

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

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



**Karolína Anderová**

Vnitrobuněčné restrikční faktory malých virů s DNA genomem  
Intracellular restriction factors of small DNA viruses

Bakalářská práce

Školitel: Doc. RNDr. Jitka Forstová, CSc.

Praha, 2019

### Prohlášení

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

V Praze, 9. 5. 2019

Karolína Anderová

.....

## Poděkování

Chtěla bych poděkovat Doc. RNDr. Jitce Forstové, CSc. za cenné rady, připomínky a vstřícnost při zpracovávání bakalářské práce.

# Obsah

## Seznam použitých zkratk

### Abstrakt

|  |           |
|--|-----------|
| <b>1. Úvod.....</b>  | <b>1</b>  |
| <b>2. Rozpoznání virových patogenů a jím indukované signalizační dráhy .....</b> | <b>3</b>  |
| 2.1. Rozpoznání virových patogenů .....  | 3         |
| 2.1.1. Intracelulární senzory virových DNA .....                                 | 4         |
| 2.2. Obecné restrikční faktory namířené proti řadě virů .....                    | 9         |
| 2.2.1. AID/APOBEC proteinová rodina .....  | 9         |
| 2.2.2. Jaderná tělíska PML.....  | 11        |
| <b>3. Vnitrobuněčné restrikční faktory malých virů s DNA genomem .....</b>       | <b>14</b> |
| 3.1. Virus hepatitidy B .....  | 15        |
| 3.1.1. Charakteristika a replikační cyklus .....                                 | 15        |
| 3.1.2. Restrikční faktory.....   | 16        |
| 3.1.2.1. Smc5/6.....   | 16        |
| 3.1.2.2. SAMHD1 .....  | 18        |
| 3.1.2.3. AID/APOBEC .....  | 19        |
| 3.1.2.4. Ostatní restrikční faktory.....   | 20        |
| 3.2. Parvoviry.....  | 22        |
| 3.2.1. Charakteristika čeledi a replikační cyklus .....                          | 22        |
| 3.2.2. Restrikční faktory.....   | 23        |
| 3.3. Polyomaviry .....   | 25        |
| 3.3.1. Charakteristika čeledi a replikační cyklus .....                          | 25        |
| 3.3.2. Restrikční faktory.....   | 26        |
| 3.4. Papillomaviry .....   | 27        |
| 3.4.1. Charakteristika čeledi a replikační cyklus .....                          | 27        |
| 3.4.2. Restrikční faktory.....   | 29        |
| <b>4. Závěr .....</b>  | <b>33</b> |
| <b>5. Literatura.....</b>  | <b>34</b> |

## Seznam použitých zkratek

|               |  |   |
|---------------|--|---|
| <b>5AzaC</b>  | 5'-aza-2'-deoxycytidine  | 5'-aza-2'-deoxycytidin  |
| <b>A</b>      | adenine  | adenin  |
| <b>AAV</b>    | adeno-associated virus   | na adenoviru závislý (parvo)virus   |
| <b>ACF</b>    | APOBEC1 complementation factor                                   | komplementační faktor proteinu APOBEC1  |
| <b>ADP</b>    | adenosine diphosphate  | adenosindifosfát  |
| <b>AID</b>    | activation-induced cytidine deaminase                            | aktivací indukovaná cytidin deamináza   |
| <b>AIM2</b>   | absent in melanoma 2   | chybějící v melanomu 2  |
| <b>ALT</b>    | alternative lengthening of telomeres                             | alternativní prodlužování telomer   |
| <b>AMP</b>    | adenosine monophosphate  | adenosinmonofosfát  |
| <b>AP-1</b>   | activator protein 1  | aktivační protein 1   |
| <b>APAR</b>   | autonomous parvovirus-associated replication                     | replikace spojená s autonomním parvovirem   |
| <b>APL</b>    | acute promyelotic leukemia                                       | akutní promyeloidní leukemie  |
| <b>APOBEC</b> | apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide like | katalytické polypeptidy podobné enzymu upravujícího mRNA pro apolipoprotein B, konzervovaná rodina cytidin deamináz |
| <b>ASC</b>    | apoptosis-associated speck-like protein containing CARD          | s apoptózou spojený protein podobný speck obsahující CARD doménu  |
| <b>ATM</b>    | ataxia-telangiectasia mutated                                    | v ataxia-telangiectasia mutovaná  |
| <b>ATP</b>    | adenosine triphosphate   | adenosintrifosfát   |
| <b>ATRX</b>   | $\alpha$ -thalassemia mental retardation X-linked protein        | protein mentální retardace způsobené $\alpha$ -talasemií spojenou s chromosomem X                                   |
| <b>BCR</b>    | B-cell receptor  | receptor B-buněk  |
| <b>BKPyV</b>  | BK polyomavirus  | BK virus  |
| <b>BRCA1</b>  | breast cancer 1  | rakovina prsu 1   |
| <b>BS1</b>    | super-agonistic tetravalent bispecific antibody                  | super agonistická tetravalentní bispecifická protilátka   |
| <b>BST-2</b>  | bone marrow stromal cell antigen 2                               | antigen 2 stromálních buněk kostní dřene  |
| <b>C</b>      | cytosine   | cytosin   |
| <b>CAA</b>    | glutamine  | glutamin  |
| <b>CARD</b>   | caspase recruitment domain                                       | doména rekrutující kaspázu  |
| <b>CBE11</b>  | bivalent anti-LT $\beta$ R monoclonal antibody                   | bivalentní monoklonální protilátka proti LT $\beta$ R   |
| <b>cccDNA</b> | covalently closed circular DNA                                   | kovalentně uzavřená kružnicová DNA  |
| <b>CDA</b>    | cytidine deaminase domain  | cytidin deaminázová doména  |
| <b>cDNA</b>   | complementary DNA  | komplementární DNA  |
| <b>CDNs</b>   | cyclic dinucleotides   | cyklické dinukleotidy   |
| <b>cGAMP</b>  | cyclic GMP-AMP   | cyklické GMP-AMP  |
| <b>cGAS</b>   | cyclic GMP-AMP synthase  | cyklická GMP-AMP syntáza  |

|                  |   |  |
|------------------|---|--|
| <b>CMV</b>       | Cytomegalovirus                                   | Cytomegalovirus  |
| <b>CpG</b>       | cytosine-phosphate-guanine                        | cytosin-fosfát-guanin                                    |
| <b>CR3</b>       | coding region 3                                   | kódující oblast 3  |
| <b>Cys</b>       | cysteine  | cystein  |
| <b>DAI</b>       | DNA-dependent activator of IFN-regulatory factors | na DNA závislý aktivátor regulačních faktorů interferonu |
| <b>DAMP</b>      | danger associated molecular pattern               | molekulární vzorec asociované s nebezpečím               |
| <b>DAPI</b>      | 4',6-diamidino-2-phenylindole                     | 4',6-diamidin-2-fenylindol                               |
| <b>DAXX</b>      | death domain associated protein                   | adaptorový protein DAXX asociovaný s death doménou       |
| <b>DC</b>        | dendritic cell                                    | dendritická buňka  |
| <b>DDB1-CUL4</b> | DNA damage binding protein 1-Cullin-4             | protein 1 vázající se k poškozené DNA-cullin4            |
| <b>DDR</b>       | DNA damage response                               | odpověď na poškození DNA                                 |
| <b>dGTP</b>      | deoxyguanosine triphosphate                       | deoxyguanosintrifosfát                                   |
| <b>DNA</b>       | deoxyribonucleic acid                             | deoxyribonukleová kyselina                               |
| <b>DNA-PK</b>    | DNA-dependent protein kinase                      | na DNA závislá protein kináza                            |
| <b>DNA-PKcs</b>  | DNA-dependent protein kinase, catalytic subunit   | katalytická podjednotka na DNA závislé protein kinázy    |
| <b>dNTPs</b>     | deoxynucleosid triphosphate                       | deoxynukleosid trifosfát                                 |
| <b>DSB</b>       | dsDNA break                                       | dvouřetězcový zlom DNA                                   |
| <b>dsDNA</b>     | double stranded DNA                               | dvouřetězcová DNA  |
| <b>EBV</b>       | Epstein Barr virus                                | Virus Epstein-Barrové                                    |
| <b>EIF4-e</b>    | eukaryotic translation initiation factor 4E       | eukaryotický iniciační translační faktor 4E              |
| <b>EMCV</b>      | encephalomyocarditis virus                        | virus encefalomyokarditidy                               |
| <b>ER</b>        | endoplasmic reticulum                             | endoplasmatické retikulum                                |
| <b>FAM111A</b>   | family with sequence similarity 111 member A      | člen A proteinové rodiny se sekvenční podobností 111     |
| <b>G</b>         | guanine   | guanin   |
| <b>GA</b>        | Golgi apparatus                                   | Golgiho aparát   |
| <b>GMP</b>       | guanosine monophosphate                           | guanosinmonofosfát                                       |
| <b>GPI</b>       | glycophosphatidylinositol                         | glykofosfatidylinositol                                  |
| <b>GTP</b>       | guanosine triphosphate                            | guanosintrifosfát  |
| <b>HbeAg</b>     | HBV e antigen                                     | HBV e antigen  |
| <b>HBV</b>       | Hepatitis B virus                                 | Virus Hepatitidy B                                       |
| <b>HBx</b>       | HBV protein X                                     | protein X viru hepatitidy B                              |
| <b>HCC</b>       | hepatocellular carcinoma                          | hepatocelulární karcinom                                 |
| <b>HCMV</b>      | human cytomegalovirus                             | lidský cytomegalovirus                                   |
| <b>HIV-1</b>     | Human immunodeficiency virus type-1               | Virus lidské imunitní nedostatečnosti                    |
| <b>HP1</b>       | heterochromatin protein 1                         | heterochromatinový protein 1                             |
| <b>HPV</b>       | human papillomavirus                              | lidský papillomavirus                                    |
| <b>HSV</b>       | Herpes simplex virus                              | heprle simplex virus                                     |
| <b>HVS</b>       | Herpesvirus saimiri                               | Herpes virus kotulu veverkovitého                        |
| <b>hZAP-L</b>    | human ZAP-large                                   | lidský protein ZAP-velký                                 |
| <b>hZAP-S</b>    | human ZAP-small                                   | lidský protein ZAP-malý                                  |
| <b>ICP0</b>      | infected cell polypeptide 0                       | polypeptid infikovaných buněk                            |

|               |   |   |
|---------------|---|---|
| <b>IFI16</b>  | interferon gamma inducible protein 16                       | protein 16 indukovatelný interferonem gamma                         |
| <b>IFIT1</b>  | interferon induced protein with tetratricopeptide repeats 1 | interferonem indukovaný protein 1<br>s tetratricopeptidovými motivy |
| <b>IFN</b>    | interferon  | interferon  |
| <b>IGC</b>    | interchromatin granule clusters                             | interchromatinové granulové shluky                                  |
| <b>IKK</b>    | IkappaB kinase  | IkappaB kináza  |
| <b>IL</b>     | interleukine  | interleukin   |
| <b>IPS-1</b>  | interferon-beta promoter stimulator 1                       | stimulátor promotoru interferonu beta 1                             |
| <b>IRF</b>    | interferon regulatory factor                                | faktor regulující interferony                                       |
| <b>ISGs</b>   | interferon stimulated genes                                 | interferonem stimulované geny                                       |
| <b>JCPyV</b>  | JC polyomavirus   | Polyomavirus JC   |
| <b>KSHV</b>   | Kaposi sarcoma-associated herpesvirus                       | Virus Kaposiho sarkomu  |
| <b>LTβR</b>   | lymphotoxin beta receptor                                   | beta lymfotoxinový receptor   |
| <b>MCPyV</b>  | Merkell cell polyomavirus                                   | Polyomavirus Merkelových buněk                                      |
| <b>MHV-68</b> | murine gammaherpesvirus-68                                  | myší gammaherpesvirus-68  |
| <b>MLV</b>    | murine leukemia virus                                       | virus myší leukemie   |
| <b>MPyV</b>   | mouse polyomavirus  | myší polyomavirus   |
| <b>MRE11</b>  | meiotic recombination 11 protein                            | meiotický rekombinační protein 11                                   |
| <b>mRNA</b>   | messenger RNA   | mediátorová RNA   |
| <b>MVM</b>    | minute virus of mice  | myší minute virus   |
| <b>MyD88</b>  | myeloid differentiation primary response 88                 | protein primární odpovědi myeloidní diferenciaci 88                 |
| <b>NCRR</b>   | non-coding regulatory region                                | nekódující regulační oblast   |
| <b>ND10</b>   | nuclear domain 10   | nukleární doména 10   |
| <b>NES</b>    | nuclear export signal                                       | jaderný exportní signál   |
| <b>NF-κB</b>  | nuclear factor kappaB                                       | jaderný faktor kappa B  |
| <b>NK</b>     | natural killer  | přirozeně cytotoxické buňky   |
| <b>NLR</b>    | NOD-like receptor   | receptor podobný NOD  |
| <b>NLRC4</b>  | NLR family CARD domain-containing protein 4                 | protein 4 rodiny NLR obsahující CARD doménu                         |
| <b>NLRP3</b>  | NOD-like receptor pyrin domain containing 3                 | receptor podobný NOD obsahující pyrin doménu 3                      |
| <b>NLS</b>    | nuclear localization signal                                 | jaderný lokalizační signál  |
| <b>NOD</b>    | nucleotide-binding oligomerization domain                   | nukleotid vazebná oligomerizační doména                             |
| <b>NS</b>     | non-structural protein                                      | nestrukturní protein  |
| <b>NSE</b>    | neuron-specific enolase protein                             | enolázový protein specifický pro neuron                             |
| <b>NTCP</b>   | sodium (natrium)-taurocholate cotransporting polypeptide    | polypeptid kotransportující taurocholát sodný                       |
| <b>ORF</b>    | open reading frame  | otevřený čtecí rámec  |
| <b>ori</b>    | origin of replication                                       | replikační počátek  |
| <b>Pal</b>    | palindromatic sequence                                      | palindromatické sekvence  |
| <b>PAMP</b>   | patogen associated molecular pattern                        | molekulární vzory asociované s patogeny                             |

|                    |  |   |
|--------------------|--|---|
| <b>PARP-1</b>      | poly (ADP-ribose) polymerase 1   | poly (ADP-ribóza) polymeráza 1  |
| <b>pgRNA</b>       | pre-genomic RNA  | pre-genomová RNA  |
| <b>PHD</b>         | plant homeodomain  | plant homeodoména   |
| <b>PML NB</b>      | promyelocytic leukemia nuclear bodies  | promyelocytární leukemická jaderná tělíska  |
| <b>PPP-RNA</b>     | 5' triphosphate  | 5'trifosfát   |
| <b>pRb</b>         | retinoblastoma protein   | retinoblastomový protein  |
| <b>pre-mRNA</b>    | precursor mRNA   | prekurzorová mRNA   |
| <b>PRR</b>         | pattern recognition receptor   | receptor rozpoznávající vzory asociované s patogeny   |
| <b>PYD</b>         | pyrin  | pyrin   |
| <b>PYHIN</b>       | pyrin and HIN protein  | pyrin a HIN protein   |
| <b>RBCC</b>        | RING, B-box, Coiled-coil   | Skupina zinek vázajících proteinů s N-koncovým RING finger motivem následovaným zinek vázající doménou (B-box) a strukturou svinuté cívky (coiled-coil) |
| <b>rcDNA</b>       | relaxed circle DNA   | rozvolněná kružnicová DNA   |
| <b>RIG</b>         | retinoic acid-inducible gene-1   | gen 1 indukovatelný retinovou kyselinou   |
| <b>RING</b>        | really interesting new gene  | skutečně zajímavý nový gen  |
| <b>RIP3</b>        | receptor-interacting protein 3   | protein interagující s receptorem 3   |
| <b>RLR</b>         | RIG-I-like receptor  | receptor podobný RIG-I  |
| <b>RNA</b>         | ribonucleic acid   | ribonukleová kyselina   |
| <b>RNA-Pol III</b> | RNA-Polymerase III   | RNA polymeráza III  |
| <b>ROS</b>         | reactive oxygen species  | reaktivní kyslíkové radikály  |
| <b>RRM</b>         | RNA recognition motif  | motiv rozeznávající RNA   |
| <b>RS domain</b>   | arginine and serine residues domain  | doména obsahující argininy a seriny   |
| <b>RSV</b>         | Rous sarcoma virus   | virus Rousova sarkomu   |
| <b>S-Ag</b>        | middle tumor antigen   | střední tumorový antigen  |
| <b>SAMHD1</b>      | sterile alpha motif (SAM) and histidine/aspartic acid (HD) domain-containing protein 1 | protein 1 obsahující sterilní alfa motiv a histidin-aspartátovou doménu   |
| <b>Ser</b>         | serine   | serin   |
| <b>SF2/ASF</b>     | pre-mRNA splicing factor 2/alternative splicing factor                                 | pre-mRNA sestřihový faktor 2/faktor alternativního sestřihu   |
| <b>sgRNA</b>       | sub-genomic RNA  | sub-genomová RNA  |
| <b>SIM</b>         | SUMO-interacting motif   | SUMO-interakční motiv   |
| <b>siRNA</b>       | small interfering RNA  | malá interferující RNA  |
| <b>SIV</b>         | simian immunodeficiency virus  | opičí virus imunitní nedostatečnosti  |
| <b>SLE</b>         | systematic lupus erytematosus  | Systémový lupus erythematoses   |
| <b>Smc5/6</b>      | structural maintenance of chromosome5/6  | Protein strukturální údržby chromosomu5/6   |
| <b>Sp100</b>       | speckled 100   | Protein 100 s tečkovaným rozmístěním v jádře (protein jaderných tělísek)  |



|                   |  |  |
|-------------------|--|--|
| <b>Sp100/HMG</b>  | Sp100/High mobility group                          | Sp100/skupina proteinů vysoké mobility, sestřižená forma Sp100 |
| <b>SRSF1</b>      | serine/arginine splicing factor 1                  | serin/arginin sestřihový faktor 1                              |
| <b>ssDNA</b>      | single stranded DNA                                | jednořetězcová DNA   |
| <b>STING</b>      | Stimulator of Interferon Genes                     | stimulátor interferonových genů                                |
| <b>SUMO</b>       | small ubiquitin-like modifier                      | modifikátor podobný malému ubikvitinu                          |
| <b>SV40</b>       | simian virus 40                                    | opičí polyomavirus 40  |
| <b>T</b>          | thymine  | thymín   |
| <b>T-Ag</b>       | large tumor antigen                                | velký tumorový antigen   |
| <b>t-Ag</b>       | small tumor antigen                                | malý tumorový antigen  |
| <b>TANK</b>       | TRAF family member-associated NF-kappa B activator | aktivátor NF-kappaB asociovaný se členy rodiny TRAF            |
| <b>TBK1</b>       | TANK-binding kinase 1                              | TANK vazebná kináza 1  |
| <b>TCR</b>        | T-cell receptor                                    | T-buněčný receptor   |
| <b>TLR</b>        | toll-like receptor                                 | receptor podobný genu Toll                                     |
| <b>TNF</b>        | tumor necrosis factor                              | faktor nádorové nekrózy  |
| <b>TRAF</b>       | TNF receptor associated factor                     | faktor asociovaný s receptorem TNF                             |
| <b>TRIM</b>       | tripartite motif-containing family                 | proteinová rodina s tripartitním motivem                       |
| <b>Ub</b>         | ubiquitin  | ubikvitin  |
| <b>VACV</b>       | Vaccina virus                                      | Virus Vakcinie   |
| <b>Vif</b>        | viral infectivity factor                           | virový infekční faktor   |
| <b>ZAP</b>        | zinc finger antiviral protein                      | antivirový protein s motivem zinkových prstů                   |
| <b>ZDD doména</b> | zinc-dependent cytidine deaminase domain           | na zinku závislá cytidin deaminázová doména                    |
| <b>ZRE</b>        | ZAP-responsible element                            | ZAP-odpovědný element  |

## **Abstrakt**

Tématem této práce je shrnutí poznatků o proteinových restričních faktorech, které se uplatňují v infikovaných buňkách při infekci malými viry s DNA genomem čeledí *Hepadnaviridae*, *Parvoviridae*, *Polyomaviridae* a *Papillomaviridae*. Do práce jsou zahrnuty jak restriční faktory indukovatelné interferonem, tak faktory přirozené (intrinsic) imunity, produkované v buňkách konstitutivně. Zároveň jsou zmíněny mechanismy, jakými viry inhibiční účinky restričních faktorů překonávají. Jsou popsány faktory potlačující infekci viru Hepatitidy B jako PML jaderná tělíska a jejich komponenty, dále proteiny Smc5/6, SAMHD1, APOBEC, TRIM, ZAP a Tetherin. U čeledi *Parvoviridae* byly identifikovány jako restriční faktory deaminázy APOBEC a PML protein. Při infekci viry čeledi *Polyomaviridae* byly prozatím popsány restriční faktory FAM111A a SRSF1. Pro čeleď *Papillomaviridae* je diskutována restrikce PML jadernými tělíska a jejich složkou – proteinem Sp100, dále proteiny APOBEC, IFI16 a IFIT1.

**Klíčová slova:** malé viry s DNA genomem, vnitrobuněčné rozpoznání (sensing) DNA, restriční faktory, virové antagonistické mechanismy

## **Abstract**

The theme of this work is to summarize knowledge about protein restriction factors, which function in cells infected by small DNA viruses of families *Hepadnaviridae*, *Parvoviridae*, *Polyomaviridae* and *Papillomaviridae*. Both restriction factors induced by interferon and restriction factors of intrinsic immunity which are constitutively produced in cells are included in this work. At the same time, mechanisms by which viruses overcome the inhibition effects of restriction factors are mentioned. Restriction factors suppressing Hepatitis B virus infection like components of PML nuclear bodies and proteins Smc5/6, SAMHD1, APOBEC, TRIM, ZAP and Tetherin are described. For the representatives of *Parvoviridae* family, deaminases APOBEC and PML protein were identified as restriction factors. For the infection by polyomaviruses, restriction factors FAM111A and SRSF1 were described. Restriction by PML nuclear bodies and its component Sp100 and proteins APOBEC, IFI16 and IFIT1 is discussed for the *Papillomaviridae* family.

