

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

Studijní program Biologie  
Studijní obor Molekulární biologie a biochemie organismů



**Petr Vomáčka**

**Vliv pH na iniciaci virové infekce**

Effect of pH on initiation of viral infection

**BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

Školitel: RNDr. Hana Španielová, Ph.D.

Praha, 2017

**Prohlášení:**

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

V Praze, 12. 05. 2017

Podpis

**Poděkování:**

Na tomto místě bych rád poděkoval své školitelce RNDr. Haně Španielové, Ph.D. za neutuchající podporu, bezmeznou trpělivost a cenné rady při zhotovování této práce a své rodině za příjemné rodinné zázemí a podporu nejen při studiu.

**Abstrakt:**

Kyselé pH se v organismech vyskytuje buď v intracelulárním, nebo extracelulárním prostředí. V intracelulárním prostředí se kyselým pH vyznačují především buněčné kompartmenty, jako jsou časná a pozdní endosomy nebo lysosomy. V extracelulárním prostředí je pak možné kyselé pH nalézt v hypoxických tkáních nebo ve tkáních, kde probíhá zánět nebo nádorové bujení. Pověštinou se jedná o hodnoty pH v rozmezí přibližně od 5,5 do 6,5. Tato práce se věnuje popisu konformačních změn virových proteinů, které nastávají v důsledku sníženého pH a vedou k uvolnění virových komponent z membránových kompartmentů buňky. Změny pH v organelách endocytických drah stejně jako změny extracelulárního pH ovlivňují významně infekci mnoha virů. Výzkum role pH v průběhu virových může přinést důležité poznatky pro vývoj protivirové a protinádorové léčby.

**Klíčová slova:** virus, konformace, pH, receptor, endocytóza

**Abstract:**

In organisms, acidic pH occurs either in the intracellular or extracellular environment. Intracellularly an acidic pH is found in particular cellular compartments, such as early and late endosomes or lysosomes. In the extracellular space, the acidic pH is found in hypoxic tissues, or in tissues where inflammation or tumour growth occurs. The value of the pH is usually in the range of approximately from 5.5 up to 6.5. This work focuses on the description of the conformation changes of viral proteins, which occur due to a decreased pH and lead to escape of viral components from membrane compartments. Changes in pH in organelles of endocytic pathways as well as changes in extracellular pH affect significantly the infection of many viruses. Research on the role of pH during the viral can bring important information for the development of antiviral and anticancer treatment.

**Key words:** virus, conformation, pH, receptor, endocytosis

## Seznam zkratek

A-MLV	amphotropic murine leukemia virus
aa	aminokyselina
Ad	adenovirus
Arg-Gly-Asp	arginin-glycin-kyselina asparagová
CAR	Coxsackievirus and Adenovirus receptor
DENV	virus dengue
DNA	deoxyribonukleová kyselina
dsDNA	dvouvláknová deoxyribonukleová kyselina
dsRNA	dvouvláknová ribonukleová kyselina
EGF	epidermální růstový faktor
ER	endoplasmatické retikulum
gB	glykoprotein B
HA	hemaglutinin
HIV	virus lidské imunodeficiency
IFITM	interferon – indukující transmembránový protein
LDL	nízkodenzní lipoprotein
MCSF	Macrophage colony-stimulating factor
MPF	manosa 6-fosfát
MPR	manosa 6-fosfátový receptor
HPV	lidský papillomavirus
MPyV	myší polyomavirus
MTOC	organizační centrum mikrotubulů

NA	neuraminidáza
NPC	jaderný pór
PDGF	plateled-derived growth factor
pH	potenciál vodíku
pK <sub>A</sub>	záporný dekadický logaritmus disociační konstanty
RNA	ribonukleová kyselina
RNP	ribonukleoprotein
RVG	glykoprotein viru vztekliny
SA	kyselina sialová
SFTSV	Severe fever with thrombocytopenia syndrome virus
ssRNA	jednovláknová ribonukleová kyselina
SV40	Simian virus 40
VSV	virus vesikulární stomatitidy
VSVG	glykoprotein viru vesikulární stomatitidy
WSSV	White spot syndrome virus
wt	divoký kmen

## Obsah

1.	Úvod .....	1
2.	Základní charakteristika viru .....	1
3.	Reprodukční cyklus virů .....	3
4.	Průnik viru do buňky .....	3
4.1.	Endocytóza a viry .....	4
5.	Vliv pH na infekci neobalenými viry .....	7
5.1.	Adenoviry .....	7
5.2.	Polyomaviry .....	9
5.3.	Rhinoviry .....	10
6.	Vliv pH na obalené viry .....	11
6.1.	Fúze s endosomální membránou a receptory I., II. a III. třídy .....	11
6.2.	Virus chřipky .....	12
6.3.	Virus herpes simplex .....	14
6.4.	Virus vztekliny a virus vesikulární stomatitidy (VSV) .....	15
7.	Vliv extracelulárního pH .....	17
8.	Závěr .....	20
	Seznam použité literatury .....	22

## 1. Úvod

Viry jsou obligátní vnitrobuněční parazité balancující na hraně živých a neživých organismů. Již ze své podstaty nesplňují kritéria definující vše živé. Ačkoliv se jedná o jednu z nejmenších parazitů, je jejich diverzita kolosální. Jejich složení, velikost, tvar, tropismus a patogeneze odpovídají co do množství variant, počtu druhů organismů, na kterých parazitují. (Lum & Cristea, 2016). Ačkoli nemohou být viry chápány jako živé entity, mají výrazný vliv na řadu živých organismů a jako takové mohou být chápány jako jeden z hlavních motorů evoluce. Viry si díky dlouhodobé koevoluci s hostitelskými organismy vytvořily strategie, které jim pomáhají při vstupu do hostitelských buněk. Mezi hlavní patří různé typy endocytózy, které v určitých případech vystavují viry kyselému prostředí v kompartmentech buňky.

Při přenosu mezi hostiteli chrání proti vlivům vnějšího prostředí viry svůj genom pomocí proteinové kapsidy a/nebo membránových obalů. Tato ochrana je v některých případech velmi účinná a některé viry jsou rezistentní k působení širokého spektra fyzikálních faktorů (teplota, tlak, pH). Přesto musí existovat mechanismy, které umožní, aby se ve správný čas kapsida rozvolnila a její obsah se uvolnil do nitra buňky. K tomu obvykle dochází při nebo velmi brzy po vstupu do hostitelské buňky. Metastabilita virionů je tedy často spojena právě se snížením pH při endocytóze.

V této práci jsem si proto vytyčil za cíl stručně popsat vliv intracelulárního i extracelulárního pH na živočišné viry.

## 2. Základní charakteristika viru

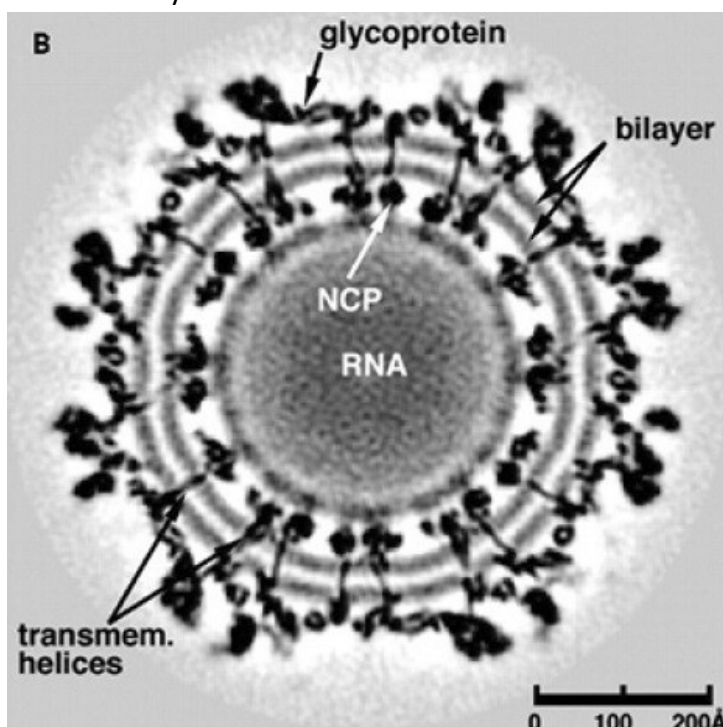
Viry jsou obligátní vnitrobuněční parazité. Bez hostitelského organismu se nemohou replikovat. Při reprodukci jsou zcela závislé na hostitelské buňce, žádný virus nekóduje ve svém genomu translační aparát. Často však kódují regulátory potřebné pro reprogramování buněčných pochodů. Některé viry mohou využívat komponenty hostitelské buňce nevlastní. Tyto komponenty si musí nést virus s sebou, což je mimo jiné případ virů využívajících enzym reversní transkriptázu.

Virový genom obsahuje buď ribonukleovou kyselinu (RNA) nebo deoxyribonukleovou kyselinu (DNA). Tyto genomy se následně mohou dělit podle počtu přítomných vláken nukleové kyseliny resp. pozitivního nebo negativního vlákna v případě RNA virů. Genom tvořený nukleovou kyselinou je uložen v kapsidě. Ta má jako taková základní funkci při ochraně

genetického materiálu viru a enzymů přítomných uvnitř. Kapsida se zpravidla rozvolňuje v průběhu virové infekci, kdy genom viru započíná svou cestu do jádra hostitelské buňky. Složitější viry se mohou skládat také z obalu tvořeného membránou hostitelské buňky.

Obal viru je tvořen hostitelskou membránou, která obsahuje glykoproteiny (Obr. č. 1), jež jsou kódované samotným virem. Membránu viry získávají při morfogenezi a při úniku z buňky. Jedná se především o membránu plasmatickou (*Arenaviridae*, *Filoviridae*, *Orthomyxo-viridae*) popř. endoplasmatického retikula (*Flaviviridae*, *Hepadnaviridae*), Golgiho aparátu (*Bunyaviridae*) nebo jadernou membránu (*Herpesviridae*) (Mahy & Van Regenmortel, 2008). Viry z čeledi *Poxviridae* mají dokonce mnohočetný obal odvozený z různých kompartmentů buňky. Základní strukturu však tvoří dvouvrstevná lipidická membrána a s ní asociované buněčné proteiny.

Díky buněčnému transportu dokáží viry inkorporovat své povrchové glykoproteiny, které jsou tvořené v endoplazmatickém retikulu hostitelské buňky do buněčné membrány (Weissenhorn *et al.*, 2007). Virový obal je relativně citlivý na vyschnutí, tepelné podněty a detergenty (Lichtenberg *et al.*, 2013). Výhoda virového obalu spočívá ve vysoké míře adaptability a v možné rychlé reakci na imunitní systém hostitele. Díky velkému počtu jedinců virového potomstva je možné setkat se s častým výskytem mutací nebo rekombinantních úseků v sekvencích kódující povrchové glykoproteiny, na které cílí protilátky hostitelského imunitního systému.



