

Possible Roles of UL112-113 Proteins in Human Cytomegalovirus DNA Replication

Young-Eui Kim and Jin-Hyun Ahn*

Department of Molecular Cell Biology, Samsung Biomedical Research Institute, Sungkyunkwan University School of Medicine, Suwon Korea

DNA replication of human cytomegalovirus (HCMV) is a highly regulated process that requires specific interactions between *cis*-acting lytic origin of replication (*ori*Lyt) and *trans*-acting viral proteins. Formation of the replication initiation complex is also regulated by specific interactions among viral replication proteins. HCMV replication proteins include origin-binding proteins, core proteins that work in replication forks, and regulatory proteins that modulate host cell functions. This letter describes intriguing questions regarding how HCMV origin-binding proteins interact with *ori*Lyt to initiate DNA replication and how the regulatory UL112-113 proteins, which are found only in beta-herpesviruses, function to promote viral DNA replication.

Key Words: HCMV, DNA replication, UL112-113

서 론

베타-히피스바이러스 아과(subfamily)에 속하는 human cytomegalovirus (HCMV)가 건강한 사람에게 감염되면 지속(persistent)감염 혹은 잠복(latent)감염을 일으킨다. 그러나 AIDS 환자, bone marrow 또는 장기이식 환자와 같이 면역기능이 저하된 사람에서 바이러스의 재활성(reactivation)이 일어나면 폐렴, 간염, 망막염 등의 여러 질병을 유발한다. 또한, HCMV는 태아에 감염되는 선천감염의 가장 빈번한 원인 바이러스이며 선천 CMV 감염의 약 10%에서 태아 중추신경계의 여러 질병(cytomegalic inclusion disease)을 야기한다. 일차감염이 일어난 후 HCMV 감염이 완전히 제거되지 않는 이유는 바이러스가 숙주의 면역반응을 제어하는 다양한 기전을 갖고 있기

때문이다. HCMV 잠복감염은 주로 myeloid lineage의 단핵세포에서 일어나는 것으로 알려져 있으나 어떻게 잠복 감염 세포에서 바이러스 genome이 유지되는지는 알려져 있지 않다 (1).

현재 사용되는 대부분의 HCMV 치료제는 바이러스 DNA polymerase를 타겟으로 하여 lytic 감염에서 바이러스 genome의 복제과정을 억제하는 것들이다. 하지만 이러한 약제에 내성을 갖는 바이러스의 빈번한 출현으로 인해 다양한 HCMV 억제제에 대한 개발이 요구되고 있다. 100종이 넘는 다양한 히피스바이러스들에서 genome 복제 기전은 대체로 유사하며 이에 관여하는 여러 유전자들이 잘 보존되어 있다. 하지만 최근의 연구 결과들은 다른 알파-히피스바이러스[예, herpes simplex virus type-1 (HSV-1)] 혹은 감마-히피스바이러스[예, Epstein-Barr virus (EBV)]에서는 발견되지 않는 독특한 바이러스 기능이 베타-히피스바이러스 복제에 관여하고 있음을 보여주고 있다. 본 글에서는 HCMV 복제에 관여하는 여러 바이러스 단백질들의 기능과 복제 오리진(origin)의 특성에 대해 간단히 살펴보고, 베타-히피스바이러스에서만 발현되는 UL112-113 단백질들에 대한 최신 연구 결과를 바탕으로 이들의 DNA 복제 관련 기능을 유추해 보도록 한다.

Received: April 7, 2012/ Revised: April 11, 2012

Accepted: April 12, 2012

*Corresponding author: Department of Molecular Cell Biology, Samsung Biomedical Research Institute, Sungkyunkwan University School of Medicine, 300 Cheoncheondong, Jangangu, Suwon, Gyeonggi-do 440-746, Korea.