**Keywords:** small DNA viruses, intracellular DNA sensing, restriction factors, viral antagonistic mechanisms

## 1. Úvod

Po celou dobu evoluce soupeří viry s hostiteli v takzvaném evolučním „arms-race“, neboli závodě ve zbrojení. Na jedné straně soupeří virus s hostitelem o to, aby byl v hostiteli úspěšně replikován, na druhé straně hostitel hledá zároveň způsoby obrany jak inhibovat virovou infekci. Hostitelé a viry jsou tedy neustále pod vzájemným selekčním tlakem, díky čemuž dochází k velmi rychlému vývoji a změnám jak infekčních mechanismů u virů, tak obranných mechanismů u hostitelů (Abdul et al., 2018; Duggal and Emerman, 2012).

Hostitelé virů tak vyvinuli v průběhu evoluce komplexní mechanismy obrany – imunitní systém. Imunitní systém se skládá ze dvou složek – vrozené části imunitního systému a adaptivní části imunitního systému. Obě tyto části dále obsahují humorální a buněčnou část. Jak již z obou názvů vyplývá, humorální část je složena ze sekretovaných látek a sérových proteinů, buněčnou část tvoří různé typy buněk. Vrozená část imunitního systému je evolučně starší a zajišťuje prvotní a nejjednodušší obranu proti patogenu. Humorální část vrozené imunity představují cytokiny, interferony a komplement. Buněčná složka vrozené imunity je tvořena NK buňkami (natural killer) a monocyty, které dále diferencují na antigen prezentující dendritické buňky a fagocytující makrofágy (Hato and Dagher, 2015). Pro adaptivní složku imunitního systému platí, že humorální část zastupují protilátkové imunitní reakce a buněčná část je prezentována T a B lymfocyty (Nicholson, 2016).

Pod vrozenou část imunitního systému (innate immunity) spadá i tzv. přirozená složka imunitního systému (intrinsic immunity), jejíž komponenty jsou v buňkách konstitutivně produkovány (tj. nejsou indukovány interferonem nebo dalšími cytokiny) a v případě virové infekce ihned inhibičně odpovídají (Duggal and Emerman, 2012; Hannoun et al., 2016; Rajsbaum and García-Sastre, 2013). Přirozenou imunitu představují vnitrobuněčné senzory, jež detekují specifické patogení rysy proteinů a nukleových kyselin. Mezi tyto vnitrobuněčné senzory se řadí například endozomální Toll-like receptory (TLRs), RIG-I-like receptory (RLRs) a NOD-like receptory (NLRs) nebo senzory cGAS a IFI16 (Habjan and Pichlmair, 2015; Iwasaki and Medzhitov, 2015). Zároveň patří do přirozené imunity i některé restriční faktory. Restriční faktory mohou být zároveň senzory nukleových kyselin a následně zprostředkovávat restrikci virové infekce (Duggal and Emerman, 2012). Druhým typem restričních faktorů jsou ty, jež v buňkách konstitutivně produkovány nejsou, ale jsou stimulovány interferony (ISGs; interferon stimulated genes). Exprese restričních faktorů v buňkách je přísně kontrolována, jelikož tyto faktory mají destruktivní role a mohlo by dojít k poškození hostitelských buněk i v nepřítomnosti virové infekce. Viry nicméně vynalezly různorodé způsoby, jak tyto mechanismy přímo inhibovat nebo se jim vyhnout (Duggal and Emerman, 2012). Správné pochopení restričních mechanismů a virových antagonistických mechanismů by mohlo přinést poznatky využitelné v antivirové terapii.

Cílem bakalářské práce je shrnout dosud známé informace o proteinových restrikčních faktorech omezujících v infikovaných buňkách replikaci malých DNA virů. Většina poznatků v oblasti restrikce byla získána na modelech retrovirů a herpesvirů. V této práci budou představeny restrikční faktory pro virus Hepatitidy B, který se řadí do čeledě *Hepadnaviridae*, a jehož genom je transkribován (avšak nikoliv replikován) v buněčném jádře. Další viry, pro něž budou restrikční faktory popsány, spadají do čeledi *Parvoviridae*, *Polyomaviridae* nebo *Papillomaviridae*, přičemž transkripce i replikace jejich genomů je prováděna hostitelskými enzymy a spolu s morfogenezí virionů probíhá v buněčném jádře. Práce se nebude zabývat restrikcí zprostředkovanou microRNA.

## 2. Rozpoznání virových patogenů a jím indukované signalizační dráhy

### 2.1. Rozpoznání virových patogenů

Rozpoznávání přítomnosti virů v savčím hostiteli je zajišťováno senzorkými proteiny (PRR; pattern recognition receptors), které rozeznávají specifické vlastnosti patogenů (PAMPs; pathogen associated molecular pattern) a změny v hostitelském organismu jak na extracelulární, tak na intracelulární úrovni. Mezi tyto charakteristické rysy rozpoznávané receptory patří například specifické uspořádání vstupující virové částice, jednotlivých virových proteinů nebo nukleových kyselin. Zjednodušeně může být řečeno, že virové senzory reagují na přítomnost viru a tento signál zpracují a zahájí spuštění kaskády odpovídající imunitní reakce (Goubau et al., 2013; Habjan and Pichlmair, 2015).

Pro rozpoznávání virů je řada senzorů adaptována zejména na rozpoznávání virových nukleových kyselin, které mají jiné vlastnosti a modifikace než nukleové kyseliny hostitelských organismů. Specifické rysy DNA jsou velmi konzervované a díky tomu je výhodné využívat ji jako signál virové infekce. Při detekci virové nukleové kyseliny, která je jinak modifikovaná než hostitelská, nebo při detekci vlastní DNA nacházející se na neobvyklém místě, dochází ke spuštění vrozené imunitní odpovědi. V následujícím kroku dochází k aktivaci několika rodin transkripčních faktorů, mezi něž patří NF- $\kappa$ B (nuclear factor kappa B), AP-1 (activator protein 1) a interferon regulující faktory (IRFs; IFN regulatory factors), které indukují produkci interferonů (IFN I) a prozánětlivých cytokinů a chemokinů (Mansur et al., 2014).

Extracelulární rozpoznání (sensing) zastupují v první řadě receptory skupiny TLR. Tyto receptory jsou primárně umístěné na povrchu buněk, kde interagují s virovými povrchovými proteiny, avšak mohou se vyskytovat i uvnitř endozomů a interagovat přímo s virovými nukleovými kyselinami (Saito and Gale, 2007). Podle cizorodého ligandu je aktivován určitý typ receptoru a následuje specifická imunitní reakce. Tato práce se bude nadále zabývat vnitrobuněčným rozpoznáním virů a vnitrobuněčnými restričními faktory. Extracelulární faktory tudíž nebudou dále diskutovány.

K intracelulárnímu rozpoznání virových patogenů dochází primárně v cytoplasmě, avšak v nedávné době byly objeveny jaderné struktury, které se také účastní rozpoznávání virových patogenů. Tyto vnitrobuněčné senzory jsou specifické proteiny, které interagují s virovými nukleovými kyselinami a spouští imunitní reakci. Indukují buď přímou degradaci dané nukleové kyseliny, produkci cytokinů, navazující signalizaci nebo interagují s virovým replikačním cyklem a ve finální fázi vedou k inhibici virové infekce (Saito and Gale, 2007). Existuje množství senzorů RNA uplatňujících se v indukci protivirových obranných mechanismů. Jejich výčet je shrnut například v přehledu (Chow et al., 2018). Později byla objevena řada senzorů, které rozpoznávají DNA. Vnitrobuněčné DNA senzory úzce souvisí s vnitrobuněčnými restričními faktory inhibujícími replikaci DNA virů a budou proto rovněž detailněji rozebrány v následujících kapitolách.

Intracelulární receptory virových nukleových kyselin jsou specifické proteiny, které detekují virové nukleové kyseliny a jejich replikační meziprodukty díky jejich odlišnostem od buněčných nukleových kyselin nebo neobvyklému umístění v buňce. Následná signalizace spouští odpovídající imunitní reakce (Diebold, 2010). Virové senzory mohou po navázání nukleové kyseliny indukovat přímo jejich degradaci. Druhým způsobem reakce virových sensorů je spuštění navazujících signálních drah, které vedou k produkci cytokinů, převážně IFN typu I a změně hostitelských buněčných pochodů nutných pro virovou replikaci (Habjan and Pichlmair, 2015). Interferony typu I jsou několika druhů ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\epsilon$ ,  $\kappa$ ,  $\omega$ ). IFN- $\alpha$  se nachází v několika izoformách (Koyama et al., 2008).

### 2.1.1. Intracelulární senzory virových DNA

Přestože vnitrobuněčné rozpoznávání bylo objeveno poměrně nedávno, počet DNA sensorů se rozrůstá a k dnešnímu dni již jejich počet přesahuje desítku. Intenzivní studium přispělo k pochopení mechanismů, jakými DNA senzory indukují produkci interferonu, hlavního aktéra protivirových odpovědí (Paludan and Bowie, 2013). Ústřední molekulou většiny dosud známých signalizačních drah aktivovaných rozpoznáním DNA je protein STING (stimulator of interferon genes) (Dunphy et al., 2018).

**Protein DAI** byl prvním popsáním DNA senzorem. Tento protein interaguje se Z-DNA a poté spouští produkci IFN- $\alpha/\beta$  signální dráhou vedoucí přes aktivaci proteinu STING a IRF-3 (interferon regulatory factor-3) (Bhat and Fitzgerald, 2014; Yoneyama and Fujita, 2010). DAI byl popsán jako hlavní hráč v antivirové signalizaci při infekci HCMV (human cytomegalovirus) (Brennan and Bowie, 2010). Protein DAI je schopen tvořit komplexy s RIP3 kinázou (receptor-interacting protein 3), regulátorem programované nekrózy, a přispívat tak k zánětlivé buněčné smrti virem infikovaných buněk (Moriwaki and Chan, 2013). Poslední známou funkcí tohoto komplexu je indukce transkripčního faktoru NF- $\kappa$ B, který dále aktivuje produkci prozánětlivých cytokinů a chemokinů (Mansur et al., 2014).

Dalším DNA senzorem je **RNA-Pol III** (RNA-polymerase III). RNA-Pol III váže oblasti virového genomu bohaté na adenin a thymin a vytváří 5'trifosfát RNA (PPP-RNA), která je rozpoznávána RIG-I-like receptorem – senzorem RNA, který dále aktivuje dráhu vedoucí k indukci INF- $\beta$  (Chiu et al., 2009).

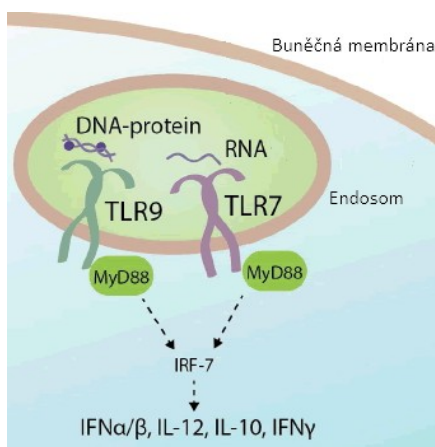
Senzory **DNA-PK** (DNA-dependent protein kinase) a **MRE11** (meiotic recombination 11 protein) jsou součástí DDR (DNA damage response). Tyto komplexy proteinů detekují poškozenou DNA a spouští signalizační dráhu vedoucí přes ATM (ataxia-telangiectasia mutated) kinázu k transkripci IFN (Dunphy et al., 2018) (Obrázek 3). DNA-PK je heterotrimerní komplex složený z heterodimeru DNA vazebných proteinů Ku70 a Ku80 a DNA-PK katalytické podjednotky DNA-PKcs (Sharif et al., 2017). Tento senzor funguje jak při detekci cizorodé DNA a indukci vrozených

imunitních reakcí, tak má důležitý význam v adaptivní části imunitního systému při generování vysoké diverzity protilátek. Kromě rolí v imunitních reakcích se DNA-PK navíc uplatňuje v opravách dsDNA zlomů (DSBs) při spojování jednotlivých konců (Mansur et al., 2014).

DNA vazebný senzor **AIM2** je společně s dalšími čtyřmi lidskými proteiny (IFI16, MNDNA, PYHIN1 a POP3) členem rodiny s PYRIN a HIN doménami (PYHIN). Tyto proteiny fungují při buněčném růstu, kontrole buněčného cyklu, buněčné diferenciaci, regulaci transkripce, apoptóze a tumor supresi (Connolly and Bowie, 2014). Bylo zjištěno, že protein AIM2 hraje důležitou roli v obraně proti infekci Virem Vakcinie (VACV). AIM2 je schopný pomocí HIN domény interagovat s cizorodou DNA a následně skrz PYRIN doménu indukovat vznik proteinového komplexu inflamazómu (Brennan and Bowie, 2010). Inflamazóm je složen z několika podjednotek, z nichž jednu představuje enzym kaspáza, která je schopná štěpit prekurzory interleukinů 1 a 18 (IL-1, IL-18), které dále zajišťují imunitní reakci (Habjan and Pichlmair, 2015).

Senzor **NLRP3** (NOD-like receptor pyrin domain containing 3) patří do rodiny NLRs. Doposud bylo popsáno 22 lidských NOD-like receptorů, z nichž některé jsou senzory RNA. Senzor NLRP3 rozpoznává jak virovou RNA, tak i DNA v kombinaci s ATP. Mechanismus rozpoznání není zatím příliš jasný (Chan and Gack, 2016).

Dalším významným NDA senzorem je **TLR9**. Tento receptor se nachází především na membránách endozomů. Strategické rozmístění senzorů struktur patogenů (PRRs) na jednotlivých buněčných subkompartmentech zajišťuje detekci specifických PAMPs a spuštění odpovídajících reakcí. Toll-like receptory na vnitřní membráně endozomu jsou významné pro rozlišení mezi vlastními hostitelskými nukleovými kyselinami, které se za normálních okolností v endozomech nevyskytují a patogenními nukleovými kyselinami, jež se do endozomů dostávají při infekci (Koyama et al., 2008). Hlavními TLRs endozomálních membrán jsou TLR3, TLR7, TLR8, a TLR9 (Hato and Dagher, 2015). DNA rozpoznávajícím TLR je TLR9. Pomocí toho senzoru je rozpoznávána nemetylovaná DNA s CpG motivem (CpG-DNA; cytosine-phosphate-guanine-DNA). Jeho role byla popsána u herpesvirů CMV (cytomegalovirus) nebo HSV-1, -2. Aktivovaná signální dráha vede přes adaptorový protein MyD88 (Koyama et al., 2008) (Obrázek 1).



**Obrázek 1: Schéma signalizační dráhy indukované Toll-like receptorem 9 (TLR9).** TLR9 se vyskytuje na endozomální membráně a rozpoznává nemetylovanou DNA s CpG motivy. Následně spouští signalizační kaskádu, jež vede skrze adaptorový protein MyD88, který indukuje IRF-7 (interferon regulatory factor-7). IRF-7 následně aktivuje expresi IFN $\alpha/\beta$ , interleukinu 12 a 10 (IL-12; IL-10) a IFN $\gamma$ . Na schématu je znázorněna i signalizační cesta endozomálního receptoru TLR7, který detekuje ssRNA a využívá stejnou signalizační cestu jako TLR9. Upraveno podle (M Eriksson et al., 2014).

Detekce patogenní DNA, která se v buňkách vyskytuje v neobvyklém množství nebo neobvyklých pozicích je zprostředkována převážně pomocí DNA senzoru **cGAS** (cyclic GMP-AMP (cGAMP) synthase). Funkčně je cGAS enzym nukleotidyl transferáza, jež je regulován pomocí IFN a hraje důležitou roli v navození antivirového stavu a spuštění imunitní reakce (Zevini et al., 2017). Protein cGAS je tvořen dvěma doménami vázajícími DNA a jednou doménou nukleotidyltransferázovou, zajišťující již zmíněnou enzymatickou funkci (Chen et al., 2016). Pokud není hostitel infikován virem a v hostitelském organismu se tedy nevyskytuje žádná cizorodá DNA, je cGAS přítomný v autoinhibovaném stavu (Zhang et al., 2014). Při infekci dochází k sekvenčně nezávislé vazbě cizorodé dsDNA pomocí aktivační smyčky přítomné v cGAS, za tvorby 2:2 komplexu. cGAS je schopný vázat i ssDNA, která je tvořena například jako intermediát při reverzní transkripci retrovirů a jež tvoří částečné sekundární struktury, jako vnitřní duplexy nebo duplex s ssDNA přesahy, tzv. Y struktura. Bylo zjištěno, že je možná i vazba dsRNA na cGAS, avšak není schopná tento senzor aktivovat. Díky konformační změně v aktivním centru indukované interakcí s DNA je enzym cGAS přeměněn na aktivní formu a spouští syntézu dvou fosfodiesterových vazeb mezi ATP a GTP a tím vznik cyklického GMP-AMP (2'3' cGAMP), jež dále funguje jako sekundární posel (Chen et al., 2016; Zevini et al., 2017). V následující signalizaci dochází k vazbě 2'3' cGAMP na adaptor STING (stimulator of interferon genes), jinými názvy též MITA, ERIS, MPYS, TMEM173, jež je v podobě homodimeru vázán pomocí čtyř transmembránových domén do membrány endoplasmatického retikula (ER) (Burdette et al., 2011; Chen et al., 2016). STING váže jak tyto cGAMP metabolizované z dsDNA, tak přímo cyklické dinukleotidy (CDNs), produkované například bakteriemi nebo archaea (Abe and Barber, 2014; Burdette et al., 2011).

Vazbou cGAMP na STING je podmíněna konformační změna STING, jeho aktivace a STING je tudíž schopný vázat TBK1. Komplex STING-TBK1 je v dalším kroku translokován z ER do Golgiho aparátu (GA) a následně do endozomů. V průběhu transportu STING-TBK1 komplexu dochází k palmitoylaci – tedy připojení zbytku kyseliny palmitové na -SH skupinu cysteinu – na Cys88 a Cys91 adaptoru STING, což má za následek aktivaci kinázy TBK1 a fosforylaci STING na Ser366. Díky



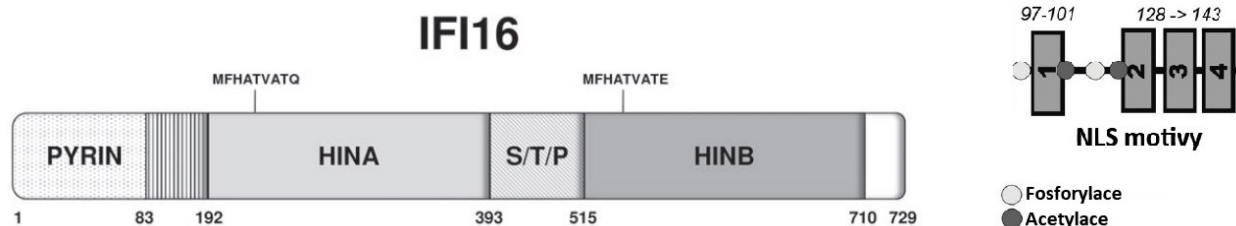
připojení této fosfátové skupiny může STING v příštím kroku vázat transkripční faktor IRF-3 a díky komplexu s TBK1 jej fosforylací aktivovat. Takto posttranslačně modifikovaný IRF-3 dimerizuje a vstupuje do jádra, kde indukuje transkripci genu pro IFN $\beta$  (Chen et al., 2016; Zevini et al., 2017).

Mimo aktivaci TBK1 je STING navíc zprostředkovatelně zodpovědný za fosforylací transkripčního faktoru NF- $\kappa$ B, translokaci do jádra a spuštění exprese cílových genů. Díky aktivaci IKK (IkappaB kinase) pomocí STING tato kináza fosforyluje inhibitory NF- $\kappa$ B z rodiny I $\kappa$ B, jež jsou následně degradovány v proteasomu díky ubikvitinovým značkám. Transkripční faktor NF- $\kappa$ B po uvolnění I $\kappa$ B vstupuje do jádra, kde společně s IRF-3 a jinými transkripčními faktory spouští ve finálním kroku expresi prozánětlivých cytokinů jako IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF a interferonů (Chen et al., 2016; Zevini et al., 2017). Signalizační dráhy vedoucí přes cGAS a STING jsou zobrazeny na schématu (Obrázek 3) (Dunphy et al., 2018).

Jednou z výjimečných vlastností cGAMP je schopnost pohybu mezi infikovanými a neinfikovanými sousedícími buňkami skrze vodivé spoje. Díky tomuto šíření cGAMP do zdravých buněk dochází k rozšíření a spuštění antivirové odpovědi přes cGAS-STING signalizační cestu. STING je nadto schopen inkorporace do nově syntetizovaných virionů během jejich skládání a je tak dále roznášen do nově infikovaných hostitelských buněk, kde následně spouští rapidní imunitní reakci (Zevini et al., 2017).

