závislá na hostitelské buňce, viry nejsou bez hostitelské buňky schopné se samy replikovat. Jedná se tedy o výhradně intracelulární parazity, pro jejichž životaschopnost je nezbytné proniknout do hostitelské buňky. Nicméně, při tomto kroku musejí viry překonat několik bariér, které jim buňka vytváří.

První z těchto bariér je plazmatická membrána. Pro většinu RNA virů je to jejich jediná překážka při jejich cestě do hostitelské buňky, neboť se replikují hlavně v její cytoplazmě. Výjimku však tvoří čeledi *Retroviridae* a *Orthomyxoviridae*, které musejí kromě plazmatické membrány překonat i další z bariér, a to dvouvrstvou jadernou membránu, neboť pro jejich replikaci jsou potřeba hostitelské enzymy nebo jiné molekuly nacházející se v buněčném jádře. To samé platí i pro DNA viry, které též musejí při svém infekčním cyklu proniknout až do buněčného jádra, aby se úspěšně zreplikovaly (shrnuto ve Whittaker et al., 2000). Výjimku mezi DNA viry tvoří viry čeledi *Poxviridae* (Schramm and Locker, 2005) a čeledí dalších gigantických virů (García-Beato et al., 1992; Goorha, 1982), které vybočují tím, že jejich replikace probíhá úplně, nebo z větší části v cytoplazmě hostitelské buňky.

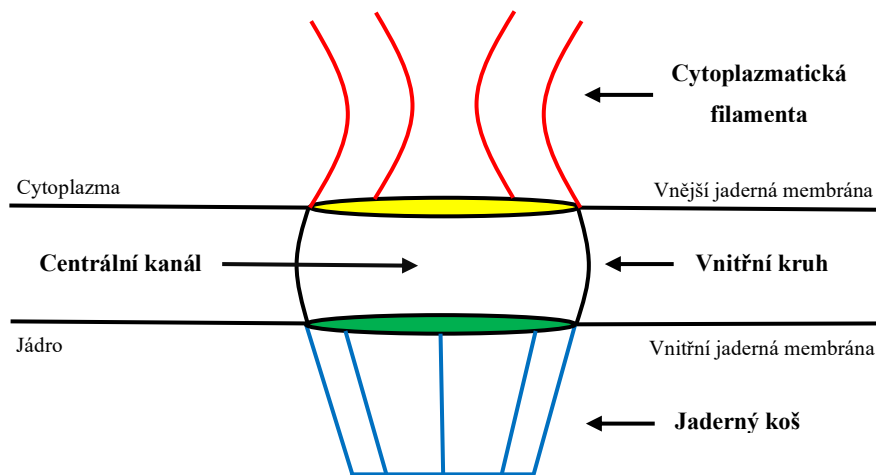
Dvouvrstevná jaderná membrána je tedy další z bariér, kterou viry, replikující se v buněčném jádře, musejí překonat. Způsobů, jakými viry překonání jaderné membrány docílí, je více. Jednou z možností je, že počkají, až buňka vejde do mitotické fáze buněčného cyklu, kdy dochází k rozpadu jaderné membrány a cesta do buněčného jádra je tak volná. Tento způsob dopravy virového genomu do buněčného jádra je typický například pro čeleď *Papillomaviridae* (Aydin et al., 2014). Další způsob překonání jaderné membrány je využíván čeledí DNA virů *Parvoviridae*, jejíž zástupci do buněčného jádra vstupují patrně skrze malá narušení v jaderné membráně, která sami navozují (Cohen et al., 2011). Nicméně ostatní viry si vyvinuly způsob, jak se do jádra hostitelské buňky dostat i v případě, kdy je buňka v tzv. interfázi buněčného cyklu, tedy kdy je jádro chráněno dvouvrstevnou jadernou membránou a která není nijak narušena. V tomto případě si viry vyvinuly strategii, při které k translokaci do buněčného jádra využívají struktury zabudované do jaderné membrány, známé jako jaderné póry. Funkcí těchto pórů je běžně zajišťovat nukleocytoplazmatický transport. Viry je nicméně dokáží využít i ve svůj prospěch a jejich prostřednictvím dopravují virový genom do jádra hostitelské buňky (Mettenleiter, 2016).

Cílem této práce je:

- Představit jaderný pór, jeho strukturu a funkci jednotlivých nukleoporinů, a to zvláště nukleoporinů bohatých na fenylalanin-glycin repeticce, které se účastní jaderného transportu.
- Dále popsat základní mechanismus jaderného importu molekul a představit translokační strategie u vybraných čeledí DNA a RNA virů využívajících jádro hostitelské buňky jako místo pro replikaci svého virového genomu.

2 Jaderný pór

Stejně jako v cytoplazmatické membráně a dalších membránách vnitrobuněčných organel, ve kterých se nacházejí různé molekulové přenašeče, kanály či pumpy, se i v jaderné membráně nacházejí struktury pro přenos molekul. Tyto struktury v jaderné membráně nazýváme jaderné póry. Jaderný pór (NPC; nuclear pore complex) je buněčná makromolekulární struktura zabudovaná do dvouvrstevné jaderné membrány a vytvářející v jaderné membráně kanál, kterým probíhá obousměrná výměna molekul mezi jádrem a cytoplazmou, nezbytná pro buněčné procesy. V následujících podkapitolách bude popsána zejména struktura jaderného póru u člověka a známé funkce jeho jednotlivých komponent (nukleoporinů), následované stručným popsáním translokačního procesu do buněčného jádra.

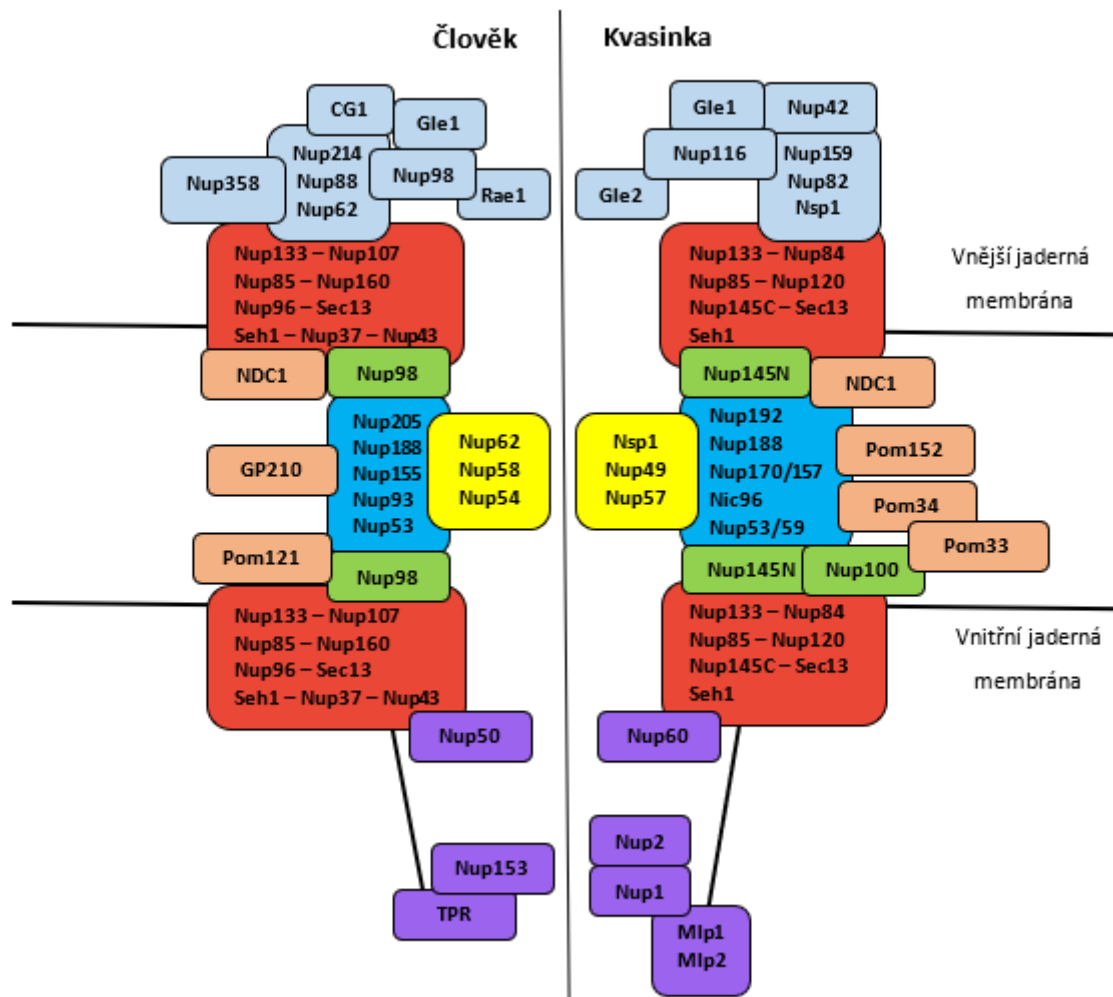


Obrázek 1. Struktura jaderného póru (NPC). Jaderný pór je v základu tvořen z cytoplazmatického (žlutě), vnitřního a jaderného kruhu (zeleně). Dalšími částmi NPC jsou pak cytoplazmatická filamenta a jaderný „koš“ (inspirováno Beck and Hurt, 2017).

2.1 Struktura jaderného póru

Jaderný pór je utvářen z proteinů zvaných nukleoporiny. Jedná se o zhruba 30 různých proteinů (Cronshaw et al., 2002), jejichž několikanásobné kopie formují strukturu NPC, která je oktagonálního tvaru (Gall, 1967) a jejíž celková hmotnost činí přibližně 120 až 125 MDa (megadaltons) (Reichelt et al., 1990). Pokud bychom jaderný pór rozdělili na jednotlivé části (Obr. 1), jednalo by se o cytoplazmatický a jaderný kruh, z nichž každý je zabudován do jedné z vrstev jaderné membrány. Mimo cytoplazmatického a jaderného kruhu se uvádí ještě i třetí,

vnitřní kruh, který leží mezi jaderným a cytoplazmatickým kruhem. Přídavnými částmi NPC jsou pak cytoplazmatická filamenta a tzv. jaderný „koš“ (shrnutí v Beck and Hurt, 2017).



Obrázek 2. Rozložení nukleoporinů v jaderném póru člověka a jejich homologů v jaderném póru kvasinek. Fialově jsou vyznačeny nukleoporiny jaderného koše, červeně je vyobrazen Y-komplex, oranžově transmembránové nukleoporiny, žlutě komplex NUP62 (respektive Nsp1 u kvasinek), modře IR-komplex, zeleně nukleoporin NUP98 (respektive NUP145N a NUP100 u kvasinek) a šedě cytoplazmatické nukleoporiny (inspirováno Beck and Hurt, 2017).

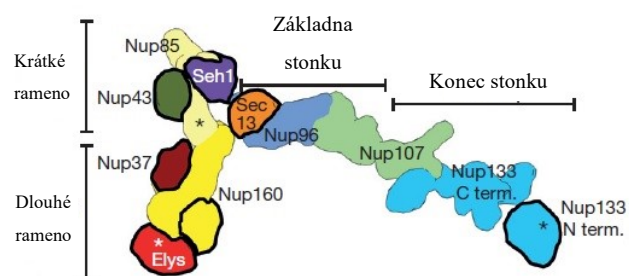
2.1.1 Nukleoporiny (NUPs)

Nukleoporiny (NUPs; nucleoporins) lze obecně rozdělit na tzv. „scaffold“ neboli strukturní NUPs, které vytvářejí pevnou strukturu jaderného póru, a „FG“ NUPs (shrnutí v Beck and Hurt, 2017), jež mají svůj název odvozený od repetitivních sekvencí fenylalanin-glycin (FG), které jsou ve velkém množství přítomné v jejich sekvenci (Wente et al., 1992), a které vytvářejí selektivní bariéru pro transport molekul jaderným pórem (Ribbeck and Görlich, 2002). Velká část nukleoporinů se ve struktuře jaderného póru vyskytuje nejčastěji ve 32 kopiích. Nicméně jsou i výjimky, kdy jsou nukleoporiny přítomny ve více, či naopak méně kopiích. Příkladem

může být 48 kopií nukleoporinů NUP155 a NUP93, nebo na druhou stranu pouze 16 kopií nukleoporinu NUP188 (Lin et al., 2016) či 8 kopií nukleoporinů NUP42 a Gle1 (shrnutu v Lin and Hoelz, 2019). Nukleoporiny se pak ve většině případů uspořádávají do forem subkomplexů. Známé jsou subkomplexy NUP107 (Loiodice et al., 2004), NUP214 (Bernad et al., 2004), NUP62 (Guan et al., 1995), NUP93 (Grandi et al., 1997) a NDC1 (Onischenko et al., 2009). Jejich jednotlivé funkce a funkce dalších nukleoporinů budou probrány v dalších podkapitolách. Pravděpodobný model uspořádání jednotlivých nukleoporinů a subkomplexů v jaderném póru člověka, v porovnání s uspořádáním v jaderném póru kvasinek, je znázorněn na Obr. 2.

2.1.1.1 Strukturální nukleoporiny (scaffold NUPs)

Jak už z názvu vyplývá, funkcí strukturálních nukleoporinů je podílet se na základním sestavení a vytvoření komplexní struktury jaderného póru. Tento proces zajišťují dva dílčí komplexy, a to tzv. Y-komplex (neboli také NUP107 komplex) (Bui et al., 2013) a komplex tvořený nukleoporiny vnitřního kruhu (IR; inner ring complex) (Kosinski et al., 2016). Y-komplex (Obr. 2 a 3) je tvořený nukleoporiny NUP107, NUP160, NUP96, NUP133, NUP85, Sec13, Seh1, NUP43, NUP37 a ELYS, z nichž poslední tři jmenované nejsou přítomné v Y-komplexu kvasinek (Bui et al., 2013). IR-komplex (Obr. 2 a 4) je utvářen z nukleoporinů NUP205, NUP188, NUP155, NUP93 a NUP53 (Kosinski et al., 2016), přičemž se k tomuto komplexu řadí také i subkomplex NUP62, který sice formálně spadá do skupiny FG NUPs, nicméně je ale k IR-komplexu připojený interakcí s N-koncovou doménou nukleoporinu NUP93 (Sachdev et al., 2012).

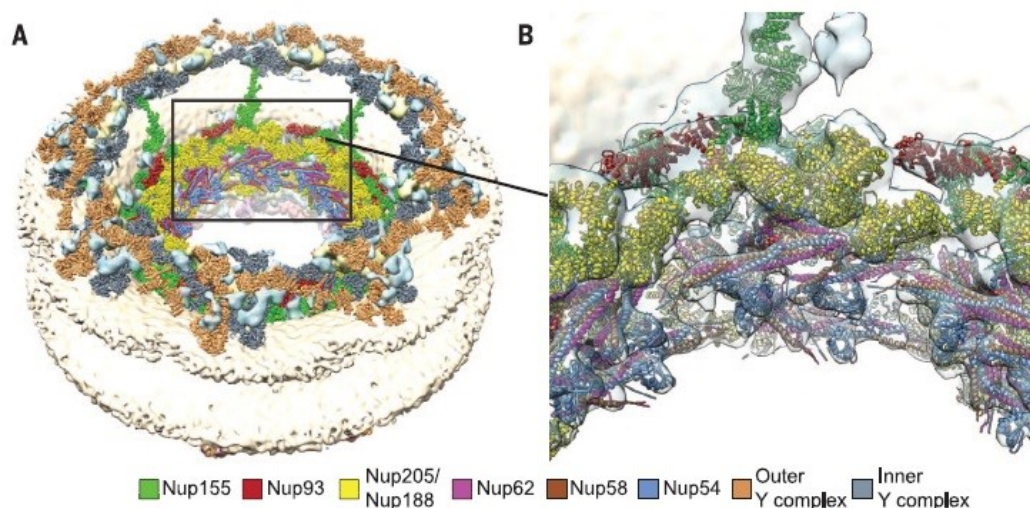


Obrázek 3. Struktura Y-komplexu. Y-komplexu je tvořen nukleoporiny NUP107, NUP160, NUP133, NUP96, Sec13, Seh1, NUP85, NUP43, NUP37 a ELYS (upraveno podle von Appen et al., 2015).

Pro vytvoření funkční struktury jaderného póru je důležitá interakce jednotlivých nukleoporinů těchto dvou komplexů s transmembránovými nukleoporiny Pom121 (Mitchell et al., 2010) a NDC1 (Mansfeld et al., 2006). Pom121 stabilizuje Y- a IR-komplex interakcí jeho N-koncové domény s nukleoporiny NUP155 a NUP160, přičemž je neváže oba najednou, ale

pravděpodobně se s nimi vyskytuje ve dvou vazebných interakcích – NUP155-Pom121 a NUP160-Pom121. Oba nukleoporiny totiž rozeznávají na Pom121 stejné vazebné místo. Nicméně se ukázalo, že NUP155 dále interaguje i s nukleoporinem NDC1 (Mitchell et al., 2010). K této vazbě s NDC1 je nukleoporin NUP155 přiveden zřejmě přes interakci s nukleoporinem NUP53, který se svým C-koncem váže přímo k NDC1 a zároveň interaguje i s NUP155 (Eisenhardt et al., 2014). Tuto vazbu mezi nukleoporiny NUP155 a NUP53 doplňuje nukleoporin NUP93, který svojí C-koncovou doménou interaguje s nukleoporinem NUP53 (Sachdev et al., 2012). K nukleoporinu NUP93 se pak dále pojí nukleoporiny NUP205 a NUP188, zbývající členové IR-komplexu (Miller et al., 2000), které dohromady ještě s NUP155 interagují s FG nukleoporinem NUP98 (Fischer et al., 2015).

