

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Biologie



Helena Caisová

Makropinocytóza ve virové infekci
Macropinocytosis in viral infection

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Vedoucí bakalářské práce: RNDr. Hana Španielová, Ph.D.

Praha 2020

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně a výhradně s použitím citovaných pramenů, literatury a dalších odborných zdrojů. Tato práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

V Praze, dne

.....

Podpis autora

Děkuji své vedoucí bakalářské práce RNDr. Haně Španielové, Ph.D. za cenné rady, věcné připomínky a vstřícnost při konzultacích a vypracování této práce.

Abstrakt: Makropinocytóza je typ endocytózy závislý na aktinu, který slouží k pohlcení velkého množství tekutiny a částic z extracelulárního prostředí buňky. Důležitou funkci plní při fyziologických procesech (např. pro prezentaci antigenu v buňkách imunitního systému), ale může být využívána i patogeny, včetně virů při vstupu do buněk. Tato práce shrnuje dosavadní poznatky o makropinocytóze ve virové infekci a klade důraz na funkci virů jako iniciačních faktorů, které proces makropinocytózy spouští. Viry do buněk často vstupují i několika endocytickými mechanismy zároveň, a proto se práce věnuje také souhrnu experimentálních kritérií potřebných pro identifikaci makropinocytózy a její odlišení od ostatních typů endocytózy. Makropinocytóza může hrát roli i při šíření viru ve tkáni nebo při internalizaci extracelulárních váčků, které mohou přenášet klastrované viry; ty pak mohou fungovat jako tzv. kolektivní infekční jednotky. V práci je nastíněn význam tohoto fenoménu a jeho možné evoluční důsledky. Studium mechanismu internalizace virů i extracelulárních váčků spolu s pochopením regulace a významu makropinocytózy ve virové infekci může pomoci k návrhu efektivních antivirotik.

Klíčová slova: makropinocytóza, endocytóza, virová infekce, evoluce, ko-infekce, extracelulární váčky

Abstract: Macropinocytosis is an actin-dependent type of endocytosis which leads to internalisation of extracellular fluid and particles. It plays an important role in many physiological processes (e.g. in presentation of antigens by cells of immune system), however, it can be also exploited by pathogens, including viruses, which use it for infectious cell entry. This thesis summarizes current knowledge about macropinocytosis in viral infection and emphasizes the function of viruses as a initiators that can trigger the macropinocytic process. Viruses are able to enter cells by different types of endocytosis simultaneously, therefore this thesis also deals with experimental criteria necessary to identify macropinocytosis and distinguish it from other types of endocytosis. Macropinocytosis can also play a role in the spreading of viruses in tissues or in internalization of extracellular vesicles. These vesicles can transfer viruses traveling in clusters which can then act as collective infectious units. The thesis also outlines the importance of this phenomena together with its possible evolutionary consequences. Study of the mechanism by which viruses and extracellular vesicles are internalised into cells, together with the understanding of regulation and significance of micropinocytosis in viral infection, could help to develop effective antivirals.

Keywords: macropinocytosis, endocytosis, viral infection, evolution, co-infection, extracellular vesicles

Obsah

Seznam použitých zkratk	vi
Úvod	1
1 Makropinocytóza	2
1.1 Výhoda využití endocytózy pro vstup virů	2
1.2 Makropinocytóza	2
1.3 Molekulární mechanismy makropinocytózy	3
1.3.1 Indukce makropinocytózy	3
1.3.2 Doprava a maturace makropinosomu	4
2 Experimentální kritéria makropinocytózy	7
3 Makropinocytóza ve virové infekci	11
3.1 Adenovirus	11
3.2 Ebola virus	13
3.3 Herpesvirus	15
3.4 HIV	18
3.5 Koronavirus	19
3.6 Reovirus	20
3.7 Virus chřipky	21
3.8 Virus vaccinie	22
3.9 Ostatní viry	23
4 Makropinocytóza při klastrování virů	25
4.1 Makropinocytóza extracelulárních váčků	25
4.2 Evoluční důsledky klastrování virů	27
Závěr	28
Literatura	29

Seznam použitých zkratek

A431	lidské epidermální nádorové buňky
A549	lidské epiteliální nádorové buňky
Ad	adenovirus
APC	buňky prezentující antigen
BMVEC	mozkové mikrovaskulární endoteliální buňky
CoV	koronavirus
CAR	coxsackie-adenovirový receptor
CME	endocytóza zprostředkovaná klatrinem
CNS	centrální nervová soustava
CtBP1/BARS	protein 1 vázající C konec/brefeldin A-ADP ribosylovaný substrát
DC	dendritické buňky
DC-SIGN	mezibuněčná adhezivní molekula specifická pro dendritické buňky
EEA1	časný endosomální autoantigen 1
EEV	extracelulární obalený virus
EBOV	virus Eboly
EGF	epidermální růstový faktor
EGFR	receptor epidermálního růstového faktoru
EIPA	ethyl-isopropylamilorid
EphA2	EphrinA2, tyrozinkinázový receptor
ESCRT	endosomální třídící komplex požadovaný pro transport
EV	extracelulární váček
FAK	fokální adhezivní kináza
GP	glykoprotein
HA	hemaglutinin
HAV	virus hepatitidy A
HCMV	lidský cytomegalovirus
HeLa	lidské epiteliální nádorové buňky
HIV	virus lidské imunitní nedostatečnosti
HMVEC-d	lidské mikrovaskulární dermální endoteliální buňky
HRP	křenuv peroxidáza
Hrs	tyrozinkinázový substrát regulovaný jaterním růstovým faktorem
HUVEC	lidské umbilikální žilní endoteliální buňky
IAV	virus chřipky
IMV	intracelulární zralý virus
IPA-3	inhibitor 3 cílící na aktivaci Pak1
JAM-A	spojovací adhezivní molekula A
KSHV	virus Kapošího sarkomu
Lamp2	membránový protein 2 asociovaný s lysosomy
MeV	virus spalniček
MOI	multiplicita infekce (počet virových částic na buňku)
MVB	multivezikulární tělísko
MHV	virus myši hepatitidy
NDV	virus Newcastleeské nemoci

NgR1	Nogo-66 receptor 1
NHE1	Na ⁺ /H ⁺ výměník 1
NPC1	Niemann-Pick C1
Nox2	NADPH oxidáza 2
Pak1	kináza aktivovaná p21
PDGFR	růstový faktor odvozený od krevních destiček
PI(3,4,5)P₃	fosfatidylinositol-3,4,5-trisfosfát
PI3 kináza	fosfatidylinositol-3-kináza
PIP5K	fosfatidylinositol 4-fosfát 5-kináza
PIKfyve	fosfoinositid kináza obsahující FYVE doménu
PKC	proteinkináza C
PLC	fosfolipáza C
PMA	forbol-12-myristát-13-acetát
PS	fosfatidylserin
ROS	reaktivní formy kyslíku
RTK	tyrozinkinázový receptor
SARS-CoV	koronavirus způsobující těžký akutní respirační syndrom
SNX	nexiny zajišťující sorting
TIM-1	T buněčný imunoglobulin a mucinová doména 1
VACV	virus vaccinie
VLP	viru podobná částice
VSV	virus vezikulární stomatitidy

Úvod

Makropinocytóza je endocytický proces, kterým buňky pohlcují tekutinu z okolního prostředí. U buněk prezentujících antigen probíhá neustále, konstitutivně. U jiných je to proces přechodný a dochází k němu pouze v případě jednorázových aktivací pomocí růstových faktorů. Některé viry si makropinocytózu „uchočily“ a využívají ji k tomu, aby se dostaly do cytoplasmu hostitelské buňky, kde se replikují. Viry buď mimikují růstový faktor, který celý proces spustí a nebo se jen nalepí k buněčné membráně a pasivně čekají, až je nic netušící buňka pohltní. Po úspěšném vstupu do buňky ale virus ještě nemá vyhráno. Musí zdárně utéct z makropinosomu předtím, než se promění v lysosom a jeho obsah bude degradován.

V této práci je kladen důraz na funkci virů jako iniciačních faktorů spouštěcích makropinocytózu. Dále se práce snaží vymezit základní signalizační proteiny hrající podstatnou roli při makropinocytóze a definuje minimální sadu buněčných procesů či faktorů potřebných pro rozpoznání a definici makropinocytózy. Také uvádí jednotlivé skupiny virů, které do buněk pomocí makropinocytózy vstupují a prostřednictvím příkladů se snaží přiblížit charakteristiky, ale i výjimky, které makropinocytózu doprovázejí.

Makropinocytóza se uplatňuje i při vstupu extracelulárních váčků (EV) do cílových buněk. Tyto váčky mohou do recipientních buněk dovézt náklad v podobě komplexních molekul a ovlivnit tak jejich fungování. Terapeutický potenciál EV je tématem intenzivního výzkumu. Aby byl tento potenciál využit, je důležité studium mechanismu, kterým jsou EV internalizovány do buňky.

Extracelulární váčky mohou přenášet i viry či virové genomy, které hromadně infikují další buňky a chovají se jako tzv. kolektivní infekční jednotky. Zdá se, že virus tímto způsobem zvyšuje multiplicitu infekce. Součástí práce je také popis tohoto fenoménu včetně jeho evolučních důsledků.

1. Makropinocytóza

Viry mají většinou jednoduchou strukturu, ale velmi složité interakce s hostitelskými buňkami. Během vstupu živočišných virů do buněk je využit široký repertoár buněčných procesů, které jsou řízeny stovkami buněčných proteinů. Přestože některé viry dokáží penetrovat do cytosolu buněk přímo plasmatickou membránou, většina využívá výhody plynoucí z pohlcení prostřednictvím endocytózy a penetruje až membránou endosomů.

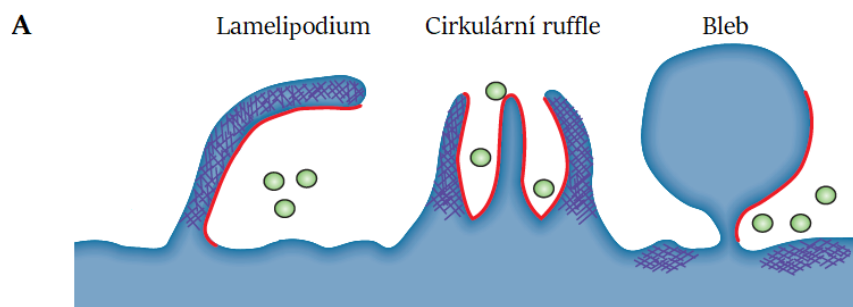
1.1 Výhoda využití endocytózy pro vstup virů

Živočišné buňky schopné endocytózy poskytují virům obrovskou výhodu. Endocytované vezikuly dovezou viry z buněčné periferie až k jádru buňky, kde jsou vhodné podmínky infekce, popř. mohou viry již snadno vniknout do jádra, jedná-li se o viry replikující se v jádře. Maturující endosom je doprovázen postupně se snižujícím pH. Kyselé pH umožní některé podstatné konformační změny virových fúzních proteinů, jejichž následkem je únik virů z endosomu. V tomto kroku může být důležitá také přítomnost specifických proteáz (furinů a katepsinů) poskytující některým virům nezbytnou proteolytickou aktivitu (Ebert a kol., 2002; Chandran a kol., 2005). Dalším faktorem zvyhodňujícím viry je částečné ukrytí před imunitním dohledem. Endocytované viry nezanechají na buněčném povrchu stopy v podobě glykoproteinů, pomocí kterých by je mohl imunitní systém snáze dohledat. Virus HIV je schopen do buněk vstoupit jak přímou fúzí s plasmatickou membránou, tak endocytózou. Studie Miyauchi a kol. (2009) ukázala, že upřednostňuje endocytózu.

1.2 Makropinocytóza

Makropinocytóza je endocytický proces závislý na aktinu, který slouží primárně k nespecifickému příjmu tekutiny, roztoku a někdy i částic z okolního prostředí buňky. Makropinocytózou pohlcují extracelulární tekutinu s částicemi buňky prezentující antigen (APC) a molekuly z okolního prostředí posléze vystavují na svém povrchu. Makropinocytóza je proces iniciovaný „rozvlněním“ (angl. ruffling) cytoplasmatické membrány, přičemž vzniknou výčnělky membrány, tzv. ruffles (viz Obrázek 1.1). K membránovému rufflingu dochází mimo jiné při migraci buněk, interakci buňka-buňka, recyklaci povrchových proteinů či membrány a při dovozu materiálu do endosomů (Gu a kol., 2011; Orth a McNiven, 2006; Nobes a Marsh, 2000; Hewlett a kol., 1994). Také nádorové buňky jsou závislé na makropinocytóze. Mohou s její pomocí přijmout velké množství živin, které potřebují k proliferaci a růstu (Commisso a kol., 2013).

Vznik membránových ruffles je spjat s aktivací aktinu a mikrofilament připojených k



Obrázek 1.1: **Membránové ruffles, počínající proces makropinocytózy, mohou nabývat různých podob.** Na obrázku jsou znázorněny: 1) planární lamelipodia, 2) cirkulární ruffles a 3) bleby. Tmavě modré šrafování reprezentuje aktin, červeně ohraničená membrána bude po pohlcení membránou makropinosomu. Převzato a upraveno z Mercer a Helenius (2009).

cytoplasmatické membráně. Ruffles se posléze uzavírají a dají vznik velké vakuole - makropinosomu. Makropinosomy jsou heterogenní co do velikosti. Ve srovnání s klatrinem obalenými váčky, které měří v průměru 85–110 nm, jsou obrovské. Jejich velikost se pohybuje od 0,2 do 5 μm .

Ve většině buněčných typů není makropinocytóza nepřetržitě trvající proces, ale proces přechodný, který když je aktivován, trvá pouze po určitou dobu. Jako specifické spouštěče mohou sloužit růstové faktory, substráty pro integriny a fosfatidylserinové (PS) buněčné zbytky (Haigler a kol., 1979; Meier a kol., 2002; Hoffmann a kol., 2001).

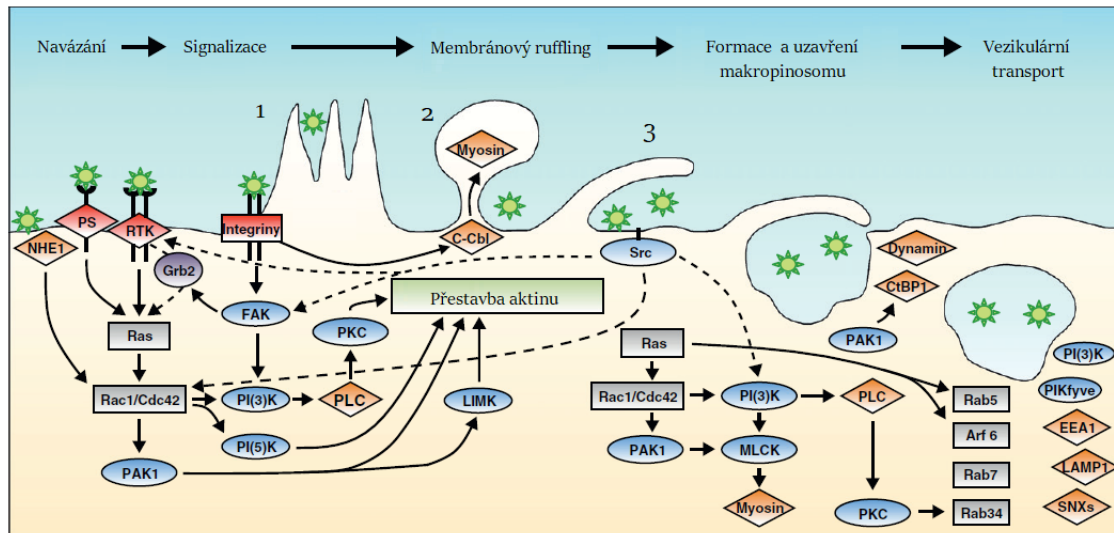
1.3 Molekulární mechanismy makropinocytózy

Cesty, jimiž virus do buňky vstupuje, závisí na mechanismu navázání viru k buněčnému povrchu. To dále ovlivní i typ endocytózy, pomocí něhož virus vstoupí do buňky, dopravu virového genetického nákladu a konečně i penetraci virové kapsidy do cytosolu. Ve všech těchto krocích je zcela zásadní buněčná signalizace, která spouští a vymezuje veškeré děje umožňující buňce endocytovat a viru do buňky vniknout. Mechanismus vstupu virů do buněk prostřednictvím makropinocytózy se může odlišovat v mnoha aspektech v souvislosti se stavem buňky, buněčným typem a typem viru. Avšak některé základní regulující a efektorové molekuly hrající roli v příjmu tekutiny - při makropinocytóze, mohou být konzervované od nižší po vyšší eukaryota (Maniak, 2001). Signalizační síť charakterizující proces makropinocytózy ve virové infekci je znázorněna na Obrázku 1.2.

1.3.1 Indukce makropinocytózy

Virus může indukovat makropinocytózu aktivací specifického receptoru na buněčném povrchu a mimikovat tak růstový faktor, který iniciuje makropinocytózu za normálních okolností. Pro přímou aktivaci využívají viry tyrozinkinázové receptory (RTK) jakými jsou EGFR

(receptory epidermálního růstového faktoru), PDGFR (růstový faktor odvozený od krevních destiček), integriny a v nějakých případech i PS receptory. Aktivací těchto receptorů dojde v buňce k četným signalizacím vedoucím ke změně dynamiky aktinu, přestavbě prostorového buněčného cytoskeletu a k následnému vytvoření membránových ruffles. Nebo se virus k buňce naváže nesespecificky prostřednictvím interakce s komponentami extracelulární matrix, např. s heparansulfátovými proteoglykany (HSPG) - v tomto případě virus pouze vychytrale vyčkává, připraven u buněčného povrchu, dokud nedojde k jeho pohlcení buňkou.

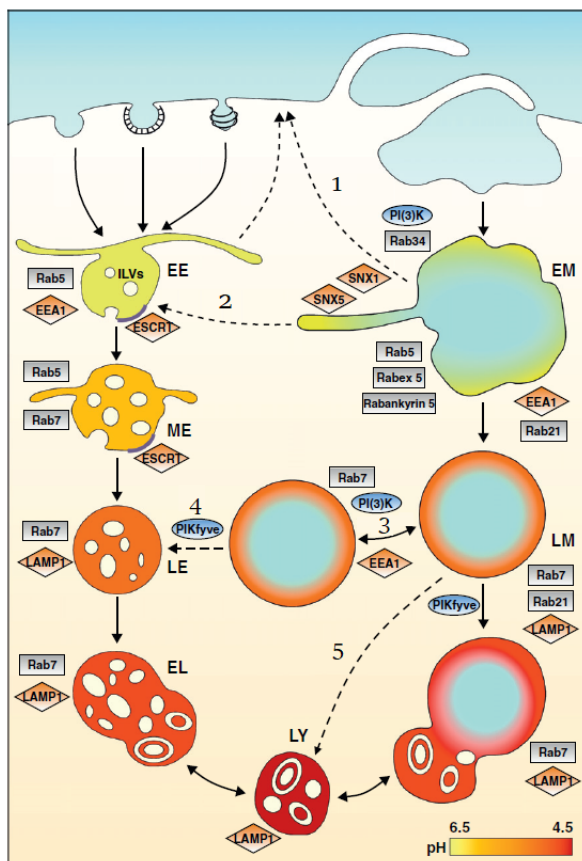


Obrázek 1.2: **Signalizační kaskáda doprovázející proces makropinocytózy ve virové infekci.** Makropinocytóza virů může být pro přehlednost rozdělena do pěti stádií: navázání, signalizace, membránový ruffling, formace makropinosomu a doprava makropinosomu. Každý z těchto procesů je ovládnán několika buněčnými faktory, které dohromady tvoří navzájem propojenou signalizační síť. Kinázy - **modře**, GTPázy - **šedě**, adaptory - **fialově** a další faktory (Na⁺/H⁺ výměník - NHE1, fosfolipázy - PLC, myosiny, fusion/fission faktory) - **oranžově**. Na obrázku jsou znázorněny membránové ruffles v cirkulární formě (1), ve formě blebů (2) a ve formě lamelipodií (3). Plné šipky znázorňují přímou alosterickou či katalytickou aktivaci a čárkované šipky znázorňují interakce, při kterých dochází k amplifikaci signálu, uzavření makropinosomu a vezikulárnímu transportu. Převzato a upraveno z Mercer a Helenius (2012).