**Protein IFI16** byl prvně popsán v roce 1992 v lymfatických buňkách (Trapani et al., 1992). Tento senzor spadá společně s AIM2 do IFN-indukované PYHIN rodiny, jejíž členové mají spojující vlastnost v podobě aktivace kaspázy 1. Protein IFI16 obsahuje dvě HIN domény, HINA a HINB, které jsou oddělené vmezeřeným úsekem („spacerem“), a PYRIN doménu (PYD) na N-konci. Funkcí HIN domén je sekvenčně nezávislá interakce s DNA, a to jak s ssDNA tak dsDNA. Úsek oddělující HIN domény je bohatý na serin, threonin a prolin a jeho délka je dána alternativním sestřihem mRNA (Obrázek 2). Díky mRNA sestřihu mohou vznikat tři různé izoformy, izoforma A, B nebo C, které se liší v zastoupení v různých typech buněk. IFI16 je schopný interagovat s mnoha různými proteiny a ovlivňovat škálu buněčných aktivit jako buněčný růst, proliferaci, diferenciaci, remodelaci chromatinu, apoptózu, pyroptózu, senescenci nebo zánět. IFI16 je převážně jaderný senzor. Vyskytuje se jak v jádře, tak v jadérku, avšak v určitých buněčných typech byl nalezen i v cytoplasmě. Jaderný IFI16 je po rozpoznání DNA přemístěn do cytoplasmy. Lokalizace v určitých buněčných subkompartmentech je ovlivňována protein-proteinovými interakcemi a právě pozice IFI16 v buňce určuje, která signalizační cesta bude v následujícím kroku spuštěna (Dell’Oste et al., 2015). Bylo objeveno, že senzor IFI16 interaguje pomocí PYRIN domény například s proteiny p53, pRb (retinoblastoma protein), BRCA1 (breast cancer 1), ASC (apoptosis-associated speck-like protein containing CARD) nebo STING za tvorby homodimerů nebo heterodimerů. Regulace lokalizace IFI16 v buňce je zajišťována posttranslačními modifikacemi, acetylací a fosforylací, avšak přesné

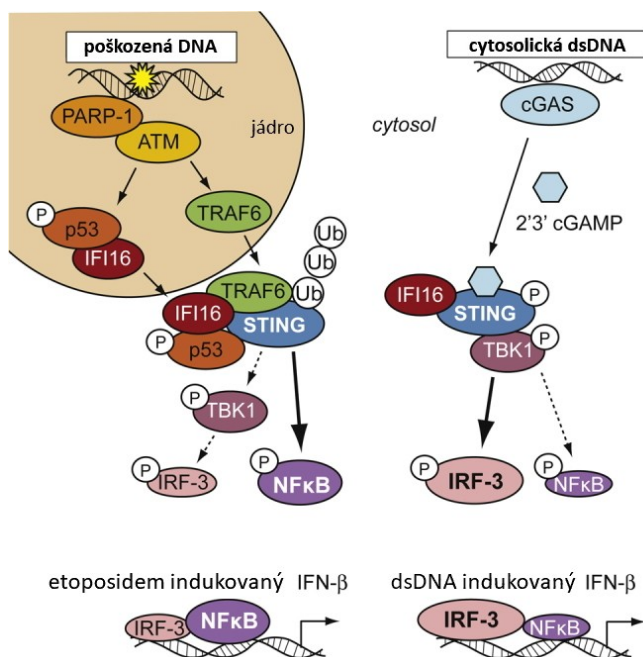
mechanismy regulující lokalizaci do jednotlivých buněčných subkompartmentů nebyly zatím popsány (Shrnuto v (Dell'Oste et al., 2015; Jakobsen and Paludan, 2014)).



**Obrázek 2: Schematický náčrt struktury IFI16 a detail jaderného lokalizačního signálu (NLS).** Na N-konci je IFI16 tvořen PYRIN doménou (aminokyseliny 1-83), jež je zodpovědná za vazbu proteinů. Za PYRIN doménou (97-143) se nachází NLS, který se skládá ze čtyř motivů a je posttranslačně modifikován fosforylacemi a acetylacemi. Postupem k C-konci obsahuje IFI16 dvě HIN domény, HINA (aminokyseliny 192-393) a HINB (515-710), jež jsou odděleny krátkým úsekem (393-515) bohatým na serin, threonin a prolin. Délka úseku mezi HIN doménami je regulována alternativním sestřihem mRNA za vzniku tří různých izoforem A, B a C. Úseky MFHATVATQ a MFHATVATE představují konzervované motivy jednotlivých HIN domén. Převzato a upraveno z (Dell'Oste et al., 2015; Jakobsen and Paludan, 2014)

IFI16 byl popsán jako senzor DNA herpesvirů v buněčném jádře. Bylo popsáno, že IFI16 detekce KSHV (Kaposi sarcoma herpes virus), indukuje tvorbu inflamazómu, kdy při detekci virové nukleové kyseliny v jádře dochází k vazbě adaptorového proteinu ASC (apoptosis-associated speck-like protein containing CARD) a tvorbě inflamazómu (Kerur et al., 2011; Mansur et al., 2014). Multiproteinový komplex inflamazóm se skládá ze tří podjednotek. První podjednotku tvoří senzorický protein, který může být čtyř typů (NLRP1, NLRC4, NLRP3 a AIM2) a udává typ inflamazómu, další podjednotky představují adaptorový protein ASC a prokaspáza 1, přičemž hlavní funkcí inflamazómu je poskytovat lešení pro proteolytické štěpení prokaspázy 1 na aktivní kaspázu 1 (Kerur et al., 2011). Nedávno bylo zjištěno, že IFI16 je také významnou složkou ostatních signalizačních drah indukovaných jak poškozením DNA (DDR), tak cGAS (Dunphy et al., 2018) (Obrázek 3).

Přestože IFI16 představuje významný senzor mikrobiální patogenní DNA a indukuje imunitní reakci, ovlivňuje tento protein hostitelský organismus i negativně. Při SLE (systematic lupus erythematosus) je tento protein vylučován z buněk a je hostitelským organismem detekován jako DAMP, neboli autoantigen, a spouští autoimunitní reakci (Dell'Oste et al., 2015).



**Obrazek 3: Schéma signálních cest indukujících expresi IFN-beta.** Vlevo: Při etoposidem indukovaném poškození DNA dochází v buňce ke spuštění DDR a rekrutování komponent této opravné cesty k poškozené DNA. Jsou rekrutovány polymeráza PARP-1 (poly (ADP-ribose) polymerase 1) a kinázy ATM (ataxia telangiectasia mutated), které detekují dvouřetězcové zlomy v DNA. Tyto složky následně indukují vznik signálního komplexu obsahujícího IFI16, fosforylovaný protein p53, E3 ubikvitin ligázu TRAF6 (TNF (tumor necrosis factor) receptor associated factor 6) a STING. STING v dalším kroku zprostředkovává dvě signální větve. Zprvné, STING indukuje aktivaci kinázy TBK1 (TANK-binding kinase 1), která fosforyluje transkripční faktor IRF-3 (interferon regulatory factor 3). Zadruhé zprostředkovává STING fosforylaci transkripčního faktoru NF-κB, jež společně s aktivovaným IRF-3 indukuje transkripci genu

pro IFN-β. Vpravo: DNA senzor cGAS detekuje dsDNA a díky své nukleotidyl transferázové enzymatické funkci způsobuje vznik cyklického GMP-AMP (cGAMP). cGAMP funguje v další signalizaci jako sekundární posel, váže se na STING a indukují vznik signálního komplexu IFI16-STING-TBK1. TBK1 kináza fosforyluje STING, který díky tomu váže IRF-3, jež je následně fosforylován a aktivován pomocí TBK1. Dále TBK1 fosforyluje NF-κB, který se s aktivovaným IRF-3 váže na DNA a indukuje expresi IFN-β. Upraveno podle (Dunphy et al., 2018).

## 2.2. Obecné restriční faktory namířené proti řadě virů

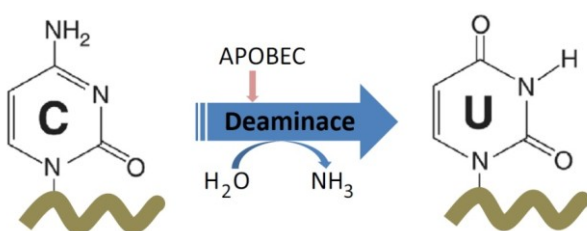
V této kapitole budou představeny restriční faktory, u kterých byla dokumentována restriční funkce u více virů s DNA genomem. Ostatní restriční faktory budou představeny v kapitolách pojednávajících o restrikci virů jednotlivých uvedených čeledí.

### 2.2.1. AID/APOBEC proteinová rodina

Proteinová rodina APOBEC (apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like) je rodina evolučně konzervovaných cytidin deamináz, jež se vyskytují u obratlovců a převážně u savců (Cao and Wu, 2018). Předchůdcem AID/APOBEC rodiny byla velká genová superrodina, jejíž členové měli deaminázovou aktivitu závislou na zinku, která se uplatňuje v metabolismu purinových a pyrimidinových bází (Moris et al., 2014). Vývoj AID/APOBEC rodiny souvisí s evolucí obratlovců a rozvojem adaptivní imunity, přičemž u člověka je tato proteinová rodina složena z 11 primárních genových produktů a dalších sestřihových variant. Členy lidské AID/APOBEC rodiny jsou proteiny APOBEC1, AID (activation induced deaminase), APOBEC2, APOBEC3A-H a APOBEC4 a všechny obsahují výše zmíněnou ZDD doménu (zinc-dependent cytidine deaminase domain) (Salter et al., 2017; Smith et al., 2012). ZDD doména má specifickou α-β-α super sekundární strukturu, jež představuje katalytické jádro cytidin deaminázové domény (CDA). Díky rozdílům v prostorovém uspořádání, délce a složení super sekundární struktury a přilehlých smyček se jednotlivé proteiny liší

ve své funkci, substrátové specifitě a deaminázové aktivitě (Salter et al., 2017). Tyto proteiny se uplatňují jak ve vrozené tak v adaptivní složce imunitního systému díky jejich schopnosti editovat nukleové kyseliny. Důležité role hrají například při restrikci virové infekce, antigenové prezentaci nebo maturaci hostitelských TCR a BCR receptorů (Moris et al., 2014). Bylo však zjištěno, že APOBEC proteiny mohou inhibovat pohyb virů a retrotranspozomů i skrze mechanismy nezávislé na jejich deaminázové aktivitě (Holmes et al., 2007). Nicméně proteiny rodiny AID/APOBEC představují v organismu i negativní roli. Díky jejich schopnosti editovat DNA mohou tyto proteiny přispívat ke karcinogenezi a tvorbě tumorů (Henderson and Fenton, 2015).

APOBEC editace může probíhat jak na RNA, tak na DNA substrátech. Při editaci apoB mRNA je primární editačním místem nt 6666, kde se nachází kodon glutaminu (CAA). Díky deaminaci je tento kodon modifikován na předčasný UAA stop kodon (Obrázek 4) (Franchini and Petersen-Mahrt, 2014). Editace apoB mRNA je velmi specifický proces, kdy při obsahu 3 315 nukleosidů cytidin je pouze 100 ve správném čtecím rámci CAA, přičemž pro to, aby editace mohla proběhnout, záleží navíc i na okolní 11nt kotevní sekvenci („mooring sequence“). Dalším faktorem pro úspěšnou editaci je úroveň exprese APOBEC1 a ACF (APOBEC1 complementation factor). APOBEC1 (A1) má velmi nízkou afinitu k RNA a jeho editační funkce může probíhat pouze v buňkách, jež obsahují RNA vazebný protein ACF. V takovémto případě dochází k tvorbě A1 a ACF dimerů navázaných přes RNA, které tvoří 27S editozom. Deaminázová aktivita je nadto regulována buněčnou lokalizací A1, jenž je transportován mezi cytoplasmou, kde se vyskytuje v zásobní formě, a mezi jádrem, kde je součástí editozomu. Posledním faktorem ovlivňujícím editační aktivitu je průběh buněčného cyklu. Editace může probíhat pouze v úzkém průzoru mezi pre-mRNA sestřihem a mRNA jaderným exportem. Díky přísným regulacím je v buňce udržován stabilní poměr jak editovaných, tak needitovaných nukleosidů, přičemž se uplatňuje i schopnost ACF zakrýt nesmyslné kodony, aby nedocházelo k jejich degradaci. Jak již bylo zmíněno výše, APOBEC proteiny se mohou účastnit onkogeneze. Při nadměrné expresi A1 dochází k přílišné editaci RNA a vzniku nádorů. V nedávné studii bylo zjištěno, že A1 je schopný editovat jak RNA tak i ssDNA, při nadměrné expresi v *E. coli*, což přináší otázku, zda může mít deregulace APOBEC1 význam i v mutacích hostitelské genomové DNA a následné karcinogenezi (Smith et al., 2012).



**Obrázek 4: Schéma APOBEC deaminázové reakce.** Díky deaminaci dochází k přeměně cytosinu (C) na uracil (U) a tedy kodonu CAA (glutamin) na kodon UAA, jenž je předčasným stop kodonem. Upraveno podle (Zou et al., 2017).

Nicméně, A1 neváže žádné savčí ssDNA substráty. Bylo avšak zjištěno, že díky své deaminázové aktivitě může hrát A1 obrannou roli v neuronech při infekci virem HSV (Herpes simplex virus). Při vazbě ssDNA, na rozdíl od RNA, jenž pro vazbu vyžaduje ACF, nejsou potřeba žádné kofaktory. Mnoho proteinů rodiny APOBEC váže jak RNA, tak DNA substráty, zajímavé ovšem je, že při vazbě k RNA nejsou proteiny APOBEC schopné ssDNA deaminázové aktivity. Na základě výše zmíněných informací zbývá objasnit, jaké strukturní rysy APOBEC proteinů udávají substrátovou specifitu (Smith et al., 2012).

Pro imunitní obranné mechanismy jsou důležité proteiny A3. Množství A3 genů a pseudogenů se díky selekčnímu tlaku různí u různých druhů, přičemž myši mají jeden A3 gen, naopak koně šest. U člověka existuje sedm A3 proteinů, mezi něž patří APOBECA-C, DE a F-H. Tyto proteiny obsahují jednu nebo dvě ZDD domény. Obecně lze říci, že A3 proteiny se vyskytují ve vysokém množství v T a B lymfocytech a fagocytických buňkách, přičemž A3A a A3B mají zvýšenou expresi v monocytech a A3G a A3F v T lymfocytech, monocytech a DCs. Kromě imunitního systému se A3 vyskytují navíc ve vaječnících a varlatech. A3G a A3F se nacházejí v cytoplasmatických mikrodoménách a stresových tělískách, která se nazývají P-tělíska. Tato tělíska slouží jako místo zásoby a metabolismu RNA, v němž se A3G a A3F uplatňují. A3 proteiny jsou aktivovány zánětlivými procesy a mimo jiné hrají roli v DNA katabolismu nebo degradaci cizorodé DNA. Funkce a síla deaminázové aktivity A3 je závislá jak na buněčném typu, tak okolním tkáňovém prostředí a přesné mechanismy A3 proteinů zbývá objasnit (Cao and Wu, 2018; Moris et al., 2014).

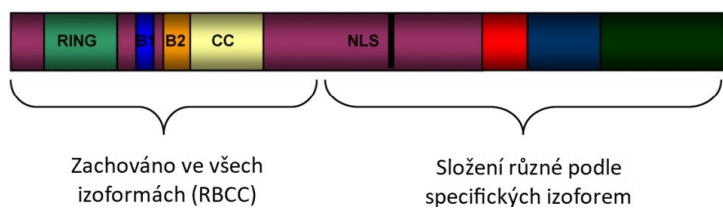
Výše stručně představené funkce proteinů rodiny AID/APOBEC představují pouze část známých funkcí, přičemž mnoho jich stále čeká na své objevení. V této práci bude kladen důraz na interakce APOBEC proteinů s malými DNA viry, jež budou popsány v kapitole „Vnitrobuněčné restriční faktory malých virů s DNA genomem“.

### 2.2.2. Jaderná tělíska PML

Jaderná tělíska (PML NBs; promyelocytic leukemia nuclear bodies), dalšími názvy také TRIM19 nebo ND10, jsou členem skupiny bezmembránových jaderných subkompartmentů, které mají přesně dané jaderné umístění a jejich hlavními zástupci jsou jaderná tělíska. Mezi tato tělíska se kromě PML NBs řadí například Cajalova tělíska, obsahující ribonukleoproteiny účastnící se v sestřihu pre-mRNA nebo úpravách ribozomální RNA, nebo jaderné „speckles“, jaderné domény ve kterých se soustřeďují faktory sestřihu buněčných pre-mRNA (Chang et al., 2018; Galganski et al., 2017; Sahin et al., 2014; Scherer and Stamminger, 2016).

PML NBs jsou dynamické globulární útvary, jejichž velikost se pohybuje v rozmezí 0,3 - 1,0  $\mu\text{m}$  a celkový počet na jádro kolísá mezi pěti až třiceti (Chang et al., 2018). Množství a velikost PML NBs je ovlivněno jednak buněčným typem a fází buněčného cyklu, jednak stresovými podmínkami, jež na

buňku působí (Bernardi and Pandolfi, 2007). PML NBs se nacházejí v interchromatinovém prostoru mezi chromosomálními teritorii a díky PML proteinům interagují s jadernou matrix. (de Thé et al., 2012; Sahin et al., 2014). PML protein, nutný pro stavbu PML NBs, patří do proteinové rodiny TRIM (tripartite motif protein family), jež je charakterizována přítomností N-koncové domény RBCC. Doména RBCC je složena z RING (really interesting new gene) domény, B-box domény, a struktury svinuté cívky (coiled-coil) (viz. Obrázek 5). Protein PML se může vyskytovat v sedmi různých izoformách, jež vznikají díky alternativnímu sestřihu na C-konci. Všechny izoformy kromě izoformy VII obsahují NLS (nuclear localization signal). PML I je nejdelší a obsahuje navíc NES (nuclear export signal), naopak PML VII je nejkratší a NLS neobsahuje. Izoformy I-V obsahují SIM (SUMO-interacting motif). (Chang et al., 2018).



Zachováno ve všech izoformách (RBCC)

Složení různé podle specifických izoform

**Obrázek 5: Struktura PML proteinu.** Na N-konci je PML protein tvořen RBCC doménou, jež sestává z RING domény, dvou B-boxů a „coiled-coil“ domény. RBCC doména je zachována ve všech sestřihových variantách PML proteinu. Na rozdíl od N-konce, C-koncová část podléhá alternativnímu sestřihu a díky tomu vzniká sedm různých PML izoform. Upraveno podle (Reineke and Kao, 2009).

Vznik PML NBs může probíhat dvěma způsoby. Prvním způsobem vzniku PLM jaderných je dělení. V průběhu buněčného cyklu se mění stabilita PLM NBs, přičemž díky deSUMOylaci a modifikacím chromatinu, jež v důsledku změny struktury odděluje tělíska od sebe, jsou tato tělíska nejméně stabilní v S fázi buněčného cyklu. Díky této nestabilitě dochází následně ke štěpení, avšak bylo zjištěno, že nově vznikající tělíska mohou v této fázi buněčného cyklu naopak také fúzovat s mateřskými (Bernardi and Pandolfi, 2007; Chang et al., 2018; Delleire, 2006).

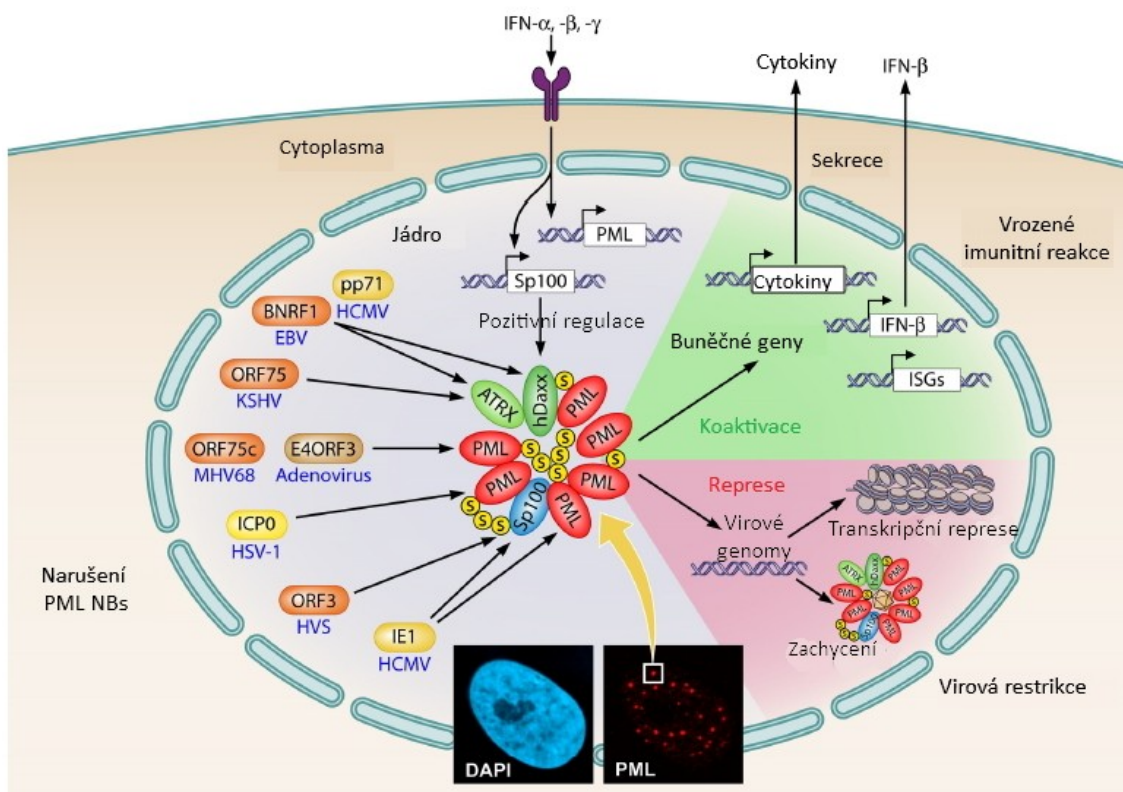
Druhým způsobem vzniku PML NBs je vytvoření *de novo*. Při *de novo* tvorbě PML NBs dochází v prvním kroku k dimerizaci a dále k nukleaci tumor supresorového proteinu PML, jenž nakonec tvoří ochrannou vrstvu pro vnitřní jádro (Lallemand-Breitenbach and de Thé, 2018). Uvnitř jaderného tělíska jsou obsaženy specifické proteiny, jež se liší podle stresových podmínek, jimž je buňka vystavena, a zároveň podle buněčného typu. Stavba PML vrstvy se skládá z několika kroků a je závislá na N-koncových doménách PML proteinu, zajišťujících jeho dimerizaci a posléze multimerizaci. Dalším faktorem ovlivňujícím dimerizaci je stres působící na buňku. V převážné většině oxidativní stres zvyšuje počet PML NBs. Jednotlivé sestřihové izoformy proteinu PML jsou dalším faktorem ovlivňujícím skládání PML slupek, a uplatňují se i při vazbě specifických proteinů. Tvorba PML NBs je dvou krokový mechanismus a jakmile je dokončena nukleace jaderných tělísek, dochází v příštím kroku k nakládání specifických proteinů dovnitř tělíska. Vkládání proteinů je regulováno pomocí posttransalčních modifikací, kdy hlavní roli v této úloze hraje sumoylace, tedy připojení proteinu SUMO (small ubiquitin-like modifier). Díky hypersumoylaci dochází k nekovalentní vazbě specifických

proteinů skrze jejich SIM motiv a následnému naložení proteinu dovnitř PML NBs (Lallemend-Breitenbach and de Thé, 2018). Prozatím bylo identifikováno přibližně 166 proteinů, které jsou v PML NBs, avšak s probíhajícími studiemi toto číslo stále narůstá. Rekrutované proteiny mohou být buď jaderné (57%), další pendlují mezi jádrem a cytoplasmou (33%) nebo se vyskytují jinak pouze v cytoplasmě (9%) (Chang et al., 2018). Většina proteinů je do jaderných tělísek rekrutována na základě silných stresových podmínek, nicméně část proteinů je v jaderných tělískách přítomna stále. Mezi tyto stálé proteiny patří například DAXX (death domain associated protein) nebo Sp100 (speckled 100) (de Thé et al., 2012). Pokud protein PML není přítomen, nedochází k sumoylaci, cílové proteiny se neváží a obsah tělísek je rozptýlen v jádře (Lallemend-Breitenbach and de Thé, 2018). Bylo zjištěno, že některé proteiny, jež napomáhají stavbě PML tělísek, se mohou v nepřítomnosti PML samy seskupovat do jednotlivých shluků. Mezi tyto proteiny patří například Sp100, jehož vazbou na PML dochází k jejich vzájemné stabilizaci nebo protein EIF4-e (de Thé et al., 2012).