Phone: +82-31-299-6222, Fax: +82-31-299-6435

e-mail: jahn@skku.edu

HCMV 복제 단백질 및 복제 오리진

HCMV genome은 이중가닥 DNA로서 크기는 약 235-kb에 달한다. HCMV DNA 복제는 매우 복잡한 과정으로 여러 바이러스 단백질들이 관여하고 있다. Lytic 감염에서 DNA 복제는 게놈의 U_L (unique long) 부위에 위치하고 있는 하나의 복제 오리진(*oriLyt*)에서 시작된다 (2) (Fig. 1A). Transfection된 세포에서 *oriLyt*를 포함하는 plasmid의 복제를 측정하는 transient transfection replication assay를 수행한 결과, 11개의 바이러스 genetic loci가 효율적인

oriLyt-의존적 DNA 복제에 필요한 것으로 규명되었다 (3) (Fig. 1A). 이들로부터 생성되는 바이러스 단백질 중에는 DNA 복제 fork에서 작용하는 6가지 core 단백질들이 포함되는데 DNA polymerase (POL; encoded by UL54), polymerase processivity factor (PPF; UL44), single-stranded DNA-binding protein (SSB; UL57), helicase (HEL; UL105), primase (PRI; UL70), 그리고 primase-associated factor (PAF; UL102)가 이에 속한다. 이들 6 core 단백질들의 유전자는 모든 herpesvirus들의 genome에 잘 보존되어 있다 (4, 5).

복제 core 단백질 외에도 UL36-38, IRS1/TRS1, UL122/123, UL84, 그리고 UL112-113 등 5곳의 genetic loci가