1.3.2 Doprava a maturace makropinosomu

Uzavření ruffles vyústí ve formaci velké, tekutinou naplněné vakuoly, která je nadále zpracována buňkou. Makropinosom se pohybuje hlouběji do nitra buňky a pokud se nachází v APC (např. v makrofágovi), potká ho stejný osud jako obyčejný endosom - maturace. Naopak v nádorových buňkách A431 dochází ke splývání makropinosomu s lysosomy jen málokdy. Makropinosom totiž ve většině případů po své internalizaci zamíří opět k buněčnému povrchu a uvolní svůj obsah zpět do extracelulárního prostoru (West a kol., 1989; Hewlett a kol., 1994). Mechanismus těchto dvou odlišných principů je však neznámý a většina studií se soustředí právě na makropinosomy, které v cytoplasmě degradují.

Přestože se doprava makropinosomu liší co do buněčného typu a spouštěcího ligandu, jeví



Obrázek 1.3: **Doprava a maturace makropinosomu.** Hlavními organelami klasické endocytické dráhy jsou časné endosomy (EE), maturující endosomy (ME), pozdní endosomy (LE), endolysosomy (EL) a lysosomy (LY). Při maturaci makropinosomu se užívají ekvivalentní názvy: časný makropinosom (EM) a pozdní makropinosom (LM). Makropinosom může po pohlcení zamířit zpět k buněčnému povrchu (1) nebo může maturovat (plně jednosměrné šipky). Maturace makropinosomu je proces, který jeví určité podobnosti s maturací endosomů. Jako marker EE i EM se uplatňuje Rab5 a EEA1. Markerem LE a LM je Rab7 a LAMP1. EM může fúzovat s EE (2) nebo maturovat a stane se z něho LM. LM může fúzovat s dalšími LM (3), s LE (4) či s LY (5). Kinázy - **modře**, GTPázy - **šedě**, ostatní faktory - **oranžově**. Faktory hrající roli při dopravě a maturaci makropinosomu jsou popsány v podkapitole Časný makropinosom a Pozdní makropinosom. Převzato a upraveno z Mercer a Helenius (2012).

některé podobnosti s maturací klasických endosomů (viz Obrázek 1.3). Viry internalizované CME a endocytózou zprostředkovanou kaveolami jsou dopraveny do časných endosomů. Ty plní funkci třídících kompartmentů, ze kterých je část membrány a tekutiny recyklována zpět do extracelulárního prostoru. U makropinosomů zatím nebyla dokázána schopnost iniciálního třídění, přítomnost intraluminálních váčků (ILV) a nebyl popsán ani kompartment v makropinosomální dráze, který by obsahoval jak časné, tak pozdní endosomální markery (v endosomální dráze je to maturující endosom - EM). Makropinosomy jsou však stejně jako endosomy citlivé na cytoplasmatické pH, podléhají okyselení a homo- či heterotypické fúzi (West a kol., 1989; Hewlett a kol., 1994).

Časný makropinosom

Po separaci makropinosomu od membrány generuje **PI3 kináza** (fosfatidylinositol-3-kináza) na nově zformovaném časném makropinosomu PI(3,4,5)P₃ (fosfatidylinositol-3,4,5-trisfosfát), který plní regulační funkci při membránové dopravě (Patki a kol., 1997). GTPáza **Rab5** je první z proteinů, které jsou makropinosomem rekrutovány a její aktivita roste během časné maturace (Feliciano a kol., 2011). Spolu s Rab5 se na makropinosomu nachází **Rabex 5** (faktor pro výměnu guaninových nukleotidů; Poteryaev a kol., 2010) a **Rabankyrin 5** (efektorový protein; Schnatwinkel a kol., 2004). Rabankyrin 5 asociuje s nově vytvořeným makropinosomem a pravděpodobně cílí Rab5 do nascentního makropinosomu (Schnatwinkel

a kol., 2004). Proteiny, které modulují aktivitu Rab, jsou dobře známy, avšak samotný efekt Rab molekul na dynamiku makropinosomu je dosud nejasný.

Některé buněčné typy požadují **Rab34** a **EEA1** (časný endosomální autoantigen 1), které zprostředkovávají formaci makropinosomu a homotypickou fúzi (Sun a kol., 2003; Hamasaki a kol., 2004). EEA1 je efektor Rab5 a spolu s ním je lokalizován v membráně časných endosomů (Patki a kol., 1997) i časných makropinosomů.

Nexiny zajišťující sorting (SNX) hrají důležitou roli při endosomální signalizaci a třídění (Teasdale a kol., 2001). SNX interagují s touto částí endosomální sítě, která je obohacena o PI(3)P (Ponting, 1996). Akcí **SNX1** a **SNX5** lze dosáhnout recyklace makropinosomu nebo jeho dopravy do časného endosomu (Kerr a kol., 2006; Bryant a kol., 2007; Lim a kol., 2008).

Pozdní makropinosom

Postupem času se makropinosom stále více vzdaluje od buněčného povrchu a proměňuje se v pozdní makropinosom charakteristický svým kyselým pH a proteinem **Rab7**, popř. i **Rab21**. Přítomnost Rab21 ale není pro úspěšnou maturaci makropinosomu nutná (Egami a Araki, 2009). Osud pozdního makropinosomu není přesně daný - makropinosom může fúzovat s pozdními endosomy i s pozdními lysosomy (Racoosin a Swanson, 1993; Hewlett a kol., 1994). Tento proces se spoléhá na enzymatickou aktivitu lipidové kinázy **PIKfyve** (fosfoinositid kináza obsahující FYVE doménu), což dokazuje fakt, že při inhibici této kinázy se v buňce vyskytují zduřelé endocytické kompartmenty připomínající pozdní endosomy (Kerr a kol., 2010).

2. Experimentální kritéria makropinocytózy

Makropinocytóza se uplatňuje při imunologických procesech důležitých pro správný chod organismu. Je však zapojena i při propagaci několika virových a bakteriálních infekcí (Francis a kol., 1993), kardiovaskulárních onemocnění (Kruth a kol., 2005), rakoviny (Commisso a kol., 2013) a alergií (Noirey a kol., 2000). Z toho důvodu je žádoucí identifikovat farmakologický nástroj, který umožní studovat makropinocytózu v buněčných i vyšších biologických systémech, popřípadě najít takový farmakologický inhibitor, který by šlo aplikovat v klinické praxi a inhibovat tak makropinocytózu zahrnutou při patologiích.

Experimentální kritéria pro vymezení makropinocytózy ve virové infekci jsou dána odlišnou účastí buněčných faktorů. K určení, zda se makropinocytózy účastní daný faktor, je třeba nejprve zamezit jeho fungování. Toho lze dosáhnout použitím specifických inhibitorů, přístupů zahrnujících RNA interferenci (knock-down) nebo expresí mutantních konstruktů s vyřazeným genem pro testovaný faktor (knock-out). Pomocí RNA interference lze efektivně zamezit expresi určitého genu.

Viry infikující eukaryotické buňky využívají ke svému vstupu do těchto buněk kromě makropinocytózy i jiné endocytické mechanismy, jejichž signalizační kaskády se prolínají. Tak má většina dostupných inhibitorů makropinocytózy nežádoucí vliv i na další endocytické cesty, popřípadě na správné fungování buněčných procesů. Je tedy velmi obtížné identifikovat buněčný faktor či farmakologický inhibitor, jenž by umožnil definovat makropinocytózu a neovlivňoval další buněčné procesy. K určení, zda daný virus do buňky vstupuje právě makropinocytózou se proto využívá nikoli jeden faktor, ale celá sada experimentálních kritérií.

Specifické inhibitory

Poptávka po specifickém inhibitoru spolu se sílícím významem makropinocytózy rostla a studie Lin a kol. (2018) přinesla slibné výsledky - našla tři specifické inhibitory makropinocytózy. Jako nejvhodnější z nich se jeví imipramin. Imipramin inhibuje makropinocytózu v nádorových, dendritických buňkách a v makrofázích a to bez vedlejšího cytopatického efektu a aniž by ovlivňoval další endocytické mechanismy (Lin a kol., 2018). V makrofázích inhibuje jen makropinocytózu stimulovanou růstovým faktorem, což je žádoucí, jelikož konstitutivní makropinocytóza se účastní při prezentaci antigenu T lymfocytům.

Imipramin je již dlouhou dobu používané tricyklické antidepresivum odvozené od molekuly dibenzazepinu. Mimoto se používá i jako inhibitor kyselý sfingomyelinázy. To je enzym, který katalyzuje hydrolýzu sfingomyelinu na ceramid a fosfocholin a vykazuje optimální aktivity v kyselém pH. Experimenty Shakor a kol. (2012) ukázaly, že pro úspěšné pohlčení transfe-

rinového receptoru CME je nutná aktivace sfingomyelinázy a zvýšená koncentrace ceramidu v plasmatické membráně. Po užití imipraminu došlo ke stimulaci internalizace transferinu nikoli CME, ale endocytózou nezávislou na klatrinu.

Imipramin se podílí na inhibici časného kroku makropinocytózy (inhibuje formaci membránových ruffles), což bylo zjištěno pomocí skenovací elektronové mikroskopie (SEM). Na tvorbě ruffles se mohou v makrofázích při makropinocytóze spuštěné M-CSF (faktor stimující kolonie makrofágů) a PMA (forbol-12-myristát-13-acetát) podílet i reaktivní formy kyslíku vzniklé působením NADPH oxidázy 2 (Nox2), které prostřednictvím inhibice PTEN (fosfatázový a tensinový homolog) a aktivace PI3 kinázové/Akt cesty vedou k aktivaci confilinu, proteinu vázajícího aktin, ke tvorbě membránových ruffles a k makropinocytóze (Ghoshal a kol., 2017). Chemiluminiscence ROS ukázala, že imipramin inhibuje produkci kyslíkového radikálu po stimulaci PMA z 50 % (Lin a kol., 2018). Je však nejasné, zda je částečná (50 %) inhibice ROS dostatečná pro inhibici makropinocytózy. Přesný mechanismus účinku imipraminu ale zatím není znám a inhibitor se dosud nepoužívá v praxi.

Typické morfologické charakteristiky

Pokud virus vstupuje do buněk makropinocytózou, je po přidání tohoto patogenu k buňkám zahájen membránový ruffling, který je následován pohlcením velkého množství tekutiny. Membránový ruffling, odehrávající se na buněčném povrchu, lze nejlépe pozorovat pokročilými zobrazovacími technikami, elektronovým a transmisním mikroskopem. Elektronovým mikroskopem lze pozorovat i makropinosom, který se od ostatních endocytovaných váček liší svou velikostí (váčky obalené klatrinem měří 85–110 nm a makropinosom 0,2–5 μm). Viry internalizované v makropinosomech by měly kolokalizovat s markery kapalné fáze. Jako markery se používají nejčastěji fluorescenčně značené komponenty, polysacharidy o vysoké molekulové hmotnosti (fluorescenční dextran s molekulovou hmotností 70 kDa Li a kol., 2015) a rozpustné enzymy (křenuvá peroxidáza - HRP; Steinman a Cohn, 1972). Nejčastěji tedy právě tak velké částice, které se nevejdou do žádného jiného endocytického váčku než do makropinosomu. Např. ve studii Meier a kol. (2002) je využito k určení, zda adenovirus 2 vstupuje makropinocytózou jak fluorescenčně značený dextran, tak i HRP.

Podle protokolu Wang a kol. (2010) lze vyhodnotit efektivitu a kinetiku biogeneze makropinosomu a jeho maturace, přičemž funkce cílových proteinů je narušena inhibitory nebo knock-down a knock-out přístupy. Pokročilejší přístup Wang a kol. (2014) umožňuje pomocí modifikovaného kvantitativního protokolu systematicky měřit množství makropinosomů, jejich velikost i objem. Využívá k tomu fluorescenčně značený dextran o velikost 10 000 MW, mikroskopii a částečně automatizovanou analýzu obrazu. Tento přístup je výhodný z důvodu možné aplikovatelnosti na širokou škálu buněk a rychlého vyhodnocení.

Využití inhibitorů aktinové dynamiky

Vstup viru makropinocytózou a s ním i infekce je sensitivní vůči inhibitorům aktinové dynamiky. V této souvislosti se používá nejčastěji latrunculin A a cytochalasiny B/D (Coué a kol., 1987; Sampath a Pollard, 1991). Nevýhodou ale je, že tyto molekuly blokují i fagocytózu a další buněčné procesy závislé na aktinu (Stockinger a kol., 2005).

Využití inhibitorů Na^+/H^+ výměníku

Makropinocytóza indukovaná růstovým faktorem je inhibovaná amiloridem, který cílí na Na^+/H^+ výměník (West a kol., 1989), jenž je důležitým regulátorem cytosolického pH. Následkem této inhibice je sníženo pH pod buněčnou membránou, což zabrání aktivaci GTPáz Rac1 a Cdc42 (Koivusalo a kol., 2010), naruší polymeraci aktinu a iniciaci makropinocytózy. Nejčastěji používané jsou deriváty samotného amiloridu, ethyl-isopropylamilorid (EIPA) a dimethylamilorid, které jsou aktivní i při nižší koncentraci než samotný amilorid (Maréchal a kol., 2001; Meier a kol., 2002). Nevýhodou je, že amilorid a jeho deriváty mohou částečně inhibovat i fagocytózu (Zhang a kol., 2015). Tento nepříznivý účinek snižuje pravděpodobnost využití amiloridu jako farmakologického inhibitoru, avšak při determinaci makropinocytózy *in vivo* je zatím první a nejspolehlivější volbou.

Využití inhibice specifických kináz

Pak1. Jednou z nejdůležitějších kináz účastnících se procesu makropinocytózy je Pak1 (kináza aktivovaná p21, serin/threoninová kináza), která je aktivována proteinem Rac1 (p21) nebo Cdc42 (Manser a kol., 1994; Parrini a kol., 2005) a reguluje aktinové přestavby. Aktivuje také CtBP1/BARS (protein 1 vázající C konec/brefeldin A-ADP ribosylovaný substrát), který může hrát důležitou roli při uzavření makropinosomu (Liberali a kol., 2008). Pak1 lze inhibovat molekulou IPA-3 (Deacon a kol., 2008). IPA-3 (inhibitor 3 cílící na aktivaci Pak1) je vysoce selektivní inhibitor, který cílí na autoinhibiční doménu Pak1. Interakcí s touto doménou je narušena katalytická funkce kinásové domény a tím pádem inhibována funkce Pak1. Výhodou je, že Pak1 aktivované před použitím IPA-3 jsou vůči tomuto inhibitoru rezistentní.

PI3 kináza. Při makropinocytóze je PI3 kináza zodpovědná za formování lipidového mikroprostředí indukujícího membránové ruffles (Araki a kol., 2007). Specifické inhibitory této kinázy, wortmannin a LY290042, blokují konstitutivní i stimulovanou makropinocytózu, ale i fagocytózu (Araki a kol., 1996). PI3 kináza v buňce kontroluje i další esenciální funkce, mimo jiné i proces příjmu glukózy a aminokyselin (Kohn a kol., 1996) a tak její inhibici lze uskutečňovat pouze v *in vitro* systémech.

PKC. Také PKC (Ca^{2+} a diacylglycerol dependentní serin/threoninová kináza) je požadována při indukcii makropinocytózy. PKC je aktivována pomocí RTK nebo PI3 kinázou a

po asociaci s plasmatickou membránou zahajuje ruffling. Makropinocytózu blokuje inhibitor PKC rottlerin, který ale může ovlivňovat i jiné kinázy (Gschwendt a kol., 1994; Sarkar a kol., 2005). Dalším užívaným inhibitorem je bis-indolyl-maleimide (BIM), kompetitivní inhibitor ATP, který byl použit např. v experimentech definujících makropinocytózu adenoviru (Meier a kol., 2002).

Využití inhibitorů dynaminu

Makropinocytóza je definována jako endocytická cesta nezávislá na multifunkční GTPáze dynaminu. Některé typy makropinocytózy ve virové infekci však dynamin vyžadují a proto je důležité vymezit závislost či nezávislost na dynaminu v rámci experimentálních kritérií makropinocytózy. Toho lze dosáhnout pomocí inhibitoru dynaminu (dynasore; Macia a kol., 2006), popř. pomocí dominantních negativních konstruktů. Damke a kol. (1994) vygenerovali buněčnou linii (dynamin-2-K44A) s defektem v genu kódujícím doménu dynaminu vázající GTP, který se nachází pod tetracyklinovým operátorem.

Formace cirkulárních ruffles stimulovaná PDGF je částečně závislá na dynaminu (Schlunck a kol., 2004; Liu a kol., 2008). Inhibice dynaminu v tomto případě bránila lokalizaci Rac1 do ruffles. Rac1 patří mezi Rho GTPázy a jeho aktivace je esenciální pro přestavbu cytoskeletu formující všechny tři typy membránových ruffles (Ridley a kol., 1992; Mercer a Helenius, 2008). Dynamin byl lokalizován v rozšiřující se části cirkulárních ruffles a je možné, že hraje roli při uzavření makropinosomu. Zprostředkovává totiž i formaci váčků při CME a to tak, že katalyzuje membránové štěpení (Bashkirov a kol., 2008).

Většina případů makropinocytózy virů je tedy nezávislá na dynaminu. V těchto případech se ukazuje jako zásadní hráč zprostředkovávající membránové štěpení protein CtBP1/BARS. Po stimulaci pomocí EGF je CtBP1/BARS translokován do membránových ruffles a fosforylován Pak1, což je esenciální pro jeho funkci (Liberati a kol., 2008).

3. Makropinocytóza ve virové infekci

Prvním úkolem virů je dostat se do cytosolu buňky. Některé viry fúzíjí s plasmatickou membránou, ale většina využívá buněčnou endocytickou aktivitu a penetruje až membránou endosomu. Viry do buněk vstupují CME, endocytózou zprostředkovanou kaveolami, pinocytózou, makropinocytózou a stejně tak i ne příliš dobře prostudovanými cestami - endocytózou nezávislou na klatrinu a kaveolách (shrnuto v Mercer a kol., 2010). Viry často využívají jednu z těchto cest jako majoritní a alternativně do buněk vstupují i několika různými cestami zároveň. Typ endocytózy, prostřednictvím kterého se viry internalizují do buňky, souvisí s vlastnostmi viru a buněčným typem.

