

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PRIRODOSLOVNO – MATEMATIČKI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK

STRATEGIJE ULASKA VIRUSA ŽIVOTINJA U STANICU
CELL ENTRY STRATEGIES OF ANIMAL VIRUSES
SEMINARSKI RAD

Daniel Čolić

Preddiplomski studij molekularne biologije
(Undergraduate Study of Molecular Biology)

Mentor: doc. dr. sc. Marin Ježić

Zagreb, 2018.

Sadržaj

1. UVOD	1
2. PREGLED PROCESA UKLJUČENIH U ULAZAK VIRUSA U STANICU	3
3. FAKTORI ADSORPCIJE	4
3.1 ELEKTROSTATSKE INTERAKCIJE	4
3.2 INTERAKCIJE IZMEĐU MOLEKULA STANICE DOMAĆINA	5
3.3 OBITELJ IMUNOGLOBULINA	5
3.4 LEKTINI.....	6
3.5 SIJALIČNA KISELINA.....	7
3.6 OSTALI RECEPTORI.....	8
4. LATERALNO KRETANJE VIRUSA UZ POVRŠINU MEMBRANE	9
4.1 VIRUSI KOJI SE NE KREĆU	10
4.2 VIRUSI KOJI KORISTE RANIJE FORMIRANE JAŽICE	10
4.3 VIRUSI KOJI MOGU POKRENUTI FORMIRANJE JAŽICA <i>DE NOVO</i>	11
5. ULAZAK VIRUSA U STANICU.....	13
5.1 FUZIJA SA STANIČNOM MEMBRANOM.....	13
5.2 ENDOCITOZA	15
5.2.1 ENDOCITOZA POSREDOVANA KLATRINOM.....	15
5.2.2 KAVEOLARNI PUT/ E. OVISNA O LIPIDNIM SPLAVIMA	16
5.2.3 MAKROPINOCITOZA	16
5.2.4 OSTALI PUTEVI.....	17
6. PRODIRANJE (PENETRACIJA)	18
6.1 VIRUSI S OVOJNICOM	20
6.2 VIRUSI BEZ OVOJNICE	22
7. KRETANJE VIRUSA KROZ CITOPLAZMU.....	24
8. SVLAČENJE I ULAZAK VIRUSA U JEZGRU.....	25
8.1. SVLAČENJE	25
8.2 ULAZAK VIRUSA U JEZGRU	26
ZAKLJUČAK.....	30
SAŽETAK.....	31
SUMMARY	31
LITERATURA.....	32

1. UVOD

Virusi su po mnogočemu specifični biološki entiteti koji se ne uklapaju u mnoge definicije života. Kod pokušaja definiranja života, često se uzimaju dva kriterija, posjedovanje nasljednog materijala u obliku nukleinske kiseline i metabolizam. Osnovnu građu virusa čine DNA ili RNA i proteinski omotač (kapsida) pa je prvi kriterij zadovoljen, ali budući da virusi ne posjeduju vlastiti metabolizam često su označavani kao entiteti „između živog i neživog“. Prema jednoj argumentaciji virusi su u stanici živi, a izvan stanice su samo nakupina organskih makromolekula (Cann, 2012). Otkrićem nasljednog materijala, napretkom molekularne genetike i oblikovanjem moderne evolucijske sinteze koja uključuje molekularnu filogenetiku, naglasak je stavljen na postojanje i evoluciju na razini DNA (ili RNA kod nekih virusa) pa se virusi mogu smatrati dijelom živog svijeta, iako različiti od svih ostalih oblika života.

Virusi su obligatni unutarstanični paraziti. Kao takvi, moraju se vezati na površinu i ući u permisivnu stanicu domaćina kako bi mogli iskoristiti postojeću staničnu mašineriju potrebnu za njihovu replikaciju. Poznato je da je gotovo svaki tip životinjske ili ljudske stanice podložan infekciji najmanje jednim, a redovito i nekolicinom različitih virusa, što se očitava u vrlo velikom broju dosad opisanih virusa (Pöhlmann, 2013).

Replikacijski ciklus virusa može se podijeliti na nekoliko koraka ili faza da bi se lakše proučavao. To su adsorpcija, ulazak u stanicu (penetracija i svlačenje), replikacija i ekspresija gena, sastavljanje i sazrijevanje viriona te izlazak iz stanice. Prvom fazom replikacijskog (ili infekcijskog) ciklusa mogu se smatrati adsorpcija i penetracija. Upravo gore spomenuta dva procesa nužan su preduvjet za produktivnu infekciju. Glavnu barijeru za umnažanje većine virusa predstavlja stanična membrana. Probirna propusnost membrane kao jedno od konstitutivnih svojstava služi između ostaloga i za sprječavanje ulaska patogena. Kod virusa životinja i bakterija¹ tijekom evolucije razvili su se mnogobrojni specifični proteini na površini njihovih omotača, takozvani antireceptori, koji se vežu za postojeće receptore na površini stanične membrane. Vezanjem se pokreće signal za endocitozu (virusi s ovojnicom) ili se stvara pora u membrani (virusi bez ovojnice). Ukoliko stanica ne eksprimira na svojoj površini receptor na koji se neki virus može vezati, takva stanica ne može biti

