

Received: 2015.10.01
Accepted: 2016.03.11
Published: 2016.06.01

Mechanizmy endocytozy wykorzystywane przez wirusy podczas zakażenia

Mechanisms of endocytosis utilized by viruses during infection

Anna Słońska^{1,2}, Joanna Cymerys¹, Marcin W. Bańbura¹

¹Zakład Mikrobiologii, Katedra Nauk Przedklinicznych, Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

²Zakład Fizjologii, Katedra Nauk Fizjologicznych, Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

Streszczenie

Wirusy, mimo stosunkowo prostej budowy, wykształciły wiele mechanizmów ułatwiających im korzystanie ze struktur komórki gospodarza. Aby doszło do zakażenia, wirus musi wprowadzić swój genom do wnętrza komórki. Najnowsze badania wskazują, że oprócz bezpośredniej fuzji otoczki wirusowej z błoną komórkową, to endocytoza jest procesem wnikania najczęściej wykorzystywanym przez wirusy. Endocytoza to złożony mechanizm przenikania przez błony komórkowe, który obejmuje kilka ścieżek: endocytozę zależną od klatryn, zależną od kaweolin, makropinocytozę i fagocytozę. Endosomy są dla wirusów wygodnym i szybkim środkiem transportu przez błonę komórkową i cytoplazmę. Zapewniają im również ochronę przed układem immunologicznym gospodarza. Wirusy mogą korzystać nie z jednej, ale z wielu szlaków endocytarnych, aby efektywniej zakażać komórki. Identyfikacja tych procesów nie tylko umożliwi lepsze poznanie mechanizmów zaangażowanych we wnikanie wirusów do wnętrza komórki, ale także pozwoli na opracowanie nowych metod terapeutycznych. W pracy, w oparciu o najnowsze doniesienia literaturowe, opisano mechanizmy wnikania wirusów różnych rodzin do wnętrza komórek.

Słowa kluczowe:

endocytoza • kaweolina • klatyna • makropinocytoza • fagocytoza • wirusy

Summary

Viruses, despite being relatively simple in structure and composition, have evolved a broad spectrum of mechanisms to exploit the host cell. To initiate effective infection, viruses or viral genomes have to enter cells. Recently studies have shown that apart from the direct fusion at the plasma membrane, endocytosis is more often the preferred means of entry into the host cell. Endocytosis is a complex phenomenon, that includes multiple pathways of membrane trafficking, such as clathrin-mediated endocytosis, caveolin-mediated endocytosis, macropinocytosis and phagocytosis. Endosomes offer a convenient and often rapid transit system across the plasma membrane and cytoplasm via the cellular microtubular network. They also provide protection to the virus from detection by the host's innate immune defences. What is important, viruses are able to utilize not just one, but multiple uptake routes. Identification of these processes and factors will not only allow a better insight into pathogenic mechanism, but may identify novel targets for future therapeutic development. This review provides insight on recent developments in the rapidly evolving field of viral entry.

Keywords:

endocytosis • caveolin • clathrin • macropinocytosis • phagocytosis • viruses



Full-text PDF: <http://www.phmd.pl/fulltxt.php?ICID=1203721>

Word count: 3329
Tables: –
Figures: 1
References: 41

Adres autorki: dr Anna Słońska, Zakład Mikrobiologii, Katedra Nauk Przedklinicznych, Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie – SGGW, ul. Ciszewskiego 8, 02-786 Warszawa; e-mail: anex007@op.pl

Wykaz skrótów: **AcMNV** – bakulowirus *Autographa californica* (*Autographa californica* multicapsid nucleopolyherdovirus), **Adv 2, 3, 5** – adenowirus 2, 3, 5 (*Adenovirus 2, 3, 5*), **APMV** – mimiwirus pełzaka *Acanthamoeba polyphaga* (*Acanthamoeba Polyphaga Mimivirus*), **ARF6** – czynnik uczestniczący w ADP-rybozylacji białek, **ASFV** – wirus afrykańskiego pomoru świń (*African Swine Fever Virus*), **CAR** – receptor coxsackie-adenowirusowy (*Coxsackievirus-Adenovirus-Receptor*), **CCVs** – pęcherzyki opłaszczone klatryną (*clathrin-coated vesicles*), **CME** – endocytoza zależna od klatryny (*clathrin-mediated endocytosis*), **EBOV** – wirus Ebola (*Ebola Virus*), **EES** – endosomy wczesne (*early endosomes*), **EHV-1** – koński herpeswirus typu 1 (*Equine Herpesvirus 1*), **HIV** – ludzki wirus niedoboru odporności (*Human Immunodeficiency Virus*), **HSV; HHV-1** – wirus opryszczki pospolitej (*Herpes Simplex Virus; Human Herpesvirus 1*), **KSHV; HHV-8** – mięsaka Kaposiego (*Kaposi's Sarcoma Associated Herpesvirus; Human Herpesvirus 8*), **LEs** – endosomy późne (*late endosomes*), **PAK1** – białkowa kinaza serynowo-treoninowa, **PI3K** – kinaza fosfatydyloinozytolu, **PRRs** – receptory rozpoznające wzorce patogenności (*Pattern Recognition Receptors; Pathogen Recognition Receptors*), **RTK** – receptor kinazy tyrozynowej, **SFV** – wirus gorączki lasu Semliki (*Semliki Forest Virus*), **SV40** – małpi wirus 40 (*simian virus 40*), **VACV** – wirus krowianki (*Vaccinia Virus*), **VSV** – wirus pęcherzykowego zapalenia jamy ustnej (*Vesicular Stomatitis Virus*).

WPROWADZENIE

Wirusy to czynniki zakaźne niewykazujące cech organizmu żywego, których reprodukcja jest całkowicie uzależniona od żywych komórek. Zbudowane są z kwasu nukleinowego (DNA lub RNA) zamkniętego w białkowym kapsydie, który u niektórych wirusów może być dodatkowo osłonięty otoczką lipidową lub glikoproteinową. Mimo tak prostej budowy interakcje wirusów z żywymi komórkami są bardzo złożone, począwszy od adsorpcji i penetracji, a skończywszy na uwalnianiu nowo powstałych wirionów z zakażonej komórki. Z powodu tego, że genomy wirusów kodują jedynie nieliczne enzymy potrzebne podczas replikacji oraz białka niezbędne w czasie zakażenia, wirusy wykształciły wiele mechanizmów ułatwiających im korzystanie ze struktur komórki gospodarza, angażując tym samym całą jej maszynę replikacyjną do wytwarzania wirionów potomnych.