PML NBs hrají důležitou roli v protivirové obraně, ale také v mnoha dalších buněčných procesech, z nichž mohou být uvedeny například regulace transkripce, modifikace proteinů, udržování stability genomu, epigenetická kontrola, buněčná proliferace, autofagie, senescence nebo apoptóza. Mezi další funkce PML NBs lze zařadit úlohu v alternativním prodlužování telomer (ALT) nebo aktivaci tumor supresorového proteinu p53 při aktivaci onkogenů působením ROS (reactive oxygen species) (Lallemend-Breitenbach and de Thé, 2018; Chang et al., 2018; Scherer and Stamminger, 2016; Bernardi and Pandolfi, 2007; Regad and Chelbi-Alix, 2001). Při rozrušení PML dochází k narušení průběhu jednotlivých buněčných dějů, což vede k onemocněním jako například APL (acute promyelotic leukemia) (Chang et al., 2018).

Role PML NBs v protivirové obraně souvisí s produkcí interferonů. Jejich vznik a produkce mnoha proteinů v nich obsažených jsou indukovány interferony (Regad and Chelbi-Alix, 2001). Při virové infekci hostitele dochází různými signálními drahami k produkci IFNs, jež v následných krocích indukují jak zvýšenou tvorbu PML NBs, tak jejich větší velikost. Naopak přítomnost PML NBs je důležitá pro virovou obranu realizovanou interferony (Chelbi-Alix et al.). PML NBs se uplatňují ve vrozené složce imunitního systému při detekci patogenních virů a následné imunitní reakci nebo v detekci poškození vlastní hostitelské DNA (DAMPs) a následných opravách. Bylo zjištěno, že jednotlivé viry, a překvapivě i viry stejných čeledí, spouští při infekci hostitele různé reorganizace PML NBs a PML NBs mohou hrát ve virovém replikačním cyklu jak pozitivní, tak negativní roli, nicméně v publikovaných pracích převládá význam těchto struktur v protivirové obraně buněk (Scherer and Stamminger, 2016). Zůstává nezbytné objasnit přesné funkce těchto jaderných tělísek ve specifických buněčných dějích a při infekci jednotlivými viry, což by případně mohlo vést k léčebnému využití. Tato práce bude dále zaměřena na role, jež PML NBs hrají při infekcích

jednotlivými malými DNA viry. Následující obrázek shrnuje interakce PML NBs s viry a zároveň ukazuje INF stimulaci PML NBs a jejich funkci v buněčných procesech (Obrázek 6).



**Obrázek 6: Shrnutí role PML-NBs protivirové obraně a její potlačení produkty velkých DNA virů.** Šedomodré pole uprostřed a nahoře: PML-NBs se skládají z mnoha buněčných proteinů včetně PML, Sp100, hDAXX, and ATRX, které mohou být sumoylovány („s“ ve žlutém kroužku). Produkce PML-NB složek je pozitivně regulována interferony (IFN- $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ). Růžové pole vpravo dole: PML-NBs jsou schopny zprostředkovat represi virové replikace potlačením transkripce virových genomů (nebo uvězněním virionů uvnitř PML NBs, jak bylo popsáno pro herpesvirus *Varicella zoster*; (Reichelt et al., 2011)). Zelené pole vpravo: PML-NBs fungují jako koaktivátory buněčných genů zapojených do protivirových aktivit jako cytokiny, ISGs (interferonem stimulovaných genů). Šedomodré pole vlevo: Řada velkých virů (EBV, Epstein Barr virus; KSHV, Kaposi sarcoma-associated herpesvirus; MHV68, murine gammaherpesvirus 68; HCMV, human cytomegalovirus; HSV-1, herpes simplex virus type 1; HVS, herpesvirus saimiri) kóduje proteiny, které rozrušují PML NBs nebo negativně ovlivňují jejich jednotlivé složky. Šipky ukazují, na které složky PML NBs jsou jednotlivé proteiny zacíleny. V dolní části je imunofluorescenční mikroskopii zobrazeno buněčné jádro (obarveno modře DAPI 4-,6-diamidino-2-phenylindole; vlevo) a červeně protilátkou proti PML proteinu; vpravo). Převzato a upraveno z (Scherer and Stamminger, 2016)

### 3. Vnitrobuněčné restriční faktory malých virů s DNA genomem

Cílem této práce je shrnout prozatím známé informace o proteinových restričních faktorech omezujících replikaci malých DNA virů. Většina poznatků v oblasti restrikce byla získána na modelech retrovirů a herpesvirů. Z malých virů s DNA genomem byla v tomto ohledu nejvíce studována restrikce HBV. U DNA virů čeledi *Pavoviridae*, *Polyomaviridae* a *Papillomaviridae* začal výzkum restrikce jejich replikačních cyklů nedávno a tak je množství získaných dat a popsaných mechanismů velmi omezené.



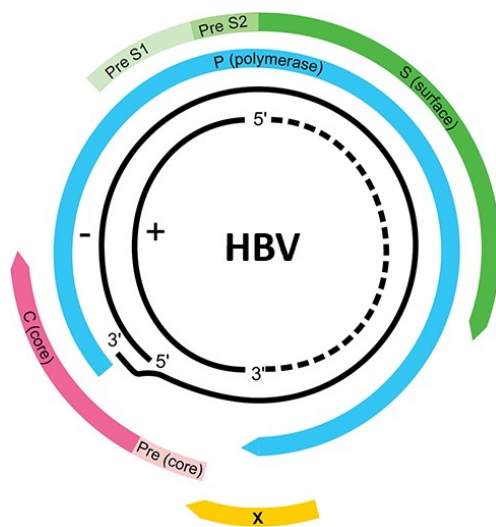
## 3.1. Virus hepatitidy B

### 3.1.1. Charakteristika a replikační cyklus

Virus Hepatitidy B patří do čeledi Hepadnaviridae, ve které jsou vedle čeledi Caulimoviridae soustředěny DNA viry s reverzní transkripcí. Ve světě již bylo virem HBV nakaženo přes 2 miliardy lidí a předpokládá se, že více než 350 milionů jedinců trpí chronickou hepatitidou B. Chronická forma HBV se může při perzistentní infekci vyvinout v cirhózu jater nebo hepatocelulární karcinom (HCC) (Livingston et al., 2017). HBV je malý obalený virus, jenž má kapsidu s ikosaedrální symetrií. Jeho genom o celkové velikosti 3,2kbp je tvořen kruhovou dvouvláknovou (ds)DNA s jednořetězcovými (ss)úseky (Gao et al., 2009). Genom HBV obsahuje 4 otevřené čtecí rámce ORF (open reading frame), které kódují 7 HBV proteinů (Valaydon and Locarnini, 2017). V genomu jsou překryvy kódujících a regulačních sekvencí (Sengupta et al., 2017). Čtecí rámec nazývaný P kóduje virovou polymerázu (reverzní transkriptázu) a protein, který slouží jako primer pro reverzní transkripci. ORF S kóduje tři povrchové (surface; S) proteiny, lišící se svoji délkou (preS1, preS2 a S). ORF C kóduje kapsidový protein C, nazývaný také „core“ protein a protein E (nazývaný též HBV e antigen – HbeAg). ORF X kóduje protein X (HBx) (Valaydon and Locarnini, 2017) (Obrázek 7). HBx je protein o velikosti 17kDa, jenž má konzervovaný motiv napříč všemi savčími Hepadnaviry a je jediným regulačním proteinem kódovaným genomem HBV s funkcí indukovat transkripci mRNA (Livingston et al., 2017; Mitra and Guo, 2016a). Ukázalo se, že HBx má mnoho dalších regulačních funkcí, protože je schopen interagovat s buněčnými proteiny (Slagle and Bouchard, 2016).

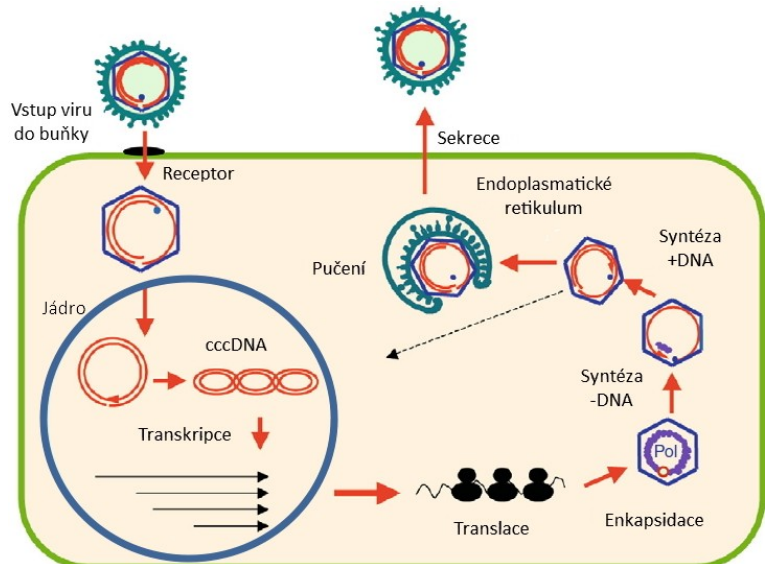
HBV vstupuje do hepatocytů pomocí receptorem zprostředkované endocytózy. Specifickým receptorem je NTCP (Na<sup>+</sup>-taurocholate cotransporting polypeptide), kotransportér sodíkových iontů a žlučových kyselin. Kapsida uvolněná po fúzi obalu s endozomální membránou do cytoplasmy se dostává k jadernému póru, je destabilizována a DNA spolu s reverzní transkriptázou a dimery kapsidového proteinu translokují do jádra. V dalším kroku probíhá dosyntetizování druhého řetězce k ssDNA úsekům pomocí hostitelských enzymů a k přeměně genomu na formu nadšroubovicové DNA (cccDNA) (Murphy et al., 2016; Valaydon and Locarnini, 2017). Genomová DNA je pak transkribována ze čtyř promotorů pomocí hostitelské DNA dependentní RNA polymerázy II za vzniku pregenomové RNA (pgRNA) a subgenomové RNA (sgRNA). V dalším kroku dochází k translaci pgRNA a sgRNA na virové proteiny. Pregenomová RNA je společně s reverzní transkriptázou enkapsidována a zároveň probíhá reverzní transkripce za vzniku rcDNA. Některé kapsidy po reverzní transkripci vracejí DNA do jádra k dalšímu kolu transkripce. Posledním krokem replikačního cyklu je tvorba maturovaných virionů, kdy kapsidy získávají obal z membrán ER (endoplasmatické retikulum) a exocytózou se uvolňují z buněk (Yi et al., 2015) (Obrázek 8).

V současné době se pro léčbu infekce HBV využívají IFN- $\alpha$  terapeutika a další metody, avšak žádná z nich nevykazuje uspokojivé léčebné výsledky. I přes schopnost potlačit virovou infekci není možné pomocí těchto metod odstranit cccDNA z infikovaných buněk, což může vést ke znovupropuknutí nemoci (Murphy et al., 2016). Některým novým možnostem léčby HBV skrze antivirové restriční faktory Smc5/6, SAMHD1, AID/APOBEC, TRIM22, Sp110 a další se bude dále věnovat tato práce.



**Obrázek 7: Schématický náčrt genomu HBV.** Silné barevné čáry – ORF (C, S, P, X). Černě – dvě (plus a minus) vlákna genomové DNA. Přerušovaná čára – nedosyntetizované druhé vlákno DNA. Převzato a upraveno z (Bell and Kramvis, 2016)

**Obrázek 8: Replikační cyklus viru HBV.** Replikační cyklus začíná adsorpcí virové částice na povrch buňky a následným vstupem. Virová částice je zbalena obalovými proteiny a přenesena do jádra. Dalším krokem je dosyntetizování druhého řetězce k ssDNA úsekům a přeměna na cccDNA. Následně dochází k transkripci ze čtyř promotorů, za vzniku pgRNA a sgRNA, jenž jsou v příštím kroku translatovány. Pregenomová RNA je společně s reverzní transkriptázou enkapsidována a v nukleokapsidě probíhá reverzní transkripce za vzniku rcDNA. Některé kapsidy vracejí po reverzní transkripci DNA do jádra k dalšímu kolu transkripce. Viriony získávají díky pučením do ER obal a exocytózou se uvolňují z buňky. Převzato a upraveno z (Benhenda et al., 2009).

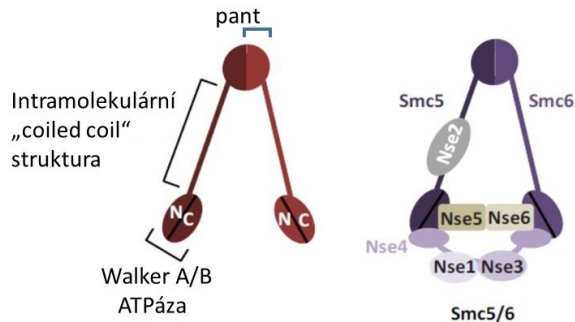


### 3.1.2. Restriční faktory

#### 3.1.2.1. Smc5/6

Smc5/6 (structural maintenance of chromosome5/6; strukturní údržba chromosomů) je chromozomový komplex skládající se z 6 podjednotek (Smc5, Smc6, Nse1-4), jenž se váže na DNA a je nezbytný pro stabilitu genomu (Livingston et al., 2017). V buňkách se Smc5/6 uplatňuje svými

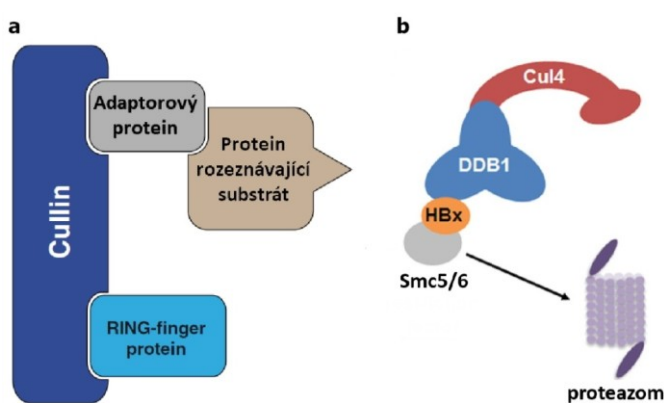
funkcemi v udržování genomové stability replikaci chromosomů jejich segregaci a opravách DNA (Livingston et al., 2017). Náleží k SMC rodině proteinových komplexů a je příbuzný s komplexem cohesin (Smc1/3) a condensin (Smc2/4) (Obrázek 9).



**Obrázek 9: Struktura komplexu Smc5/6.** Vlevo: Jádro Smc5/6 komplexu je tvořeno dvěma Smc proteiny. Každý z nich obsahuje ATPázovou doménu, dále doménu pantu, která zprostředkovává dimerizaci Smc proteinů a také antiparalelní coiled coil strukturu. Vpravo: Smc5/6 komplex s NSE proteiny. Proteiny Nse5 a Nse6 jsou přítomny v Smc5/6 komplexech. Upraveno podle (Wu and Yu, 2012).

Bylo pozorováno, že Smc5/6 je restričním faktorem, který reprimuje transkripci HBV genomu. Mechanismus transkripční represe HBV genomu komplexem Smc5/6 není znám. V buňkách infikovaných HBV jsou proteiny Smc5/6 degradovány. Degradace je zprostředkována virovým proteinem HBx (Decorsière et al., 2016).

Mechanismus HBx zprostředkované degradace Smc5/6 spočívá ve vazbě HBx na ubikvitin ligázový komplex DDB1-CUL4 (DNA-damage binding protein 1-Cullin-4). DDB1-CUL4 komplex se skládá z Cullin-Ring E3 ligázového komplexu 4A a adaptorového proteinu DDB1 (Mitra and Guo, 2016b; Murphy et al., 2016) (Obrázek 10). Nedávné poznatky ukazují, že pro umlčení transkripce z genomu HBV je nutné umístění Smc5/6 a HBV genomů v bezprostřední blízkosti PML NBs (Niu et al., 2017).



**Obrázek 10: (a) Schematický náčrt struktury Cullin-RING E3 ligázového komplexu (CRL).** Proteiny rodiny Cullinů fungují jako lešení pro RING (really interesting new gene)-finger proteiny, adaptorové proteiny a proteiny rozeznávající substrát za tvorby CRL komplexů. V případě monoubikvitinace dochází k změně substrátu, naopak pokud dojde k polyubikvitinaci, následuje proteazomová degradace substrátu. **(b) Proteazomová degradace restričního faktoru Smc5/6 zprostředkovaná proteinem HBx.** Díky vazbě HBx na adaptorový protein DDB1 hraje HBx roli

proteinu rozpoznávající substrát. Vzhledem k afinitě HBx k proteinu Smc5/6 dochází k ubikvitinaci a následné degradaci Smc5/6. Upraveno podle (a) (Sarikas et al., 2011), (b) (Kim et al., 2016).

Culliny se uplatňují v mnoha buněčných procesech od regulace buněčného cyklu, transkripce, apoptózy, remodelace chromatinu až k přenosu signálů. Proces ubikvitinace probíhá ve třech krocích. Prvním krokem je ATP-závislá aktivace proteinu ubikvitinu (Ub) pomocí E1 ubikvitin aktivačního

enzymu. V následujícím kroku dochází k přenosu Ub na protein E2, jenž zprostředkovává další přenos. Posledním krokem je vazba E3 ubikvitin ligázy na komplex E2-Ub a substrát, přičemž dochází k přenosu Ub na substrát a jeho ubikvitinaci. Navázání HBx na DDB1-CUL4 ubikvitin ligázový komplex dává vznik komplexu CUL4-DDB1-HBx, u kterého je výběr substrátu k ubikvitinaci řízen proteinem HBx. Ten směřuje k ubikvitinaci a následné proteasomové degradaci protein Smc5/6 (Mitra and Guo, 2016b). Je možné připravit mutanty adaptorového proteinu DDB1, které nevážou HBx a tedy neindukují degradaci Smc5/6, takže je uplatňována represe transkripce. To naznačuje možnost využití DDB1 jako cíle pro antivirovou terapii. Ačkoliv kohesin (Smc1/3) a kondensin (Smc2/4) mají podobnou strukturu i funkci v udržování chromozomové stability jako Smc5/6, protein HBx na tyto komplexy vliv nemá (Decorsière et al., 2016).

### 3.1.2.2. *SAMHD1*

Další restriční faktor, enzym SAMHD1 (sterile alpha motif (SAM) and histidine/aspartic acid (HD) domain-containing protein) byl popsán jako restriční faktor viru HIV-1 (Human immunodeficiency virus type-1) (Goldstone et al., 2011; Lahouassa et al., 2012; Powell et al., 2011). Tento enzym přeměňuje doxynukleosid trifosfáty (dNTPs) na deoxynukleosidy a anorganické trifosfáty a působí tak úbytek zásob dNTPs buňky na hladinu, která nedostačuje pro účinnou syntézu cDNA retrovirů (Li et al., 2017). Inhibice virové replikace enzymem SAMHD1 byla popsána i pro další retroviry jako například HIV-2, SIV (simian immunodeficiency virus), RSV (Rous sarcoma virus) nebo MLV (murine leukemia virus) (Gramberg et al., 2013; Sze et al., 2013; White et al., 2013) a také pro některé viry s velkým DNA genomem jako Herpes simplex virus 1 nebo poxvirus Vakcinia (Hollenbaugh et al., 2013; Kim et al., 2013) a v této kapitole rozebíraného HBV (Li et al., 2017).

Strukturně je SAMHD1 protein o délce 626 aminokyselin (Li et al., 2017). SAMHD1 obsahuje N-koncový NLS, za nímž se nachází SAM doména a C-terminální HD doménu, jenž je zodpovědná za enzymatickou dNTPázovou aktivitu. HD doména je typická pro skupinu enzymů fosfodiesteráz, nukleáz a fosfatáz, přičemž její trifosfohydrolázová aktivita byla poprvé objevena u bakterií. Zároveň se HD doména překrývá s další doménou zodpovědnou za vazbu nukleových kyselin. Na rozdíl od HD se SAM doména neuplatňuje v enzymatické aktivitě, ale pouze při jejím zvyšování a protein-proteinových a protein-DNA/RNA interakcích. (Ballana and Esté, 2015; Mauney and Hollis, 2018). Podle navrženého modelu aktivace enzymatické aktivity dochází nejprve k vazbě GTP na A1 místo (guanine-specific activator site), tedy alosterické místo, a tvorbě dimeru. GTP je považován oproti dGTP za primární aktivátor enzymatické aktivity, jelikož se v buňce nachází v mnohonásobně vyšší koncentraci a dává ve výsledku vznik déle stabilním tetrametrickým formám SAMHD1. Tvorba oligomerů byla identifikována v savčích buňkách, ovšem hydrolýza dNTP může probíhat i v dimerické formě (Li et al., 2017).