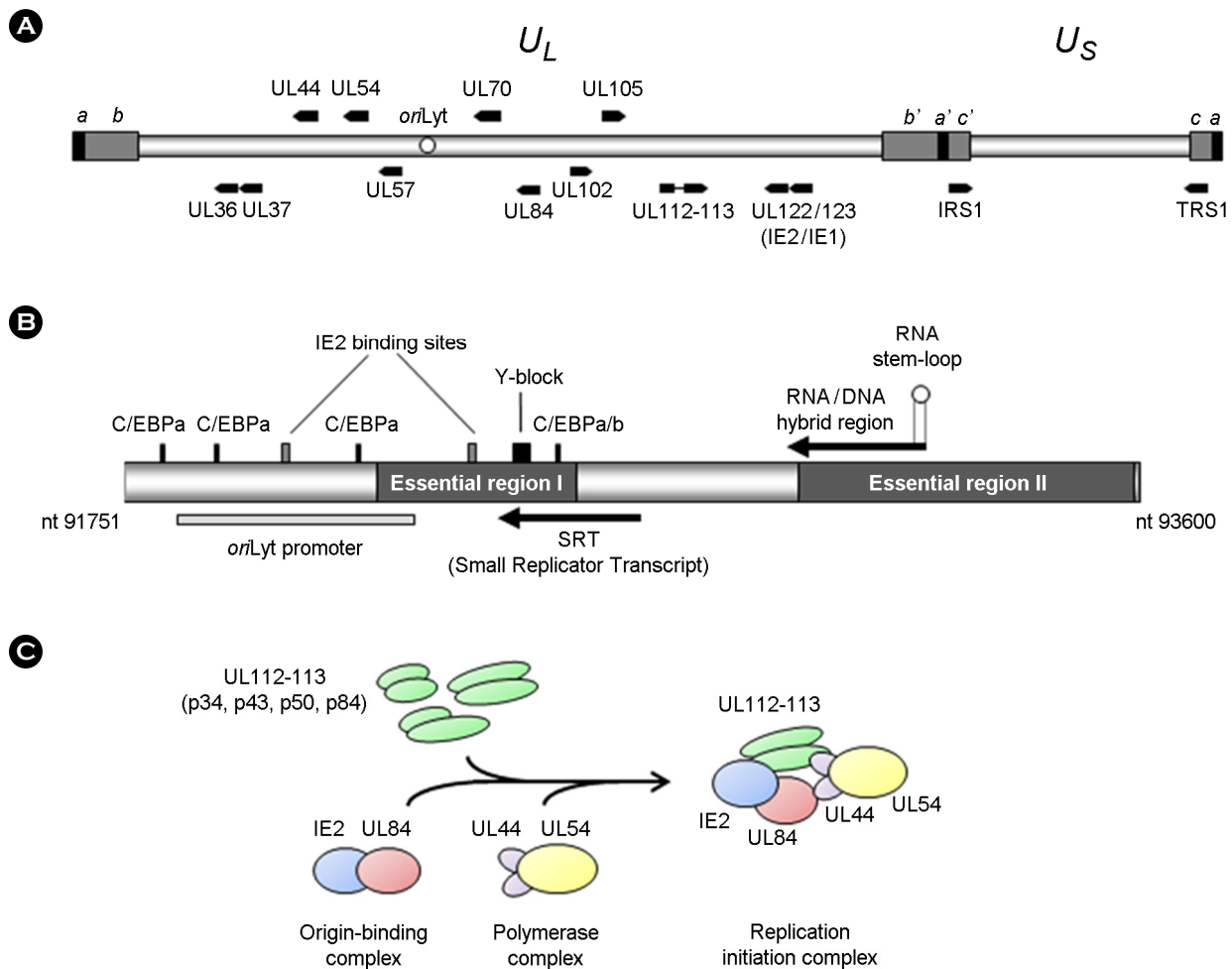


Figure 1. HCMV-encoded replication proteins, the structure of *oriLyt*, and a possible role of UL112-113 proteins in the formation of the replication initiation complex. (A) The HCMV genome consisting of unique long (U_L) and unique short (U_S) sequences bound by terminal repeats (a/a', b/b', and c/c') and the position of open reading frames (ORFs) for replication proteins are shown. (B) Schematic of HCMV *oriLyt* showing the relative position of two essential regions, *oriLyt* promoter, small replicator transcript (SRT), binding sites for C/EBPα and IE2, a highly pyrimidine-rich sequence (Y-block) and the RNA stem-loop structure. Nucleotide (nt) numbers shown are with reference to the AD169 strain DNA sequence. (C) A possible role of UL112-113 proteins as a mediator between the origin-binding complex and the polymerase complex in the formation of the replication initiation complex.

transient transfection replication assay에서 효율적인 DNA 복제에 관여한다 (3, 6, 7). UL122/123 locus에서는 alternative splicing에 의해 immediate-early 단백질인 IE1 (IE72)와 IE2 (IE86)가 발현된다. IE2는 HCMV 대부분의 유전자의 발현에서 transactivator로 작용하는데, 초기연구에서는 IE2의 이러한 기능이 DNA 복제를 증진시키는데 관여하는 것으로 생각되었다 (8). 최근에는 IE2가 복제 개시인자로 알려진 UL84와 함께 *oriLyt*에 직접 작용하여 DNA 복제의 시작에 중요한 역할을 하는 것으로 밝혀졌다 (9). IE1은 IE2의 transactivator 기능을 도울 뿐 아니라, PML 및 Sp100 등의 세포 restriction factor, histone deacetylases, STAT2와 결합함으로써 감염세포에서 바이러스 genome의 epigenetic suppression을 극복하거나 type I 인터페론 신호전달을 억제하는 기능을 갖는다 (10~14). UL36-38에서는 숙주의 세포사멸을 억제하는 단백질들이 발현되며 (15, 16), IRS1/ TRS1은 protein kinase RNA-dependent (PKR)과 결합하여 인터페론에 의해 유도되는 항 바이러스 세포기능을 억제하는 기능을 갖는다 (17, 18). UL84는 복제 개시인자로서 *oriLyt*에 존재하는 RNA stem-loop 구조를 인지하여 DNA 복제를 시작하는데 중요한 역할을 한다 (19). 이처럼 HCMV DNA 복제는 IE2 및 UL84 등 복제 오리진에 결합하는 단백질, 복제 fork에서 작용하는 core 단백질(POL, PPF, SSB, HEL, PRI, PAF), 그리고 UL36-37, IE1, IRS1/ TRS1 등 숙주의 세포기능을 조절하여 DNA 복제에 유리한 환경을 만드는 단백질들의 여러 기능을 필요로 한다.

HCMV genome 상의 복제 오리진은 두 개의 필수부위(essential region I/II)를 가지고 있다 (20) (Fig. 1B). Essential region I은 한 개의 Y-block이라 불리는 31 nt-oligopyrimidine sequence와 transcription factor들이 결합할 수 있는 두 개의 29-base pair repeat sequence를 가지고 있으며, 이외에도 IE2-binding site가 존재한다. Essential region II에는 DNA/RNA hybrid 부위와 RNA의 stem-loop 부위가 존재하며, 이 구조는 캡시드에 packaging된 genome에도 남아있는 것으로 보아 genome 안정성에 관련된 것으로 여겨진다. 또한, UL84는 *in vitro* binding 분석에서 RNA stem-loop와 직접 결합할 수 있으며, chromatin immunoprecipitation (ChIP) 분석을 통해 바이러스 감염세포에서도 DNA/RNA hybrid 부위에 결합하는 것으로 밝혀졌다 (19).