¹ Virusi biljaka zbog stanične stijenke na površini biljne stanice ne mogu na taj način ulaziti u stanicu. Za njihovo prodiranje u stanicu domaćina potrebno je oštećenje stanice. U ovom radu tema su, zbog svoje raznolikosti, strategije virusa životinja.

inficirana tim virusom. To nas dovodi do činjenice da je tropizam virusa određen upravo prvom fazom replikacijskog ciklusa. U svjetlu medicinskih istraživanja i borbe protiv epidemija nužno je poznavati elemente koji određuju tropizam virusa. Proučavanje tih elemenata važno je i zbog toga što su virusi vrlo promjenjivi pa virusi drugih kralježnjaka mogu evoluirati na način da postanu infektivni za stanice čovjeka, što može dovesti, primjerice kod majmunskih boginja, ili je u prošlosti dovelo do velikih epidemija, primjerice sojevima gripe kojima su primarni domaćin svinje ili ptice.

Ulazak virusa u stanicu predmet je recentnih istraživanja liječenja kroničnih bolesti poput onih uzrokovanih virusom ljudske imunodeficijencije (HIV) i virusom hepatitisa C (HCV). Eksperimenti se provode koristeći CRISPR-Cas9 sustav koji je precizno oruđe za otkrivanje receptora potrebnih za virusnu infekciju (Puschnik i sur., 2017). Isti CRISPR-Cas sustav nastoji se prilagoditi za liječenje pacijenata mijenjanjem gena za određene receptore pri čemu se kao vektor koji dovodi CRISPR-Cas u stanicu koristi Sendai virus (SeV)² (Park i sur., 2016).

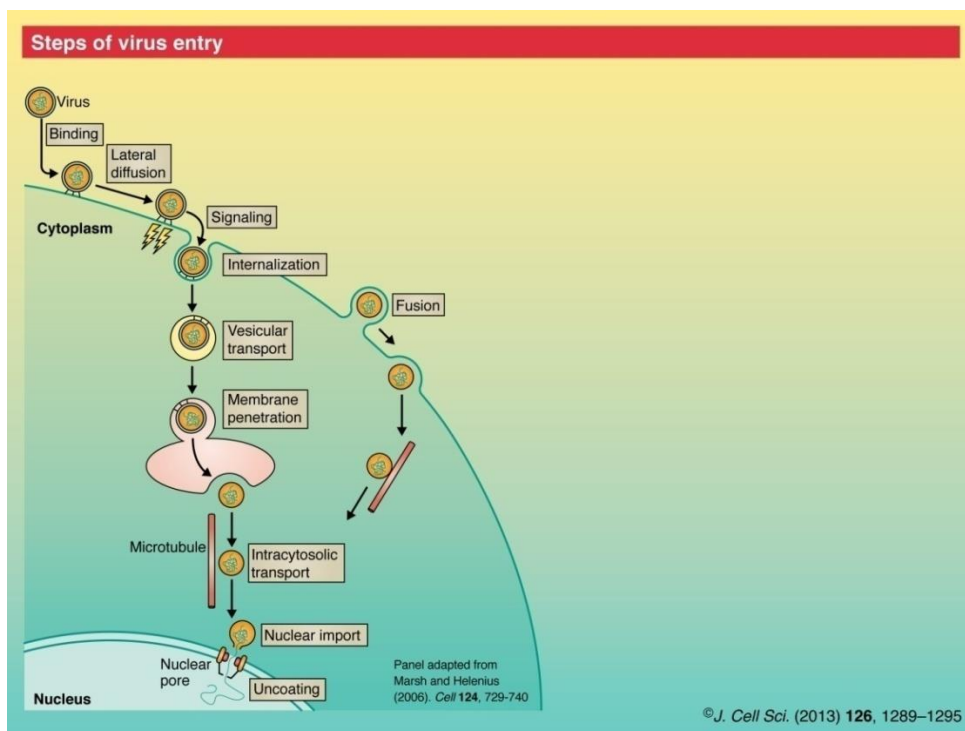
Nedavno je otkriveno da je razvitak placente kod placentalnih sisavaca usko povezan s endogenim retrovirusom. Protein sincitin, koji je virusu služio za vezanje za membranu stanice domaćina, stanicama trofoblasta u ranom stadiju razvoja embrija omogućuje stvaranje sincicija i formiranje placente što je značajni evolucijski događaj.

