

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA UNIVERZITY KARLOVY V PRAZE

KATEDRA GENETIKY A MIKROBIOLOGIE



BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

**Role buněčného aktinu ve virové infekci
polyomaviry**

(Role of host actin cytoskeleton in entry of polyomaviruses)

Milan Lokvenc

Školitel: RNDr. Alena Morávková, Ph.D.

2008 / 2009

Poděkování

Na tomto místě, děkuji vedoucí mé bakalářské práce, RNDr. Aleně Morávkové PhD., za pomoc při shromažďování odborné literatury a poskytnuté rady při sepsování této práce.

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracoval samostatně s vyznačením všech použitých pramenů a spoluautorství. Souhlasím se zveřejněním bakalářské práce podle zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách, ve znění pozdějších předpisů. Byl jsem seznámen s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, ve znění pozdějších předpisů.

V Praze dne 29. dubna 2009

.....
Milan Lokvenc

Abstrakt

Aktin, společně s dalšími cytoskeletálními proteiny, slouží jako základní kámen buněčného cytoskeletu. Tento soubor proteinových vláken poskytuje buňce řadu životně důležitých funkcí. Buněčný cytoskelet však neslouží pouze buňce, ale také virům, které jsou schopny ovládnout buněčné mechanismy a využívat cytoskelet v několika fázích svého životního cyklu. Viry během svého životního cyklu využívají především aktinová vlákna a mikrotubuly. Bylo prokázáno, že aktinová vlákna se uplatňují v časných fázích virové infekce, tedy při vstupu a časně internalizaci, zatímco mikrotubuly jsou využívány později, především k transportu viru do centra buňky.

Tato bakalářská práce je zaměřena na hlavní zástupce virů z čeledi *Polyomaviridae* a snaží se shrnout poznatky o internalizaci těchto virů a interakcích s buněčným cytoskeletem. Tato práce porovnává cesty vstupu a transportu k buněčnému jádru čtyř hlavních polyomavirů (SV-40, BK viru, JC viru a myšího polyomaviru) a poukazuje na rozdíly ve využití buněčného cytoskeletu. Zároveň je tato práce zaměřena na roli lipidových raftů a buněčné signalizace při internalizaci a na odlišnosti polyomavirů při vstupu přes receptor zprostředkovanou endocytózu.

Klíčová slova: aktin, virus, cytoskelet, polyomaviry, internalizace, caveoly, klathrin

Abstract

Actin and other cytoskeletal proteins are used as a headstone of cytoskeleton. This complex of protein filaments provides many type of essential functions to a cell. The cytoskeleton does not minister only to cell. Also viruses are able to manage mechanism of cell and use cytoskeleton during their life cycle. Viruses apply especially actin filaments and microtubules during their life cycle. It was proved, that actin filaments play a major role in early stage of viral infection, especially in a viral entry and early internalization. While the microtubules are applied later than microfilaments, especially in virus transport to the cell centre.

This Bachelor thesis is aimed to major members of *Polyomaviridae* and sums up attainments about internalization of these viruses and interactions between these viruses and cytoskeleton. This thesis compares ways of entry and transport to nucleus between four major polyomaviruses, SV-40, BK virus, JC virus and mouse polyomavirus, and refers the differences in utilization of cytoskeleton. This thesis is also aimed to the role of lipid rafts and signalling of a cell during the internalization. At the conclusion, the thesis refers about differences between polyomavirus in receptor-mediated endocytosis entry.

Keywords: actin, virus, cytoskeleton, polyomaviruses, internalization, caveolae, clathrin

Seznam použitých zkratk:

AP	adaptorový protein
BKV	BK virus
c-Src	buněčná Src kináza
EEA1	časný endozomální antigen 1
ER	endoplazmatické retikulum
ERAD	proteiny asociované s degradační dráhou endoplazmatického retikula
GPCR	receptory spřažené s G-proteiny
IEV	intracelulární obalený virion
Jas	jasplakinolid
JCV	JC virus
LatA	latrunculin A
MAPK	mitogen activated protein kinase
MHC	major histocompatibility complex
MPyV	myší polyomavirus
PDI	protein disulfid izomeráza
PI4P5K	fosfoinositid-4-fosfát-5-kináza
SV-40	Simian virus 40
T-Ag	velký polyomavirový T antigen
VLP	virus like particle
VP	virový protein
v-Src	virová Src kináza
WASP	Wiskott-Aldrich syndrome protein
WIP	WASP interagující protein

Obsah:

1. Úvod.....	7
2. Buněčný cytoskelet.....	7
3. Interakce polyomavirů s cytoskeletem.....	8
3.1. Vstup polyomavirů do buňky.....	9
3.2. Adsorbce polyomavirů.....	9
4. Internalizace polyomavirů.....	10
4.1. Internalizace virů přes kaveoly.....	11
4.1.1. Role cytoskeletu v internalizaci viru SV-40.....	15
4.1.2. Role cytoskeletu v internalizaci BK viru.....	18
4.1.3. Role cytoskeletu v internalizaci myšího polyomaviru.....	19
4.2. Internalizace virů pomocí klathrinem obalených váčků.....	22
4.2.1. Role cytoskeletu v internalizaci JC viru.....	24
5. Závěr.....	25
6. Seznam použité literatury.....	26

1. Úvod

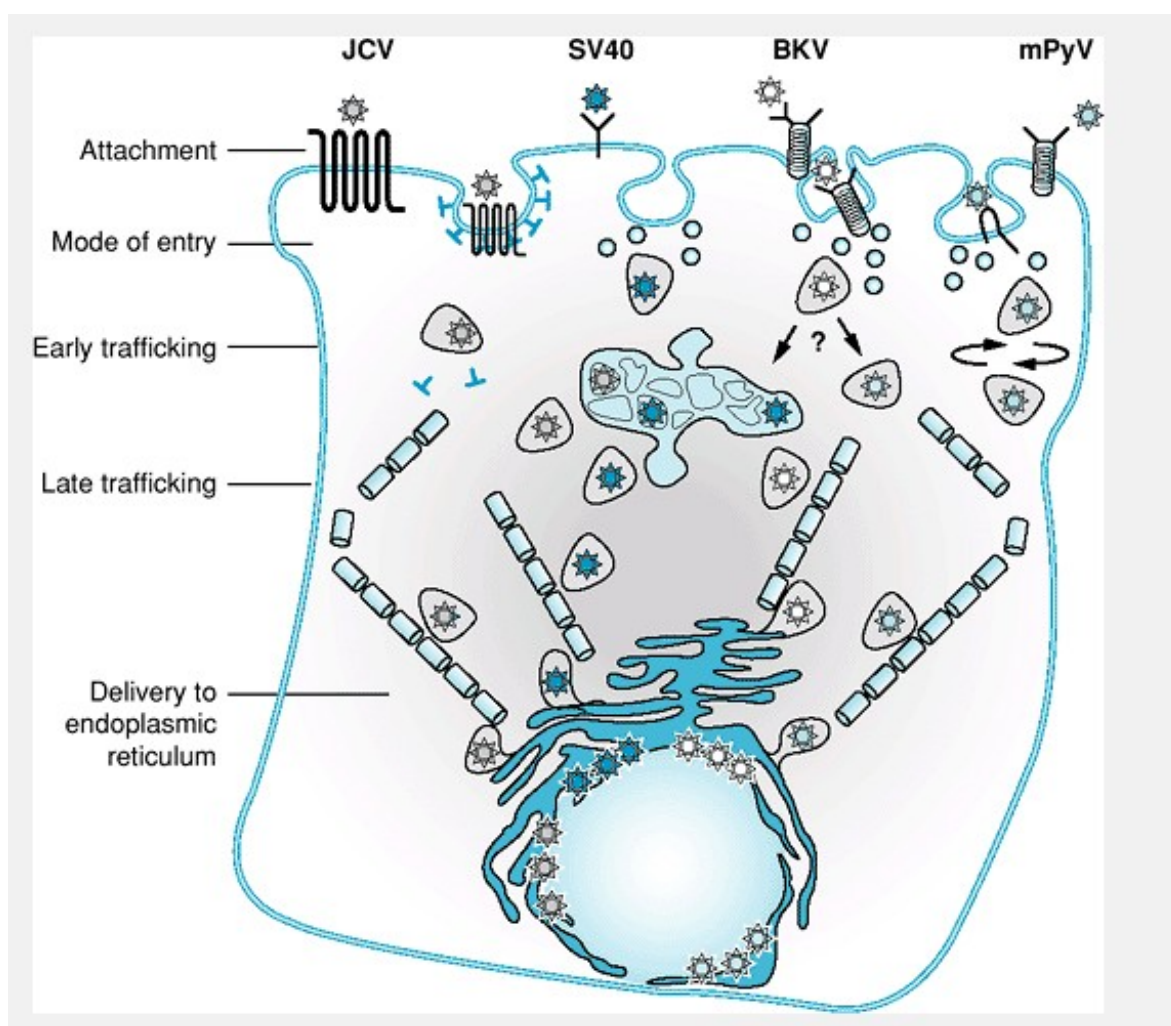
Viry jsou obligátní intracelulární parazité, kteří ke svému životnímu cyklu nezbytně potřebují buňky. Lze spekulovat, zda viry samy o sobě lze považovat za živé organismy. Všechny známé viry, nehledě na jejich obrovskou variabilitu, využívají buňky k replikaci svého genomu a tvorbě nového virového potomstva. Cesta od vstupu viru do buňky po vznik a uvolnění nového virového potomstva, je u většiny virů velmi komplikovaná. Viry využívají a kooperují s různými buněčnými elementy specifickými pro danou fázi životního cyklu viru. Při vstupu virů interagují povrchové struktury virů a buněk. V následujících krocích dochází k remodelaci cytoskeletu, signálních drah, replikačního a translačního aparátu buňky, buněčného cyklu a mnohých jiných buněčných mechanismů, které využívají viry při infekci. Buněčných mechanismů, kterých využívají viry ke svým záměrům je nespočet a je přirozené, že ne všechny viry využívají stejné mechanismy. Buněčný cytoskelet hraje ústřední roli v životním cyklu většiny virů. Cytoskelet je dynamický soubor proteinových vláken a tubulů, který vytváří hustou síť zaplňující celou buňku. Cytoskelet se skládá z aktinových a intermediálních filament a mikrotubulů. Všechny mají své unikátní složení a funkci. Navíc existuje mnoho buněčných proteinů, které s cytoskeletem interagují. Hlavní cytoskeletální proteiny, které viry využívají, jsou aktinová vlákna a mikrotubuly. Viry využívají cytoskelet ke vstupu do buňky, transportu po buňce, transkripci a replikaci a šíření virů do dalších buněk. Tato práce je zaměřena na skupinu virů z čeledi *Polyomaviridae* a na těchto virech budou probrány mechanismy, kterými interagují s buněčným cytoskeletem a využívají jej ve svém životním cyklu.