진핵세포나 여러 DNA 바이러스의 복제 오리진에는

transcription control element가 존재하며, transcription activation을 통해 복제가 시작되거나 복제의 효율이 증가된다 (21). HCMV 오리진에도 세포 transcription factor의 binding site와 바이러스의 transcription factor인 IE2의 binding site가 존재한다. 세포의 transcription factor인 C/EBP α 는 UL84와 직접 결합할 수 있으며 복제 오리진에서도 같은 위치에서 관찰된다 (22). 최근에는 transcription coactivator 기능을 보이는 hnRNP K도 HCMV의 복제 오리진에 존재하는 것으로 보고되었다 (23). hnRNP K는 감마-히피스바이러스인 EBV나 Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (KSHV)의 lytic 및 latent 오리진에도 결합한다 (24, 25). HCMV 복제 오리진의 두 부위에서 transcriptional activation이 발견되는데, *oriLyt* promoter와 SRT (Small Replicator Transcript) promoter에서 일어난다 (Fig. 1B). *OriLyt* promoter는 bi-directional promoter로 IE2-binding site가 존재하며, UL84과 IE2에 의해 활성화가 조절된다 (26). SRT는 감염 2시간부터 만들어지는 작은 non-polyadenylated transcript로 감염이 진행됨에 따라 증가된다. SRT promoter에서의 transcription은 세포나 바이러스의 transcription factor에 의해 조절될 것으로 생각된다 (27). 최근 SRT promoter 부위에도 IE2-binding site가 존재하며 IE2가 결합되어 있음이 확인되었다 (22). Transient transfection replication assay를 통해서, IE2-UL84에 의한 *oriLyt* promoter의 transcriptional activation이 일어나지 않으면 DNA 복제가 저해됨이 관찰되었다 (26). 또한 SRT 부위가 deletion된 *oriLyt*을 이용한 *in vitro* replication assay 결과에서도 SRT가 형성되지 않으면 DNA 복제가 저해되었다 (20). 따라서, 복제 오리진의 replicator transcript들이 DNA 복제의 initiator로 작용하거나 복제를 조절하는 기능을 가질 것으로 생각된다. *OriLyt*에서 생성되는 transcript의 기능 및 발현 조절에 대한 연구는 HCMV DNA 복제 기전을 정확하게 이해하는데 필요한 중요한 연구과제이다.

HCMV DNA 복제에서 UL112-113 단백질의 역할

흥미롭게도 HCMV DNA 복제에 관련된 유전자 중에서 UL112-113은 베타-히피스바이러스에만 특이적으로 존재한다. 특히 UL112 sequence는 모든 베타-히피스바이러스에서 비교적 잘 보존되어 있다 (28). UL112-113 단백질들

은 하나의 transcript로부터 alternative splicing에 의해 4개의 단백질들로 만들어지는데 이들 모두가 UL112에 의해 encode되는 아미노-말단 252개의 아미노산을 공유한다. UL112-113 단백질들은 핵 내에 인산화된 단백질로 발현되며 분자량에 의해 각각 p34, p43, p50, 그리고 p84로 구분된다 (29~31). HCMV가 감염된 세포에서 UL112-113 단백질의 발현은 감염의 진행에 따라 시간적으로 조절된다. p43은 가장 많이 발현되어 감염 내내 높은 level로 유지되는 반면, 다른 isoform은 주로 감염 후기에 발현량이 증가한다 (30). UL112-113에 대한 anti-sense RNA을 처리시 바이러스의 복제가 저해됨이 관찰되었다 (32). 또한, HCMV genome에서 UL112 또는 UL113 부위가 deletion된 바이러스는 거의 증식하지 못함이 규명되었다 (33, 34). 이러한 유전학적 증거들은 UL112-113 단백질들이 배양 세포에서 효율적인 바이러스의 증식에 필요함을 보여주고 있다.