Přítomnost Pom121, NUP155, NUP53 a Y-komplexu je esenciální pro úspěšné vytvoření NPC a jaderné membrány. Antonin a kolektiv na základě výsledků postulovali hypotézu, že během sestavování jaderné membrány existuje jistý kontrolní bod řízený Y-komplexem, který v případě, že není přítomen Pom121 či NUP155, tuto situaci zaznamená a sestavování jaderné membrány, a tedy i NPC, se zastaví (Antonin et al., 2005). Stejně tak pokud dojde k mutaci NUP53, která zabrání vazbě s NUP155, se i v tomto případě sestavování jaderného póru zastaví (Eisenhardt et al., 2014), neboť NUP155 se zdá být hlavním prostředníkem, který ukotvuje IR- komplex interakcí s Pom121 a NDC1 v jaderné membráně (Mitchell et al., 2010). Nejprve je ale potřeba právě vazba NUP155 s NUP53, který jej k těmto interakcím navede (Eisenhardt et al., 2014).



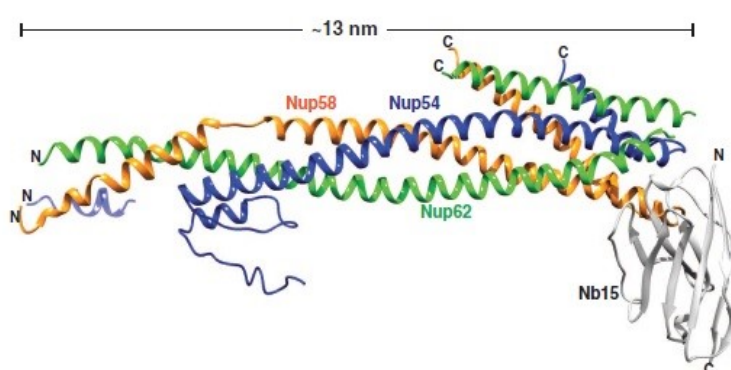
Obrázek 4. Modelové vyobrazení struktury jaderného póru. (A) Pohled na cytoplazmatický kruh jaderného póru shora, kde lze vidět vnější (outer) i vnitřní (inner) Y-komplex a IR-komplex, který obklopuje centrální kanál jaderného póru. (B) Detail vnitřního kruhu s IR-komplexem, který je tvořen nukleoporiny NUP205, NUP188, NUP155, NUP93 a NUP53 (NUP53 není na obr. uveden) (Kosinski et al., 2016).

Y-komplex je pak k sestavování NPC přiveden prostřednictvím nukleoporinu NUP153 (Vollmer et al., 2015). Jeho hlavní význam, mimo funkce jako kontrolního bodu, spočívá v tom, že jeho 32 kopií vytváří oba dva krajní kruhy jaderného póru – cytoplazmatický a jaderný kruh (Bui et al., 2013). V každém z těchto kruhů najdeme, vzhledem k oktogonální symetrii jaderného póru (Gall, 1967), 8 dimerů Y-komplexu, kdy monomery Y-komplexu nacházející se blíže středu jaderného póru utváří vnitřní Y-komplex a monomery směřující ven od středu póru tvoří vnější Y-komplex (Obr. 4). Přes Y-komplex se ke struktuře jaderného póru připojuje subkomplex NUP214, a to interakcí mezi nukleoporiny NUP88 a NUP107 (Bui et al., 2013).

2.1.1.2 Nukleoporiny obsahující FG repetice (FG NUPs)

Funkcí těchto nukleoporinů není, narozdíl od strukturních nukleoporinů, se tak vysokou měrou podílet na struktuře jaderného póru, ale naopak zajišťovat především regulovaný a selektivní průchod molekul jaderným pórem (Ribbeck and Görlich, 2002) a interagovat s transportními receptory (A. Radu et al., 1995). Tuto vlastnost udílejí těmto nukleoporinům jejich přirozeně neuspořádané domény bohaté na repetice fenylalanin-glycin (FG) (Denning et al., 2003) tvořící právě onu selektivní bariéru. Mechanismus tvorby této bariéry spočívá v hydrofobních interakcích mezi jednotlivými FG repeticemi (Ribbeck and Görlich, 2002), které vytvářejí jakousi síťovinu podobnou hydrogelu (Frey et al., 2006), přes kterou je znemožněn pasivní průchod molekul větších než 5 nm v průměru (Bonner, 1975). Transportní receptory však jsou schopné díky přímým interakcím s FG repeticemi (motivy) skrz tuto bariéru proniknout (Ribbeck and Görlich, 2002). Jak již dříve také prokázali Lim se svými spolupracovníky, vazba transportního receptoru importinu $\beta 1$ na FG repetice nukleoporinu NUP153 způsobí jejich krátkodobý reverzibilní kolaps a zaujmutí kompaktnější konformace, na rozdíl od neuspořádané síťoviny, která zabraňuje pasivnímu průniku větších molekul jaderným pórem (Lim et al., 2007). Raveh a kolektiv přišli před pár lety s dalším rozšířením znalostí těchto interakcí. Navrhli tzv. „slide and exchange“ model, který je založen na skutečnosti, že jednotlivé FG motivy při interakci s transportními receptory oscilují mezi dvěma základními stavy, a to silně interagujícím a slabě interagujícím stavem. Tyto jednotlivé FG motivy pak specificky interagují s transportními receptory na několika vazebných místech, a to tak, že střídáním silně a slabě interagujících stavů do těchto vazebných míst vstupují a zase naopak vystupují. Jeden FG motiv pak může tedy vytěsnit druhý FG motiv, který se zrovna nachází ve slabě interagujícím stavu s transportním receptorem a ten se tedy pravděpodobně tímto způsobem může rychle pohybovat i s nákladem centrálním kanálem jaderného póru až do nukleoplazmy (Raveh et al., 2016).

Mezi FG NUPs, které se na této selektivitě jaderného póru a interakci s transportními receptory podílejí, se řadí komplex NUP62 a dále pak nukleoporiny NUP98, NUP214, NUP358 a již zmíněný NUP153. Komplex NUP62 je složen ze tří nukleoporinů – NUP62, NUP58 a NUP54, které spolu interagují doménou „coiled-coil“ a tvoří tak heterotrimer (Obr. 5). Ten se nachází ve vnitřním kruhu jaderného póru (Obr. 2) (Guan et al., 1995), kde se prostřednictvím nukleoporinu NUP93 připojuje k IR-komplexu (Chug et al., 2015). Ve vnitřním kruhu jaderného póru je komplex NUP62 esenciální pro jaderný transport (Finlay et al., 1991), a tedy i pro interakci s transportními receptory (Paschal and Gerace, 1995) prostřednictvím FG repetice (Chug et al., 2015).



Obrázek 5. Schéma heterotrimeru komplexu NUP62, jehož jednotlivé nukleoporiny jsou mezi sebou provázány „coiled-coil“ doménami. Nukleoporin NUP62 je vyobrazen zeleně, NUP54 modře a NUP58 oranžově (Chug et al., 2015).

Nukleoporin NUP98 obklopuje jak z jaderné, tak i z cytoplazmatické strany vnitřní kruh jaderného póru (Obr. 2) (Krull et al., 2004). K cytoplazmatické straně jaderného póru je připojen svojí C-koncovou doménou, a to interakcí s cytoplazmatickým nukleoporinem NUP88, který je jednou z komponent komplexu NUP214 (Griffis et al., 2003). Do nitra jaderného póru a do buněčného jádra zasahuje NUP98 svojí N-koncovou doménou (Ren et al., 2010) obsahující repetice GLFG (glycin-leucin-fenylalanin-glycin) (Radu et al., 1995). Díky tomuto uspořádání je schopen migrovat jak mezi jádrem a jaderným pórem, tak i mezi jádrem a cytoplazmou (Griffis et al., 2002). Jeho role je zejména v exportu RNA do cytoplazmy, kdy NUP98 interaguje s exportním faktorem Rae1 (ribonucleic acid export 1) (Ren et al., 2010) a s RNA vazebným proteinem TAP (transporter associated with antigen processing) (Blevins et al., 2003). Nicméně se NUP98 podílí dále také na jaderném importu (Radu et al., 1995) a na regulaci propustnosti bariéry jaderného póru. NPC bez přítomnosti NUP98 není schopen zformovat dostatečně účinnou bariéru, která by regulovala pasivní vtok molekul (Hülsmann et al., 2012).

Nukleoporin NUP214 se nachází na cytoplazmatické straně jaderného póru (Obr. 2) (Kraemer et al., 1994), kde interakcí přes „coiled-coil“ domény vytváří komplex spolu s dalším cytoplazmatickým nukleoporinem NUP88 (Fornerod et al., 1997). Tento komplex je významný

zejména pro export mRNA, ale také i proteinů, které se z buněčného jádra dostávají do cytoplazmy prostřednictvím exportního proteinu CRM1 (chromosomal maintenance 1) (Hutten and Kehlenbach, 2006), který interaguje s FG repeticemi nacházejícími se na C-koncové doméně nukleoporinu NUP214 (Fornerod et al., 1997). NUP214 následně vytváří komplex spolu s RanGTP, CRM1 a exportovaným nákladem a slouží tak jako jedno z finálních míst pro vazbu exportovaných molekul před jejich uvolněním do cytoplazmy (Hutten and Kehlenbach, 2006). Bernad a spolupracovníci ve své studii ukázali mimo jiné i na roli NUP214 a CRM1 i v exportu velké (60 S) ribozomální podjednotky (Bernad et al., 2006).

NUP358 známý také jako RanBP2 (Ran binding protein 2), se nachází stejně jako nukleoporin NUP214 na cytoplazmatické straně jaderného póru (Obr. 2), a právě přes komplex NUP214/88 je i připojen k NPC (Bernad et al., 2004). RanBP2 se uplatňuje jak v jaderném importu (Wälde et al., 2012), tak i v jaderném exportu molekul do cytoplazmy přes exportní protein CRM1 (Bernad et al., 2004), tedy podobně jako u nukleoporinu NUP214. Ale na rozdíl od NUP214, který exportovaný komplex vazbou stabilizuje (Hutten and Kehlenbach, 2006), je funkcí RanBP2 v této CRM1 exportní dráze naopak rozložení exportovaného komplexu (Ritterhoff et al., 2016). Pro rozložení exportovaného komplexu tvořeného proteiny CRM1, RanGTP a exportovaným nákladem (Hutten and Kehlenbach, 2006), byly popsány dvě možné cesty. První je spolupráce dvou proteinů, a to RanGAP1 (Ran GTPase activating protein 1) a RanBP1 (Ran binding protein 1) (Askjaer et al., 1999), které zajistí hydrolyzu RanGTP na RanGDP a anorganický fosfát vedoucí k rozložení exportovaného komplexu. Druhou možností je pak využití právě nukleoporinu NUP358 (RanBP2), který obsahuje vazebnou doménu podobnou RanBP1 (Kehlenbach et al., 1999), přes kterou může interagovat s RanGAP1. Na řadu zde přicházejí i FG repetice nukleoporinu RanBP2, které mimo jiné vykazují vysokou afinitu pro interakci s proteinem CRM1, ale především se mezi těmito repeticemi nachází sekvence asi 300 aminokyselin, která v sobě obsahuje vazebné místo pro zmíněný RanGAP1. Ten se tímto pravděpodobně může dostat do blízkosti proteinu RanGTP, vázaného v komplexu s CRM1 a exportovaným nákladem, a katalyzovat tedy jeho hydrolyzu na RanGDP a anorganický fosfát (Ritterhoff et al., 2016). Tato změna stejně jako v případě spolupráce RanGAP1 s RanBP1 (Askjaer et al., 1999) vede k rozložení exportovaného komplexu (Ritterhoff et al., 2016). Uvolněný protein CRM1 zůstává navázán na RanBP2 a je navrácen zpět do buněčného jádra (Bernad et al., 2004).

Podobný mechanismus je používán i při recyklaci importinu β , který se v komplexu přes RanGTP zachytí na nukleoporinu RanBP2. Za pomoci RanGAP1, navázaného na RanBP2, dojde opět k hydrolyze RanGTP a importin β zůstane navázán na RanBP2, kde může

interagovat s přicházejícím komplexem tvořeným importinem α a transportovaným nákladem, a zajistit tak jeho translokaci do buněčného jádra (Hutten et al., 2008).

Posledním z těchto FG NUPs je nukleoporin NUP153. Ten se nachází na jaderné straně jaderného póru (Obr. 2) a slouží jako připojovací element pro vazbu nukleoporinu Tpr, který je hlavní komponentou jaderného „koše“ (Krull et al., 2004). Zatímco N-koncová doména NUP153 se podle všeho nachází pouze v jaderném kruhu a slouží pro připojení NUP153 ke struktuře NPC (Bastos et al., 1996), tak C-koncová doména má tu schopnost, že se může vyskytovat i v oblasti kruhu cytoplazmatického (Fahrenkrog et al., 2002). To umožňuje nukleoporinu NUP153 přes tuto doménu interagovat s transportními receptory, konkrétně například s importinem α , který je ve společném komplexu s importinem β a transportovaným nákladem (Ogawa et al., 2012). Zároveň na svém N-konci NUP153 interaguje s nukleoporinem NUP50, který se prostřednictvím této vazby dostane do blízkosti importinu α a spolu s dalšími faktory, jako je např. GTPáza Ran, způsobí uvolnění transportovaného nákladu do nukleoplazmy (Makise et al., 2012).

Přes NUP153 probíhá i recyklace GTPázy Ran. Potom, co dojde na nukleoporinu NUP358 k disociaci RanGTP na RanGDP a anorganický fosfát (Hutten et al., 2008), se RanGDP vrací zpět do jádra buňky, kde se váže na motivy zinkových prstů nacházejících se na NUP153. Zde pod vlivem RanGEF (Ran guanine nucleotide exchange factor) dojde k výměně GDP (guanosine diphosphate) za GTP (guanosine triphosphate) a vzniká opět RanGTP. Ten se poté, jak bylo výše zmíněno, podílí vazbou na importin β na rozložení transportovaného komplexu (Schrader et al., 2008).

Nicméně nukleoporin NUP153 nefiguruje pouze v jaderném importu. Kromě této funkce je jeho přítomnost důležitá i pro export proteinů a různých typů RNA, jakou jsou například snRNA, 5S RNA (Ullman et al., 1999) či mRNA. Pro interakci mRNA s NUP153 jsou nejspíše důležité FG repetice obsažené na C-konci tohoto nukleoporinu (Bastos et al., 1996).

2.2 Princip transportu molekul do buněčného jádra

Jak bylo naznačeno výše, transport molekul mezi jádrem a cytoplazmou může probíhat zásadně dvěma způsoby, buďto pasivní anebo aktivní cestou. Pasivní cestou je v podstatě prostá difuze dostatečně malých molekul jaderným pórem, kdežto aktivní cesta vyžaduje spolupráci s transportními receptory (karyopheriny), které přes jaderný pór dokážou translokovat molekuly, jejichž velikost přesahuje limit pro pasivní tok pórem.

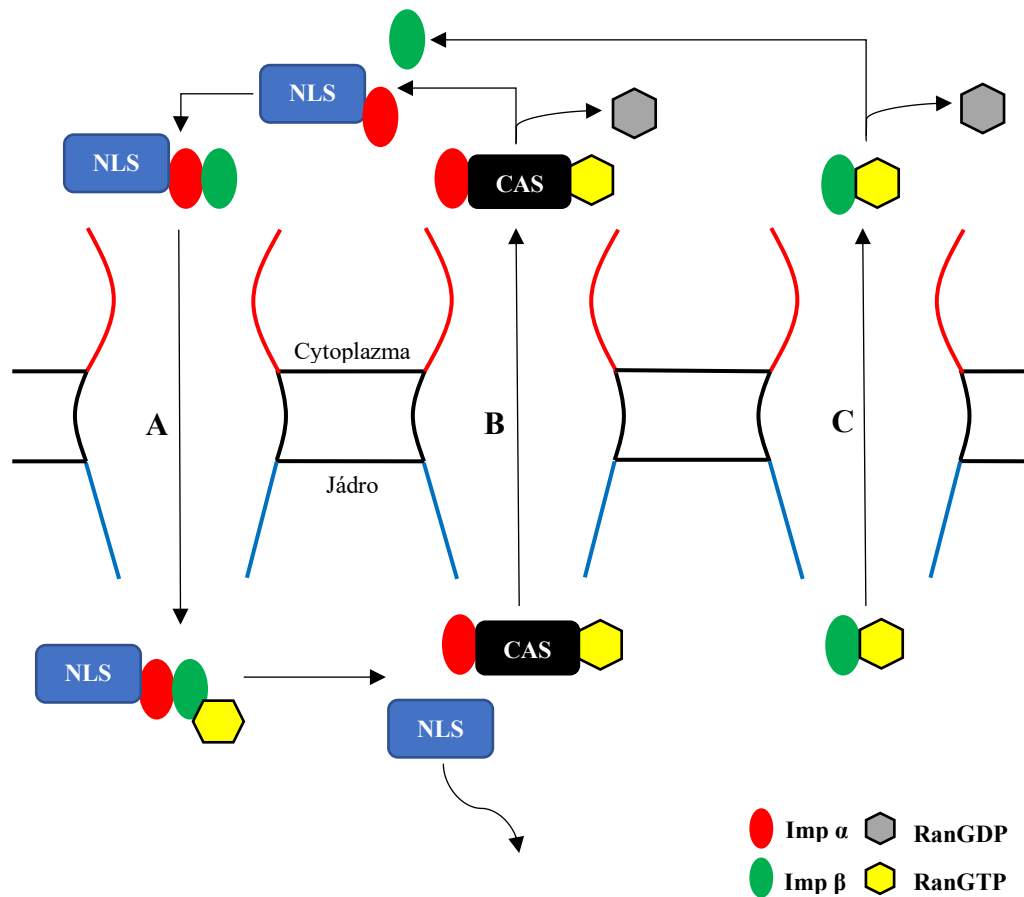
Pasivní cestou, tedy difuzí, mohou do buněčného jádra projít pouze ty molekuly, jejichž velikost je menší, než přibližně 40 kDa (kilodaltons) (Bonner, 1975). Ostatní molekuly,

přesahující tento limit, prostupují přes jaderný pór podstatně hůře a musejí využít spolupráce s transportními receptory, které mají schopnost přes selektivní bariéru jaderného póru proniknout (Ribbeck and Görlich, 2002). Karyopherinů, účastnících se importu molekul do buněčného jádra, byla popsána celá řada. Kromě importinů α/β jsou to dále např. importin-4, importin-5, importin-7, importin-8, importin-9, importin-11, importin-13, importin β 2, transportin SR2 či exportin-4 (shrnutí v Kim et al., 2017).