2. Buněčný cytoskelet

Cytoskelet je soubor proteinových vláken, který má několik zásadních funkcí pro buňku. Tvoří oporu buňce a uděluje jí tvar, je zodpovědný za buněčné dělení a především za vesikulární transport a buněčný pohyb. Cytoskelet má mnoho jiných funkcí, ale tyto jsou společné většině typů buněk. Cytoskelet je tvořen třemi typy proteinových vláken. Tvoří jej aktinová vlákna, intermediální filamenta a mikrotubuly. Intermediální filamenta však nehrají velkou roli ve virové infekci a proto není nutné se o nich dále zmiňovat. Charakteristickou vlastností cytoskeletu je jeho dynamika. Aktinová vlákna a mikrotubuly jsou ve stavu dynamické rovnováhy. Buňky mají mechanismy, které jim umožňují přestavovat cytoskelet, čehož však využívají i viry, které tyto buňky infikují.

3. Interakce virů s cytoskeletem

Aktinová vlákna a mikrotubuly hrají důležitou roli v životním cyklu většiny polyomavirů. Polyomaviry využívají cytoskelet k adsorpci, internalizaci a pohybu směrem k jádru, kde dochází k replikaci těchto virů. Poměrně malá znalost mechanismů internalizace a pohybu polyomavirů od periferie k buněčnému jádru je hlavním důvodem studia těchto interakcí.



Obr. 1: Obecné schéma odlišných drah vstupu polyomavirů do buňky.

Z obrázku je patrné, že se polyomaviry odlišují způsobem vstupu a internalizací. Většina z nich, se odlišuje v typu receptoru, který zprostředkovává vazbu viru na buněčný povrch. Je pravdou, že všechny polyomaviry vstupují do buněk receptorem zprostředkovanou endocytózou, avšak ne všechny využívají stejné druhy váčků ke své internalizaci. Klíčovým prvkem, který je polyomavirům společný, je interakce virů s buněčným cytoskeletem. Všichni zástupci polyomavirů, znázornění na obrázku, využívají přechodnou reorganizaci aktinového cytoskeletu pro vstup do buňky a po internalizaci asociují s mikrotubuly a využívají je k transportu z periferie k buněčnému jádru. Převzato z Knipe et al., (2007).

3.1. Vstup polyomavirů do buňky

Vstup virů z čeledi *Polyomaviridae* do buněk není jednotný pro všechny tyto viry. Prvním krokem na cestě virů do buňky je vazba na receptory, které jsou vystaveny na plazmatické membráně buňky (Dimitrov, 2004). Po vazbě polyomavirů na buňku dochází k receptorem zprostředkované endocytóze.

3.2. Adsorpce polyomavirů

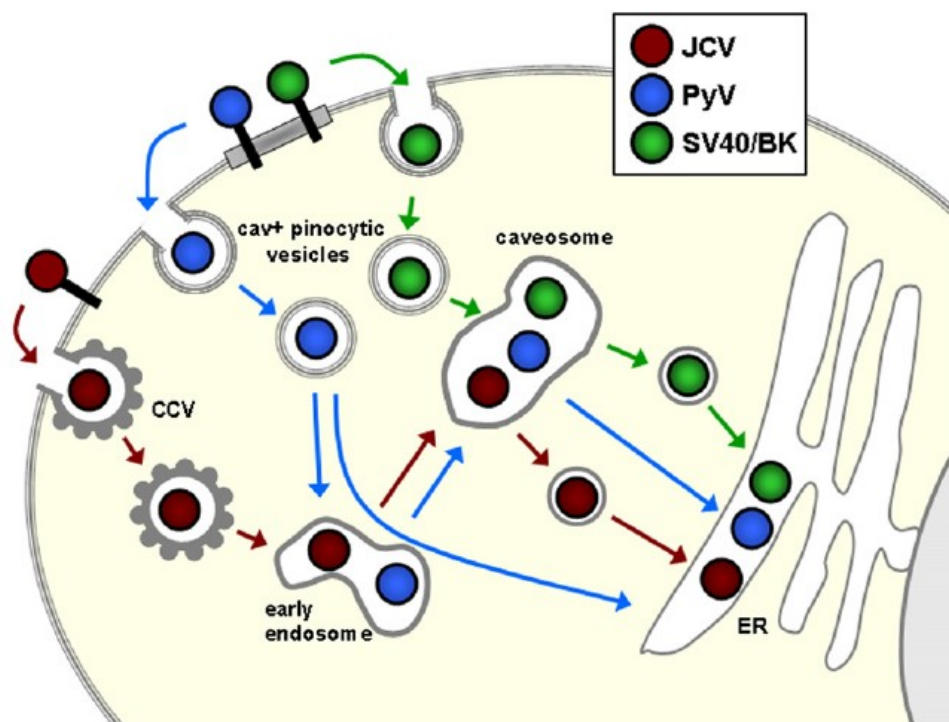
Myší polyomavirus (MPyV) využívá jako receptory pro vstup do buňky gangliosidy. Pro MPyV jsou specifické GD1a a GT1b gangliosidy (Tsai et al., 2003). V případě MPyV je kyselina sialová, která je přítomna na gangliosidech, vázána s majoritním kapsidovým proteinem VP1. Předpokládá se, že integrin $\alpha 4\beta 1$ by mohl být koreceptorem pro vstup MPyV u myších buněk (Caruso et al., 2003). Vazbu s kyselinou sialovou využívají i oba lidské polyomaviry, JC virus (JCV) a BK virus (BKV). JCV využívá ke vstupu do buňky $\alpha(2,6)$ -vázanou kyselinu sialovou přítomnou na serotoninovém receptoru 5-HT (Elphick et al., 2004; Komagome et al., 2002). V případě viru SV-40 je hlavním buněčným receptorem, zodpovědným za vstup viru do buňky, MHC I. třídy (Atwood, Norkin, 1989).

Aktinová vlákna hrají svoji roli již při vazbě polyomavirů na povrchové receptory buňky. Při vazbě virům podobných partikulí (VLP) myšího polyomaviru na povrch plazmatické membrány, dochází v těchto místech k omezení pohybu VLP vázaných na receptory vlivem aktinových vláken. Při analýze drah vstupu polyomavirových VLP byly odhaleny tři odlišné druhy pohybu. Bezprostředně po vazbě VLP na gangliosidy následuje 5-10 sekund dlouhý rychlý pohyb, způsobený difuzí. Poté dochází k prudkému snížení pohyblivosti částic, které jsou omezeny v pohybu a vytvářejí komplexy o velikosti 30-60 nm. Některé VLP se pohybují odlišným pohybem, charakterizovaný pomalým prouděním. Omezení pohybu částic, které následuje po rychlém difuzním pohybu, je způsobeno aktinovými vlákny, které vytvářejí cytoskeletální bariéru. Bylo prokázáno, že tvorba omezení, zprostředkována aktinovými vlákny, není přímo spojena s endocytózou (Ewers et al., 2005).

4. Internalizace polyomavirů

Internalizace je jedním z klíčových kroků při vstupu virů do buňky. Existují dva hlavní mechanismy internalizace, které využívá většina virů. Jedním z nich je přímá fúze viru s plazmatickou membránou buňky. Tento mechanismus využívají především obalené viry. Druhý způsob internalizace, který bude hlouběji popsán, neboť je využíván polyomaviry, je vstup viru endocytózou. Polyomaviry využívají dva hlavní mechanismy, vstupu do buněk pomocí endocytózy. První mechanismus využívající endocytózu, je internalizace virů v útvech označovaných jako kaveoly (Sieczkarski and Whittaker, 2004; Smith and Helenius, 2004). Mezi polyomaviry, které vstupují do buněk endocytózou přes kaveoly patří virus SV-40, BKV a zřejmě také MPyV, který je internalizován v hladkých monopinocytických váčcích pozitivních na kaveolin (Eash et al., 2004; Kartenbeck et al., 1989; Pelkmans et al., 2001; Richterová et al., 2001). Druhý způsob internalizace pomocí endocytózy využívají viry jako Semliki Forest virus, virus chřipky nebo adenovirus. Tyto viry vstupují do buněk pomocí klathrinem obalených váčků. Tento způsob endocytózy využívá také zástupce lidských polyomavirů, JCV (Pho et al., 2000). Obecné schéma cesty virů od plazmatické membrány do nitra buňky je znázorněno na obrázku 2.

Svoji roli v internalizaci virů hraje také buněčný cytoskelet. Především aktinový cytoskelet, který je uložený těsně pod plazmatickou membránou, plní důležité funkce, které napomáhají endocytóze virů. Aktinový kortex nevytváří bariéru endocytóze, ale spíše je využíván jako lešení, které reguluje a ovlivňuje invaginaci a odstříhování váčků z plazmatické membrány. Aktinová vlákna se navíc podílejí na transportu endocytických váčků po buňce (Apodaca, 2001; Yarar et al., 2005). Viry také mohou zasahovat do buněčné signalizace a tímto způsobem indukovat přestavbu aktinových vláken, což napomáhá endocytóze viru. Takovým příkladem je virus SV-40, který indukuje přechodnou přestavbu aktinových stresových vláken. Tyto změny v aktinovém kortexu mají vliv na tvorbu kaveol obsahujících virus. Tyto mechanismy jsou závislé na indukci tyrosin-kináz, které fosforylují proteiny kaveol. Tyto proteiny jsou nezbytné k formování endocytických váčků. (Pelkmans et al., 2002). Poté co jsou polyomaviry úspěšně internalizovány, je jejich hlavním cílem jádro buňky, které představuje místo pro jejich replikaci. V tomto ohledu se zdá, že je strategie polyomavirů založena na přepnutí od aktinových vláken k mikrotubulům, které poskytují relativně snadnou cestu k jádru.



Obr. 2: Rozdílné cesty endocytózy u zástupců polyomavirů.