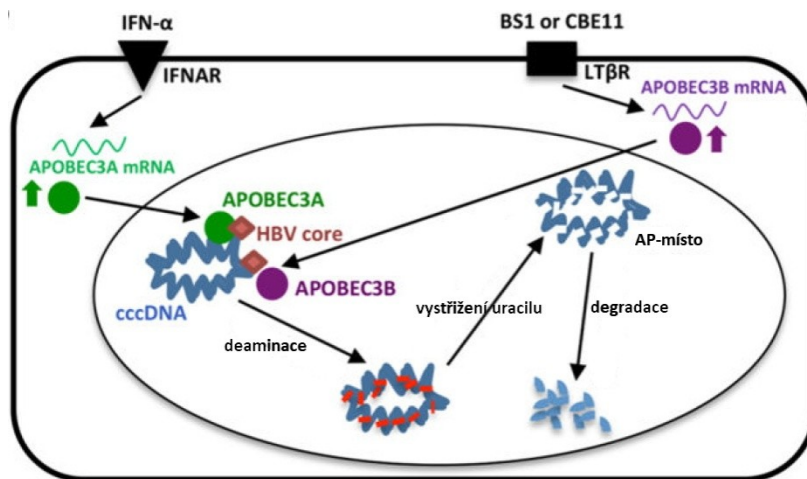
Pro restrikci infekce HBV je klíčová dNTPázová aktivita enzymu SAMHD1. Jak bylo popsáno výše, HBV DNA je syntetizována reverzní transkripcí RNA templátu. Díky hydrolýze dNTPs a vyčerpání zásob, není v buňce dostatek dNTPs pro reverzní transkripci a tudíž pro dokončení replikačního cyklu. SAMHD1 tedy působí na pozdější fázi HBV replikace (Jeong et al., 2016). Antivirová aktivita SAMHD1 je dále regulována fosforylací, jež je závislá na průběhu buněčného cyklu. Pokud je SAMHD1 fosforylován na tyrozinu 592, je v restriktivně neaktivní formě. Fosforylace destabilizuje katalyticky aktivní tetrametry a tak patrně ovlivňuje dNTPázovou aktivitu. Bylo však demonstrováno, že virus HBV je schopný se replikovat a šířit v játrech i v buněčné kultuře nedělících se buněk i přes přítomnost restriktivního faktoru SAMHD1, takže tento restriktivní faktor pravděpodobněji pouze zpomaluje virové šíření. Zatím však nebyly nalezeny přímé antagonistické mechanismy, které by virus HBV vyvinul proti SAMHD1. SAMHD1 je kromě již zmíněných vlastností indukovatelný IFN I/II a je tedy významným ISG (interferon stimulated gene) v hepatocytech (Sommer et al., 2016). IFN I regulují SAMHD1 na posttranslační úrovni pomocí defosforylace tyrozinu 592 a aktivují tak jeho aktivitu (Li et al., 2017). V současné době se již v moderní medicíně využívá cílení na enzymy fungující v metabolismu nukleových kyselin za účelem vyčerpání buněčné zásoby dNTPs, avšak stále je kladen velký důraz na pochopení jednotlivých mechanismů účastnících se restrikce a na jejich potenciální další využití v antivirových léčivech (Chen et al., 2014; Mauney and Hollis, 2018; Sommer et al., 2016).

### 3.1.2.3. *AID/APOBEC*

Jak již bylo zmíněno (v kapitole 2. 2. 1.), AID/APOBEC rodina proteinů se uplatňuje při restrikci retrovirů, retrotransposonů i DNA virů. Nejvíce studovaným DNA virem v tomto ohledu je HBV. Vzhledem k tomu, že po reverzní transkripci zůstávají v genomu HBV úseky jednovláknové DNA, mohou A3 proteiny interagovat s těmito úseky a přispívat k antivirové imunitě (Harris and Dudley, 2015). Některé studie ukázaly, že APOBEC3G výrazně omezuje infekci HBV *in vitro* nezávisle na jeho deaminázové aktivitě (Nguyen et al., 2007). Autoři této práce nevysvětlili mechanismus této inhibice, pouze pozorovali, že k ní dochází v časně fázi reverzní transkripce, kdy vážne elongace DNA. Naopak, jiné práce prokázaly *in vitro* i *in vivo*, že A3 enzymem zprostředkovaná deaminace a hypermutace ovlivňuje negativně expresi HBV. V obou případech lze říci, že APOBEC3 je restriktivním faktorem pro HBV infekci (Např. (Kock and Blum, 2008; Renard et al., 2010). Hlavní roli v tomto procesu hrají A3G, A3B a A3F, přičemž bylo zjištěno, že jsou možné jak přeměna G-A, tak C-T, a úpravy DNA tudíž mohou probíhat na obou řetězcích (Harris and Dudley, 2015). Podle studie provedené (Liang et al., 2013) má možnou roli v restrikci HBV i protein AID, jenž se váže na ribonukleoproteinový komplex HBV a způsobuje deaminaci RNA (Liang et al., 2013).

Zajímavé zjištění přinesla práce (Lucifora et al., 2014), ve které autoři pozorovali, že aktivace interferonu  $\alpha$  a také lymfotoxin- $\beta$  receptoru má za následek zvýšenou expresi APOBEC 3A a 3B

deamináz jak v HBV infikovaných buněčných liniích, tak v primárních hepatocytech a biopsiích z lidských infikovaných jater. Zároveň pozorovali, že vysoké dávky interferonu vedly k degradaci HBV genomu v jeho kruhové cccDNA formě v buněčném jádře. Následně zjistili, že aktivity deamináz APOBEC 3A a 3B jsou nezbytné pro degradaci HBV cccDNA a že APOBEC 3A interaguje s kapsidovým proteinem HBV. Na základě experimentálních zjištění navrhli autoři mechanismus degradace cccDNA závislé na účincích těchto enzymů (Obrázek 11).



**Obrázek 11: Schéma degradace cccDNA HBV závislé na deaminaci proteiny APOBEC 3A a 3B, jejichž exprese je indukována IFN a aktivací LTβR (Lymphotoxin beta receptor). Při IFN-α léčbě dochází k vazbě na IFNAR (interferon-α receptor) a následně expresi APOBEC proteinů. APOBEC3A se v jádře váže na cccDNA přes kapsidový (core) protein HBV a způsobuje deaminace, vystřížení uracilu tvorbu AP-místa, které následně indukuje DNA degradaci. Při**

aktivaci LTβR receptoru pomocí protilátky BS1 (super-agonistic tetraivalent bispecific antibody) nebo CBE11 (bivalent anti-LTβR monoclonal antibody) dochází k produkci APOBEC3B, který se procesu rovněž účastní i když jeho přímá vazba na „core“ protein nebyla prokázána.

Dlouho nebylo zřejmé, zdali HBV vyvinul proti účinkům APOBEC proteinů nějakou protireakci, např. podobnou jako virus HIV, kde Vif protein snižuje hladiny A3G proteinu jeho cílením k ubikvitinaci a následné degradaci (Conticello et al., 2003; Sheehy et al., 2003). Práce (Chen et al., 2017) přinesla poznatek, že protein HBx snižuje hladinu A3G proteinu v buňkách. Mechanismus je ale odlišný od akce Vif proteinu. Autoři uvádějí, že HBx patrně zesiluje sekreci A3G z buněk prostřednictvím exozomů.

#### 3.1.2.4. *Ostatní restriční faktory*

##### **TRIM**

Proteiny s tripartitním motivem (TRIM) jsou velmi starou skupinou s dynamickou evolucí. Tyto proteiny se v průběhu evoluce neustále vyvíjí, přičemž hnací silou je odpověď na nové patogeny a DAMPs. V lidském genomu je prozatím známo 100 TRIM genů, z nichž je mnoho stimulováno více rozličnými stimuly (Hattlmann et al., 2012). Proteiny rodiny TRIM se nacházejí v mnoha tkáních a orgánech a uplatňují se jak ve vrozené, tak adaptivní složce imunitního systému (Zhang et al., 2013). Mezi hlavní buněčné procesy, jichž se TRIM proteiny účastní, patří apoptóza, onkogeneze a již výše zmíněné antivirové imunitní odpovědi (Ozato et al., 2008). Jako již některé zmíněné restriční faktory

jsou i TRIM proteiny indukované pomocí IFN (Gao et al., 2009). Zhang se spolupracovníky identifikoval osm TRIM proteinů, které hrají možnou úlohu při restrikci HBV, tak, že snižují množství HBV mRNA a inhibují aktivity virových enhancerů (Zhang et al., 2013) Další studie se zaměřuje na TRIM22, který hraje roli i při restrikci dalších virů, například HIV, viru chřipky nebo EMCV (Barr et al., 2008; Di Pietro et al., 2013; Eldin et al., 2009). Pro HBV bylo pozorováno, že TRIM22 inhibuje aktivitu promotoru pro mRNA kapsidového proteinu (Gao et al., 2009).

Strukturně patří proteiny rodiny TRIM mezi E3 ligázy RING-typu a sdílí konzervovaný N-konec a variabilní C-konec. N-konec obsahuje RING finger doménu, jeden nebo dva B-boxy a doménu svinuté cívky (Zhang et al., 2013).

Jako v případě ostatních restrikčních faktorů, tak i pro TRIM22 byla ukázána inhibiční role proteinu HBx. HBx, reguluje expresi TRIM22 pomocí epigenetické kontroly (Lim et al., 2018). Promotor TRIM22 obsahuje čtyři CpG, z nichž jsou všechna v přítomnosti HBx metylována. Mechanismus inhibice spočívá v HBx indukované metylaci třetího (+71) CpG místa v promotoru TRIM22. V rámci výzkumu bylo na promotor působeno inhibitorem DNA metylace 5AzaC (5'-aza-2'-deoxycytidine) a výsledky ukazují, že pouze +71 CpG místo bylo citlivé na působení tohoto inhibitoru. Ze zjištěných dat vyplývá, že +71 CpG místo bylo při infekci HBV aktivně metylováno v závislosti na HBx a jeho metylace je tedy zodpovědná za potlačení promotorové aktivity TRIM22. Místo +71 CpG se nachází v IRF1-vazebném místě pro DNA, jež je nezbytné pro IFN indukovanou TRIM22 antivirovou odpověď. Methylace tohoto místa brání vytvoření IRF1-DNA vazby a snižuje tak expresi TRIM22 a následně antivirovou odpověď, což může následně vést k vývoji chronické HBV onemocnění a HCC. HBx zprostředkované potlačení transkripce TRIM22 bylo prokázáno v *in vitro* systémech a zbývá objasnit, zda má HBx stejnou funkci i v lidském organismu a zda bude díky těmto poznatkům možné zdokonalit IFN založenou léčbu (Lim et al., 2018).

## ZAP

K dalším HBV restrikčním faktorů stojí za zmínku ZAP (zinc finger antiviral protein). Protein ZAP hraje roli jako restrikční faktor u RNA virů (Bick et al., 2003; Muller et al., 2007; Zhang et al., 2007), přičemž u DNA virů byl prvně identifikován při restrikci MHV-68 (gammaherpesvirus-68) (Xuan et al., 2012). Lidský ZAP se vyskytuje ve dvou sestřihových variantách, dlouhé (hZAP-L) a krátké (hZAP-S) a váže se na specifický RNA motiv ZRE (ZAP-responsible element) (Mao et al., 2013). V případě HBV interaguje ZAP s motivem ZRE přítomným na mRNA a zprostředkovává její degradaci. V lidských hepatocytech dochází ke kontinuální basální expresi jak dlouhé, tak krátké ZAP izofomy a bylo navíc zjištěno, že krátká forma může být jako v případě jiných restrikčních faktorů dále indukována IFN a IPS-1 (beta interferon promoter stimulator 1). ZAP má tak roli ve vrozené imunitě jako antivirový restrikční faktor

a budoucí poznatky o jeho funkci by mohly přispět k potenciálnímu využití v terapii HBV (Mao et al., 2013).

### **Tetherin**

Restrikční faktor tetherin, jiným názvem BST-2, je membránový protein, jenž má N-koncovou cytoplasmatickou doménu, extracelulární coiled coil doménu a C-terminální GPI (glykofosfatidylinositol) kotvu. Jeho produkce je inducibilní interferonem (Yan et al., 2015). Tento protein je znám jako restrikční faktor pro HIV infekci, kde inhibuje uvolňování virionů z infikovaných buněk (Neil et al., 2008). Yan a spolupracovníci zjistili, že tetherin funguje jako restrikční faktor i u viru HBV. Nachází se společně s viriony na multivesikulárních tělíčkách a zabraňuje jejich uvolňování (Yan et al., 2015).

## **3.2. Parvoviry**

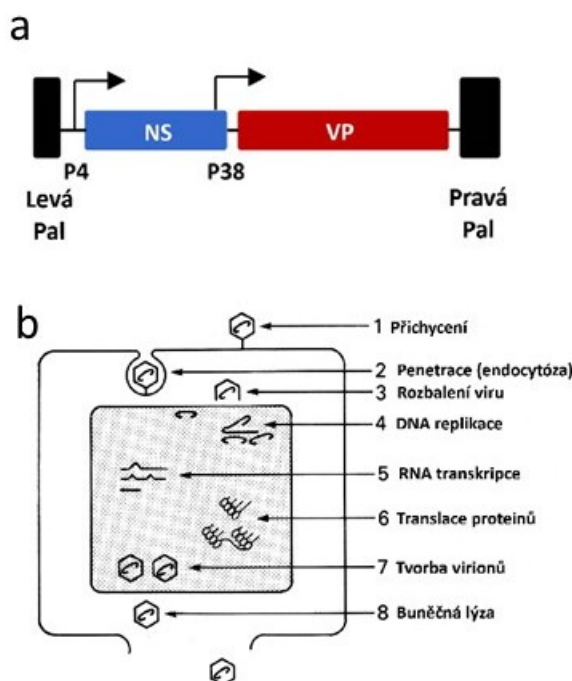
### **3.2.1. Charakteristika čeledi a replikační cyklus**

Virová čeleď *Parvoviridae* soustřeďuje malé neobalené viry s kapsidou založenou na ikosahedrální symetrii a genomem tvořeným jednovláknovou DNA (ssDNA) (Rogo et al., 2014; Tu et al., 2015). Viry podčeledi *Parvovirinae* napadají obratlovce a hostiteli podčeledi *Densovirinae* jsou bezobratlí. Zároveň se zástupci této čeledi dělí na skupinu autonomních virů, například lidský parvovirus B19 (human parvovirus B19) nebo myší parvovirus MVM (minute virus of mice) a virů, pro jejichž replikaci je nezbytná koinfekce jiným virem, většinou z čeledi *Adenoviridae* nebo *Herpesviridae*. Příkladem může být například virus AAV (adeno-associated virus). V případě infekce parvovirem v nepřítomnosti pomocného viru dochází k integraci genomu do hostitelských chromozomů a vytvoření latentní infekce, jež může být aktivována pozdější infekcí hostitele pomocným virem. (Chisaka et al., 2003; Tijssen, 1999). Lidský autonomní parvovirus B19 je příčinou tzv. páté nemoci u dětí, projevující se vyrážkou, může působit také aplastické krize a v těhotenství těžká poškození plodu (hydrops fetalis), dále persistentní anemie u lidí se sníženou imunitou, kardiomyopatie i záněty různých tkání (Shrnuto v (Ganaie and Qiu, 2018).

Na obou koncích genomu se nachází palindromové koncové sekvence (Pal) o velikosti 120-250 nt, z nichž každá tvoří rozdílnou vlásenkovou sekundární strukturu podle typu jednotlivých virů (Rogo et al., 2014; Tu et al., 2015). U většiny členů čeledě *Parvoviridae* obsahuje genom dva ORF, přičemž ORF1 kóduje nestrukturní protein NS, jenž se uplatňuje při regulaci genomové replikace a díky své cytotoxicitě způsobuje apoptózu a ORF2 strukturní proteiny VP (VP1, VP2 a u některých virů i VP3 vznikající štěpením VP2), které hrají roli při stavbě virové kapsidy (Marchini et al., 2015) (Obrázek 12).



Replikační cyklus Parvovirů je závislý na hostitelských buněčných funkcích a k replikaci dochází v buněčném jádře v takzvaných APAR tělískách (autonomous parvovirus-associated replication) (Marchini et al., 2015; Tijssen, 1999). Viry infikují rychle se dělící buňky při S-fázi buněčného cyklu. (Marchini et al., 2015). Virus využívá pro transkripci i replikaci genomů hostitelských enzymů. V prvním kroku replikačního cyklu probíhá konverze ssDNA na dsDNA replikativní formu, jež je v dalším kroku využita pro transkripci mRNA a tvorbu dalších replikačních intermediátů. V příštím kroku dochází ke spuštění DDR a následnému zastavení buněčného cyklu v S-fázi. Jakmile jsou translatovány kapsidové proteiny, dochází k enkapsidaci nových genomů a k transportu virových částic skrze endoplasmatické retikulum a Golgiho aparát k buněčné membráně (Obrázek 12) (Marchini et al., 2015).



**Obrázek 12: (a) Genom čeledi *Parvoviridae*.** Genom je tvořen ssDNA, jež má na obou koncích palindromatické terminální sekvence (Pal), které slouží jako replikační primery. Promotory P4 a P38 regulují transkripci. Genom většiny členů čeledi *Parvoviridae* obsahuje dva ORF. ORF1 kóduje nestrukturní protein NS, ORF2 kóduje VP proteiny **(b) Schéma replikačního cyklu čeledi *Parvoviridae*.** Upraveno podle (a) (Angelova et al., 2015), (b) (Rogo et al., 2014).

### 3.2.2. Restrikční faktory

Pro viry čeledi *Parvoviridae* není známo mnoho restrikčních faktorů a poznatky se omezují spíše na hostitelské faktory potřebné pro replikační cyklus, jejichž nedostatek může vést k inhibici virové replikace.

#### Protein APOBEC3A

Jako restrikční faktor pro parvoviry byl popsán APOBEC3 (Chen et al., 2006; Narvaiza et al., 2009). Chen a spolupracovníci zjistili, že APOBEC3A (A3A) je restrikčním faktorem pro AAV a retrotranspozony. Dokumentovali, že tento restrikční faktor se nacházel jak v cytoplasmě, tak

v buněčném jádře, kde blokoval tvorbu replikačních center AAV. Studie (Narvaiza et al., 2009) prokázala, že A3A inhibuje nejen dependovirus AAV, ale také autonomní myší parvovirus MVM. Zatímco z předchozí práce nebylo jasné, zdali je pro inhibici replikace nutná katalytická aktivita A3A, Narvaiza se spolupracovníky ukázal, že inhibice A3A nevyžaduje cytidin deaminázovou aktivitu pro restrikcí obou parvovirů. Byla provedena mutační analýza bodově mutovaných A3A proteinů a také chimérických A3A a A3G proteinů. Tyto mutanty byly testovány jak na deaminázovou aktivitu, tak na schopnost inhibovat virovou replikaci. Podařilo se jim identifikovat mutanty, které ztratily deaminázovou aktivitu, ale zachovaly si schopnost virové restrikce.

Zatímco pokusy předchozích prací byly prováděny *in vitro*, studie (Nakaya et al., 2016) zkoumala, jestli získané pokusy o restrikcí herpesvirů a myšího parvoviru MVM budou platit i *in vivo* pokusech. K tomuto účelu použili myši s vyřazeným genem pro APOBEC3 (A4 „knockout“) a transgenní myši produkující lidský APOBEC3A nebo APOBEC3G. Překvapivě bylo zjištěno, že myši s vyřazeným myším APOBEC3 i transgenní myši, jež produkují APOBEC3G, a myši divokého typu byly nezměněně infikovány lidským nebo myším herpesvirem. Pro infekci parvovirem bylo zjištěno, že lidský APOBEC3A, ale ne myší APOBEC3 inhiboval infekci myší. Pokusy zároveň potvrdily, že inhibice nezávisí na deaminázové aktivitě APOBEC3. Tato studie ukazuje, že *in vitro* získané výsledky nemusí odrážet situaci *in vivo*, a že restrikcí faktory je nutné testovat i v *in vivo* podmínkách.

### **Protein PML**

Dalším významným restrikcí faktorem, jenž se uplatňuje u infekce AAV je PML protein (TRIM19). Autoři Mitchell a spolupracovníci (Mitchell et al., 2014) zkoumalí vliv proteinu PML na AAV. Jedná se o parvovirus, který je využíván jako vektor pro přenos genů v genové terapii. Autoři zjistili, že vyřazení genu pro PML (PML „knockout“) zesiluje transdukcí rekombinantního AAV2. Tento efekt byl způsoben inhibicí syntézy druhého vlákna parvovirové DNA. Nejsilnější inhibiční efekt na replikaci rekombinantního AAV měla izoforma PML II. Podobný inhibiční efekt PML II detekovali autoři u divokého typu AAV i dalšího parvoviru MVM. AAV pomocné viry kódují PML regulační proteiny, jež modifikují nebo úplně degradují PML a chrání tak AAV před jeho restrikcí účinky. Jako příklad lze uvést adenovirový protein E4Orf3, který způsobuje změnu globulárních PML NBs na trubicovité nefunkční útvary (Doucas et al., 1996; Leppard et al., 2009) nebo Herpesvirovou E3 ligázu ICP0, indukující proteasomovou degradaci PML (Everett et al., 2008; Maul and Everett, 1994). Jelikož protein PML II působí jako restrikcí faktor replikace genomu AAV i MVM, nabízí se otázka, zda PML II plní stejnou restrikcí roli i u dalších parvovirů a zda mohou být tyto poznatky využity k zesílení účinnosti přenosu genů pomocí AAV vektorů v genové terapii (Mitchell et al., 2014).

### 3.3. Polyomaviry

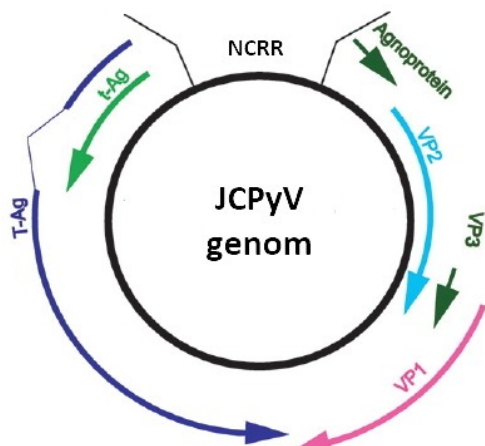
#### 3.3.1. Charakteristika čeledi a replikační cyklus

Čeď *Polyomaviridae* je další z čeledí malých DNA virů, jež bude z hlediska hostitelských restričních faktorů v této práci představena. Tato čeď se v posledních 10 letech velmi rozrostla o nové členy izolované z různých obratlovců – savců, včetně člověka, ptáků a ryb a dokonce i z bezobratlých (Moens et al., 2017). Prozatím bylo identifikováno 13 lidských polyomavirů. Dva již dlouho známé lidské polyomaviry BKPyV (BK polyomavirus), JCPyV (JC polyomavirus) působí závažná onemocnění u imunosupromovaných pacientů. Polyomaviry mají nádorový potenciál. Poměrně nově objevený MCPyV (Merkell cell polyomavirus) může být příčinou agresivního karcinomu Merkelových buněk u lidí. Opičí virus SV40 (Simian virus 40) a myší polyomavirus MPyV (mouse polyomavirus) jsou již dlouho podrobně studované modelové polyomaviry, při jejichž studiu bylo objeveno množství mechanismů buněčných procesů, jako například replikace DNA, onkogeneze, onkosuprese a další (Shrnuto v (Moens et al., 2017)).