W pierwszym etapie zakażenia, wirus musi wprowadzić swój genom do wnętrza komórki. W tym celu musi pokonać barierę, którą jest błona komórkowa. Wirus może wnikać na dwa sposoby:

- przez fuzję z błoną komórkową, która występuje w przypadku wirusów mających otoczkę lipidową, lub
- przez endocytozę, z której korzystają zarówno wirusy otoczkowe, jak i bezotoczkowe [10,15,30].

Podczas zakażenia bardzo ważną rolę odgrywa cytoszkielet komórki (filamenty aktynowe i mikrotubule), wykorzystywany na różnych etapach cyklu replikacyjnego. Dowiedziono, że poszczególne elementy cytoszkieletu uczestniczą w wewnątrzkomórkowym transporcie wirionów lub ich części składowych, zarówno do miejsca replikacji (w cytoplazmie lub jądrze komórkowym), jak i podczas uwalniania wirionów potomnych. Podczas zakażenia wirusowego może dojść do polimeryzacji lub fragmentacji włókien cytoszkieletu, możliwa jest również ich reorganizacja lub nawet całkowite zniszczenie [6,34,35,36,37].

MECHANIZMY WCHŁANIANIA WEWNĄTRKOMÓRKOWEGO

Endocytoza jest procesem transportu substancji przez błonę komórkową do wnętrza komórki. Tą drogą do komórek mogą się dostawać nie tylko substancje rozpuszczone bądź zawieszona w środowisku zewnątrzkomórkowym, ale również bakterie, pierwotniaki czy wirusy. W pierwszym etapie ładunek zostaje pochłonięty przez wytworzone w błonie wgłębienie, które przekształca się w pęcherzyk (endosom). Endosomy wczesne (*early endosomes*, *EES*) powstają w pobliżu błony komórkowej w wyniku połączenia się kilku pęcherzyków endocytarnych. Natomiast endosomy późne (*late endosomes*, *LEs*) powstają w głębi cytoplazmy i występują głównie w przestrzeni okołojądrowej. Ładunek w endosomach jest transportowany z udziałem mikrotubul do wyspe-

czajizowanych struktur sortujących (głównie aparatu Golgiego), skąd dostarczany jest do miejsc przeznaczenia. Ze względu na różnicę w wielkości pęcherzyków endocytarnych, mechanizmie ich powstawania oraz rodzaju pobieranych cząstek, można wyróżnić kilka ścieżek endocytarnych:

- endocytozę zależną od klatryn,
- endocytozę zależną od kaweolin,
- makropinocytozę oraz
- fagocytozę (ryc. 1) [5,10].

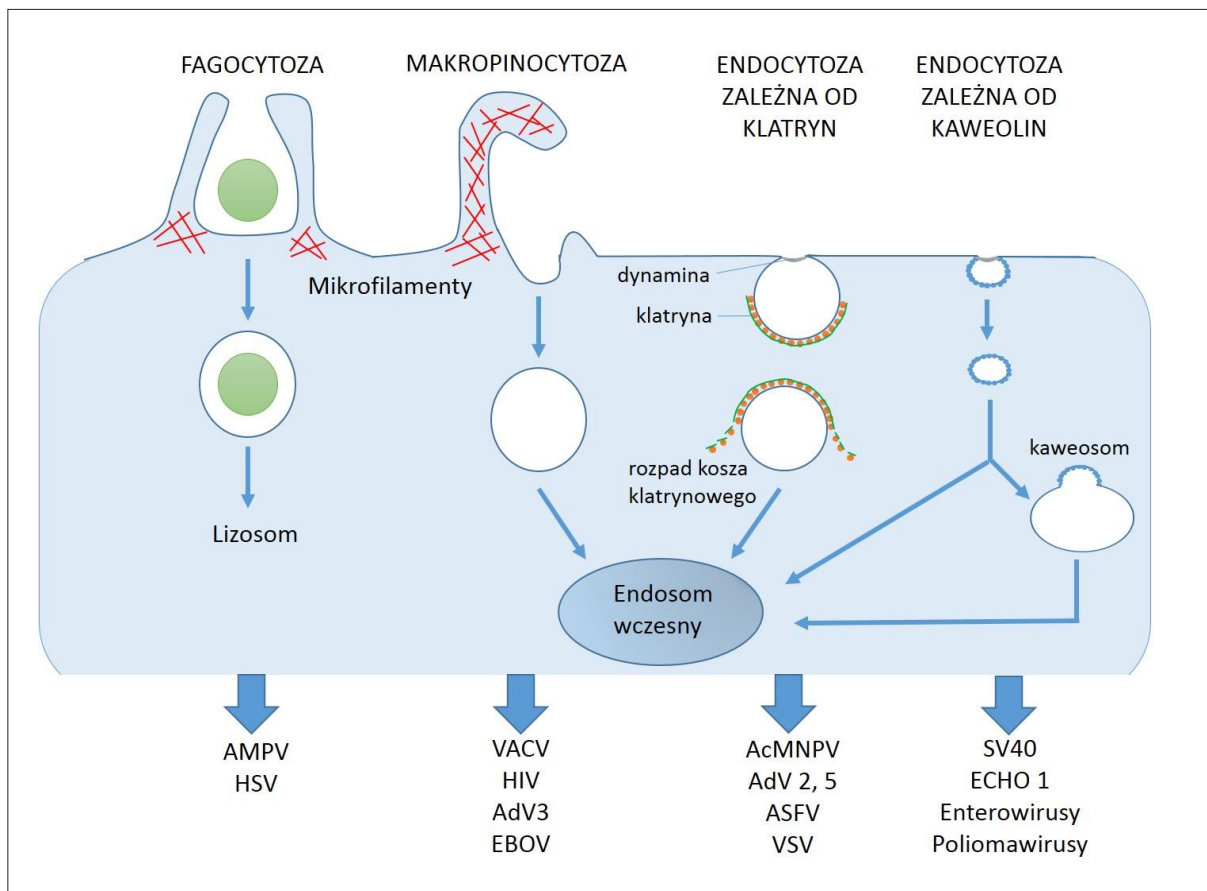
ENDOCYTOZA ZALEŻNA OD KLATRYN

Endocytoza zależna od klatryn (clathrin-mediated endocytosis, CME; endocytoza zależna od receptorów) jest najbardziej powszechnym szlakiem wchłaniania, a zarazem procesem wysoce selektywnym, wymagającym wyspecjalizowanych receptorów znajdujących się na powierzchni błony komórkowej. Odpowiada za wchłanianie substancji odżywczych niezbędnych komórce, takich jak: lipoproteiny, transferyny, insulina, czynniki wzrostu czy hormony białkowe oraz za regulację stężenia receptorów błonowych i dystrybucję wielu substan-

cji biologicznie czynnych. Na drodze CMP są pobierane również antygeny, toksyny bakteryjne czy wirusy. W tym typie endocytozy niezbędna jest obecność klatryny – białka opłaszczającego i uczestniczącego w tworzeniu pęcherzyków (CCVs – clathrin-coated vesicles) [5,26].