Virus SV-40 a BKV, které zřejmě využívají stejnou endocytotickou dráhu, jsou zde znázorněny zeleně. Po internalizaci viru, která se zdá být závislá na lipidových raftech, jsou kaveolin pozitivní pinocytické váčky směřovány do kaveozómů. Z kaveozómů poté pučí váčky, které jsou transportovány do endoplazmatického retikula (ER). Internalizace MPyV, který je zde znázorněn modře, zřejmě také vyžaduje spolupráci s lipidovými rafty. MPyV je endocytován v podobě kaveolin pozitivních, hladkých monocytických váček, které fúzí s časnými endozómy. Poté je pravděpodobně virus transportován do kaveozómů a následně do ER, nebo z endozómu přímo do ER, avšak tato část transportní cesty nebyla doposud prokázána. JCV, který je označen červeně, je internalizován v klathrinem obalených váčkách. Tyto váčky fúzí s časnými endozómy a následně jsou cíleny do kaveozómů. Transport viru s kaveozómu do ER je obdobný cestě virus SV-40 a BKV. Převzato z Sapp, Day (2009).

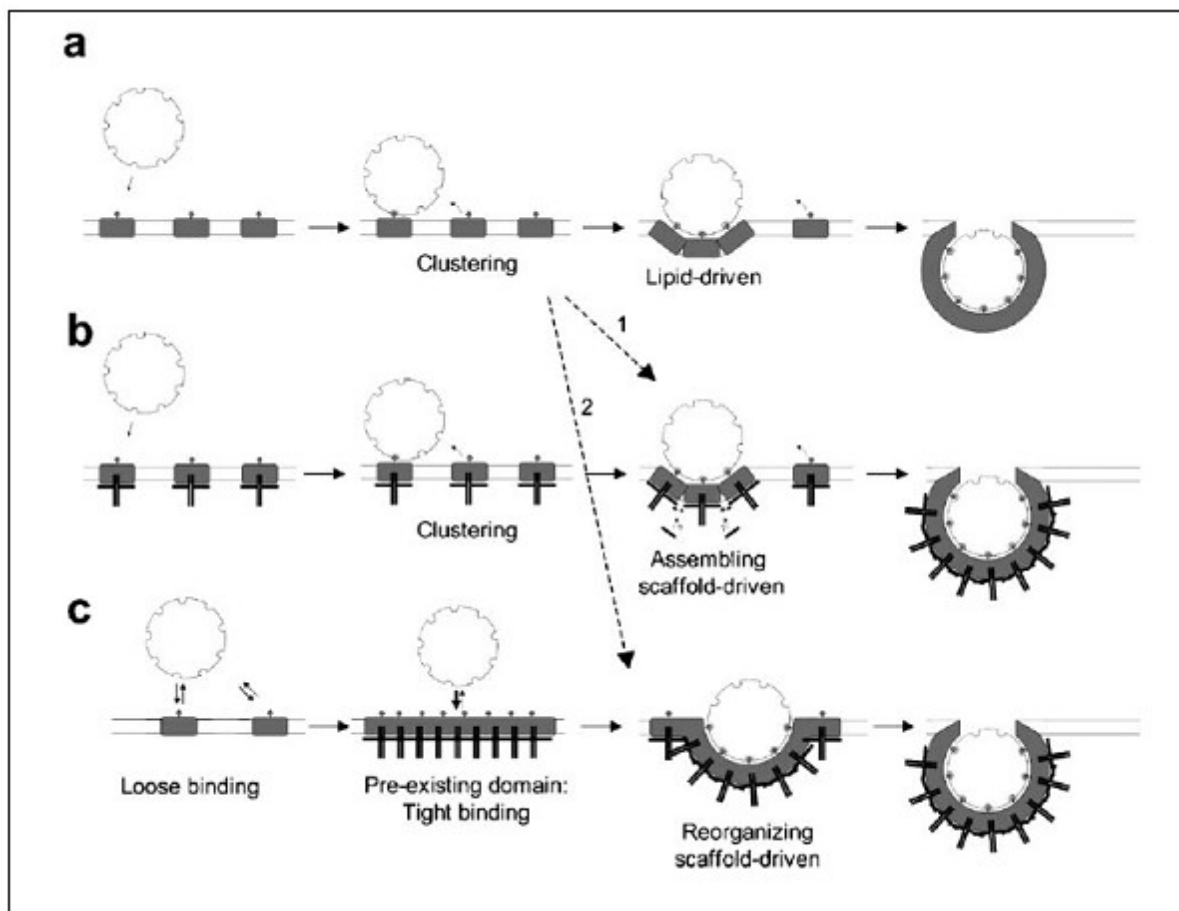
4.1. Internalizace virů přes kaveoly

Jak již bylo řečeno, mezi polyomaviry, které jsou internalizovány přes kaveoly patří virus SV-40, BKV a MPyV. Kaveoly byly poprvé objeveny v 50. letech 20. století. O jejich objev se zasloužil Palade v roce 1953 a o dva roky poté Yamada (Palade, 1953; Yamada, 1955). Kaveoly představují baňkovité invaginace plazmatické membrány, které slouží k přímé internalizaci membránových komponent, extracelulárních ligandů, bakteriálních toxinů a některých neobalených virů. Kaveoly jsou majoritně tvořeny především z proteinu zvaného kaveolin-1, avšak ve svalových buňkách je proteinový obal tvořen kaveolinem-3 (Rothberg et al., 1992). Kaveoliny jsou integrální membránové

proteiny o velikosti 21 kDa. Kaveolin-1 je na C-konci palmitoylován (Dietzen et al., 1995), což má za následek, že může být fosforylován tyrosin-kinázami (Glenney, 1989). Navíc je kaveolin-1 schopen vázat cholesterol (Murata et al., 1995) a polymerizovat do dimerů či oligomerů (Monier et al., 1995). Kaveoliny jsou nezbytné pro správné a stabilní formování kaveol (Fra et al., 1995). Navíc bylo prokázáno, že kaveoliny se nacházejí v buňkách v různých konformačních stavech. Pomocí imunofluorescenčního značení protilátkami proti kaveolinu-1, bylo prokázáno, že konformace kaveolinu-1 z plazmatické membrány je identická s kaveolinem z kaveozómů. Zatímco konformace kaveolinu-1 z Golgiho komplexu je od předchozích odlišná (Dupree et al., 1993; Pelkmans et al., 2001). Dalším proteinem, který se účastní tvorby kaveol, je dynamin (Henley et al., 1998). Tento protein je z funkčního hlediska GTPáza, která je zodpovědná za odstřížení kaveol od membrány (De Camilli et al., 1995). Dynamin plní podobnou roli při tvorbě klathrinových váčků (Hinshaw, 2000). Kaveoly na svém povrchu nesou také řadu buněčných receptorů a signálních molekul v podobě tyrosin-kináz (Sargiacomo et al., 1993). Právě tyrosin-kinázy se ukazují být zodpovědné, za řadu událostí vedoucí k tvorbě kaveol a regulaci internalizace touto cestou. V neposlední řadě hrají důležitou roli také lipidové rafty, které jsou zřejmě stejně nepostradatelné pro tvorbu kaveol jako kaveoliny. Důkazem toho je, že při odstranění cholesterolu z plazmatické membrány nedochází k tvorbě kaveol (Rothberg et al., 1992).

Prvotní událost, ke které dochází při endocytóze zprostředkované přes kaveoly, je shlukování lipidových raftů na plazmatické membráně. Tyto změny ve složení plazmatické membrány jsou indukované po přisednutí virových částic na buněčný povrch. Během internalizace polyomavirů dochází také ke shlukování receptorů, které interagují s viry. Byly vytvořeny 3 modely, jakým způsobem indukují viry shlukování lipidových raftů a vznik kaveol. Nejjednodušší model předpokládá shlukování lipidových raftů, které vede ke zvýšení lokální koncentrace cholesterolu a následně ke spontánnímu zakřivování plazmatické membrány (Bacia et al., 2005). Druhý model předpokládá shlukování lipidových raftů, které interagují na cytosolické straně s integrálními proteiny, které slouží jako lešení a po jejich oligomerizaci dochází k zakřivování membrány a vzniku kaveol. Jelikož přisednutý virus indukuje shlukování lipidových raftů spolu s receptory viru a zároveň kaveolin-1 vykazuje vysokou afinitu k cholesterolu, vzniká tak velký stabilní komplex, ze kterého vznikají kaveoly (Wary et al., 1998). Poslední model je obdobný druhému. Liší se pouze v představě, že kaveoly nevznikají *de novo*. Na plazmatické membráně jsou již pre-existující shluklé lipidové rafty i se stabilizačním komplexem.

Vysoká koncentrace buněčných receptorů asociovaných s lipidovými doménami váže virus a poté dochází k internalizaci viru. Všechny tři modely jsou shrnuty na obrázku 3.

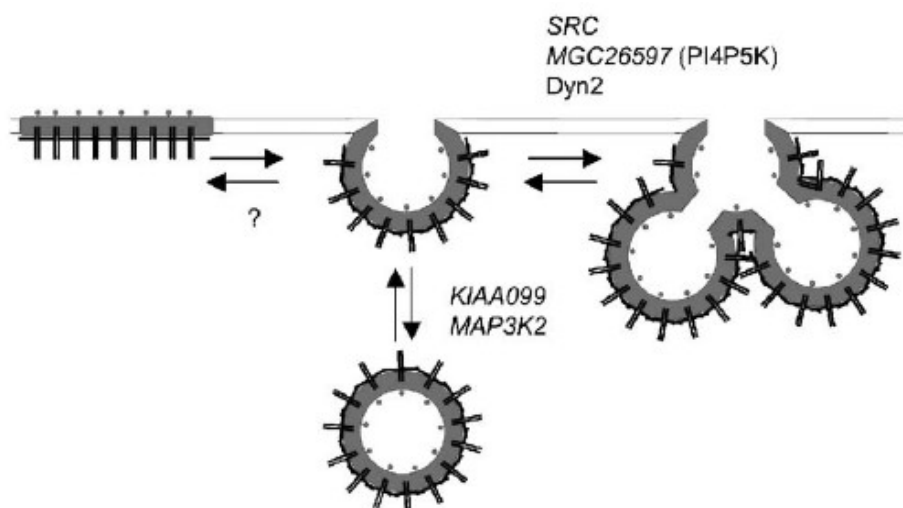


Obr. 3: Způsoby indukce kaveol virovými partikullemi a invaginace lipidových raftů.