Ovaj pregledni rad ukratko obrađuje strategije ulaska virusa životinja u stanicu s opisanim mehanizmima tog procesa.

² Isti se virus koristi za fuziju stanica u kulturi i transformaciju, a pogodan je zbog RNA genoma i širokog tropizma.

2. PREGLED PROCESA UKLJUČENIH U ULAZAK VIRUSA U STANICU

Podjela i redoslijed pojedinih faza staničnog ciklusa su proizvoljni, ali je takva vrsta sistematizacije korisna za sustavno proučavanje pojedine faze. Sam ulazak u stanicu, odnosno ulazak virusne čestice u citoplazmu ili jezgru može se raščlaniti na nekoliko koraka: 1) adsorpcija na površinu stanice; 2) lateralno kretanje uz plazma membranu i grupiranje receptora; 3) aktivacija staničnog signalnog puta; 4) endocitoza i transport u sekundarne organele; 5) penetracija fuzijom s membranom, lizom ili formiranjem kanala/pore; 6) unutarstanični transport do jezgre ili nekog drugog mjesta unutar citoplazme; 7) djelomično ili potpuno otvaranje čestice (eng. *uncoating*) u citoplazmi, jezgrinoj pori ili nukleoplazmi (Helenius, 2018). S obzirom na različite strategije pojedinih virusa, ovi koraci nisu univerzalni za sve, te stoga postoje brojne varijacije. Nadalje, neki koraci još uvijek nisu temeljito istraženi zbog delikatnosti samih eksperimenata, naročito zbog veličine same virusne čestice i teškog vizualiziranja procesa, posebice lateralnog kretanja uz površinu membrane i otvaranja čestice. Brojna istraživanja provedena su u kulturi stanica *in vitro*, koja uz brojne prednosti ne može do kraja oponašati uvjete *in vivo* pa se rezultati dobiveni u tim istraživanjima moraju i dalje potvrđivati drugim tehnikama (za detaljniji prikaz problematike vidi Prescott, Feldmann and Safronetz, 2017).



Slika 1. Pregled procesa uključenih u ulazak virusa u stanicu, preuzeto iz Yamauchi, 2013.

3. FAKTORI ADSORPCIJE

Da bi virus ušao u stanicu, mora se vezati za odgovarajući receptor na membrani i tako pokrenuti signalni put koji će rezultirati njegovim unosom u stanicu. Problem u tom koraku mogu predstavljati kompetitivni ligandi koji se kao dio regularnih procesa u organizmu vežu na odgovarajuće receptore, ali i sami uvjeti u međustaničnom prostoru kao što su nepovoljni pH, naboj ili pak strujanje međustanične tekućine ukoliko se radi o vaskularnom tkivu. U tim uvjetima virusna čestica može se destabilizirati i izgubiti infektivnost pa je važno da se vezanje za površinu stanice dogodi relativno brzo. Zbog toga mnogi virusi prvo dolaze u doticaj s molekulama na površini stanice koje često ne mogu pokrenuti signal za unos, ali predstavljaju uporište i omogućuju koncentriranje uz staničnu membranu i lakši ulazak u stanicu. Te molekule nazivaju se faktori adsorpcije (eng. *attachment factors*). Interakcije s faktorima adsorpcije najčešće su nespecifične i reverzibilne elektrostatske interakcije, iako neki virusi s ovojnicom sadrže kompleksne molekule za specifične interakcije s odgovarajućim receptorima. Budući da zbog kompleksnih interakcija receptora i liganda mutacije u receptoru najčešće imaju negativni učinak na stanicu, receptori su izrazito konzervirani. To predstavlja snažan selektivni pritisak i na sekvence onih domena antireceptora koje se vežu za receptore. Selektivni pritisak predstavljaju i neutralizirajuća antitijela pa mnogi virusi imaju strategije za sprječavanje njihovog vezanja. Neke od strategija su okruživanje glikanskim štitom, postojanje proteina-mamca ili pak ukopavanje u udolinu nedostupnu molekulama koje nemaju odgovarajuću konformaciju. Za vezanje na receptore za ulazak u stanicu neki virusi posjeduju kriptičke domene koje se otvaraju tek interakcijom s faktorom adsorpcije ili sl. (Jolly and Sattentau, 2006). Najdetaljnije proučavane interakcije virusa s faktorima adsorpcije su one kod HIV-a i virusa gripe tipa A (FLUAV).