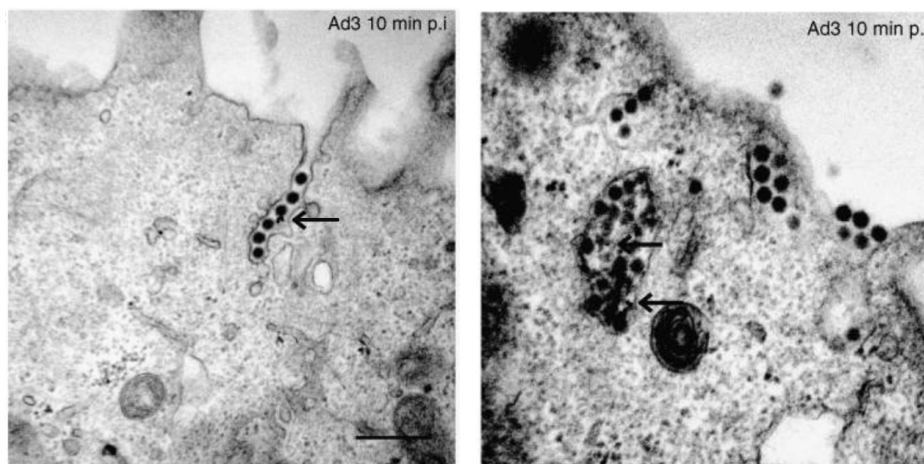
V této kapitole je probrána role makropinocytózy ve virové infekci, přičemž jsou podrobně popsány její charakteristiky u jednotlivých skupin virů. Dále je kladen důraz také na signalizační faktory účastníci se makropinocytózy a její vymezení vůči ostatním mechanismům podobným makropinocytóze.

3.1 Adenovirus

Adenoviry (Ad) reprezentují skupinu neobalených DNA virů s kapsidou s ikosahedrální symetrií o průměru 90 nm (převzato z Berk, 2013). Tato skupina virů obsahuje mnoho odlišných sérotypů, které se liší povahou hlavního kapsidového proteinu (Aoki a kol., 2011). Liší se i mechanismus vstupu do buněk u různých sérotypů adenovirů? A jakou v něm hraje roli makropinocytóza?

Adenovirus 2 a 5. Proces vstupu lidského adenoviru 2 a 5 se odehrává pomocí CME, kterou doprovází druhý endocytický proces - makropinocytóza (Wang a kol., 1998). Tyto viry přirozeně infikují respirační epiteliální buňky a jako primární receptor jim slouží CAR (coxsackie virus B Ad receptor; Roelvink a kol., 1998). Virové partikule přichycené k buňce pomocí CAR pak aktivují jako koreceptory integriny, které spustí internalizaci viru (Wickham a kol., 1993). Integriny mohou poskytovat upstream signály indukující makropinocytózu. Podílí se i na makropinocytóze a fagocytóze mrtvých opsonizovaných buněk (Wu a kol., 2006).

Ad2 vstupuje do lidských epiteliálních buněk CME. Po přidání viru k buňkám je však zvýšen příjem tekutiny, který není ovlivněn inhibicí CME. Jedná se o makropinocytózu indukovanou virem, ke které dochází i tehdy, když je zamezeno průběhu CME a internalizaci viru. Signalizační kaskádu spouštějící makropinocytózu pravděpodobně aktivuje navázaný virus na povrchu buňky. (Meier a kol., 2002)



Obrázek 3.1: Snímky z elektronového mikroskopu zachycující lokalizaci adenoviru 3 v HeLa buňkách při multiplicitě infekce 5000 (MOI, multiplicita infekce - počet virových částic na buňku). K pořízení snímků došlo 10 minut po infekci, kdy byly partikule Ad3 často nacházeny ještě nepohlcené v hladkých invaginacích (šipky v levém obrázku) a ve velkých makropinosomech (šipky v pravém obrázku). Převzato a upraveno z Amstutz a kol. (2008), měřítko neuvedeno.

Ad2 opouští endosomální dráhu časně, nevyžaduje ke svému úniku do cytosolu fúzi s lysosomem (Greber a kol., 1993). Inhibice makropinocytózy inhibitorem EIPA zamezí úniku viru z endosomů, a tak autoři Meier a kol. (2002) došli k závěru, že Ad2 navázaný na povrchu buňky indukuje uvolnění obsahu makropinosomu i endosomu do cytosolu buněk. Makropinocytóza se tedy podílí na produktivní infekci Ad2 u lidských epiteliálních buněk.

Makropinocytóza je spuštěna navázáním viru k buněčnému povrchu a vykazuje některé podobnosti s makropinocytózou stimulovanou růstovým faktorem - zahrnuje ruffling závislý na F-aktinu, formaci velké endocytické vakuoly, PKC, je sensitivní vůči EIPA inhibitoru a nevyžaduje dynamin. Ruffles indukované virem se svou morfologií liší od těch indukovaných EGF. I osud vzniklých makropinosomů se liší. Makropinosomy odvozené od Ad2 jsou pohyblivější a po nějaké době se ztratí v cytoplasmě, dojde k jejich lýzi. To koreluje se zjištěním, že Ad2 poměrně rychle opouští endocytickou dráhu (Greber a kol., 1993). Zatímco makropinosomy odvozené od EGF v cytoplasmě přetrvávají podstatně déle. (Meier a kol., 2002)

Adenovirus 3. Tento virus využívá pro rychlou infekci epiteliálních a hematopoetických buněk endocytózu nezávislou na dynaminu. Prvním krokem Ad3 je navázání k receptoru CD46 na buněčném povrchu a krokem druhým je klastrování integrinů indukované virem. Endocytóza Ad3 splňuje hned několik kritérií charakteristických pro makropinocytózu. Je sensitivní vůči inhibitorům mířících na F-aktin, nízké pH endosomů, PKC, Na^+/H^+ výměník a Rac1. Dále je během ní aktivován Pak1 a CtBP1, což jsou molekuly hrající roli při uzavírání makropinosomu. Elektronová mikroskopie ukázala Ad3 viriony lokalizované ve velkých tekutinou naplněných vakuolách (viz Obrázek 3.1), což jen potvrzuje roli makropinocytózy. (Amstutz a kol., 2008)

Adenovirus 35. Stejně jako Ad3, tak i Ad35 využívá makropinocytózu jako cestu produktivní infekce a to konkrétně do HeLa buněk a HK-2 buněk (buněk lidských ledvin; Kálin a kol., 2010). Tato cesta zahrnuje aktivaci α v integrinů a nezávisí na dynaminu, což vylučuje CME. Ad35 je slibný vektor pro přenos genů a vakcinaci z důvodu jeho nízké séroprevalence v populaci a širokého tropismu (Vogels a kol., 2003).

Na rozdíl od Ad3 a 35 vstupujících do buněk makropinocytózou majoritně, Ad2 a 5 vstupují prostřednictvím CME a makropinocytózu využívají pro svůj únik z endosomu. Všechny typy adenoviru stimulují makropinocytózu a to způsobem, který zahrnuje integriny a Rac1.

3.2 Ebola virus

Viry Eboly (EBOV), jsou obalené RNA viry, řadící se do čeledi *Filoviridae*, což znamená přesným překladem nitkovité viry. Tento název odkazuje na jejich charakteristický protáhlý tvar zcela ojedinělý mezi viry. Viriony eboly měří 1-2 μ m na délku a 80-100 nm na šířku (převzato z Sanchez a kol., 2013). Už jen tento fakt poukazuje na výběr endocytického mechanismu, kterým virus započiná infekci - je jím makropinocytóza. Virus Eboly infikuje široké spektrum hostitelských buněk. Dokáže způsobit produktivní infekci v makrofázích, dendritických buňkách (DC), endoteliálních buňkách, fibroblastech, hepatocytech a v adrenálních kortikálních buňkách (Zaki a kol., 1999; Ryabchikova a kol., 1999; Geisbert a kol., 2003). Lymfocyty jsou jedním z mála buněčných typů, který není filoviry produktivně infikován (Geisbert a kol., 2000).

Navázání viru k buňkám se odehrává pomocí virového glykoproteinu (GP). GP může interagovat s širokou škálou buněčných receptorů a koreceptorů. Účastnit se může folátový receptor- α (Chan a kol., 2001), několik různých typů lektinů (Alvarez a kol., 2002), integrin β 1 (Takada a kol., 2000) a tyrozinkinázové receptory TIM-1 a Axl. TIM-1 (T buněčný imunoglobulin a mucinová doména 1) dramaticky zvyšuje účinnost infekce epiteliálních buněk (Moller-Tank a kol., 2013). V tomto procesu je klíčový PS, jenž se váže na zbytky TIM-1 a umožňuje interakci s virem. Vedle toho je vstup EBOV zprostředkovaný i Axl, avšak ne přímou interakcí s povrchovým GP (Brindley a kol., 2011). Axl zvyšuje účinnost makropinocytického vstupu ZEBOV (Zaire-Ebola virus) do HeLa buněk (Hunt a kol., 2011). Axl ve své fosforylované a aktivní podobě interaguje s PLC, která plní roli regulátoru aktinové dynamiky a je důležitá pro průběh makropinocytózy (Amyere a kol., 2000; Linger a kol., 2008).

Většina partikulí EBOV vstupuje do buňky makropinocytózou a následně je dopravena do časného a pozdního endosomu (Saeed a kol., 2010). Zajímavé je, že pro úspěšnou dopravu makropinosomu a infekci EBOV jsou zapotřebí proteiny asociované s autofagosomy (Shtanko a kol., 2018). Na cestě endosomálním systémem je GP EBOV štěpen endosomálními proteázami - katepsiny B a L (Schornberg a kol., 2006) nebo jinými dosud neidentifikovanými

proteázami (Marzi a kol., 2012). Po štěpení se odhalí skryté domény, které se váží k intracelulárnímu receptoru NPC1 (Niemann-Pick C1; Côté a kol., 2011; Carette a kol., 2011). NPC1 je membránový protein, který snižuje množství cholesterolu v intracelulárních membránách tím, že ho třídí zpět na plasmatickou membránu nebo do endoplasmatického retikula (Cruz a kol., 2000).

Zatímco k makropinocytickému vstupu filamentárních virům podobných částic (VLPs) viru Eboly dochází relativně rychle, tak k jejich úniku do cytoplazmy začíná docházet až 30 minut po vstupu, což je relativně dlouho ve srovnání s ostatními viry fúzujícími z pozdních endosomů (např. virus chřipky; Lakadamyali a kol., 2003). K nastartování fúze dojde až po splynutí makropinosomu s endolysosomy pozitivními na NPC1 (Mingo a kol., 2015). Podobná zjištění platí i pro koronavirus, ale v tomto případě virus nevyužívá přímo NPC1, ale zvýšené aktivity katepsinu L v pozdních endosomech/lysosomech (viz podkapitola Koronaviry).

Mnoho experimentů týkající se EBOV a mechanismu vstupu ukázalo, že se virus internalizuje pomocí klatrinu či endocytózou zprostředkovanou kaveolami (Empig a Goldsmith, 2002). Tyto nesrovnalosti mohou reflektovat rozdíly v experimentálních systémech a aplikovaných podmínkách. Velká část studií používá pouze pseudotypované viry, které ale nemají filamentární strukturu a nesou na svém povrchu jen GP viru Eboly (jedná se většinou o sférický retrovirus či sférický virus vezikulární stomatitidy - VSV). Skutečnosti se lépe přibližují experimenty založené na fluorescenčně značeném viru s deletovaným esenciálním transkripčním faktorem (Halfmann a kol., 2008) a na VLPs. Takto upravené viriony a VLPs byly použity v experimentu Nanbo a kol., 2010, který přesvědčivě ukázal, že se vstupu viru Eboly účastní makropinocytóza.

Dendritické buňky. Tyto buňky jsou první linií obrany imunitního systému, která přichází do kontaktu s EBOV (Geisbert a kol., 2003; Bray a Geisbert, 2005). Jsou to APC a v nezralém stavu u nich dochází ke konstitutivní makropinocytóze. Na svůj povrch exprijují lektiny typu C, konkrétně DC-SIGN (mezibuněčná adhezivní molekula specifická pro dendritické buňky), pomocí kterého se virus k těmto buňkám naváže. Interakce zprostředkovaná virem rozběhne aktivaci a migraci DC do sekundárních lymfoidních orgánů, kde tyto APC započínají specifickou adaptivní imunitní odpověď - aktivují T-buňky a endoteliální buňky prostřednictvím mezibuněčné adhezivní molekuly ICAM-3 (Geijtenbeek a kol., 2000b) a ICAM-2 (Geijtenbeek a kol., 2000a). EBOV vstupuje do dendritických buněk makropinocytickým mechanismem závislým na dynaminu (Mulherkar a kol., 2011) a nejspíš využívají migrační schopnost DC jako cestu k rozšíření infekce po těle.

Epiteliální buňky. VLPs EBOV se internalizují prostřednictvím makropinocytózy do epiteliálních buněk (Vero a HEK293T). Jejich internalizace touto cestou je spuštěna charakteristickými virovými glykoproteiny (Nanbo a kol., 2010; Saeed a kol., 2010). Virus vyžaduje pro úspěšný vstup přítomnost cholesterolu v buněčné membráně, kolokalizuje společně s markery

kapalné fáze v pohlceném váčku a je inhibován amiloridem (EIPA) - tato kritéria by se dala požadovat za ta základní při charakterizaci makropinocytózy. Makropinocytóza při vstupu EBOV do epiteliálních buněk je však závislá na dynaminu (Mulherkar a kol., 2011) a tak se hodí ji nazvat spíše mechanismem podobným makropinocytóze (angl. macropinocytosis-like mechanism).

Novější studie Hu a kol. (2019) soustředící se na vymezení vstupu VLPs EBOV do polarizovaných epiteliálních Vero buněk ukázala, že probíhá apikální částí těchto buněk. Hlavní roli v tomto procesu hraje nerovnoměrné rozložení receptorů, ke kterým se virus váže. EBOV receptory - TIM-1 a Ax1 jsou totiž soustředěny hlavně na apikální části buněčného povrchu. Proces makropinocytózy sám o sobě ale není polarizovaný ani v polarizovaných buňkách a není proto příčinou polarizovaného vstupu EBOV. (Hu a kol., 2019)

Studie využívající pseudotypovaný VSV ukázaly, že EBOV může do buněk vstupovat CME (Aleksandrowicz a kol., 2011; Bhattacharyya a kol., 2010), popřípadě i endocytózou zprostředkovanou kaveolami (Empig a Goldsmith, 2002). Vzhledem k použitému experimentálnímu systému (pseudotypování) však může být relevance pro vlastní EBOV nižší. Věrohodnější experimenty využívající VLPs EBOV ukázaly, že virus vstupuje do buněk majoritně makropinocytózou (Nanbo a kol., 2010; Mulherkar a kol., 2011). Celková analýza studií naznačuje, že mechanismus vstupu indukovaného EBOV závisí částečně na buněčném typu a pro něj charakteristických receptorech (Hu a kol., 2019).

3.3 Herpesvirus

Herpesviry jsou obalené DNA viry s poměrně složitou strukturou. Součástí viru je kapsida s ikosahedrální symetrií o velikosti 125 nm, tegument a lipidový obal. Při infekci herpesviry může v buňkách dojít ke dvěma odlišným módům infekce, k infekci lytické (produktivní) a k latentní. Během latentní fáze nedochází na rozdíl od té lytické k uvolnění nových infekčních virionů. Volba módu závisí na infikovaném buněčném typu. (Převzato z Roizman a Pellet, 2013)

KSHV

Virus Kaposiho sarkomu (KSHV) může do buněk vstupovat jak přímou fúzí s cytoplasmatickou membránou, tak jinými endocytickými mechanismy. Virus infikuje širokou škálu lidských buněk. *In vivo* byla jeho přítomnost prokázána v B buňkách, makrofázích, keratinocytech, endoteliálních a epiteliálních buňkách (Whitby a kol., 1995). *In vitro* dokáže virus infikovat B buňky, endoteliální, epiteliální buňky, fibroblasty a stejně tak i některé typy buněk zvířat (Akula a kol., 2002; Naranatt a kol., 2003). Glykoproteiny KSHV interagují s povrchem buněk prostřednictvím HSPG (Akula a kol., 2001), což objasňuje rozmanitost

buněčných typů, které virus napadá. Mohou se vázat také k integrinům $\alpha3\beta1$. Exprese integrinů na povrchu CHO buněk (ovariální buňky křečička čínského) zvýšila infektivitu viru (Akula a kol., 2002). Aktivace pomocí intergrinů spustí jako jeden ze signálních faktorů fokální adhezivní kinázu (FAK; Akula a kol., 2002), která se může účastnit makropinocytózy při migraci buněk (Gu a kol., 2011).

Fibroblasty. KSHV využívá pro vstup do buněk klasickou endocytózu i makropinocytózu. Do lidských fibroblastů vstupuje endocytózou závislou na klatrinu (Akula a kol., 2003). Infekce u těchto buněk závisí na sníženém pH, přičemž byl pozorován aktivní únik viru z endosomu. Jedná se o infekci charakteristickou nepřetržitou expresí genů asociovaných s latentní fází.

Endoteliální buňky. Virus vstupuje do endoteliálních buněk HMVEC-d (lidské mikrovaskulární dermální endoteliální buňky) a HUVEC (lidské umbilikální žilní endoteliální buňky) makropinocytózou (Raghu a kol., 2009). Infekce těchto buněk je charakteristická nepřetržitou expresí genů asociovaných s latentní fází. Kontakt viru s buněčným povrchem indukuje polymerizaci aktinu a tvorbu lamelipodií či blebů - buněčných útvarů charakteristických pro makropinocytózu. Při indukci blebů participuje adaptorový protein c-Cbl. c-Cbl translokuje KSHV navázaný na $\alpha3\beta1$ a $\alphaV\beta3$ integriny do oblasti s lipidovými rafty, kde následně ubiquitinyluje tyrozinkinázový receptor EphrinA2 (EphA2; Veettil a kol., 2010) a interaguje s doménou myosinu IIA. Dysfunkce tohoto proteinu způsobí defekt ve formaci blebů (Veettil a kol., 2010). EphA2 spolu s CIB1 poté asociují s c-Cbl navázaným na myosin IIA a zesilují následující signalizaci zprostředkovanou FAK, Src a PI3 kinázou a Rho GTPázami v lipidových raftech (Bandyopadhyay a kol., 2014). Nejen že c-Cbl ubiquitinyluje receptor na povrchu buňky, ale zprostředkovává i jeho endocytózu a třídění z membrány do lysosomu (Levkowitz a kol., 1998). V savčích buňkách pomáhají s tříděním ubiquitinylovaných proteinů a jejich dopravou do lysosomů proteiny, které jsou součástí ESCRT (endosomální třídící komplex požadovaný pro transport). Svou roli hrají tyto proteiny i během dopravy a třídění makropinosomu. Tento proces je poměrně dobře prozkoumaný. Při makropinocytickém vstupu KSHV do HMVEC-d je důležitým členem Hrs (tyrozinkinázový substrát regulovaný jaterním růstovým faktorem), který je komponentou ESCRT-0. Ve studii Veettil a kol. (2016) se ukázalo, že Hrs rekrutuje ROCK1 k buněčné membráně, což zajišťuje fosforylaci NHE1 (Na^+/H^+ výměník 1). Změna pH je vyžadována pro efektivní makropinocytózu.