(a) Multivalentní virus indukuje shlukování lipidových raftů, jež vede k vzniku lipidových domén s tendencí k ohýbání. Zvyšující se koncentrace cholesterolu přispívá k procesu invaginace. (b) Virus indukuje shlukování lipidových raftů, které interagují se stabilizačními (scaffold) proteiny. Po oligomerizaci těchto proteinů vzniká struktura, která napomáhá ohýbat plazmatickou membránu. (c) Virus je schopen přisednout na lipidové rafty, ale se stejnou afinitou může také disociovat. Pokud však virus interaguje s pre-existujícím komplexem lipidových raftů a (scaffold) proteinů, dochází k silné asociaci a k internalizaci do kaveol. Převzato z Pelkmans (2005).

Velmi podstatnou roli při endocytóze přes kaveoly hrají buněčné protein-kinázy, které se uplatňují v signálních kaskádách. Kaveolin-1 byl původně objeven jako hlavní substrát virové tyrosin kinázy (v-Src) exprimované virem Rousova sarkomu (Glenney Jr., 1989) a předpokládalo se, že by buněčný homolog (c-Src) mohl být schopen fosforylovat kaveolin-1 také, což se nakonec potvrdilo. Src fosforyluje v kaveolinu-1 tyrosin 14. a je tak

nepřímo zapojen do endocytózy přes kaveoly (Shajahan et al., 2004). Například pro virus SV-40 je c-Src nezbytně potřebný pro internalizaci tohoto viru. Existuje asi 43 protein-kináz, které vyžaduje SV-40 ve svém životním cyklu. Pelkmans a Zerial (2005) se zaměřili a 6 specifických protein-kináz, které hrají roli v regulaci endocytózy přes kaveoly. První je serin/threonin kináza, ARAF1, která se účastní signalizace buněčného dělení. Předpokládá se, že při utlumení její funkce dochází ke snížení stability nově vytvořených kaveol. Druhou protein-kinázou je MGC26597. Tato kináza má zřejmě homologní doménu s fosfoinositid-4-fosfát-5-kinázou (PI(4)P5K). Při odstranění této kinázy dochází k shlukování kaveol a následně dochází k tvorbě multi-kaveolárních komplexů, což je znázorněno na obrázku 4. Obdobnou funkci má také Src a Dyn2 kináza. Výsledkem odstranění aktivit těchto kináz je silná inhibice dynamiky kaveol a tudíž i internalizace SV-40. Podobného účinku dosahují také dvě serin/threonin kinázy, MAP3K2 a KIAA099, které při své absenci silně redukují kiss-and-run pohyby, což vede k akumulaci kaveolárních struktur na povrchu buňky. Taktéž na obrázku 4. Na druhou stranu, při odstranění serin/threonin kinázy DYRK3, která je ze skupiny MAPK, dochází k vysokému nárůstu kaveolárního pohybu a má pouze zanedbatelný vliv na destabilizaci pláště kaveol. (Pelkmans et al., 2005).



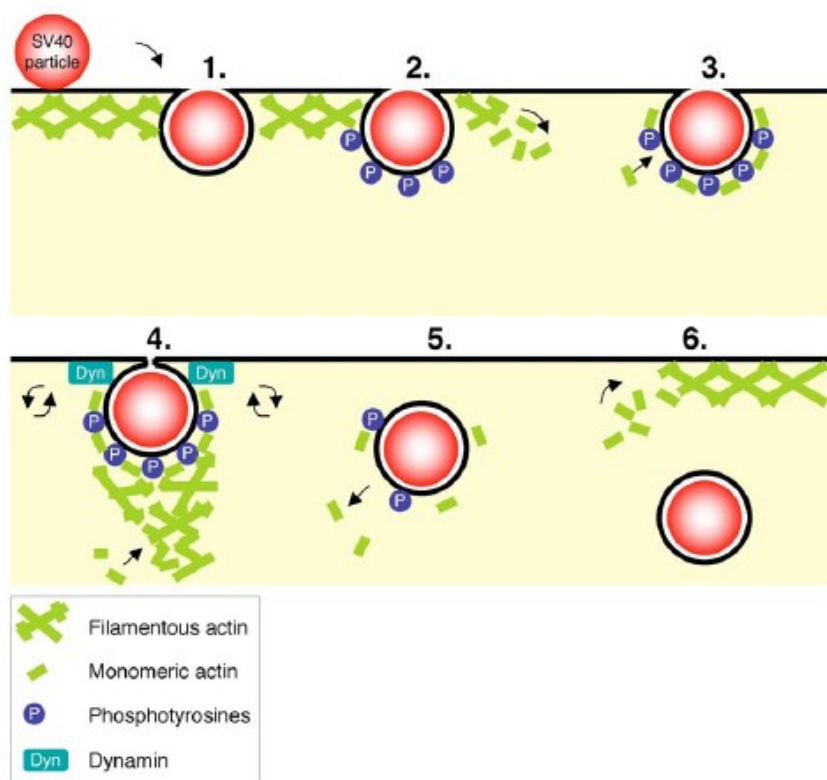
Obr. 4: Regulační účinky protein-kináz na tvorbu kaveol.

Znázorněny jsou dva typy regulace pomocí protein-kináz. Redukce pohybů kiss-and-run přes KIAA099 a MAP3K2. Druhým způsobem je shlukování kaveol do komplexů, které jsou nepohyblivé a pevně vázané na buněčný povrch. Tuto regulaci vykazují kinázy Src, MGC26597 a Dyn2. Převzato z Pelkmans (2005).

4.1.1. Role cytoskeletu v internalizaci viru SV-40

V internalizaci viru SV-40 hrají podstatnou roli aktinová vlákna a mikrotubuly. Aktinová vlákna jsou využita virem především při internalizaci do kaveol, zatímco mikrotubuly slouží především k pohybu viru od kaveozómů k buněčnému jádru.

Aktinová vlákna využívá SV-40 při vstupu do buňky. Při internalizaci viru do kaveol dochází k jevům, kdy virové částice spouští lokální fosforylace, které vedou ke změnám aktinových vláken a kaveol. Při internalizaci dochází k přechodnému rozpadu aktinových vláken na monomerní aktin. Aktin je využit při tvorbě plochých útvarů, polymerizujících na buněčném povrchu v místech, kde je lokalizován SV-40. Tyto útvary, jsou místem vzniku charakteristických aktinových komet, které jsou typické i pro jiné skupiny virů. Aktinové komety jsou v průměru 1.3 μm dlouhé, na jednom konci zašpičatělé a vykazují poměrně velkou dynamiku. Ke vzniku kaveol je nezbytný také dynamin II, který společně s aktinem hraje důležitou roli při odstřížení kaveol od plazmatické membrány. Schéma polymerizace aktinu při tvorbě aktinových komet je znázorněno na obrázku 5.



Obr. 5: Tvorba aktinových komet při internalizaci SV-40.

Po vazbě viru na buněčný povrch, je virus následně internalizován do kaveol, které jsou spojeny s aktinových cytoskeletem (1). Po začlenění viru do kaveol, SV-40 spouští signální kaskádu, která vede k lokální fosforylaci proteinů, jež ovlivňují depolymerizaci aktinového kortexu (2). Monomerní aktin je poté formován v aktinové záplaty (3), ze kterých poté polymerizují aktinové komety (4). Kaveoly jsou poté uvolněny z buněčné membrány do cytosolu za účasti dynaminu II (5). Po internalizaci polymerizuje aktin do původní struktury (6). Převzato z Pelkmans et al., (2002).

Existence aktinových komet u viru SV-40 byla potvrzena, podobně jako u jiných virů. Je však nutné se zamyslet, jestli také mechanismy tvorby a využití aktinových komet nemůže být podobné jako u jiných virů. Například u viru vakcinie je tvorba aktinových komet běžnou součástí jednoho způsobu uvolnění při šíření viru. Virus vakcinie využívá aktinové komety k pohybu obalených virionů (IEV) k plazmatické membráně, kde dochází k fúzi vnější membrány virionu s plazmatickou membránou. Předpokládá se, že charakteristická tvorba aktinových komet přispívá k šíření viru z buňky do buňky. Mechanismus tvorby aktinových komet je založen na polymerizaci aktinových vláken, která je zprostředkována přes proteinový komplex Arp 2/3. Tento sedmi podjednotkový protein hraje klíčovou roli v regulaci aktinových vláken. Arp 2/3 má schopnost se vázat na existující aktinové vlákno a poskytuje nukleační místo, ze kterého polymerizuje nové aktinové vlákno (Gouin et al., 2005). Nukleační aktivita komplexu Arp 2/3 je iniciována několika proteiny, které patří do rodiny Wiskott-Aldrich syndrom protein (WASP). Klíčovou roli v iniciaci nukleační aktivity Arp 2/3 hrají proteiny N-WASP a WIP (WASP interacting protein). Zásadní roli hraje také virový protein A36R, který je fosforylován tyrosin-kinázou Src. Po fosforylaci, A36R rekrutuje adaptorové proteiny Nck a Grb2, které jsou schopné vázat a aktivovat N-WASP a WIP (Scaplehorn et al., 2002). Je zřejmé, že tvorba aktinových komet u viru vakcinie je komplexní děj, který je založen na signalizaci a vazbě mnoha adaptorových proteinů. Není prokázáno, že virus SV-40 ovlivňuje komplex Arp 2/3, avšak nemůžeme to vyloučit, neboť i u tohoto viru dochází k tvorbě aktinových komet stejně jako u viru vakcinie.