**Obr. č. 1: Alphavirus s viditelným virovým obalem**

Lipidový obal alphaviru tvořený lipidickou dvouvrstvou (bilayer) a virovými glykoproteiny E1 a E2 (glycoprotein), skrze dvouvrstvu prochází části helixů proteinů E1 a E2 (transmem. helices). Pod dvouvrstvou se nachází proteiny nukleokapsidy (NCP) tvořící vlastní kapsidu a obklopující genetickou informaci viru, v tomto případě RNA. Převzato a upraveno: Fields *et al.*, 2007



Oproti neobaleným virům, které mohou využívat podobné únikové strategie, mají obalené viry větší míru mutační volnosti, neboť při mutacích obalu nedochází k narušování stability existenčně důležité virové kapsidy. Při takovéto změně nemusí být dosavadní protilátky schopny rozeznat povrchové glykoproteiny a virus určitou dobu uniká imunitnímu systému. Mezi viry s vysokou adaptabilitou patří mimo jiné viry chřipky nebo viry vezikulární stomatitidy (VSV) (Hilleman, 1953, Novella *et al.*, 2005)

### 3. Reprodukční cyklus virů

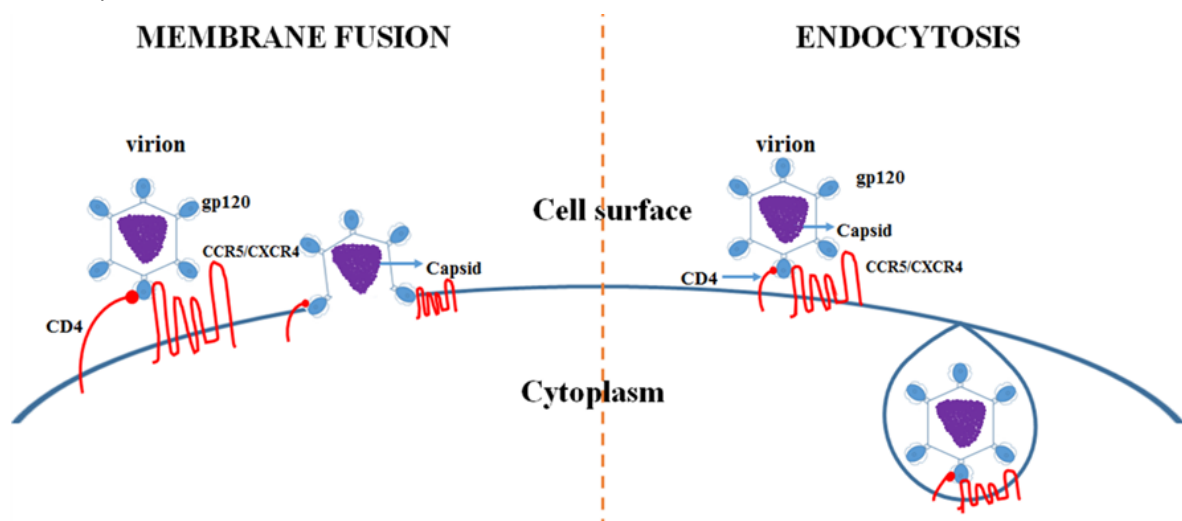
Obecně můžeme rozdělit životní cyklus virů do několika fází, a to na prvotní fázi virové adsorpce, v této fázi dochází ke zprostředkování kontaktu virion-buňka za pomoci receptorů na buněčném a virovém povrchu. Následnou fází je penetrace nebo pohlcení, kdy dochází k průniku virové částice do buňky. To může být uskutečněno mimo jiné pomocí endocytózy zprostředkované receptorem resp. fúze, popřípadě vstříknutím virového genomu do buňky hostitele, jako je tomu například u mnohých bakteriofágů. Jednotlivé strategie penetrace do hostitelské buňky se mezi obalenými a neobalenými viry mohou lišit (Tsai, 2007). Poté, co se virus dostane do hostitelské buňky, nastává fáze eklipsy, tedy uvolnění nukleové kyseliny z kapsidy, její replikace a syntéza virových proteinů. Zde můžeme nalézt jeden z mnoha rozdílů mezi RNA a DNA viry, kdy DNA viry musí přesunout svou genetickou informaci do jádra hostitelské buňky, zatímco RNA virům stačí k replikaci poloha v cytoplasmě buňky, protože pro translaci lze využít jejich genomová RNA (Smith & Helenius, 2004). Další fází je vlastní zrání virionů a po jejím dokončení nastává fáze uvolnění virionů z buňky.

### 4. Průnik viru do buňky

Infekce může proběhnout, jakmile dojde ke kontaktu mezi virem a hostitelskou buňkou. Tuto vazbu mohou zprostředkovávat různé buněčné proteiny, lipidy a cukerné složky proteinů a lipidů (Obr. č. 2). Diverzita používaných receptorů je nesmírná, některé nejsou vlastním receptorem pro vazbu viru, ale slouží pouze jako koreceptor. Jiné receptory jsou přímo zodpovědné za vazbu viru na buňku, signalizaci do cytoplasmy buňky a za iniciaci buněčné endosymbiózy. resp. za indukci konformačních změn, vedoucích k destabilizaci virionu, fúzi membrán a uvolnění virového genomu (Cossart *et al.*, 2014).

Mezi nejdůležitější vlastnosti virové kapsidy patří metastabilita. Kapsida vyniká odolností v extracelulárním prostředí, kdy efektivně brání degradaci virového genomu. V intracelulárním prostoru je naopak kapsida schopna rychlého rozvolnění, čímž umožní únik virového genomu, který se následně může replikovat v hostitelské buňce. Stabilita kapsidy může být ovlivněna mimo jiné mechanicky, jako je například vnitřní tlak v kapsidě, anebo chemicky, například kyselostí okolního prostředí. U mnohých virů je metastabilita a uvolnění genomu z kapsidy přímo závislé na změně pH. Okyselení často vede ke konformačním změnám kapsidových proteinů (Greber, 2016).

Pro vlastní vniknutí do buňky mohou viry využívat několik možností. Některé obalené viry dokáží indukovat přímou fúzi virového obalu s plazmatickou membránou buňky nebo vstupují pomocí endocytózy. Například pro virus HIV byly dokumentovány obě dvě strategie (Obr. č. 2).



**Obr. č. 2: Vstup HIV viru do buňky**

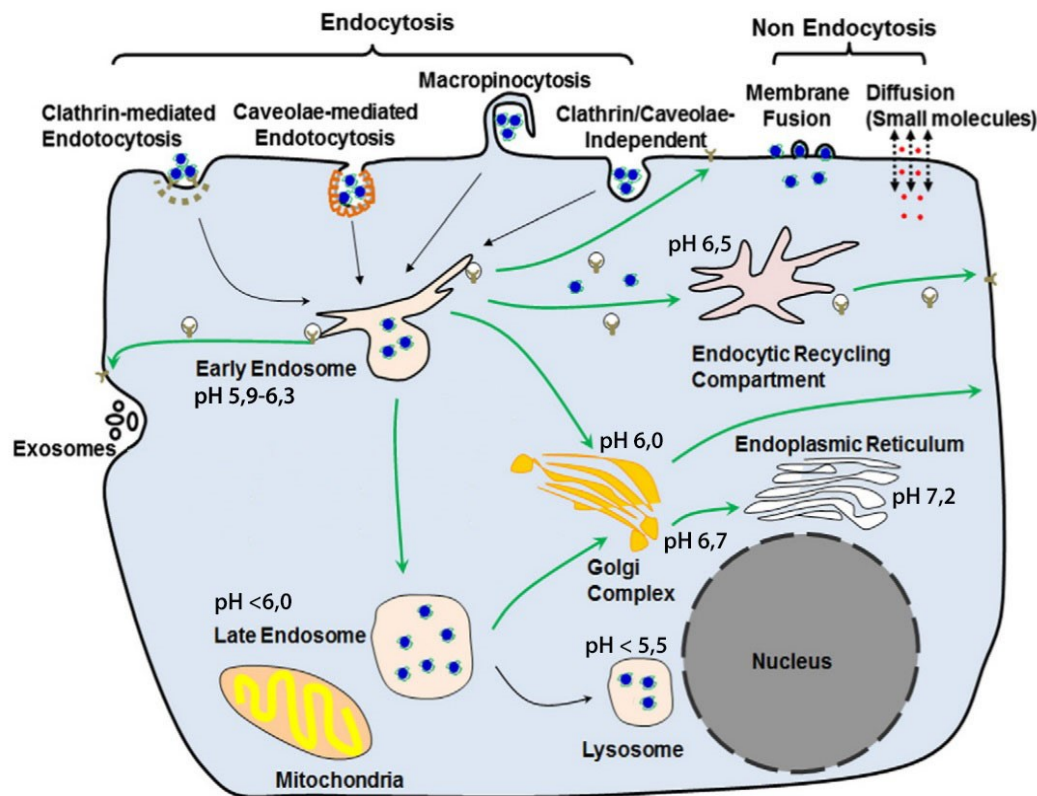
Dvě možné strategie vstupu viru HIV do buňky. Při fúzi virového obalu s plazmatickou membránou (membrane fusion) dochází k vazbě obalového glykoproteinu (gp120) na buněčný receptor CD4 a koreceptor CCR5 nebo CXCR4. Endocytóza viru HIV probíhá také po vazbě na receptor CD4, kdy dochází k buněčné signalizaci a iniciaci endocytózy. Převzato a upraveno: Balakrishna & Kondapi, 2016

#### 4.1. Endocytóza a viry

Endocytóza je pro vstup do buňky využívána téměř výhradně neobalenými viry. I při endocytóze však virus může volit různé endocytické dráhy (Obr. č. 3). Po vazbě na receptor dochází k endocytóze nejčastěji za vzniku klatrinových váčků (například adenovirus) (Gastaldelli et al., 2008) a nebo za vzniku váčků kaveolinových (například papillomaviry a polyomaviry) (Eash et al., 2004, Smith et al., 2008). Mezi další způsoby průniku do hostitelské buňky mohou být považovány makropinocytóza (Vaccinia virus, HIV-1, Coxsackievirus B)

(Maréchal et al., 2001, Coyne *et al.*, 2009, Lim & Gleeson, 2011), fagocytóza (Mimivirus) (Ghigo et al., 2008), popř. méně prozkoumané cesty, ve kterých se endocytózy neúčastní klatrinové ani kaveolinové váčky. Zde může být jmenována například flotilinová endocytóza, kterou využívá virus WSSV (z anglického White spot syndrome virus, WSSV) napadající krevety (Shi *et al.*, 2016). Bez ohledu na to, jaká cesta slouží pro vstup viru do buňky při endocytóze, jsou virové částice transportovány do časného endosomu.

Makropinocytóza je méně často využívána, oproti klatrinové nebo kaveolinové endocytóze, pro vstup viru do hostitelské buňky. Jedná se o řízený proces pohlcení především části okolní tekutiny a vytvoření nepravidelného váčku. Díky pohlcení tekutiny s blížící nespecifikovaným obsahem mohou být pohlceny také viry snažící se napadnout hostitelskou buňku.



**Obr. č. 3: Endocytické cesty umožňující vstup virů a do hostitelské buňky**

Zobrazené cesty jsou využívány mnoha viry k infekci hostitelských buněk. Pro tuto práci jsou významné pouze cesty, které jsou využívány viry. Zleva jsou zobrazeny cesty endocytické, mezi tyto cesty patří endocytóza za vzniku klatrinových resp. kaveolinových váček. Tyto váčky jsou směřovány do časného endosomu, kde jsou zároveň recyklovány buněčné receptory. Do časného endosomu/makropinosomu putují i váčky pohlcené makropinocytózou. Z časného endosomu mohou viry putovat do více částí buňky. Mezi ně patří recyklující kompartment s pH přibližně 6,5 (Endocytic Recycling Compartment), pozdní endosom s pH < 6,0 (Late Endosom), Golgiho komplex s pH na cis straně 6,7 a na trans 6,0 (Golgi complex), lysosom s pH < 5,5 (Lysosome), endoplasmatické retikulum s pH 7,2 (Endoplasmatic Reticulum). Převzato a upraveno z Au *et al.*, 2016

Mezi viry využívajícími makropinocytózu můžeme zařadit mimo jiné Vaccinia virus z čeledi *Poxviridae*, HIV-1 a A-MLV (z anglického *Amphotropic Murine Leukemia Virus*) z čeledi *Retroviridae*. Vaccinia virus mimikuje apoptotický materiál, především díky přítomnosti fosfatidylserinu a/nebo fosfatidylglycerolu a tím přinutí buňku k makropinocytóze (Lim & Gleeson, 2011, Blaas, 2016). U HIV-1 je makropinocytóza pouze jednou z možných cest viru, neboť HIV-1 může napadnout hostitelskou buňku i skrze fúzi plasmatické membrány nebo klatrinové endocytózy (viz Obr. č. 2). Oproti tomu u A-MLV je makropinocytóza zřejmě hlavním způsobem průniku do hostitelské buňky (Rasmussen & Vilhardt, 2015). Vznik váčků není závislý na klatrinu nebo kaveolinu. Jeho vznik je zapříčiněn přeskupováním aktinového cytoskeletu v buňce, vytvoření lamelipodií a obklopení části okolní tekutiny. Pohlčené váčky se sdružují do kompartmentu podobného časnému endosomu – makropinosomu. Následně makropinosom maturuje a dále může být recyklován a směřován buď na plasmatickou membránu, nebo může být poslán k degradaci do lysosomu (Bloomfield & Kay, 2016).