Molekuly, jež jsou určeny pro transport do buněčného jádra, jsou rozpoznávány transportními receptory prostřednictvím jejich jaderného lokalizačního signálu (NLS; nuclear localization signal). Ten bývá nejčastěji rozeznáván importinem α (Moroianu et al., 1995). Nicméně jsou i výjimky, kdy rozpoznání NLS může proběhnout i nezávisle na importinu α , a to přes importin β (Cingolani et al., 2002). Sekvence NLS, která je rozeznávána importinem α , je obvykle tvořena bazickými aminokyselinami, lysinem a argininem. Typickým příkladem je například NLS viru SV40 (Simian Virus 40), jehož sekvence je tvořena aminokyselinami KKKRKKV (K = lysin, R = arginin, V = valin) (Elena Conti, 1998).

Importin α , který rozpozná na molekule určené k transportu aminokyseliny NLS a naváže se k nim, interaguje dále s importinem β a vytváří tak spolu dohromady transportní komplex (Moroianu et al., 1995). Vytvořený transportní komplex je poté naveden k jadernému póru, kterým je prostřednictvím interakcí s FG NUPs translokován do nukleoplazmy (A. Radu et al., 1995). V nukleoplazmě je následně vlivem GTPázy Ran, která se váže na importin β , transportovaný komplex rozložen (Rexach and Blobel, 1995), importovaná molekula je uvolněna (Obr. 6) a importin β je prostřednictvím RanGTP transportován zpět do cytoplazmy. Jsou následně dvě možnosti, jak pravděpodobně dochází k recyklaci importinu β . V té první se komplex RanGTP-imp β váže na nukleoporin NUP358, kde prostřednictvím s ním spojeného RanGAP1 dojde k hydrolýze RanGTP na RanGDP a anorganický fosfát a k uvolnění importinu β , který zůstane navázán na NUP358 a může se účastnit dalších transportních cyklů. Druhá možnost je, že dojde k situaci, kdy jsou všechna vazebná místa pro Ran na nukleoporinu NUP358 obsazena, komplex RanGTP-imp β translokuje až do cytoplazmy, kde je prostřednictvím RanGAP1 a RanBP1 importin β uvolněn a připraven znovu vytvářet transportní komplex (Obr. 6) (Hutten et al., 2008). Recyklace importinu α vyžaduje kromě RanGTP také jeden z exportních faktorů, a to protein CAS (cellular apoptosis susceptibility protein). Následně stejným způsobem, jako v případě importinu β , dojde za účasti RanBP1 a RanGAP1 k hydrolýze RanGTP a k uvolnění importinu α do cytoplazmy (Obr. 6) (Kutay et al., 1997). RanGDP se po hydrolýze RanGTP vrací pomocí NTF2 (nuclear transport factor 2)

zpět do nukleoplazmy (Ribbeck et al., 1998), váže se na NUP153 a prostřednictvím RanGEF faktoru dojde k nahrazení GDP za GTP a k obnově RanGTP (Schrader et al., 2008).



Obrázek 6. Schéma průběhu jaderného importu. (A) Komplex NLS-imp α -imp β je translokován do nukleoplazmy, kde se na importin β váže RanGTP a dochází k rozložení transportního komplexu. (B) Recyklace importinu α probíhá ve spolupráci s proteinem CAS a RanGTP. V cytoplazmě pak za účasti RanBP1 a RanGAP1 dochází k hydrolýze RanGTP a k uvolnění importinu α , který opět váže NLS molekuly určené k transportu. (C) Recyklace importinu β probíhá pouze za účasti RanGTP. V cytoplazmě dochází opět k hydrolýze RanGTP a k uvolnění importinu β , který se váže ke komplexu NLS-imp α (inspirováno Oka and Yoneda, 2018).

3 Translokační strategie přes jaderný pór u vybraných skupin virů

V této kapitole budou představeny vybrané skupiny obalených i neobalených DNA a RNA virů, pro něž je typické, že se zcela, nebo částečně, replikují v buněčném jádře hostitelské buňky a musí tedy proniknout nejen první bariérou, kterou představuje cytoplazmatická membrána, ale kritický je pak průnik přes druhou bariéru, dvouvrstevnou jadernou membránu. Níže budou popsány translokační strategie u vybraných skupin virů z cytoplazmy přes jaderný pór, až do buněčného jádra hostitelské buňky.

3.1 DNA viry

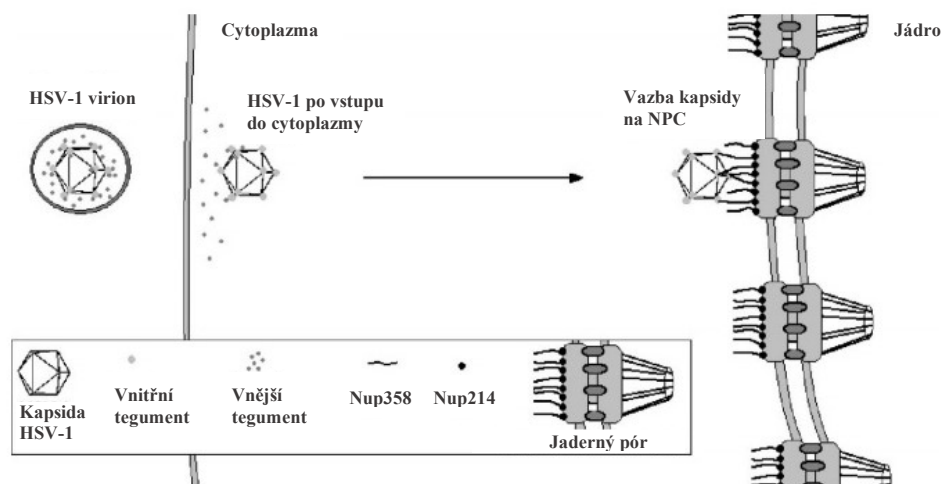
3.1.1 *Herpesviridae*

Herpesviridae je čeleď obalených virů jejichž genomem je lineární dvouvláknová DNA (dsDNA; double-stranded DNA). Kapsida s ikosahedrální symetrií má triangulační číslo (T) = 16 a je tvořena hlavním strukturním proteinem VP5 (viral protein 5), produktem genu UL 19 (Spear and Roizman, 1972). Kapsidu tvoří konkrétně 162 kapsomer proteinu VP5 – 150 hexonů, jejichž funkcí je vytvářet stěny kapsidy, a 12 pentonů, které se vyskytují ve vrcholech kapsidy (shrnuto v Brown and Newcomb, 2011). Jak hexony, tak i pentony jedenácti vrcholů jsou tvořeny proteinem VP5. V jednom z vrcholů kapsidy je však penton tvořen jiným proteinem než zbývajících jedenáct - tzv. portálovým komplexem (portálem), tvořeným proteinem pUL6, který má funkci zejména při balení virové dsDNA do kapsidy, ale i při jejím opouštění (Newcomb et al., 2001). Mezi kapsidou a vnějším lipidickým obalem obsahujícím virové, většinou glykosylované proteiny, se nachází vrstva tegumentu (Grünwald et al., 2003). Ten obsahuje přibližně 23 virových proteinů potřebných pro infekční cyklus viru (Loret et al., 2008). Po průniku viru do buňky je velká část tegumentu uvolněna do cytoplazmy (Granzow et al., 2005). Kapsida herpesviru je spolu se zbývajících proteiny tegumentu transportována prostřednictvím vazby na molekulární motor dynein po mikrotubulu k buněčnému jádru (Sodeik et al., 1997).

Některé proteiny tegumentu jsou důležité pro interakci s jaderným pórem a k uvolnění virové DNA z kapsidy. Ojala a spolupracovníci pozorovali při jejich odstranění sníženou schopnost kapsidy HSV-1 (Herpes Simplex Virus 1) vázat se k NPC (Ojala et al., 2000). Hlavní roli při tomto procesu hraje především protein VP1/2 (pUL36) kódovaný genem UL36 (Copeland et al., 2009) a pUL25, který interaguje s C-koncovou doménou nukleoporinu NUP214. Snížení hladiny mRNA pro tento nukleoporin pomocí RNA interference mělo za následek defekt ve vstupu herpesvirové DNA do buněčného jádra (Pasdeloup et al., 2009).

Stejný efekt však měla i RNA interference namířená proti nukleoporinu NUP358, z čehož vyplývá, že oba nukleoporiny jsou podstatně důležité pro zakotvení kapsidy herpesviru v NPC. Použití protilátek proti proteinu VP1/2 vedlo rovněž ke snížení schopnosti vazby kapsidy k jadernému póru (Copeland et al., 2009), což potvrzuje i jeho funkci zprostředkovatele interakce mezi kapsidou herpesviru a jaderným pórem. Navíc Abaitua a O'Hare identifikovali na N-koncové doméně proteinu VP1/2 sekvenci, která nese jaderný lokalizační signál (Abaitua and O'Hare, 2008). Jak již dříve ve své studii prokázali Ojala a kolektiv, zakotvení kapsidy herpesviru v NPC se odehrává prostřednictvím importinu β (Ojala et al., 2000). NLS by mohl být importinem β rozeznán a kapsida herpesviru by tak mohla být dopravena k jadernému póru a interagovat s nukleoporinem NUP358 (Copeland et al., 2009). Nicméně, role VP1/2 (Jovasevic et al., 2008) a stejně tak i role proteinu pUL25 (Preston et al., 2008) jsou podstatné i při následném uvolnění virové DNA z kapsidy do buněčného jádra.

Pro protein pUL25 bylo prokázáno, že interaguje s proteinem pUL6, který vytváří portál (Pasdeloup et al., 2009), a také s C-koncovou doménou proteinu VP1/2 (Coller et al., 2007). Oba tyto pUL25-vazebné virové proteiny jsou pak spolu s pUL25 zahrnuty do procesu uvolnění virové DNA z kapsidy (Pasdeloup et al., 2009). Potom, co se pravděpodobně prostřednictvím proteinu VP1/2, interagujícího s NUP358 (Copeland et al., 2009), a proteinu pUL25, který se váže k NUP214 (Pasdeloup et al., 2009), zakotví kapsida herpesviru v jaderném póru (Obr. 7), dojde k iniciaci proteolytického štěpení proteinu VP1/2. To má za následek vyvolání konformační změny nejen proteinu VP1/2, ale i s ním spojeného vrcholového pentonu



Obrázek 7. Schéma interakce kapsidy herpesviru (HSV-1) s NPC. HSV-1 po splynutí s plazmatickou membránou a proniknutí do cytoplazmy buňky ztrácí vnější tegument a kapsida se stále navázaným vnitřním tegumentem putuje k jaderné membráně, kde interaguje skrz VP1/2 a pUL25 s NUP358 a NUP214. Vazba kapsidy k jadernému póru vede k rozštěpení VP1/2 a k uvolnění virové DNA do buněčného jádra (upraveno podle Copeland et al., 2009).

(pravděpodobně portálového proteinu pUL6), jímž se kapsida směrem do jaderného póru orientuje. Tato konformační změna posléze vede k otevření kapsidy a k uvolnění virové DNA do buněčného jádra. To, jakými proteázami je štěpení proteinu VP1/2 zajišťováno, není doposud zcela objasněno. Ve hře jsou zejména serinové, popřípadě i cysteinové proteázy (Jovasevic et al., 2008). Nicméně Kattenhorn a spolupracovníci ve svém výzkumu přišli s tím, že VP1/2 je sám o sobě cysteinová proteáza (Kattenhorn et al., 2005) a není tedy vyloučeno, že by štěpení mohl zajišťovat autokatalyticky on sám (Jovasevic et al., 2008).

3.1.2 *Hepadnaviridae*

Hepadnaviridae je čeleď obalených virů s genomem v podobě kruhové dvouvláknové DNA s úseky ssDNA (single-stranded DNA), jinak nazvané jako rcDNA (relaxed circular partially double-stranded DNA). Pro členy *Hepadnaviridae* je typické využití reverzní transkripce během jejich replikačního cyklu. Nejvýznamnějším zástupcem této čeledi je virus hepatitidy B (HBV; Hepatitis B Virus) replikující se v buňkách jaterního parenchymu (hepatocytech). Tento virus působí akutní zánět jater a může být příčinou také cirhózy jater nebo hepatocelulárního karcinomu. Kapsida HBV je ikosahedrální symetrie ($T = 4$; průměr 36 nm) a je tvořena 240 kopiemi kapsidového proteinu (CP; core protein) (shrnutí v Gallucci and Kann, 2017). Po fúzi virového obalu s membránou lysozomu je kapsida po mikrotubulech (Rabe et al., 2006) transportována k buněčnému jádru. DNA genom je v jádře opraven buněčnými opravnými mechanismy na kruhovou kovalentně uzavřenou DNA (cccDNA; covalently closed circular DNA), která je transkribována buněčnou RNA polymerázou do různě dlouhých mRNA. Nejdelší transkript, tzv. pregenomová RNA je v cytoplazmě enkapsidována a zároveň reverzně transkribována do DNA. Část kapsid obsahujících DNA se vrací do jádra k transkripci, část získává obal a je uvolňována z buněk (shrnutí v Schädler and Hildt, 2009).

Při studiu translokace HBV do buněčného jádra byl v sekvenci jak kapsidového proteinu (Yeh et al., 1990), tak i hepadnavirové polymerázy (Lupberger et al., 2013) objeven jaderný lokalizační signál. Na základě toho byly navrženy dva možné modely, jakými se genom HBV translokuje do buněčného jádra.

První model zahrnuje DNA polymerázu HBV, která je kovalentně připojena na 5' konec mínus vlákna rcDNA (Bartenschlager and Schaller, 1988). Hepadnavirová rcDNA by v důsledku destabilizace kapsidy byla uvolněna do cytoplazmy (Kann et al., 1997). Následně by vlivem fosforylace specifických míst došlo k zpřístupnění NLS na polymeráze pro transportní receptory a hepadnavirový genom by mohl být tímto způsobem translokován do buněčného jádra. Lupberger a kolektiv tento model podpořili svou studií, ve které inhibice

fosforylace NLS na polymeráze vedla ke snížení replikace HBV (Lupberger et al., 2013). Nicméně v kontrastu k tomuto modelu stojí dřívější studie Gua a spolupracovníků, kteří ve svém experimentu pozorovali odštěpení polymerázy ještě před translokací hepadnavirového genomu do jádra buňky. Po odštěpení polymerázy a po uvolnění rcDNA z kapsidy do cytoplazmy, zůstala velká část rcDNA navázaná na kapsidový protein (Guo et al., 2007). Kapsidový protein obsahuje ve své sekvenci NLS a uvolněná hepadnavirová rcDNA by se do buněčného jádra mohla tedy dostat prostřednictvím tohoto proteinu.

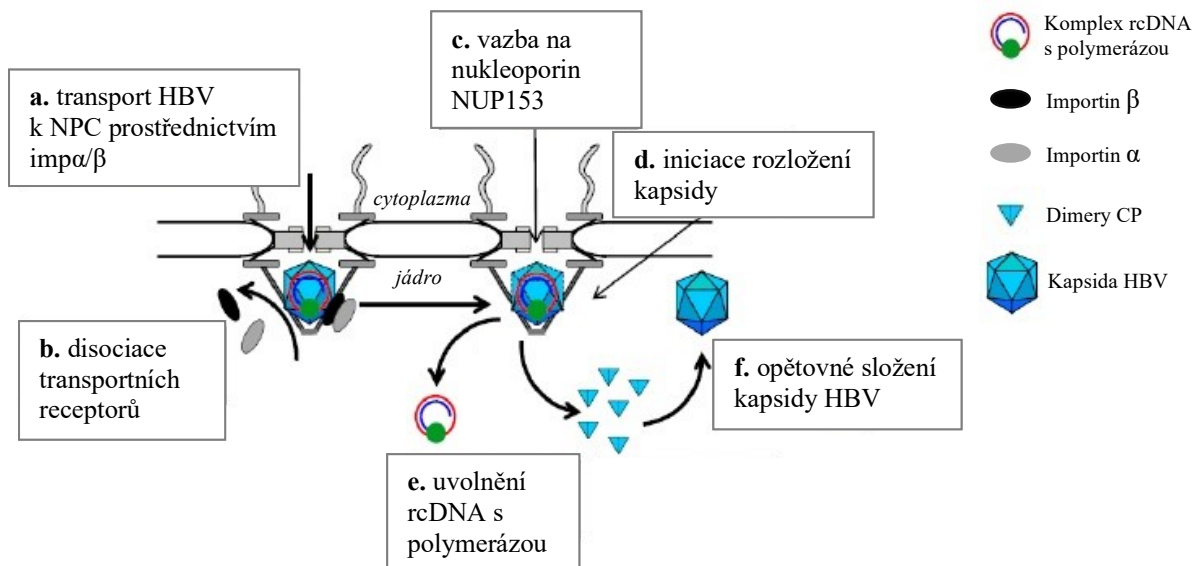
Jaderný lokalizační signál se nachází na C-konci kapsidového proteinu v sekvenci bohaté na bazickou aminokyselinu arginin (R). Yeh a kolektiv ve své studii definovali tento NLS jako sekvenci dvou po sobě jdoucích repetitiv PRRRRSQS (P = prolin; S = serin; Q = glutamin), což odpovídá aminokyselinám na pozicích 165 – 172 a 173 – 180 kapsidového proteinu. Dvě výše uvedené sekvence za sebou připojené ke globulinu jej směřovaly do buněčného jádra, zatímco jediná kopie k translokaci globulinu do jádra nestačila (Yeh et al., 1990). Haryanto a spolupracovníci nicméně pozorovali, že i aminokyseliny 158 – 168 odpovídající sekvenci PRRRTSPRRR (T = threonin), připojí-li se k bovinnímu sérum albuminu, zajistí jeho translokaci do buněčného jádra (Haryanto et al., 2012). NLS se tedy pravděpodobně nachází v celém rozmezí aminokyselin 158 – 172 (Kann et al., 1999), respektive 158 – 180. Pokud obě tyto sekvence jaderného lokalizačního signálu CP srovnáme například s NLS opičího polyomaviru SV40 (KKKRKV; K = lysin, V = valin), všimneme si, že oba typy NLS obsahují množství bazických aminokyselin (arginin a/nebo lysin), které jsou tedy očividně důležité pro interakci s transportními receptory, zajišťujícími transport komplexů do buněčného jádra.