Pelkmans a spolupracovníci (2002) ve svých experimentech ukázali, že klíčovou roli v internalizaci SV-40, hraje několik buněčných struktur. Experimenty zaměřili na pozorování změn infekivity SV-40 při užití látek, které ovlivňují vlastnosti aktinových vláken, tyrosin-kináz a membránových struktur. Při užití kombinace nystatinu a progesteronu, které způsobují ztrátu lipidových raftů, blokovali vstup viru a dosáhli snížení infekce o 90%. Podobného účinku dosáhli při užití staurosporinu a genisteinu, které slouží jako inhibitory protein-kináz. Snížení infekce činilo asi 70%. Ve svých

experimentech použili také látky ovlivňující aktin. Latrunculin A (LatA) způsobuje odstranění monomerního aktinu. Při jeho užití bylo snížení infekce srovnatelné s inhibicí protein-kináz. Avšak aplikací jasplakinolidu, látky která stabilizuje aktinová vlákna, došlo k nesrovnatelně silnější inhibici infekce, než při použití LatA. Předpokládá se, že stabilizace aktinových vláken negativně zasahuje do pozdějších fází pohybu viru buňkou. Hlavní roli však hraje stabilizace aktinového kortexu těsně pod membránou, která vede k zablokování transportu kaveol dále do cytosolu. Ve svých experimentech také poukazují na fakt, že SV-40 zřejmě indukuje rozpad stresových vláken a formování aktinových komet při internalizaci viru. Z jejich výsledků vyplývá, že formace aktinových komet je závislá na virových partikulích v oblasti se silnou tvorbou kaveol. Při užití látek ovlivňujících vznik lipidových raftů a kaveol nebyly aktinové komety pozorovány. Zároveň předpokládají, že aktinové komety jsou potřebné k správné tvorbě kaveol obsahujících virus, ale nehrají roli v transportu kaveolárních váček do kaveozómu. Shrnutí v review Pelkmans et al. (2002).

Svoji roli v životním cyklu SV-40 však hrají také mikrotubuly. Po internalizaci je SV-40 transportován do kaveozómů. V těchto velkých membránových organelách, různého tvaru a velikosti, dochází k hromadění velkého množství viru. V membránách kaveozómů je obsažen kaveolin-1 a vyskytuje se zde ve stejném konformačním stavu, jako na plazmatické membráně. Specifickou vlastností kaveozómů je, že jejich pH je neutrální. Po 2-4 hodinách od vstupu viru do kaveozómů, se začíná zvyšovat dynamika těchto organel. Kaveozómy začínají rychle měnit svůj tvar a formují se do dlouhých tubulárních váček. Po oddělení od kaveozómů, jsou tyto váčky využity pro transport SV-40 do hladkého ER, kde dochází k akumulaci viru. Formování a intracelulární pohyb těchto váček směrem k ER vyžaduje aktivní spoluúčast mikrotubulů. Zvláštností je, že váčky, které jsou transportovány od plazmatické membrány ke kaveozómům obsahují kaveolin-1, zatímco váčky transportující virus od kaveozómů k ER žádný kaveolin-1 neobsahují. Při studiu transportu SV-40 do hladkého endoplazmatického retikula bylo prokázáno, že cílený rozpad mikrotubulů pomocí nocodazolu má vliv na infekci. Při užití nocodazolu, nebyl inhibován vstup viru do buněk, ani transport do kaveozómů. Zatímco pokud se nocodazol použil ve fázi, kdy byl virus akumulován v kaveozómech, došlo k inhibici formování a pohybu váček k ER. Z těchto výsledků jasně vyplývá, že mikrotubuly nejsou potřebné k vstupu viru do buňky a transportu do kaveozómů, ale jsou esenciální pro transport viru z kaveozómů do ER. Je také patrné, že virus nemusí být pouze

internalizován, ale musí dojít také k transportu z kaveozómů do ER. Převtazo z Pelkmans et al., (2001).

Po internalizaci virových partikulí, následuje u většiny neobalených virů rozvolnění kapsidy. Tento proces je u polyomavirů cílem zkoumání a není zatím zcela jasné, kde a jakým způsobem k němu dochází. U viru SV-40, bylo rozvolnění kapsidy poprvé pozorováno v ER, pomocí imunofluorescenční detekce minoritních virových proteinů VP2 a VP3. Tyto proteiny není možno detekovat protilátkami, pokud nedojde ke konformační změně kapsidy (Norkin et al., 2002). Virus SV-40 vyžaduje k úspěšné infekci dvě thio-disulfid oxidoreduktasy. První z nich je ERp57 a druhá PDI. ERp57 je schopna změnit vnitřní uspořádání disulfidických vazeb v proteinu. Při změně konformace disulfidických vazeb z C9-C9 na C9-C104 (Schelhaas et al., 2007), dochází k oslabení spojení mezi pentavalentními a hexavalentními kapsomerami (Stehle et al., 1996). Výsledkem aktivity ERp57 je rozvolnění 12 pentamerů z celkového počtu 72. Při nízké hladině Ca^{2+} dochází k úplnému uvolnění těchto pentamerů ze struktury virionu. Předpokládá se, že k úspěšné infekci SV-40, jsou také nezbytné proteiny Derlin-1 a Sel1L, jež jsou členy proteinové rodiny ER-associated degradation (ERAD). Předpokládá se, že SV-40, využívá isomeraci svých disulfidických vazeb k tomu, aby mohl opouštět ER za pomoci proteinů z rodiny ERAD. Tento předpoklad potvrzuje také detekce a kolokalizace SV-40

s BiP/GRP78, lumenálním chaperonem, který transportuje abnormální proteiny z ER do cytosolu (Deeks et al., 2002). Zdá se, že mnohé proteiny z ER jsou využívány polyomaviry k rozbalení a transportu z ER. Je však stále nejasné, zda se z ER dostává rozbalený virion celý, nebo pouze virový genom. Avšak předpokládá se, že polyomaviry vyvinuly různé způsoby transportu z ER do jádra.

4.1.2. Role cytoskeletu v internalizaci BK viru.

BKV má velmi podobný životní cyklus jako SV-40. Stejně jako SV-40 vstupuje do buněk receptorem zprostředkovanou endocytózou přes kaveoly. Má zřejmě také stejné internalizační cesty vedoucí k jádru a stejně jako u viru SV-40, v jeho životním cyklu hraje jistou roli cytoskelet. Eash a Atwood (2005) poukazují ve svých experimentech na funkci cytoskeletu při virové infekci BKV. Jejich experimenty jsou postaveny na užití látek, které ovlivňují vlastnosti mikrofilament a mikrotubulů.

V případě mikrofilament se domnívají, že destabilizace aktinových vláken nevede ke snížení infekce BKV. Zatímco pokud dojde ke stabilizaci aktinových vláken, pak dochází

ke značné redukci infekce. Při užití LatA docházelo k rozrušení aktinových vláken, ale inhibice infekce nebyla pozorována. Z jejich předpokladů je patrné, že internalizace a následné události v životním cyklu BKV jsou nezávislé na neporušeném aktinovém cytoskeletu. Gilbert et al., (2003) se dokonce domnívají, že destabilizace aktinového cytoskeletu u MPyV, který patří do stejné virové rodiny jako BKV, vede ke zvýšení infekivity. Předpokládají, že rozpad aktinových vláken vede k lepší přístupnosti virových receptorů nebo k snadnější penetraci plazmatické membrány při destrukci pevné sítě aktinového kortexu. Naopak při použití chemické látky jasplakinolidu (Jas), který stabilizuje aktinová vlákna, byla pozorována redukce infekce BKV. Autoři se domnívají, že BKV potřebuje ke vstupu a internalizaci aktinová vlákna, která jsou schopna se dynamicky přestavovat.

V případě mikrotubulů byl postup podobný. Užili látky nocodazol a paclitaxel, které mají opačné účinky. Nocodazol mikrotubuly destabilizuje, zatímco paclitaxel účinkuje jako stabilizační činidlo. Vliv na infekci měl pouze nocodazol. Při jeho použití došlo ke snížení exprese T-Ag BKV. Výsledky naznačují, že neporušené mikrotubuly jsou nezbytné pro časnou infekci BKV. Při stabilizaci mikrotubulů, pomocí paclitaxelu, nedochází k redukci infekce. Převzato z Eash et al., (2005).

4.1.3. Role cytoskeletu v internalizaci myšího polyomaviru

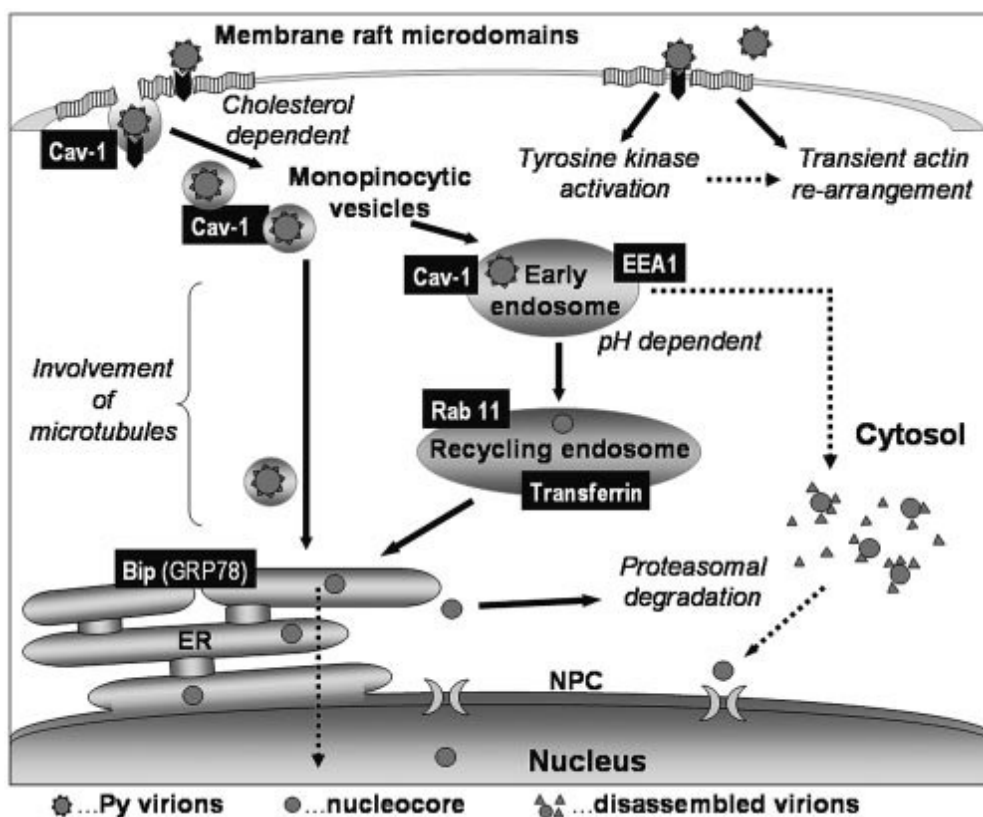
Internalizace MPyV je podobná jako u viru SV-40. Virus vstupuje receptorem zprostředkovanou endocytózou přes hladké monopinocytické váčky, jejichž pohyb je asociován s přechodnou změnou aktinového cytoskeletu. Virové partikule vykazují při adsorpci na buněčný povrch silnou afinitu k oblastem s vysokou koncentrací aktinu. Právě v těchto místech dochází k formování invaginací a samotné internalizaci viru. Zatímco invaginace charakteristické pro kaveoly mají průměr 70-100 nm, tak invaginace obsahující MPyV jsou menší, v průměru mají asi 60 nm. Richterová a spolupracovníci (2001) prokazují ve své práci, že brzy po adsorpci viru na plazmatickou membránu dochází k velké akumulaci kaveolinu v místech, kde virus vstupuje do buňky. Také ve své práci prokazují přítomnost kaveolinu-1 ve váčkách obsahující viriony nebo VP1 pseudokapsidy. Na druhou stranu, Gilbert a Benjamin (2000) během svých pozorování nezjistili přítomnost kaveolinu-1 ve váčkách obsahující viriony. Navíc nepozorovali žádné snížení efektivity viru při blokaci endocytózy, pomocí syntézy negativní formy dynaminu I, který je nezbytný pro endocytózu, ať přes kaveoly či klathrinem obalené váčky. Zároveň bylo Lieblem a spolupracovníky (2006) prokázáno, že kaveolin-1 není nezbytně nutný k