3.1 ELEKTROSTATSKE INTERAKCIJE

Velik broj virusa kao faktore adsorpcije koristi glikane glikokaliksa, proteoglikanskog omotača na površini većine stanica. Glikani su polidimeri koji sadrže negativno nabijenu fosfatnu skupinu – glikozaminoglikani (GAG). Velika količina negativnog naboja pogodna je za elektrostatske interakcije s bazičnim aminokiselinama. Virus i ostali patogeni uglavnom se vežu na proteoglikane koji sadrže heparan sulfat (HSPG), ali zabilježeni su i virusi koji se vežu na hondroitin sulfat. Neki od virusa koji se vežu za HSPG su ljudski herpesvirus 1 (HHV-1), HCV, retrovirusi poput HIV-a i virusa leukemije T-stanica, te flavivirusi (Kalia and Jameel, 2011). Kod adenovirusa, koji pripadaju skupini virusa bez lipidne ovojnice, detaljno

je istražena sekvenca koja interagira s HSPG i utvrđeno je da se radi o konzerviranoj sekvenci KKTK³ (Zhang and Bergelson, 2005; Sobhy, 2016). Za HSV-I utvrđeno je da s HSPG interagiraju proteini gB i gC. Protein gC nije neophodan za ulazak u stanicu, ali je u gC mutantu uočen deseterostuko manja stopa infekcije što govori o važnosti faktora adsorpcije za uspješnu infekciju (Herold *et al.*, 1991). Dobro je proučen i HIV čiji gp120 površinski protein može interagirati s HSPG svojom domenom V3 petlje. Vezano za ovu interakciju vode se rasprave o tome utječe li velika ekspresija HSPG na površini stanice inhibitorno na infekciju s obzirom na najpoznatiji put ulaska interakcija s CD4 receptorom i CCR5 koreceptorom. Naime, interakcija s HSPG može olakšati adsorpciju kod stanica koje nemaju jaku ekspresiju CD4 na membrani (makrofagi), ali istovremeno omogućuje vezanje za nepermissivne stanice, što može rezultirati gubitkom infektivnosti viriona. Detaljna *in vivo* istraživanja nisu provedena pa je moguće da konačni odgovor ni ne možemo dobiti u kulturi stanica (Jolly and Sattentau, 2006). Virus slinavke i šapa (FMDV) je virus bez ovojnice koji interagira s HSPG. Sekvenca koja se veže na heparan sulfat nalazi se u udubini između VP1, VP2 i VP3 proteina kapside. Interakcija s HS povezana je s kaveolarnim unosom u stanicu (O'Donnell, LaRocco and Baxt, 2008).

3.2 INTERAKCIJE IZMEĐU MOLEKULA STANICE DOMAĆINA

Virusi s ovojnicom istu su stekli prilikom izlaska iz stanice pupanjem. U skladu s porijeklom u lipidnom dvosloju mogu se naći molekule i receptori koji stanicama služe za međusobnu interakciju i povezivanje. Tako virion HIV-a može na površini sadržavati MHC-I, MHC-II tkivne antigene, kao i B7.1, B7.2, ICAM-1 molekule (Kalia and Jameel, 2011). MHC tkivne antigene prepoznaju T-stanični receptori, B7.1 i B7.2 interagiraju s CD28 ili CTLA-4, a ICAM-1 s LFA-1 na membrani stanice. Eksperimenti su potvrdili da posjedovanje navedenih molekula na površini viriona može značajno olakšati adsorpciju.

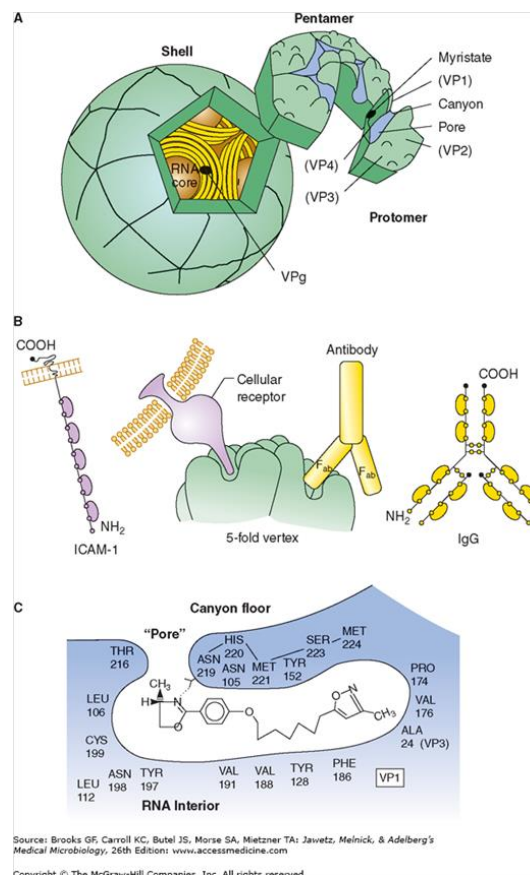
3.3 OBITELJ IMUNOGLOBULINA

Jedna od najviše proučavanih interakcija iz ove skupine je interakcija HIV-CD4, tj. preciznije gp120-CD4. Poznato je već prema simptomima side da HIV prije svega inficira T-limfocite i stanice monocitno-makrofagne linije. Oba tipa stanica imaju eksprimiran CD4 receptor. Interakcija s CD4 receptorom se ostvaruje preko proteina gp120, ali ne istom