Klatryna to białko o masie cząsteczkowej 180 kDa (łańcuchy ciężkie), które wraz z łańcuchami lekkimi (33-35 kDa) opłaszcza pęcherzyki podczas kształtowania się wpuklenia błony komórkowej. Łańcuchy łącząc się tworzą tzw. triskelion, czyli podjednostkę klatryny w kształcie trójramiennej swastyki. Triskeliony wiążące się z łańcuchami lekkimi formują kosz klatrynowy o heksagonalnych lub pentagonalnych ścianach [26].

Endocytoza klatrynozależna składa się z dwóch etapów: etapu błonowego oraz etapu wewnątrzkomórkowego. W pierwszym etapie dochodzi do związania liganda z odpowiednim receptorem na powierzchni komórki. Po utworzeniu kompleksów receptor-ligand następuje ich przegrupowanie i zagęszczenie w odpowiednich miejscach na błonie komórkowej, gdzie dochodzi również do nagromadzenia klatryny od strony cytoplazmy. W tych miejscach błona komórkowa ulega wpukleniu i powstaje kosz klatrynowy. Do powstania pęcherzyka opłaszczonego klatryną niezbędna jest obecność transglutaminazy wspomagającej tworzenie agregatów kompleksów



Ryc. 1. Drogi endocytarne wykorzystywane przez wirusy w celu wnikięcia do komórki (opracowanie własne wg [10,15,19,30])



ligand-receptor, białek adapterowych (assembly proteins, AP: AP180, AP1-4, AP2), które są ważnymi elementami płaszczka klatrynowego oraz aktyny, dynaminy i GTP-azy kontrolujących wpuklenie błony i uwolnienie pęcherzyka do cytoplazmy [5,26,32].

Na etapie wewnątrzkomórkowym zachodzi właściwa endocytoza. Uwolniony do cytoplazmy pęcherzyk ma średnicę 120 nm. Dochodzi do rozpadu kosza i uwolnienia klatryny oraz białek adapterowych. Po odrzuceniu płaszczka klatrynowego pęcherzyk staje się endosomem wczesnym, za którego dalszy transport są odpowiedzialne mikrotubule, wzdłuż których przenoszony jest do aparatu Golgiego, skąd dalej jest przetransportowywany do innych organelli komórkowych.

Endocytoza klatrynozależna jest wykorzystywana przez wirus poliedrozy jądrowej owadów (*Autographa californica multicapsid nucleopolyhedrovirus*, AcMNPV), adenowirusy (AdV2, AdV5), wirus grypy typu A, wirus afrykańskiego pomoru świń (*African swine fever virus*, ASFV), wirus pęcherzykowatego zapalenia jamy ustnej (*vesicular stomatitis virus*, VSV), wirus gorączki lasu Semliki (*Semliki Forest virus*, SFV) [10,14,16,20].

ENDOCYTOZA ZALEŻNA OD KAWEOLIN

Endocytoza zależna od kaweolin (caveolin-mediated endocytosis) jest mechanizmem, za pośrednictwem którego pobierane są ligandy (kwas foliowy, białka, hormony wzrostu), toksyny bakteryjne, glikosfingolipidy i białka GPI zakotwiczone w błonie plazmatycznej i odpowiedzialne za potranslacyjną modyfikację białek [23,24].

Kaweole to wpuklenia błony komórkowej w kształcie kolby o średnicy 50 nm, wzbogacone w cholesterol, glikosfingolipidy, przenośniki błonowe oraz cząsteczki sygnałne. Ważną rolę w ich tworzeniu odgrywa niskocząsteczkowe białko – kaweolina. Tworzy płaszcz wokół wpuklenia od strony cytoplazmy, który stabilizuje kaweole oraz determinuje ich wielkość i kształt. Bierze także udział w regulacji procesów sygnalizacji za pomocą jonów wapnia Ca^{2+} [26].

Endocytoza zależna od kaweoli ma związek z reorganizacją cytoszkieletu aktynowego oraz działaniem GTP-azy zwanej dynaminą. Współdziałanie szkieletu aktynowego oraz dynaminy powoduje powstanie małych pęcherzyków o średnicy 50-80 nm, które mogą się łączyć z endosomami wczesnymi i formować lizosomy lub ulegać fuzji tworząc kaweosomy dalej transportowane za pośrednictwem mikrotubul do miejsc przeznaczenia [21,22].

W wyniku endocytozy kaweolinozależnej wnikają wirusy bezotoczkowe, takie jak mały wirus 40 (*simian virus 40*, SV40), enterowirusy: *wirus Cocksackie B* (*Cocksackie B virus*) i *wirus ECHO 1* (*ECHO 1 virus*) oraz poliomawirusy [10,15,29,30].

MAKROPINOCYTOZA

Makropinocytoza jest to nieswoisty szlak wchłaniania wewnątrzkomórkowego, w który aktywnie zaangażowany jest cytoszkielet aktynowy. Jest to proces, w którym do komórki włączane są substancje rozpuszczalne w płynie zewnątrzkomórkowym, najczęściej o charakterze anionowym lub elektrycznie obojętne. W odróżnieniu od pinocytozy, w makropinocytozie pęcherzyki transportujące – makropinosomy są większe i mają średnicą od 100 nm nawet do 1 μ m. Skład błony makropinosomu jest bardzo podobny do składu błony komórkowej, z tym że jest dodatkowo wzbogacony swoistymi polifosfatydyloinozytolami i markerami tratw lipidowych [4,26]. Poza aktyną, w formowaniu makropinosomów bierze udział Rho GTP-aza, kinaza fosfatydyloinozytolu (PI3K), czynnik uczestniczący w ADP-rybozylacji białek (Arf6), białkowa kinaza serynowo-treoninowa (PAK1) i białka Rab (Rab5, Rab34), które aktywują białka składające filanty aktynowe oraz wspomagające tworzenie wpuklenia w błonie komórkowej, w miejscu gdzie doszło do lokalnego zagęszczenia cząsteczek [10]. Po uformowaniu makropinosomu jest dalej transportowany z udziałem mikrotubul do wnętrza komórki.