Internalizovaná virová membrána fúzuje s membránou makropinosomu, což způsobí uvolnění kapsidy do cytosolu a následný pohyb kapsidy do jádra buňky. Transport do oblasti jaderné periferie probíhá po mikrotubulech a závisí na dyneinu (Naranatt a kol., 2005).

Lze tedy shrnout, že makropinocytóza je hlavní cestou vstupu KSHV do lidských endoteliálních buněk, které jsou přirozeným cílem KSHV. Do fibroblastů ale virus vstupuje endocytózou závislou na klatrinu. Makropinocytózy zprostředkovávající infekci KSHV se účastní

mnoho faktorů, jejichž vazby i efekty v buňce jsou poměrně dobře prozkoumané.

Lidský cytomegalovirus

Lidský cytomegalovirus (HCMV) iniciuje infekci, stejně jako KSHV, nespecifickými nízkoavidními interakcemi s HSPG (Compton a kol., 1993). Tyto interakce jsou podstatné zejména při infekci fibroblastů. Po navázání k HSPG může virus aktivovat další signální molekuly, přičemž při makropinocytóze HCMV se uplatňuje DC-SIGN, integriny a RTKs - EGFR a PDGFR (Wang a kol., 2003; Cobbs a kol., 2007; Soroceanu a kol., 2008). Zvýšená exprese PDGFR v endoteliálních a epiteliálních buňkách zvyšuje úspěšnost infekce pomocí makropinocytózy, avšak při normálních hodnotách exprese tohoto receptoru se na zprostředkování vstupu viru makropinocytóza nepodílí (Vanarsdall a kol., 2012). Zvýšená exprese PDGFR tedy umožňuje vstup abnormální cestou, makropinocytózou, což zvyšuje účinnost infekce až o 90 % a rozšiřuje virový tropismus.

Dendritické buňky mohou plnit funkci Trojského koně a roznášet HCMV dále po těle i na místa, na která by se bez schopnosti migrace DC nedostal. Pomocí DC-SIGN se viry naváží na povrch těchto buněk, což je esenciální pro úspěšnou infekci (Halary a kol., 2002). Do dendritických buněk odvozených od monocytů se HCMV dostává pomocí cesty podobné makropinocytóze závislé na cholesterolu a nezávislé na kyselém pH. Tato cesta je identifikována pouze jako cesta podobná makropinocytóze, protože ji dokáží indukovat jen některé kmeny HCMV a to v určitých buněčných typech. Jinak však vykazuje charakteristiky typické pro makropinocytózu, doprovází ji membránový ruffling a tvorba makropinosomu. Z endosomální dráhy úspěšně uniká velká většina virových kapsid do cytosolu buňky (podobnosti s EBOV). Některé viry mohou být zachyceny v endosomech, které nepodléhají maturaci. Tyto viry jsou později uvolněny z endosomů do extracelulárního prostoru a mohou se dále šířit na cílové buňky. (Haspot a kol., 2012)

Fibroblasty. Výzkumy uskutečněné na vstupu HCMV do fibroblastů ukázaly, že virus vstupuje z větší části makropinocytózou a z menší části fúzuje s plasmatickou membránou (Hetzeneker a kol., 2016). Makropinocytóza, jež se zde uplatňuje, vyžaduje dynamin. To ji odlišuje od jiných případů makropinocytózy ve virové infekci a hodí se ji nazvat spíše mechanismem podobným makropinocytóze. Aktivace makropinocytózy ve fibroblastech závisí na signalizaci integriny a PDGFR, ale ne EGFR. Interakce viru a fibroblastů spustí tvorbu cirkulárních dorzálních ruffles, které byly poprvé pozorovány v experimentu Hetzeneker a kol. (2016).

Hematopoetické progenitorové buňky. Vstup HCMV do buněk, kde probíhá produktivní infekce je prostudován poměrně dobře, ale vstup do buněčných typů, kde virus přetrvává v latentním stavu, nikoli. Příkladem buněk charakteristických latencí HCMV jsou CD34⁺ hematopoetické progenitorové buňky. Vstup HCMV do této buněčné linie probíhá

také pomocí makropinocytózy. Inhibice makropinocytózy v těchto buňkách narušuje vstup viru a redukuje akumulaci transkriptů asociovaných s latencí HCMV. HCMV dokáže do buněk vstoupit, ale selhává při rozvolnění tegumentu, což vede k vyvinutí stavu latence. (Lee a Kalejta, 2019)

Makropinocytóza se zdá být pro virus výhodná. HCMV je schopen tuto cestu indukovat v širokém okruhu buněčných typů, což zvyšuje úspěšnost jeho infekčních schopností.

3.4 HIV

Infekce virem HIV (virus lidské imunitní nedostatečnosti) - obaleným, RNA lentivirem; způsobuje Syndrom získaného selhání imunity (AIDS). Velikost virionů se pohybuje v rozmezí od 100 do 120 nm (převzato z Freed a Martin, 2013). Vědci si dlouho mysleli, že prostá fúze s cytoplasmatickou membránou je jedinou možnou produktivní cestou, kterou virus HIV vstupuje do CD4+ buněk. Tuto myšlenku potvrzovalo například to, že infekce virem nezávisí na kyselém pH (McClure a kol., 1988). Viry vyžadující nízké pH, jako je např. virus chřipky, vstupují do buněk endocytózou. Později se však zjistilo, že přenos viru HIV z buňky do buňky může probíhat endocytózou a při internalizaci do několika buněčných typů byla pozorována makropinocytóza (Maréchal a kol., 2001; Liu a kol., 2002; Yassen a kol., 2018).

O receptorech a koreceptorech účastnících se makropinocytózy viru HIV toho není známo mnoho. Ve studii Tanaka a kol. (2012) bylo ukázáno, že stimulace chemokinového receptoru CXCR4 pomocí gp 120, obalového glykoproteinu viru HIV-1, indukuje makropinocytózu. Autoři však spekulují, že v tomto případě by se mohlo jednat o dráhu vedoucí k degradaci viru a tedy o možnost obrany před virovou infekcí. Makropinocytóza by takto snižovala množství viru, které je schopno vstoupit „klasickou“ cestou vedoucí k produktivní infekci.

Makrofágy. Krátce po vystavení HIV makrofágům byl virus pozorován na povrchu buňky v klatrinem obalených váčcích i ve velkých intracelulárních váčcích identifikovaných jako makropinosomy. Typ makropinocytózy účastníci se vstupu HIV do makrofágů je nespecifický, nevyžaduje tedy interakci viru a buněčného receptoru. Při infekci makrofágů funguje jako kofaktor PS, který je integrován ve vnějším listu membrány viru HIV (Callahan a kol., 2003; Aloia a kol., 1988). Asociace virové membrány s PS výrazně zvyšuje infektivitu i u jiných obalených virů (Ichihashi a Oie, 1983). S největší pravděpodobností zřejmě dochází po internalizaci HIV k jeho degradaci, ale možnost, že dojde při tomto procesu k fúzi membrán, úniku virionu a následné infekci, nelze vyloučit (Maréchal a kol., 2001).

Epiteliální buňky. HIV se internalizuje do epiteliálních buněk, které jsou první linií obrany proti šíření viru HIV, pomocí endocytózy a makropinocytózy. Po endocytóze dojde k zadržení viru v pohlčených endosomech, včetně multivesikulárních tělísek (MVB), kde virus vydrží i několik dní. Interakce aktivovaných lymfocytů s epiteliemi, v nichž je virus HIV zachycen, vede k šíření viru z epiteliálních buněk na lymfocyty. Inhibice tvorby MVB vede

ke snížení transmise o 60-70 %. (Yasen a kol., 2018)

Endoteliální buňky. Dále byla makropinocytóza potvrzena také u mozkových mikrovasculárních endoteliálních buněk (BMVEC; Liu a kol., 2002), které brání před neuroinvasí virem. Elektronová mikroskopie HIV-1 a BMVEC ukázala, že jsou na povrchu navázané viriony omotány buněčnými mikrovilli a následně internalizovány do velkých cytoplasmatických vakuol společně s markerem kapalné fáze (Liu a kol., 2002). Fúze virového obalu a buněčné membrány pozorována nebyla. Typ makropinocytózy, ke kterému dochází při vstupu HIV do BMVEC, závisel na přítomnosti lipidových raftů, MAPK (mitogenem aktivované proteinkinázové) signalizační dráze a glykosaminoglykanech, zatímco CD4 a chemokinové receptory hrály minimální roli. HIV, který vstoupil do BMVEC prostřednictvím makropinosomů byl po fúzi makropinosomu s lysosomy degradován.

Mód vstupu viru HIV do buněk je stále kontroverzním tématem. Makropinocytóza byla pozorována při internalizaci viru do makrofágů, epiteliálních a endoteliálních buněk. Častěji ale virus vstupuje cestou závislou na klatrinu, kaveolinu a cestou asociovanou s lipidovými rafty (Daecke a kol., 2005; Miyauchi a kol., 2009).

3.5 Koronavirus

Koronaviry (CoV) jsou rodinou obalených RNA virů, jejichž partikule mají sférický tvar a v průměru dosahují velikosti 120 nm (převzato z Masters a Perlman, 2013). Napadají savce a ptáky a jejich nebezpečí plyne hlavně z možné mezidruhové adaptace (Guan a kol., 2003). Životní cyklus CoV je zahájen navázáním virového spike glykoproteinu (glykoprotein S) k buněčnému receptoru, jenž je následován buď přímou fúzí s plasmatickou membránou nebo vstupem pomocí endocytózy. Glykoprotein S plní při buněčném vstupu duální roli, jelikož zprostředkovává jak navázání k receptoru, tak fúzi s plasmatickou membránou (Chan a kol., 2006). SARS-CoV (koronavirus způsobující těžký akutní respirační syndrom) požaduje pro úspěšný únik z endosomu stejně jako EBOV endolysosomy pozitivní na NPC1 (Mingo a kol., 2015). EBOV vyžaduje přímo molekulu NPC1, zatímco SARS-CoV využívá vyššího stupně proteolytické aktivity endolysosomů (Simmons a kol., 2005). S protein, exprimovaný MHV (virus myši hepatitidy) a SARS-CoV, může interagovat i s receptory přilehlých buněk, což vyústí ve fúzi těchto buněk a tvorbu syncytií (Luo a kol., 1999). Formace syncytií je v buněčné kultuře velmi dobře popsáný cytopatický efekt vedoucí k vyšší infektivitě (Yamada a kol., 2009).

Astrocyty. Při analýze infekce MHV (kmen MHV A59) u DBT buněk (angl. murine delayed brain tumor astrocytoma cells) se ukázalo, že virus dokáže indukovat makropinocytózu, která však není přímo asociována se vstupem viru. Je ale klasicky doprovázena membránovým rufflingem, internalizací velkého pleiomorfního váčku, zvýšeným příjmem tekutiny, závislostí na Rac1, Cdc24, Pak1 a citlivostí k EIPA inhibitoru. Atypické je na ní to, že k ní dochází až

4 hodiny po infekci. Virus pravděpodobně využívá tohoto procesu ke stimulaci kontaktů mezi buňkami, způsobuje jejich fúzi. Jako nástroj zprostředkovávající fúzi dvou sousedních buněk slouží dlouhá filopodia vytvořená po spuštění makropinocytózy. Tato filopodia vystavují na své špičce virový S protein, který pak může interagovat se sousední buňkou, fúzovat s ní a vytvořit tak buněčné syncytium. (Freeman a kol., 2014)

Jiný kmen MHV (MHV 2S) nestimuluje makropinocytózu ani fúzi dvou buněk, přesto ale způsobuje onemocnění *in vivo*. Makropinocytóza tak zřejmě není požadována pro patogenitu všech kmenů MHV. Typ onemocnění způsobené MHV 2S ale vykazuje jiný fenotyp než onemocnění způsobené MHV A59, kmenem schopným makropinocytovat a tvořit buněčná syncytia. Kmen MHV A59 má jiný tropismus než ostatní kmeny MHV (Kenyon a kol., 2015).

Na základě těchto pozorování, lze tedy shrnout, že makropinocytóza nemusí být jednostranným mechanismem sloužícím pouze jako viry využívaná vstupní brána vedoucí do buněk. Pozorovaný nárůst zformovaných dlouhých filopodií u infikovaných buněk potvrzuje roli makropinocytózy jako mechanismu pomocí kterého CoV komunikují s buňkami vzdálenými. K podobnému mechanismu dochází i při infekci viru vaccinie (viz podkapitola Virus vaccinie).

3.6 Reovirus

Čeleď *Reoviridae* je největší a velice diverzifikovanou skupinou neobalených RNA virů. Kapsida s ikosahedrální symetrií nabývá od 65 do 80 nm. Virus může napadat širokou škálu hostitelů, do nichž se řadí člověk i malí savci. (Převzato z Dermody a kol., 2013) Reovirus se váže na povrch nepolarizovaných buněk prostřednictvím nízkoafinních interakcí s kyselinou sialovou (Paul a kol., 1989). Studium onemocnění způsobené reoviry na myších pomohlo determinovat krok navázání viru jako ten klíčový při rozvoji onemocnění (Sharpe a Fields, 1985). V myších se reoviry sérotypu 1 (T1) šíří krví do CNS (centrální nervové soustavy) a replikují se zde v endymových buňkách. Na druhou stranu virus sérotypu 3 (T3) v CNS infikuje neurony. Tento odlišný buněčný tropismus je dán rozdílnou strukturou reovirového „attachment“ proteinu $\sigma 1$ (Weiner a kol., 1980). Vstup viru do myších fibroblastů je iniciován interakcí s JAM-A (spojovací adhezivní molekula A), následován aktivací $\beta 1$ integriny a zprostředkován CME (Maginnis a kol., 2006).

Nervové buňky. Neurotropní reoviry se rozšiřují skrz nervovou soustavu a napadají CNS. Tyto viry a nemoci jimi způsobené jsou známy již dlouhou dobu, ale mechanismus infekce nervových buněk byl objasněn teprve nedávno. Sialová kyselina i JAM-A jsou zodpovědné za vstup reoviru do nervových buněk myši (Antar a kol., 2009; Stencel-Baerenwald a kol., 2015). Ukázalo se, že reovirus vstupuje do nervových buněk odvozených od primárních kryších neuronů makropinocytózou (Aravamudhan a kol., 2020). Dosud nebyl objeven žádný jiný neurotropní virus vstupující do nervových buněk tímto mechanismem. Výsledky Arava-

mudhan a kol. (2020) dále ukázaly, že makropinocytóza umožňující vstup reoviru do krysích buněk vyžaduje Na^+/H^+ výměník, aktinovou dynamiku, aktivitu PI3 kinázy, dynamin, a RTK, což jsou faktory esenciální pro průběh makropinocytózy.

Reovirus tedy vstupuje do většiny buněčných linií CME (Maginnis a kol., 2006, 2008), avšak při vstupu do nervových buněk využívá makropinocytózu (Aravamudhan a kol., 2020).

3.7 Virus chřipky

Virus chřipky (IAV) je obalený, segmentovaný RNA virus z čeledi *Orthomyxoviridae*, jenž může infikovat ptáky a savce. IAV produkuje pleiomorfni viriony, které se liší jak tvarově, tak svou velikostí. Sférické partikule mají v průměru 100 nm, filamentární prodloužené partikule pak mohou dosahovat až 300 nm. Shaw a kol., 2013

IAV se navazuje k hostitelské buňce prostřednictvím hlavního povrchového proteinu, hemaglutininu (HA), který interaguje se zbytky kyseliny sialové. Zatím ale není známo, jak toto spojení ovlivňuje endocytický mechanismus, jenž následuje po navázání viru k buňce. V místě navázání viru byla pozorována *de novo* formace jamek obalených klatrinem (Rust a kol., 2004) a CME byla dlouho považována za jedinou možnou cestu vstupu IAV do buněk.

Epiteliální buňky. Studie De Vries a kol. (2011) potvrdila alternativní roli makropinocytózy při vstupu sférického IAV do HeLa buněk. Ke stimulaci makropinocytózy došlo až po přidání viru společně se sérem. Virus sám o sobě makropinocytózu neindukoval, avšak stále není vyloučena kointerakce séra a viru. Typ makropinocytózy využívané IAV se však odlišuje od ostatních typů makropinocytózy indukované virem. Zaprvé, nezávisí na dynaminu stejně jako makropinocytóza stimulovaná některými typy adenovirů. Zadruhé je sice průběh makropinocytózy závislý na aktivaci Pak1, ale není pozastavený inhibicí Rac1 či Cdc42, jak tomu je u většiny případů. Inhibice Rac1 a Cdc42 má naopak stimulační účinky, což je efekt specifický jen pro IAV. Buněčný ruffling se vyskytuje při tomto typu makropinocytózy, ale přesná morfologie membránových ruffles si zaslouží další studium. (De Vries a kol., 2011)

Filamentární virus chřipky využívá makropinocytózu dokonce jako hlavní cestu proniknutí do epiteliálních MDCK buněk (psí buňky ledvin; Rossman a kol., 2012). Filamentární viriony, které vniknou do buněk prostřednictvím makropinosomu, jsou posléze dopraveny do kyselých pozdních endosomálních kompartmentů. Nízké pH způsobí konformační změny M2 proteinu a dojde k fragmentaci filamentárního viru, který je dále schopen fúzovat s membránou endolysosomu. (Rossman a kol., 2012)

Při vstupu viru pomocí CME i makropinocytózy hraje důležitou roli intracelulární Ca^{2+} , jenž reguluje obě tyto dráhy prostřednictvím signalizační kaskády zahrnující RhoA, Rho-kinázu, fosfatidylinositol 4-fosfát 5-kinázu (PIP5K) a PLC (Fujioka a kol., 2013). V zájmu buňky by bylo udržet koncentraci Ca^{2+} na takové hladině, aby do ní nemohl IAV vstoupit.

Hlavní cestou vstupu sférického IAV je CME (Rust a kol., 2004), ale alternativně tento

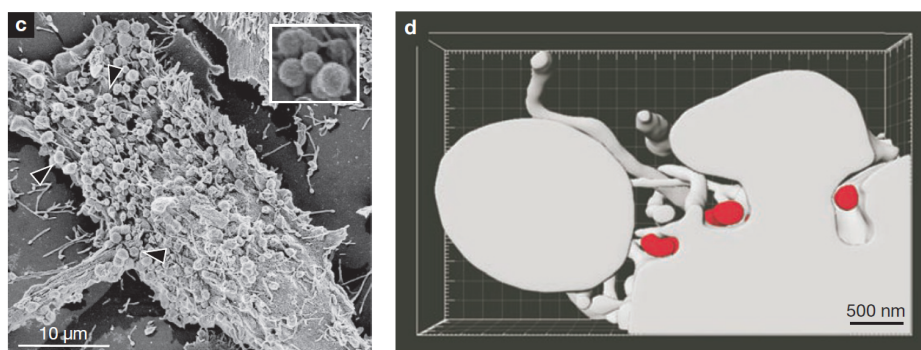
virus vstupuje i makropinocytickým mechanismem (De Vries a kol., 2011), který vykazuje některé abnormality. Filamentární IAV využívá makropinocytózu majoritně (Rossman a kol., 2012), což může být z důvodu jeho větší velikosti.