internalizaci MPyV. K infekci MPyV byly použity buňky, kde nebyl kaveolin-1 exprimován. Infekce virem byla porovnána s infikovanými myšimi fibroblasty a bylo shledáno, že invaginace a tvorba váčků byla morfologicky podobná a k efektivní infekci došlo v obou případech. Je tedy možné, že MPyV využívá ještě odlišnou cestu internalizace. Svoji roli v internalizaci myšího polyomaviru hrají také lipidové rafty, podobně jako je tomu u viru SV-40. Při adsorbci myšího polyomaviru na buněčný povrch byly prokázány asociace viru s lipidovými rafty, které vykazovaly obdobné děje jako při signální transdukcii. Tato pozorování byla spojena se zvýšenou hladinou mRNA c-fos a c-myc krátce po adsorbci viru (Zullo et al., 1987). Role lipidových raftů v infekci myším polyomavirem byla také prokázána použitím methyl- β -cyklodextrinu. Při užití této látky, která odstraňuje cholesterol z plazmatické membrány, se významně snižuje infektivita viru. Převzato z Richterová et al., (2001).

Se vstupem MPyV přes lipidové rafty je také spjat aktinový cytoskelet, podobně jako je tomu u viru SV-40. Při adsorbci MPyV na buněčný povrch dochází k asociaci viru s aktinovým cytoskeletem. Je známo, že lipidové rafty, bohaté na cholesterol, se shlukují v místech se zvýšenou koncentrací aktinu. V těchto lipidových doménách se koncentruje velké množství malých GTPáz, které jsou schopny regulovat aktin a tím přispívat k internalizaci viru. Takovým příkladem jsou GTPázy z proteinové rodiny Rho. Do této rodiny patří tři hlavní GTPázy, a to RhoA, Rac1 a Cdc42 (Michaely et al., 1999). Aktivace proteinu Rho vede k tvorbě stresových vláken a také k asociaci komplexů fokální adheze. Oproti tomu aktivace proteinu Rac vede k tvorbě lamelopodií a aktivací Cdc42 dochází k tvorbě filopodií. Navíc bylo prokázáno, že tyto GTPázy jsou příbuzné s GTPázami z rodiny Ras a jsou schopné se navzájem aktivovat (Caron et al., 1998). Tato pozorování vedou k předpokladu, že GTPázy z proteinových rodin Rho hrají klíčovou roli v regulaci aktinového cytoskeletu při endocytóze. Je patrné, že aktin hraje hlavní roli v časných fázích infekce MPyV. Předpokládá se, že aktinová vlákna slouží jako bariéra, která navádí váčky s virem do kompartmentů, které jsou předurčeny k degradaci. Tento předpoklad by vysvětloval obvyklou reorganizaci aktinových vláken, která je indukována virem při internalizaci. Tímto způsobem se virus brání svedení na cestu degradace. Naopak mikrotubuly, jsou využity myším polyomavirem v pozdějších fázích, a to především k transportu k ER a buněčnému jádru. Převzato z Richterová et al., (2001).

Po internalizaci myšího polyomaviru se odehrávají odlišné události než při infekci SV-40. Předpokládá se, že monopinocytické váčky, které obsahují virus, postupně fúzí s časnými endozómy a následně s kaveozómy. Poté je cesta MPyV podobná viru SV-40.

Z kaveozómů je virus transportován do ER, kde zřejmě dochází k rozvolnění virových kapsid. Vstup myšího polyomaviru do časných endozómů je podložen důkazy založenými na kolokalizaci VP1 s časným endozomálním antigenem (EEA1). Bylo také prokázáno, že MPyV během své cesty od periférie k jádru vstupuje do recyklujících se endozómů, což je znázorněno na obrázku 6. Tento fakt byl prokázán kolokalizací VP1 s GTPázou Rab11. Převzato z Liebl et al., (2006). Myší polyomavirus je schopen se vyhnout dráze od recyklujících se endozómů k pozdním endozómům a následně lysozómům, která je popsána u psího parvoviru (Suikkanen et al., 2002).



Obr. 6: Možnosti vstup a pohybu MPyV od periférie k jádru.

Myší polyomavirus je internalizován přes lipidové rafty do hladkých monopinocytických váčků, které jsou pozitivní na kaveolin. Váčky následně fúzí s časnými endozómy. Kyselá pH endozómů je nezbytné k efektivní infekci myším polyomavirem. Internalizace viru je spojena s aktivací signalizace přes protein-kinázy, která ve většině případů spouští přechodnou přestavbu aktinového cytoskeletu. Na obrázku je také zobrazena cesta viru přes recyklující se endozómy, která byla prokázána kolokalizací viru s GTPázou Rab11. Zároveň byla pozorována kolokalizace viru s endoplazmatickým proteinem BiP, což nasvědčuje faktu, že MPyV prochází při své cestě k jádru přes ER. Je zde však zobrazena také přímá cesta viru od plazmatické membrány k ER, při které dochází k interakci viru s mikrotubuly. Černé šipky označují experimentálně

prokázané cesty. Tečkované šipky ukazují alternativní cesty, které však nebyly zcela prokázány. Převzato z Liebl et al., (2006).

Mezi internalizací MPyV a SV-40 byly nalezeny i další odlišnosti, kromě cesty MPyV přes endozomy. Bylo prokázáno, že MPyV a SV-40 využívají odlišné subtypy váčků při dopravě mezi Golgiho komplexem a ER. U SV-40 byla prokázána kolokalizace VP1 s obalovým proteinem β COP, který je součástí COPI klathrinových váčků zprostředkovávající transport mezi Golgiho komplexem a ER. Tento fakt naznačuje, že virus je transportován do ER retrográdním transportem z Golgiho komplexu. Tento retrográdní transport je citlivý k brefeldinu A. Tato látka inhibuje ARF-1, GTPázu z rodiny Ras, která reguluje tvorbu komplexu COPI na cisternách Golgiho komplexu. Bylo prokázáno, že při užití brefeldinu A dochází k inhibici transportu viru do ER. Převzato z Norkin et al., (2002). Mannová et al., (2003) zjistili, že MPyV vykazuje pouze nízkou kolokalizaci VP1 s β COP v čase do 3 hodin po infekci a navíc byly signály často lokalizovány na opačných stranách sledovaných buněk. Při sledování vlivu brefeldinu A na infekci MPyV byl pro srovnání testován také SV-40. V případě SV-40 docházelo k více než 90% inhibici infekce, zatímco u myšího polyomaviru byla inhibice infekce zanedbatelná. Snížení množství infikovaných buněk nepřekročilo 20%. Tyto výsledky naznačují, že MPyV a SV-40 mají odlišné transportní cesty, kterými dosahují ER.

4.2. Internalizace virů pomocí klathrinem obalených váčků

Většina živočišných buněk přijímá extracelulární kapaliny a ligandy vázané na receptorech pomocí endocytózy přes klathrinové váčky (Mellman, 1996). Klathrinové váčky byly poprvé objeveny a izolovány z buněk mozku, kde se účastnili endocytózy neuromediátorů pre-synaptické membrány. Při pozorování struktury váčků, bylo zjištěno, že jejich obal se skládá z pentagonů a hexagonů klathrinu (Pearse, 1987). Dnes je již struktura klathrinových váčků dobře prozkoumaná a je známo, že formování a pohyb váčků buňkou je složitý vícekrokový proces, který vyžaduje asociaci mnoha proteinů a je přísně regulován. Při tvorbě klathrinových váčků dochází k interakci mnoha proteinů. Hlavní význam mají adaptorové proteiny. Tyto proteiny existují ve formě heterotetramerových komplexů, které se odlišují svým typem podle lokalizace v buňce. Mezi hlavní patří AP1, AP2, AP3 a AP4. Adaptory AP1, AP3 a AP4 jsou zahrnuty do transportu z trans-Golgi kompartmentu a AP2 je využit pro transport z plazmatické membrány. Hlavní význam v internalizaci polyomavirů má transport

z plazmatické membrány. Adaptor AP2 je složen ze dvou, zhruba 100 kDa velkých podjednotek α a $\beta 2$ a ze dvou menších podjednotek $\mu 2$ (50 kDa) a $\sigma 2$ (20kDa). AP2 asociuje s plazmatickou membránou přes α podjednotku, která má afinitu k fosfoinositidům. Naopak klathrin váže $\beta 2$ podjednotka a propojuje tak klathrin s plazmatickou membránou. Předpokládá se, že adaptorové proteiny indukují zakřivení membrány a přispívají tak k tvorbě invaginací. Převzato z Kirchhausen (1999). Bylo prokázáno, že podjednotka $\mu 2$ adaptorového proteinu AP2 váže s nízkou afinitou receptory, ze kterých přichází signál indukující endocytózu (Brodsky et al., 2001). Transmembránový protein synaptotagmin je schopen tuto slabou interakci mezi $\mu 2$ podjednotkou a příslušným receptorem stabilizovat a slouží jako tzv. docking protein (Haucke and De Camilli, 1999). Avšak existuje celá řada dalších proteinů, která se účastní interakce s AP2 a klathrinem. Mezi nejvýznamnější patří adaptorový protein (AP180), který svojí interakcí s AP2 usnadňuje sbalení klathrinového pláště (McMahon 1999). Dalšími proteiny jsou Eps15 (de Beer et al., 1998; Wendland et al., 1998) a arrestiny, které propojují G-proteiny spřažené s receptory (GPCR) s klathrinovými váčky (Ferguson, 2001). Eps15 je protein, který má hned několik funkcí při tvorbě klathrinových váček. Eps15 má na svém N-konci EH doménu, která je schopna vázat epsiny. Epsiny patří do velké proteinové rodiny a jejich nejdůležitější funkcí je schopnost generovat zakřivování plazmatické membrány. C-konec proteinu Eps15 je schopný vázat AP2. Po asociaci všech potřebných adaptorových proteinů dochází k interakci klathrinových monomerů a ke složení klathrinového obalu. Sbalování klathrinového pláště je regulováno přes $\beta 2$ podjednotku, která může být fosforylována či defosforylována (Brodsky et al., 2001).