Za pośrednictwem makropinocytozy do komórek wnikają: wirus krowianki (*vaccinia virus*, VACV), wirus Ebola (EBOV), ludzki wirus niedoboru odporności (*human immunodeficiency virus*, HIV) oraz adenowirus 3 (*adenovirus 3*, AdV3) [10,15,30].

FAGOCYTOZA

Fagocytoza jest procesem wchłaniania dużych nierozpuszczalnych cząstek o średnicy większej niż 0,5-1,0 μ m. U ssaków, fagocytoza pełni główną rolę w nieswoistej (wrodzonej) odpowiedzi immunologicznej i zachodzi głównie w makrofagach, monocytach, komórkach dendrytycznych oraz neutrofilach w celu eliminacji komórek bakterii, grzybów czy pierwotniaków [10].

Fagocytoza jest złożonym mechanizmem wchłaniania składającym się z kilku etapów. W pierwszym etapie dochodzi do połączenia powierzchniowych receptorów komórki, zwanych receptorami rozpoznającymi wzorce patogenności (*pattern recognition receptors*, pathogen recognition receptors, PRRs) z odpowiednimi ligandami (czynnikami zakaźnymi, komórkami czy cząsteczkami). Do PRRs należą m.in. receptor Fc, CR3 (CD11b/CD18), receptor mannozy czy receptory Toll-podobne, dzięki którym możliwe jest rozpoznanie struktur bakteryjnych (lipopolisacharydy, peptydoglikan lub flagelina) oraz całych komórek bakterii nieopłaszczonych, jak i opłaszczonych przez np. przeciwciała. Po utworzeniu kompleksu receptor-ligand dalsze wnikanie zależy od cytoszkieletu aktynowego i wymaga aktywności białek wiążących aktynę (Arp2/3, dynaminy 2), białek regulujących wchłanianie (białek z rodziny Rho/GTPazy), kinaz (PI3K, Hck) oraz fosfolipazy C i cholesterolu. Zostaje uformowany pęcherzyk – fagosom, który następnie

łączy się z lizosomem formując tym samym fagolizosom, w którym dochodzi do trawienia pobranych cząsteczek/mikroorganizmów [38,39].

Fagocytoza nie jest powszechnie wykorzystywana przez wirusy. Z danych literaturowych wynika, że tylko wirus opryszczki pospolitej (*Herpes Simplex Virus*; HSV) i mimiwirus pełzaka *Acanthamoeba polyphaga* (*Acanthamoeba polyphaga* mimivirus; APMV) wnikają do komórek w wyniku fagocytozy [10,11,30].

WIRUSY A ENDOCYTOZA

Analizując różnorodne sposoby wnikania wirusów do komórek można zadać pytanie, na jakiej podstawie wybierany jest dany rodzaj szlaku endocytarnego? Jak wynika z danych literaturowych, jednym z kryteriów wyboru drogi wnikania jest wielkość pęcherzyków endocytarnych. W klatryno- lub kaweolinozależnej endocytozie wielkość endosomów jest dużo mniejsza niż w fagocytozie czy makropinocytozie. Dlatego też mniejsze wirusy (ASFV czy adenowirusy) wybierają szlaki zależne od klatryn czy kaweolin, a duże wirusy, takie jak mimiwirusy, których średnica wirionu dochodzi nawet do 400 nm, wnikają do komórek przede wszystkim w wyniku fagocytozy [11].

Dla wielu wirusów duże znaczenie podczas wnikania ma pH. Wirusy otoczkowe (wirus grypy, SFV) wymagają niskiego pH w endosomie późnym, aby mogło dojść do aktywacji glikoprotein wirusowych (pH-zależnych proteaz), które prowadzą do zmian konformacyjnych w błonie endosomu i uwolnienia wirusowego genomu do cytoplazmy w pobliżu miejsca replikacji. W przypadku wirusów bezotoczkowych (pikornawirusy czy poliowirusy) niskie pH nie jest wymagane podczas penetracji komórki [15].

Należy również zwrócić uwagę, że endosomy są dla wirusów wygodnym i szybkim środkiem transportu przez błonę komórkową i cytoplazmę. Zapewniają im również ochronę przed układem immunologicznym gospodarza. Ma to szczególne znaczenie w przypadku wirusów, które replikują się w jądrze komórkowym i muszą pokonać długą drogę od miejsca swojej replikacji. Co więcej, wirusy mogą korzystać nie z jednej, ale z wielu szlaków endocytarnych, aby efektywniej zakażać komórki [19].

ADENOVIRIRIDAE

Wirusy należące do rodziny *Adenoviridae* to bezotoczkowe ikosaedralne DNA wirusy, których wielkość wirionu wynosi 80-90 nm. Zakażają głównie układ oddechowy i pokarmowy ludzi i ptaków. Ze względu na sekwencję nukleotydów w genomie, ludzkie adenowirusy podzielono na siedem gatunków (A-G), w których homologia genów między ich przedstawicielami wynosi 50-100%. W zależności od gatunku, adenowirusy mogą wnikać do komórki za pośrednictwem endocytozy zależnej od klatryn lub makropinocytozy, wykorzystując przy tym inne receptory komórkowe.

Adenowirusy gatunku C (AdV2 i AdV5) wnikają do komórek za pośrednictwem klatrynozależnej endocytozy. W procesie tym bardzo ważną rolę odgrywa receptor CAR (coxsackie adenovirus receptor), jak również integryny $\alpha\beta3$ i $\alpha\beta5$ (receptory drugorzędowe). W wyniku oddziaływań między integrynami dochodzi do aktywacji kinazy PI3, białek z rodziny Rho/GTPazy (Cdc42, Rac), białka p130^{cas} oraz białka Rab5. Białka te koordynują proces formowania się pęcherzyka, jak również doprowadzają do reorganizacji cytoszkieletu aktynowego znajdującego się pod błoną komórkową. Wydajność wnikania wirusa do komórki zależy od liczby dostępnych w komórce receptorów CAR oraz receptorów drugorzędowych [10,27].