UL112-113 단백질들은 어떻게 HCMV DNA 복제를 증진시키는가? UL112-113에서 발현되는 4종의 단백질들은 각각 특이적인 기능을 갖는가? 초기연구에서는 UL112-113 단백질들의 바이러스 유전자 발현조절 기능이 제시되었다. UL112-113 단백질들은 비특이적으로 DNA들과 결합하였고 (35), transient transfection을 이용한 reporter 유전자 분석에서 IE1/IE2 단백질과 더불어 UL112-113 단백질들은 DNA 복제에 관련된 early 유전자의 발현을 증가시켰다 (8, 36, 37). 하지만 이러한 reporter 분석에서의 transactivator 기능이 바이러스 감염의 context에서도 나타나는지는 규명된 바 없다. 흥미롭게도 UL112-113 단백질들의 발현이 KSHV의 재활성화에 있어서 중요한 transcription factor인 RTA의 발현을 증가시킴으로써 KSHV 증식을 증진시킬 수 있음이 보고된 바 있다 (38). 최근 HCMV가 감염된 세포에서 UL112-113 단백질들이 복제 오리진 결합 단백질인 UL84 및 IE2와 complex를 이루고 있으며, 특히 IE2와는 직접 결합을 하는 것으로 규명되었다 (39). HCMV 복제 오리진에서의 DNA 복제 시작에 *oriLyt* promoter에서의 전사가 필요하고 이 과정에 transcription factor인 IE2가 관여한다는 점에서, UL112-113의 transcription coactivator 기능이 *oriLyt*에서 DNA 복제의 개시를 촉진하는데 기여할 가능성 있다. IE2와 결합을 하지 못하는 UL112-113 mutant 바이러스를 이용하여 *oriLyt* promoter에서의 transcription이 영향을 받는지, 그리고 이것이 DNA 복제 효율의 저하와 관련 있는지를

규명하는 연구가 필요할 것이다.

HCMV 감염에서 바이러스 genome의 복제를 위한 pre-replication site와 DNA 복제센터(replication center 혹은 replication compartment)는 세포 핵 안에서 형성되는데, 이 과정에는 바이러스 복제 단백질들 간의 특이적 결합이 필요할 것으로 생각된다 (32, 40, 41). 흥미롭게도 UL112-113를 6가지 core 단백질들과 함께 발현시킬 경우, UL44가 UL112-113-의존적으로 pre-replication site로 recruit됨이 관찰되었다 (40). UL112-113 단백질들은 아미노-말단의 125 아미노산을 통해 self-interaction하며 서로 다른 isoform들 간의 상호결합도 이루어진다 (28). Self-interaction이 결여된 mutant 단백질들은 정상적인 세포 내 분포를 보이지 않으며 다른 core 단백질들을 pre-replication site로 recruit하는 기능도 잃게 된다 (28). 이러한 결과로부터 HCMV의 DNA pre-replication site 및 복제센터 형성에 UL112-113가 중요한 역할을 하고 있으며 이러한 기능에 아미노-말단을 통한 UL112-113 단백질들 간의 상호작용이 필요함을 유추할 수 있다.

한편, UL112-113 단백질은 self-interaction 뿐 아니라 UL44 (PPF)와도 직접 결합할 수 있음이 밝혀졌다 (39). UL44는 UL54 (POL)의 카복시-말단의 22개 아미노산을 통해 UL54와 결합하며 UL54에 의한 long-chain DNA 합성이 가능하도록 돕는 기능을 갖는다 (42, 43). UL44의 아미노-말단 290개 아미노산 부위는 HSV-1의 UL42, 세포의 proliferating cell nuclear antigen (PCNA) 및 polymerase III의 β subunit과 비슷한 구조를 갖는다 (44, 45). UL42는 monomer, PCNA는 head-to-tail의 trimer로서 processivity factor로 작용하는 반면에, UL44 (1-290)은 C-clamp 모양의 head-to-head dimer로 작용한다 (46). UL44 (1-290)은 온전한 UL44가 지니고 있는 DNA 결합 및 UL54 결합 활성화와 *in vitro* processivity factor로서의 활성을 모두 가지고 있다 (47). 하지만 UL44 (1-290)는 UL112-113의 p84와는 결합하지 못하며 UL44 (1-290) 유전자를 갖는 돌연변이 바이러스는 매우 낮은 증식력을 보임이 관찰되었다 (39, 48). 더 나아가, 복제 core 단백질, UL84, IE2, 그리고 UL112-113 발현 plasmid를 이용한 cotransfection replication assays에서 UL112-113 p84와 UL44의 결합은 UL44의 효율적인 *oriLyt*으로의 loading 및 이에 따른 *oriLyt* plasmid의 복제에 필요함이 규명되었다 (39). 또한, UL112-113로부터 p34, p43, p50은 발현되지만 p84는 발현하지 못하는 mutant 바이러스는 거의 증식하지 못함이 확인되었다

(39). 이러한 결과는 UL112-113에서 발현되는 단백질들이 각각 특이적인 기능을 가지고 있음을 제시하고 있다.