Svoji roli v tvorbě a pohybu klathrinových váček hraje také aktinový cytoskelet. Předpokládá se, že pro úspěšné vytvoření klathrinových váček a jejich pohybu hlouběji do cytosolu, je nutná lokální přestavba aktinového kortexu, který lemuje plazmatickou membránu. Neopominutelný je také fakt, že řada proteinů, které se účastní tvorby klathrinových váček, jsou schopné vázat proteiny, které přímo interagují s aktinem. Dynamin, který se účastní odstřížení klathrinových váček z membrány je schopen vázat cortactin, který přímo asociuje s aktinem (Lee and De Camilli, 2002). Proteiny syndapin a pacsin, které jsou dynamin vazebné, jsou zároveň schopné interagovat s proteiny WASP/N-WASP (Qualmann and Kelly, 2000). Jak bylo dříve řečeno, tyto proteiny jsou zapojeny do tvorby aktinových komet přes Arp2/3 komplex, čímž nemůžeme vyloučit interakci aktinových komet také s klathrinovými váčky. Spojení mezi klathrinovými váčky a

aktinovým cytoskeletem tedy nepopíratelně existuje, avšak je velmi obtížné pozorovat přímé projevy těchto interakcí.

Velmi brzy po vytvoření klatrinových váček dochází k cílené ztrátě klatrinového pláště. Váčky obsahující viry pak velmi rychle fúzí s endocytickými organelami. První zastávkou viru bývají zpravidla časné endozómy. V těchto organelách dochází k roztržení přijatého materiálu. Z časných endozómů vedou dvě odlišné cesty. Jedna vede k recyklujícím endozómům, a tu využívají především receptory, které je třeba recyklovat a vracet zpět do plazmatické membrány. Z recyklujících endozómů pučí váčky, které míří zpět k plazmatické membráně. Druhou cestou je cesta do pozdních endozómů, kde je pH kyselější než v časných endozómech. Do pozdních endozómů se dostávají především látky, které jsou určeny k degradaci, jež následně probíhá v lysozómech. Některé viry jsou schopné unikat buněčným mechanismům a místo cesty do pozdních endozómů a následně do lysozómů, využívají cesty recyklujících endozómů, ze které však uhýbají směrem k ER. Převzato z Mellman (1996).

4.2.1. Role cytoskeletu v internalizaci JC viru

JCV je jediný z dosud známých polyomavirů, který vstupuje do buňky endocytózou přes klathrinové váčky. Jak již bylo řečeno, hlavní receptor pro vstup JCV do buňky je 5HT_{A2} serotoninový receptor. Tyto předpoklady potvrzují pozorování Elphicka a spolupracovníků (2004), kteří použili chlorpromazin a clozapin při infekci JC virem. Tyto látky patří do skupiny inhibitorů serotoninových a dopaminních receptorů. Chlorpromazin specificky blokuje endocytózu přes klathrinové váčky, zatímco clozapin inhibuje obecně infekci virem.

Vstup viru přes klathrinové váčky byl potvrzen použitím látek inhibujících jak endocytózu přes klathrin, tak i přes caveoly. Při užití nystatinu, látky která inhibuje příjem pomocí caveol, nedošlo ke zdatelné inhibici infekce. Naopak použití chlorpromazinu, mělo zdatelný inhibiční efekt na infekci JCV. Zároveň však bylo prokázáno, že k inhibici chlorpromazinem dochází pouze v časných fázích životního cyklu JCV. Bylo prokázáno, že JCV kolokalizuje s transferrinem v časných endozómech a tudíž po internalizaci JCV putuje do časného endozómu (Pho et al., 2000). Vstup do endozómu vystavuje virus kyselému prostředí, které indukuje konformační změny, vedoucí k rozvolnění virové kapsidy. Ashok a Atwood (2002) prokázali, že kyselé pH endozómů je nezbytné k efektivní infekci JC virem. Použili dva odlišné inhibitory acidifikace endozómů k průkazu snížení infekivity viru. První inhibitor byl chlorid amonný, který je slabou bází

a tlumí tak kyselé pH endozómu. Druhý inhibitor byl bafilomycin A1, který funguje jako specifický inhibitor protonové pumpy, která okyseluje prostředí endozómu. Tyto studie s inhibitory ukázaly, že zatímco SV-40 je nezávislý na pH endozómů, tak infekce JCV vykazuje citlivost k narušení endozomálního pH.

Obdobně jako u ostatních polyomavirů je i infekce JCV závislá na buněčném cytoskeletu. Pho et al., (2002) provedli několik studií s látkami ovlivňující cytoskelet. Testování prováděli u JCV a pro kontrolu použili SV-40. Při studiích použili látky nocodazol, cytochalasin D a acrylamid a zjistili, že virus SV-40 je sensitivní pouze k nocodazolu, zatímco infekce JCV je citlivá ke všem třem inhibitorům. U viru JCV byla užitím acrylamidu prokázána citlivost infekce k rozvolnění vimentinové sítě. Suzuki a spolupracovníci (2005) prokázali u JCV interakce mezi agnoproteinem a nově objeveným FEZ1 proteinem. FEZ1 je protein, který je běžně exprimován v neuronech. Protein FEZ1 vykazuje afinitu k mikrotubulům, avšak agnoprotein je schopen indukovat disociaci FEZ1 proteinu z mikrotubulů. Výsledky studií předpokládají, že agnoprotein podněcuje pohyb virionů podél mikrotubulů, pomocí disociace FEZ1 proteinu. Je patrné, že cytoskelet hraje důležitou roli i při infekci JC viru.

5. Závěr

Je jisté, že buněčný cytoskelet hraje důležitou roli při vstupu a internalizaci většiny živočišných virů do buněk. Ač se zdá, že viry využívají cytoskelet podobnými mechanismy, je pravdou, že i mezi samotnými polyomaviry, které jsou z jedné virové rodiny, se nacházejí mechanismy velice odlišné. Podrobné studium interakcí virů s cytoskeletem nám pomáhá pochopit, jak viry vstupují a především jak se pohybují buňkou. Pochopení problematiky transportu virů skrz buňku, nám může pomoci nejen léčit některá virová onemocnění, ale zároveň bychom mohli využít viry jako transportní systémy pro genovou terapii.

6. Seznam použité literatury

- Apodaca, G. (2001): Endocytic traffic in polarized epithelial cells: role of the actin and microtubule cytoskeleton. *Traffic* 2:149–159.
- Atwood, W.J., and L.C. Norkin. (1989): Class I major histocompatibility proteins as cell surface receptors for simian virus 40. *J. Virol.* 63:4474–4477.
- Bacia, K., Schwille, P., Kurzchalia, T. (2005): Sterol structure determines the separation of phases and the curvature of the liquid-ordered phase in model membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 102:3272-3277.
- Brodsky, F.M., Chen, C.Y., Knuehl, C., Towler, M.C., and Wakeham, D.E. (2001): BIOLOGICAL BASKET WEAVING: Formation and function of clathrin-coated vesicles. *Annu Rev Cell Dev Biol* 17:517-68.
- Caron, E., and Hall, A. (1998): Identification of two distinct mechanisms of phagocytosis controlled by different Rho GTPases. *Science* 282, 1717-21.
- Caruso, M., Belloni, L., Sthandier, O., Amati, P., and Garcia, M.I. (2003): $\alpha 4\beta 1$ integrin acts as a cell receptor for murine polyomavirus at the postattachment level. *J. Virol.* 77:3913–3921.
- de Beer, T., Carter, R.E., Lobel-Rice, K.E., Sorkin, A., and Overduin, M. (1998): Structure and Asn-Pro-Phe binding pocket of the Eps15 homology domain. *Science* 281:1357-60.
- De Camilli, P., Takei, K., and McPherson, P.S. (1995): The function of dynamin in endocytosis. *Curr Opin Neurobiol* 5:559-65.
- Deeks, E.D., Cook, J.P., Day, P.J., Smith, D.C., Roberts, L.M., and Lord, J.M. (2002): The low lysine content of ricin A chain reduces the risk of proteolytic degradation after translocation from the endoplasmic reticulum to the cytosol. *Biochemistry* 41:3405–3413.
- Dietzen, D.J., Hastings, W.R., and Lublin, D.M. (1995): Caveolin is palmitoylated on multiple cysteine residues. Palmitoylation is not necessary for localization of caveolin to caveolae. *J Biol Chem* 270:6838-42.
- Dimitrov, D. (2004): Virus entry: molecular mechanisms and biomedical applications. *Nat Rev Microbiol* 2:109–122.
- Dupree, P., Parton, R.G., Raposo, G., Kurzchalia, T.V., and Simons, K. (1993): Caveolae and sorting in the trans-Golgi network of epithelial cells. *Embo J* 12:1597-605.
- Eash, S., Atwood, W.J. (2005): Involvement of cytoskeletal components in BK virus infectious entry. *J. Virol.* 79:11734–11741.
- Eash, S., Querbes, W., Atwood, W.J. (2004): Infection of vero cells by BK virus is dependent on caveolae. *J. Virol.* 78:11583–11590.