W pierwszym etapie AdV zamknięty zostaje w pęcherzyku opłaszczonym klatryną, który po odrzuceniu płaszczki klatrynowego staje się endosomem wczesnym. W endosomie dochodzi do częściowej dezorganizacji kapsydu pod wpływem działania proteazy wirusowej. Kiedy pH wewnątrz pęcherzyka spada poniżej 6,0, wirusy opuszczają endosomy i są uwalniane do cytoplazmy. Dalej są transportowane z udziałem mikrotubul i kompleksu dyneina/dynaktyna w stronę jądra komórkowego, gdzie dochodzi do replikacji wirusa [37].

Zupełnie inny szlak endocytarny wykorzystują adenowirusy należące do gatunku B, którego przedstawicielem jest AdV3. W przeciwieństwie do adenowirusów grupy C, nie korzystają z receptora CAR, natomiast oddziaływanie z komórką odbywa się poprzez receptor CD46. AdV3 wnika do komórek nabłonka oraz komórek krwiotwórczych na drodze makropinocytozy. W pierwszym etapie, w wyniku oddziaływań między wirusem a receptorem CD46 dochodzi do aktywacji kinazy PI3 oraz białka Rab5. W kolejnym etapie białko kapsydu wirusa wiąże się z integrynami αv stanowiącymi receptory drugorzędowe [1,33,41]. W procesie formowania makropinosomu są niezbędne białka Rac1 oraz Cdc42, które indukują polimeryzację aktyny [20].

ASFARVIRIDAE

Wirus afrykańskiego pomoru świń (ASFV) to otoczkowy dsDNA wirus, należący do rodziny *Asfarviridae*. Jest czynnikiem etiologicznym odpowiedzialnym za wysoce śmiertelną i nieuleczalną chorobę krwotoczną występującą u świń domowych i dzików, bardzo często związaną z poważnymi stratami ekonomicznymi.

Badania dotyczące mechanizmów wchłaniania ASFV prowadzono na linii komórkowej Vero (nerka małpy) i wykazały, że wirus wnika do komórek na drodze klatrynozależnej endocytozy. W procesie tym biorą udział białka wirusowe p12 i p54, odgrywające ważną rolę podczas adsorpcji wirusa do powierzchniowych receptorów komórkowych oraz białko p30, regulujące wnikanie ASFV [2,13]. Istotne znaczenie ma również obecność cholesterolu w błonie komórkowej, który jest niezbędny podczas formowania pęcherzyka opłaszczonego klatryną oraz dynamina – GTP-aza uczestnicząca w jego odrywaniu od



blony komórkowej. Następnie, po uwolnieniu endosomu do cytoplazmy, jest transportowany wzdłuż mikrotubul w okolice jądra komórkowego, gdzie w fabryczkach wirusowych dochodzi do replikacji ASFV [14].

BACULOVIRIDAE

Baculoviridae to rodzina DNA wirusów chorobotwórczych stawonogów, głównie owadów, których replikacja odbywa się w jądrze zakażonej komórki. Ich wiriony, o długości 250-300 nm, a średnicy 30-60 nm, mają symetrię złożoną i podłużny kształt. Przedstawicielem bakulowirusów jest wirus poliedrozy jądrowej (AcMNPV) zdolny do zakażenia nie tylko komórek owadów, ale również komórek ssaków. Wprawdzie nie dochodzi wówczas do replikacji wirusa, ale może dojść do kontrolowanej przez gospodarza ekspresji obcych genów, co sprawia, że znalazł zastosowanie jako wektor w eksperymentach związanych z inżynierią genetyczną. AcMNPV powoduje aktywację przeciwwirusowej odpowiedzi immunologicznej oraz chroni komórkę przed zniszczeniem w wyniku zakażenia [16].

Mimo że drogi endocytozy wykorzystywane przez AcMNPV były wielokrotnie badane, głównie na owadzych liniach komórkowych, istnieje kilka sprzecznych hipotez na temat molekularnych mechanizmów zaangażowanych w ten proces. Najprawdopodobniej wirus może używać kilku szlaków wchłaniania: endocytozy zależnej od klatryn [18], makropinocytozy [16] oraz niezależnej od kaweolin i klatryn endocytozy [17]. Wykazano, że niezależnie od wykorzystywanej drogi, w procesie tym ważną rolę odgrywa glikoproteina otoczki wirusowej – GP64, odpowiadająca za przyłączenie wirusa do powierzchni komórki. Przy niskim pH GP64 ulega zmianie konformacyjnej, dzięki czemu możliwe jest wprowadzenie nukleokapsydu do wnętrza komórki. Wirusy pozbawione GP24 wykazują 98% obniżenie skuteczności uwalniania wirionów potomnych, co sugeruje, że białko to jest niezbędne nie tylko podczas wnikania wirusa, ale również podczas jego wychodzenia z zakażonej komórki. Istotną rolę podczas endocytozy AcMNPV odgrywa również cholesterol znajdujący się w błonie komórkowej. Wykazano bowiem, że zastosowanie metylo- β -cyklodekstryny, który powoduje usunięcie cholesterolu, prowadzi do zahamowania zależnego od GP24 procesu wnikania wirusa do komórki [16].

FILIVIRIDAE

Filoviridae to rodzina RNA wirusów, wywołujących u ludzi i innych naczelnych gorączki krwotoczne o wyjątkowo ciężkim przebiegu. Ich najbardziej znanym przedstawicielem jest wirus Ebola (EBOV), którego morfologia wirionu różni się znacząco od innych wirusów. Wiriony EBOV mają kształt wydłużony i nitkowaty o średniej długości 800-1000 nm i średnicy 80 nm. Charakteryzują się pleomorfizmem i mogą przybierać różne kształty od prostych pałeczek i nitek zakończonych jedną lub kilkoma pętlami do mocno skręconych form [29].