3.8 Virus vaccinie

Virus vaccinie (VACV), prototyp rodiny *Poxviridae*, je DNA virus, který se replikuje v cytoplasmě buněk. Od ostatních živočišných virů se poxviry liší hlavně svou velikostí a komplexitou. Viriony jsou 220-450 nm dlouhé a 140-260 nm široké. (Převzato z Moss, 2013)

Během replikace jsou produkovány dvě infekční formy viru. První formou je intracelulární zralý virus (IMV) a formou druhou je extracelulární obalený virus (EEV). IMV jsou uvolněny z buňky pouze po její lýzi a jejich navázání k buňce se odehrává na základě interakce s glykosaminoglykany na buněčném povrchu (Carter a kol., 2005). Už ve studii Cudmore a kol. (1995) byly na buňkách pozorovány výběžky indukované virem podobné těm, které dokáží indukovat některé intracelulární bakterie. Byly to výběžky později spojované s membránovým rufflingem charakteristickým pro makropinocytózu. S tímto pozorováním přišla i teorie, že VACV využívá buněčný aktinový cytoskelet k tomu, aby mohl infikovat buňky v okolí. Virus může přímo fúzovat s membránou buňky (Carter a kol., 2005), avšak tento vstup se jeví jako ne příliš efektivní oproti endocytickému vstupu probíhajícímu při sníženém pH (Townsend a kol., 2006).

Epiteliální buňky. Do HeLa buněk virus vstupuje makropinocytickým mechanismem závislým na nízkém pH (Mercer a Helenius, 2008; Huang a kol., 2008). V buňce indukuje formaci blebů a infekce tímto virem je striktně závislá na expozici fosfatidylserinu ve virové membráně (Mercer a Helenius, 2008). Za normálních podmínek slouží vystavený PS jako rozpoznávací signál pro internalizaci apoptotických tělísek prostřednictvím makropinocytózy (Hoffmann a kol., 2001). Buňky fagocytující apoptotická tělíska mohou být jak profesionální fagocyty - makrofágy, tak fagocyty neprofesionální - buňky epitelí (Wyllie a kol., 1980), endotelií (Hess a kol., 1997) a fibroblasty (Hall a kol., 1994). Virus tak prostřednictvím PS zakomponovaného v membráně mimikuje apoptotická tělíska, která jsou pohlcována buňkami za normálních okolností. Zdá se, že viry jakožto intracelulární oportunistický parazit využívají tohoto mechanismu internalizace. Napodobování apoptotických tělísek není fenomén charakteristický pouze pro virus vaccinie. Poprvé byl pozorován u viru hepatitidy B (Vanlandschoot a Leroux-Roels, 2003). Receptor, který je aktivován pomocí PS, zatím není znám. K inicializaci makropinocytózy v případě viru vaccinie je zapotřebí ještě EGFR (Mercer a kol., 2010), který může spustit průběh makropinocytózy. Po kontaktu viru s buňkami dojde také k fosforylaci kinázy Pak1, která je esenciální při probíhající makropinocytóze a její lokalizace koreluje s výskytem blebů (Mercer a Helenius, 2008). Jiný kmen VACV neindukuje v HeLa buňkách tvorbu blebů, ale tvorbu filopodií (Mercer a kol., 2010). Když byly zkoumány tyto



Obrázek 3.2: **Virem indukovaná makropinocytóza.** c) Přidání IMV (angl. intracellular mature virions) viru vaccinie k HeLa buňkám způsobí systematické tvoření blebů po celém povrchu buňky. d) Vstup virových partikulí byl vykreslen pomocí 3D skenovací elektronové mikroskopie. Převzato a upraveno z Mercer a Helenius (2009)

dvě signální cesty, objevily se rozdíly na úrovni Rho GTPáz. Pro vznik blebů byl klíčovým hráčem Rac1, pro tvorbu filopodií Cdc42.

Dendritické buňky. Do dendritických buněk odvozených od monocytů vstupují jak IMV, tak i EEV. Tyto viriony se ale neváží k lektinům na povrchu DC, které využívá většina ostatních virů. Vstup obou typů virionů je sensitivní vůči inhibitorům makropinocytózy a závislý na PI3 kináze. Viriony ale nejspíš nevstupují klasickou endosomální cestou, jelikož nedochází ke kolokalizaci s EEA1 ani s Lamp2 (membránový protein 2 asociovaný s lysosomy). Uvolnění viru do cytosolu nespolehá ani na nízké pH. Z těchto výsledků vychází, že virus vstupuje do DC prostřednictvím makropinocytózy. (Sandgren a kol., 2010)

Pro virus vaccinie lze tedy shrnout, že fúzuje s buněčnou membránou hned u povrchu buňky nebo indukuje membránový ruffling a vstupuje makropinocytózou. Virová částice je příliš velká na to, aby mohla být internalizována CME nebo endocytózou zprostředkovanou kaveolami, a tak využívá výhody plynoucí z makropinocytózy. Membránové ruffles indukované při makropinocytóze mohou přenést VACV do blízkosti okolních buněk a zajistit tak viru rychlejší přenos.

3.9 Ostatní viry

Jako hlavní cestu svého vstupu využívá makropinocytózu **Chikungunya virus**, který tímto mechanismem vstupuje do lidských svalových buněk (Hua a kol., 2019). Majoritně pomocí makropinocytózy vstupuje i **infektivní pankreatický nekrozní virus (IPNV)** a to do CHSE-214 buněk (buňky odvozené od embrya lososa *Oncorhynchus tshawytscha*) (Levican a kol., 2017). Tento typ makropinocytózy vykazuje veškeré charakteristiky makropinocytózy indukované růstovým faktorem.

To, že je makropinocytóza výhodná pro relativně velké viry, potvrzuje vedle viru vaccinie i **Bombyx mori nucleopolyhedrovirus (BmNPV)**; Huang a kol., 2014). U tohoto viru je

makropinocytóza a ostatní typy endocytóz jedinou možností, jak buňky produktivně infikovat. Zajímavé je, že přímá fúze viru s plasmatickou membránou, na rozdíl od viru vaccinie, infekci zamezí (Huang a kol., 2019).

Makropinocytóza je důležitá i při vstupu virů do nádorových buněk. Příkladem může být **virus spalniček** (MeV), který dokáže vstupovat makropinocytózou do buněk, které exprimují SLAM (signalizační molekula aktivující lymfocyty) a nebo PVRL4 (angl. poliovirus receptor-like 4). MeV vstupuje do Vero buněk nezávisle na Pak1 mechanismem podobným makropinocytóze a do několika linií nádorových buněk obdobným způsobem, který ale závisí na Pak1 i Rac1. Podrobnější poznání této cesty podobné makropinocytóze může přinést cenné poznatky pro vývoj onkolytické terapie. (Delpeut a kol., 2017)

Onkolytický virus Newcastleké nemoci (NDV), stejně jako většina ostatních virů z čeledi *Paramyxoviridae*, penetruje hned membránou buněk. Využívá ale i endocytózu zprostředkovanou kaveolami (Cantin a kol., 2007). Do kuřecích embryonálních fibroblastů dokáže vstoupit i CME a makropinocytózou (Tan a kol., 2016). NDV partikule jsou dopraveny do endosomálních struktur způsobem závislým na Rab5 a profitují ze snížení pH v časných endosomech ze kterých dokáží uniknout a buňky infikovat (Tan a kol., 2016).

Makropinocytóza byla pozorována i u dalších členů čeledi *Paramyxoviridae*. **Nipah virus** (NiV) může vstupovat do buněk makropinocytózou iniciovanou tyrozinkinázovým receptorem EphrinB2 (Pernet a kol., 2009). **Respirační syncytiální virus** (RSV) vstupuje do HeLa a A549 buněk makropinocytózou aktivovanou EGF receptorem, kterou doprovází tvorba blebů na buněčném povrchu (Krzyzaniak a kol., 2013).

Lassa virus (LASV), virus z čeledi *Arenaviridae*, stimuluje při vstupu do buněk různé typy receptorů. Při navázání viru na jeden z nich, distroglykan, se spustí v lidských epitelálních buňkách cesta podobná makropinocytóze, kterou ale doprovází pouze minimální membránový ruffling, jindy tak charakteristický pro makropinocytózu (Oppliger a kol., 2016).

4. Makropinocytóza při klastrování virů

Virové částice infikují buňky jako samostatné infekční jednotky (Flint a kol., 2015). Aby došlo ke ko-infekci buňky dvěma či více virovými genomy, musí do ní vstoupit několik virových částic nezávisle na sobě. Tato tvrzení platila do té doby, dokud analýza enterovirové infekce neukázala, že buňky mohou být ko-infikovány jak jednotlivými nezávislými viriony, tak i shluky virionů (Chen a kol., 2015). Tyto shluklé neboli klastrované viriony byly uzavřené v lipidových extracelulárních váčcích (EV) odvozených od hostitelské buňky.

Makropinocytóza se uplatňuje při internalizaci různých typů EV (Fitzner a kol., 2011; Escrevente a kol., 2011; Verdera a kol., 2017), avšak zatím nebylo doloženo, že by se přímo účastnila pohlcení EV s klastrovanými viry. V této kapitole jsou shrnuty dosud publikované poznatky ohledně makropinocytózy EV spolu se spekulacemi o její účasti při internalizaci klastrovaných virů. Dále je nastíněn význam přenosu klastrovaných virů a diskutovány evoluční důsledky tohoto fenoménu.

Viry si kromě strategie přenosu prostřednictvím EV vyvinuly i další varianty struktur podporujících virovou ko-transmisi, které lze souhrnně nazývat kolektivní infekční jednotky (angl. collective infectious units; Sanjuán, 2017). Dalšími příklady k EV, dokládající existenci kolektivních infekčních jednotek u živočišných virů, jsou virové kapsidy s polyploidními genomy, virionové agregáty a okluzní tělíska. U rostlinných buněk to pak mohou být struktury plasmodesmat pozměněné viry, jimiž jsou viry následně schopné proniknout do sousední buňky.

4.1 Makropinocytóza extracelulárních váčků

Extracelulární váčky jsou útvary odvozené od buněčných membrán, jejichž velikost se pohybuje od desítek do tisíců nanometrů. Uzavírají a transportují komplexní molekuly, jakými jsou proteiny, lipidy a nukleové kyseliny (Ratajczak a kol., 2006). V poslední době jsou hojně studovány, a to z důvodu své přirozené schopnosti internalizovat se do buňky. Tato schopnost je vhodná pro dopravu léčiv (Zhang a kol., 2019) a jak ukázala studie Chen a kol. (2015), využívají ji i viry.

Viriony se mohou vyskytovat v lipidových váčcích - exosomech a autofagosomech, či ve váčcích odvozených od plasmatické membrány. Ve studii Jackson a kol. (2005) byly složeny částice viru hepatitidy A (HAV) v buňce lokalizované v MVB a *in vitro* úbytek ESCRT proteinů, které jsou potřeba pro biogenezi exosomů, zablokoval uvolnění viru z buňky. Tato skutečnost poukazuje na využití exosomů při infekci HAV.

V EV, charakterizovaných jako autofagosomy, byla zaznamenána přítomnost polioviru, Cocksackieviru a rhinoviru (Jackson a kol., 2005; Robinson a kol., 2014; Chen a kol., 2015). Váčky s pohlceným poliovirem měly ve své vnější membráně zakomponovaný PS, bez něhož neprobíhala jejich internalizace ani infekce. Stejně tak byl k produktivní infekci potřeba i poliovirový receptor CD155 (Chen a kol., 2015). To vysvětluje zjištění, že membrána pohlceného EV je v endocytickém kompartmentu narušena (neznámým mechanismem; Yin a kol., 2016), uvolněné virové částice se posléze naváží k buněčnému receptoru a uniknou do cytosolu buněk (Chen a kol., 2015).

Rotaviry a noroviry, neobalené RNA viry způsobující gastrointestinální infekce, se mohou přenášet *in vivo* v lipidovém váčku odvozeném od plasmatické membrány, a to fekálně-orální cestou. Výsledky experimentů Santiana a kol. (2018) ukázaly, že volné částice rotaviru přenesené stolicí jsou méně infekční než odpovídající množství částic v EV. Jedním z důvodů by podle autorů studie mohla být větší náchylnost virových kapsid k proteázám, protilátkám (např. sekretorický IgA) a kyselinám nacházejícím se ve stolici a v GI traktu nového hostitele. Během fekálně-orálního přenosu tak neinfikují volně rozptýlené částice enterocyty v takovém počtu, aby byly překonány replikační bariéry (Chen a kol., 2015; Santiana a kol., 2018). Přenos prostřednictvím EV pak nemusí být výhodný pro viry, které mutují méně a mají nižší replikační bariéry než polioviry a rotaviry.

Membrána EV přenášejících poliovirus, rotavirus a norovirus obsahuje PS s invertovanou topologií (Chen a kol., 2015; Santiana a kol., 2018). PS nacházející se ve vnějším listu plasmatické membrány má protizánětlivý účinek (Fadok a kol., 2000) a také schopnost vázat antivirové cytokiny jako je interferon γ (Oyler-Yaniv a kol., 2017). Nejen že jsou viry přenesené v EV skryté před protilátkami, ale mohly by prostřednictvím PS ovlivnit i fungování imunitního systému tak, že potlačí zánětlivou odpověď. Úloha PS ko-trasportovaného s viry však vyžaduje podrobnější studium.

Endocytóza je hlavní cestou, kterou jsou EV pohlcovány buňkou. Váčky mohou být pohlceny CME (Escrevente a kol., 2011), makropinocytózou (Escrevente a kol., 2011) a fagocytózou (Feng a kol., 2010). Byly zaznamenány ale i případy, kdy došlo k přímé fúzi s cytoplasmatickou membránou (del Conde a kol., 2005; Parolini a kol., 2009). V jednom buněčném typu může docházet hned k několika endocytickým mechanismům (Escrevente a kol., 2011; Verdera a kol., 2017).

Infekce buněk klastrovanými viriony uzavřenými v EV vede k vyšší produkci virových částic polioviru, rotaviru a noroviru; než infekce ekvivalentním množstvím rozptýlených virionů (Chen a kol., 2015; Santiana a kol., 2018). Fenomén virů fungujících jako kolektivní infekční jednotky přenesených v EV je podle dosavadních studií výhodný pro viry s vyšší mutační rychlostí, jelikož při ko-infekci mnoha virovými genomy (vyšší MOI) může dojít ke vzájemným kooperacím genomů a k umlčení mutací. Viry schované v EV se vyhnou imunit-

nímu systému a mohou prostřednictvím PS vyvolat protizánětlivou odpověď. Klastry virů přenášené EV jsou vysoce virulentní jednotky, jejichž existence by neměla být podceňována při návrhu efektivních antivirotik.

Makropinocytóza nebyla dosud zaznamenána přímo v souvislosti s internalizací EV obalujících klastry virů. Je však známo, že se podílí na internalizaci váčků, jež mají ve vnějším membránovém listu zakomponovaný PS (Hoffmann a kol., 2001). PS se podílel na internalizaci EV nesoucích poliovirus a byl nezbytně nutný pro internalizaci těchto váčků do makrofágů (Chen a kol., 2015). Avšak význam makropinocytózy při tomto procesu vyžaduje další studium.

4.2 Evoluční důsledky klastrování virů

Na konci replikačního cyklu (zejména RNA virů, jejichž replikace je velmi chybová) jsou ve virovém potomstvu jen vzácně identické kopie. Takto variabilní, ale blízce příbuzné virové genomy se nazývají quasispecies (Santiana a kol., 2018). EV spojují osud virových genomů z původního kola replikace a mohou se jimi přenášet jak celé virové částice, tak i holé virové genomy. Při *in vitro* infekci velkým množstvím virových částic byl pozorován zvýšený stupeň rekombinace a větší genetická diverzita (Bordería a kol., 2015). Když do buňky vstoupí mnoho virových částic najednou, produkují velké množství virových proteinů a zvyšují pravděpodobnost kooperativních a komplementárních interakcí mezi sebou. Příkladem těchto interakcí je rekombinace napříč genomy, sdílení virové mašinerie pro translaci, RNA syntéza a složení virové částice (Altan-Bonnet, 2016). Při vyšší MOI se virus rychleji vyhne přirozeným imunitním obranám buňky (Gifford, 1963; Zaritsky a kol., 2015). V tomto procesu hrají roli různé typy antivirových cytokinů - inteferonů, které jsou produkovány v přítomnosti viru a podílí se na aktivování vrozené imunity. Když byly buňky infikovány velkým počtem virových částic, produkovaly méně typů inteferonů (Zaritsky a kol., 2015).

Lze tedy shrnout, že extracelulární váčky využívají viry, aby zvýšily svou MOI a virulenci. Seskupení vironů a jejich fungování jako kolektivních infekčních jednotek je z pohledu replikační kinetiky a genetické diverzity selektivně zvýhodněno. Důsledkem interakcí se zvyšuje replikační fitness viru.

Závěr

Makropinocytóza je jedním z procesů, prostřednictvím kterého buňky internalizují makromolekuly. Je nejlépe prostudovaná v souvislosti s prezentací antigenu u buněk imunitního systému. Pokročilé zobrazovací techniky pomáhají odhalit význam makropinocytózy i ve virové infekci. Ukazuje se, že makropinocytózu využívají viry převážně ke svému vstupu do buněk. Majoritně makropinocytózou vstupují viry, které svou velikostí přesahují velikost klasických endocytických váčků, což je např. virus Eboly, filamentární virus chřipky a virus vaccinie. Některé viry (virus myší hepatitidy a virus vaccinie) mohou využít prodlužujících se membránových ruffles k tomu, aby se rozšířily a infikovaly okolní buňky. Makropinocytóza tedy virům neslouží jen jako vstupní brána do buněk, ojediněle ji viry využívají i k jiným účelům.

V této práci byla shrnuta funkce virů jako iniciátorů makropinocytózy, které interagují s receptory, popř. i s koreceptory charakteristickými pro daný buněčný typ. Makropinocytóza stimulovaná viry je svou signalizací často podobná makropinocytóze stimulované růstovým faktorem. Mezi nejvýznamnější signální molekuly, které spolu tyto dvě dráhy sdílí, patří RTK, Rac a Cdc42, Ras, PI3 kináza a Na^+/H^+ výměník. Zahrnuté faktory ale mohou být variabilní. Např. sférické partikule viru chřipky vstupují cestou podobnou makropinocytóze, která není závislá ani na jedné z Rho GTPáz Rac a Cdc42 (De Vries a kol., 2011). Proces makropinocytózy se tedy může při virové infekci odlišovat v mnoha aspektech a není jednoduché ho definovat. Proto byla v této práci shrnuta i minimální sada buněčných faktorů potřebných pro identifikaci makropinocytózy.