Endosomy fungují jako třídící a recyklační kompartmenty buňky. Důsledkem acidifikace lumen endosomu ( $\text{pH} \sim 6,5$ ) je uvolnění nákladu z buněčného receptoru. Receptor je po rozpojení vazby mezi ním a nákladem recyklován – transportován zpět na buněčnou membránu a připraven pro vazbu dalšího váčku. Příkladem může být recyklace manosa 6-fosfátového receptoru (MPR) nebo LDL receptoru (angl. *low density lipoprotein*).

U většiny váčků procházejících endocytickou cestou dochází k jejich dozrávání. Váčky přijaté buňkou putují do časného endosomu, kde se setkávají s  $\text{pH} \sim 6,2$  (Obr. č. 3). Transport do časného endosomu předně zajišťují regulační faktory typu Rab5 malé GTPázy (Scott *et al.*, 2014). Dle signální sekvence je náklad přesunut do následujících kompartmentů buňky. Například, pokud má být náklad degradován, tak podstupuje cestu skrze pozdní endosom s  $\text{pH} < 6$ , za přispění Rab7 GTPás, až do lysosomu kde je  $\text{pH} < 5,5$ , což umožňuje mimo jiné degradaci cizorodých, nebo nepotřebných aminokyselin (Scott *et al.*, 2014, Yamauchi & Greber, 2016). Dále mohou váčky putovat do recyklujících endosomů, ve kterých je  $\text{pH} \sim 6,5$  a dále na plasmatickou membránu. Transport do recyklujícího endosomu zajišťují Rab11 GTPázy (Ullrich *et al.*, 1996, Goldenring, 2015). Z časného endosomu se mohou dostat váčky také do Golgiho aparátu (GA) s  $\text{pH}$  v rozmezí hodnot od 6,0 po 6,7 a přes GA se mohou dostat až do endoplasmatického retikula (ER). Transport pomocí váčku do ER využívají například zástupci virů z čeledi *Polyomaviridae* (Kartenbeck *et al.*, 1989).

Viry, které přímo využívají změn pH při průchodu skrze jednotlivé kompartmenty buňky řadíme mezi viry na pH závislé a jsou jimi například neobalené adenoviry nebo obalené viry herpes simplex a viry chřipky (Li *et al.*, 2014, Scherer & Vallee, 2015, Weed *et al.*, 2016). Oproti tomu můžeme nalézt viry, u kterých není infekce změnou pH ovlivněna a probíhá i přes záměrné zastavení acidifikace kompartmentů buňky. K tomu lze experimentálně využít řadu látek, které neutralizují prostředí endosomů (Van Weert *et al.*, 1995). Například vliv pH na iniciaci virové infekce u lidského retroviru XMRV (z anglického Xenotropic murine leukemia virus-related virus) byl zkoumán na lidské buněčné linii HTX po inkubaci s chloridem amonným (NH<sub>4</sub>Cl), který snižuje kyselost v endosomálních kompartmentech nebo s bafilomycinem A1 (BafA1), který inhibuje protonové pumpy. Vystavení HTX buněk NH<sub>4</sub>Cl podpořilo infekci XMRV a u kontrolního vzorku buněk s VSV (pH závislý virus) byla infekce potlačena. Stejný výsledek byl pozorován i v případě BafA1 a experiment byl ověřen i na buňkách 293 a na lidských buňkách rakoviny prostaty (Côté *et al.*, 2012).

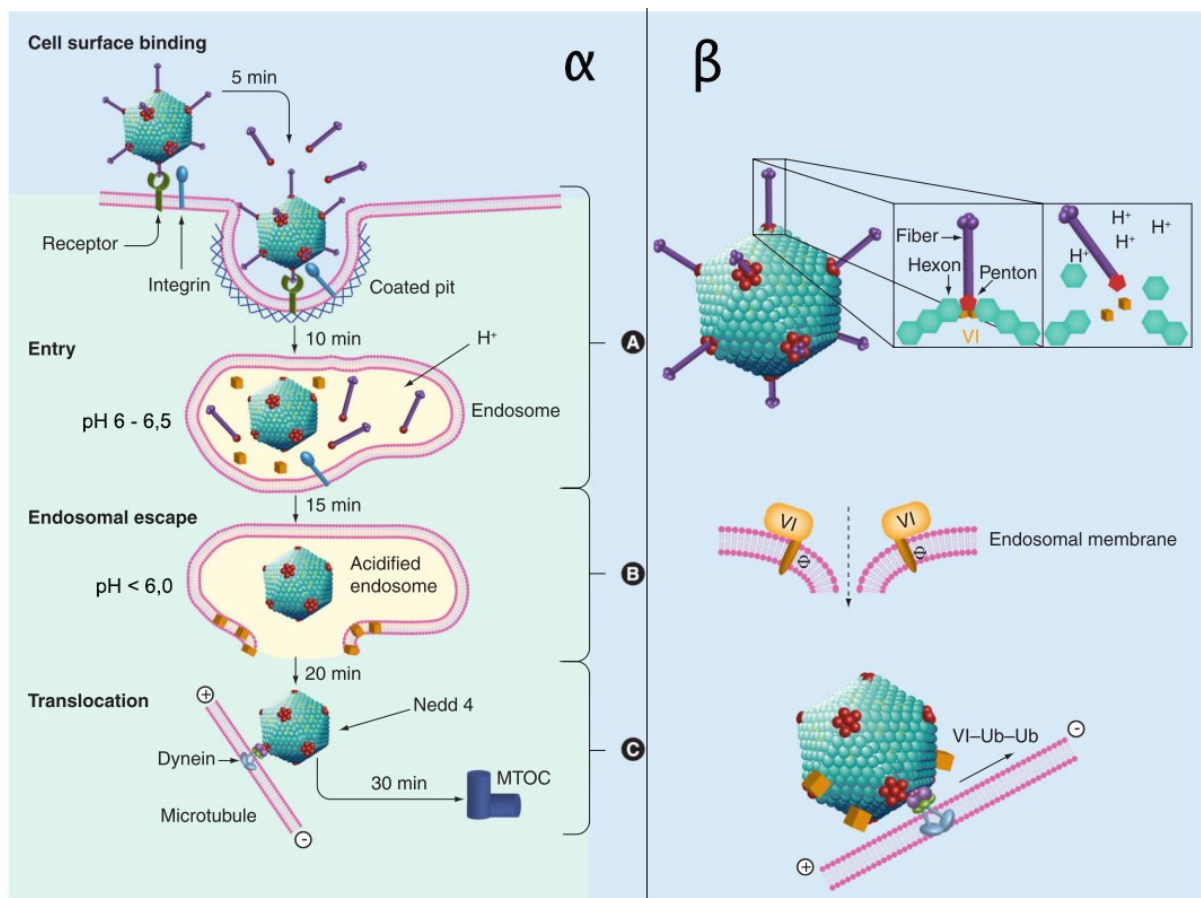
## 5. Vliv pH na infekci neobalenými viry

Předpokládá se, že změny pH mohou u neobalených virů způsobovat změny v konformacích kapsidových proteinů. K těmto změnám dochází například v endosomech a mohou vést k následné destabilizaci membrány endosomu vlivem exponovaných domén virových proteinů a úniku viru do cytoplasmy.

### 5.1. Adenoviry

Vliv pH na účinnost virové infekce byl velmi dobře popsán u adenovirů (Obr. č. 4). Kontakt viru s hostitelskou buňkou je zprostředkován homotrimerickými vlákny viru. Jako receptory pro přichycení viru na buňku slouží převážně receptory CAR (z anglického *Coxsackievirus and Adenovirus receptor*“), CD46 a receptory Her2/*neu* a desmoglein2 (DSG-2; sérotypy Ad-3, Ad-7, Ad-11, Ad-14). (Bergelson *et al.*, 1997, Wang *et al.*, 2011). Po vazbě vlákno-receptor dochází k disociaci vlákna a vazbě mezi pentonovou basí adenoviru, vystavující na svém povrchu peptidovou RGD (Arg-Gly-Asp) sekvenci a integriny v buněčné plasmatické membráně. Mezi integriny rozpoznávající RGD motiv patří:  $\alpha_5\beta_1$ ,  $\alpha_{11b}\beta_3$  a velká část integrinů  $\alpha_v$  (Wickham *et al.*, 1993). Vazba na integriny aktivuje druhé posly v buněčné signalizaci a dochází k cytoskeletárnímu přeskupení, které dává za vznik klatrinovému váčku. Do tohoto obalu je inkorporován příslušný adenovirus navázaný na integriny. Vzniklý váček je transportován za účasti Rab5 GTPázy do časného endosomu

(Gastaldelli *et al.*, 2008). Po inkorporaci váčku do endosomu je vystaven virus sníženému endosomálnímu pH. To je způsobeno H<sup>+</sup>ATPasovými pumpami a jakmile je virus vystaven pH<6 dochází ke konformačním změnám pentonových basí, jejich odpojení a perforaci stěny endosomu. Tomu předchází inkorporace vnitřních kapsidových proteinů VI, které membránu endosomu rozruší (Wiethoff *et al.*, 2005). Následně virus uniká do cytoplasmu buňky. Z časného endosomu unikají především Ad2 a Ad5. V některých případech se adenovirus dostává až do pozdního endosomu odkud uniká do cytoplasmu. Tato skutečnost byla pozorována například u Ad7.



**Obr. č. 4: Vstup adenoviru 5 (Ad5) do buňky hostitele pomocí receptorem zprostředkované endocytózy a lyze endosomální membrány**

**(α, A)** Adenovirus se při kontaktu s hostitelskou buňkou váže na buněčný receptor (CAR, CD46 a jiné). Následně dochází k vazbě na buněčný integrin a tvorbě klátrinového váčku, váček se dostává do časného endosomu (pH 6), endosom je okyselován pomocí H<sup>+</sup>ATPasových pump. Díky styku s kyselým pH dochází k odpojení pentonových basí. **(β, A)** Strukturní model adenoviru s přiblíženou oblastí homotrimerického vlákna, pentonové báze a hexonu kapsidy. **(α, B)** Vnitřní kapsidový protein VI se inkorporuje do endosomální membrány a způsobuje její lyzi, což umožňuje únik viru do cytoplasmu buňky. **(β, B)** Model inkorporace proteinu VI do membrány endosomu a lyze membrány. **(α, C)** Virus se podél mikrotubulů za pomoci dyneinu koncentruje v oblasti MTOC, odkud e následně za přispění kinesinu transportován k NPC. **(β, C)** Transport podél mikrotubulu k MTOC. Převzato a upraveno: (Henaff *et al.*, 2011)

Má se za to, že únik Ad7 z endosomu je méně efektivní oproti Ad5. Rozdílná kinetika mezi virem Ad5 a Ad7 je zřejmě způsobena rozdílnou délkou homotrimetických vláken, odlišnou efektivitou proteinu VI a odlišnou silou vazby na příslušný receptor. Mezi virem Ad5 a Ad7 je možné pozorovat rozdíly i při rychlosti transportu do jádra buňky (Miyazawa *et al.*, 1999, Miyazawa *et al.*, 2001).

Po úniku do cytosolu buňky putuje adenovirus podél mikrotubulů k organizačnímu centru mikrotubulů (MTOC) za účasti dyneinu (Leopold *et al.*, 2000, Bailey *et al.*, 2003). V okolí MTOC dochází k akumulaci virů a následně putují podél mikrotubulů za účasti kinesinu-1 k jadernému póru (NPC), kde se váže skrze protein Nup214. Kinesin-1 provede rozrušení kapsidy navázané na Nup214 a následně se dostává genom viru do jádra hostitelské buňky (Strunze *et al.*, 2011, Montespan *et al.*, 2017). V jádře probíhá samotná replikace viru. Hlavním rozdílem mezi místy průniku viru do cytoplasmy, je hodnota pH, která pro únik z endosomu dosahuje hodnoty 6.0, zatímco pro únik z pozdního endosomu dosahuje hodnoty pH ~ 5,5 (Miyazawa *et al.*, 2001).