³ K= lizin; T= treonin

domenom kao i kod interakcije s heparan sulfatom. Kontakt se događa između 26 aminokiselina u gp120 i 22 aminokiseline CD4 receptora (Kwong *et al.*, 1998). Po stupanju u interakciju dolazi do konformacijske promjene proteina gp120 i dolazi do izlaganja tzv. kriptičke domene koja se veže za jedan od dva kemokinska receptora: CCR5 ili CXCR4. Premda se prema dosadašnjem opisu može zaključiti da je CD4 primarni receptor, mogućnost unosa virusa neovisno o CD4 ukazuje da je primarni receptor upravo jedan od spomenutih kemokinskih (Jolly and Sattentau, 2006).

Molekulu ICAM-1 (CD54) koristi virus prehlade, rinovirus čovjeka (HRV). U interakciju s tom molekulom stupa sekvenca koja se nalazi zaštićena u tzv. kanjonu između VP1, VP2, VP3 i VP4 proteina kapside kako bi se na taj način spriječilo vezanje neutralizirajućeg antitijela.



Slika 2. Shema viriona rinovirusa (A), interakcija s ICAM-1 u odnosu na IgG antitijelo (B) i izgled tzv. kanjona (C). Preuzeto iz Brooks *et al.*, 2013

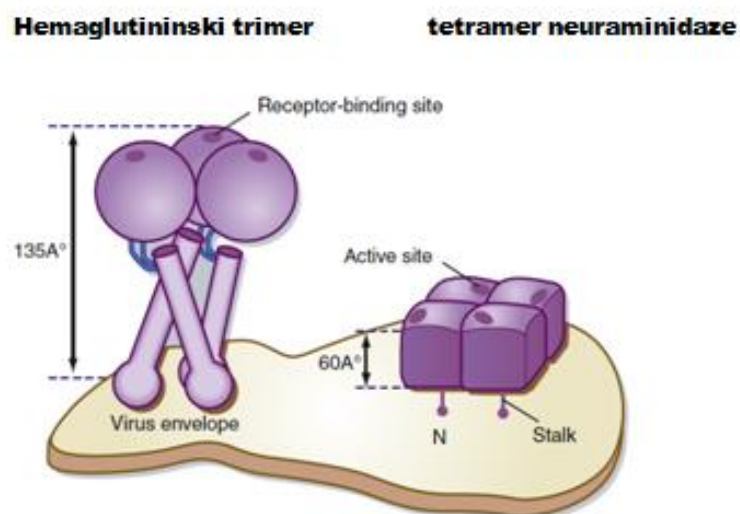
3.4 LEKTINI

Lektini su površinski receptori koji se vežu na N-vezane glikane bogate manozom, kakvi se između ostalih nalaze i na površini virusa Ebole, HIV-a i HCV-a (Yamauchi and

Helenius, 2013). Zanimljivo je da lektini koji su karakteristični za dendritičke stanice (DC-SIGN) imaju važnu ulogu u imunskoj obrani od patogena, ali istovremeno služe kao meta za uspostavljanje infekcije i širenje infekcije organizmom (Anderluh *et al.*, 2012). U slučaju HIV-a, govorimo o mogućnosti *trans*-infekcije. Vezanjem za DC-SIGN HIV ne može inficirati dendritičku stanicu, ali smatra se da može ući u endosom koji nema litičku ulogu i tako ostati infektivan do nekoliko dana. Prilikom interakcije dendritičke stanice i T-stanice stvara se tzv. infektivna sinapsa koja predstavlja pogodni okoliš za infekciju. HIV izlazi na površinu i može ući u CD4⁺ T-stanicu. Ovaj proces događa se u limfnim čvorovima (Hyun, Reuter and McDonald, 2008).

3.5 SIJALIČNA KISELINA

Utvrđeno je da sijalična kiselina predstavlja faktor adsorpcije za FLUAV, koronavirus, ortoreovirus i rotavirus (Kalia and Jameel, 2011). Za IAV detaljno je do atomske razine proučena interakcija između virusne molekule hemaglutinina (HA) i sijalične kiseline. Hemaglutinin i neuraminidaza (NA) su proteini na površini virusne čestice virusa influence. HA je trimer koji se veže na sijaličnu kiselinu, a NA tetramer koji može prekinuti vezu HA-sijalična kiselina što je bitno za oslobađanje iz stanice i za odvajanje od nepermisivne stanice budući da je sijalična kiselina široko rasprostranjena. Posljedica odvajanja je da bočni ogranci sijalične kiseline ostaju vezani za HA pa je taj protein nefunkcionalan pri sljedećoj adsorpciji (Cann, 2012).