Role kapsidového proteinu je podstatou druhého modelu vstupu genomu HBV do buněčného jádra. Tento model na rozdíl od prvního modelu předpokládá interakci intaktní kapsidy HBV přímo s jaderným pórem.

Interakci kapsid HBV s buněčným jádrem a jaderným pórem studovali v *in vitro* pokusech Kann se spolupracovníky. Použili lidské hepatocyty, u kterých permeabilizovali digitoninem cytoplazmatickou membránu a odmyli cytosol. K permeabilizovaným buňkám přidávali HBV kapsidy vytvořené z rekombinantního kapsidového proteinu fosforylovaného nebo nefosforylovaného, a dále lyzát z králíčních retikulocytů (který použili jako zdroj cytosolických faktorů) s ATP či bez ATP. Ukázali, že se kapsidy shromažďují na jaderné membráně pouze v případě, kdy je kapsidový protein fosforylovaný a jsou přítomné cytosolické faktory. Přítomnost či absence adenosin trifosfátu spojení kapsid s jadernou membránou neovlivnila (Kann et al., 1999).

V dalších pokusech pak tyto autoři ukázali, že nutnými cytosolickými faktory jsou importiny α a β . Aby mohl být jaderný lokalizační signál viru hepatitidy B importiny rozpoznán je zapotřebí, aby došlo k fosforylaci kapsidového proteinu na pozici aminokyseliny serinu v blízkosti NLS. Vlivem fosforylace dojde k prezentaci jaderného lokalizačního signálu (přítomného na C-koncové doméně CP) na povrchu kapsidy, což umožní jeho rozpoznání importinem α (Kann et al., 1999). Důvodem expozice NLS je, že fosforylace naruší stabilitu kapsidy a dovolí tak C-koncové doméně kapsidového proteinu prezentovat NLS na povrch (Selzer et al., 2015). Nicméně, vazba pouze importinu α nestačí k transportu HBV k jadernému póru. Nutná je i vazba importinu β a až tento komplex může dopravit HBV k jadernému póru, kde podléhá dalším interakcím (Kann et al., 1999).

Kapsida HBV je dostatečně malá na to (v průměru 36 nm), aby byla schopná vstoupit do vnitřní struktury jaderného póru. Přesto však její průchod jaderným pórem není zcela volný a pro dopravení virového genomu do buněčného jádra vyžaduje interakce s nukleoporiny jaderného póru (Schmitz et al., 2010). Schmitz a kolektiv přišli ve své studii na to, že tím hlavním a pravděpodobně také jediným nukleoporinem, který interaguje s kapsidou HBV, je nukleoporin NUP153. Kapsida HBV rozeznává na NUP153 dvě specifické sekvence aminokyselin – aminokyseliny 618 až 999 a 992 až 1219. Obě tyto vazebné domény jsou pak součástí tzv. fenylalanin-glycin repetice (Schmitz et al., 2010), které fungují jako selektivní bariéra pro transport různých komplexů do buněčného jádra (Ribbeck and Görlich, 2002).



Obrázek 8. Model jaderného importu hepadnavirové rcDNA řízeného kapsidou. Kapsida HBV je komplexem $\text{imp}\alpha/\beta$ transportována do jaderného póru. Zde vlivem interakce kapsidy s nukleoporinem NUP153 dojde k rozložení kapsidy HBV na dimery kapsidového proteinu, uvolnění komplexu rcDNA s polymerázou a k opětovnému složení prázdných kapsid (upraveno podle Gallucci and Kann, 2017).

Vazba kapsidy HBV k NUP153 je však specifická pouze pro tento nukleoporin. S ostatními nukleoporiny obsahujícími FG repetice (NUP358, NUP214, NUP98), kapsida HBV, jak vyplynulo z analýzy imunoprecipitátů, zřejmě neinteraguje (Schmitz et al., 2010).

Interakce kapsidy s nukleoporinem NUP153 pak spouští další důležitý krok v rané fázi infekčního cyklu viru hepatitidy B, a to rozložení kapsidy HBV na dimery kapsidového proteinu a jejich následné zpětné složení (Obr. 8). Rozložením kapsidy se uvolní komplex genomové rcDNA s polymerázou a translokuje do nukleoplazmy. Zároveň do nukleoplazmy translokují i dimery kapsidového proteinu, které se zde pod vlivem pravděpodobně buněčné RNA mohou složit zpět do virové kapsidy (Rabe et al., 2009).

3.1.3 *Adenoviridae*

Adenoviridae je čeleď neobalených virů s genomem v podobě lineární dvouvláknové DNA a kapsidou ikosahedrální symetrie (o průměru přibližně 90 nm), která je složená z 240 hexamerů tvořených hlavním kapsidovým proteinem – hexonem a 12 pentamer tvořících vrcholy, z nichž vystupují vláknité proteiny (shrnuto v San Martín, 2012). Virová dsDNA, kovalentně vázána na obou koních s terminálním proteinem, je v přímé interakci s dalšími proteiny, a to konkrétně s proteinem X, proteinem V (propojujícího vnitřní struktury virionu s proteiny tvořícími kapsidu) a proteinem VII. (Cassany et al., 2014). Po vstupu do buňky receptorem zprostředkovanou endocytózou, adenovirus (AdV) způsobuje narušení membrány endosomu a proniká do cytoplazmy. Vazbou na komplex dynein/dynactin je adenovirus následně prostřednictvím mikrotubulů dopraven k jádru hostitelské buňky, kde interaguje s NPC a dalšími buněčnými faktory (shrnuto v Greber and Flatt, 2019).

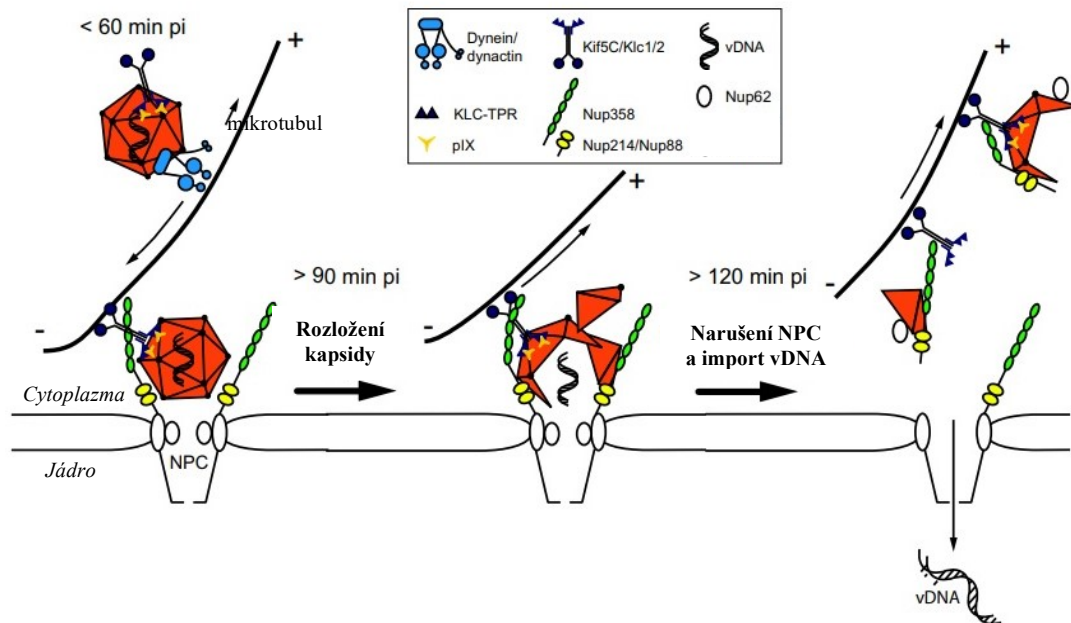
Protein hexon se ukázal jako jeden z hlavních determinantů řídících translokaci virové DNA do buněčného jádra. Cassany a spolupracovníci ve své studii prokázali, že kapsidový protein hexon interaguje s N-koncovou částí nukleoporinu NUP214 (Cassany et al., 2014). Jak již bylo zmíněno v předchozí kapitole o struktuře jaderného póru, NUP214 je jedním z tzv. FG NUPs, tedy nukleoporinů bohatých na repetice fenylalanin-glycin, jejichž hlavní funkcí je interakce s transportními receptory během transportu mezi jádrem a cytoplazmou (Kraemer et al., 1994). Interakce mezi hexonem a NUP214 byla prokázána snížením exprese tohoto nukleoporinu s použitím shRNA (short-hairpin RNA), tedy RNA interferencí. V buňkách s potlačenou expresí NUP214 došlo k výraznému snížení množství adenovirové DNA v buněčném jádře. Naopak u kontrolních buněk, ve kterých byla použita shRNA namířená proti jinému nukleoporinu NUP358, nebo ve kterých nebyla použita žádná shRNA, byla adenovirová DNA přítomná ve značném množství jak v cytoplazmě, tak i v jádře buňky. Tyto výsledky tedy značí, že hexon

AdV se váže specificky k nukleoporinu NUP214, který je nezbytně důležitý pro transport adenovirové DNA do buněčného jádra. Specifický úsek aminokyselin přítomných na NUP214, který je rozpoznáván hexonem AdV, se pak nachází na N-konci tohoto nukleoporinu, a to konkrétně v oblasti aminokyselin 450 až 586. Navíc vazba hexonu na NUP214 i v nepřítomnosti cytoplazmatických faktorů ukazuje, že pro translokaci adenovirové DNA do jádra buňky nejsou potřeba transportní receptory (Cassany et al., 2014).

Kromě interakce s nukleoporinem NUP214 se kapsida AdV váže také na motorový protein kinesin-1 (Strunze et al., 2011). Kinesin-1 hraje roli v anterográdním transportu (transport od středu buňky k periférii) a vyskytuje se ve formě heterotetrameru, který je složený ze dvou těžkých (KHC; kinesin heavy chains) a dvou lehkých řetězců (KLC; kinesin light chains) (Kuznetsov et al., 1988). Lehké řetězce kinesinu obsahují na svém C-konci šest tzv. „tetratricopeptide“ repetice (TPRs), což je sekvence asi 30 až 40 aminokyselin, které interagují s proteiny určených pro transport k periférii buňky (Gauger and Goldstein, 1993). Tyto TPRs lehkých řetězců kinesinu-1 interagují i s kapsidou AdV. Na tuto skutečnost ve své studii poukázali Strunze a spolupracovníci, a to připojením GFP (green fluorescent protein) k TPR doménám KLC2. Po infekci buněk AdV pak došlo ke kolokalizaci těchto GFP-TPR nejen s adenovirovými částicemi, ale také s již rozloženými kapsidami adenoviru. Interakce lehkých řetězců kinesinu-1 s doposud neporušenou kapsidou AdV je uskutečněna prostřednictvím kapsidového proteinu IX (Strunze et al., 2011).

Kromě KLC1 a KLC2 má na rozložení adenovirové kapsidy vliv i jeden ze dvou těžkých řetězců kinesinu-1, a to KIF5C (Strunze et al., 2011). KIF5C se váže na kinesinovou vazebnou doménu, jenž je přítomna na nukleoporinu NUP358 (Cho et al., 2007), který zároveň interaguje s komplexem NUP214/NUP88 (Bernad et al., 2004). NUP358, jak již bylo uvedeno výše, není esenciální pro zakotvení AdV v jaderném póru (Cassany et al., 2014), avšak vazbou na kinesin-1 podporuje rozbalení kapsidy AdV (Strunze et al., 2011).

Adenovirová částice tedy interaguje prostřednictvím hexonu přes NUP214 s jaderným pórem (Cassany et al., 2014). Na kapsidu AdV se přes kapsidový protein IX váže svými lehkými řetězci kinesin-1, který zároveň svým těžkým řetězcem KIF5C interaguje s NUP358 (Obr. 9). Po těchto interakcích kinesin-1 iniciuje rozložení adenovirové kapsidy a zároveň způsobí i narušení stability jaderného póru, čehož je dosaženo dislokací nukleoporinů NUP358, NUP214/NUP88 a NUP62 od struktury NPC (Obr. 9). Tato strukturní změna jaderného póru pak usnadňuje translokaci adenovirové DNA do jádra buňky (Strunze et al., 2011).



Obrázek 9. Schéma translokace adenovirového genomu do buněčného jádra. Adenovirová částice využívá k transportu k buněčnému jádru pohyb po mikrotubulu prostřednictvím komplexu dynein/dynactin. Hexonem se AdV posléze váže k NUP214 a interaguje s lehkými řetězci kinesinu-1. Těžký řetězec kinesinu-1 KIF5C interaguje s NUP358. Tyto interakce postupně vedou k rozložení virové kapsidy a k narušení struktury jaderného póru a k translokaci virové DNA do buněčného jádra (upraveno podle Strunze et al., 2011).

V nedávné době Bauer a spolupracovníci objevili další buněčný faktor, který hraje v rozložení adenovirové kapsidy neméně důležitou roli. Jedná se o E3 ubiquitin-protein ligázu Mib1 (mind bomb 1) (Bauer et al., 2019). O ubiquitylaci je známo, že má vliv na funkci, strukturu, ale i lokalizaci a také degradaci takto modifikovaných proteinů. Zároveň má značný vliv i na proteinové interakce (shrnutí v Komander and Rape, 2012). Důležitá role jiné E3 ubiquitin ligázy (Itch) byla již dříve pozorována u viru chřipky typu A, a to konkrétně při úniku jednotlivých ribonukleoproteinových komplexů z endosomu do cytoplasmy (Su et al., 2013). U adenovirů se ale Mib1 uplatňuje v době, kdy je kapsida zakotvena v jaderném póru. Bauer a spolupracovníci snížili hladinu exprese Mib1 prostřednictvím RNA interference. Výsledkem byl defekt v rozbalení adenovirové kapsidy v jaderném póru, a tedy značná inhibice infekce. Byly následně navrženy dvě možnosti, jakými Mib1 pravděpodobně podporuje rozbalení adenovirové kapsidy. První z možností je, že Mib1 může ubiquitylovat virový nebo buněčný protein, popřípadě oba zároveň, což by mohlo vést ke ztrátě proteinových interakcí a k iniciaci rozložení kapsidy. Druhou je pak ubiquitylace buněčného inhibitory blokujiícího rozbalení adenovirové kapsidy. Ubiquitylací takového inhibitory by mohlo dojít k jeho uvolnění a inaktivaci (Bauer et al., 2019).

Ovšem způsob, jakým je virová DNA po rozložení kapsidy následně dopravena do buněčného jádra, není doposud jasný. Možnou roli by v tomto kroku mohl hrát adenovirový protein VII (Wodrich et al., 2006) a nukleoporin NUP358 (Carlon-Andres et al., 2020). Protein VII je asociován s virovou DNA ve formě nukleoproteinu (Vayda et al., 1983) a podle studie Chena a spolupracovníků je na virové DNA přítomen ještě před zahájením transkripce časných genů adenoviru (Chen et al., 2007). Wodrich a kolektiv objevili v sekvenci proteinu VII i jaderný lokalizační signál, jehož prostřednictvím tento protein interaguje s mnoha zástupci transportních receptorů, včetně transportinu 1 (Wodrich et al., 2006). Transportin 1 je podle nedávné studie Carlon-Andresové a spolupracovníků patrně primárním transportním faktorem, který zajišťuje finální translokaci adenovirové DNA do buněčného jádra. Tyto studie tedy hrají ve prospěch hypotézy, ve které N-koncová doména nukleoporinu NUP358 slouží jako místo pro vazbu transportního receptoru, nejspíše právě transportinu 1, který rozpozná NLS v sekvenci proteinu VII asociovaného s virovou DNA a zajistí tak transport virového genomu do buněčného jádra (Carlon-Andres et al., 2020).