## 5.2. Polyomaviry

U polyomavirů, například u SV40 (z anglického Simian virus 40) byla pozorována endocytóza za účasti caveolinových váčků. Tento způsob endocytózy není tak častý a oproti klatrinovým váčkům je také pomalejší. SV40, stejně jako myší polyomavirus (Liebl *et al.*, 2006), může pravděpodobně využívat pro internalizaci i monopinosytické váčky bez caveolinu (Engel *et al.*, 2011). Caveolinové váčky mají v průměru 50 – 100 nm a vznikají invaginací lipidových raftů plasmatické membrány. Plasmatická membrána je v místě vznikajících invaginací bohatá na cholesterol a glykosfingolipidy. (Lisanti *et al.*, 1994, Blaas, 2016).

Je důležité zmínit, že mnohé polyomaviry vstupují do cytosolu hostitelské buňky skrze endoplasmatické retikulum s vnitřní hodnotou pH přibližně 7,2 (Kartenbeck *et al.*, 1989). Jakmile je však v průběhu infekce pozastaveno okyselování buněčných kompartmentů, tak dochází k blokaci infekce (Liebl *et al.*, 2006, Engel *et al.*, 2011). Z toho lze vyvodit, že při cestě skrze kompartmenty buňky je vystavení viru nízkému pH nezbytné.

Prvním krokem pro vstup viru do buňky je vazba viru SV40 skrze majoritní kapsidový protein VP1 na gangliosidový receptor GM1 nacházející se na plasmatické membráně buňky (Tsai *et al.*, 2003). Zformování vlastních váčků má na starost protein caveolin (Cav1) (Lajoie & Nabi, 2010). Po vytvoření váčku dochází k transportu SV40 přes časný endosom do endoplasmatického retikula (ER) za přispění aktinového cytoskeletu a mikrotubulů (Kartenbeck *et al.*, 1989). Po splynutí váčku s ER následuje vazba ER chaperonů, probíhající v lumen ER. Vazby na virovou částici se účastní především BiP proteiny (z anglického *binding immunoglobulin protein*) z rodiny chaperonů Hsp70, které způsobí konformační změny virové částice a zároveň ochrání odhalené hydrofobní části minoritních virových proteinů VP2 a VP3. Před samotnou vazbou na membránu ER musí být rozrušena vazba mezi BiP a hydrofobními částmi minoritních VP2 a VP3 proteinů viru SV40. Mechanismus rozrušení vazby je zatím nejasný (Inoue & Tsai, 2015). Proces penetrace je však nadále řízen komplexem Hsp70 – Hsp105 – SGTA (z anglického *Small glutamine-rich tetratricopeptide repeat-containing protein alpha*). Další funkce SGTA jsou momentálně nejasné, avšak je možné, že se tento protein podílí na transportu viru z cytosolu do jádra buňky (Dupzyk *et al.*, 2017). Po uvolnění hydrofobních částí SV40 dochází k vazbě na membránu ER, její penetraci a úniku viru SV40 do cytosolu buňky. Virus dále putuje skrze NPC do jádra buňky, kde může zahájit svou replikaci (Anderson *et al.*, 1996).

### 5.3. Rhinoviry

Rhinoviry patří do čeledi *Picornaviridae* a dle Baltimorovy klasifikace se řadí do 4. třídy sdružující (+)ssRNA viry. Přibližně rhinoviry zastřešují skupinu virů čítající kolem 150 různých sérotypů. Převážná část lidských rhinovirů využívá pro vniknutí do hostitelské buňky kyselý pH. Pro vazbu viru na povrch buňky je nezbytný receptor ICAM-1. Po vazbě následně putují viry v klatrinových váčcích do časného endosomu. V časném endosomu využívají rhinoviry kyselého pH pro iniciaci útěku do cytoplasmy buňky. Jakmile bylo experimentálně zamezeno okyselování endosomů použitím bafilomycinu nebo chloridu amonného, byla infekce rhinovirů zastavena. Při tomto pokusu bylo také zjištěno, že použití nocodazolu, inhibitoru transportu spřaženého s mikrotubuly, který blokuje transport mezi časným a pozdním endosomem, resp. lysozomem nemělo vliv na průběh infekce (Nurani *et al.*, 2003). Fakt, že při použití nocodazolu nebyl pozorován vliv na infekce buněk je zřejmě zapříčiněn použitými subtypy rhinovirů, tedy HRV2, HRV3, HRV14 a HRV16.



Z experimentu z roku 2016, které provedl Conzemijs *et al.* vyplývá, že existuje několik cest, které lidské rhinoviry mohou použít pro průnik do cytoplasmy. Při experimentu byl využit již zmíněný sérotyp HRV14, ale také HRV89. Při zkoumání bylo potvrzeno, že nocodazol nemá vliv na infekci HRV14 a ta je tedy ovlivňována pouze zásahy do acidifikace časného endosomu. Avšak při zkoumání infekce u HRV89 bylo zjištěno, že použití nocodazolu je neslučitelné s úspěšným průběhem infekcí. Tudíž se podařilo dokázat, že některé subtypy se do cytoplasmy dostávají skrze odlišné buněčné kompartmenty s nižšími hodnotami pH oproti časnému endosomu, jako jsou pozdní endosomy nebo endocytické recyklační kompartmenty (Conzemijs *et al.*, 2016).

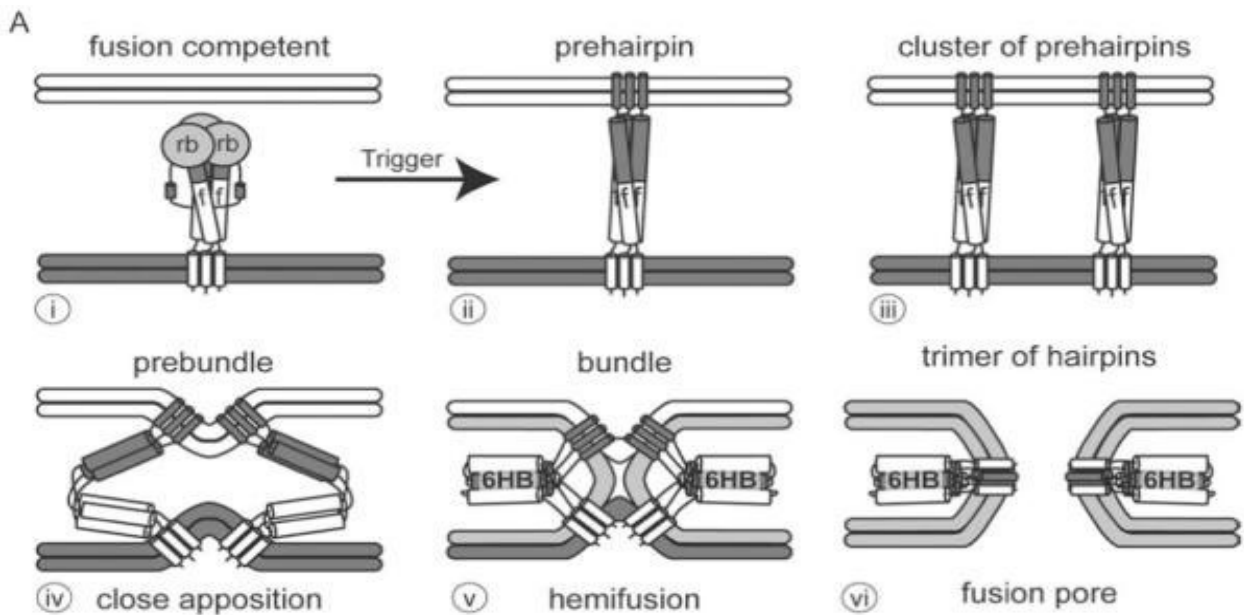
## 6. Vliv pH na obalené viry

U obalených virů může mít pH vliv na konformační změny obalových glykoproteinů, které zprostředkovávají fúze membrán. Obalené viry, které vstupují do cytoplasmy buňky fúzí obalu viru a plasmatické membrány hostitelské buňky, mohou být ovlivněny extracelulárním pH. U virů vstupujících do buňky skrze endocytózu dochází především k vlivu intracelulárního pH v kompartmentech buňky.

### 6.1. Fúze s endosomální membránou a receptory I., II. a III. třídy

Po endocytóze zprostředkované receptorem dochází k splynutí obalové membrány viru a membrány endosomálního kompartmentu. Způsob, jakým se při této fúzi uplatňují virové glykoproteiny, se mezi viry liší a tyto glykoproteiny se rozdělují na tři typy, receptory I., II. a III třídy, které umožňují fúzi membrán (Backovic & Jardetzky, 2009). Receptorem se v tomto případě myslí fúzní obalové proteiny nacházející se na povrchu viru.

Pro všechny třídy jsou společné konformační změny doprovázející fúzi membrán (Obr. č. 5), avšak detaily těchto změn se u každé z nich liší. Původně se uvažovalo pouze o dvou třídách receptorů (třída I. a třída II.), avšak pozdější výzkum ukázal, že u některých virů je fúzní mechanismus jiný. Mezi viry s nově zařazeným receptorem III. třídy patří mimo jiné rhabdoviry (Roche *et al.*, 2006; Roche *et al.*, 2007), herpesviry (Heldwein *et al.*, 2006; Backovic *et al.*, 2009) a baculoviry (Kadlec *et al.*, 2008). Konformační změnou se receptor dostává do stavu s nejnižší energetickou hladinou (Chen *et al.*, 1995).



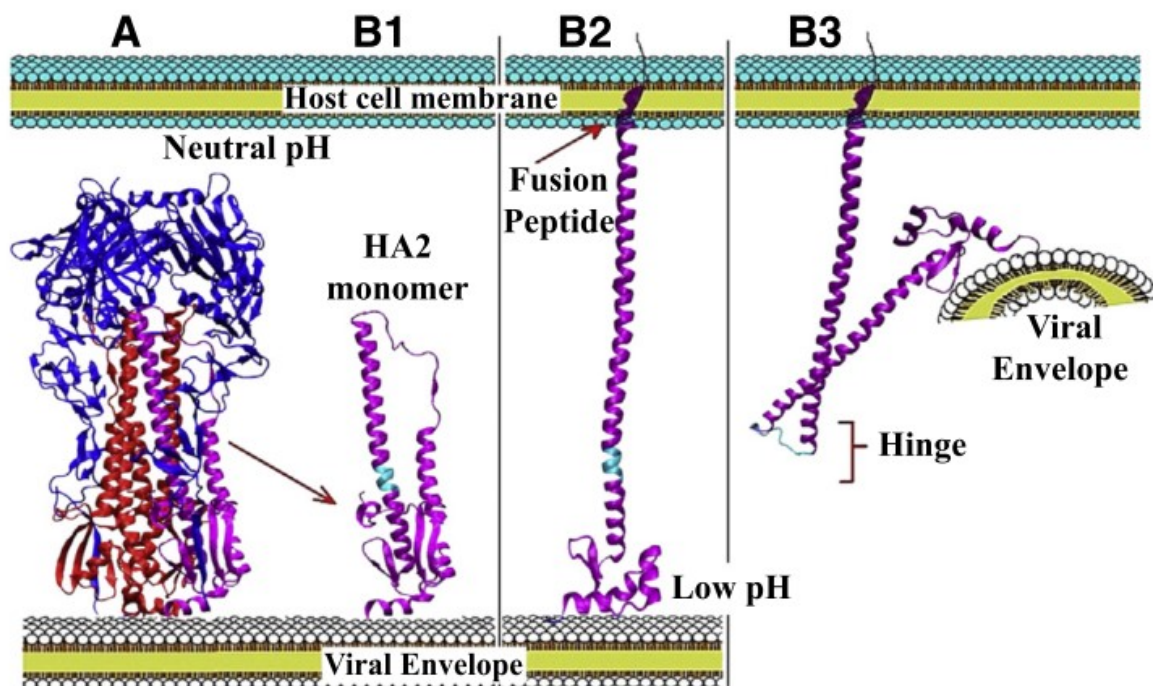
**Obr. č. 5: Obecný model znázorňující fúzi virového obalu a buněčné membrány**

(i) pre-fúzní konformace fúzního trimeru, (ii) konformační změna a vazba na hostitelskou membránu, (iii) vazba více trimerů v definované oblasti, (iv) přibližování virového a hostitelské membrány, (v) hemifúzní stav a počátek tvorby fúzního póru, (vi) hotový fúzní pór. Převzato a upraveno: White *et al.*, 2008

Tyto změny jsou z podstaty věci vyvolávány nízkým pH. Avšak na každý druh viru mohou mít změny pH jiný vliv. Hodnota pH je závislá na teplotě, která je v živočišné říši velice variabilní, a proto je striktní určení jediné hodnoty pro každý jednotlivý virus nemožné. Pro povrchový glykoprotein hemagglutinin (HA) X-31 viru chřipky platí, že při teplotě 37° C dochází k fúzi membrán při pH = 5,6 zatímco při teplotě 62° C postačuje pH = 7,3 (Skehel & Wiley, 2000).