Podobnie jak w przypadku bakulowirusów, w literaturze istnieją sprzeczne hipotezy na temat szlaków zaangażowanych we wnikanie filowirusów. Początkowo sądzono, że w celu wniknięcia do komórki wykorzystują różne drogi endocytarne, w tym endocytozę zależną od kaweolin [7] i zależną od klatryn [3]. Sprzeczne wyniki były najprawdopodobniej spowodowane zastosowaniem w badaniach zastępczego modelu EBOV (pseudotypowego retrowirusa), którego morfologia oraz właściwości biochemiczne różnią się od szczepów dzikich. Hipotezy zweryfikowali Saeeda i wsp., którzy wykazali, że EBOV zakaża komórki linii HEK293T (embrionalne komórki ludzkiej nerki) i Vero (komórki nerki małpy) niezależnie od klatryny, kaweoliny i dynaminy, a głównym mechanizmem wnikania wirusa jest makropinocytoza. Potwierdzili to stosując inhibitory białek regulujących makropinocytozę (PAK1 i CtBP/BARS) oraz etyloizopropylomiloryd (EIPA), które wpłynęły na proces formowania makropinosomu i spowodowały znaczne obniżenie liczby cząstek wirusowych wchodzących do komórki [29].

HERPESVIRIDAE

Herpesviridae to duża rodzina otoczkowych DNA-wirusów, wywołujących zakażenia zarówno u kręgowców, jak i u niektórych bezkręgowców. Ich cechą charakterystyczną jest zdolność do ustalania stanu zakażenia latentnego w neuronach zwoju trójdzielnego oraz limfocytach T CD8+.

Podczas zakażenia produktywnego wirusy należące do podrodziny *Alphaherpesvirinae*, których przedstawicielami są wirus opryszczki pospolitej (HSV) oraz koński herpeswirus typu 1 (EHV-1), wykorzystują różne receptory powierzchniowe. W zależności od typu zakażanych komórek mogą to być: receptor HveA (TNFRSF14), HveB (nektyna-2), HveC (nektyna-1) czy siarczan heparanu [8]. W procesie tym ważną rolę odrywają glikoproteiny wirusowe: gC i gB, niezbędne do zainicjowania adsorpcji wirusa do powierzchni komórki; gD, odpowiedzialna za utworzenie stabilnego wiązania z receptorem powierzchniowym oraz gB i kompleks gH-gL, koordynujące fuzję otoczki wirusowej z błoną komórkową [40].

HSV, jak i EHV-1, wykazują tropizm do wielu typów komórek, dlatego też badania szlaków endocytarnych wykorzystywanych przez te wirusy były prowadzone na różnych modelach komórkowych, w tym na liniach Vero (nerka małpy), Hep-2 (ludzkie komórki nabłonka), CHO-K1 (jajnik chomika), RK13 (nerka królika) czy ED (skóra konia) [8,9,40]. W przypadku obu wirusów stwierdzono, że głównym mechanizmem wnikania jest fuzja otoczki z błoną komórkową gospodarza. Po wprowadzeniu do wnętrza komórki, kapsyd jest transportowany wzdłuż mikrotubul w stronę jądra komórkowego, które jest miejscem replikacji wirusa.

W ostatnich latach pojawiły się doniesienia sugerujące, że wirusy te mogą korzystać również z innego sposobu

– endocytozy niezależnej od klatryn i kaweolin, która przypomina fagocytozę. W przypadku HSV zakażającego komórki linii CHO-K1, po utworzeniu połączenia między glikoproteiną D i nektyną-1, dochodzi do fuzji otoczki wirusa z endosomem, czemu towarzyszy spadek pH w jego wnętrzu, miejscowa reorganizacja cytoszkieletu aktynowego oraz aktywacja białka RhoA. U EHV-1 mechanizm ten jest analogiczny, różnica polega na tym, że adsorpcja wirusa do tego samego typu komórek odbywa się w wyniku interakcji gB i gC z siarczanem heparanu, a towarzyszy temu aktywacja Rho-zależnej kinazy ROCK1 [8,9,10].

ORTHOMYXOVIIRIDAE

Wirus grypy typu A należy do rodziny *Orthomyxoviridae* i rodzaju *Influenzavirus A*. Jego genom jest zbudowany z ośmiu segmentów RNA, kodujących 11 białek wirusa. Cechą charakterystyczną wirusa grypy jest obecność na powierzchni otoczki antygenów powierzchniowych: hemaglutynin (HA), warunkujących zjadliwość wirusa, odpowiedzialnych za przyłączenie wirionów do receptorów i fuzję otoczki z błoną komórki gospodarza oraz neuraminidaz (NA), odgrywających ważną rolę w procesie uwalniania wirionów potomnych [12]. Podobnie jak w przypadku EBOV, wiriony grypy mogą przybierać różne formy: sferyczne o średnicy 100 nm oraz podłużne o średnicy 100 nm i długości 20 µm. W badaniach dotyczących mechanizmów wnikania wirusa grypy wykazano, że wiriony podłużne wykorzystują głównie makropinocytozę, a wiriony sferyczne mogą wnikać do komórek zarówno za pośrednictwem makropinocytozy, jak i endocytozy zależnej od klatryn [28].

Podczas klatrynozależnej endocytozy dochodzi do połączenia hemaglutyniny z receptorem kinazy tyrozynowej (RTKs). W procesie formowania endosomu wczesnego i przekształcania w endosom późny niezbędna jest obecność białek Rab5 i Rab7. Aby wiriony mogły opuścić endosom późny, w jego wnętrzu pH musi spaść do 5,0. Jest to możliwe dzięki wirusowemu białku M2, które odpowiada za formowanie kanałów jonowych w otocze wirusa i jej fuzję z błoną endosomu. Genom wirusa zostaje uwolniony do cytoplazmy i z udziałem importyny β przetransportowany do jądra komórkowego [10]. W przypadku gdy wiriony wnikają na drodze makropinocytozy, dochodzi do reorganizacji cytoszkieletu aktynowego, aktywacji GTPazy Rab5 oraz kinazy fosfatidyloinozitolu (PI3K) [28].