3.1.4 *Polyomaviridae*

Čeď *Polyomaviridae* se řadí mezi neobalené viry jejichž genomem je kruhová dvouvláknová DNA. Kapsida, která je ikosahedrální symetrie ($T = 7$), je složena ze 72 kapsomer tvořených pentamery hlavního strukturního proteinu VP1 (shrnutí v Kilcher and Mercer, 2015). Každý pentamer VP1 obsahuje molekulu jednoho ze dvou minoritních strukturních proteinů (VP2 nebo VP3), která je přichycena nekovalentní vazbou v centrální prohlubni VP1 pentameru (Chen et al., 1998). Mezi nejznámější a nejvíce prostudované polyomaviry patří opičí polyomavirus (SV40), myší polyomavirus (MPyV; Murine Polyomavirus) a dva z lidských polyomavirů, JC polyomavirus (JCPyV) a BK polyomavirus (BKPyV). Polyomaviry putují po internalizaci buňkou v endosomech až do endoplazmatického retikula, odkud částečně rozvolněné viriony translokují do cytosolu a putují k jaderné membráně, aby doručily virový genom do jádra hostitelské buňky (shrnutí v Horníková et al., 2020).

Mechanismus transportu polyomavirového genomu do buněčného jádra není objasněn. Translokace virových genomů do jádra hostitelské buňky je ale závislá na interakci transportních receptorů s jadernými lokalizačními signály přítomnými na strukturních proteinech kapsidy – VP1, VP2, VP3 (Qu et al., 2004). Qu a spolupracovníci, kteří se ve svém výzkumu zaměřili na studium JCPyV, využili viru podobné částice (VLPs; virus-like particles) tvořené proteinem VP1, ke studiu vstupu tohoto viru do buněčného jádra. Použili jednak VLPs

složené z VP1 divokého typu (wtVLPs; wild-type VLPs) a také VLPs složené z VP1, s mutovaným NLS. Těmito VLPs částicemi pseudoinfikovali HeLa a SVG buňky. Výsledkem bylo, že zatímco v jádrech obou typů buněk bylo přítomno vysoké procento wtVLPs, tak naopak přítomnost částic s mutovaným proteinem VP1 byla ve srovnání s wtVLPs v jádrech minimální, což poukazuje na defekt v translokaci mutantních částic do buněčného jádra (Qu et al., 2004).

Pro úspěšnou translokaci JCPyV genomu do jádra hostitelské buňky je nutná přítomnost a interakce obou typů importinů, α a β . Wild-type VLPs v nepřítomnosti těchto důležitých buněčných transportních receptorů nejsou schopné do buněčného jádra přes jaderný pór proniknout, byť mají NLS. Nejsou toho ale schopné ani v přítomnosti pouze jednoho z transportních receptorů. Pouze pokud dojde k interakci mezi NLS, přítomným na N-konci proteinu VP1, importinem α a následně pak i importinem β , tak tento komplex je schopen translokace do buněčného jádra (Qu et al., 2004).

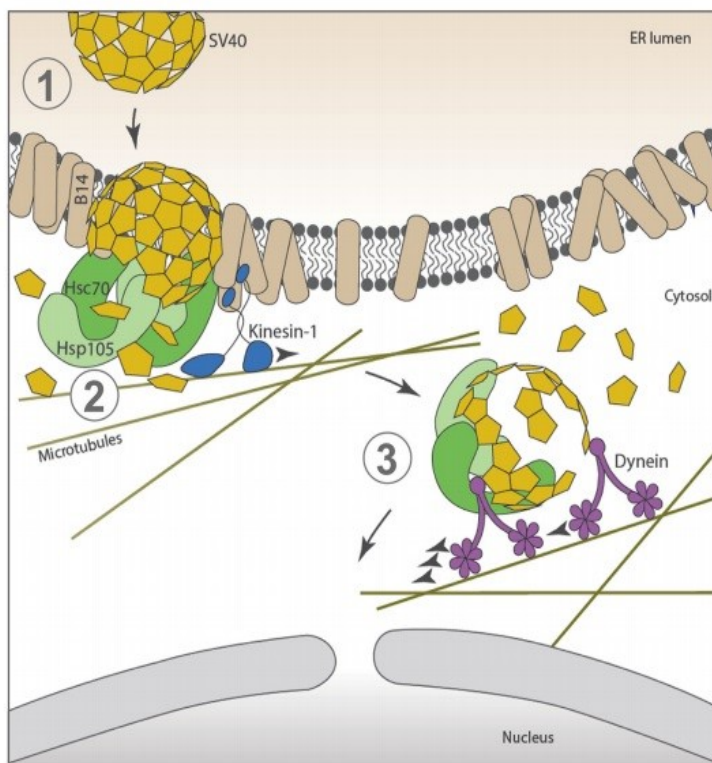
Zatímco u JCPyV řídí import virové DNA jaderný lokalizační signál proteinu VP1 (Qu et al., 2004), tak u dalších zástupců polyomavirů hrají roli ve stupu virového genomu do buněčného jádra i minoritní strukturní proteiny – VP2 a VP3. Soldatova a spolupracovníci studovali transport virionů do buněčného jádra u MPyV. Mutační analýzou zjistili, že to, jestli se uplatňuje ve vazbě s importiny více NLS proteinu VP1, nebo NLS minoritních strukturních proteinů, závisí na síle NLS signálů. Zároveň ale také pozorovali, že pro vazbu importinů je důležitá i konformace kapsomer navozená přítomností minoritních proteinů (Soldatova et al., 2018).

Při studiu BKPyV Bennett a spolupracovníci identifikovali důležité bazické aminokyseliny, přítomných v sekvenci NLS proteinů VP2 a VP3, jejichž přítomnost je potřebná pro translokaci viru do buněčného jádra. Jedná se o aminokyseliny Lys-319, který se nachází v NLS proteinu VP2 a Lys-200 nacházející se v NLS proteinu VP3. Při záměně aminokyseliny lysinu za threonin vykazovaly tyto mutované viry oproti divokému typu BKPyV výrazný pokles časné genové exprese – produkce LT antigenu (large tumor antigen) v buněčném jádře, což ukazuje na narušení translokace virové DNA do jádra buňky a zároveň tedy na závislost jaderného importu na jaderném lokalizačním signálu minoritních proteinů VP2/VP3 (Bennett et al., 2015).

U viru SV40 hraje významnou roli jaderný lokalizační signál přítomný na strukturním proteinu VP3. Vnesením mutací do sekvence tohoto signálu, tedy záměnou některé z bazických aminokyselin (lysinu, argininu) popřípadě úplným nahrazením všech bazických aminokyselin, které jsou esenciální pro rozpoznání transportními receptory, došlo k narušení infekтивности VLPs nesoucích tyto mutace. Množství LT antigenu, indikátoru translokace polyomavirového genomu do jádra buňky, bylo u mutantních VLPs (v jejichž NLS byly nahrazeny všechny

bazické aminokyseliny) v porovnání s divokým typem viru podstatně nižší, neboť importin α , nebyl schopen vázat mutovaný NLS na proteinu VP3. Jaderný lokalizační signál přítomný na strukturním proteinu VP1 SV40 je importiny α/β také rozpoznáván, ovšem ale pouze v nepřítomnosti DNA (Nakanishi et al., 2002). V přítomnosti DNA se totiž bazické aminokyseliny NLS proteinu VP1 vážou k DNA, a to i uvnitř virové částice a NLS nemůže být tedy vystaven na povrch, aby mohl být rozpoznán transportními receptory (Li et al., 2001). U proteinu VP3 a jeho NLS je tomu ale naopak, VP3 se k virové DNA ve virionu neváže a může tak být po částečném rozložení virionu vystaven na jeho povrch, interagovat s importiny α/β , a dopravit tak virový genom prostřednictvím jaderného póru do jádra hostitelské buňky (Nakanishi et al., 2002). Mechanismus translokace polyomavirů přes jaderný pór je však nejasný.

Studie Ravindrana a spolupracovníků ukazuje, že v cytosolu po translokaci částečně rozvolněných virionů z endoplazmatického retikula (ER) dochází k dalšímu rozpadu virové částice. Autoři zjistili, že molekulární motor dynein interaguje s virionem SV40 po jeho úniku z endoplazmatického retikula (ER) do cytoplazmy (Ravindran et al., 2018). Únik virionu z ER je zprostředkován buněčnými chaperony Hsc70 (heat shock cognate 70) a Hsp105 (heat shock protein 105) (Ravindran et al., 2015) a molekulárním motorem kinesinem-1 (Obr. 10). Kinesin-1 se váže na transmembránový protein B14 a svojí aktivitou vytváří v membráně ER místo pro průnik viru do cytoplazmy (Ravindran et al., 2017). Funkcí dyneinu je poté rozložení takto uniklého viru z endoplazmatického retikula patrně během transportu k jadernému póru, před jeho translokací do buněčného jádra. Proteolytická analýza ukázala, že viriony, které byly aktivitou dyneinu rozloženy, jsou náchylnější ke štěpení trypsinem. Naopak v buňkách, do kterých byl přidán specifický inhibitor dyneinu ciliobrevin D, byly viriony vůči účinku trypsinu odolnější, což potvrzuje onu funkci dyneinu. To, jakým přesným způsobem dynein způsobuje rozpad virionu, je prozatím nejasné. Nicméně byly navrženy modely, jakými tento krok může probíhat. Jedním z těchto modelů je předpoklad, že se na strukturu virionu váže více takovýchto dyneinových motorů, které se však pohybují odlišnou rychlostí a dochází tak vyvíjení síly, které naruší stabilitu virionu a způsobí jeho rozložení (Obr. 10) (Ravindran et al., 2018).



Nucleus (buněčné jádro); **Microtubules** (mikrotubuly); **ER lumen** (lumen endoplazmatického retikula)

Obrázek 10. Transport SV40 z ER do buněčného jádra. (1) Vlivem protein disulfid izomerázy je pozměněna struktura virionu v lumen ER. Virion se stane hydrofobním, což mu dovolí zabudovat se do membrány ER. (2) Prostřednictvím transmembránového proteinu B14 dojde k vazbě chaperonů Hsc70 a Hsp105 a kinesinu-1. Tyto buněčné faktory způsobí vytažení virionu z membrány ER do cytosolu za jeho částečného rozvolnění. (3) V cytosolu se na virion váže tubulinový motor dynein, který zprostředkovává další rozložení virové kapsidy a virus může být, dosud neznámým mechanismem, translokován prostřednictvím jaderného póru do buněčného jádra (Ravindran et al., 2018).

3.2 RNA viry

3.2.1 *Orthomyxoviridae*

Orthomyxoviridae je čeleď obalených virů s genomem v podobě lineární jednovláknové RNA v minus smyslu (řetězec je komplementární k sekvenci překládané do proteinu). Genomová RNA je ve virionech přítomna v několika segmentech, a tvoří spolu s virem kódovaným nukleoproteinem (NP) ribonukleoproteinové komplexy (RNPs; ribonucleoprotein particles) – nukleokapsidy s helikální symetrií. Mezi hlavní zástupce této skupiny patří zejména viry chřipky typu A, B, C a D. Jednotlivé typy se mezi sebou liší počtem segmentů RNA. Virus chřipky typu A a B nese 8 těchto segmentů a typu C a D pouze 7 segmentů RNA. K jednotlivým nukleokapsidám se navíc váže komplex RNA dependentních RNA polymeráz (PA – polymerase acidic protein; PB1 – polymerase basic protein 1; PB2 – polymerase basic protein 2). *Orthomyxoviry* se, na rozdíl od mnoha jiných minus RNA virů, replikují v buněčném jádře. Proto virové RNPs, uvolněné po fúzi virového obalu s membránami endosomu, musí být spolu s navázaným polymerázovým komplexem transportovány do jádra. Translokace RNPs z cytoplazmy do buněčného jádra probíhá za využití importinů α a β (shrnuo v Dou et al., 2018), které interagují primárně s NLS nacházejícím se na NP (O'Neill et al., 1995), ale jsou schopné dokonce i rozpoznávat polymerázový řetězec PB2 (Gabriel et al., 2008) či dimer

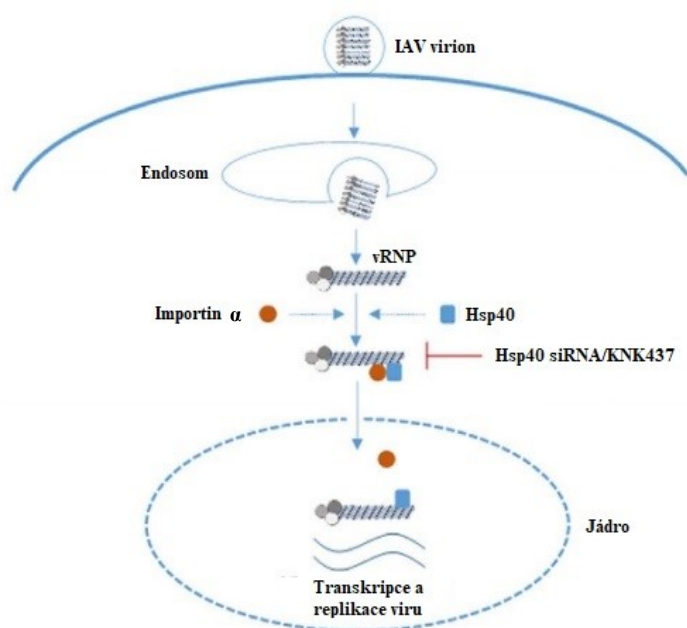
PB1- PA (Deng et al., 2006), které jsou důležité pro syntézu virových RNA uvnitř buněčného jádra.

Jak již ve své studii z roku 1995 prokázali O'Neill a kolektiv, nukleoprotein je pro infekční cyklus viru chřipky esenciální komponentou, neboť funguje jakožto nositel jaderného lokalizačního signálu a řídí tak translokaci virové RNA do jádra buňky. Samotné segmenty virové RNA (bez NP) nejsou schopné se do buněčného jádra dostat. Při translokaci asistují oba importiny α a β . V jejich nepřítomnosti či v nepřítomnosti pouze jednoho z nich nedochází k akumulaci RNPs u jaderné membrány (O'Neill et al., 1995). Tato studie byla podpořena pozdější prací Babcocka a kolektivu z roku 2004, kteří stejně jako O'Neill a spol. pozorovali akumulaci RNPs u jaderné membrány. Přidání protilátky proti NPC pak zabránilo vstupu RNPs do buněčného jádra a zároveň nedošlo ani k akumulaci RNPs okolo jaderné membrány. Tato skutečnost ukazuje na interakci RNPs s jaderným pórem, která je zprostředkována nejspíše právě prostřednictvím importinů (Babcock et al., 2004).

Wang a spolupracovníci při studiu interakce NP s buněčnými importiny objevili, že nukleoprotein viru chřipky typu A obsahuje na svém N-konci vazebná místa pro importiny $\alpha 5$ a $\alpha 1$. Obě tyto izoformy importinu α rozeznávají oblast prvních 13 aminokyselin nacházejících se na N-konci nukleoproteinu a fungujících tedy jako jaderný lokalizační signál (Wang et al., 1997). Krystalová analýza interakce NP s myším importinem $\alpha 1$ ze studie Nakady a spolupracovníků určila, že jaderný lokalizační signál odpovídá sekvenci SQGTKRSYEQM (S = serin; G = glycin; T = threonin; K = lysin; R = arginin; Y = tyrosin; M = methionin; Q = glutamin; E = kyselina glutamová) (Nakada et al., 2015). V porovnání s jinými NLS se jedná o tzv. neklasický NLS, neboť postrádá sekvenci bohatou na bazické aminokyseliny lysin a arginin (Wang et al., 1997) a jeho vazba na importin α není kompetitivně inhibována tzv. klasickým NLS viru SV40. Z tohoto lze vyvodit, že oba NLS rozeznávají na importinu α jiné vazebné místo (Cros et al., 2005). Strukturní analýza RNPs pomocí kryoelektronové mikroskopie ukázala, že NLS na N-konci nukleoproteinu je vystaven na povrchu RNPs a je tak přístupný pro vazbu importinu α (Moeller et al., 2012). Nakada a kolektiv ve své studii dále ukázali, že myší importin $\alpha 1$ interaguje s NLS nukleoproteinu prostřednictvím vazebného místa nacházejícím se na C-koncové doméně importinu $\alpha 1$. Interakce probíhá především přes vodíkové vazby a elektrostatické interakce. Mutační analýzou bylo zjištěno, že pro vazbu mezi těmito dvěma vazebnými partnery jsou důležité výhradně aminokyseliny lysin, arginin a methionin na pozicích 7, 8 a 13 nacházejících se v sekvenci NLS nukleoproteinu. Náhrada těchto aminokyselin za alanin výrazně narušila interakci s importinem $\alpha 1$ (Nakada et al., 2015).

Vazbě mezi importinem α a NLS nukleoproteinů mohou napomáhat pravděpodobně i další buněčné faktory. Batra a kolektiv ve své práci studovali roli buněčného chaperonu Hsp40 (heat shock protein 40). Podle jejich pozorování je Hsp40 schopen interagovat prostřednictvím své N-koncové domény (tzv. J domény) s N-koncem nukleoproteinů. Přes svojí C-koncovou doménu pak Hsp40 pravděpodobně váže importin α , čímž by mohl zprostředkovat vazbu mezi importinem α a NLS na N-konci nukleoproteinů vedoucí k translokaci RNPů do buněčného jádra (Obr. 11). Tento model je však prozatím stále ve fázi výzkumu a vyžaduje další ověření (Batra et al., 2016).

V roce 2010 autoři Watanabe a kolektiv analyzovali pomocí siRNA (Genome-wide RNAi screening) data početných rozsáhlých studií interakcí proteinů viru chřipky a buněčných proteinů a také studií vyhledávajících buněčné proteiny důležité pro replikaci viru chřipky. Mezi jimi vytipovanými 128 buněčnými proteiny byly, kromě importinů, také proteiny jaderného póru NUP98 a NUP153. Nicméně na ověření jejich účasti v transportu RNPů viru chřipky do buněčného jádra se ještě čeká (Watanabe et al., 2010).