## 6.2. Virus chřipky

Viry chřipky patří do čeledi *Orthomyxoviridae* a dle Baltimorovy klasifikace jsou řazeny do 5. třídy, která souhrnně označuje -ssRNA viry. Na povrchu virů chřipky je možné nalézt několik povrchových proteinů. Především jedná se o hemagglutinin (HA), neuraminidázu (NA), matrixový protein M1 a matrixový protein M2. Díky hemagglutininu, přesněji trimeru z  $\alpha$  helikálních domén HA a terminální sialové kyseliny (SA), která je součástí membránových glykoproteinů a glykolipidů hostitelské buňky dochází k vazbě viru na plasmatickou membránu buňky. Tato vazba vyvolá odpověď buňky ve formě tvorby klatrinových váčků (Skehel & Wiley, 2000). Endocytóza probíhá za přispění mnoha buněčných faktorů, jako jsou například Rab5, Rab7 malé GTPázy a interferon-indukující transmembránové proteiny (IFITM-1,2,3).



**Obr. č. 6: Konformační změny hemagglutininu viru chřipky v závislosti na změně – snížení hodnoty pH**

**(A)** 3D zobrazení struktury hemagglutininu ukotveného ve virové membráně v neutrálním pH tvořeného podjednotkami HA1 a HA2 v homotrimerní podobě, HA2 homotrimer se nachází v centru struktury (červená a fialová) a je kryt zvnějšku HA1 homotrimerem (modrá). **(B1)** Monomer HA2 podjednotky ohnutý v rozmezí 63-72 aa a vyznačenou oblastí následného ohybu při přiblížení membrán (tyrkysová). **(B2)** Jehlovitá struktura HA2 pronikající svým N-koncem – fúzním peptidem do membrány endosomu. Tato struktura vzniká konformační změnou při snížení pH. **(B3)** Ohyb HA2 podjednotky způsobující vlastní přiblížení virové membrány a membrány endosomu. Převzato a upraveno: Kalani *et al.*, 2013

Vzniklý klatrinový váček je transportován do časného endosomu (Li *et al.*, 2014). Nízké pH, které se ustavuje v endosomu vyvolá nevratnou změnu konformace HA (Obr. č. 6). Každý monomer HA je tvořen ze dvou podjednotek – HA1 (328 aa) a HA2 (221 aa). Ohnuté HA2 podjednotky jsou ukryty v pouzdře tvořeném ze tří HA1 podjednotek. Při snížení hodnoty pH se pouzdro z HA1 odpojuje a dochází k narovnání HA2 podjednotek. Konformační posun vypudí N terminální konec HA2 podjednotek tak, že je možné ho inkorporovat do membrány endosomu. Po připojení N-konce dochází k opětovnému ohnutí HA2 podjednotky a k přiblížení obou membrán – virové i endosomální (Chernomordik *et al.*, 1998, Kalani *et al.*, 2013). Touto inkorporací dochází k fúzi virové membrány a membrány endosomu. Před proběhnutím samotné fúze je aktivován iontový kanál, závislý na hodnotě pH, jenž je tvořený proteinem M2. Tento kanál zprostředkovává transfer vodíkových iontů do lumen virového obalu. Okyselení způsobí disociaci virového matrix proteinu (M1) od virového

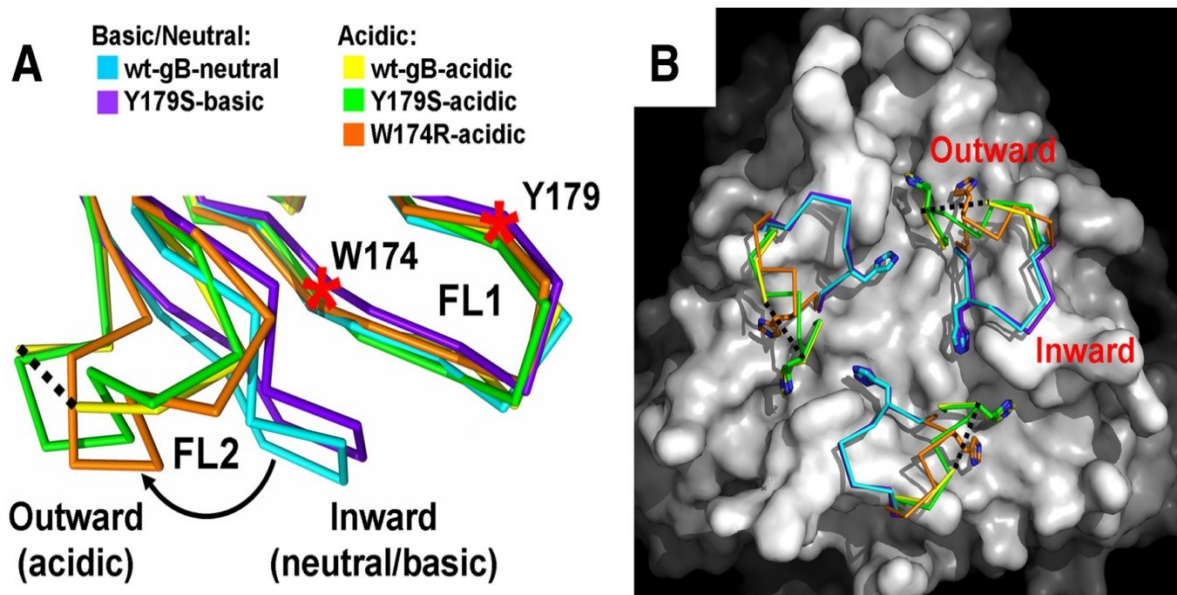
ribonukleoproteinového (vRNP) komplexu. Po proběhlé disociaci je vRNP komplex uvolněn do cytoplasmy a následuje jeho transport do buněčného jádra. Transport zajišťují především buněčné importiny (importin- $\alpha$  a importin- $\beta$ ). Ve fázi pozdního endosomu disociuje i matrixový protein M1, který se do jádra dostává samostatně (Schnell, 2011, Matsuoka *et al.*, 2013, Saotome *et al.*, 2015).

### 6.3. Virus herpes simplex

Viry herpes simplex spadající do čeledi *Herpesviridae*. Dle Baltimorovy klasifikace se řadí do 1. třídy, která označuje dsDNA viry. Rozdíl oproti viru chřipky můžeme sledovat v tom, že cesta skrze endocytózu není hlavním vstupním mechanismem. Tím je fúze obalu viru s plasmatickou membránou. To, zda virus bude vstupovat do buňky skrze fúzi nebo endocytózu závisí na typu buněk, které napadá (Muggeridge, 2012). V obalu herpesvirů se nachází několik glykoproteinů podílejících se na fúzi membrán. Jsou jimi glykoprotein B, glykoprotein H a glykoprotein L, které se nachází u všech herpesvirů. U alphaherpesvirů je možné se setkat ještě s glykoproteinem D (Stampfer *et al.*, 2010).

Hlavním virovým glykoproteinem herpesvirů je glykoprotein B (gB) - oligomer, který má nejkonzervovanější podobu. Jedná se o fúzní protein III. třídy a právě glykoprotein B je nejvíce ovlivněn změnou - snížením pH v endosomu buňky (rozmezí pH $\sim$ 5,0-6,0). Při vystavení gB sníženému pH dochází k rozpadu gB oligomeru v oligomer nižšího řádu. Tyto změny jsou však pouze lokálního charakteru, globální konformační změny nebyly zaznamenány u divokého kmene viru (wt) ani u jiných mutant. Takto vzniklý oligomer nižšího řádu má výraznější hydrofobní vlastnosti – jsou odhalovány hydrofobní regiony, jako jsou fúzní peptidy nebo fúzní smyčky. Dříve bylo uváděno, že tyto konformační změny jsou vratné, což lze považovat za markantní rozdíl oproti fúzním proteinům 1. a 2. třídy, u kterých jsou tyto změny nevratné (Dollery *et al.*, 2010). Avšak při následném zkoumání gB bylo zjištěno, že při vystavení pH  $\sim$  5 dochází k nevratné změně oblasti H126. Pokud tedy není gB vystaven kyselému pH v blízkosti hostitelské membrány s kterou by mohl fúzovat, dochází k nevratné konformační změně gB a virus se stává neschopným fúze (Weed *et al.*, 2016). Na glykoproteinu B můžeme nalézt hned 2 hydrofobní fúzní smyčky – FL1, FL2 přímo zodpovědné za proběhnutí fúze membrán (Obr. č. 7). Mutace v těchto smyčkách vede ke vzniku defektních virových částic neschopných uniknout z endosomu. Pomocí elektronové mikroskopie a gelové chromatografie bylo zjištěno, že nízké pH ovlivňuje především podobu FL2 smyčky

v pozici 257-264. Smyčka FL2 se nachází především ve dvou polohách – první směřující dovnitř (*inward*) a druhá směřující ven (*outward*). Při normální hodnotě pH je smyčka v poloze směrem dovnitř, při kyselém pH směřuje ven (Stampfer *et al.*, 2010). Ve smyčce FL2 se v pozici 263 nachází Histidin, jehož náboj je vysoce citlivý na změny vedoucí k nižšímu pH.  $pK_A$  histidinu je ve fyziologickém prostředí přibližně 6,5, tudíž je v kyselejších pH protonovaný a nese kladný náboj, tyto vlastnosti jsou pro konformační změnu vlivem kyselého pH klíčové.

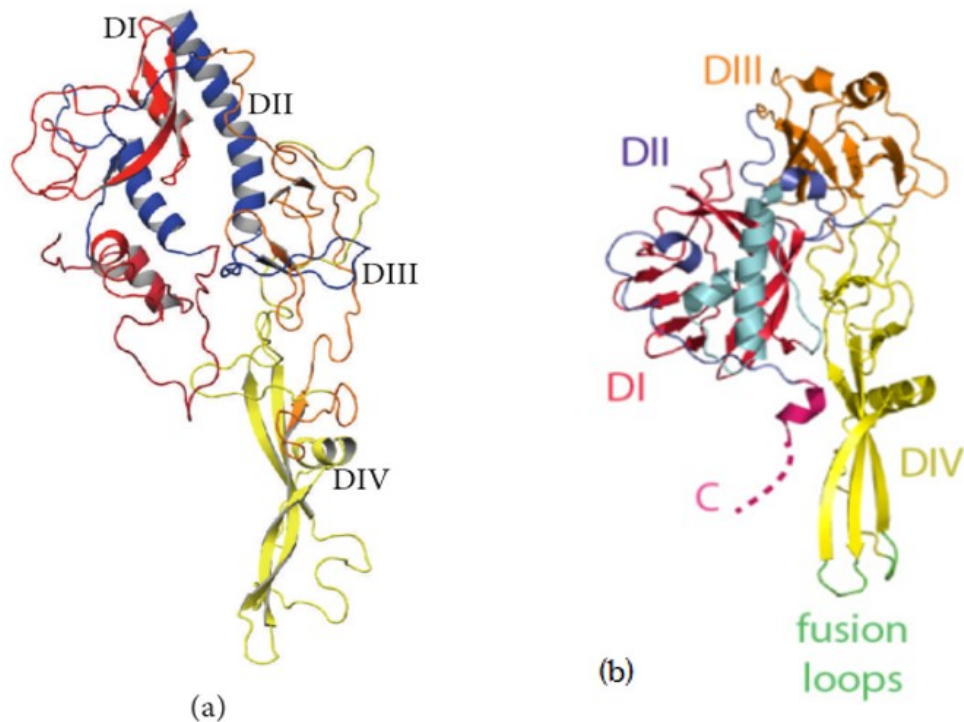


**Obr. č. 7: Konformační změny fúzní smyčky FL2 viru herpes simplex v závislosti na změně – snížení hodnoty pH a fúzní smyčka FL1 nereagující na změny pH**

**(A)** Regiony fúzních smyček při pohledu z boku, změna konformace smyčky FL2 z pozice „inward“ v neutrálním resp. zásaditém pH (*wt-gB* a *Y179S*) a změna do pozice „outward“ v kyselém pH (*wt-gB*, *Y179S* a *W174R*). Pozice smyčky FL1 je v závislosti na pH neměnná. **(B)** Pohled na povrch struktury trimeru glykoproteinu B a jeho fúzní smyčky, změna konformace z pozice „inward“ v neutrálním resp. zásaditém pH do pozice „outward“ v kyselém pH. Převzato a upraveno: Stampfer *et al.*, 2010

#### 6.4. Virus vztekliny a virus vesikulární stomatitidy (VSV)

Virus vztekliny (angl. Rabies virus) patří do rodu *Lyssavirus* a VSV (angl. *vesicular stomatitis virus*) patří do rodu *Vesiculovirus* náleží do čeledi *Rhabdoviridae* a dle Baltimorovy klasifikace jsou řazeny do 5. třídy sdružující -ssRNA viry. VSV i virus vztekliny patří mezi obalené viry a na jejich povrchu můžeme nalézt fúzní glykoproteiny (z anglického *rabies virus glycoprotein* – RVG, *vesicular stomatitis virus glycoprotein* - VSVG) (Obr. č. 8). RVG i VSVG jsou homotrimerní glykoproteiny hrající klíčovou roli při fúzi s endosomální membránou a úniku do cytoplasmu buňky.