POLYOMAVIRIDAE

Małpi wirus 40 (SV40) to bezotczkowy RNA wirus należący do rodziny *Polyomaviridae* i wywołujący zakażenia zarówno u małp, jak i ludzi. Wnika do komórek w wyniku kaweolozależnej endocytozy. Po adsorpcji do komórki, dochodzi do formowania wpuklenia w błonie komórko-

wej i zamknięcia wirusa w kaweoli. Następnie, w wyniku aktywacji kinazy tyrozynowej dochodzi do regulowanej przez białko RhoA depolimeryzacji filamentów aktynowych, kumulacji aktyny wokół kaweoli i aktywacji procesu endocytozy. Z udziałem mikrotubul i dyneiny, SV40 transportowany jest w kaweosomie bezpośrednio do siateczki śródplazmatycznej. Proces regulowany jest przez kompleks białek COPI (odpowiedzialnych za retrogradowy transport z aparatu Golgiego do siateczki śródplazmatycznej) i wymaga obecności GTPazy Arf1 i Sar1. Po dotarciu do siateczki śródplazmatycznej, SV40 uwalniany jest do cytoplazmy i transportowany do miejsca replikacji w jądrze komórkowym [25,31]. Badania z zastosowaniem inhibitorów aktyny i kinazy tyrozynowej czy nystatyny, która blokowała kaweolozależną endocytozę, wykazały zahamowanie wnikania wirusa do komórek [30].

Endocytoza zależna od kaweolin jest wykorzystywana przez wiele wirusów, w tym wirus ECHO 1, wirus Coxsackie B czy enterowirusy. Jednak w przypadku SV40 proces ten znacznie różni się od tradycyjnego szlaku endosom/lizosom, z tym że wiriony są przekazywane bezpośrednio z kaweosomu do siateczki śródplazmatycznej [10].

PODSUMOWANIE

Oddziaływania między wirusem a żywą komórką są bardzo złożone. Mimo bardzo prostej budowy, wirusy wykształciły wiele mechanizmów ułatwiających im zaangażowanie całej maszyny komórki do wytwarzania wirionów potomnych. Najważniejszym etapem cyklu replikacyjnego wirusa, bez którego nie mogłoby dojść do zakażenia, jest adsorpcja wirionu do powierzchni komórki oraz pokonanie bariery, którą jest błona komórkowa. Proces ten wymaga nie tylko obecności na powierzchni komórki swoistych receptorów rozpoznawanych przez białka wirusowe, ale również wykorzystania przez wirusa mechanizmów endocytozy, dzięki którym komórka pobiera substancje ze środowiska zewnętrznego. Z przeprowadzonych dotychczas badań wynika, że aby efektywniej zakażać komórki, wirusy mogą wykorzystywać nie jeden, ale kilka szlaków endocytarnych jednocześnie. Transport w endosomach jest dla nich wygodnym, bezpiecznym i szybkim sposobem dostania się do miejsca replikacji. Dokładne poznanie molekularnych mechanizmów wykorzystywanych przez wirusy podczas wnikania do komórek może znaleźć zastosowanie podczas opracowywania nowych terapii przeciwwirusowych, w których mechanizm działania leków i chemioterapeutyków nie będzie opierał się na hamowaniu wirusowych enzymów, lecz na blokowaniu swoistych interakcji między wirusem a gospodarzem. Zahamowanie cyklu replikacyjnego poprzez stosowanie inhibitorów lub aktywatorów białek uczestniczących w jego pierwszym etapie uniemożliwi wirusom wnikanie do komórek, a tym samym zakażanie.