Slika 3. Ilustracija proteina na površini FLUAV, preuzeto iz Cann, 2012 .

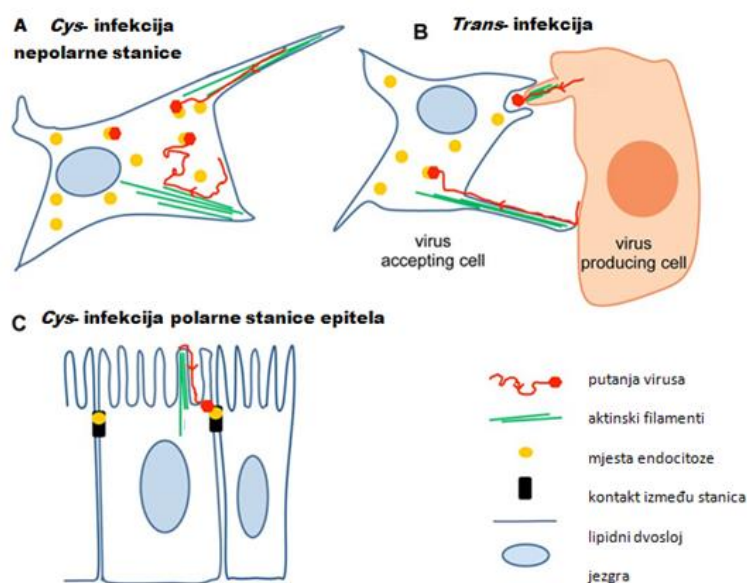
3.6 OSTALI RECEPTORI

Osim ranije opisanih adsorpcijskih faktora, mnogi virusi vežu se i na integrine, multispaline, „receptore-hvatače“ (eng. *scavenger receptors*) koji vežu LDL i ostale receptore. Integrini su heterodimeri koji imaju ulogu u posredovanju interakcija stanica i izvanstaničnog matriksa te interakcija među stanicama. Primjeri virusa koji se vežu za integrine su ehovirus i rotavirus. U grupu 7-transmembranskih proteina (obitelj multispalina) ubrajaju se CCR5 i CXCR4 koji služe kao faktori adsorpcije kod infekcije virusom HIV neovisno o CD4. „Receptori-hvatači“ mogu sudjelovati u adsorpciji HCV na permisivnu stanicu (Jolly and Sattentau, 2006).