**Obr. č. 8: Strukturní model viru vztekliny a VSV glykoproteinu s vyobrazenými čtyřmi doménami**  
**(a)** Strukturní model monomeru glykoproteinu viru vztekliny s barevně odlišenými čtyřmi doménami., IV. doména (DIV) – fúzogenní, je při snížení pH přesunuta tak, že na svém povrchu odhaluje fúzní smyčky nacházející se v koncové části domény. **(b)** Strukturní model monomeru glykoproteinu viru vesikulární stomatitidy (VSV) s barevně odlišenými čtyřmi doménami. IV. doména (DIV) s vyznačenými fúzními smyčkami (*fusion loop*). Převzato a upraveno: Fernando *et al.*, 2016, Albertini *et al.*, 2012

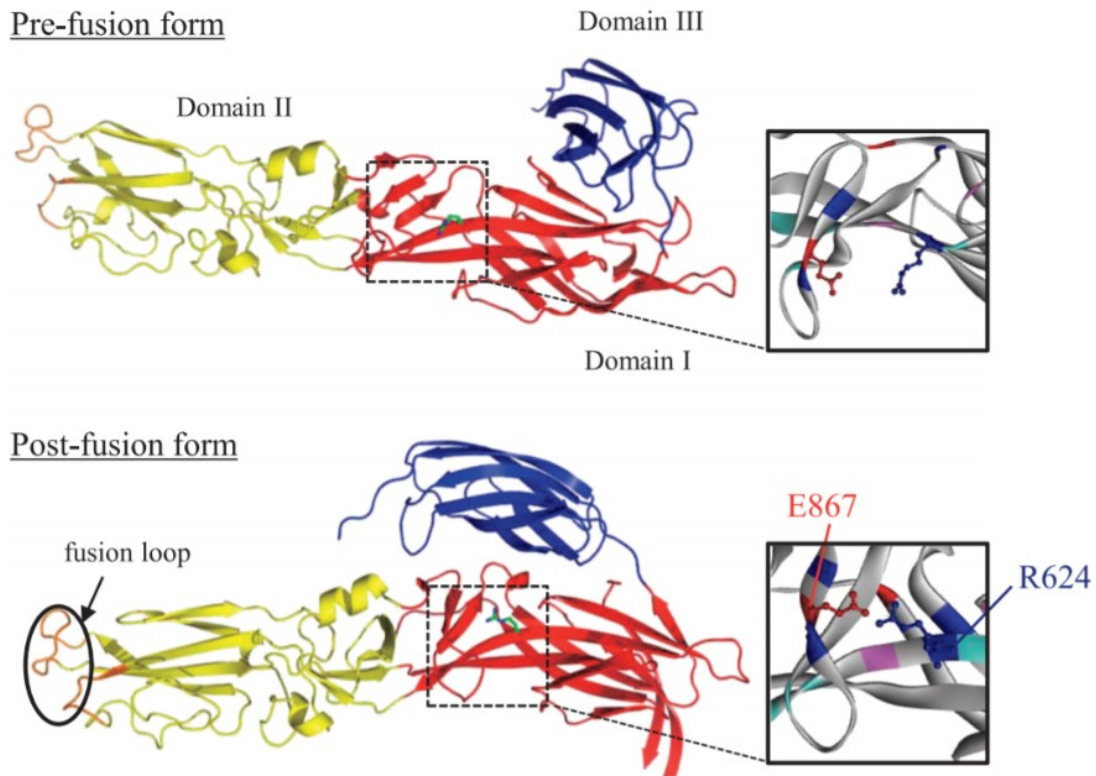
Dle předešlého rozdělení je možné zařadit jak RVG, tak i VSVG mezi receptory III. třídy (Gaudin *et al.*, 1993, Backovic & Jardetzky, 2009, Rucker *et al.*, 2012). RVG se může nacházet ve 3 konformačních stavech. Prvním je stav pro protein přirozený, tedy v pH ~ 7,0, druhým stavem je stav aktivovaný. Ke změně konformace do aktivovaného stavu dochází při hodnotě pH pod 6,7, kdy jsou odhaleny hydrofobní úseky RVG proteinu schopné fúze s membránou endosomu. Posledním, třetím stavem je inaktivní konformace, kdy dochází k neschopnosti fúze RVG proteinu, ačkoliv se nachází ve vhodném prostředí. Zmíněné hodnoty pH platí i pro VSVG, avšak VSVG se nevyskytuje ve 3 konformačních stavech jako RVG. Konformační změny jsou vratné a dle okolního prostředí mohou volně přecházet jedna v druhou (Gaudin *et al.*, 1999, Albertini *et al.*, 2012). VSVG i RVG se skládá ze čtyř domén, přičemž IV. doména (pro RVG i VSVG - 51-180 aa) je doménou fúzogenní. Nachází se zde 2 fúzogenní smyčky, které jsou po konformační změně vystaveny na povrchu glykoproteinu, a tím je umožněn průnik do hostitelské membrány. Následně jsou membrány přiblíženy a dojde k vytvoření fúzního póru (Fernando *et al.*, 2016, Kim *et al.*, 2016).

Pro G protein viru vezikulární stomatitidy *in vitro* platí, že jediným potřebným signálem indukujícím změnu z monomerního stavu proteinu na stav trimerní, tedy schopný fúze, je pouhá změna pH z normální hodnoty pH=7,5 a na hodnotu pH<6,5. VSV nevyužívá účasti žádných dalších kofaktorů. Tato změna vyvolá i konformační změny fúzních proteinů a tedy i následnou fúzi membrán. Tento mechanismus založený na změně hodnot pH je z výše zmíněných znám pouze u VSV. Například virus herpes simplex 1 využívá až 4 další proteiny a kofaktory umožňující vlastní fúzi membrán (Harrison, 2015).

## 7. Vliv extracelulárního pH

S nízkým pH se viry většinou setkávají až v průběhu endocytózy, tedy při kontaktu s endosomem a lysosomem buňky. Avšak v některých případech jako jsou hypoxie, zánětlivé procesy nebo okolí nádorových buněk byla zaznamenána změna extracelulárního pH, a to z normálních hodnot v rozmezí 7,0-7,2 na hodnoty výrazně kyselější, tedy v rozmezí hodnot 6,7 – 6,8 pro okolí nádorových buněk (Zhang *et al.*, 2010) a až 6,0-6,9 pro zánětlivé procesy (Gautam *et al.*, 2010). Toto kyselé pH může mít jak pozitivní, tak negativní vliv na případnou virovou infekci. Experimentální data ukazují, že infekčnost myšího polyomaviru (MPyV) se v kyselém prostředí zvyšuje. (Španielová, osobní sdělení). V některých případech však kyselé extracelulární pH může zabraňovat infekci. Tento děj se zpravidla vyskytuje u virů využívající receptory I. a II. třídy. Tyto receptory vykazují nevratné konformační změny v prostředí s kyselým pH. Jestliže je virus vystaven kyselému pH a nemá možnost fúze s membránou, dojde k této nevratné změně do post-fúzní konformace a receptor již neplní svou funkci. Tento fakt byl pozorován například u viru chřipky typu A (White *et al.*, 1982), u ibaraki viru z čeledi *Reoviridae* (Tsuruta *et al.*, 2016) nebo u viru herpes simplex (Weed *et al.*, 2016). Virus s takto pozměněným receptorem není schopen vniknout do hostitelské buňky skrze fúzi zprostředkovanou receptorem, resp. není schopen uniknout z buněčných kompartmentů, jako jsou časný a pozdní endosom a tudíž je nakonec degradován v lysosomu (Dollery *et al.*, 2010).

Vliv extracelulárního pH byl také pozorován u viru SFTSV (z anglického Severe fever with thrombocytopenia syndrome virus), který spadá mezi *Phleboviry* z čeledi *Bunyaviridae*. Při vystavení buněčné kultury nízkému pH byly získány 2 subklony viru navzájem se lišící v sekvenci povrchového glykoproteinu - Y328H a R624W. Získaný subklon Y328 nevykazuje v kyselém pH fúzní aktivitu.



**Obr. č. 9: Pre-fúzní a post-fúzní konformace SFTSV glykoproteinu**

Strukturní model SFTSV povrchového glykoproteinu s vyobrazenými doménami. Druhá doména je vyobrazena s fúzní smyčkou. V první doméně se nachází oblast s R624 a zároveň s E867, která má neopomenutelný vliv na virovou infekci v acidickém pH. Převzato a upraveno: (Tsuda *et al.*, 2017)

Oproti tomu u subklonu R624W (Obr. č. 9) dochází k fúzi při acidickém pH v rozmezí 5,0 až 6,2. Právě pozice 624 se zdá být klíčová pro iniciaci virové fúze. Pokud se v pozici 624 nachází aminokyseliny jako serin, tryptofan nebo glycin dochází k fúzi bez větších problémů, pokud se však v této pozici nachází jednodušší aminokyseliny, je fúze blokována (Tsuda *et al.*, 2017). Mimo to, byly získány i subklony, které dokáží iniciovat fúzi jak v kyselém, tak v neutrálním pH zároveň, oproti výše popsanému, který je již pevně adaptován na kyselé pH a v pH neutrálním k fúzi nedochází (Nishio *et al.*, 2016).

V případě, že dochází k nedostatečnému okyselování části organismu, může nastat v dané oblasti hypoxie, která má za následek spuštění procesů anaerobní glykolýzy. Jedním z produktů těchto procesů je kyselina mléčná – laktát. Uvolňování laktátu a protonů do extracelulárního prostoru dochází ke snižování hodnoty pH. U buněk takto vystavených snížené hodnotě pH dochází k nadměrné tvorbě ORG1 (z anglického *Ovarian cancer G-protein coupled receptor 1*), což je receptor reagující na snížené extracelulární pH. Jako jeden



z hlavních pH citlivých receptorů se podílí na homeostázi organismu (Ludwig *et al.*, 2003). V posledních letech bylo prokázáno, že k nadměrné tvorbě ORG1 dochází i v kyselých oblastech nádorových buněk (de Vallière *et al.*, 2016). V případě rakoviny vaječníku bylo popřeno, že by mohla být způsobována lidskými papillomaviry (HPV) (Anttila *et al.*, 1999), avšak vyvstává otázka, zda hypoxie způsobující okyselení extracelulárního prostoru může předně přispívat k tvorbě jiných nádorových onemocnění způsobovaných viry.