Obrázek 11. Model translokace RNPů do buněčného jádra. Po průniku viru chřipky typu A (IAV) do buňky dochází ke splynutí virového obalu a membrány endosomu vedoucí k uvolnění vRNPů. Nukleoprotein váže přes N-konec Hsp40, který rekrutuje imp α . Ve spolupráci s importinem β (na obr. neuveden) je tento komplex translokován do buněčného jádra. Snížení hladiny exprese Hsp40 RNA interferencí (siRNA) či jeho blokáce inhibitory KNK437 naruší vazbu mezi imp α a nukleoproteinem, a tedy i import vRNPů do jádra (upraveno podle Batra et al., 2016).

3.2.2 *Retroviridae*

Retroviridae je čeleď obalených virů jejichž genomem je lineární jednovláknová RNA. *Retroviridae* vyžadují pro svůj replikační cyklus translokaci do jádra hostitelské buňky a integraci do genomu hostitele. Po průniku do hostitelské buňky, pomocí enzymu reverzní transkriptázy (RT) přepíše retrovirus svou ssRNA (single-stranded RNA) do dsDNA, která může dále putovat směrem k jádru hostitelské buňky a integrovat se do genomu hostitele. Putuje

tam ve formě tzv. pre-integračního komplexu (PIC; preintegration complex), který je tvořen právě dsDNA a dále pak virovými a buněčnými proteiny. *Retroviridae* lze rozlišit na dvě skupiny. První skupina je schopna průniku do buněčného jádra pouze během dělicí se fáze buněčného cyklu (mitózy), kdy dochází k rozpadu jaderné membrány a retroviru se tak otevře cesta do buněčného jádra. Do této skupiny patří rod *Gammaretrovirus*, například virus myší leukémie (MLV; Murine Leukemia Virus). Druhá skupina retrovirů je však schopna se do buněčného jádra dostat i během nedělicí se fáze buňky, a to prostřednictvím jaderného póru. Sem lze zařadit rod *Lentivirus*, jehož nejvíce známým zástupcem je virus lidské imunitní nedostatečnosti (HIV-1; Human Immunodeficiency Virus) (shrnutí ve Woodward et al., 2013).

3.2.2.1 Translokace HIV-1 do buněčného jádra

HIV-1, jakožto zástupce čeledi *Retroviridae*, po průniku do hostitelské buňky a dalších krocích s ním spojených, započne reverzní transkripci ssRNA (pomocí enzymu reverzní transkriptázy) na dsDNA (neboli cDNA; complementary DNA), která se posléze stane součástí PIC. Enzym RT zůstává ale i nadále také součástí PIC, neboť reverzní transkripce virové ssRNA probíhá současně s jaderným transportem a je patrně kompletně dokončena až v jádře hostitelské buňky, čemuž nasvědčuje i přítomnost pozdních produktů reverzní transkripce v jaderných extraktech infikovaných buněk. Bukrinsky a spolupracovníci identifikovali v PIC kromě cDNA a reverzní transkriptázy i již výše zmiňované virové proteiny, a to konkrétně matrix (MA), Vpr a integráza (IN) (Bukrinsky et al., 1993).

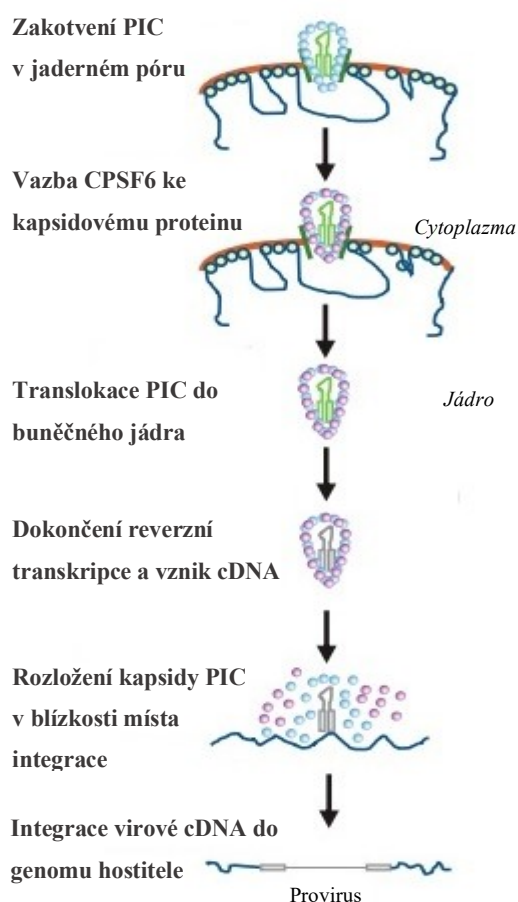
Translokace PIC do buněčného jádra je podle studií řízena zejména interakcí virových proteinů s nukleoporiny jaderného póru – NUP153 (Matreyek et al., 2013; Woodward et al., 2009) a NUP358 (Schaller et al., 2011). Woodward a spolupracovníci ve své studii zaměřené na vstup HIV-1 do buněčného jádra pozorovali, že jedním z virových proteinů interagujících s NUPs, je integráza, která interaguje s nukleoporinem NUP153. Tato interakce je zprostředkována prostřednictvím C-koncové domény NUP153, bohaté na repetice fenylalanin-glycin (Woodward et al., 2009), a to i díky skutečnosti, že C-koncová doména NUP153 je částečně vystavena na cytoplazmatické straně jaderného obalu (Fahrenkrog et al., 2002). Avšak relativně nedávné studie prokázaly, že primární roli v tomto kroku zastává spíše než integráza, kapsidový protein viru HIV-1. Buffone a spolupracovníci pomocí krystalové struktury identifikovali peptidové zbytky kapsidového proteinu (Buffone et al., 2018), který, jak již bylo prokázáno dříve, interaguje obdobně jako virová integráza s C-koncovou doménou NUP153 (Matreyek et al., 2013). Důležitý je zejména peptidový zbytek N57 (asparagin 57), který prostřednictvím vodíkových vazeb zajišťuje interakci kapsidového proteinu s FG repeticemi

nukleoporinu NUP153. Mutace N57 vedla k zamezení této interakce a tato vazba se tedy zdá být důležitá pro translokaci PIC do buněčného jádra (Buffone et al., 2018).

Kromě vazby s nukleoporinem NUP153 je kapsidový protein HIV-1 schopen vstupovat do interakce také s nukleoporinem NUP98, který se podílí na integraci virové DNA do genomu hostitele (Di Nunzio et al., 2012) a nukleoporinem RanBP2 (NUP358). RanBP2 se pravděpodobně účastní nejen řízení translokace PIC do buněčného jádra (Schaller et al., 2011), ale zdá se, že také hraje nepostradatelnou roli ve schopnosti PIC se správně uchytit v jaderném póru. Snížení hladiny exprese RanBP2 vyvolá výrazné snížení infekivity viru HIV-1. To může být způsobeno pravděpodobně neschopností PIC se správně zachytit v NPC v důsledku postrádání vazby s RanBP2 (Di Nunzio et al., 2012). RanBP2 obsahuje na svém C-konci doménu homologní s cyclophilinem A (CypA) (Wu et al., 2007) prostřednictvím níž kapsidový protein s RanBP2 interaguje (Schaller et al., 2011). Cyclophilin A je jeden z důležitých buněčných faktorů, které jsou potřebné pro vstup PIC do buněčného jádra (Bossolt et al., 1993). Di Nunzio a kolektiv při odstranění C-koncové domény RanBP2, ve které se doména homologní s CypA nachází, pozorovali defekt ve vazbě s kapsidovým proteinem a s ním i související snížení infekivity HIV-1 (Di Nunzio et al., 2012).

Nukleoporiny jaderného póru však nejsou jedinými buněčnými faktory, které vazbou na virové proteiny podporují translokaci PIC do buněčného jádra. Dalším takovýmto buněčným faktorem je transportin-SR2, který prostřednictvím své N-koncové domény interaguje s virovou integrázou (Tsirkone et al., 2017). Transportin-SR2 běžně zajišťuje transport SR proteinů (bohatých na aminokyseliny serin a arginin) mezi cytoplazmou a jádrem buňky (Kataoka et al., 1999). PIC by tak mohl využít vazby na tento transportní komplex a prostřednictvím něj translokovat do buněčného jádra (Tsirkone et al., 2017). S integrázou HIV-1 interaguje také importin 7 (Zaitseva et al., 2009) a heterodimer importinů α a β (Hearps and Jans, 2006). Oba tyto transportní faktory vazbou na integrázu zvyšují efektivitu transportu PIC do buněčného jádra. Další buněčný faktor cyclophilin A se váže ke kapsidovému proteinu HIV-1 a navádí jej k dalším interakcím s nukleoporiny RanBP2 a NUP153. Inhibice CypA cyklosporinem má za následek, že virus HIV-1 je nucen využít alternativní cesty do jádra, neboť klasický transport prostřednictvím CypA, RanBP2 a NUP153 je inhibicí cyklosporinem narušen. Zajímavé je, že způsob, jakým se HIV-1 dostane do buněčného jádra, souvisí i s tím, do jakého místa genomu hostitele se bude virová cDNA integrovat (Schaller et al., 2011). V procesu integrace HIV-1 genomu do genomu hostitele má nezbytnou roli buněčný protein CPSF6 (cleavage and polyadenylation specificity factor 6) (Buffone et al., 2018). Ten prostřednictvím interakce s kapsidovým proteinem řídí integraci virového genomu do transkripčně aktivních oblastí

chromatinu (Sowd et al., 2016). Připravené mutantní viry HIV-1, u nichž byla zavedena mutace v kapsidovém proteinu u peptidového zbytku N57, se integrovaly do míst hostitelského genomu s nižší genovou hustotou, na rozdíl od divokého typu HIV-1. Příčinou defektu v integraci by mohla být neschopnost tohoto mutantu interagovat jak s NUP153, tak i s CPSF6 (Buffone et al., 2018), který by jinak řídil integraci do transkripčně aktivních oblastí chromatinu, jako je tomu u divokého typu HIV-1 (Sowd et al., 2016). Bejarano a spolupracovníci ve své nedávné studii pozorovali, že CPSF6 se kromě integrace virového genomu účastní také v konečném transportu PIC přes jaderný pór. Funkce CPSF6 v tomto kroku spočívá ve vyvázání PIC z interakce s NUP153, které je následováno uvolněním PIC do nukleoplazmy (Bejarano et al., 2019). Podle Burdicka a kolektivu je PIC během translokace do jádra stále ve formě částečně rozvolněné kapsidy (Burdick et al., 2020), která je ale v průměru příliš velká na to (61 nm) (Briggs et al., 2003), aby mohla NPC projít. Při postrádání vazby PIC s CPSF6 byla pozorována akumulace PIC v okolí jaderné membrány. Na základě výsledků své studie Burdick a spolupracovníci navrhli předpoklad, že CPSF6 by mohl způsobovat narušení kapsidy, popřípadě jaderného póru, čímž by bylo umožněno PIC translokovat do jádra buňky (Obr. 12) (Burdick et al., 2020).



Obrázek 12. Model jaderné translokace a integrace genomu HIV-1. Pre-integrační komplex (PIC) zakotví v jaderném póru. Ke kapsidovému proteinu se naváže protein CPSF6, který spolu s NUP153 (na obrázku neuveden) umožní translokaci PIC do buněčného jádra. V jádře dochází k dokončení reverzní transkripce, k rozložení kapsidy a k integraci virového genomu do genomu hostitele v blízkosti místa rozložení kapsidy PIC (upraveno podle Burdick et al., 2020).

4 Závěr

Tato práce je souhrnem znalostí o jaderném póru, jeho struktuře, funkci, ale zejména pak o interakci s virovými částicemi. Jaderný pór je vysoce komplexní struktura, kde každá jeho část má významnou funkci ať už pro úspěšné složení jaderného póru po mitotickém dělení, anebo pro jeho funkci jakožto zprostředkovatele transportu mezi cytoplazmou a buněčným jádrem. Tento transport zajišťují nukleoporiny bohaté na repetice fenylalanin-glycin (FG NUPs), které interagují s transportními receptory nesoucími náklad, jenž má být translokován do buněčného jádra. Nicméně, jak bylo v této práci doloženo, FG nukleoporiny mají také tu schopnost, že mohou interagovat s různými virovými částicemi a jsou jimi tedy využívány pro doručení virového genomu do buněčného jádra. Zvláště se do tohoto procesu zapojují nukleoporiny NUP358, NUP214 a NUP153. Snížení hladiny exprese těchto nukleoporinů má podstatný vliv na inhibici virové infekce, neboť doručení virového genomu do jádra hostitelské buňky je tímto významně narušeno. Není však zcela vyloučeno, že do těchto interakcí nemohou být zapojeny i další FG nukleoporiny, jako je komplex NUP62 či nukleoporin NUP98, u něhož již bylo prokázáno, že hraje částečnou roli v integraci genomu HIV-1 a uvažuje si i nad jeho rolí v jaderném importu viru chřipky typu A.

Co je doposud známo a potvrzeno, tak této interakce s nukleoporiny pro translokaci do buněčného jádra využívá z RNA virů pouze čeleď *Retroviridae* a z DNA virů čeledi *Herpesviridae*, *Hepadnaviridae* a *Adenoviridae*. Nad čeleděmi *Orthomyxoviridae* a *Polyomaviridae* však zůstává otazník. Obě tyto virové čeledi využívají interakcí s transportními receptory, o kterých je známo, že jsou schopné skrz interakce s FG repeticemi nukleoporinů doručit transportovaný náklad do buněčného jádra. Mohou však i samotné ribonukleoproteinové částice (RNPs) viru chřipky typu A, či strukturní proteiny VP1, VP2, VP3 polyomavirů, nějakým způsobem interagovat s FG nukleoporiny samy? Bude mít případná delece či specifická blokáce těchto nukleoporinů negativní vliv na vstup virových částic do buněčného jádra, a tím pádem i na jejich infektivitu? Uvedené možnosti se určitě u obou čeledí nabízejí, nicméně bude potřeba provést v dané oblasti další studie, abychom mohli tyto možné interakce potvrdit nebo popřípadě vyloučit. Dále nám případné zjištění takovýchto nových specifických interakcí, mezi nukleoporiny (nebo jinými buněčnými faktory) a virovými proteiny, může přinést další zcela inovativní možnosti terapeutické léčby v boji s virovou nákazou.

Literatura

(* = sekundární zdroj)

- Abaitua, F., O'Hare, P., 2008. Identification of a Highly Conserved, Functional Nuclear Localization Signal within the N-Terminal Region of Herpes Simplex Virus Type 1 VP1-2 Tegument Protein. *J. Virol.* 82, 5234–5244.
- Antonin, W., Franz, C., Haselmann, U., Antony, C., Mattaj, I.W., 2005. The Integral Membrane Nucleoporin pom121 Functionally Links Nuclear Pore Complex Assembly and Nuclear Envelope Formation. *Mol. Cell* 17, 83–92.
- Askjaer, P., Bachi, A., Wilm, M., Bischoff, F.R., Weeks, D.L., Ogniewski, V., Ohno, M., Niehrs, C., Kjems, J., Mattaj, I.W., Fornerod, M., 1999. RanGTP-Regulated Interactions of CRM1 with Nucleoporins and a Shuttling DEAD-Box Helicase. *Mol. Cell. Biol.* 19, 6276–6285.
- Aydin, I., Weber, S., Snijder, B., Samperio Ventayol, P., Kühbacher, A., Becker, M., Day, P.M., Schiller, J.T., Kann, M., Pelkmans, L., Helenius, A., Schelhaas, M., 2014. Large Scale RNAi Reveals the Requirement of Nuclear Envelope Breakdown for Nuclear Import of Human Papillomaviruses. *PLoS Pathog.* 10, e1004162.
- Babcock, H.P., Chen, C., Zhuang, X., 2004. Using Single-Particle Tracking to Study Nuclear Trafficking of Viral Genes. *Biophys. J.* 87, 2749–2758.
- Bartenschlager, R., Schaller, H., 1988. The amino-terminal domain of the hepadnaviral P-gene encodes the terminal protein (genome-linked protein) believed to prime reverse transcription. *EMBO J.* 7, 4185–4192.
- Bastos, R., Lin, A., Enarson, M., Burke, B., 1996. Targeting and function in mRNA export of nuclear pore complex protein Nup153. *J. Cell Biol.* 134, 1141–1156.
- Batra, J., Tripathi, S., Kumar, A., Katz, J.M., Cox, N.J., Lal, R.B., Sambhara, S., Lal, S.K., 2016. Human Heat shock protein 40 (Hsp40/DnaJB1) promotes influenza A virus replication by assisting nuclear import of viral ribonucleoproteins. *Sci. Rep.* 6, 19063.
- Bauer, M., Flatt, J.W., Seiler, D., Cardel, B., Emmenlauer, M., Boucke, K., Suomalainen, M., Hemmi, S., Greber, U.F., 2019. The E3 Ubiquitin Ligase Mind Bomb 1 Controls Adenovirus Genome Release at the Nuclear Pore Complex. *Cell Rep.* 29, 3785–3795.
- *Beck, M., Hurt, E., 2017. The nuclear pore complex: understanding its function through structural insight. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 18, 73–89.
- Bejarano, D.A., Peng, K., Laketa, V., Börner, K., Jost, K.L., Lucic, B., Glass, B., Lusic, M., Müller, B., Kräusslich, H.-G., 2019. HIV-1 nuclear import in macrophages is regulated by CPSF6-capsid interactions at the nuclear pore complex. *eLife* 8, e41800.
- Bennett, S.M., Zhao, L., Imperiale, M.J., 2015. Role of a Nuclear Localization Signal on the Minor Capsid Proteins VP2 and VP3 in BKPyV Nuclear Entry. *Virology* 474, 110–116.
- Bernad, R., Engelsma, D., Sanderson, H., Pickersgill, H., Fornerod, M., 2006. Nup214-Nup88 Nucleoporin Subcomplex Is Required for CRM1-mediated 60 S Preribosomal Nuclear Export. *J. Biol. Chem.* 281, 19378–19386.
- Bernad, R., van der Velde, H., Fornerod, M., Pickersgill, H., 2004. Nup358/RanBP2 Attaches to the Nuclear Pore Complex via Association with Nup88 and Nup214/CAN and Plays