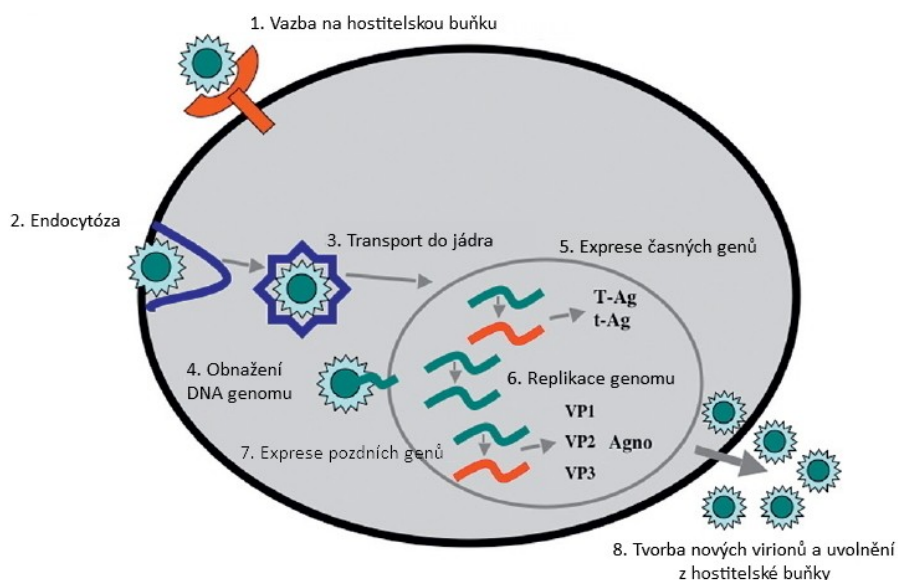
Polyomaviry mají neobalenou kapsidu ikosahedráního tvaru, jež uzavírá dsDNA genom o velikosti přibližně 5 kbp. Genomová dsDNA tvoří komplex s buněčnými histony H2A, H2B, H3 a H4 a v buněčném jádře je v podobě mini-chromosomu (Eash et al., 2006). Genom je rozdělen na časnou a pozdní kódující oblast oddělenou regulační oblastí (NCRR), jež obsahuje replikační počátek, časný a pozdní promotor a enhancer (Eash et al., 2006; Wendzicki et al., 2015) (Obrázek 13). Časná oblast kóduje regulační proteiny nazývající se tumor antigeny, přičemž alternativním sestřihem primárního transkriptu vznikají mRNA pro velký (T-Ag, LT) a malý (t-Ag, sT) tumor antigen, a u hlodavčích polyomavirů ještě střední T antigen (S-Ag, ST). Časné antigeny jsou důležité jak pro účinnou transkripci a replikaci virových genomů, tak pro deregulaci buňky. Velký T antigen je multifunkční protein, jenž je nezbytný pro zahájení replikace virových genomů a může navíc fungovat jako transkripční aktivátor, chaperon a buněčný regulátor. T-Ag je schopen vázat onkosupresory pRb a většinou i p53. S dalšími T antigeny může immortalizovat a nádorově transformovat pro polyomavirus nepermissivní buňky. Pozdní kódující oblast kóduje strukturní proteiny VP1, VP2 a VP3, jež stejně jako T-antigeny vznikají z mRNA po alternativním sestřihu. Některé polyomaviry kódují navíc agnoprotein, jehož role ve virovém replikačním cyklu je modulace transkripce a replikace. (Eash et al., 2006).

Replikační cyklus čeledi *Polyomaviridae* je rozdělen na časnou a pozdní fázi. Prvním krokem časně fáze je adsorpce viru na hostitelskou buňku a vstup receptorem zprostředkovanou endocytózou. Virus je v endocytických váčcích dopraven cytoskeletálním transportem do endoplasmatického retikula, odkud jsou částečně rozvolněné viriony translokovány do cytosolu a následně dopraveny přes jaderné póry do jádra. Dalším krokem je transkripce časně oblasti. Následně je pomocí T-Ag zahájena pozdní fáze replikací virových genomů. V pozdní fázi probíhá

transkripce strukturálních proteinů a morfogeneze virionů. Na konci virového replikačního cyklu dochází k smrti infikované buňky (Eash et al., 2006; Mahon et al., 2009) (Obrázek 14).



**Obrázek 13: (a) Schéma genomu JCPyV.** Genom JCPyV čeledi Polyomaviridae obsahuje časnou a pozdní kódující oblast, jež jsou odděleny pomocí regulační nekódující oblasti (NCCR). Časná oblast kóduje velký tumor antigen (T-Ag) (tmavě modře) a malý tumor antigen (t-Ag) (světle zeleně). Pozdní oblast kóduje strukturální proteiny VP1 (růžově), VP2 (světle modře) a VP3 (tmavě zeleně) a agnoprotein (tmavě zeleně). Převzato a upraveno z (Eash et al., 2006).



**Obrázek 14: Schéma replikačního cyklu Polyomavirů.** Převzato a upraveno z (Eash et al., 2006)

### 3.3.2. Restrikční faktory

#### FAM111A

Protein FAM111A, jenž hraje roli při inhibici replikačního cyklu viru SV40, působí jako tzv. „host range“ restrikční faktor. Virová hostitelská oblast (host range) je soubor buněk, tkání nebo organismů ve kterých je virus schopen se zreplikovat. Tento restrikční faktor byl objeven autory práce (Fine et al., 2012), tak, že zjistili, že FAM111A je vyvazován C-koncovou doménou oblastí T-Ag. Autoři identifikovali tento dosud neznámý protein hmotnostní spektroskopií. Potlačení exprese, stejně jako zvýšená exprese T-Ag nebo C-koncové domény T-Ag zvyšovalo expresi virových genů i lytickou infekci SV40. Z pokusů vyplývá, že inhibiční efekt restrikčního faktoru FAM111A je překonáván virovým T-Ag. Nicméně přesný mechanismus jeho působení není prozatím znám. Jelikož FAM111A obsahuje trypsin-like serin peptidázovou doménu, předpokládá se, že může působit jako specifická peptidáza.

Bylo zjištěno, že T-Ag se pomocí C-terminální domény váže na FAM111A a působí tak proti jeho restriční peptidázové aktivitě. Nicméně bylo prokázáno, že T-Ag se při této vazbě neuplatňuje jako substrát pro FAM111A a nedochází k jeho proteolýze (Fine et al., 2012). Množství proteinu FAM111A se mění během fáze buněčného cyklu, přičemž nejnižší exprese je v průběhu G0 fáze a nejvyšší exprese je dosaženo v G2/M fázi. Předpokládá se, že rozdíly v hladině FAM111A mohou ovlivnit virový replikační cyklus a účinnost restrikce (Fine et al., 2012).

### **SRSF1**

SRSF1 (Serine/Arginine Splicing Factor 1), znám také pod názvem SF2/ASF, je dalším z restričních faktorů polyomavirů (Wang and Manley, 1995). SRSF1 patří do rodiny SR proteinů, jejichž hlavní rolí je sestřih pre-mRNA, a uplatňují se i při alternativním sestřihu (Wang and Manley, 1995). SR proteiny mají navíc roli i v dalších krocích metabolismu RNA, v genomové stabilitě a buněčném cyklu (Li, 2005; Li and Manley, 2005). Doposud bylo identifikováno 12 lidských SR proteinů (Manley and Krainer, 2010). Tyto proteiny jsou většinou jaderné a vyskytují se u jaderných „speckles“ nebo u IGC (interchromatin granule clusters), avšak některé z nich, včetně SRSF1 pendlují mezi jádrem a cytoplasmou (Shrnuto v (Caceres et al., 1998)). Protein SRSF1 byl poprvé identifikován jako regulátor sestřihu a exprese časných genů T-Ag a t-Ag u viru SV40 (Ge and Manley, 1990). Mezi funkce tohoto proteinu patří indukce tvorby spliceozómu, sestřih pre-mRNA, regulace transkripce a translace, sumoylace a výše zmíněná regulace alternativního sestřihu u SV40 (Krainer et al., 1990). Stejně jako v případě SV40 se SRSF1 uplatňuje jako regulátor sestřihu virových transkriptů i u JCPyV, přičemž u JCPyV funguje navíc jako inhibitor virové transkripce a replikace. Skrze vazbu na specifickou sekvenci CR3, nacházející se ve virovém promotoru nebo enhanceru, je SRSF1 je schopen při infekci JCPyV negativně regulovat aktivitu promotoru a inhibovat tak virovou transkripci v gliových buňkách. SRSF1 inhibuje také transkripci i v transformovaných buňkách s integrovaným virovým genomem (Sariyer and Khalili, 2011). Tento restriční mechanismus je naopak potlačen pomocí T-Ag, jenž se váže na promotor SRSF1 a inhibuje jeho transkripci (Craigie et al., 2015). Strukturně obsahuje SRSF1 doménu bohatou na arginin a serin (RS), jež je zodpovědná za interakci s komponentami spliceozomu, a dvě kopie RNA vazebných motivů (RRM1 a RRM2). RRM se uplatňují při vazbě RNA, přičemž RRM1 je hlavní doménou zodpovědnou za vazbu na DNA JCPyV nezbytnou pro inhibici transkripce (Sariyer and Khalili, 2011).

## **3.4. Papillomaviry**

### **3.4.1. Charakteristika čeledi a replikační cyklus**

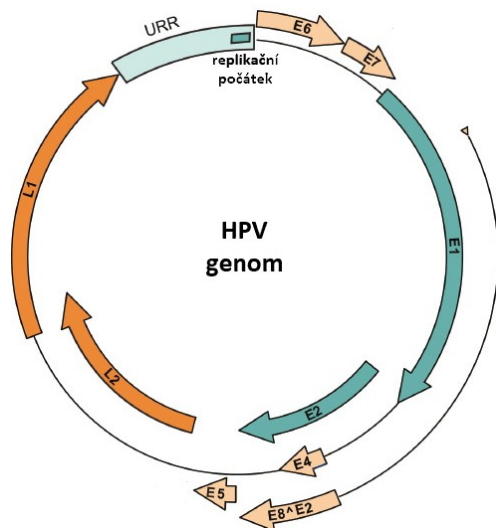
V současnosti bylo prozatím identifikováno přibližně 140 zvířecích a přes 200 lidských zástupců čeledi *Papillomaviridae* (McBride, 2017). HPV viry napadají sliznicové a pokožkové epiteliální buňky, přičemž

infekce může být asymptomatická nebo vést k tvorbě bradavic a papilomů. Zároveň mohou tyto viry u imunokompromitovaných hostitelů způsobovat několik typů rakoviny nebo tvořit latentní stádia (McBride, 2017; Porter et al., 2017; Reinholz et al., 2013). Podle onkogenního potenciálu se HPV dále dělí na nízko rizikové a vysoce rizikové (Reinholz et al., 2013). Mezi nízko rizikové papillomaviry se řadí například HPV1 a HPV6, které způsobují benigní genitální bradavice a pouze výjimečně způsobují maligní transformace. Na druhou stranu bylo popsáno 15 papillomavirů řadících se do skupiny vysoce rizikových subtypů, například HPV16 nebo HPV18 (Anacker and Moody, 2017; Reinholz et al., 2013). Tyto viry způsobují karcinomy buněk dlaždicovitého epitelu a jsou, mimo jiné, etiologickým agens karcinomu děložního čípku a nádorů hlavy a krku. (Anacker and Moody, 2017; Reinholz et al., 2013).

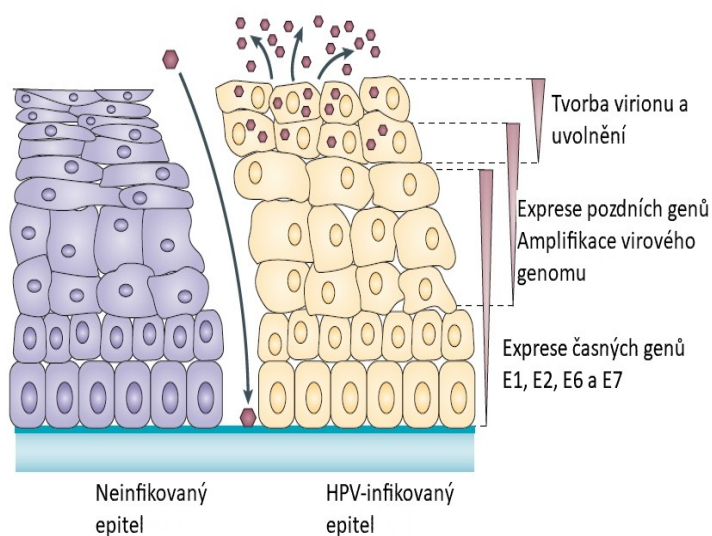
Viry čeledi *Papillomaviridae* jsou malé neobalené viry s ikosahedrální kapsidou, jež uzavírá kruhový dsDNA genom o přibližné velikosti 8 kbp (Cerqueira and Schiller, 2017). Genomová DNA je v komplexu s histony a v buňce se vyskytuje v podobě minichromosomu (Anacker and Moody, 2017). Genom všech papillomavirů obsahuje čtyři ORFs, přičemž kóduje dva strukturální proteiny L1 a L2, jež tvoří virovou kapsidu, a proteiny E1 a E2, uplatňující se při virové replikaci. Některé papillomaviry navíc obsahují dodatečné čtecí rámce kódující proteiny E4, E5, E6, E7 a E10, které hrají roli při adaptaci na hostitelské prostředí, tvorbě vhodného replikačního prostředí, deregulaci buněčného cyklu, úniku imunitnímu systému a modifikaci a rekrutování hostitelských buněčných faktorů (McBride, 2017; Porter et al., 2017). Funkčně je protein E1 ATP-dependentní virová helikáza, nezbytná pro replikaci virových genomů a vázající se do replikačního počátku (Anacker and Moody, 2017). Protein E2 je potřebný pro upevnění E1 v ori a současně je hlavním regulátorem transkripce (Porter et al., 2017). E4 a E5 se uplatňují při uvolňování virionů z hostitelských buněk a produktivní virové replikaci. Proteiny E6 a E7 jsou významné onkoproteiny, jež u vysoce rizikových HPV způsobují deregulaci buněčného cyklu, díky jejich schopnosti vyvazovat onkosupresory pRb a p53 (Anacker and Moody, 2017). Navíc existuje u papillomavirů fúzní protein E8<sup>E2</sup>, kódovaný alternativně sestřiženým transkriptem, který reguluje virovou replikaci a transkripci a je důležitý pro tvorbu perzistentní infekce (McBride, 2017) (Obrázek 15).

Replikační cyklus Papillomavirů je závislý na vrstevnatém slizničním nebo pokožkovém epitelu a jeho diferenciaci. Replikační cyklus je rozdělen do čtyř fází; primární DNA amplifikace, zaváděcí fáze (establishment phase), udržovací fáze (maintenance phase) a produktivní fáze (productive phase) (Anacker and Moody, 2017; McBride, 2017). K infekci hostitele dochází při mikropoškození epitelu a virus v následujícím kroku vstupuje endocytózou do mitoticky aktivního basálního keratinocyty. Při mitotickém rozpadu jaderné membrány je virová částice následně transportována do jádra a zbarvena virové kapsidy (Porter et al., 2017). V první fázi papillomavirového replikačního cyklu dochází k primární amplifikaci DNA. V druhé, udržovací fázi probíhá virová replikace, přičemž virové genomy jsou udržovány v podobě epizomu (extrachromosomálního replikonu) v nízkém konstantním počtu a

rozdělovány do dceřiných buněk (Anacker and Moody, 2017; McBride, 2017). K produktivní fázi replikačního cyklu dochází při diferenciaci keratinocyty, jenž se postupně posunuje vrstevnatým epitelem vzhůru od bazální linie buněk. V této poslední fázi nastává vysoká produkce virových genomů, které jsou následně v nejvyšších vrstvách epitelu enkapsidovány do nových virionů a opouštějí hostitelskou buňku (McBride, 2017) (Obrázek 16).



**Obrázek 15: Genom lidského Papillomaviru (HPV).** Základní regulační proteiny kódované genomy všech papillomavirů jsou znázorněny tmavomodře a strukturální proteiny oranžově. Světle oranžově jsou zobrazeny doplňkové proteiny. Na schématu je dále znázorněna regulační oblast URR (upstream regulatory region), jež obsahuje replikační počátek a vazebná místa pro protein E2 a buněčné transkripční faktory. Upraveno podle (McBride, 2017).



**Obrázek 16: Replikační cyklus papillomavirů.** Papillomaviry infikují mitoticky se dělící keratinocyty bazální vrstvy, ve kterých udržují stabilní nízký počet replikované genomové DNA. Při diferenciaci keratinocytů nejprve probíhá expresce časných genů a při jejich pohybu směrem nahoru od bazální vrstvy dochází k produktivní virové replikaci, kdy je produkováno až tisíc genomových kopií na buňku. V horní vrstvě keratinocytů dochází k enkapsidaci genomů a uvolnění virionů z hostitelské buňky. Upraveno podle (Moody and Laimins, 2010)

### 3.4.2. Restrikční faktory

Pro čeleď Papillomaviridae je známo poměrně mnoho faktorů, podílejících se na restrikci virové infekce, avšak mechanismy působení byly objasněny pouze pro několik z nich.

#### APOBEC

Restrikční role APOBEC deamináz v papillomavirových infekcích není zcela jasná. Práce (Vartanian et al., 2008) ukázala, že oba řetězce HPV DNA mohou být editovány proteiny APOBEC. Autoři

identifikovali editované sekvence v prekarcinomových buňkách děložního čípku u HPV 16 a ve vzorcích z bradavic u HPV 1a. V pokusech *in vitro* byly proteiny A3A, A3C a A3H schopny editovat HPV DNA. Autoři usoudili, že by tyto tři enzymy mohly být zapojeny i do editace HPV DNA *in vivo*. Existují i další práce, jež se zabývají rolí APOBEC deamináz v HPV indukovaných karcinomech (Alexandrov et al., 2013; Westrich et al., 2018). V rakovinotvorných buňkách protein E7 HPV 16 stabilizuje APOBEC3A pomocí inhibice jeho degradace závislé na cullinu 2 (Westrich et al., 2018). Studie Warrena a spolupracovníků ukazuje, že hladiny A3A a A3B proteinů jsou v HPV pozitivních keratinocytech a cervikálních tkáních v časném stádiu progresu nádoru zvýšené. Viriony HPV 16 se tvořily v přítomnosti A3A, avšak ne v přítomnosti A3B nebo A3C, kdy byla infektivita průkazně snížena. Navíc, při snížení hladiny A3A v lidských keratinocytech pomocí siRNA došlo ke zvýšení infekivity HPV. To vedlo autory k závěru, že A3A je restričním faktorem HPV. (Warren et al., 2015). APOBEC proteiny způsobují deaminaci C na U, přičemž ze sekvenování vyplývá, že alfa-HPVs mají nižší obsah TC dinukleotidů, jež jsou cílem APOBEC editační aktivity. Toto přizpůsobení bylo pravděpodobně vytvořeno v průběhu společného evolučního vývoje alfa-HPVs a hostitelů (Warren and Pyeon, 2015). Jiným mechanismem restričního působení by mohla být také A3A RNA editační aktivita, jež by mohla vést k deaminaci L1 a L2 mRNA transkriptů a následné nefunkčnosti virové kapsidy (Warren et al., 2017). Nicméně autoři, kteří se zabývají problematikou role APOBEC v infekci papillomaviry se shodují, že bude třeba dalšího výzkumu k jejímu objasnění (Shrnuto v (Porter et al., 2017)).

### **PML NBs**

Důležitou roli v restrikci papillomavirů hrají některé komponenty PML NBs. Protein Sp100 se vyskytuje v PML NBs ve čtyřech různých izoformách (Sp100A, Sp100B, Sp100C a Sp100HMG). Některé z těchto izoform se vyskytují v PML NBs stále, některé se naopak pohybují mezi nukleoplasmou a PML NBs. Sp100 proteiny obsahují dimerizační a HP1 (heterochromatin protein 1) vazebnou doménu. Jednotlivé izoformy se liší v obsahu dalších domén jako je DNA vazebná doména nebo chromatin vazebný motiv zvaný „bromodomain/PHD (plant homeodomain) finger“. Díky DNA vazebným doménám se tyto proteiny uplatňují při regulaci genové exprese (Shrnuto v (Stepp et al., 2013)). Studie popsaná v práci (Stepp et al., 2013) prokázala, že snížení množství Sp100 pomocí siRNA v primárních lidských keratinocytech má za následek zvýšení virové transkripce a replikace. Autoři pozorovali represi transkripce a replikace virového genomu proteinem Sp100 pouze během počátečního stádia ustanovení virové infekce, což ukazuje, že protein Sp100 působí jako represor na papillomavirové DNA přicházející do jádra (Stepp et al., 2013).

Další práce této výzkumné skupiny (Stepp et al., 2017) ukázala, že Sp100 lokalizuje s místy replikace papillomavirových genomů v primárních keratinocytech a v buňkách získaných



z cervikálních biopsií. Další analýza prokázala, že se Sp100 vázal k papillomavirovému genomu a množství navázaného proteinu napříč genomem stoupalo v pozdní fázi infekce. Z těchto výsledků a analýzy virové transkripce po použití siRNA namířené proti Sp100 autoři učinili závěr, že Sp100 reprimuje papillomavirový replikační cyklus jak v časně, tak v pozdní fázi infekce. Bylo zjištěno, že hlavní restriční faktory HPV představují izoformy Sp100B, -C a -HMG, ale ne Sp100A (Habiger et al., 2016) (Shrnuto také v (Porter et al., 2017)).