## 8. Závěr

Vliv pH na živočišné viry je možné pozorovat jak v extracelulárním prostředí, tak i v prostředí intracelulárním. Ke snížení hodnoty extracelulárního pH může docházet v hypoxických tkáních, v nádorech nebo ve tkáních s probíhajícím zánětem. Snížené hodnoty intracelulárního pH se nachází především v buněčných kompartmentech, jako jsou časně a pozdní endosomy nebo lysozomy. Značná část virů reaguje na nízké pH v rozmezí 5,5 až 6,5 konformačními změnami kapsidových nebo obalových proteinů viru. Konformační změny vedou k uvolnění virových komponent z buněčných kompartmentů.

Mezi nejprobádanější v tomto ohledu patří bezpochyby virus chřipky a jeho povrchový glykoprotein hemagglutinin. Ten reaguje na snížení hodnoty pH vypuzením N-koncového fúzního peptidu a jeho umístěním do membrány endosomu hostitelské buňky, což vede k fúzi virové membrány a membrány endosomu hostitelské buňky. Virus chřipky dále využívá nízké pH k uvolnění vRNP komplexu z kapsidy viru. Dobře popsány jsou účinky sníženého pH na infekci u adenovirů, viru herpes simplex nebo například viru vesikulární stomatitidy.

Kyselá pH je díky svému nezanedbatelnému vlivu na některé viry velmi zajímavým faktorem pro boj s virovou nákazou. Díky poznatkům o virech, u kterých je infekční cyklus závislý na změnách pH by bylo možné, při aplikaci léčiv, která ovlivňují pH, například chloroquine, znemožnit těmto virům efektivní infekci hostitele. Chloroquin je dnes hojně využívaná profylaktační látka, patřící mezi antimalarika. V souvislosti s účinky chloroquinu probíhá výzkum na Ebola a Marburg virech z čeledi *Filoviridae*. Efektivní infekce těmito viry je závislá na organelách se sníženou hodnotou pH. V těchto organelách dochází k ukládání chloroquinu, což má za následek zvyšování jejich vnitřního pH a zároveň způsobuje disfunkci enzymů nezbytných pro proteolytickou úpravu a post-translační modifikace (Akpovwa, 2016). Další využití mohou nalézt tyto poznatky při protinádorové léčbě. Jelikož se v okolí nádorového bujení vyskytuje nízké pH, je pravděpodobně možné uvažovat o návrhu viroterapeutických přístupů založených na změnách pH při selektivním cílení na nádorové. Přehled virů, u kterých byl pozorován vliv na lokalizaci změn pH při interakci viru s buňkou je uveden v tabulce číslo 1. (Tab. č.1).

**Tab. č. 1 – Shrnutí virů reagujících na nízkou hodnotu pH v intracelulárním prostředí a vliv nízkého pH v extracelulárním prostředí**

<b>intracelulární pH</b>	<b>genom</b>	<b>obal</b>	<b>lokalizace změn virových proteinů</b>	<b>pH</b>
adenovirus 2/5	dsDNA	-	EE	5,9-6,3
adenovirus 7	dsDNA	-	LE	<6
SV40	dsDNA	-	ER	7,2
rhinovirus 2/3/14/16	(+)ssRNA	-	EE	5,9-6,3
rhinovirus 89	(+)ssRNA	-	LE; ERC	<6; 6,5
virus chřipky	(-)ssRNA	+	EE	5,9-6,3
virus herpes simplex	dsDNA	+	PM; EE	7; 5,9-6,3
virus vztekliny	(-)ssRNA	+	EE	5,9-6,3
VSV	(-)ssRNA	+	EE	5,9-6,3
<p>EE – časný endosom; LE – pozdní endosom; ER – endoplasmatické retikulum; ERC – recyklační kompartmenty endosomu; PM – plasmatická membrána</p>				
<b>extracelulární pH</b>	<b>genom</b>	<b>obal</b>	<b>efekt</b>	<b>pH</b>
myší polyomavirus	dsDNA	-	zvýšená infekčnost	4,5-6,8
ibaraki virus	dsRNA	-	zastavení infekce	4
virus herpes simplex	dsDNA	+	zastavení infekce	5-6
virus chřipky	(-)ssRNA	+	zastavení infekce	5,8–5,2
SFTSV	(-)ssRNA	+	adaptace povrchového glykoproteinu mutací (R624W)	5,8 – 6,2

## Seznam použité literatury

- Akpovwa, H. (2016). Chloroquine could be used for the treatment of filoviral infections and other viral infections that emerge or emerged from viruses requiring an acidic pH for infectivity. *Cell Biochemistry and Function*, 34(4), 191–196.
- Albertini, A. A. V, Baquero, E., Ferlin, A., & Gaudin, Y. (2012). Molecular and cellular aspects of rhabdovirus entry. *Viruses*, 4(1), 117–139.
- Anderson, H. a, Chen, Y., & Norkin, L. C. (1996). Bound simian virus 40 translocates to caveolin-enriched membrane domains, and its entry is inhibited by drugs that selectively disrupt caveolae. *Molecular Biology of the Cell*, 7(11), 1825–34.
- Anttila, M., Syrjänen, S., Ji, H., Saarikoski, S., & Syrjänen, K. (1999). Failure to demonstrate human papillomavirus DNA in epithelial ovarian cancer by general primer PCR. *Gynecologic Oncology*, 72(3), 337–41.
- Au, J. L. S., Yeung, B. Z., Wientjes, M. G., Lu, Z., & Wientjes, M. G. (2016). Delivery of cancer therapeutics to extracellular and intracellular targets: Determinants, barriers, challenges and opportunities. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 97(February 2016), 280–301.
- Backovic, M., & Jardetzky, T. S. (2009). Class III viral membrane fusion proteins. *Current Opinion in Structural Biology*, 19(2), 189–196.
- Backovic, M., Longnecker, R., & Jardetzky, T. S. (2009). Structure of a trimeric variant of the Epstein-Barr virus glycoprotein B. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(8), 2880–2885.
- Bailey, C. J., Crystal, R. G., & Leopold, P. L. (2003). Association of adenovirus with the microtubule organizing center. *Journal of Virology*, 77(24), 13275–13287.
- Balakrishna, L. S., & Kondapi, A. K. (2016). Role of Host Proteins in HIV-1 Early Replication. In S. K. Saxena (Ed.), *Advances in Molecular Retrovirology*. InTech.
- Bergelson, J. M., Cunningham, J. a, Droguett, G., Kurt-Jones, E. a, Krithivas, a, Hong, J. S., ... Finberg, R. W. (1997). Isolation of a common receptor for Coxsackie B viruses and adenoviruses 2 and 5. *Science (New York, N.Y.)*, 275(5304), 1320–1323.

- Blaas, D. (2016). Viral entry pathways: the example of common cold viruses. *Wiener Medizinische Wochenschrift (1946)*, 166(7–8), 211–26.
- Bloomfield, G., & Kay, R. R. (2016). Uses and abuses of macropinocytosis. *Journal of Cell Science*, 129(14), 2697–705.
- Conzemius, R., Ganjian, H., Blaas, D., & Fuchs, R. (2016). ICAM-1 Binding Rhinoviruses A89 and B14 Uncoat in Different Endosomal Compartments. *Journal of Virology*, 90(17), 7934–42.
- Cossart, P., Helenius, A., Cossart, P., Helenius, A., Settembre, C., Ballabio, A., ... Weigert, R. (2014). Endocytosis of Viruses and Bacteria.
- Côté, M., Zheng, Y. M., & Liu, S. L. (2012). Membrane fusion and cell entry of XMRV are pH-independent and modulated by the envelope glycoprotein's cytoplasmic tail. *PLoS ONE*, 7(3), 1–12.
- Coyne, C. B., Shen, L., Turner, J. R., & Bergelson, J. M. (2009). Coxsackievirus Entry across Epithelial Tight Junctions Requires Occludin and the Small GTPases Rab 34 and Rab 5. *Cell*, 2(3), 181–192.
- de Vallière, C., Cosin-Roger, J., Simmen, S., Atrott, K., Melhem, H., Zeitz, J., ... Ruiz, P. A. (2016). Hypoxia Positively Regulates the Expression of pH-Sensing G-Protein-Coupled Receptor OGR1 (GPR68). *Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology*, 2(6), 796–810.
- Dollery, S. J., Delboy, M. G., & Nicola, A. V. (2010). Low pH-induced conformational change in herpes simplex virus glycoprotein B. *Journal of Virology*, 84(8), 3759–3766.
- Dupzyk, A., Williams, J. M., Bagchi, P., Inoue, T., & Tsai, B. (2017). SGTA-dependent regulation of Hsc70 promotes cytosol entry of SV40 from the ER. *Journal of Virology*, (March), JVI.00232-17.
- Eash, S., Querbes, W., & Atwood, W. J. (2004). Infection of Vero Cells by BK Virus Is Dependent on Caveolae Infection of Vero Cells by BK Virus Is Dependent on Caveolae. *Society*, 78(21), 11583–11590.
- Engel, S., Heger, T., Mancini, R., Herzog, F., Kartenbeck, J., Hayer, A., & Helenius, A. (2011). Role of endosomes in simian virus 40 entry and infection. *Journal of Virology*, 85(9), 4198–4211.

- Fernando, B. G., Yersin, C. T., José, C. B., & Paola, Z. S. (2016). Predicted 3D Model of the Rabies Virus Glycoprotein Trimer. *BioMed Research International*, 2016.
- Fields, B. N., Knipe, D. M., & Howley, P. M. (2007). *Fields Virology. Fields Virology* (Vol. 1st).
- Gastaldelli, M., Imelli, N., Boucke, K., Amstutz, B., Meier, O., & Greber, U. F. (2008). Infectious adenovirus type 2 transport through early but not late endosomes. *Traffic*, 9(12), 2265–2278.
- Gaudin, Y., Ruigrok, R. W., Knossow, M., & Flamand, A. (1993). Low-pH conformational changes of rabies virus glycoprotein and their role in membrane fusion. *Journal of Virology*, 67(3), 1365–72.
- Gaudin, Y., Tuffereau, C., Durrer, P., Brunner, J., Flamand, A., Ruigrok, R., & Virus, Â. (1999). Rabies virus-induced membrane fusion.
- Gautam, M., Benson, C. J., & Sluka, K. A. (2010). Increased response of muscle sensory neurons to decreases in pH after muscle inflammation. *Neuroscience*, 170(3), 893–900.
- Ghigo, E., Kartenbeck, J., Lien, P., Pelkmans, L., Capo, C., Mege, J. L., & Raoult, D. (2008). Ameobal pathogen mimivirus infects macrophages through phagocytosis. *PLoS Pathogens*, 4(6).
- Goldenring, J. R. (2015). Recycling endosomes. *Current Opinion in Cell Biology*, 35, 117–122.
- Greber, U. F. (2016). Virus and host mechanics support membrane penetration and cell entry. *Journal of Virology*, 90(February).
- Harrison, S. C. (2015). Viral Membrane Fusion, *Virology*, 498–507.
- Heldwein, E. E., Lou, H., Bender, F. C., Cohen, G. H., Eisenberg, R. J., & Harrison, S. C. (2006). Crystal structure of glycoprotein B from herpes simplex virus 1. *Science (New York, N.Y.)*, 313(5784), 217–220.
- Henaff, D., Salinas, S., & Kremer, E. J. (2011). An adenovirus traffic update: from receptor engagement to the nuclear pore. *Future Microbiology*, 6(2), 179–92.
- Hilleman, M. R. (1953). Antigenic Variation of Influenza Viruses. *Nature*, 311–332.