즉, UL112-113 단백질들은 homo-dimer 혹은 hetero-dimer를 이루며 UL84-IE2 복제 오리진 결합 complex 뿐 아니라 UL54-UL44 complex와도 결합하면서 replication initiation complex 형성의 mediator 역할을 할 수 있을 것으로 생각된다(Fig. 1C). 또한, UL44의 카복시-말단과 UL112-113 단백질이 결합함으로써 PCNA와 유사한 ring 모양의 구조를 이뤄 DNA polymerization에 있어서 UL44의 활성 자체를 조절할 가능성도 있다. UL44와 UL112-113 단백질 간의 결합이 processivity factor 활성을 직접 조절하는지는 *in vitro* DNA polymerization assay를 수행함으로써 확인될 수 있을 것이다. 여러 HCMV DNA 복제 단백질들 간의 상호작용 그리고 이들과 *oriLyt* 간의 특이적 결합 성질에 대한 정보는 바이러스 복제 기전을 이해하고 효과적인 제어방법을 모색하는데 매우 유익한 정보를 제공할 것이다.

참 고 문 헌

- 1) Mocarski ES, Shenk T, Pass RF. Cytomegaloviruses. In: Knipe DM, Howley PM, Griffin DE, Lamb RA, Martin MA, Roizman B, et al (ed.), Fields virology. Philadelphia, PA.: Lippincott Williams & Wilkins; 2007. p. 2701-72.
- 2) Anders DG, Punturieri SM. Multicomponent origin of cytomegalovirus lytic-phase DNA replication. J Virol 1991;65:931-7.
- 3) Pari GS, Anders DG. Eleven loci encoding trans-acting factors are required for transient complementation of human cytomegalovirus *oriLyt*-dependent DNA replication. J Virol 1993;67:6979-88.
- 4) Chee MS, Bankier AT, Beck S, Bohni R, Brown CM, Cerny R, et al. Analysis of the protein-coding content of the sequence of human cytomegalovirus strain AD169. Curr Top Microbiol Immunol 1990;154:125-69.
- 5) Davison AJ, Dolan A, Akter P, Addison C, Dargan DJ, Alcendor DJ, et al. The human cytomegalovirus genome revisited: comparison with the chimpanzee cytomegalovirus genome. J Gen Virol 2003;84:17-28.
- 6) Pari GS, Kacica MA, Anders DG. Open reading frames UL44, IRS1/TRS1, and UL36-38 are required for transient complementation of human cytomegalovirus *oriLyt*-dependent DNA synthesis. J Virol 1993;67:2575-82.
- 7) Smith JA, Pari GS. Expression of human cytomegalovirus UL36 and UL37 genes is required for viral DNA replication. J Virol 1995;69:1925-31.
- 8) Iskenderian AC, Huang L, Reilly A, Stenberg RM, Anders DG. Four of eleven loci required for transient complementation of human cytomegalovirus DNA replication cooperate to activate expression of replication genes. J Virol 1996;70:383-92.
- 9) Pari GS. Nuts and bolts of human cytomegalovirus lytic DNA replication. Curr Top Microbiol Immunol 2008;325:153-66.
- 10) Lee HR, Kim DJ, Lee JM, Choi CY, Ahn BY, Hayward GS, et al. Ability of the human cytomegalovirus IE1 protein to modulate sumoylation of PML correlates with its functional activities in transcriptional regulation and infectivity in cultured fibroblast cells. J Virol 2004;78:6527-42.
- 11) Kim YE, Lee JH, Kim ET, Shin HJ, Gu SY, Seol HS, et al. Human cytomegalovirus infection causes degradation of Sp100 proteins that suppress viral gene expression. J Virol 2011;85:11928-37.
- 12) Nevels M, Paulus C, Shenk T. Human cytomegalovirus immediate-early 1 protein facilitates viral replication by antagonizing histone deacetylation. Proc Natl Acad Sci U S A 2004;101:17234-9.
- 13) Huh YH, Kim YE, Kim ET, Park JJ, Song MJ, Zhu H, et al. Binding STAT2 by the acidic domain of human cytomegalovirus IE1 promotes viral growth and is negatively regulated by SUMO. J Virol 2008;82:10444-54.
- 14) Paulus C, Krauss S, Nevels M. A human cytomegalovirus antagonist of type I IFN-dependent signal transducer and activator of transcription signaling. Proc Natl Acad Sci U S A 2006;103:3840-5.
- 15) Goldmacher VS, Bartle LM, Skaletskaya A, Dionne CA, Kedersha NL, Vater CA, et al. A cytomegalovirus-encoded mitochondria-localized inhibitor of apoptosis structurally unrelated to Bcl-2. Proc Natl Acad Sci U S A 1999;96:12536-41.
- 16) Skaletskaya A, Bartle LM, Chittenden T, McCormick AL, Mocarski ES, Goldmacher VS. A cytomegalovirus-encoded inhibitor of apoptosis that suppresses caspase-8 activation. Proc Natl Acad Sci U S A 2001;98:7829-34.
- 17) Marshall EE, Bierle CJ, Brune W, Geballe AP. Essential role for either TRS1 or IRS1 in human cytomegalovirus replication. J Virol 2009;83:4112-20.
- 18) Child SJ, Hakki M, De Niro KL, Geballe AP. Evasion of