Většina skupin virů, které do buněk makropinocytózou vstupují, dokáže makropinosom opustit a buňku produktivně infikovat. Může se však stát, že makropinosom splyne s lysosomem a obsah (včetně viru) je degradován, popř. pak prezentován na povrchu APC. Makropinocytóza může být tedy v závislosti na okolnostech proces výhodný buď pro virus, nebo pro buňku.

Makropinocytóza se může uplatňovat ve virové infekci i při vstupu extracelulárních váčků do cílových buněk. Tyto váčky mohou být spojeny s přenosem klastrovaných virů, které pak fungují jako tzv. kolektivních infekční jednotky. Tento fenomén zvyšuje virulenci některých virových skupin a je pro viry výhodný i z evolučního hlediska.

Ohledně mechanismu iniciace makropinocytózy a signálních molekul v ní zahrnutých zůstává mnoho nezodpovězených otázek. Zdá se, že existuje několik různých typů makropinocytózy a pokud skutečně ano, je třeba zjistit, jak se liší. Čím víc toho o makropinocytóze víme, tím více se zdá, že je ve virové infekci častější, než se dříve myslelo. Její studium přináší poznatky, které mohou být v budoucnu prospěšné jak v boji proti virovým infekcím, tak ve využití virů pro dopravu terapeutických látek do buněk.

Literatura

- AKULA, S. M., WANG, F.-Z., VIEIRA, J. a CHANDRAN, B. (2001). Human herpesvirus 8 interaction with target cells involves heparan sulfate. *Virology*, **282**(2), 245–255.
- AKULA, S. M., PRAMOD, N. P., WANG, F.-Z. a CHANDRAN, B. (2002). Integrin $\alpha 3\beta 1$ (CD 49c/29) is a cellular receptor for Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (KSHV/HHV-8) entry into the target cells. *Cell*, **108**(3), 407–419.
- AKULA, S. M., NARANATT, P. P., WALIA, N.-S., WANG, F.-Z., FEGLEY, B. a CHANDRAN, B. (2003). Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (human herpesvirus 8) infection of human fibroblast cells occurs through endocytosis. *Journal of virology*, **77**(14), 7978–7990.
- ALEKSANDROWICZ, P., MARZI, A., BIEDENKOPF, N., BEIMFORDE, N., BECKER, S., HOENEN, T., FELDMANN, H. a SCHNITTLER, H.-J. (2011). Ebola virus enters host cells by macropinocytosis and clathrin-mediated endocytosis. *The Journal of infectious diseases*, **204**(suppl_3), S957–S967.
- ALOIA, R. C., JENSEN, F. C., CURTAIN, C. C., MOBLEY, P. W. a GORDON, L. M. (1988). Lipid composition and fluidity of the human immunodeficiency virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **85**(3), 900–904.
- ALTAN-BONNET, N. (2016). Extracellular vesicles are the Trojan horses of viral infection. *Current opinion in microbiology*, **32**, 77–81.
- ALVAREZ, C. P., LASALA, F., CARRILLO, J., MUÑIZ, O., CORBÍ, A. L. a DELGADO, R. (2002). C-type lectins DC-SIGN and L-SIGN mediate cellular entry by Ebola virus in cis and in trans. *Journal of virology*, **76**(13), 6841–6844.
- AMSTUTZ, B., GASTALDELLI, M., KÄLIN, S., IMELLI, N., BOUCKE, K., WANDELER, E., MERCER, J., HEMMI, S. a GREBER, U. F. (2008). Subversion of CtBP1-controlled macropinocytosis by human adenovirus serotype 3. *The EMBO journal*, **27**(7), 956–969.
- AMYERE, M., PAYRASTRE, B., KRAUSE, U., SMISSEN, P. V. D., VEITHEN, A. a COURTOY, P. J. (2000). Constitutive macropinocytosis in oncogene-transformed fibroblasts depends on sequential permanent activation of phosphoinositide 3-kinase and phospholipase C. *Molecular biology of the cell*, **11**(10), 3453–3467.
- ANTAR, A. A., KONOPKA, J. L., CAMPBELL, J. A., HENRY, R. A., PERDIGOTO, A. L., CARTER, B. D., POZZI, A., ABEL, T. W. a DERMODY, T. S. (2009). Junctional adhesion molecule-A is required for hematogenous dissemination of reovirus. *Cell host & microbe*, **5**(1), 59–71.
- AOKI, K., BENKÖ, M., DAVISON, A. J., ECHAVARRIA, M., ERDMAN, D. D., HARRACH, B., KAJON, A. E., SCHNURR, D., WADELL, G., COMMUNITY, A. R. a KOL. (2011). Toward an integrated human adenovirus designation system that utilizes molecular and serological data and serves both clinical and fundamental virology. *Journal of virology*, **85**(11), 5703–5704.
- ARAKI, N., JOHNSON, M. T. a SWANSON, J. A. (1996). A role for phosphoinositide 3-kinase in the completion of macropinocytosis and phagocytosis by macrophages. *The Journal of cell biology*, **135**(5), 1249–1260.
- ARAKI, N., EGAMI, Y., WATANABE, Y. a HATAE, T. (2007). Phosphoinositide metabolism during membrane ruffling and macropinosome formation in EGF-stimulated A431 cells. *Experimental cell research*, **313**(7), 1496–1507.
- ARAVAMUDHAN, P., RAGHUNATHAN, K., KONOPKA-ANSTADT, J., PATHAK, A., SUTHERLAND, D. M., CARTER, B. D. a DERMODY, T. S. (2020). Reovirus uses macropinocytosis-mediated entry and fast axonal transport to infect neurons. *PLoS Pathogens*, **16**(2), e1008380.
- BANDYOPADHYAY, C., VALIYA-VEETIL, M., DUTTA, D., CHAKRABORTY, S. a CHANDRAN, B. (2014). CIB1 synergizes with EphrinA2 to regulate Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus macropinocytic entry in human microvascular dermal endothelial cells. *PLoS pathogens*, **10**(2).

- BASHKIROV, P. V., AKIMOV, S. A., EVSEEV, A. I., SCHMID, S. L., ZIMMERBERG, J. a FROLOV, V. A. (2008). Gtpase cycle of dynamin is coupled to membrane squeeze and release, leading to spontaneous fission. *Cell*, **135**(7), 1276–1286.
- *BERK, A. J. (2013). *Adenoviridae. Fields Virology*. In *Knipe a Howley (2013).
- BHATTACHARYYA, S., WARFIELD, K. L., RUTHEL, G., BAVARI, S., AMAN, M. J. a HOPE, T. J. (2010). Ebola virus uses clathrin-mediated endocytosis as an entry pathway. *Virology*, **401**(1), 18–28.
- BORDERÍA, A. V., ISAKOV, O., MORATORIO, G., HENNINGSSON, R., AGÜERA-GONZÁLEZ, S., ORGANTINI, L., GNÄDIG, N. F., BLANC, H., ALCOVER, A., HAFENSTEIN, S. A KOL. (2015). Group selection and contribution of minority variants during virus adaptation determines virus fitness and phenotype. *PLoS pathogens*, **11**(5).
- BRAY, M. a GEISBERT, T. W. (2005). Ebola virus: the role of macrophages and dendritic cells in the pathogenesis of Ebola hemorrhagic fever. *The international journal of biochemistry & cell biology*, **37**(8), 1560–1566.
- BRINDLEY, M. A., HUNT, C. L., KONDRATOWICZ, A. S., BOWMAN, J., SINN, P. L., MCCRAY JR, P. B., QUINN, K., WELLER, M. L., CHIORINI, J. A. a MAURY, W. (2011). Tyrosine kinase receptor Axl enhances entry of Zaire ebolavirus without direct interactions with the viral glycoprotein. *Virology*, **415**(2), 83–94.
- BRYANT, D. M., KERR, M. C., HAMMOND, L. A., JOSEPH, S. R., MOSTOV, K. E., TEASDALE, R. D. a STOW, J. L. (2007). EGF induces macropinocytosis and SNX1-modulated recycling of E-cadherin. *Journal of cell science*, **120**(10), 1818–1828.
- CALLAHAN, M. K., POPERNACK, P. M., TSUTSUI, S., TRUONG, L., SCHLEGEL, R. A. a HENDERSON, A. J. (2003). Phosphatidylserine on HIV envelope is a cofactor for infection of monocytic cells. *The Journal of Immunology*, **170**(9), 4840–4845.
- CANTIN, C., HOLGUERA, J., FERREIRA, L., VILLAR, E. a MUNOZ-BARROSO, I. (2007). Newcastle disease virus may enter cells by caveolae-mediated endocytosis. *Journal of general virology*, **88**(2), 559–569.
- CARETTE, J. E., RAABEN, M., WONG, A. C., HERBERT, A. S., OBERNOSTERER, G., MULHERKAR, N., KUEHNE, A. I., KRANZUSCH, P. J., GRIFFIN, A. M., RUTHEL, G. A KOL. (2011). Ebola virus entry requires the cholesterol transporter Niemann–Pick C1. *Nature*, **477**(7364), 340–343.
- CARTER, G. C., LAW, M., HOLLINSHEAD, M. a SMITH, G. L. (2005). Entry of the vaccinia virus intracellular mature virion and its interactions with glycosaminoglycans. *Journal of General Virology*, **86**(5), 1279–1290.
- CHAN, S. Y., EMPIG, C. J., WELTE, F. J., SPECK, R. F., SCHMALJOHN, A., KREISBERG, J. F. a GOLDSMITH, M. A. (2001). Folate receptor- α is a cofactor for cellular entry by Marburg and Ebola viruses. *Cell*, **106**(1), 117–126.
- CHAN, W.-E., CHUANG, C.-K., YEH, S.-H., CHANG, M.-S. a CHEN, S. S.-L. (2006). Functional characterization of heptad repeat 1 and 2 mutants of the spike protein of severe acute respiratory syndrome coronavirus. *Journal of virology*, **80**(7), 3225–3237.
- CHANDRAN, K., SULLIVAN, N. J., FELBOR, U., WHELAN, S. P. a CUNNINGHAM, J. M. (2005). Endosomal proteolysis of the Ebola virus glycoprotein is necessary for infection. *Science*, **308**(5728), 1643–1645.
- CHEN, Y.-H., DU, W., HAGEMELJER, M. C., TAKVORIAN, P. M., PAU, C., CALI, A., BRANTNER, C. A., STEMPINSKI, E. S., CONNELLY, P. S., MA, H.-C. A KOL. (2015). Phosphatidylserine vesicles enable efficient en bloc transmission of enteroviruses. *Cell*, **160**(4), 619–630.
- COBBS, C. S., SOROCEANU, L., DENHAM, S., ZHANG, W., BRITT, W. J., PIEPER, R. a KRAUS, M. H. (2007). Human cytomegalovirus induces cellular tyrosine kinase signaling and promotes glioma cell invasiveness. *Journal of neuro-oncology*, **85**(3), 271–280.

- COMMISSO, 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. A KOL. (2013). Macropinocytosis of protein is an amino acid supply route in Ras-transformed cells. *Nature*, **497**(7451), 633–637.
- COMPTON, T., NOWLIN, D. M. a COOPER, N. R. (1993). Initiation of human cytomegalovirus infection requires initial interaction with cell surface heparan sulfate. *Virology*, **193**(2), 834–841.
- CÔTÉ, M., MISASI, J., REN, T., BRUCHEZ, A., LEE, K., FILONE, C. M., HENSLEY, L., LI, Q., ORY, D., CHANDRAN, K. A KOL. (2011). Small molecule inhibitors reveal Niemann–Pick C1 is essential for Ebola virus infection. *Nature*, **477**(7364), 344–348.
- COUÉ, M., BRENNER, S. L., SPECTOR, I. a KORN, E. D. (1987). Inhibition of actin polymerization by latrunculin A. *FEBS letters*, **213**(2), 316–318.
- CRUZ, J. C., SUGII, S., YU, C. a CHANG, T.-Y. (2000). Role of Niemann-Pick type C1 protein in intracellular trafficking of low density lipoprotein-derived cholesterol. *Journal of Biological Chemistry*, **275**(6), 4013–4021.
- CUDMORE, S., COSSART, P., GRIFFITHS, G. a WAY, M. (1995). Actin-based motility of vaccinia virus. *Nature*, **378**(6557), 636–638.
- DAECKE, J., FACKLER, O. T., DITTMAR, M. T. a KRÄUSSLICH, H.-G. (2005). Involvement of clathrin-mediated endocytosis in human immunodeficiency virus type 1 entry. *Journal of virology*, **79**(3), 1581–1594.
- DAMKE, H., BABA, T., WARNOCK, D. E. a SCHMID, S. L. (1994). Induction of mutant dynamin specifically blocks endocytic coated vesicle formation. *The Journal of cell biology*, **127**(4), 915–934.
- DE VRIES, E., TSCHERNE, D. M., WIENHOLTS, M. J., COBOS-JIMENEZ, V., SCHOLTE, F., GARCIA-SASTRE, A., ROTTIER, P. J. a DE HAAN, C. A. (2011). Dissection of the influenza A virus endocytic routes reveals macropinocytosis as an alternative entry pathway. *PLoS pathogens*, **7**(3).
- DEACON, S. W., BEESER, A., FUKUI, J. A., RENNEFAHRT, U. E., MYERS, C., CHERNOFF, J. a PETERSON, J. R. (2008). An isoform-selective, small-molecule inhibitor targets the autoregulatory mechanism of p21-activated kinase. *Chemistry & biology*, **15**(4), 322–331.
- DEL CONDE, I., SHRIMPTON, C. N., THIAGARAJAN, P. a LÓPEZ, J. A. (2005). Tissue factor-bearing microvesicles arise from lipid rafts and fuse with activated platelets to initiate coagulation. *Blood*, **106**(5), 1604–1611.
- DELPEUT, S., SISSON, G., BLACK, K. M. a RICHARDSON, C. D. (2017). Measles virus enters breast and colon cancer cell lines through a PVRL4-mediated macropinocytosis pathway. *Journal of virology*, **91**(10), e02191–16.
- *DERMODY, T. S., PARKER, J. S. L. a SHERRY, B. (2013). *Fields virology, 6th ed.*, chapter Orthoreoviruses. In *Knipe a Howley (2013).
- EBERT, D. H., DEUSSING, J., PETERS, C. a DERMODY, T. S. (2002). Cathepsin L and cathepsin B mediate reovirus disassembly in murine fibroblast cells. *Journal of Biological Chemistry*, **277**(27), 24609–24617.
- EGAMI, Y. a ARAKI, N. (2009). Dynamic changes in the spatiotemporal localization of Rab21 in live RAW264 cells during macropinocytosis. *PLoS One*, **4**(8).
- EMPIG, C. J. a GOLDSMITH, M. A. (2002). Association of the caveola vesicular system with cellular entry by filoviruses. *Journal of Virology*, **76**(10), 5266–5270.
- ESCREVENTE, C., KELLER, S., ALTEVOGT, P. a COSTA, J. (2011). Interaction and uptake of exosomes by ovarian cancer cells. *BMC cancer*, **11**(1), 108.
- FADOK, V. A., BRATTON, D. L., ROSE, D. M., PEARSON, A., EZEKEWITZ, R. A. B. a HENSON, P. M. (2000). A receptor for phosphatidylserine-specific clearance of apoptotic cells. *Nature*, **405**(6782), 85–90.

- FELICIANO, W. D., YOSHIDA, S., STRAIGHT, S. W. a SWANSON, J. A. (2011). Coordination of the Rab5 cycle on macropinosomes. *Traffic*, **12**(12), 1911–1922.
- FENG, D., ZHAO, W.-L., YE, Y.-Y., BAI, X.-C., LIU, R.-Q., CHANG, L.-F., ZHOU, Q. a SUI, S.-F. (2010). Cellular internalization of exosomes occurs through phagocytosis. *Traffic*, **11**(5), 675–687.
- FITZNER, D., SCHNAARS, M., VAN ROSSUM, D., KRISHNAMOORTHY, G., DIBAJ, P., BAKHTI, M., REGEN, T., HANISCH, U.-K. a SIMONS, M. (2011). Selective transfer of exosomes from oligodendrocytes to microglia by macropinocytosis. *Journal of cell science*, **124**(3), 447–458.
- FLINT, S. J., RACANIELLO, V. R., RALL, G. F. a SKALKA, A. M. (2015). *Principles of virology*. John Wiley & Sons.
- FRANCIS, C. L., RYAN, T. A., JONES, B. D., SMITH, S. J. a FALKOW, S. (1993). Ruffles induced by Salmonella and other stimuli direct macropinocytosis of bacteria. *Nature*, **364**(6438), 639–642.
- *FREED, E. O. a MARTIN, M. A. (2013). *Human Immunodeficiency Viruses: Replication. Fields Virology*. In *Knipe a Howley (2013).
- FREEMAN, M. C., PEEK, C. T., BECKER, M. M., SMITH, E. C. a DENISON, M. R. (2014). Coronaviruses induce entry-independent, continuous macropinocytosis. *MBio*, **5**(4), e01340–14.
- FUJIOKA, Y., TSUDA, M., NANBO, A., HATTORI, T., SASAKI, J., SASAKI, T., MIYAZAKI, T. a OHBA, Y. (2013). A Ca²⁺-dependent signalling circuit regulates influenza A virus internalization and infection. *Nature communications*, **4**, 2763.
- GEIJTENBEEK, T. B., KROOSHOP, D. J., BLEIJS, D. A., VAN VLIET, S. J., VAN DUIJNHOFEN, G. C., GRABOVSKY, V., ALON, R., FIGDOR, C. G. a VAN KOOYK, Y. (2000a). DC-SIGN–ICAM-2 interaction mediates dendritic cell trafficking. *Nature immunology*, **1**(4), 353–357.
- GEIJTENBEEK, T. B., TORENSMA, R., VAN VLIET, S. J., VAN DUIJNHOFEN, G. C., ADEMA, G. J., VAN KOOYK, Y. a FIGDOR, C. G. (2000b). Identification of DC-SIGN, a novel dendritic cell-specific ICAM-3 receptor that supports primary immune responses. *Cell*, **100**(5), 575–585.
- GEISBERT, T. W., HENSLEY, L. E., GIBB, T. R., STEELE, K. E., JAAX, N. K. a JAHRLING, P. B. (2000). Apoptosis induced in vitro and in vivo during infection by Ebola and Marburg viruses. *Laboratory investigation*, **80**(2), 171–186.
- GEISBERT, T. W., HENSLEY, L. E., LARSEN, T., YOUNG, H. A., REED, D. S., GEISBERT, J. B., SCOTT, D. P., KAGAN, E., JAHRLING, P. B. a DAVIS, K. J. (2003). Pathogenesis of Ebola hemorrhagic fever in cynomolgus macaques: evidence that dendritic cells are early and sustained targets of infection. *The American journal of pathology*, **163**(6), 2347–2370.
- GHOSHAL, P., SINGLA, B., LIN, H., FECK, D. M., CANTU-MEDELLIN, N., KELLEY, E. E., HAIGH, S., FULTON, D. a CSÁNYI, G. (2017). Nox2-mediated PI3K and cofilin activation confers alternate redox control of macrophage pinocytosis. *Antioxidants & redox signaling*, **26**(16), 902–916.
- GIFFORD, G. (1963). Variation of interferon yield with multiplicity of infection. *Nature*, **200**(4901), 91–92.
- GREBER, U. F., WILLETTS, M., WEBSTER, P. a HELENIUS, A. (1993). Stepwise dismantling of adenovirus 2 during entry into cells. *Cell*, **75**(3), 477–486.
- GSCHWENDT, M., MULLER, H., KIELBASSA, K., ZANG, R., KITTSTEIN, W., RINCKE, G. a MARKS, F. (1994). Rottlerin, a novel protein kinase inhibitor. *Biochemical and biophysical research communications*, **199**(1), 93–98.
- GU, Z., NOSS, E. H., HSU, V. W. a BRENNER, M. B. (2011). Integrins traffic rapidly via circular dorsal ruffles and macropinocytosis during stimulated cell migration. *Journal of Cell Biology*, **193**(1), 61–70.