Zajímavé je, že protein DAXX, který je stálou komponentou PML NBs a uplatňuje se jako restriční faktor při infekci herpesviru HCMV a v adenovirové infekci nemá na HPV negativní vliv (Scherer and Stamminger, 2016). DAXX je pomocí proteinu L2 rekrutován do PML NBs, avšak jeho následnou roli zbývá objasnit (Florin et al., 2002). (Shrnuto v (Porter et al., 2017)).

### **IFI16**

Jaderný DNA senzor IFI16 (viz kapitola 2.1.1) představuje další z faktorů uplatňujících se při restrikci papillomavirové infekce, přičemž ale působí nezávisle na své DNA senzorické aktivitě (Porter et al., 2017). Lo Cigno a spolupracovníci ukázali, že potlačení exprese IFI16 pomocí siRNA v imortalizovaných keratinocytech zvyšuje výrazně replikaci HPV 18. Naopak zvýšená exprese IFI16 potlačila replikaci HPV 18. Protein IFI16 navíc také snižoval transkripci virového genomu (Lo Cigno et al., 2015). Autoři zároveň ukázali, že tento restriční faktor zprostředkovává posttranslační modifikace (metylace) histonů na papillomavirových minichromosomech tak, že indukuje pokles aktivačních euchromatinových značek (dimetylovaný histon 3 v pozici K4-H3K4) a vzrůst inhibičních heterochromatinových značek (dimetylovaný H3K9) jak na časném, tak na pozdním promotoru (Lo Cigno et al., 2015). IFI16 je schopný zprostředkovat restrikci replikace a transkripce i integrovaného papillomavirového genomu. Zatím není jasný mechanismus indukce změn v modifikacích chromatinu. (Porter et al., 2017; Lo Cigno et al., 2015)

### **IFIT1**

Protein IFIT1, známý také pod názvy p56 nebo ISG56, patří k rodině IFIT1 proteinů kódovaných ISGs indukovanými virovou infekcí. Společným rysem této skupiny proteinů je, že obsahují strukturní motivy zvané tetratricopeptidy (tandemové repetice aminokyselin vytvářejících  $\alpha$  helixy, jež jsou důležité pro protein-proteinové interakce (Blatch and Lässle, 1999). Proteiny této rodiny byly identifikovány jako součást interferonových obranných mechanismů inhibující některé RNA viry (West Nile virus, Virus lymfocytické choriomeningitidy nebo virus hepatitidy) na úrovni translace (Wacher et al., 2007; Wang et al., 2003). Jiný mechanismus virové restrikce byl popsán při infekci papillomavirem HPV 18. Bylo zjištěno, že IFIT1 se N-koncovou částí váže na C-koncovou oblast E1 proteinu HPV 18, což způsobuje inhibici vazby E1 na virový replikační počátek a zablokování jeho

helikázové aktivity. Navíc IFIT1 potlačuje interakci E1 a E2, která je důležitá pro stabilizaci E1 ve virovém ori. Zmíněnými mechanismy je IFIT1 schopen účinně inhibovat replikaci HPV DNA (Saikia et al., 2010; Terenzi et al., 2008).

### **Smc5/6**

V práci (Bentley et al., 2018) bylo zjišťováno, jestli je tak jako v případě HBV komplex Smc5/6 restričním faktorem papillomavirů. Autoři zjistili, že se Smc5/6 váže na virový transkripční faktor E2. Nebyl však nalezen důkaz, že by komplex Smc5/6 ovlivňoval transkripční aktivaci E2 nebo transkripci virových genů. Přítomnost E2 proteinu zároveň neovlivňovala hladinu Smc5/6. Autoři tudíž soudí, že v případě papillomavirové restrikce hraje Smc5/6 spíše pozitivní roli, např. v rozkladu multimerních virových DNA na monomery nebo při asociaci papillomavirových minichromosomů k mitotickému chromatinu. (Bentley et al., 2018).

## 4. Závěr

Intenzivní výzkum restričních faktorů namířených proti virům s DNA genomem byl odstartován objevem vnitrobuněčných DNA senzorů, jako např. cGAS nebo IFI16. Ten přišel mnohem později, než identifikace senzorů RNA. Většina poznatků vztahujících se k restričním faktorům byla získána na retrovirech nebo velkých virech s DNA genomem. Studium restričních faktorů inhibujících malé viry s DNA genomem, jako hepadnaviry, parvoviry, polyomaviry nebo papillomaviry, které jsou hlavním předmětem této práce, je v současné době v počátcích.

Nejvíce prozkoumanými restričními faktory účastnícími se inhibice replikace malých virů s DNA genomem jsou proteiny rodiny APOBEC a PML NBS s jejich proteinovými složkami – proteiny PML, DAXX a Sp100. Z dosavadních znalostí o restričních faktorech vyplývá, že některé restriční faktory jsou více specifické a některé naopak obecnější. PML NBS a protein APOBEC jsou obecnými restričními faktory, jelikož se inhibičně uplatňují při infekci mnoha DNA i RNA viry různých čeledí. Opačným případem je například restriční faktor SRSF1, jenž je více specifický a byl prozatím identifikován jako restriční faktor pouze u čeledi *Polyomaviridae*. Některé restriční faktory inhibují různé viry odlišnými mechanismy, jako je tomu například v případě PML NBS, jež působí jinak u virů čeledi *Parvoviridae* a *Papillomaviridae* nebo APOBEC, který inhibuje řadu virů svou deaminázovou aktivitou, zatímco u jiných virů byla prokázána inhibice nezávislá na jeho enzymové aktivitě. Viry se specificky brání těmto hostitelským restričním faktorům, ať už přímou inhibicí jejich funkce nebo tím, že unikají rozpoznání senzory a restričními faktory. Z prozatím shromážděných informací vyplývá, že restriční faktor může hrát inhibiční roli při replikaci jednoho viru a naopak pozitivní roli v replikačním cyklu jiného viru. Příkladem takového restričního faktoru je komplex Smc5/6, který reprimuje transkripci HBV, ale naopak se pozitivně účastní replikačního cyklu HPV. Důležitým poznáním je, že funkce restričních faktorů popsané na základě pokusů *in vitro* nemohou být bez ověření zobecňovány pro situaci *in vivo*. To bylo ukázáno např. při studiu restrikce parvovirů proteiny APOBEC.

Virové restriční faktory jsou velmi současným tématem a jejich výzkum se neustále rozvíjí. Díky pochopení specifických mechanismů, jimiž restriční faktory při infekci na viry působí a také mechanismů, kterými viry překonávají jejich účinky, bude možné najít nové cíle pro vývoj antivirových terapeutik.

## 5. Literatura

- Abdul, F., Filleton, F., Gerossier, L., Paturel, A., Hall, J., Strubin, M. and Etienne, L.** (2018). Smc5/6 Antagonism by HBx Is an Evolutionarily Conserved Function of Hepatitis B Virus Infection in Mammals. *J Virol* **92**, e00769-18, /jvi/92/16/e00769-18.atom.
- Abe, T. and Barber, G. N.** (2014). Cytosolic-DNA-Mediated, STING-Dependent Proinflammatory Gene Induction Necessitates Canonical NF- $\kappa$ B Activation through TBK1. *Journal of Virology* **88**, 5328–5341.
- Alexandrov, L. B., Australian Pancreatic Cancer Genome Initiative, ICGC Breast Cancer Consortium, ICGC MML-Seq Consortium, Alexandrov, L. B., Nik-Zainal, S., Wedge, D. C., Aparicio, S. A. J. R., Behjati, S., Biankin, A. V., et al.** (2013). Signatures of mutational processes in human cancer. *Nature* **500**, 415–421.
- Anacker, D. C. and Moody, C. A.** (2017). Modulation of the DNA damage response during the life cycle of human papillomaviruses. *Virus Research* **231**, 41–49.
- Angelova, A. L., Geletneký, K., Nüesch, J. P. F. and Rommelaere, J.** (2015). Tumor Selectivity of Oncolytic Parvoviruses: From in vitro and Animal Models to Cancer Patients. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* **3**,.
- Ballana, E. and Esté, J. A.** (2015). SAMHD1: At the Crossroads of Cell Proliferation, Immune Responses, and Virus Restriction. *Trends in Microbiology* **23**, 680–692.
- Barr, S. D., Smiley, J. R. and Bushman, F. D.** (2008). The Interferon Response Inhibits HIV Particle Production by Induction of TRIM22. *PLoS Pathog* **4**, e1000007.
- Bell, T. G. and Kramvis, A.** (2016). The Study of Hepatitis B Virus Using Bioinformatics. In *Bioinformatics - Updated Features and Applications* (ed. Abdurakhmonov, I. Y.), p. InTech.
- Benhenda, S., Cougot, D., Buendia, M.-A. and Neuveut, C.** (2009). Chapter 4 Hepatitis B Virus X Protein. In *Advances in Cancer Research*, pp. 75–109. Elsevier.
- Bentley, P., Tan, M. J. A., McBride, A. A., White, E. A. and Howley, P. M.** (2018). The SMC5/6 Complex Interacts with the Papillomavirus E2 Protein and Influences Maintenance of Viral Episomal DNA. *Journal of Virology* **92**, e00356-18, /jvi/92/15/e00356-18.atom.
- Bernardi, R. and Pandolfi, P. P.** (2007). Structure, dynamics and functions of promyelocytic leukaemia nuclear bodies. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **8**, 1006–1016.
- Bhat, N. and Fitzgerald, K. A.** (2014). Recognition of cytosolic DNA by cGAS and other STING-dependent sensors: HIGHLIGHTS. *Eur. J. Immunol.* **44**, 634–640.
- Bick, M. J., Carroll, J.-W. N., Gao, G., Goff, S. P., Rice, C. M. and MacDonald, M. R.** (2003). Expression of the Zinc-Finger Antiviral Protein Inhibits Alphavirus Replication. *Journal of Virology* **77**, 11555–11562.
- Blatch, G. L. and Lässle, M.** (1999). The tetratricopeptide repeat: a structural motif mediating protein-protein interactions. *BioEssays* **21**, 932–939.
- Brennan, K. and Bowie, A. G.** (2010). Activation of host pattern recognition receptors by viruses. *Current Opinion in Microbiology* **13**, 503–507.
- Burdette, D. L., Monroe, K. M., Sotelo-Troha, K., Iwig, J. S., Eckert, B., Hyodo, M., Hayakawa, Y. and Vance, R. E.** (2011). STING is a direct innate immune sensor of cyclic di-GMP. *Nature* **478**, 515–518.
- Caceres, J. F., Sreaton, G. R. and Krainer, A. R.** (1998). A specific subset of SR proteins shuttles continuously between the nucleus and the cytoplasm. *Genes & Development* **12**, 55–66.
- Cao, W. and Wu, W.** (2018). Apolipoprotein B mRNA Editing Enzyme, Catalytic Polypeptide-Like Gene Expression, RNA Editing, and MicroRNAs Regulation. In *MicroRNA and Cancer* (ed. Wu, W.), pp. 75–81. New York, NY: Springer New York.
- Cerqueira, C. and Schiller, J. T.** (2017). Papillomavirus assembly: An overview and perspectives. *Virus Research* **231**, 103–107.
- Chan, Y. K. and Gack, M. U.** (2016). Viral evasion of intracellular DNA and RNA sensing. *Nature Reviews Microbiology* **14**, 360–373.
- Chang, H. R., Munkhjargal, A., Kim, M.-J., Park, S. Y., Jung, E., Ryu, J.-H., Yang, Y., Lim, J.-S. and Kim, Y.** (2018). The functional roles of PML nuclear bodies in genome maintenance. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* **809**, 99–107.
- Chelbi-Alix, M. K., Quignon, F., Pelicano, L. and Koken, M. H. M.** Resistance to Virus Infection Conferred by the Interferon- Induced Promyelocytic Leukemia Protein. *J. VIROL.* **9**.
- Chen, H., Lilley, C. E., Yu, Q., Lee, D. V., Chou, J., Narvaiza, I., Landau, N. R. and Weitzman, M. D.** (2006). APOBEC3A Is a Potent Inhibitor of Adeno-Associated Virus and Retrotransposons. *Current Biology* **16**, 480–485.
- Chen, Z., Zhu, M., Pan, X., Zhu, Y., Yan, H., Jiang, T., Shen, Y., Dong, X., Zheng, N., Lu, J., et al.** (2014). Inhibition of Hepatitis B virus replication by SAMHD1. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **450**, 1462–1468.

**Chen, Q., Sun, L. and Chen, Z. J.** (2016). Regulation and function of the cGAS–STING pathway of cytosolic DNA sensing. *Nature Immunology* **17**, 1142–1149.

**Chen, R., Zhao, X., Wang, Y., Xie, Y. and Liu, J.** (2017). Hepatitis B virus X protein is capable of down-regulating protein level of host antiviral protein APOBEC3G. *Sci Rep* **7**, 40783.

**Chisaka, H., Morita, E., Yaegashi, N. and Sugamura, K.** (2003). Parvovirus B19 and the pathogenesis of anaemia. *Reviews in Medical Virology* **13**, 347–359.

**Chiu, Y.-H., MacMillan, J. B. and Chen, Z. J.** (2009). RNA Polymerase III Detects Cytosolic DNA and Induces Type I Interferons through the RIG-I Pathway. *Cell* **138**, 576–591.

**Chow, K. T., Gale, M. and Loo, Y.-M.** (2018). RIG-I and Other RNA Sensors in Antiviral Immunity. *Annu. Rev. Immunol.* **36**, 667–694.

**Connolly, D. J. and Bowie, A. G.** (2014). The emerging role of human PYHIN proteins in innate immunity: Implications for health and disease. *Biochemical Pharmacology* **92**, 405–414.

**Coticello, S. G., Harris, R. S. and Neuberger, M. S.** (2003). The Vif Protein of HIV Triggers Degradation of the Human Antiretroviral DNA Deaminase APOBEC3G. *Current Biology* **13**, 2009–2013.

**Craigie, M., Regan, P., Otalora, Y.-L. and Sariyer, I. K.** (2015). Molecular interplay between T-Antigen and splicing factor, arginine/serine-rich 1 (SRSF1) controls JC virus gene expression in glial cells. *Virology Journal* **12**, 196.

**de Thé, H., Le Bras, M. and Lallemand-Breitenbach, V.** (2012). Acute promyelocytic leukemia, arsenic, and PML bodies. *The Journal of Cell Biology* **198**, 11–21.

**Decorsière, A., Mueller, H., van Breugel, P. C., Abdul, F., Gerossier, L., Beran, R. K., Livingston, C. M., Niu, C., Fletcher, S. P., Hantz, O., et al.** (2016). Hepatitis B virus X protein identifies the Smc5/6 complex as a host restriction factor. *Nature* **531**, 386–380.

**Dellaire, G.** (2006). The number of PML nuclear bodies increases in early S phase by a fission mechanism. *Journal of Cell Science* **119**, 1026–1033.

**Dell’Oste, V., Gatti, D., Giorgio, A. G., Gariglio, M., Landolfo, S. and Andrea, M. D.** (2015). The interferon-inducible DNA-sensor protein IFI16: a key player in the antiviral response. *16*.

**Di Pietro, A., Kajaste-Rudnitski, A., Oteiza, A., Nicora, L., Towers, G. J., Mehti, N. and Vicenzi, E.** (2013). TRIM22 Inhibits Influenza A Virus Infection by Targeting the Viral Nucleoprotein for Degradation. *Journal of Virology* **87**, 4523–4533.

**Diebold, S.** (2010). Innate recognition of viruses. *Immunology Letters* **128**, 17–20.

**Doucas, V., Ishov, A. M., Romo, A., Juguilon, H., Weitzman, M. D., Evans, R. M. and Maul, G. G.** (1996). Adenovirus replication is coupled with the dynamic properties of the PML nuclear structure. *Genes Dev.* **10**, 196–207.

**Duggal, N. K. and Emerman, M.** (2012). Evolutionary conflicts between viruses and restriction factors shape immunity. *Nature Reviews Immunology* **12**, 687–695.

**Dunphy, G., Flannery, S. M., Almine, J. F., Connolly, D. J., Paulus, C., Jønsson, K. L., Jakobsen, M. R., Nevels, M. M., Bowie, A. G. and Unterholzner, L.** (2018). Non-canonical Activation of the DNA Sensing Adaptor STING by ATM and IFI16 Mediates NF-κB Signaling after Nuclear DNA Damage. *Molecular Cell* **71**, 745-760.e5.

**Eash, S., Manley, K., Gasparovic, M., Querbes, W. and Atwood, W. J.** (2006). The human polyomaviruses. *Cellular and Molecular Life Sciences* **63**, 865–876.

**Eldin, P., Papon, L., Oteiza, A., Brocchi, E., Lawson, T. G. and Mehti, N.** (2009). TRIM22 E3 ubiquitin ligase activity is required to mediate antiviral activity against encephalomyocarditis virus. *Journal of General Virology* **90**, 536–545.

**Everett, R. D., Parada, C., Gripon, P., Sirma, H. and Orr, A.** (2008). Replication of ICP0-Null Mutant Herpes Simplex Virus Type 1 Is Restricted by both PML and Sp100. *Journal of Virology* **82**, 2661–2672.

**Fine, D. A., Rozenblatt-Rosen, O., Padi, M., Korkhin, A., James, R. L., Adelmant, G., Yoon, R., Guo, L., Berrios, C., Zhang, Y., et al.** (2012). Identification of FAM111A as an SV40 Host Range Restriction and Adenovirus Helper Factor. *PLoS Pathogens* **8**, e1002949.

**Florin, L., Schäfer, F., Sotlar, K., Streeck, R. E. and Sapp, M.** (2002). Reorganization of Nuclear Domain 10 Induced by Papillomavirus Capsid Protein L2. *Virology* **295**, 97–107.

**Franchini, D.-M. and Petersen-Mahrt, S. K.** (2014). AID and APOBEC deaminases: balancing DNA damage in epigenetics and immunity. *Epigenomics* **6**, 427–443.

**Galganski, L., Urbanek, M. O. and Krzyzosiak, W. J.** (2017). Nuclear speckles: molecular organization, biological function and role in disease. *Nucleic Acids Research* **45**, 10350–10368.

**Ganaie, S. S. and Qiu, J.** (2018). Recent Advances in Replication and Infection of Human Parvovirus B19. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* **8**, 166.

**Gao, B., Duan, Z., Xu, W. and Xiong, S.** (2009). Tripartite motif-containing 22 inhibits the activity of hepatitis B virus core promoter, which is dependent on nuclear-located RING domain. *Hepatology* **50**, 424–433.

**Ge, H. and Manley, J. L.** (1990). A protein factor, ASF, controls cell-specific alternative splicing of SV40 early pre-mRNA in vitro. *Cell* **62**, 25–34.

**Goldstone, D. C., Ennis-Adeniran, V., Hedden, J. J., Groom, H. C. T., Rice, G. I., Christodoulou, E., Walker, P. A., Kelly, G., Haire, L. F., Yap, M. W., et al.** (2011). HIV-1 restriction factor SAMHD1 is a deoxynucleoside triphosphate triphosphohydrolase. *Nature* **480**, 379–382.

**Goubau, D., Deddouche, S. and Reis e Sousa, C.** (2013). Cytosolic Sensing of Viruses. *Immunity* **38**, 855–869.

**Gramberg, T., Kahle, T., Bloch, N., Wittmann, S., Müllers, E., Daddacha, W., Hofmann, H., Kim, B., Lindemann, D. and Landau, N. R.** (2013). Restriction of diverse retroviruses by SAMHD1. *Retrovirology* **10**, 26.

**Habiger, C., Jäger, G., Walter, M., Iftner, T. and Stubenrauch, F.** (2016). Interferon Kappa Inhibits Human Papillomavirus 31 Transcription by Inducing Sp100 Proteins. *J. Virol.* **90**, 694–704.

**Habjan, M. and Pichlmair, A.** (2015). Cytoplasmic sensing of viral nucleic acids. *Current Opinion in Virology* **11**, 31–37.

**Hannoun, Z., Maarifi, G. and Chelbi-Alix, M. K.** (2016). The implication of SUMO in intrinsic and innate immunity. *Cytokine & Growth Factor Reviews* **29**, 3–16.

**Harris, R. S. and Dudley, J. P.** (2015). APOBECs and virus restriction. *Virology* **479–480**, 131–145.

**Hato, T. and Dagher, P. C.** (2015). How the Innate Immune System Senses Trouble and Causes Trouble. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology* **10**, 1459–1469.

**Hattmann, C. J., Kelly, J. N. and Barr, S. D.** (2012). TRIM22: A Diverse and Dynamic Antiviral Protein. *Molecular Biology International* **2012**, 1–10.

**Henderson, S. and Fenton, T.** (2015). APOBEC3 genes: retroviral restriction factors to cancer drivers. *Trends in Molecular Medicine* **21**, 274–284.

**Hollenbaugh, J. A., Gee, P., Baker, J., Daly, M. B., Amie, S. M., Tate, J., Kasai, N., Kanemura, Y., Kim, D.-H., Ward, B. M., et al.** (2013). Host Factor SAMHD1 Restricts DNA Viruses in Non-Dividing Myeloid Cells. *PLoS Pathog* **9**, e1003481.

**Holmes, R. K., Malim, M. H. and Bishop, K. N.** (2007). APOBEC-mediated viral restriction: not simply editing? *Trends in Biochemical Sciences* **32**, 118–128.

**Iwasaki, A. and Medzhitov, R.** (2015). Control of adaptive immunity by the innate immune system. *Nat Immunol* **16**, 343–353.

**Jakobsen, M. R. and Paludan, S. R.** (2014). IFI16: At the interphase between innate DNA sensing and genome regulation. *Cytokine & Growth Factor Reviews* **25**, 649–655.

**Jeong, G. U., Park, I.-H., Ahn, K. and Ahn, B.-Y.** (2016). Inhibition of hepatitis B virus replication by a dNTPase-dependent function of the host restriction factor SAMHD1. *Virology* **495**, 71–78.

**Kerur, N., Veetil, M. V., Sharma-Walia, N., Bottero, V., Sadagopan, S., Otageri, P. and Chandran, B.** (2011). IFI16 Acts as a Nuclear Pathogen Sensor to Induce the Inflammasome in Response to Kaposi Sarcoma-Associated Herpesvirus Infection. *Cell Host & Microbe* **9**, 363–375.