- cellular antiviral responses by human cytomegalovirus TRS1 and IRS1. *J Virol* 2004;78:197-205.
- 19) Colletti KS, Smallenburg KE, Xu Y, Pari GS. Human cytomegalovirus UL84 interacts with an RNA stem-loop sequence found within the RNA/DNA hybrid region of *oriLyt*. *J Virol* 2007;81:7077-85.
 - 20) Zhu Y, Huang L, Anders DG. Human cytomegalovirus *oriLyt* sequence requirements. *J Virol* 1998;72:4989-96.
 - 21) DePamphilis ML. Transcriptional elements as components of eukaryotic origins of DNA replication. *Cell* 1988;52:635-8.
 - 22) Kagele D, Gao Y, Smallenburg K, Pari GS. Interaction of HCMV UL84 with C/EBP α transcription factor binding sites within *oriLyt* is essential for lytic DNA replication. *Virology* 2009;392:16-23.
 - 23) Kagele D, Rossetto CC, Tarrant MT, Pari GS. Analysis of the interactions of viral and cellular factors with human cytomegalovirus lytic origin of replication, *oriLyt*. *Virology* 2012;424:106-14.
 - 24) Deng Z, Lezina L, Chen CJ, Shtivelband S, So W, Lieberman PM. Telomeric proteins regulate episomal maintenance of Epstein-Barr virus origin of plasmid replication. *Mol Cell* 2002;9:493-503.
 - 25) Wang Y, Li H, Tang Q, Maul GG, Yuan Y. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus *ori-Lyt*-dependent DNA replication: involvement of host cellular factors. *J Virol* 2008;82:2867-82.
 - 26) Xu Y, Cei SA, Rodriguez Huete A, Colletti KS, Pari GS. Human cytomegalovirus DNA replication requires transcriptional activation via an IE2- and UL84-responsive bidirectional promoter element within *oriLyt*. *J Virol* 2004;78:11664-77.
 - 27) Huang L, Zhu Y, Anders DG. The variable 3' ends of a human cytomegalovirus *oriLyt* transcript (SRT) overlap an essential, conserved replicator element. *J Virol* 1996;70:5272-81.
 - 28) Park MY, Kim YE, Seo MR, Lee JR, Lee CH, Ahn JH. Interactions among four proteins encoded by the human cytomegalovirus UL112-113 region regulate their intranuclear targeting and the recruitment of UL44 to prereplication foci. *J Virol* 2006;80:2718-27.
 - 29) Staprans SI, Rabert DK, Spector DH. Identification of sequence requirements and trans-acting functions necessary for regulated expression of a human cytomegalovirus early gene. *J Virol* 1988;62:3463-73.
 - 30) Wright DA, Staprans SI, Spector DH. Four phosphoproteins with common amino termini are encoded by human cytomegalovirus AD169. *J Virol* 1988;62:331-40.
 - 31) Wright DA, Spector DH. Posttranscriptional regulation of a class of human cytomegalovirus phosphoproteins encoded by an early transcription unit. *J Virol* 1989;63:3117-27.
 - 32) Yamamoto T, Suzuki S, Radsak K, Hirai K. The UL112/113 gene products of human cytomegalovirus which colocalize with viral DNA in infected cell nuclei are related to efficient viral DNA replication. *Virus Res* 1998;56:107-14.
 - 33) Dunn W, Chou C, Li H, Hai R, Patterson D, Stolc V, *et al.* Functional profiling of a human cytomegalovirus genome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:14223-8.
 - 34) Yu D, Silva MC, Shenk T. Functional map of human cytomegalovirus AD169 defined by global mutational analysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:12396-401.
 - 35) Iwayama S, Yamamoto T, Furuya T, Kobayashi R, Ikuta K, Hirai K. Intracellular localization and DNA-binding activity of a class of viral early phosphoproteins in human fibroblasts infected with human cytomegalovirus (Towne strain). *J Gen Virol* 1994;75:3309-18.
 - 36) Kerry JA, Priddy MA, Jervey TY, Kohler CP, Staley TL, Vanson CD, *et al.* Multiple regulatory events influence human cytomegalovirus DNA polymerase (UL54) expression during viral infection. *J Virol* 1996;70:373-82.
 - 37) Li J, Yamamoto T, Ohtsubo K, Shirakata M, Hirai K. Major product pp43 of human cytomegalovirus U(L)112-113 gene is a transcriptional coactivator with two functionally distinct domains. *Virology* 1999;260:89-97.
 - 38) Wells R, Stensland L, Vieira J. The human cytomegalovirus UL112-113 locus can activate the full Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus lytic replication cycle. *J Virol* 2009;83:4695-9.
 - 39) Kim YE, Ahn JH. Role of the specific interaction of UL112-113 p84 with UL44 DNA polymerase processivity factor in promoting DNA replication of human cytomegalovirus. *J Virol* 2010;84:8409-21.
 - 40) Ahn JH, Jang WJ, Hayward GS. The human cytomegalovirus IE2 and UL112-113 proteins accumulate in viral DNA replication compartments that initiate from the periphery of promyelocytic leukemia protein-associated nuclear bodies (PODs or ND10). *J Virol* 1999;73:10458-71.
 - 41) Penfold ME, Mocarski ES. Formation of cytomegalovirus DNA replication compartments defined by localization of viral proteins and DNA synthesis. *Virology* 1997;239:46-61.
 - 42) Ertl PF, Powell KL. Physical and functional interaction of human cytomegalovirus DNA polymerase and its accessory