- GUAN, Y., ZHENG, B., HE, Y., LIU, X., ZHUANG, Z., CHEUNG, C., LUO, S., LI, P., ZHANG, L., GUAN, Y. A KOL. (2003). Isolation and characterization of viruses related to the SARS coronavirus from animals in southern China. *Science*, **302**(5643), 276–278.
- HAIGLER, H. T., MCKANNA, J. A. a COHEN, S. (1979). Rapid stimulation of pinocytosis in human carcinoma cells A-431 by epidermal growth factor. *The Journal of cell biology*, **83**(1), 82–90.
- HALARY, F., AMARA, A., LORTAT-JACOB, H., MESSERLE, M., DELAUNAY, T., HOULÈS, C., FIESCHI, F., ARENZANA-SEISDEDOS, F., MOREAU, J.-F. a DÉCHANET-MERVILLE, J. (2002). Human cytomegalovirus binding to DC-SIGN is required for dendritic cell infection and target cell trans-infection. *Immunity*, **17**(5), 653–664.
- HALFMANN, P., KIM, J. H., EBIHARA, H., NODA, T., NEUMANN, G., FELDMANN, H. a KAWAOKA, Y. (2008). Generation of biologically contained Ebola viruses. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **105**(4), 1129–1133.
- HALL, S. E., SAVILL, J. S., HENSON, P. M. a HASLETT, C. (1994). Apoptotic neutrophils are phagocytosed by fibroblasts with participation of the fibroblast vitronectin receptor and involvement of a mannose/fucose-specific lectin. *The Journal of Immunology*, **153**(7), 3218–3227.
- HAMASAKI, M., ARAKI, N. a HATAE, T. (2004). Association of early endosomal autoantigen 1 with macropinocytosis in EGF-stimulated A431 cells. *The Anatomical Record Part A: Discoveries in Molecular, Cellular, and Evolutionary Biology: An Official Publication of the American Association of Anatomists*, **277**(2), 298–306.
- HASPOT, F., LAVAULT, A., SINZGER, C., SAMPAIO, K. L., STIERHOF, Y.-D., PILET, P., BRESSOLETTE-BODIN, C. a HALARY, F. (2012). Human cytomegalovirus entry into dendritic cells occurs via a macropinocytosis-like pathway in a pH-independent and cholesterol-dependent manner. *PloS one*, **7**(4).
- HESS, K. L., TUDOR, K.-S. R., JOHNSON, J. D., OSATI-ASHTIANI, F., ASKEW, D. S. a COOK-MILLS, J. M. (1997). Human and murine high endothelial venule cells phagocytose apoptotic leukocytes. *Experimental cell research*, **236**(2), 404–411.
- HETZENECKER, S., HELENIUS, A. a KRZYZANIAK, M. A. (2016). HCMV induces macropinocytosis for host cell entry in fibroblasts. *Traffic*, **17**(4), 351–368.
- HEWLETT, L. J., PRESCOTT, A. R. a WATTS, C. (1994). The coated pit and macropinocytic pathways serve distinct endosome populations. *The Journal of cell biology*, **124**(5), 689–703.
- HOFFMANN, P. R., DECATHELINEAU, A. M., OGDEN, C. A., LEVERRIER, Y., BRATTON, D. L., DALEKE, D. L., RIDLEY, A. J., FADOK, V. A. a HENSON, P. M. (2001). Phosphatidylserine (PS) induces PS receptor-mediated macropinocytosis and promotes clearance of apoptotic cells. *The Journal of cell biology*, **155**(4), 649–660.
- HU, M., WANG, F., LI, W., ZHANG, X., ZHANG, Z., ZHANG, X.-E. a CUI, Z. (2019). Ebola Virus Uptake into Polarized Cells from the Apical Surface. *Viruses*, **11**(12), 1117.
- HUA, C., LEE, R., HUSSAIN, K. M. a CHU, J. J. H. (2019). Macropinocytosis dependent entry of Chikungunya virus into human muscle cells. *PLoS neglected tropical diseases*, **13**(8), e0007610.
- HUANG, C.-Y., LU, T.-Y., BAIR, C.-H., CHANG, Y.-S., JWO, J.-K. a CHANG, W. (2008). A novel cellular protein, VPEF, facilitates vaccinia virus penetration into HeLa cells through fluid phase endocytosis. *Journal of virology*, **82**(16), 7988–7999.
- HUANG, J., HAO, B., CHENG, C., LIANG, F., SHEN, X. a CHENG, X. (2014). Entry of Bombyx mori nucleopolyhedrovirus into BmN cells by cholesterol-dependent macropinocytic endocytosis. *Biochemical and biophysical research communications*, **453**(1), 166–171.
- HUANG, J., LI, C., TANG, X., LIU, L., NAN, W., SHEN, X. a HAO, B. (2019). Transport via macropinocytic vesicles is crucial for productive infection with bombyx mori nucleopolyhedrovirus. *Viruses*, **11**(7), 668.

- HUNT, C. L., KOLOKOLTSOV, A. A., DAVEY, R. A. a MAURY, W. (2011). The Tyro3 receptor kinase Axl enhances macropinocytosis of Zaire ebolavirus. *Journal of virology*, **85**(1), 334–347.
- ICHIHASHI, Y. a OIE, M. (1983). The activation of vaccinia virus infectivity by the transfer of phosphatidylserine from the plasma membrane. *Virology*, **130**(2), 306–317.
- JACKSON, W. T., GIDDINGS JR, T. H., TAYLOR, M. P., MULINYAWE, S., RABINOVITCH, M., KOPITO, R. R. a KIRKEGAARD, K. (2005). Subversion of cellular autophagosomal machinery by RNA viruses. *PLoS biology*, **3**(5).
- KÄLIN, S., AMSTUTZ, B., GASTALDELLI, M., WOLFRUM, N., BOUCKE, K., HAVENGA, M., DIGENNARO, F., LISKA, N., HEMMI, S. a GREBER, U. F. (2010). Macropinocytotic uptake and infection of human epithelial cells with species B2 adenovirus type 35. *Journal of virology*, **84**(10), 5336–5350.
- KENYON, L. C., BISWAS, K., SHINDLER, K. S., NABAR, M., STOUT, M., HINGLEY, S. T., GRINSPAN, J. B. a DAS SARMA, J. (2015). Gliopathy of demyelinating and non-demyelinating strains of mouse hepatitis virus. *Frontiers in cellular neuroscience*, **9**, 488.
- KERR, M. C., LINDSAY, M. R., LUETTERFORST, R., HAMILTON, N., SIMPSON, F., PARTON, R. G., GLEESON, P. A. a TEASDALE, R. D. (2006). Visualisation of macropinosome maturation by the recruitment of sorting nexins. *Journal of cell science*, **119**(19), 3967–3980.
- KERR, M. C., WANG, J. T., CASTRO, N. A., HAMILTON, N. A., TOWN, L., BROWN, D. L., MEUNIER, F. A., BROWN, N. F., STOW, J. L. a TEASDALE, R. D. (2010). Inhibition of the PtdIns (5) kinase PIKfyve disrupts intracellular replication of Salmonella. *The EMBO journal*, **29**(8), 1331–1347.
- *KNIPE, D. M. a HOWLEY, P., editors (2013). *Fields virology, 6th ed.* Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.
- KOHN, A. D., SUMMERS, S. A., BIRNBAUM, M. J. a ROTH, R. A. (1996). Expression of a constitutively active Akt Ser/Thr kinase in 3T3-L1 adipocytes stimulates glucose uptake and glucose transporter 4 translocation. *Journal of Biological Chemistry*, **271**(49), 31372–31378.
- KOIVUSALO, M., WELCH, C., HAYASHI, H., SCOTT, C. C., KIM, M., ALEXANDER, T., TOURET, N., HAHN, K. M. a GRINSTEIN, S. (2010). Amiloride inhibits macropinocytosis by lowering submembranous pH and preventing Rac1 and Cdc42 signaling. *Journal of Cell Biology*, **188**(4), 547–563.
- KRUTH, H. S., JONES, N. L., HUANG, W., ZHAO, B., ISHII, I., CHANG, J., COMBS, C. A., MALIDE, D. a ZHANG, W.-Y. (2005). Macropinocytosis is the endocytic pathway that mediates macrophage foam cell formation with native low density lipoprotein. *Journal of Biological Chemistry*, **280**(3), 2352–2360.
- KRZYZANIAK, M. A., ZUMSTEIN, M. T., GEREZ, J. A., PICOTTI, P. a HELENIUS, A. (2013). Host cell entry of respiratory syncytial virus involves macropinocytosis followed by proteolytic activation of the F protein. *PLoS pathogens*, **9**(4).
- LAKADAMYALI, M., RUST, M. J., BABCOCK, H. P. a ZHUANG, X. (2003). Visualizing infection of individual influenza viruses. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **100**(16), 9280–9285.
- LEE, J.-H. a KALEJTA, R. F. (2019). Human cytomegalovirus enters the primary CD34+ hematopoietic progenitor cells where it establishes latency by macropinocytosis. *Journal of virology*, **93**(15), e00452–19.
- LEVICAN, J., MIRANDA-CÁRDENAS, C., SOTO-RIFO, R., AGUAYO, F., GAGGERO, A. a LEÓN, O. (2017). Infectious pancreatic necrosis virus enters CHSE-214 cells via macropinocytosis. *Scientific reports*, **7**(1), 1–12.
- LEVKOWITZ, G., WATERMAN, H., ZAMIR, E., KAM, Z., OVED, S., LANGDON, W. Y., BEGUINOT, L., GEIGER, B. a YARDEN, Y. (1998). c-Cbl/Sli-1 regulates endocytic sorting and ubiquitination of the epidermal growth factor receptor. *Genes & development*, **12**(23), 3663–3674.

- LI, L., WAN, T., WAN, M., LIU, B., CHENG, R. a ZHANG, R. (2015). The effect of the size of fluorescent dextran on its endocytic pathway. *Cell biology international*, **39**(5), 531–539.
- LIBERALI, P., KAKKONEN, E., TURACCHIO, G., VALENTE, C., SPAAR, A., PERINETTI, G., BÖCKMANN, R. A., CORDA, D., COLANZI, A., MARJOMAKI, V. A KOL. (2008). The closure of Pak1-dependent macropinosomes requires the phosphorylation of CtBP1/BARS. *The EMBO journal*, **27**(7), 970–981.
- LIM, J. P., WANG, J. T., KERR, M. C., TEASDALE, R. D. a GLEESON, P. A. (2008). A role for SNX5 in the regulation of macropinocytosis. *BMC cell biology*, **9**(1), 58.
- LIN, H.-P., SINGLA, B., GHOSHAL, P., FAULKNER, J. L., CHERIAN-SHAW, M., O'CONNOR, P. M., SHE, J.-X., BELIN DE CHANTEMELE, E. J. a CSÁNYI, G. (2018). Identification of novel macropinocytosis inhibitors using a rational screen of Food and Drug Administration-approved drugs. *British journal of pharmacology*, **175**(18), 3640–3655.
- LINGER, R. M., KEATING, A. K., EARP, H. S. a GRAHAM, D. K. (2008). TAM receptor tyrosine kinases: biologic functions, signaling, and potential therapeutic targeting in human cancer. *Advances in cancer research*, **100**, 35–83.
- LIU, N. Q., LOSSINSKY, A. S., POPIK, W., LI, X., GUJULUVA, C., KRIEDERMAN, B., ROBERTS, J., PUSHKARSKY, T., BUKRINSKY, M., WITTE, M. A KOL. (2002). Human immunodeficiency virus type 1 enters brain microvascular endothelia by macropinocytosis dependent on lipid rafts and the mitogen-activated protein kinase signaling pathway. *Journal of virology*, **76**(13), 6689–6700.
- LIU, Y.-W., SURKA, M. C., SCHROETER, T., LUKIYANCHUK, V. a SCHMID, S. L. (2008). Isoform and splice-variant specific functions of dynamin-2 revealed by analysis of conditional knock-out cells. *Molecular biology of the cell*, **19**(12), 5347–5359.
- LUO, Z., MATTHEWS, A. M. a WEISS, S. R. (1999). Amino acid substitutions within the leucine zipper domain of the murine coronavirus spike protein cause defects in oligomerization and the ability to induce cell-to-cell fusion. *Journal of virology*, **73**(10), 8152–8159.
- MACIA, E., EHRLICH, M., MASSOL, R., BOUCROT, E., BRUNNER, C. a KIRCHHAUSEN, T. (2006). Dynasore, a cell-permeable inhibitor of dynamin. *Developmental cell*, **10**(6), 839–850.
- MAGINNIS, M. S., FORREST, J. C., KOPECKY-BROMBERG, S. A., DICKESON, S. K., SANTORO, S. A., ZUTTER, M. M., NEMEROW, G. R., BERGELSON, J. M. a DERMODY, T. S. (2006). β 1 integrin mediates internalization of mammalian reovirus. *Journal of virology*, **80**(6), 2760–2770.
- MAGINNIS, M. S., MAINOU, B. A., DERDOWSKI, A., JOHNSON, E. M., ZENT, R. a DERMODY, T. S. (2008). NPXY motifs in the β 1 integrin cytoplasmic tail are required for functional reovirus entry. *Journal of virology*, **82**(7), 3181–3191.
- MANIAK, M. (2001). Fluid-phase uptake and transit in axenic Dictyostelium cells. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, **1525**(3), 197–204.
- MANSER, E., LEUNG, T., SALIHUDDIN, H., ZHAO, Z.-s. a LIM, L. (1994). A brain serine/threonine protein kinase activated by Cdc42 and Rac1. *Nature*, **367**(6458), 40.
- MARÉCHAL, V., PREVOST, M.-C., PETIT, C., PERRET, E., HEARD, J.-M. a SCHWARTZ, O. (2001). Human immunodeficiency virus type 1 entry into macrophages mediated by macropinocytosis. *Journal of virology*, **75**(22), 11166–11177.
- MARZI, A., REINHECKEL, T. a FELDMANN, H. (2012). Cathepsin B & L are not required for ebola virus replication. *PLoS neglected tropical diseases*, **6**(12).
- *MASTERS, P. S. a PERLMAN, S. (2013). *Coronaviridae. Fields Virology*. In *Knipe a Howley (2013).
- MCCLURE, M. O., MARSH, M. a WEISS, R. A. (1988). Human immunodeficiency virus infection of CD4-bearing cells occurs by a pH-independent mechanism. *The EMBO journal*, **7**(2), 513–518.

- MEIER, O., BOUCKE, K., HAMMER, S. V., KELLER, S., STIDWILL, R. P., HEMMI, S. a GREBER, U. F. (2002). Adenovirus triggers macropinocytosis and endosomal leakage together with its clathrin-mediated uptake. *The Journal of cell biology*, **158**(6), 1119–1131.
- MERCER, J. a HELENIUS, A. (2008). Vaccinia virus uses macropinocytosis and apoptotic mimicry to enter host cells. *Science*, **320**(5875), 531–535.
- MERCER, J., KNÉBEL, S., SCHMIDT, F. I., CROUSE, J., BURKARD, C. a HELENIUS, A. (2010). Vaccinia virus strains use distinct forms of macropinocytosis for host-cell entry. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **107**(20), 9346–9351.
- *MERCER, J. a HELENIUS, A. (2009). Virus entry by macropinocytosis. *Nature cell biology*, **11**(5), 510.
- *MERCER, J. a HELENIUS, A. (2012). Gulping rather than sipping: macropinocytosis as a way of virus entry. *Current opinion in microbiology*, **15**(4), 490–499.
- *MERCER, J., SCHELHAAS, M. a HELENIUS, A. (2010). Virus entry by endocytosis. *Annual review of biochemistry*, **79**, 803–833.
- MINGO, R. M., SIMMONS, J. A., SHOEMAKER, C. J., NELSON, E. A., SCHORNBERG, K. L., D’SOUZA, R. S., CASANOVA, J. E. a WHITE, J. M. (2015). Ebola virus and severe acute respiratory syndrome coronavirus display late cell entry kinetics: evidence that transport to NPC1+ endolysosomes is a rate-defining step. *Journal of virology*, **89**(5), 2931–2943.
- MIYAUCHI, K., KIM, Y., LATINOVIC, O., MOROZOV, V. a MELIKYAN, G. B. (2009). HIV enters cells via endocytosis and dynamin-dependent fusion with endosomes. *Cell*, **137**(3), 433–444.
- MOLLER-TANK, S., KONDRATOWICZ, A. S., DAVEY, R. A., RENNERT, P. D. a MAURY, W. (2013). Role of the phosphatidylserine receptor TIM-1 in enveloped-virus entry. *Journal of virology*, **87**(15), 8327–8341.
- *MOSS, B. (2013). *Poxviridae. Fields Virology*. In *Knipe a Howley (2013).
- MULHERKAR, N., RAABEN, M., DE LA TORRE, J. C., WHELAN, S. P. a CHANDRAN, K. (2011). The Ebola virus glycoprotein mediates entry via a non-classical dynamin-dependent macropinocytic pathway. *Virology*, **419**(2), 72–83.
- NANBO, A., IMAI, M., WATANABE, S., NODA, T., TAKAHASHI, K., NEUMANN, G., HALFMANN, P. a KAWAOKA, Y. (2010). Ebolavirus is internalized into host cells via macropinocytosis in a viral glycoprotein-dependent manner. *PLoS pathogens*, **6**(9).
- NARANATT, P. P., AKULA, S. M., ZIEN, C. A., KRISHNAN, H. H. a CHANDRAN, B. (2003). Kaposi’s sarcoma-associated herpesvirus induces the phosphatidylinositol 3-kinase-PKC- ζ -MEK-ERK signaling pathway in target cells early during infection: implications for infectivity. *Journal of virology*, **77**(2), 1524–1539.
- NARANATT, P. P., KRISHNAN, H. H., SMITH, M. S. a CHANDRAN, B. (2005). Kaposi’s sarcoma-associated herpesvirus modulates microtubule dynamics via RhoA-GTP-diaphanous 2 signaling and utilizes the dynein motors to deliver its DNA to the nucleus. *Journal of virology*, **79**(2), 1191–1206.
- NOBES, C. a MARSH, M. (2000). Dendritic cells: new roles for Cdc42 and Rac in antigen uptake? *Current Biology*, **10**(20), R739–R741.
- NOIREY, N., ROUGIER, N., ANDRÉ, C., SCHMITT, D. a VINCENT, C. (2000). Langerhans-like dendritic cells generated from cord blood progenitors internalize pollen allergens by macropinocytosis, and part of the molecules are processed and can activate autologous naive T lymphocytes. *Journal of allergy and clinical immunology*, **105**(6), 1194–1201.
- OPPLIGER, J., TORRIANI, G., HERRADOR, A. a KUNZ, S. (2016). Lassa virus cell entry via dystroglycan involves an unusual pathway of macropinocytosis. *Journal of virology*, **90**(14), 6412–6429.