PIŚMIENNICTWO

- [1] Amstutz B., Gastaldelli M., Kalin S., Imelli N., Boucke K., Wandeler E., Mercer J., Hemmi S., Greber U.F.: Subversion of CtBP1-controlled macropinocytosis by human adenovirus serotype 3. *EMBO J.*, 2008; 27: 956-969
- [2] Angulo A., Alcamí A., Vinuela E.: Virus-host interactions in African swine fever: the attachment to cellular receptors. *Arch. Virol. Suppl.*, 1993; 7: 169-183
- [3] Bhattacharyya S., Warfield K.L., Ruthel G., Bavari S., Aman M.J., Hope T.J.: Ebola virus uses clathrin-mediated endocytosis as an entry pathway. *Virology*, 2010; 401: 18-28
- [4] Comisso C., Davidson S.M., Soydaner-Azeloglu R.G., Parker S. J., Kamphorst J.J., Hackett S., Grabocka E., Nofal M., Drebin J.A., Thompson C.B., Rabinowitz J.A., Metallo C.M., Vander Heiden M.G., Bar-Sagi D.: Macropinocytosis of protein is an amino acid supply route in Ras-transformed cells. *Nature*, 2013; 497: 633-637
- [5] Doherty G.J., McMahon H.T.: Mechanisms of endocytosis. *Annu. Rev. Biochem.*, 2009; 78: 857-902
- [6] Drebert Z., Golke A., Cymerys J., Słońska A., Chmielewska A., Tucholska A., Bańbura M.W.: Equid herpesvirus type 1 (EHV-1) disrupts actin cytoskeleton during productive infection in equine leukocytes. *Pol. J. Vet. Sci.*, 2015; 18: 107-112
- [7] Empig C.J., Goldsmith M.A.: Association of the caveola vesicular system with cellular entry by filoviruses. *J. Virol.*, 2002; 76: 5266-5270
- [8] Frampton A.R., Jr., Goins W.F., Cohen J.B., von Einem J., Osterrieder N., O'Callaghan D.J., Glorioso J.C.: Equine herpesvirus 1 utilizes a novel herpesvirus entry receptor. *J. Virol.*, 2005; 79: 3169-3173
- [9] Frampton A.R. Jr., Stolz D.B., Uchida H., Goins W.F., Cohen J.B., Glorioso J.C.: Equine herpesvirus 1 enters cells by two different pathways, and infection requires the activation of the cellular kinase ROCK1. *J. Virol.*, 2007; 81: 10879-10889
- [10] Ghigo E.: A dilemma for viruses and giant viruses: which endocytic pathway to use to enter cells? *Intervirology*, 2010; 53: 274-283
- [11] Ghigo E., Kartenbeck J., Lien P., Pelkmans L., Capo C., Mege J.L., Raoult D.: Ameobal pathogen mimivirus infects macrophages through phagocytosis. *PLoS Pathog.*, 2008; 4: e1000087
- [12] Golke A., Słońska A., Cymerys J.: Pandemiczna grypa A(H1N1). *Życie Wet.*, 2010; 85: 47-49
- [13] Gómez-Puertas P., Rodríguez F., Oviedo J.M., Brun A., Alonso C., Escribano J.M.: The African swine fever virus proteins p54 and p30 are involved in two distinct steps of virus attachment and both contribute to the antibody-mediated protective immune response. *Virology*, 1998; 243: 461-471
- [14] Hernaez B., Alonso C.: Dynamin - and clathrin-dependent endocytosis in African swine fever virus entry. *J. Virol.*, 2010; 84: 2100-2109
- [15] Kalia M., Jameel S.: Virus entry paradigms. *Amino Acids*, 2011; 41: 1147-1157
- [16] Kataoka C., Kaname Y., Taguwa S., Abe T., Fukuhara T., Tani H., Moriishi K., Matsuura Y.: Baculovirus GP64-mediated entry into mammalian cells. *J. Virol.*, 2012; 86: 2610-2620
- [17] Laakkonen J.P., Mäkelä A.R., Kakkonen E., Turkki P., Kukkonen S., Peränen J., Ylä-Herttua S., Airene K.J., Oker-Blom C., Vihinen-Ranta M., Marjomäki V.: Clathrin-independent entry of baculovirus triggers uptake of *E. coli* in non - phagocytic human cells. *PLoS One*, 2009; 4: e5093
- [18] Long G., Pan X., Kormelink R., Vlaskin J.M.: Functional entry of baculovirus into insect and mammalian cells is dependent on clathrin-mediated endocytosis. *J. Virol.*, 2006; 80: 8830-8833
- [19] Lopez S., Arias C.: How viruses hijack endocytic machinery. *Nature Education*, 2010; 3: 16
- [20] Meier O., Greber U.F.: Adenovirus endocytosis. *J. Gene. Med.*, 2004; 6 (Suppl. 1): S152-S163
- [21] Mundy D.I., Machleidt T., Ying Y.S., Anderson R.G., Bloom G.S.: Dual control of caveolar membrane traffic by microtubules and the actin cytoskeleton. *J. Cell Sci.*, 2002; 115: 4327-4339
- [22] Nichols B.J.: A distinct class of endosome mediates clathrin-independent endocytosis to the Golgi complex. *Nat. Cell Biol.*, 2002; 4: 374-378
- [23] Parton R.G., Richards A.A.: Lipid rafts and caveolae as portals for endocytosis: new insights and common mechanisms. *Traffic*, 2003; 4: 724-738
- [24] Parton R.G., Simons K.: The multiple faces of caveolae. *Nat. Rev. Moll. Cell Biol.*, 2007; 8: 185-194
- [25] Pelkmans L., Kartenbeck J., Helenius A.: Caveolar endocytosis of simian virus 40 reveals a new two-step vesicular-transport pathway to the ER. *Nat. Cell Biol.*, 2001; 3: 473-483
- [26] Pollard T.D., Earnshaw W.C.: Endocytosis and the endosomal membrane system. W: *Cell Biology*, wyd. 2, Saunders/Elsevier, Philadelphia, 2008: 391-408
- [27] Rauma T., Tuukkanen J., Bergelson J.M., Denning G., Hautala T.: rab5 GTPase regulates adenovirus endocytosis. *J. Virol.*, 1999; 73: 9664-9668
- [28] Rossman J.S., Leser G.P., Lamb R.A.: Filamentous influenza virus enters cells via macropinocytosis. *J. Virol.*, 2012; 86: 10950-10960
- [29] Saeed M.F., Kolokoltsov A.A., Albrecht T., Davey R.A.: Cellular entry of Ebola virus involves uptake by a macropinocytosis-like mechanism and subsequent trafficking through early and late endosomes. *PLoS Pathog.*, 2010; 6: e1001110
- [30] Schelhaas M.: Come in and take your coat off - how host cells provide endocytosis for virus entry. *Cell. Microbiol.*, 2010; 12: 1378-1388
- [31] Schelhaas M., Malmström J., Pelkmans L., Haugstetter J., Ellgaard L., Grünewald K., Helenius A.: Simian virus 40 depends on ER protein folding and quality control factors for entry into host cells. *Cell*, 2007; 131: 516-529
- [32] Simonsen A., Wurmser A.E., Emr S.D., Stenmark H.: The role of phosphoinositides in membrane transport. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 2001; 13: 485-492
- [33] Sirena D., Lilienfeld B., Eisenhut M., Kälin S., Boucke K., Beerli R.R., Vogt L., Ruedl C., Bachmann M.F., Greber U.F., Hemmi S.: The human membrane cofactor CD46 is a receptor for species B adenovirus serotype 3. *J. Virol.*, 2004; 78: 4454-4462
- [34] Słońska A., Cymerys J., Godlewski M.M., Dzieciatkowski T., Tucholska A., Chmielewska A., Golke A., Bańbura M.W.: Equine herpesvirus type 1 (EHV-1)-induced rearrangements of actin filaments in productively infected primary murine neurons. *Arch. Virol.*, 2014; 159: 1341-1349
- [35] Słońska A., Cymerys J., Skwarska J., Golke A., Bańbura M.W.: Influence of importin α/β and exportin 1 on equine herpesvirus type 1 (EHV-1) replication in primary murine neurons. *Pol. J. Vet. Sci.*, 2013; 16: 749-751
- [36] Słońska A., Golke A., Solarska M., Cymerys J., Dzieciatkowski T., Bańbura M.: Wpływ zakażeń wirusowych na cytoskielet ko-

mórkowy. Post. Mikrobiol., 2011; 50: 121-130

[37] Słońska A., Polowy R., Golke A., Cymerys J.: Rola białek motorycznych cytoszkieletu w zakażeniu wirusowym. Postępy Hig. Med. Dośw., 2012; 66: 810-817

[38] Stuart L.M., Ezekowitz R.A.: Phagocytosis: elegant complexity. Immunity, 2005; 22: 539-550

[39] Taylor P.R., Martinez-Pomares L., Stacey M., Lin H.H., Brown G.D., Gordon S.: Macrophage receptors and immune recognition. Annu. Rev. Immunol., 2005; 23: 901-944

[40] Van de Walle G.R., Peters S.T., VanderVen B.C., O'Callaghan D.J., Osterrieder N.: Equine herpesvirus 1 entry via endocytosis is facilitated by αV integrins and an RSD motif in glycoprotein D. J. Virol., 2008; 82: 11859-11868

[41] Wickham T.J., Mathias P., Cheres D.A., Nemerow G.R.: Integrins $\alpha V\beta_3$ and $\alpha V\beta_5$ promote adenovirus internalization but not virus attachment. Cell, 1993; 73: 309-319

Autorzy deklarują brak potencjalnych konfliktów interesów.