- Elphick, G.F., Querbes, W., Jordan, J.A., Gee, G.V., Eash, S., Manley, K., Dugan, A., Stanifer, M., Bhatnagar, A., Kroeze, W.K., Roth, B.L., Atwood, W.J. (2004): The human polyomavirus, JCV, uses serotonin receptors to infect cells. *Science* 306:1380–1383.
- Ewers, H., Smith, A.E., Sbalzarini, I.F., Lilie, H., Koumoutsakos, P., and Helenius, A. (2005): Single-particle tracking of murine polyoma virus-like particles on live cells and artificial membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102:15110–15115.
- Ferguson, S.S. (2001): Evolving concepts in G protein-coupled receptor endocytosis: the role in receptor desensitization and signaling. *Pharmacol Rev* 53:1-24.
- Fra, A.M., Williamson, E., Simons, K., and Parton, R.G. (1995): De novo formation of caveolae in lymphocytes by expression of VIP21-caveolin. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:8655-9.
- Gilbert, J.M., and T.L. Benjamin. (2000): Early steps of polyomavirus entry into cells. *J. Virol.* 74:8582–8588.
- Gilbert, J.M., Goldberg, I.G., and Benjamin, T.L. (2003): Cell penetration and trafficking of polyomavirus. *J. Virol.* 77:2615–2622.
- Glenney, J.R., Jr. (1989): Tyrosine phosphorylation of a 22 -kDa protein is correlated with transformation by Rous sarcoma virus. *J Biol Chem* 264:20163-6.
- Gouin, E., Welch, M.D., Cossart, P. (2005): Actin-based motility of intracellular pathogens. *Current Opinion in Microbiology* 8:35-45.
- Haucke, V., and De Camilli, P. (1999): AP-2 recruitment to synaptotagmin stimulated by tyrosine-based endocytic motifs. *Science* 285:1268-71.
- Henley, J.R., Krueger, E.W., Oswald, B.J., and McNiven, M.A. (1998): Dynamin-mediated internalization of caveolae. *J Cell Biol* 141:85-99.
- Hinshaw, J.E. (2000): Dynamin and its role in membrane fission. *Annu Rev Cell Dev Biol* 16:483-519.
- Kartenbeck, J., Stukenbrok, H., Helenius, A. (1989): Endocytosis of simian virus 40 into the endoplasmic reticulum. *J. Cell Biol.* 109:2721–2729.
- Kirchhausen, T. (1999): Adaptors for clathrin-mediated traffic. *Annu Rev Cell Dev Biol* 15:705-32.
- Knipe, D.M., Howley, P.M., Griffin, D.E., Lamb, R.A., Martin, M.A., Roizman, B., Straus, S.E., *Fields Virology*, 5th Edition. Lippincott Williams and Wilkins 2007
- Komagome, R., Sawa, H., Suzuki, T., Suzuki, Y., Tanaka, S., Atwood, W. J., Nagashima, K. (2002): Oligosaccharides as receptors for JC virus. *J. Virol.* 76 (24), 12992–13000.
- Lee, E., and De Camilli, P. (2002): Dynamin at actin tails. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:161-6.

- Liebl, D., Difato, F., Horniková, L., Mannová, P., Štokrová, J., Forstová, J. (2006): Mouse polyomavirus enters early endosomes, requires their acidic pH for productive infection, and meets transferrin cargo in Rab11-positive endosomes. *J. Virol.* 80:4610–4622.
- Mannová, P., and Forstová, J. (2003): Mouse polyomavirus utilizes recycling endosomes for a traffic pathway independent of COPI vesicle transport. *J. Virol.* 77:1672–1681.
- McMahon, H.T. (1999): Endocytosis: an assembly protein for clathrin cages. *Curr Biol* 9:332-5.
- Mellman, I. (1996): Endocytosis and molecular sorting. *Annu Rev Cell Dev Biol* 12: 575-625.
- Michaely, P.A., Mineo, Ch., Ying, Y., and Anderson, R.G.W. (1999): Polarized distribution of endogenous Rac1 and RhoA at the cell surface. *J Biol Chem* 274:21430-21436.
- Monier, S., Parton, R.G., Vogel, F., Behlke, J., Henske, A., and Kurzchalia, T.V. (1995): VIP21-caveolin, a membrane protein constituent of the caveolar coat, oligomerizes in vivo and in vitro, *Mol Biol Cell* 6:911-27.
- Murata, M., Peranen, J., Schreiner, R., Wieland, F., Kurzchalia, T.V., and Simons, K. (1995): VIP21/caveolin is a cholesterol-binding protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:10339-43.
- Norkin, L.C., Anderson, H.A., Wolfrom, S.A., Oppenheim, A. (2002): Caveolar endocytosis of simian virus 40 is followed by brefeldin A-sensitive transport to the endoplasmic reticulum, where the virus disassembles. *J. Virol.* 76:5156–5166.
- Palade, G.E. (1953): Fine structure of blood capillaries, *J Appl Physiol* 24 1424.
- Pearse, B.M.F. (1987): Clathrin and coated vesicles. *EMBO J.* 6:2507-2512.
- Pelkmans, L. (2005): Secrets of caveolae- and lipid raft-mediated endocytosis revealed by mammalian viruses. *Biochimica et Biophysica Acta* 1746:295-304.
- Pelkmans, L., Fava, E., Grabner, H., Hannus, M., Habermann, B., Krausz, E., and Zerial, M. (2005): Genome-wide analysis of human kinases in clathrin- and caveolae/raft-mediated endocytosis. *Nature* 436:78-86.
- Pelkmans, L., Kartenbeck, J., Helenius, A. (2001): Caveolar endocytosis of simian virus 40 reveals a new two-step vesicular-transport pathway to the ER. *Nat. Cell Biol.* 3:473–483.
- Pelkmans, L., Puntener, D., and Helenius, A. (2002): Local actin polymerization and dynamin recruitment in SV40-induced internalization of caveolae. *Science* 296:535–539.
- Pho, M.T., Ashok, A., Atwood, W.J. (2000): JC virus enters human glial cells by clathrin dependent receptor-mediated endocytosis. *J. Virol.* 74:2288–2292.

- Qualmann, B., and Kelly, R.B. (2000): Syndapin isoforms participate in receptor-mediated endocytosis and actin organization. *J Cell Biol* 148:1047-62.
- Richterová, Z., Liebl, D., Horák, M., Palková, J., Štokrová, J., Hozák, P., Korb, J., and Forstová, J. (2001): Caveolae are involved in the trafficking of mouse polyomavirus virions and artificial VP1 pseudocapsids toward cell nuclei. *J. Virol.* 75:10880-10891.
- Rothberg, K.G., Heuser, J.E., Donzell, W.C., Ying, Y.S., Glenney, J.R., and Anderson, R.G. (1992): Caveolin, a protein component of caveolae membrane coats. *Cell* 68:673-82.
- Sapp, M., Day, P.M. (2009): Structure, attachment and entry of polyoma- and papillomaviruses. *Virology* 348:400-409.
- Sargiacomo, M., Sudol, M., Tang, Z., and Lisanti, M.P. (1993): Signal transducing molecules and glycosyl-phosphatidylinositol-linked proteins form a caveolin-rich insoluble complex in MDCK cells. *J Cell Biol* 122:789-807.
- Scaplehorn, N., Holmström, A., Moreau, V., Frishknecht, F., Reckmann, I., and Way, M. (2002): Grb2 and Nck act cooperatively to promote actin-based motility of vaccinia virus. *Current Biology* 12:740-745.
- Shajahan, A.N., Timblin, B.K., Sandoval, R., Tiruppathi, C., Malik, A.B., Minshall, R.D. (2004): Role of Src-induced dynamin-2 phosphorylation in caveolae-mediated endocytosis in endothelial cells. *J. Biol.Chem.* 279:20392–20400.
- Schelhaas, M., Malmstrom, J., Pelkmans, L., Haugstetter, J., Ellgaard, L., Grunewald, K., Helenius, A. (2007): Simian Virus 40 depends on ER protein folding and quality control factors for entry into host cells. *Cell* 131:516–529.
- Sieczkarski, S.B., and Whittaker, G.R. (2004): Viral entry. *Curr Top Microbiol Immunol* 285: 1–23.
- Smith, A.E., and Helenius, A. (2004): How viruses enter animal cells. *Science* 304: 237–242.
- Stehle, T., Harrison, S.C. (1996) Crystal structures of murine polyomavirus in complex with straight-chain and branched-chain sialyloligosaccharide receptor fragments. *Structure* 4:183–194.
- Suikkanen, S., Sääjärvi, K., Hirsimäki, J., Välilehto, O., Reunanen, H., Vihinen-Ranta, M., and Vuento, M. (2002): Role of recycling endosomes and lysosomes in dynein-dependent entry of canine parvovirus. *J. Virol.* 76:4401–4411.
- Suzuki, T., Okada, Y., Semba, S., Orba, Y., Yamanouchi, S., Endo, S., Tanaka, S., Fujita, T., Kuroda, S., Nagashima, K., and Sawa, H. (2005): Identification of FEZ1 as a protein that interacts with JC virus agnoprotein and microtubules. *The Journal of Biological Chemistry* 280:24948-24956.
- Tsai, B., Gilbert, J.M., Stehle, T., Lencer, W., Benjamin, T.L. & Rapoport, T.A. (2003): Gangliosides are receptors for murine polyoma virus and SV40 *EMBO J.* 22, 4346–4355.

Wary, K.K., Mainiero, F., Isakoff, S.J., Marcantonio, E.E., Giancotti, F.G. (1998): The adaptor protein Shc couples a class of integrins to the control of cell cycle progression. *Cell* 87:733–743.

Wendland, B., and Emr, S.D. (1998): Pan1p, yeast eps15, functions as a multivalent adaptor that coordinates protein-protein interactions essential for endocytosis. *J Cell Biol* 141:71-84.

Yamada, E. (1955): The fine structure of the gall bladder epithelium of the mouse, *J Biophys Biochem Cytol* 1:445-458.

Yarar, D., Waterman-Storer, C.M., and Schmid, S.L. (2005): A dynamic actin cytoskeleton functions at multiple stages of clathrin-mediated endocytosis. *Mol Biol Cell* 16:964–975.

Zullo, J., Stiles, C.D., and Garcea, R.L. (1987): Regulation of c-myc and c-fos mRNA levels by polyomavirus: distinct roles for the capsid protein VP1 and the viral early proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:1210–1214.