**Kim, E. T., White, T. E., Brandariz-Núñez, A., Diaz-Griffero, F. and Weitzman, M. D.** (2013). SAMHD1 Restricts Herpes Simplex Virus 1 in Macrophages by Limiting DNA Replication. *J. Virol.* **87**, 12949–12956.

**Kim, W., Lee, S., Son, Y., Ko, C. and Ryu, W.-S.** (2016). DDB1 Stimulates Viral Transcription of Hepatitis B Virus via HBx-Independent Mechanisms. *J. Virol.* **90**, 9644–9653.

**Kock, J. and Blum, H. E.** (2008). Hypermutation of hepatitis B virus genomes by APOBEC3G, APOBEC3C and APOBEC3H. *Journal of General Virology* **89**, 1184–1191.

**Koyama, S., Ishii, K. J., Coban, C. and Akira, S.** (2008). Innate immune response to viral infection. *Cytokine* **43**, 336–341.

**Krainer, A. R., Conway, G. C. and Kozak, D.** (1990). Purification and characterization of pre-mRNA splicing factor SF2 from HeLa cells. *Genes & Development* **4**, 1158–1171.

**Lahouassa, H., Daddacha, W., Hofmann, H., Ayinde, D., Logue, E. C., Dragin, L., Bloch, N., Maudet, C., Bertrand, M., Gramberg, T., et al.** (2012). SAMHD1 restricts the replication of human immunodeficiency virus type 1 by depleting the intracellular pool of deoxynucleoside triphosphates. *Nat Immunol* **13**, 223–228.

**Lallemand-Breitenbach, V. and de Thé, H.** (2018). PML nuclear bodies: from architecture to function. *Current Opinion in Cell Biology* **52**, 154–161.

**Leppard, K. N., Emmott, E., Cortese, M. S. and Rich, T.** (2009). Adenovirus type 5 E4 Orf3 protein targets promyelocytic leukaemia (PML) protein nuclear domains for disruption via a sequence in PML isoform II that is predicted as a protein interaction site by bioinformatic analysis. *Journal of General Virology* **90**, 95–104.

**Li, X.** (2005). Loss of splicing factor ASF/SF2 induces G2 cell cycle arrest and apoptosis, but inhibits internucleosomal DNA fragmentation. *Genes & Development* **19**, 2705–2714.

- Li, X. and Manley, J. L.** (2005). Inactivation of the SR Protein Splicing Factor ASF/SF2 Results in Genomic Instability. *Cell* **122**, 365–378.
- Li, M., Zhang, D., Zhu, M., Shen, Y., Wei, W., Ying, S., Korner, H. and Li, J.** (2017). Roles of SAMHD1 in antiviral defense, autoimmunity and cancer. *Reviews in Medical Virology* **27**, e1931.
- Liang, G., Kitamura, K., Wang, Z., Liu, G., Chowdhury, S., Fu, W., Koura, M., Wakae, K., Honjo, T. and Muramatsu, M.** (2013). RNA editing of hepatitis B virus transcripts by activation-induced cytidine deaminase. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **110**, 2246–2251.
- Lim, K.-H., Park, E.-S., Kim, D. H., Cho, K. C., Kim, K. P., Park, Y. K., Ahn, S. H., Park, S. H., Kim, K.-H., Kim, C. W., et al.** (2018). Suppression of interferon-mediated anti-HBV response by single CpG methylation in the 5'-UTR of TRIM22. *Gut* **67**, 166–178.
- Livingston, C., Ramakrishnan, D., Strubin, M., Fletcher, S. and Beran, R.** (2017). Identifying and Characterizing Interplay between Hepatitis B Virus X Protein and Smc5/6. *Viruses* **9**, 69.
- Lo Cigno, I., De Andrea, M., Borgogna, C., Albertini, S., Landini, M. M., Peretti, A., Johnson, K. E., Chandran, B., Landolfo, S. and Gariglio, M.** (2015). The Nuclear DNA Sensor IFI16 Acts as a Restriction Factor for Human Papillomavirus Replication through Epigenetic Modifications of the Viral Promoters. *Journal of Virology* **89**, 7506–7520.
- Lucifora, J., Xia, Y., Reisinger, F., Zhang, K., Stadler, D., Cheng, X., Sprinzl, M. F., Koppensteiner, H., Makowska, Z., Volz, T., et al.** (2014). Specific and Nonhepatotoxic Degradation of Nuclear Hepatitis B Virus cccDNA. *Science* **343**, 1221–1228.
- M Eriksson, E., G Sampaio, N. and Schofield, L.** (2014). Toll-Like Receptors and Malaria – Sensing and Susceptibility. *J Trop Dis* **02**,.
- Mahon, C., Liang, B., Tikhonovich, I., Abend, J. R., Imperiale, M. J., Nasheuer, H. P. and Folk, W. R.** (2009). Restriction of Human Polyomavirus BK Virus DNA Replication in Murine Cells and Extracts. *Journal of Virology* **83**, 5708–5717.
- Manley, J. L. and Krainer, A. R.** (2010). A rational nomenclature for serine/arginine-rich protein splicing factors (SR proteins). *Genes & Development* **24**, 1073–1074.
- Mansur, D. S., Smith, G. L. and Ferguson, B. J.** (2014). Intracellular sensing of viral DNA by the innate immune system. *Microbes and Infection* **16**, 1002–1012.
- Mao, R., Nie, H., Cai, D., Zhang, J., Liu, H., Yan, R., Cuconati, A., Block, T. M., Guo, J.-T. and Guo, H.** (2013). Inhibition of Hepatitis B Virus Replication by the Host Zinc Finger Antiviral Protein. *PLoS Pathogens* **9**, e1003494.
- Marchini, A., Bonifati, S., Scott, E. M., Angelova, A. L. and Rommelaere, J.** (2015). Oncolytic parvoviruses: from basic virology to clinical applications. *Virology Journal* **12**, 6.
- Maul, G. G. and Everett, R. D.** (1994). The nuclear location of PML, a cellular member of the C3HC4 zinc-binding domain protein family, is rearranged during herpes simplex virus infection by the C3HC4 viral protein ICPO. *Journal of General Virology* **75**, 1223–1233.
- Mauney, C. H. and Hollis, T.** (2018). SAMHD1: Recurring roles in cell cycle, viral restriction, cancer, and innate immunity. *Autoimmunity* **51**, 96–110.
- McBride, A. A.** (2017). Mechanisms and strategies of papillomavirus replication. *Biological Chemistry* **398**,.
- Mitchell, A. M., Hirsch, M. L., Li, C. and Samulski, R. J.** (2014). Pomyelocytic Leukemia Protein Is a Cell-Intrinsic Factor Inhibiting Parvovirus DNA Replication. *Journal of Virology* **88**, 925–936.
- Mitra, B. and Guo, H.** (2016a). Hepatitis B virus X protein crosses out Smc5/6 complex to maintain covalently closed circular DNA transcription: Hepatology Elsewhere. *Hepatology* **64**, 2246–2249.
- Mitra, B. and Guo, H.** (2016b). Hepatitis B virus X protein crosses out Smc5/6 complex to maintain covalently closed circular DNA transcription: Hepatology Elsewhere. *Hepatology* **64**, 2246–2249.
- Moens, U., Krumbholz, A., Ehlers, B., Zell, R., Johne, R., Calvignac-Spencer, S. and Lauber, C.** (2017). Biology, evolution, and medical importance of polyomaviruses: An update. *Infection, Genetics and Evolution* **54**, 18–38.
- Moody, C. A. and Laimins, L. A.** (2010). Human papillomavirus oncoproteins: pathways to transformation. *Nat Rev Cancer* **10**, 550–560.
- Moris, A., Murray, S. and Cardinaud, S.** (2014). AID and APOBECs span the gap between innate and adaptive immunity. *Frontiers in Microbiology* **5**, 1–13.
- Moriwaki, K. and Chan, F. K.-M.** (2013). RIP3: a molecular switch for necrosis and inflammation. *Genes & Development* **27**, 1640–1649.
- Muller, S., Moller, P., Bick, M. J., Wurr, S., Becker, S., Gunther, S. and Kummerer, B. M.** (2007). Inhibition of Filovirus Replication by the Zinc Finger Antiviral Protein. *Journal of Virology* **81**, 2391–2400.

**Murphy, C. M., Xu, Y., Li, F., Nio, K., Reszka-Blanco, N., Li, X., Wu, Y., Yu, Y., Xiong, Y. and Su, L.** (2016). Hepatitis B Virus X Protein Promotes Degradation of SMC5/6 to Enhance HBV Replication. *Cell Reports* **16**, 2846–2854.

**Nakaya, Y., Stavrou, S., Blouch, K., Tattersall, P. and Ross, S. R.** (2016). *In Vivo* Examination of Mouse APOBEC3- and Human APOBEC3A- and APOBEC3G-Mediated Restriction of Parvovirus and Herpesvirus Infection in Mouse Models. *Journal of Virology* **90**, 8005–8012.

**Narvaiza, I., Linfesty, D. C., Greener, B. N., Hakata, Y., Pintel, D. J., Logue, E., Landau, N. R. and Weitzman, M. D.** (2009). Deaminase-Independent Inhibition of Parvoviruses by the APOBEC3A Cytidine Deaminase. *PLoS Pathog* **5**, e1000439.

**Neil, S. J. D., Zang, T. and Bieniasz, P. D.** (2008). Tetherin inhibits retrovirus release and is antagonized by HIV-1 Vpu. *Nature* **451**, 425–430.

**Nguyen, D. H., Gummuluru, S. and Hu, J.** (2007). Deamination-Independent Inhibition of Hepatitis B Virus Reverse Transcription by APOBEC3G. *Journal of Virology* **81**, 4465–4472.

**Nicholson, L. B.** (2016). The immune system. *Essays In Biochemistry* **60**, 275–301.

**Niu, C., Livingston, C. M., Li, L., Beran, R. K., Daffis, S., Ramakrishnan, D., Burdette, D., Peiser, L., Salas, E., Ramos, H., et al.** (2017). The Smc5/6 Complex Restricts HBV when Localized to ND10 without Inducing an Innate Immune Response and Is Counteracted by the HBV X Protein Shortly after Infection. *PLOS ONE* **12**, e0169648.

**Ozato, K., Shin, D.-M., Chang, T.-H. and Morse, H. C.** (2008). TRIM family proteins and their emerging roles in innate immunity. *Nat Rev Immunol* **8**, 849–860.

**Paludan, S. R. and Bowie, A. G.** (2013). Immune Sensing of DNA. *Immunity* **38**, 870–880.

**Porter, S. S., Stepp, W. H., Stamos, J. D. and McBride, A. A.** (2017). Host cell restriction factors that limit transcription and replication of human papillomavirus. *Virus Research* **231**, 10–20.

**Powell, R. D., Holland, P. J., Hollis, T. and Perrino, F. W.** (2011). Aicardi-Goutières Syndrome Gene and HIV-1 Restriction Factor SAMHD1 Is a dGTP-regulated Deoxynucleotide Triphosphohydrolase. *J. Biol. Chem.* **286**, 43596–43600.

**Rajsbaum, R. and García-Sastre, A.** (2013). Viral evasion mechanisms of early antiviral responses involving regulation of ubiquitin pathways. *Trends in Microbiology* **21**, 421–429.

**Regad, T. and Chelbi-Alix, M. K.** (2001). Role and fate of PML nuclear bodies in response to interferon and viral infections. *Oncogene* **20**, 7274–7286.

**Reichelt, M., Wang, L., Sommer, M., Perrino, J., Nour, A. M., Sen, N., Baiker, A., Zerboni, L. and Arvin, A. M.** (2011). Entrapment of Viral Capsids in Nuclear PML Cages Is an Intrinsic Antiviral Host Defense against Varicella-Zoster Virus. *PLoS Pathog* **7**, e1001266.

**Reineke, E. L. and Kao, H.-Y.** (2009). Targeting Promyelocytic Leukemia Protein: A Means to Regulating PML Nuclear Bodies. *International Journal of Biological Sciences* **366–376**.

**Reinholz, M., Kawakami, Y., Salzer, S., Kreuter, A., Dombrowski, Y., Koglin, S., Kresse, S., Ruzicka, T. and Schaubert, J.** (2013). HPV16 activates the AIM2 inflammasome in keratinocytes. *Archives of Dermatological Research* **305**, 723–732.

**Renard, M., Henry, M., Guétard, D., Vartanian, J.-P. and Wain-Hobson, S.** (2010). APOBEC1 and APOBEC3 Cytidine Deaminases as Restriction Factors for Hepadnaviral Genomes in Non-Humans *In Vivo*. *Journal of Molecular Biology* **400**, 323–334.

**Rogo, L. D., Mokhtari-Azad, T., Kabir, M. H. and Rezaei, F.** (2014). Human parvovirus B19: A review. *Acta virologica* **58**, 199–213.

**Sahin, U., de Thé, H. and Lallemand-Breitenbach, V.** (2014). PML nuclear bodies: Assembly and oxidative stress-sensitive sumoylation. *Nucleus* **5**, 499–507.

**Saikia, P., Fensterl, V. and Sen, G. C.** (2010). The Inhibitory Action of P56 on Select Functions of E1 Mediates Interferon’s Effect on Human Papillomavirus DNA Replication. *Journal of Virology* **84**, 13036–13039.

**Saito, T. and Gale, M.** (2007). Principles of intracellular viral recognition. *Current Opinion in Immunology* **19**, 17–23.

**Salter, J. D., Bennett, R. P. and Smith, H. C.** (2017). The APOBEC Protein Family: United by Structure, Divergent in Function. **578–594**.

**Sarikas, A., Hartmann, T. and Pan, Z.-Q.** (2011). The cullin protein family. *Genome Biol* **12**, 220.

**Sariyer, I. K. and Khalili, K.** (2011). Regulation of Human Neurotropic JC Virus Replication by Alternative Splicing Factor SF2/ASF in Glial Cells. *PLoS ONE* **6**, e14630.

**Scherer, M. and Stamminger, T.** (2016). Emerging Role of PML Nuclear Bodies in Innate Immune Signaling. *Journal of Virology* **90**, 5850–5854.



- Sengupta, I., Das, D., Singh, S. P., Chakravarty, R. and Das, C.** (2017). Host transcription factor Speckled 110 kDa (Sp110), a nuclear body protein, is hijacked by hepatitis B virus protein X for viral persistence. *Journal of Biological Chemistry* **292**, 20379–20393.
- Sharif, H., Li, Y., Dong, Y., Dong, L., Wang, W. L., Mao, Y. and Wu, H.** (2017). Cryo-EM structure of the DNA-PK holoenzyme. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **114**, 7367–7372.
- Sheehy, A. M., Gaddis, N. C. and Malim, M. H.** (2003). The antiretroviral enzyme APOBEC3G is degraded by the proteasome in response to HIV-1 Vif. *Nat Med* **9**, 1404–1407.
- Slagle, B. L. and Bouchard, M. J.** (2016). Hepatitis B Virus X and Regulation of Viral Gene Expression. *Cold Spring Harb Perspect Med* **6**, a021402.
- Smith, H. C., Bennett, R. P., Kizilyer, A., McDougall, W. M. and Prohaska, K. M.** (2012). Functions and regulation of the APOBEC family of proteins. *Seminars in Cell & Developmental Biology* **23**, 258–268.
- Sommer, A. F. R., Rivière, L., Qu, B., Schott, K., Riess, M., Ni, Y., Shepard, C., Schnellbacher, E., Finkernagel, M., Himmelsbach, K., et al.** (2016). Restrictive influence of SAMHD1 on Hepatitis B Virus life cycle. *Scientific Reports* **6**,.
- Stepp, W. H., Meyers, J. M. and McBride, A. A.** (2013). Sp100 Provides Intrinsic Immunity against Human Papillomavirus Infection. *mBio* **4**, e00845-13.
- Stepp, W. H., Stamos, J. D., Khurana, S., Warburton, A. and McBride, A. A.** (2017). Sp100 colocalizes with HPV replication foci and restricts the productive stage of the infectious cycle. *PLOS Pathogens* **13**, e1006660.
- Sze, A., Belgnaoui, S. M., Olganier, D., Lin, R., Hiscott, J. and van Grevenynghe, J.** (2013). Host Restriction Factor SAMHD1 Limits Human T Cell Leukemia Virus Type 1 Infection of Monocytes via STING-Mediated Apoptosis. *Cell Host & Microbe* **14**, 422–434.
- Terenzi, F., Saikia, P. and Sen, G. C.** (2008). Interferon-inducible protein, P56, inhibits HPV DNA replication by binding to the viral protein E1. *EMBO J* **27**, 3311–3321.
- Tijssen, P.** (1999). MOLECULAR AND STRUCTURAL BASIS OF THE EVOLUTION OF PARVOVIRUS TROPISM. *Acta Veterinaria Hungarica* **47**, 379–394.
- Trapani, J., Browne, K., Dawson, M., Ramsay, R., Eddy, R., Shows, T., White, P. and Dupont, B.** (1992). A novel gene constitutively expressed in human lymphoid cells is inducible with interferon- $\gamma$  in myeloid cells. *Immunogenetics* **36**,.
- Tu, M., Liu, F., Chen, S., Wang, M. and Cheng, A.** (2015). Role of capsid proteins in parvoviruses infection. *Virology Journal* **12**, 114.
- Valaydon, Z. S. and Locarnini, S. A.** (2017). The virological aspects of hepatitis B. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology* **31**, 257–264.
- Vartanian, J.-P., Guetard, D., Henry, M. and Wain-Hobson, S.** (2008). Evidence for Editing of Human Papillomavirus DNA by APOBEC3 in Benign and Precancerous Lesions. *Science* **320**, 230–233.
- Wacher, C., Muller, M., Hofer, M. J., Getts, D. R., Zabarar, R., Ousman, S. S., Terenzi, F., Sen, G. C., King, N. J. C. and Campbell, I. L.** (2007). Coordinated Regulation and Widespread Cellular Expression of Interferon-Stimulated Genes (ISG) ISG-49, ISG-54, and ISG-56 in the Central Nervous System after Infection with Distinct Viruses. *Journal of Virology* **81**, 860–871.
- Wang, J. and Manley, J. L.** (1995). Overexpression of the SR proteins ASF/SF2 and SC35 influences alternative splicing in vivo in diverse ways. *RNA* **1**, 335–346.
- Wang, C., Pflugheber, J., Sumpter, R., Sodora, D. L., Hui, D., Sen, G. C. and Gale, M.** (2003). Alpha Interferon Induces Distinct Translational Control Programs To Suppress Hepatitis C Virus RNA Replication. *Journal of Virology* **77**, 3898–3912.
- Warren, C. J. and Pyeon, D.** (2015). APOBEC3 in papillomavirus restriction, evolution and cancer progression. *Oncotarget* **6**,.
- Warren, C. J., Xu, T., Guo, K., Griffin, L. M., Westrich, J. A., Lee, D., Lambert, P. F., Santiago, M. L. and Pyeon, D.** (2015). APOBEC3A Functions as a Restriction Factor of Human Papillomavirus. *Journal of Virology* **89**, 688–702.
- Warren, C., Westrich, J., Doorslaer, K. and Pyeon, D.** (2017). Roles of APOBEC3A and APOBEC3B in Human Papillomavirus Infection and Disease Progression. *Viruses* **9**, 233.
- Wendzicki, J. A., Moore, P. S. and Chang, Y.** (2015). Large T and small T antigens of Merkel cell polyomavirus. *Current Opinion in Virology* **11**, 38–43.
- Westrich, J. A., Warren, C. J., Klausner, M. J., Guo, K., Liu, C.-W., Santiago, M. L. and Pyeon, D.** (2018). Human Papillomavirus 16 E7 Stabilizes APOBEC3A Protein by Inhibiting Cullin 2-Dependent Protein Degradation. *Journal of Virology* **92**, e01318-17, /jvi/92/7/e01318-17.atom.

- White, T. E., Brandariz-Nuñez, A., Valle-Casuso, J. C., Amie, S., Nguyen, L., Kim, B., Brojatsch, J. and Diaz-Griffero, F.** (2013). Contribution of SAM and HD domains to retroviral restriction mediated by human SAMHD1. *Virology* **436**, 81–90.
- Wu, N. and Yu, H.** (2012). The Smc complexes in DNA damage response. *Cell Biosci* **2**, 5.
- Xuan, Y., Liu, L., Shen, S., Deng, H. and Gao, G.** (2012). Zinc Finger Antiviral Protein Inhibits Murine Gammaherpesvirus 68 M2 Expression and Regulates Viral Latency in Cultured Cells. *Journal of Virology* **86**, 12431–12434.
- Yan, R., Zhao, X., Cai, D., Liu, Y., Block, T. M., Guo, J.-T. and Guo, H.** (2015). The Interferon-Inducible Protein Tetherin Inhibits Hepatitis B Virus Virion Secretion. *J. Virol.* **89**, 9200–9212.
- Yi, Z., Chen, J., Kozlowski, M. and Yuan, Z.** (2015). Innate detection of hepatitis B and C virus and viral inhibition of the response: Innate sensing of HBV and HCV. *Cellular Microbiology* **17**, 1295–1303.
- Yoneyama, M. and Fujita, T.** (2010). Recognition of viral nucleic acids in innate immunity. *Rev. Med. Virol.* **20**, 4–22.
- Zevini, A., Olnagier, D. and Hiscott, J.** (2017). Crosstalk between Cytoplasmic RIG-I and STING Sensing Pathways. *Trends in Immunology* **38**, 194–205.
- Zhang, Y., Burke, C. W., Ryman, K. D. and Klimstra, W. B.** (2007). Identification and Characterization of Interferon-Induced Proteins That Inhibit Alphavirus Replication. *Journal of Virology* **81**, 11246–11255.
- Zhang, S., Guo, J.-T., Wu, J. Z. and Yang, G.** (2013). Identification and Characterization of Multiple TRIM Proteins That Inhibit Hepatitis B Virus Transcription. *PLoS ONE* **8**, e70001.
- Zhang, X., Wu, J., Du, F., Xu, H., Sun, L., Chen, Z., Brautigam, C. A., Zhang, X. and Chen, Z. J.** (2014). The Cytosolic DNA Sensor cGAS Forms an Oligomeric Complex with DNA and Undergoes Switch-like Conformational Changes in the Activation Loop. *Cell Reports* **6**, 421–430.
- Zou, J., Wang, C., Ma, X., Wang, E. and Peng, G.** (2017). APOBEC3B, a molecular driver of mutagenesis in human cancers. *Cell & Bioscience* **7**,.