- Chen, J., Wharton, S. a, Weissenhorn, W., Calder, L. J., Hughson, F. M., Skehel, J. J., & Wiley, D. C. (1995). A soluble domain of the membrane-anchoring chain of influenza virus hemagglutinin (HA2) folds in *Escherichia coli* into the low-pH-induced conformation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *92*(26), 12205–12209.
- Inoue, T., & Tsai, B. (2015). A Nucleotide Exchange Factor Promotes Endoplasmic Reticulum-to-Cytosol Membrane Penetration of the Nonenveloped Virus Simian Virus 40. *J Virol*, *89*(8), 4069–4079.
- Kadlec, J., Loureiro, S., Abrescia, N. G. a, Stuart, D. I., & Jones, I. M. (2008). The postfusion structure of baculovirus gp64 supports a unified view of viral fusion machines. *Nature Structural & Molecular Biology*, *15*(10), 1024–1030.
- Kalani, M. R., Moradi, A., Moradi, M., & Tajkhorshid, E. (2013). Characterizing a histidine switch controlling pH-dependent conformational changes of the influenza virus hemagglutinin. *Biophysical Journal*, *105*(4), 993–1003.
- Kartenbeck, J., Stukenbrok, H., & Helenius, A. (1989). Endocytosis of Simian Virus 40 into the Endoplasmic Reticulum. *J. Cell Biol.*, *109*(6), 2721–2729.
- Kim, I. S., Jenni, S., Stanifer, M. L., Roth, E., Whelan, S. P. J., van Oijen, A. M., & Harrison, S. C. (2016). Mechanism of membrane fusion induced by vesicular stomatitis virus G protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 201618883.
- Lajoie, P., & Nabi, I. R. (2010). *Lipid rafts, caveolae, and their endocytosis. International Review of Cell and Molecular Biology* (1st ed., Vol. 282). Elsevier Inc.
- Leopold, P. L., Kreitzer, G., Miyazawa, N., Rempel, S., Pfister, K. K., Rodriguez-Boulan, E., & Crystal, R. G. (2000). Dynein- and Microtubule-Mediated Translocation of Adenovirus Serotype 5 Occurs after Endosomal Lysis. *Human Gene Therapy*, *11*(1), 151–165.
- Li, S., Sieben, C., Ludwig, K., H??fer, C. T., Chiantia, S., Herrmann, A., ... Schaap, I. A. T. (2014). PH-ontrolled two-step uncoating of influenza virus. *Biophysical Journal*, *106*(7), 1447–1456.

- Liebl, D., Difato, F., Hornikova, L., Mannova, P., Stokrova, J., & Forstová, J. (2006). Mouse Polyomavirus Enters Early Endosomes , Requires Their Acidic pH for Productive Infection , and Meets Transferrin Cargo in Rab11-Positive Endosomes. *Journal of Virology*, *80*(9), 4610–4622.
- Lichtenberg, D., Ahyayauch, H., & Goñi, F. M. (2013). The mechanism of detergent solubilization of lipid bilayers. *Biophysical Journal*, *105*(2), 289–299.
- Lim, J. P., & Gleeson, P. A. (2011). Macropinocytosis: an endocytic pathway for internalising large gulps. *Immunology and Cell Biology*, *89*(8), 836–843.
- Lisanti, M. P., Scherer, P. E., Tang, Z., & Sargiacomo, M. (1994). Caveolae, caveolin and caveolin-rich membrane domains: a signalling hypothesis. *Trends In Cell Biology*, *4*, 231–235.
- Ludwig, M.-G., Vanek, M., Guerini, D., Gasser, J. A., Jones, C. E., Junker, U., ... Seuwen, K. (2003). Proton-sensing G-protein-coupled receptors. *Nature*, *425*(6953), 93–98.
- Lum, K. K., & Cristea, I. M. (2016). Interactions During the Progression of Viral Infection, *13*(3), 325–340.
- Maréchal, V., Prevost, M., Petit, C., Perret, E., Heard, J., & Schwartz, O. (2001). Human Immunodeficiency Virus Type 1 Entry into Macrophages Mediated by Macropinocytosis Human Immunodeficiency Virus Type 1 Entry into Macrophages Mediated by Macropinocytosis. *Journal of Virology*, *75*(22), 11166–11177.
- Matsuoka, Y., Matsumae, H., Katoh, M., Einfeld, A. J., Neumann, G., Hase, T., ... Kawaoka, Y. (2013). A comprehensive map of the influenza A virus replication cycle. *BMC Systems Biology*, *7*(1), 97.
- Miyazawa, N., Crystal, R. G., & Leopold, P. L. (2001). Adenovirus Serotype 7 Retention in a Late Endosomal Compartment prior to Cytosol Escape Is Modulated by Fiber Protein Adenovirus Serotype 7 Retention in a Late Endosomal Compartment prior to Cytosol Escape Is Modulated by Fiber Protein. *Journal of Virology*, *75*(3), 1387–1400.



- Miyazawa, N., Leopold, P. L., Hackett, N. R., Ferris, B., Worgall, S., Falck-Pedersen, E., & Crystal, R. G. (1999). Fiber swap between adenovirus subgroups B and C alters intracellular trafficking of adenovirus gene transfer vectors. *J Virol*, *73*(7), 6056–6065.
- Montespan, C., Marvin, S. A., Austin, S., Burrage, A. M., Roger, B., Rayne, F., ... Wodrich, H. (2017). Multi-layered control of Galectin-8 mediated autophagy during adenovirus cell entry through a conserved PPxY motif in the viral capsid. *PLOS Pathogens* (Vol. 13).
- Muggeridge, M. I. (2012). Glycoprotein B of Herpes Simplex Virus 2 Has More than One Intracellular Conformation and Is Altered by Low pH. *Journal of Virology*, *86*(12), 6444–6456.
- Nishio, S., Tsuda, Y., Ito, R., Shimizu, K., Yoshimatsu, K., & Arikawa, J. (2016). Establishment of Subclones of Severe Fever with Thrombocytopenia Syndrome Virus YG1 Strain Selected by the Degree of Low-pH-dependent Cell Fusion Activity. *Japanese Journal of Infectious Diseases*.
- Novella, I. S., Gilbertson, D. L., Borrego, B., Domingo, E., & Holland, J. J. (2005). Adaptability costs in immune escape variants of vesicular stomatitis virus. *Virus Research*, *107*(1), 27–34.
- Nurani, G., Lindqvist, B., & Casasnovas, J. M. (2003). Receptor priming of major group human rhinoviruses for uncoating and entry at mild low-pH environments. *Journal of Virology*, *77*(22), 11985–11991.
- Rasmussen, I., & Vilhardt, F. (2015). Macropinocytosis is the entry mechanism of amphotropic murine leukemia virus. *Journal of Virology*, *89*(3), 1851–66.
- Roche, S., Bressanelli, S., Rey, F. A., & Gaudin, Y. (2006). Crystal Structure of the Low-pH Form of the Vesicular Stomatitis Virus Glycoprotein G. *Science*, *313*(5784), 187–191.
- Roche, S., Rey, F. A., Gaudin, Y., & Bressanelli, S. (2007). Structure of the Prefusion Form of VSV G. *Science*, *315*(February), 843–848.
- Rücker, P., Wieninger, S. a, Ullmann, G. M., & Sticht, H. (2012). pH-dependent molecular dynamics of vesicular stomatitis virus glycoprotein G. *Proteins*, *80*(July), 2601–13.

- Saotome, K., Duong-ly, K. C., & Howard, K. P. (2015). Influenza A M2 protein conformation depends on choice of model membrane. *Nature, Biopolymers*, *104*(4), 405–411.
- Scott, C. C., Vacca, F., & Gruenberg, J. (2014). Endosome maturation, transport and functions. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, *31*, 2–10.
- Shi, H., Guo, G., Liu, R., Wang, C., Xu, X., & Ruan, L. (2016). Membrane associated protein flotillin-2 in *Litopenaeus vannamei* plays a role in WSSV infection. *Fish & Shellfish Immunology*, *54*, 247–253.
- Scherer, J., & Vallee, R. B. (2015). Conformational Changes in the Adenovirus Hexon Subunit Responsible for Regulating Cytoplasmic Dynein Recruitment. *Journal of Virology*, *89*(2), 1013–1023.
- Schnell, J. R., & Chou, J. J. (2011). Structure and Mechanism of the M2 Proton Channel of Influenza A Virus. *Nature*, *451*(7178), 591–595.
- Skehel, J. J., & Wiley, D. C. (2000). Receptor binding and membrane fusion in virus entry: The Influenza Hemagglutinin. *Annual Review of Biochemistry*, *69*, 531–569.
- Smith, A. E., & Helenius, A. (2004). How Viruses Enter Animal Cells, *Science*, 237-242.
- Smith, J. L., Campos, S. K., Wandinger-Ness, A., & Ozbun, M. A. (2008). Caveolin-1-dependent infectious entry of human papillomavirus type 31 in human keratinocytes proceeds to the endosomal pathway for pH-dependent uncoating. *Journal of Virology*, *82*(19), 9505–12.
- Stampfer, S. D., Lou, H., Cohen, G. H., Eisenberg, R. J., & Heldwein, E. E. (2010). Structural basis of local, pH-dependent conformational changes in glycoprotein B from herpes simplex virus type 1. *Journal of Virology*, *84*(24), 12924–12933.
- Strunze, S., Engelke, M. F., Wang, I. H., Puntener, D., Boucke, K., Schleich, S., ... Greber, U. F. (2011). Kinesin-1-mediated capsid disassembly and disruption of the nuclear pore complex promote virus infection. *Cell Host and Microbe*, *10*(3), 210–223.
- Tsai, B. (2007). Penetration of nonenveloped viruses into the cytoplasm. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, *23*, 23–43.
- 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. *The EMBO Journal*, 22(17), 4346–4355.
- Tsuda, Y., Igarashi, M., Ito, R., Nishio, S., Shimizu, K., Yoshimatsu, K., & Arikawa, J. (2017). The amino acid at position 624 in the glycoprotein of SFTSV (severe fever with thrombocytopenia virus) plays a critical role in low-pH-dependent cell fusion activity. *Journal of Virology*, 38(2), 89–97.
- Tsuruta, Y., Shibutani, S. T., Watanabe, R., & Iwata, H. (2016). The requirement of environmental acidification for Ibaraki virus infection to host cells. *Journal of Veterinary Medical Science*, 78(1), 153–156.
- Ullrich, O., Reinsch, S., Urbé, S., Zerial, M., & Parton, R. G. (1996). Rab11 regulates recycling through the pericentriolar recycling endosome. *Journal of Cell Biology*, 135(4), 913–924.
- Van Weert, A. W. M., Dunn, K. W., Geuze, H. J., Maxfield, F. R., & Stoorvogel, W. (1995). Transport from late endosomes to lysosomes, but not sorting of integral membrane proteins in endosomes, depends on the vacuolar proton pump. *Journal of Cell Biology*, 130(4), 821–834.
- Wang, H., Li, Z., Liu, Y., Persson, J., Beyer, I., Möller, T., ... Lieber, A. (2011). HHS Public Access, 17(1), 96–104.
- Weed, D. J., Pritchard, S. M., Gonzalez, F., Aguilar, H. C., & Nicola, A. V. (2016). Mildly acidic pH triggers an irreversible conformational change in the fusion domain of herpes simplex virus 1 glycoprotein B and inactivation of viral entry. *Journal of Virology*, (December), JVI.02123-16.
- Weissenhorn, W., Hinz, A., & Gaudin, Y. (2007). Virus membrane fusion. *FEBS Letters*, 581(11), 2150–2155.
- White, J., Kartenbeck, J., & Helenius, A. (1982). Membrane fusion activity of influenza virus. *The EMBO Journal*, 1(2), 217–22.
- White, J. M., Delos, S. E., Brecher, M., & Schornberg, K. (2008). Structures and Mechanisms of Viral Membrane Fusion Proteins. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 43(3), 189–219.

- Wickham, T. J., Mathias, P., Cheresch, D. A., & Nemerow, G. R. (1993). Integrins  $\alpha\beta3$  and  $\alpha\beta5$  promote adenovirus internalization but not virus attachment. *Cell*, *73*(2), 309–319.
- Wiethoff, C. M., Wodrich, H., Gerace, L., & Nemerow, G. R. (2005). Adenovirus protein VI mediates membrane disruption following capsid disassembly. *Journal of Virology*, *79*(4), 1992–2000.
- Yamauchi, Y., & Greber, U. F. (2016). Principles of Virus Uncoating: Cues and the Snooker Ball. *Traffic*, *17*(6), 569–592.
- Zhang, X., Lin, Y., & Gillies, R. J. (2010). Tumor pH and its measurement. *Journal of Nuclear Medicine : Official Publication, Society of Nuclear Medicine*, *51*(8), 1167–70.