- protein (ICP36) expressed in insect cells. *J Virol* 1992;66:4126-33.
- 43) Weiland KL, Oien NL, Homa F, Wathen MW. Functional analysis of human cytomegalovirus polymerase accessory protein. *Virus Res* 1994;34:191-206.
- 44) Zuccola HJ, Filman DJ, Coen DM, Hogle JM. The crystal structure of an unusual processivity factor, herpes simplex virus UL42, bound to the C terminus of its cognate polymerase. *Mol Cell* 2000;5:267-78.
- 45) Novotny J, Rigoutsos I, Coleman D, Shenk T. In silico structural and functional analysis of the human cytomegalovirus (HHV5) genome. *J Mol Biol* 2001;310:1151-66.
- 46) Komazin-Meredith G, Petrella RJ, Santos WL, Filman DJ, Hogle JM, Verdine GL, *et al.* The human cytomegalovirus UL44 C clamp wraps around DNA. *Structure* 2008;16:1214-25.
- 47) Appleton BA, Brooks J, Loregian A, Filman DJ, Coen DM, Hogle JM. Crystal structure of the cytomegalovirus DNA polymerase subunit UL44 in complex with the C terminus from the catalytic subunit. Differences in structure and function relative to unliganded UL44. *J Biol Chem* 2006;281:5224-32.
- 48) Silva LA, Loregian A, Pari GS, Strang BL, Coen DM. The carboxy-terminal segment of the human cytomegalovirus DNA polymerase accessory subunit UL44 is crucial for viral replication. *J Virol* 2010;84:11563-8.
-