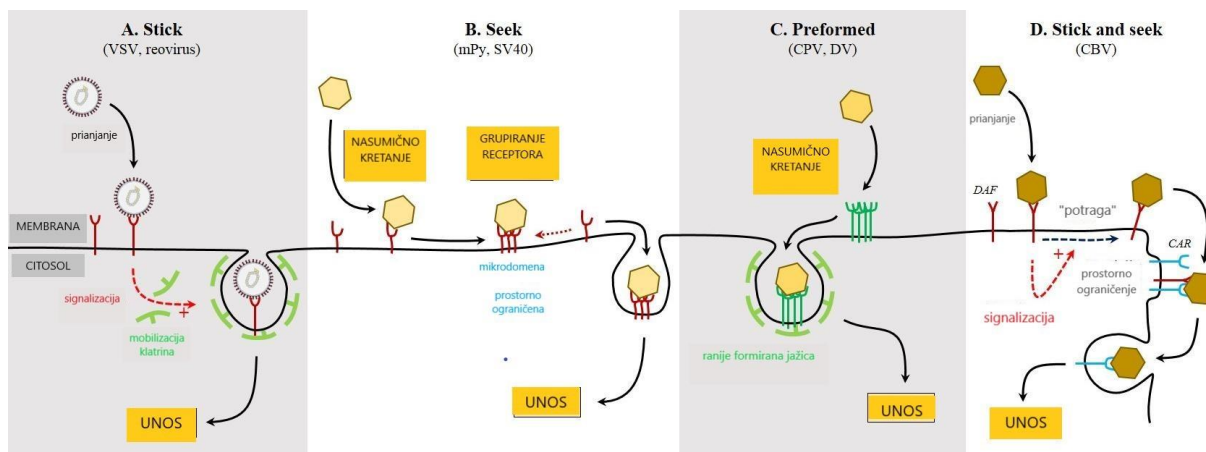
4. LATERALNO KRETANJE VIRUSA UZ POVRŠINU MEMBRANE

Za razliku od mehanizama endocitoze i interakcija virusa i receptora, lateralno kretanje virusa uz površinu membrane predstavlja relativno novo područje istraživanja. Stanična membrana je heterogen, složen i vrlo dinamičan sustav građen od glikolipida, kolesterola i fosfolipida, ali i cijeloga niza drugih molekula (Maxfield and Tabas, 2005). Elementi stanične membrane nisu fiksirani i statični nego često difundiraju, samostalno ili u obliku kompleksa receptor-ligand (Burckhardt and Greber, 2009). Elementi citoskeleta (posebno koritkalni F-aktin) u uskoj su vezi sa staničnom membranom i, kako pozitivno tako i negativno, kontroliraju mogućnost lateralne difuzije.

Najjednostavniji put ulaska u stanicu podrazumijevao bi vezanje virusa za fiksirani receptor i stohastički unos procesom endocitoze, odnosno vezanje virusa za primarni receptor i stohastičko vezanje za sekundarni receptor koji može pokrenuti signal za endocitozu (Boulant, Stanifer and Lozach, 2015). Efikasnost takvog puta uvelike ovisi o mjestu vezanja i broju i gustoći receptora potrebnih za ulazak virusa u stanicu. Nadalje, ovakav način ulaska virusa ne objašnjava procese *trans*-infekcije (ranije spomenuta kod HIV-a) ili *cis*-infekcije kod virusa čija su meta epitelne stanice karakteristične morfologije, često s brojnim mikrovilima (Slika 4). Korak od vezanja za faktor adsorpcije do endocitoze kod mnogih virusa je složen proces koji uključuje aktivno lateralno kretanje uz površinu membrane do odgovarajuće mikrodomene pogodne za endocitozu ili do već nastale jažice (Slika 5B-D). Takvo aktivno kretanje označava usmjereno kretanje kompleksa receptor-virus, a pod kontrolom je staničnih faktora, budući da se virusi ne mogu kretati samostalno zbog neposjedovanja metabolizma.



Slika 4. Shema *cis*- i *trans*- infekcije, prilagođeno prema Burckhardt and Greber, 2009.



Slika 5. Načini lateralnog kretanja virusa uz površinu membrane, prilagođeno prema Boulant, Stanifer and Lozach, 2015.

4.1 VIRUSI KOJI SE NE KREĆU

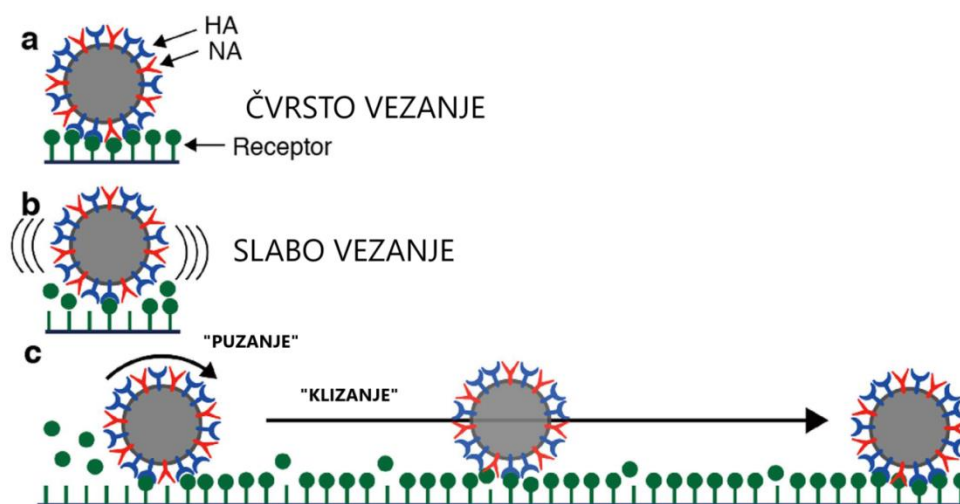
Pripadnici porodice *Reoviridae* i Indiana virus vezikularnog stomatitisa (VSIV) vjerojatno u stanicu ulaze nakon što se vežu za receptor bez lateralnog kretanja. Oba virusa ulaze u stanicu endocitozom posredovanom klatrinom. S obzirom na relativno fiksiranu poziciju, ulazak ovih virusa ovisi o formiranju klatrinom obložene jažice u neposrednoj blizini kompleksa receptor-virus. Za reoviruse je predložen sljedeći model: Najprije se virus veže za sijaličnu kiselinu, a potom za koreceptor $\beta 1$ integrin. Vezanje virusa aktivira molekulu JAM-A (eng. *junctional adhesion molecule A*) koja posreduje u endocitozi (Boulant, Stanifer and Lozach, 2015).