- a Supporting Role in CRM1-Mediated Nuclear Protein Export. *Mol. Cell. Biol.* 24, 2373–2384.
- Blevins, M.B., Smith, A.M., Phillips, E.M., Powers, M.A., 2003. Complex Formation among the RNA Export Proteins Nup98, Rae1/Gle2, and TAP. *J. Biol. Chem.* 278, 20979–20988.
- Bonner, W.M., 1975. Protein migration into nuclei. I. Frog oocyte nuclei in vivo accumulate microinjected histones, allow entry to small proteins, and exclude large proteins. *J. Cell Biol.* 64, 421–430.
- Bossolt, K., Luban, J., Franke, E., Kalpana, G., Goff, S., 1993. Human Immunodeficiency Virus Type 1 Gag Protein Binds to Cyclophilins A and B. *Cell* 73, 1067–1078.
- Briggs, J.A.G., Wilk, T., Welker, R., Kräusslich, H.-G., Fuller, S.D., 2003. Structural organization of authentic, mature HIV-1 virions and cores. *EMBO J.* 22, 1707–1715.
- *Brown, J.C., Newcomb, W.W., 2011. Herpesvirus capsid assembly: insights from structural analysis. *Curr. Opin. Virol.* 1, 142–149.
- Buffone, C., Martinez-Lopez, A., Fricke, T., Opp, S., Severgnini, M., Cifola, I., Petiti, L., Frabetti, S., Skorupka, K., Zdrozny, K.K., Ganser-Pornillos, B.K., Pornillos, O., Di Nunzio, F., Diaz-Griffero, F., 2018. Nup153 Unlocks the Nuclear Pore Complex for HIV-1 Nuclear Translocation in Nondividing Cells. *J. Virol.* 92, e00648-18.
- Bui, K.H., von Appen, A., DiGuilio, A.L., Ori, A., Sparks, L., Mackmull, M.-T., Bock, T., Hagen, W., Andrés-Pons, A., Glavy, J.S., Beck, M., 2013. Integrated Structural Analysis of the Human Nuclear Pore Complex Scaffold. *Cell* 155, 1233–1243.
- Bukrinsky, M.I., Sharova, N., McDonald, T.L., Pushkarskaya, T., Tarpley, W.G., Stevenson, M., 1993. Association of integrase, matrix, and reverse transcriptase antigens of human immunodeficiency virus type 1 with viral nucleic acids following acute infection. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90, 6125–6129.
- Burdick, R.C., Li, C., Munshi, M., Rawson, J.M.O., Nagashima, K., Hu, W.-S., Pathak, V.K., 2020. HIV-1 uncoats in the nucleus near sites of integration. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 117, 5486–5493.
- Carlson-Andres, I., Lagadec, F., Pied, N., Rayne, F., Lafon, M.-E., Kehlenbach, R.H., Wodrich, H., 2020. Nup358 and Transportin 1 Cooperate in Adenoviral Genome Import. *J. Virol.* 94, e00164-20.
- Cassany, A., Ragues, J., Guan, T., Bégu, D., Wodrich, H., Kann, M., Nemerow, G.R., Gerace, L., 2014. Nuclear Import of Adenovirus DNA Involves Direct Interaction of Hexon with an N-Terminal Domain of the Nucleoporin Nup214. *J. Virol.* 89, 1719–1730.
- Chen, J., Morral, N., Engel, D.A., 2007. Transcription releases protein VII from adenovirus chromatin. *Virology* 369, 411–422.
- Chen, X.S., Stehle, T., Harrison, S.C., 1998. Interaction of polyomavirus internal protein VP2 with the major capsid protein VP1 and implications for participation of VP2 in viral entry. *EMBO J.* 17, 3233–3240.
- Cho, K., Cai, Y., Yi, H., Yeh, A., Aslanukov, A., Ferreira, P.A., 2007. Association of the Kinesin-Binding Domain of RanBP2 to KIF5B and KIF5C Determines Mitochondria Localization and Function. *Traffic* 8, 1722–1735.
- Chug, H., Trakhanov, S., Hülsmann, B.B., Pleiner, T., Görlich, D., 2015. Crystal structure of the metazoan Nup62•Nup58•Nup54 nucleoporin complex. *Science* 350, 106–110.

- Cingolani, G., Bednenko, J., Gillespie, M.T., Gerace, L., 2002. Molecular Basis for the Recognition of a Nonclassical Nuclear Localization Signal by Importin β . *Mol. Cell* 10, 1345–1353.
- Cohen, S., Marr, A.K., Garcin, P., Pante, N., 2011. Nuclear Envelope Disruption Involving Host Caspases Plays a Role in the Parvovirus Replication Cycle. *J. Virol.* 85, 4863–4874.
- Coller, K.E., Lee, J.I.-H., Ueda, A., Smith, G.A., 2007. The Capsid and Tegument of the Alphaherpesviruses Are Linked by an Interaction between the UL25 and VP1/2 Proteins. *J. Virol.* 81, 11790–11797.
- Copeland, A.M., Newcomb, W.W., Brown, J.C., 2009. Herpes Simplex Virus Replication: Roles of Viral Proteins and Nucleoporins in Capsid-Nucleus Attachment. *J. Virol.* 83, 1660–1668.
- Cronshaw, J.M., Krutchinsky, A.N., Zhang, W., Chait, B.T., Matunis, M.J., 2002. Proteomic analysis of the mammalian nuclear pore complex. *J. Cell Biol.* 158, 915–927.
- Cros, J.F., García-Sastre, A., Palese, P., 2005. An Unconventional NLS is Critical for the Nuclear Import of the Influenza A Virus Nucleoprotein and Ribonucleoprotein. *Traffic* 6, 205–213.
- Deng, T., Engelhardt, O.G., Thomas, B., Akoulitchev, A.V., Brownlee, G.G., Fodor, E., 2006. Role of Ran Binding Protein 5 in Nuclear Import and Assembly of the Influenza Virus RNA Polymerase Complex. *J. Virol.* 80, 11911–11919.
- Denning, D.P., Patel, S.S., Uversky, V., Fink, A.L., Rexach, M., 2003. Disorder in the nuclear pore complex: The FG repeat regions of nucleoporins are natively unfolded. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 2450–2455.
- Di Nunzio, F., Danckaert, A., Fricke, T., Perez, P., Fernandez, J., Perret, E., Roux, P., Shorte, S., Charneau, P., Diaz-Griffero, F., Arhel, N.J., 2012. Human Nucleoporins Promote HIV-1 Docking at the Nuclear Pore, Nuclear Import and Integration. *PLoS ONE* 7, e46037.
- *Dou, D., Revol, R., Östbye, H., Wang, H., Daniels, R., 2018. Influenza A Virus Cell Entry, Replication, Virion Assembly and Movement. *Front. Immunol.* 9, 1581.
- Eisenhardt, N., Redolfi, J., Antonin, W., 2014. Interaction of Nup53 with Ndc1 and Nup155 is required for nuclear pore complex assembly. *J. Cell Sci.* 127, 908–921.
- Elena Conti, M.U., 1998. Crystallographic analysis of the recognition of a nuclear localization signal by the nuclear import factor karyopherin α . *Cell* 94, 193–204.
- Fahrenkrog, B., Maco, B., Fager, A.M., Köser, J., Sauder, U., Ullman, K.S., Aebi, U., 2002. Domain-specific antibodies reveal multiple-site topology of Nup153 within the nuclear pore complex. *J. Struct. Biol.* 140, 254–267.
- Finlay, D., Meier, E., Bradley, P., Horecka, J., Forbes, D., 1991. A complex of nuclear pore proteins required for pore function. *J. Cell Biol.* 114, 169–183.
- Fischer, J., Teimer, R., Amlacher, S., Kunze, R., Hurt, E., 2015. Linker Nups connect the nuclear pore complex inner ring with the outer ring and transport channel. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 22, 774–781.
- Fornerod, M., van Deursen, J., van Baal, S., Reynolds, A., Davis, D., Murti, K.G., Fransen, J., Grosveld, G., 1997. The human homologue of yeast CRM1 is in a dynamic subcomplex with CAN/Nup214 and a novel nuclear pore component Nup88. *EMBO J.* 16, 807–816.

- Frey, S., Richter, R.P., Gorlich, D., 2006. FG-Rich Repeats of Nuclear Pore Proteins Form a Three-Dimensional Meshwork with Hydrogel-Like Properties. *Science* 314, 815–817.
- Gabriel, G., Herwig, A., Klenk, H.-D., 2008. Interaction of Polymerase Subunit PB2 and NP with Importin $\alpha 1$ Is a Determinant of Host Range of Influenza A Virus. *PLoS Pathog.* 4, e11.
- Gall, J.G., 1967. Octagonal nuclear pores. *J. Cell Biol.* 32, 391–399.
- *Gallucci, L., Kann, M., 2017. Nuclear Import of Hepatitis B Virus Capsids and Genome. *Viruses* 9, 21.
- García-Beato, R., Salas, M.L., Viñuela, E., Salas, J., 1992. Role of the host cell nucleus in the replication of African swine fever virus DNA. *Virology* 188, 637–649.
- Gauger, A.K., Goldstein, L.S., 1993. The Drosophila kinesin light chain. Primary structure and interaction with kinesin heavy chain. *J. Biol. Chem.* 268, 13657–13666.
- Goorha, R., 1982. Frog Virus 3 DNA Replication Occurs in Two Stages. *J. Virol.* 43, 519–528.
- Grandi, P., Dang, T., Pané, N., Shevchenko, A., Mann, M., Forbes, D., Hurt, E., 1997. Nup93, a Vertebrate Homologue of Yeast Nic96p, Forms a Complex with a Novel 205-kDa Protein and Is Required for Correct Nuclear Pore Assembly. *Mol. Biol. Cell* 8, 2017–2038.
- Granzow, H., Klupp, B.G., Mettenleiter, T.C., 2005. Entry of Pseudorabies Virus: an Immunogold-Labeling Study. *J. Virol.* 79, 3200–3205.
- *Greber, U.F., Flatt, J.W., 2019. Adenovirus Entry: From Infection to Immunity. *Annu. Rev. Virol.* 6, 177–197.
- Griffis, E., Altan, N., Lippincott-Schwartz, J., Powers, M., 2002. Nup98 Is a Mobile Nucleoporin With Transcription-Dependent Dynamics. *Mol. Biol. Cell* 13, 1282–1297.
- Griffis, E.R., Xu, S., Powers, M.A., 2003. Nup98 Localizes to Both Nuclear and Cytoplasmic Sides of the Nuclear Pore and Binds to Two Distinct Nucleoporin Subcomplexes. *Mol. Biol. Cell* 14, 600–610.
- Grünewald, K., Desai, P., Winkler, D.C., Heymann, J.B., Belnap, D.M., Baumeister, W., Steven, A.C., 2003. Three-Dimensional Structure of Herpes Simplex Virus from Cryo-Electron Tomography. *Science* 302, 1396–1398.
- Guan, T., Müller, S., Klier, G., Panté, N., Blevitt, J.M., Haner, M., Paschal, B., Aebi, U., Gerace, L., 1995. Structural analysis of the p62 complex, an assembly of O-linked glycoproteins that localizes near the central gated channel of the nuclear pore complex. *Mol. Biol. Cell* 6, 1591–1603.
- Guo, H., Jiang, D., Zhou, T., Cuconati, A., Block, T.M., Guo, J.-T., 2007. Characterization of the Intracellular Deproteinized Relaxed Circular DNA of Hepatitis B Virus: an Intermediate of Covalently Closed Circular DNA Formation. *J. Virol.* 81, 12472–12484.
- Haryanto, A., Schmitz, A., Rabe, B., Gassert, E., Vlachou, A., Kann, M., 2012. Analysis of the nuclear localization signal of the hepatitis B virus capsid. *Int. Res. J. Biochem. Bioinforma.* 2, 174–185.
- Hearps, A.C., Jans, D.A., 2006. HIV-1 integrase is capable of targeting DNA to the nucleus via an Importin α/β -dependent mechanism. *Biochem. J.* 398, 475–484.
- *Horníková, L., Bruščíková, K., Forstová, J., 2020. Microtubules in Polyomavirus Infection. *Viruses* 12, 121.

- Hülsmann, B.B., Labokha, A.A., Görlich, D., 2012. The Permeability of Reconstituted Nuclear Pores Provides Direct Evidence for the Selective Phase Model. *Cell* 150, 738–751.
- Hutten, S., Flotho, A., Melchior, F., Kehlenbach, R.H., 2008. The Nup358-RanGAP Complex Is Required for Efficient Importin α/β -dependent Nuclear Import. *Mol. Biol. Cell* 19, 2300–2310.
- Hutten, S., Kehlenbach, R.H., 2006. Nup214 Is Required for CRM1-Dependent Nuclear Protein Export In Vivo. *Mol. Cell Biol.* 26, 6772–6785.
- Jovasevic, V., Liang, L., Roizman, B., 2008. Proteolytic Cleavage of VP1-2 Is Required for Release of Herpes Simplex Virus 1 DNA into the Nucleus. *J. Virol.* 82, 3311–3319.
- Kann, M., Bischof, A., Gerlich, W.H., 1997. In vitro model for the nuclear transport of the hepadnavirus genome. *J. Virol.* 71, 1310–1316.
- Kann, M., Sodeik, B., Vlachou, A., Gerlich, W.H., Helenius, A., 1999. Phosphorylation-dependent Binding of Hepatitis B Virus Core Particles to the Nuclear Pore Complex. *J. Cell Biol.* 145, 45–55.
- Kataoka, N., Bachorik, J.L., Dreyfuss, G., 1999. Transportin-SR, a Nuclear Import Receptor for SR Proteins. *J. Cell Biol.* 145, 1145–1152.
- Kattenhorn, L.M., Korbel, G.A., Kessler, B.M., Spooner, E., Ploegh, H.L., 2005. A Deubiquitinating Enzyme Encoded by HSV-1 Belongs to a Family of Cysteine Proteases that Is Conserved across the Family Herpesviridae. *Mol. Cell* 19, 547–557.
- Kehlenbach, R.H., Dickmanns, A., Kehlenbach, A., Guan, T., Gerace, L., 1999. A Role for RanBP1 in the Release of CRM1 from the Nuclear Pore Complex in a Terminal Step of Nuclear Export. *J. Cell Biol.* 145, 645–657.
- *Kilcher, S., Mercer, J., 2015. DNA virus uncoating. *Virology* 479–480, 578–590.
- *Kim, Y.H., Han, M.-E., Oh, S.-O., 2017. The molecular mechanism for nuclear transport and its application. *Anat. Cell Biol.* 50, 77–85.
- *Komander, D., Rape, M., 2012. The Ubiquitin Code. *Annu. Rev. Biochem.* 81, 203–229.
- Kosinski, J., Mosalaganti, S., von Appen, A., Teimer, R., DiGuilio, A.L., Wan, W., Bui, K.H., Hagen, W.J.H., Briggs, J.A.G., Glavy, J.S., Hurt, E., Beck, M., 2016. Molecular architecture of the inner ring scaffold of the human nuclear pore complex. *Science* 352, 363–365.
- Kraemer, D., Wozniak, R.W., Blobel, G., Radu, A., 1994. The human CAN protein, a putative oncogene product associated with myeloid leukemogenesis, is a nuclear pore complex protein that faces the cytoplasm. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91, 1519–1523.
- Krull, S., Thyberg, J., Björkroth, B., Rackwitz, H.-R., Cordes, V.C., 2004. Nucleoporins as Components of the Nuclear Pore Complex Core Structure and Tpr as the Architectural Element of the Nuclear Basket. *Mol. Biol. Cell* 15, 4261–4277.
- Kutay, U., Bischoff, F.R., Kostka, S., Kraft, R., 1997. Export of Importin α from the Nucleus Is Mediated by a Specific Nuclear Transport Factor. *Cell* 90, 1061–1071.
- Kuznetsov, S.A., Vaisberg, E.A., Shanina, N.A., Magretova, N.N., Chernyak, V.Y., Gelfand, V.I., 1988. The quaternary structure of bovine brain kinesin. *EMBO J.* 7, 353–356.
- Li, P.P., Nakanishi, A., Shum, D., Sun, P.C.-K., Salazar, A.M., Fernandez, C.F., Chan, S.-W., Kasamatsu, H., 2001. Simian Virus 40 Vp1 DNA-Binding Domain Is Functionally