- ORTH, J. D. a MCNIVEN, M. A. (2006). Get off my back! Rapid receptor internalization through circular dorsal ruffles. *Cancer research*, **66**(23), 11094–11096.
- OYLER-YANIV, J., OYLER-YANIV, A., SHAKIBA, M., MIN, N. K., CHEN, Y.-H., CHENG, S.-Y., KRICHEVSKY, O., ALTAN-BONNET, N. a ALTAN-BONNET, G. (2017). Catch and release of cytokines mediated by tumor phosphatidylserine converts transient exposure into long-lived inflammation. *Molecular cell*, **66**(5), 635–647.
- PAROLINI, I., FEDERICI, C., RAGGI, C., LUGINI, L., PALLESCHI, S., DE MILITO, A., COSCIA, C., IESSI, E., LOGOZZI, M., MOLINARI, A. a KOL. (2009). Microenvironmental pH is a key factor for exosome traffic in tumor cells. *Journal of Biological Chemistry*, **284**(49), 34211–34222.
- PARRINI, M., MATSUDA, M. a DE GUNZBURG, J. (2005). Spatiotemporal regulation of the pak1 kinase. *Biochemical Society Transactions*, **33**(4), 646–648.
- PATKI, V., VIRBASIOUS, J., LANE, W. S., TOH, B.-H., SHPETNER, H. S. a CORVERA, S. (1997). Identification of an early endosomal protein regulated by phosphatidylinositol 3-kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **94**(14), 7326–7330.
- PAUL, R. W., CHOI, A. H. a LEE, P. W. (1989). The α -anomeric form of sialic acid is the minimal receptor determinant recognized by reovirus. *Virology*, **172**(1), 382–385.
- PERNET, O., POHL, C., AINOUBE, M., KWEDER, H. a BUCKLAND, R. (2009). Nipah virus entry can occur by macropinocytosis. *Virology*, **395**(2), 298–311.
- PONTING, C. P. (1996). Novel domains in NADPH oxidase subunits, sorting nexins, and PtdIns 3-kinases: binding partners of SH3 domains? *Protein Science*, **5**(11), 2353–2357.
- POTERYAEV, D., DATTA, S., ACKEMA, K., ZERIAL, M. a SPANG, A. (2010). Identification of the switch in early-to-late endosome transition. *cell*, **141**(3), 497–508.
- RACOOSIN, E. L. a SWANSON, J. A. (1993). Macropinosome maturation and fusion with tubular lysosomes in macrophages. *The Journal of cell biology*, **121**(5), 1011–1020.
- RAGHU, H., SHARMA-WALIA, N., VEETIL, M. V., SADAGOPAN, S. a CHANDRAN, B. (2009). Kaposi’s sarcoma-associated herpesvirus utilizes an actin polymerization-dependent macropinocytic pathway to enter human dermal microvascular endothelial and human umbilical vein endothelial cells. *Journal of virology*, **83**(10), 4895–4911.
- RATAJCZAK, J., MIEKUS, K., KUCIA, M., ZHANG, J., RECA, R., DVORAK, P. a RATAJCZAK, M. (2006). Embryonic stem cell-derived microvesicles reprogram hematopoietic progenitors: evidence for horizontal transfer of mRNA and protein delivery. *Leukemia*, **20**(5), 847–856.
- RIDLEY, A. J., PATERSON, H. F., JOHNSTON, C. L., DIEKMANN, D. a HALL, A. (1992). The small GTP-binding protein rac regulates growth factor-induced membrane ruffling. *Cell*, **70**(3), 401–410.
- ROBINSON, S. M., TSUENG, G., SIN, J., MANGALE, V., RAHAWI, S., MCINTYRE, L. L., WILLIAMS, W., KHA, N., CRUZ, C., HANCOCK, B. M. a KOL. (2014). Coxsackievirus B exits the host cell in shed microvesicles displaying autophagosomal markers. *PLoS pathogens*, **10**(4).
- ROELVINK, P. W., LIZONOVA, A., LEE, J. G., LI, Y., BERGELSON, J. M., FINBERG, R. W., BROUGH, D. E., KOVESDI, I. a WICKHAM, T. J. (1998). The coxsackievirus-adenovirus receptor protein can function as a cellular attachment protein for adenovirus serotypes from subgroups A, C, D, E, and F. *Journal of virology*, **72**(10), 7909–7915.
- *ROIZMAN, B. a PELLET, P. (2013). *The family herpesviridae: a brief introduction*. In *Knipe a Howley (2013).
- ROSSMAN, J. S., LESER, G. P. a LAMB, R. A. (2012). Filamentous influenza virus enters cells via macropinocytosis. *Journal of virology*, **86**(20), 10950–10960.
- RUST, M. J., LAKADAMYALI, M., ZHANG, F. a ZHUANG, X. (2004). Assembly of endocytic machinery around individual influenza viruses during viral entry. *Nature structural & molecular biology*, **11**(6), 567–573.

- RYABCHIKOVA, E. I., KOLESNIKOVA, L. V. a LUCHKO, S. V. (1999). An analysis of features of pathogenesis in two animal models of Ebola virus infection. *The Journal of infectious diseases*, **179** (Supplement_1), S199–S202.
- SAEED, M. F., KOLOKOLTSOV, A. A., ALBRECHT, T. a DAVEY, R. A. (2010). Cellular entry of ebola virus involves uptake by a macropinocytosis-like mechanism and subsequent trafficking through early and late endosomes. *PLoS pathogens*, **6**(9).
- SAMPATH, P. a POLLARD, T. D. (1991). Effects of cytochalasin, phalloidin and pH on the elongation of actin filaments. *Biochemistry*, **30**(7), 1973–1980.
- *SANCHEZ, A., GEISBERT, T. a FELDMANN, H. (2013). *Filoviridae: Marburg and Ebola viruses. Fields Virology*. In *Knipe a Howley (2013).
- SANDGREN, K. J., WILKINSON, J., MIRANDA-SAKSENA, M., MCINERNEY, G. M., BYTH-WILSON, K., ROBINSON, P. J. a CUNNINGHAM, A. L. (2010). A differential role for macropinocytosis in mediating entry of the two forms of vaccinia virus into dendritic cells. *PLoS pathogens*, **6**(4).
- SANJUÁN, R. (2017). Collective infectious units in viruses. *Trends in microbiology*, **25**(5), 402–412.
- SANTIANA, M., GHOSH, S., HO, B. A., RAJASEKARAN, V., DU, W.-L., MUTSAFI, Y., DE JÉSUS-DIAZ, D. A., SOSNOVTSEV, S. V., LEVENSON, E. A., PARRA, G. I. a KOL. (2018). Vesicle-cloaked virus clusters are optimal units for inter-organismal viral transmission. *Cell host & microbe*, **24**(2), 208–220.
- SARKAR, K., KRULAK, M. J., ERLANDSEN, S. L. a SHAW, S. (2005). Selective inhibition by rottlerin of macropinocytosis in monocyte-derived dendritic cells. *Immunology*, **116**(4), 513–524.
- SCHLUNCK, G., DAMKE, H., KIOSSES, W. B., RUSK, N., SYMONS, M. H., WATERMAN-STORER, C. M., SCHMID, S. L. a SCHWARTZ, M. A. (2004). Modulation of Rac localization and function by dynamin. *Molecular biology of the cell*, **15**(1), 256–267.
- SCHNATWINKEL, C., CHRISTOFORIDIS, S., LINDSAY, M. R., UTTENWEILER-JOSEPH, S., WILM, M., PARTON, R. G. a ZERIAL, M. (2004). The Rab5 effector Rabankyrin-5 regulates and coordinates different endocytic mechanisms. *PLoS biology*, **2**(9), e261.
- SCHORNBERG, K., MATSUYAMA, S., KABSCH, K., DELOS, S., BOUTON, A. a WHITE, J. (2006). Role of endosomal cathepsins in entry mediated by the Ebola virus glycoprotein. *Journal of virology*, **80**(8), 4174–4178.
- SHAKOR, A. B. A., ATIA, M. M., KWIATKOWSKA, K. a SOBOTA, A. (2012). Cell surface ceramide controls translocation of transferrin receptor to clathrin-coated pits. *Cellular signalling*, **24**(3), 677–684.
- SHARPE, A. H. a FIELDS, B. N. (1985). Pathogenesis of viral infections: basic concepts derived from the reovirus model. *New England Journal of Medicine*, **312**(8), 486–497.
- *SHAW, M., PALESE, P. a KOL. (2013). *Orthomyxoviridae. Fields Virology*. In *Knipe a Howley (2013).
- SHTANKO, O., REYES, A. N., JACKSON, W. T. a DAVEY, R. A. (2018). Autophagy-Associated Proteins Control Ebola Virus Internalization Into Host Cells. *The Journal of infectious diseases*, **218**(suppl_5), S346–S354.
- SIMMONS, G., GOSALIA, D. N., RENNEKAMP, A. J., REEVES, J. D., DIAMOND, S. L. a BATES, P. (2005). Inhibitors of cathepsin L prevent severe acute respiratory syndrome coronavirus entry. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **102**(33), 11876–11881.
- SOROCEANU, L., AKHAVAN, A. a COBBS, C. S. (2008). Platelet-derived growth factor- α receptor activation is required for human cytomegalovirus infection. *Nature*, **455**(7211), 391–395.
- STEINMAN, R. M. a COHN, Z. A. (1972). The interaction of soluble horseradish peroxidase with mouse peritoneal macrophages in vitro. *The Journal of cell biology*, **55**(1), 186–204.

- STENCEL-BAERENWALD, J., REISS, K., BLAUM, B. S., COLVIN, D., LI, X.-N., ABEL, T., BOYD, K., STEHLE, T. a DERMODY, T. S. (2015). Glycan engagement dictates hydrocephalus induction by serotype 1 reovirus. *MBio*, **6**(2), e02356–14.
- STOCKINGER, W., ZHANG, S. C., TRIVEDI, V., JARZYLO, L. A., SHIEH, E. C., LANE, W. S., CASTORENO, A. B. a NOHTURFFT, A. (2005). Differential Requirements for Actin Polymerization, Calmodulin, and Ca²⁺ Define Distinct Stages of Lysosome/Phagosome Targeting. *Immunity*, **37**(1).
- SUN, P., YAMAMOTO, H., SUETSUGU, S., MIKI, H., TAKENAWA, T. a ENDO, T. (2003). Small GTPase Rac/Rab34 is associated with membrane ruffles and macropinosomes and promotes macropinosome formation. *Journal of Biological Chemistry*, **278**(6), 4063–4071.
- TAKADA, A., WATANABE, S., ITO, H., OKAZAKI, K., KIDA, H. a KAWAOKA, Y. (2000). Downregulation of β 1 integrins by Ebola virus glycoprotein: implication for virus entry. *Virology*, **278**(1), 20–26.
- TAN, L., ZHANG, Y., ZHAN, Y., YUAN, Y., SUN, Y., QIU, X., MENG, C., SONG, C., LIAO, Y. a DING, C. (2016). Newcastle disease virus employs macropinocytosis and Rab5a-dependent intracellular trafficking to infect DF-1 cells. *Oncotarget*, **7**(52), 86117.
- TANAKA, G., NAKASE, I., FUKUDA, Y., MASUDA, R., OISHI, S., SHIMURA, K., KAWAGUCHI, Y., TAKATANI-NAKASE, T., LANGEL, Ü., GRÄSLUND, A. a KOL. (2012). CXCR4 stimulates macropinocytosis: implications for cellular uptake of arginine-rich cell-penetrating peptides and HIV. *Chemistry & biology*, **19**(11), 1437–1446.
- TEASDALE, R. D., LOCI, D., HOUGHTON, F., KARLSSON, L. a GLEESON, P. A. (2001). A large family of endosome-localized proteins related to sorting nexin 1. *Biochemical Journal*, **358**(1), 7–16.
- TOWNSLEY, A. C., WEISBERG, A. S., WAGENAAR, T. R. a MOSS, B. (2006). Vaccinia virus entry into cells via a low-ph-dependent endosomal pathway. *Journal of virology*, **80**(18), 8899–8908.
- VANARSDALL, A. L., WISNER, T. W., LEI, H., KAZLAUSKAS, A. a JOHNSON, D. C. (2012). PDGF receptor- α does not promote HCMV entry into epithelial and endothelial cells but increased quantities stimulate entry by an abnormal pathway. *PLoS pathogens*, **8**(9).
- VANLANDSCHOOT, P. a LEROUX-ROELS, G. (2003). Viral apoptotic mimicry: an immune evasion strategy developed by the hepatitis B virus? *Trends in immunology*, **24**(3), 144–147.
- VEETIL, M. V., SADAGOPAN, S., KERUR, N., CHAKRABORTY, S. a CHANDRAN, B. (2010). Interaction of c-Cbl with myosin IIA regulates Bleb associated macropinocytosis of Kaposi’s sarcoma-associated herpesvirus. *PLoS Pathog*, **6**(12), e1001238.
- VEETIL, M. V., KUMAR, B., ANSARI, M. A., DUTTA, D., IQBAL, J., GJYSHI, O., BOTTERO, V. a CHANDRAN, B. (2016). ESCRT-0 component Hrs promotes macropinocytosis of Kaposi’s sarcoma-associated herpesvirus in human dermal microvascular endothelial cells. *Journal of virology*, **90**(8), 3860–3872.
- VERDERA, H. C., GITZ-FRANCOIS, J. J., SCHIFFELERS, R. M. a VADER, P. (2017). Cellular uptake of extracellular vesicles is mediated by clathrin-independent endocytosis and macropinocytosis. *Journal of Controlled Release*, **266**, 100–108.
- VOGELS, R., ZUIJDEEST, D., VAN RIJNSOEVER, R., HARTKOORN, E., DAMEN, I., DE BÉTHUNE, M.-P., KOSTENSE, S., PENDERS, G., HELMUS, N., KOUDESTAAL, W. a KOL. (2003). Replication-deficient human adenovirus type 35 vectors for gene transfer and vaccination: efficient human cell infection and bypass of preexisting adenovirus immunity. *Journal of virology*, **77**(15), 8263–8271.
- WANG, J. T., KERR, M. C., KARUNARATNE, S., JEANES, A., YAP, A. S. a TEASDALE, R. D. (2010). The SNX-PX-BAR family in macropinocytosis: the regulation of macropinosome formation by SNX-PX-BAR proteins. *PloS one*, **5**(10).

- WANG, J. T., TEASDALE, R. D. a LIEBL, D. (2014). Macropinosome quantitation assay. *MethodsX*, **1**, 36–41.
- WANG, K., HUANG, S., KAPOOR-MUNSHI, A. a NEMEROW, G. (1998). Adenovirus internalization and infection require dynamin. *Journal of virology*, **72**(4), 3455–3458.
- WANG, X., HUONG, S.-M., CHIU, M. L., RAAB-TRAUB, N. a HUANG, E.-S. (2003). Epidermal growth factor receptor is a cellular receptor for human cytomegalovirus. *Nature*, **424**(6947), 456–461.
- WEINER, H. L., POWERS, M. L. a FIELDS, B. N. (1980). Absolute linkage of virulence and central nervous system cell tropism of reoviruses to viral hemagglutinin. *Journal of infectious diseases*, **141** (5), 609–616.
- WEST, M. A., BRETSCHER, M. S. a WATTS, C. (1989). Distinct endocytotic pathways in epidermal growth factor-stimulated human carcinoma A431 cells. *The Journal of cell biology*, **109**(6), 2731–2739.
- WHITBY, D., BOSHOFF, C., HATZIOANNOU, T., WEISS, R. A., SCHULZ, T. F., HOWARD, M. R., BRINK, N., TEDDER, R., TENANT-FLOWERS, M., COPAS, A. A KOL. (1995). Detection of Kaposi sarcoma associated herpesvirus in peripheral blood of HIV-infected individuals and progression to Kaposi's sarcoma. *The lancet*, **346**(8978), 799–802.
- WICKHAM, T. J., MATHIAS, P., CHERESH, D. A. a NEMEROW, G. R. (1993). Integrins $\alpha\beta3$ and $\alpha\beta5$ promote adenovirus internalization but not virus attachment. *Cell*, **73**(2), 309–319.
- WU, Y., TIBREWAL, N. a BIRGE, R. B. (2006). Phosphatidylserine recognition by phagocytes: a view to a kill. *Trends in cell biology*, **16**(4), 189–197.
- WYLLIE, A., KERR, J. R. a CURRIE, A. (1980). Cell death: the significance of apoptosis. In *International review of cytology*, volume 68, pages 251–306. Elsevier.
- YAMADA, Y., LIU, X. B., FANG, S. G., TAY, F. P. a LIU, D. X. (2009). Acquisition of cell–cell fusion activity by amino acid substitutions in spike protein determines the infectivity of a coronavirus in cultured cells. *PloS one*, **4**(7).
- YASEN, A., HERRERA, R., ROSBE, K., LIEN, K. a TUGIZOV, S. M. (2018). HIV internalization into oral and genital epithelial cells by endocytosis and macropinocytosis leads to viral sequestration in the vesicles. *Virology*, **515**, 92–107.
- YIN, X., AMBARDEKAR, C., LU, Y. a FENG, Z. (2016). Distinct entry mechanisms for nonenveloped and quasi-enveloped hepatitis e viruses. *Journal of virology*, **90**(8), 4232–4242.
- ZAKI, S. R., SHIEH, W.-J., GREER, P. W., GOLDSMITH, C. S., FEREBEE, T., KATSHITSHI, J., TSHIOKO, F. K., BWAKA, M. A., SWANEPOEL, R., CALAIN, P. A KOL. (1999). A novel immunohistochemical assay for the detection of Ebola virus in skin: implications for diagnosis, spread, and surveillance of Ebola hemorrhagic fever. *The Journal of infectious diseases*, **179**(Supplement_1), S36–S47.
- ZARITSKY, L. A., BEDSAUL, J. R. a ZOON, K. C. (2015). Virus multiplicity of infection affects type i interferon subtype induction profiles and interferon-stimulated genes. *Journal of virology*, **89**(22), 11534–11548.
- ZHANG, M., ZHU, Q., SHI, M., LIU, Y., MA, L., YANG, Y., FENG, D., DAI, W., ZHANG, L., KANG, T. A KOL. (2015). Active phagocytosis of Mycobacterium tuberculosis (H37Ra) by T lymphocytes (Jurkat cells). *Molecular immunology*, **66**(2), 429–438.
- ZHANG, X., GOEL, V. a ROBBIE, G. J. (2019). Pharmacokinetics of Patisiran, the First Approved RNA Interference Therapy in Patients With Hereditary Transthyretin-Mediated Amyloidosis. *The Journal of Clinical Pharmacology*.