- Separable from the Overlapping Nuclear Localization Signal and Is Required for Effective Virion Formation and Full Viability. *J. Virol.* 75, 7321–7329.
- Lim, R.Y.H., Fahrenkrog, B., Köser, J., Schwarz-Herion, K., Deng, J., Aebi, U., 2007. Nanomechanical Basis of Selective Gating by the Nuclear Pore Complex. *Science* 318, 640–643.
- *Lin, D.H., Hoelz, A., 2019. The Structure of the Nuclear Pore Complex (An Update). *Annu. Rev. Biochem.* 88, 725–783.
- Lin, D.H., Stuwe, T., Schilbach, S., Rundlet, E.J., Perriches, T., Mobbs, G., Fan, Y., Thierbach, K., Huber, F.M., Collins, L.N., Davenport, A.M., Jeon, Y.E., Hoelz, A., 2016. Architecture of the symmetric core of the nuclear pore. *Science* 352, aaf1015.
- Loïodice, I., Alves, A., Rabut, G., van Overbeek, M., Ellenberg, J., Sibarita, J.-B., Doye, V., 2004. The Entire Nup107-160 Complex, Including Three New Members, Is Targeted as One Entity to Kinetochores in Mitosis. *Mol. Biol. Cell* 15, 3333–3344.
- Loret, S., Guay, G., Lippé, R., 2008. Comprehensive Characterization of Extracellular Herpes Simplex Virus Type 1 Virions. *J. Virol.* 82, 8605–8618.
- Lupberger, J., Schaedler, S., Peiran, A., Hildt, E., 2013. Identification and characterization of a novel bipartite nuclear localization signal in the hepatitis B virus polymerase. *World J. Gastroenterol.* WJG 19, 8000–8010.
- Makise, M., Mackay, D.R., Elgort, S., Shankaran, S.S., Adam, S.A., Ullman, K.S., 2012. The Nup153-Nup50 Protein Interface and Its Role in Nuclear Import. *J. Biol. Chem.* 287, 38515–38522.
- Mansfeld, J., Güttinger, S., Hawryluk-Gara, L.A., Panté, N., Mall, M., Galy, V., Haselmann, U., Mühlhäusser, P., Wozniak, R.W., Mattaj, I.W., Kutay, U., Antonin, W., 2006. The Conserved Transmembrane Nucleoporin NDC1 Is Required for Nuclear Pore Complex Assembly in Vertebrate Cells. *Mol. Cell* 22, 93–103.
- Matreyek, K.A., Engelman, A., 2011. The Requirement for Nucleoporin NUP153 during Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection Is Determined by the Viral Capsid. *J. Virol.* 85, 7818–7827.
- Matreyek, K.A., Yücel, S.S., Li, X., Engelman, A., 2013. Nucleoporin NUP153 Phenylalanine-Glycine Motifs Engage a Common Binding Pocket within the HIV-1 Capsid Protein to Mediate Lentiviral Infectivity. *PLoS Pathog.* 9, e1003693.
- Mettenleiter, T.C., 2016. Breaching the Barrier—The Nuclear Envelope in Virus Infection. *J. Mol. Biol.* 428, 1949–1961.
- Miller, B.R., Powers, M., Park, M., Fischer, W., Forbes, D.J., 2000. Identification of a New Vertebrate Nucleoporin, Nup188, with the Use of a Novel Organelle Trap Assay. *Mol. Biol. Cell* 11, 3381–3396.
- Mitchell, J.M., Mansfeld, J., Capitanio, J., Kutay, U., Wozniak, R.W., 2010. Pom121 links two essential subcomplexes of the nuclear pore complex core to the membrane. *J. Cell Biol.* 191, 505–521.
- Moeller, A., Kirchdoerfer, R.N., Potter, C.S., Carragher, B., Wilson, I.A., 2012. Organization of the Influenza Virus Replication Machinery. *Science* 338, 1631–1634.
- Moroianu, J., Blobel, G., Radu, A., 1995. Previously identified protein of uncertain function is karyopherin α and together with karyopherin β docks import substrate at nuclear pore complexes. *Proc Natl Acad Sci USA* 92, 2008–2011.

- Nakada, R., Hirano, H., Matsuura, Y., 2015. Structure of importin- α bound to a non-classical nuclear localization signal of the influenza A virus nucleoprotein. *Sci. Rep.* 5, 15055.
- Nakanishi, A., Shum, D., Morioka, H., Otsuka, E., Kasamatsu, H., 2002. Interaction of the Vp3 Nuclear Localization Signal with the Importin α 2/ β Heterodimer Directs Nuclear Entry of Infecting Simian Virus 40. *J. Virol.* 76, 9368–9377.
- Newcomb, W.W., Juhas, R.M., Thomsen, D.R., Homa, F.L., Burch, A.D., Weller, S.K., Brown, J.C., 2001. The UL6 Gene Product Forms the Portal for Entry of DNA into the Herpes Simplex Virus Capsid. *J. Virol.* 75, 10923–10932.
- Ogawa, Y., Miyamoto, Y., Oka, M., Yoneda, Y., 2012. The Interaction Between Importin- α and Nup153 Promotes Importin- α / β -Mediated Nuclear Import. *Traffic* 13, 934–946.
- Ojala, P.M., Sodeik, B., Ebersold, M.W., Kutay, U., Helenius, A., 2000. Herpes Simplex Virus Type 1 Entry into Host Cells: Reconstitution of Capsid Binding and Uncoating at the Nuclear Pore Complex In Vitro. *Mol. Cell. Biol.* 20, 4922–4931.
- Oka, M., Yoneda, Y., 2018. Importin α : functions as a nuclear transport factor and beyond. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci* 94, 259–274.
- O’Neill, R.E., Jaskunas, R., Blobel, G., Palese, P., Moroianu, J., 1995. Nuclear Import of Influenza Virus RNA Can Be Mediated by Viral Nucleoprotein and Transport Factors Required for Protein Import. *J. Biol. Chem.* 270, 22701–22704.
- Onischenko, E., Stanton, L.H., Madrid, A.S., Kieselbach, T., Weis, K., 2009. Role of the Ndc1 interaction network in yeast nuclear pore complex assembly and maintenance. *J. Cell Biol.* 185, 475–491.
- Paschal, B.M., Gerace, L., 1995. Identification of NTF2, a cytosolic factor for nuclear import that interacts with nuclear pore complex protein p62. *J. Cell Biol.* 129, 925–937.
- Padeloup, D., Blondel, D., Isidro, A.L., Rixon, F.J., 2009. Herpesvirus Capsid Association with the Nuclear Pore Complex and Viral DNA Release Involve the Nucleoporin CAN/Nup214 and the Capsid Protein pUL25. *J. Virol.* 83, 6610–6623.
- Preston, V.G., Murray, J., Preston, C.M., McDougall, I.M., Stow, N.D., 2008. The UL25 Gene Product of Herpes Simplex Virus Type 1 Is Involved in Uncoating of the Viral Genome. *J. Virol.* 82, 6654–6666.
- Qu, Q., Sawa, H., Suzuki, T., Semba, S., Henmi, C., Okada, Y., Tsuda, M., Tanaka, S., Atwood, W.J., Nagashima, K., 2004. Nuclear Entry Mechanism of the Human Polyomavirus JC Virus-like Particle: Role of importins and the nuclear pore complex. *J. Biol. Chem.* 279, 27735–27742.
- Rabe, B., Delaleau, M., Bischof, A., Foss, M., Sominskaya, I., Pumpens, P., Cazenave, C., Castroviejo, M., Kann, M., 2009. Nuclear Entry of Hepatitis B Virus Capsids Involves Disintegration to Protein Dimers followed by Nuclear Reassociation to Capsids. *PLoS Pathog.* 5, e1000563.
- Rabe, B., Glebe, D., Kann, M., 2006. Lipid-Mediated Introduction of Hepatitis B Virus Capsids into Nonsusceptible Cells Allows Highly Efficient Replication and Facilitates the Study of Early Infection Events. *J. Virol.* 80, 5465–5473.
- Radu, A., Blobel, G., Moore, M.S., 1995. Identification of a protein complex that is required for nuclear protein import and mediates docking of import substrate to distinct nucleoporins. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92, 1769–1773.

- Radu, Aurelian, Moore, M.S., Blobel, G., 1995. The peptide repeat domain of nucleoporin Nup98 functions as a docking site in transport across the nuclear pore complex. *Cell* 81, 215–222.
- Raveh, B., Karp, J.M., Sparks, S., Dutta, K., Rout, M.P., Sali, A., Cowburn, D., 2016. Slide-and-exchange mechanism for rapid and selective transport through the nuclear pore complex. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 113, E2489–E2497.
- Ravindran, M.S., Bagchi, P., Inoue, T., Tsai, B., 2015. A Non-enveloped Virus Hijacks Host Disaggregation Machinery to Translocate across the Endoplasmic Reticulum Membrane. *PLoS Pathog.* 11, e1005086.
- Ravindran, M.S., Engelke, M.F., Verhey, K.J., Tsai, B., 2017. Exploiting the kinesin-1 molecular motor to generate a virus membrane penetration site. *Nat. Commun.* 8, 15496.
- Ravindran, M.S., Spriggs, C.C., Verhey, K.J., Tsai, B., 2018. Dynein Engages and Disassembles Cytosol-Localized Simian Virus 40 To Promote Infection. *J. Virol.* 92, e00353-18.
- Reichelt, R., Holzenburg, A., Buhle, E.L., Jarnik, M., Engel, A., Aebi, U., 1990. Correlation between structure and mass distribution of the nuclear pore complex and of distinct pore complex components. *J. Cell Biol.* 110, 883–894.
- Ren, Y., Seo, H.-S., Blobel, G., Hoelz, A., 2010. Structural and functional analysis of the interaction between the nucleoporin Nup98 and the mRNA export factor Rae1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 10406–10411.
- Rexach, M., Blobel, G., 1995. Protein Import into Nuclei: Association and Dissociation Reactions Involving Transport Substrate, Transport Factors, and Nucleoporins. *Cell* 83, 683–692.
- Ribbeck, K., Görlich, D., 2002. The permeability barrier of nuclear pore complexes appears to operate via hydrophobic exclusion. *EMBO J.* 21, 2664–2671.
- Ribbeck, K., Lipowsky, G., Kent, H.M., Stewart, M., Görlich, D., 1998. NTF2 mediates nuclear import of Ran. *EMBO J.* 17, 6587–6598.
- Ritterhoff, T., Das, H., Hofhaus, G., Schröder, R.R., Flotho, A., Melchior, F., 2016. The RanBP2/RanGAP1*SUMO1/Ubc9 SUMO E3 ligase is a disassembly machine for Crm1-dependent nuclear export complexes. *Nat. Commun.* 7, 11482.
- Sachdev, R., Sieverding, C., Flötenmeyer, M., Antonin, W., 2012. The C-terminal domain of Nup93 is essential for assembly of the structural backbone of nuclear pore complexes. *Mol. Biol. Cell* 23, 740–749.
- *San Martín, C., 2012. Latest Insights on Adenovirus Structure and Assembly. *Viruses* 4, 847–877.
- *Schädler, S., Hildt, E., 2009. HBV Life Cycle: Entry and Morphogenesis. *Viruses* 1, 185–209.
- Schaller, T., Ocwieja, K.E., Rasaiyaah, J., Price, A.J., Brady, T.L., Roth, S.L., Hué, S., Fletcher, A.J., Lee, K., KewalRamani, V.N., Noursadeghi, M., Jenner, R.G., James, L.C., Bushman, F.D., Towers, G.J., 2011. HIV-1 Capsid-Cyclophilin Interactions Determine Nuclear Import Pathway, Integration Targeting and Replication Efficiency. *PLoS Pathog.* 7, e1002439.
- Schmitz, A., Schwarz, A., Foss, M., Zhou, L., Rabe, B., Hoellenriegel, J., Stoeber, M., Panté, N., Kann, M., 2010. Nucleoporin 153 Arrests the Nuclear Import of Hepatitis B Virus Capsids in the Nuclear Basket. *PLoS Pathog.* 6, e1000741.

- Schrader, N., Koerner, C., Koessmeier, K., Bangert, J.-A., Wittinghofer, A., Stoll, R., Vetter, I.R., 2008. The Crystal Structure of the Ran-Nup153ZnF2 Complex: a General Ran Docking Site at the Nuclear Pore Complex. *Structure* 16, 1116–1125.
- Schramm, B., Locker, J.K., 2005. Cytoplasmic Organization of POXvirus DNA Replication. *Traffic* 6, 839–846.
- Selzer, L., Kant, R., Wang, J.C.-Y., Bothner, B., Zlotnick, A., 2015. Hepatitis B Virus Core Protein Phosphorylation Sites Affect Capsid Stability and Transient Exposure of the C-terminal Domain. *J. Biol. Chem.* 290, 28584–28593.
- Sodeik, B., Ebersold, M.W., Helenius, A., 1997. Microtubule-mediated Transport of Incoming Herpes Simplex Virus 1 Capsids to the Nucleus. *J. Cell Biol.* 136, 1007–1021.
- Soldatova, I., Prilepskaja, T., Abrahamyan, L., Forstová, J., Huérfano, S., 2018. Interaction of the Mouse Polyomavirus Capsid Proteins with Importins Is Required for Efficient Import of Viral DNA into the Cell Nucleus. *Viruses* 10, 165.
- Sowd, G.A., Serrao, E., Wang, H., Wang, W., Fadel, H.J., Poeschla, E.M., Engelman, A.N., 2016. A critical role for alternative polyadenylation factor CPSF6 in targeting HIV-1 integration to transcriptionally active chromatin. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 113, E1054–E1063.
- Spear, P.G., Roizman, B., 1972. Proteins Specified by Herpes Simplex Virus. V. Purification and Structural Proteins of the Herpesvirion. *J. Virol.* 9, 143–159.
- Strunze, S., Engelke, M.F., Wang, I.-H., Puntener, D., Boucke, K., Schleich, S., Way, M., Schoenenberger, P., Burckhardt, C.J., Greber, U.F., 2011. Kinesin-1-Mediated Capsid Disassembly and Disruption of the Nuclear Pore Complex Promote Virus Infection. *Cell Host Microbe* 10, 210–223.
- Su, W.-C., Chen, Y.-C., Tseng, C.-H., Hsu, P.W.-C., Tung, K.-F., Jeng, K.-S., Lai, M.M.C., 2013. Pooled RNAi screen identifies ubiquitin ligase Itch as crucial for influenza A virus release from the endosome during virus entry. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 110, 17516–17521.
- Tsirkone, V.G., Blokken, J., De Wit, F., Breemans, J., De Houwer, S., Debyser, Z., Christ, F., Strelkov, S.V., 2017. N-terminal half of transportin SR2 interacts with HIV integrase. *J. Biol. Chem.* 292, 9699–9710.
- Ullman, K.S., Shah, S., Powers, M.A., Forbes, D.J., 1999. The Nucleoporin Nup153 Plays a Critical Role in Multiple Types of Nuclear Export. *Mol. Biol. Cell* 10, 649–664.
- Vayda, M.E., Rogers, A.E., Flint, S.J., 1983. The structure of nucleoprotein cores released from adenovirions. *Nucleic Acids Res.* 11, 441–460.
- Vollmer, B., Lorenz, M., Moreno-Andrés, D., Bodenhöfer, M., De Magistris, P., Astrinidis, S.A., Schooley, A., Flötenmeyer, M., Leptihn, S., Antonin, W., 2015. Nup153 Recruits the Nup107-160 Complex to the Inner Nuclear Membrane for Interphasic Nuclear Pore Complex Assembly. *Dev. Cell* 33, 717–728.
- von Appen, A., Kosinski, J., Sparks, L., Ori, A., DiGuilio, A.L., Vollmer, B., Mackmull, M.-T., Banterle, N., Parca, L., Kastritis, P., Buczak, K., Mosalaganti, S., Hagen, W., Andres-Pons, A., Lemke, E.A., Bork, P., Antonin, W., Glavy, J.S., Bui, K.H., Beck, M., 2015. In situ structural analysis of the human nuclear pore complex. *Nature* 526, 140–143.

- Wälde, S., Thakar, K., Hutten, S., Spillner, C., Nath, A., Rothbauer, U., Wiemann, S., Kehlenbach, R.H., 2012. The Nucleoporin Nup358/RanBP2 Promotes Nuclear Import in a Cargo- and Transport Receptor-Specific Manner. *Traffic* 13, 218–233.
- Wang, P., Palese, P., O’Neill, R.E., 1997. The NPI-1/NPI-3 (Karyopherin α) Binding Site on the Influenza A Virus Nucleoprotein NP Is a Nonconventional Nuclear Localization Signal. *J. Virol.* 71, 1850–1856.
- Watanabe, T., Watanabe, S., Kawaoka, Y., 2010. Cellular Networks Involved in the Influenza Virus Life Cycle. *Cell Host Microbe* 7, 427–439.
- Wente, S.R., Rout, M.P., Blobel, G., 1992. A new family of yeast nuclear pore complex proteins. *J. Cell Biol.* 119, 705–723.
- *Whittaker, G.R., Kann, M., Helenius, A., 2000. Viral Entry into the Nucleus. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 16, 627–651.
- Wodrich, H., Cassany, A., D’Angelo, M.A., Guan, T., Nemerow, G., Gerace, L., 2006. Adenovirus Core Protein pVII Is Translocated into the Nucleus by Multiple Import Receptor Pathways. *J. Virol.* 80, 9608–9618.
- Woodward, C.L., Prakobwanakit, S., Mosessian, S., Chow, S.A., 2009. Integrase Interacts with Nucleoporin NUP153 To Mediate the Nuclear Import of Human Immunodeficiency Virus Type 1. *J. Virol.* 83, 6522–6533.
- *Woodward, C.L., Wu, J., Chow, S.A., 2013. Nuclear Import: HIV-1 Goes NUPs, in: Hope, T.J., Stevenson, M., Richman, D. (Eds.), *Encyclopedia of AIDS*. Springer New York, New York, NY, 1573–1581. ISBN 978-1-4614-9610-6
- Wu, W.W.H., Weaver, L.L., Panté, N., 2007. Ultrastructural Analysis of the Nuclear Localization Sequences on Influenza A Ribonucleoprotein Complexes. *J. Mol. Biol.* 374, 910–916.
- Yeh, C.T., Liaw, Y.F., Ou, J.H., 1990. The arginine-rich domain of hepatitis B virus precore and core proteins contains a signal for nuclear transport. *J. Virol.* 64, 6141–6147.
- Zaitseva, L., Cherepanov, P., Leyens, L., Wilson, S.J., Rasaiyaah, J., Fassati, A., 2009. HIV-1 exploits importin 7 to maximize nuclear import of its DNA genome. *Retrovirology* 6, 11.