4.2 VIRUSI KOJI KORISTE RANIJE FORMIRANE JAŽICE

Uočeno je da neki virusi poput Dengue virusa (DENV), virus papiloma čovjeka (HPV), virusa poliomijelitisa (PoV) i psećeg parvovirusa (CPV) za ulazak u stanicu koriste unaprijed formirane jažice (Burckhardt and Greber, 2009; Boulant, Stanifer and Lozach, 2015). Njihovo kretanje bi se moglo opisati kao pretraživanje membrane u potrazi za već formiranim jažicama. Takve jažice nazivamo statičnima. Endocitozom tih jažica nastaju kasni endosomi i lizosomi (Burckhardt and Greber, 2009). Za CPV je uočeno da kretanje traje 30-ak sekundi. Značajno otkriće predstavlja ovisnost brzine difuzije o broju vezanih receptora. Pretpostavlja se na temelju eksperimenata da su čestice koje difundiraju vezane za manje od tri, a čestice koje ne mogu difundirati za više od 8 transferinskih receptora. Dakle, za ulazak u stanicu postoji optimalna stehiometrija koja ovisi o afinitetu virusa za receptor. U skladu s time, preveliki afinitet bio bi pogodan samo za vezanje, ali bi mogao negativno utjecati na mogućnost difuzije virusa i na taj način inhibirati ulazak u ciljnu stanicu. Za viruse koji induciraju formiranje jažica obavijenih klatrinom *de novo*, vezanje za više receptora može biti korisno jer zaustavlja virus i omogućava formiranje same jažice i endocitozu (Boulant, Stanifer and Lozach, 2015).

4.3 VIRUSI KOJI MOGU POKRENUTI FORMIRANJE JAŽICA DE NOVO

Vežanje virusa za staničnu membranu je slučajan događaj koji ne favorizira optimalnu poziciju za endocitozu. Zbog toga mnogi virusi difundiraju, uglavnom u ovisnosti o aktinu, do mjesta gdje će se vezati za više receptora i pokrenuti signal za endocitozu. Za virus ptičje leukoze, VSIV, HIV i još nekolicinu virusa utvrđeno je da se kreću po površini filopodija, tipu lažnih nožica (pseudopodija) s ulogom u migraciji stanica i međustaničnim interakcijama. Ostali se uglavnom kreću pomoću kortikalnog aktina, a neki i slobodnom difuzijom. Virus poliooma miša (mPy) nakon vežanja za gangliozični receptor difundira po površini membrane dok se ne veže za dovoljan broj receptora koji će omogućiti signalizaciju i endocitozu (Slika 5B). Sličan proces uočen je kod virusa majmuna 40 (SV40) (Boulant, Stanifer and Lozach, 2015). FLUAV često u organizam ulazi kroz stanice epitela crijeva i dišnog sustava. Takve stanice imaju brojne resice koje su povezane s mikrotubulima i ostalim elementima citoskeleta koji ometaju proces endocitoze. Zbog toga se ulazak u stanicu događa pri bazi cilija (Slika 4C) ili na susjednim stanicama bez cilija koje su obično sakrivene u udubinama epitela. Očito je da FLUAV mora imati mehanizam kretanja da bi ušao u stanicu. Problem kod objašnjavanja konkretnog mehanizma javlja se zbog činjenice da je K_d^4 između sijalične kiseline i HA 1,4-6,5 x 10⁻³ što je između 10⁵ i 10¹¹ veća vrijednost u odnosu na ostale viruse, primjerice *Semliki Forest virus* (SFV) i VSIV (Sakai *et al.*, 2017). Nadalje, autori ističu da za razliku od ostalih virusa koji se zbog prirode odgovarajućih staničnih receptora ne mogu nalaziti imobilizirani u nekoj mikrodomeni, kod virusa koji se vežu za sijaličnu kiselinu to ne mora biti slučaj. Zbog toga su Sakai *et al.*, 2017 na temelju eksperimenata predložili novi model kretanja virusa po membrani (Slika 6), kretanje do kojeg dolazi promjenom receptora na temelju antagonističkog djelovanja HA i NA i spontane disocijacije HA i sijalične kiseline. Opisana su dva načina pokretanja: kretanje nalik na puzanje (kotrljanje) i ono nalik na klizanje. Ukoliko se potvrdi predloženi model, to bi ujedno značilo da je FLUAV prvi virus za kojega je otkriveno da posjeduje vlastiti mehanizam pokretanja, neovisan o receptoru.



Slika 6. Model kretanja lateralnog kretanja FLUAV, preuzeto iz Sakai *et al.*, 2017.

⁴ K_d - konstanta disocijacije

Zanimljiv je i primjer virusa koji se vežu za CAR receptor, enterovirusa i adenovirusa. Enterovirus B (CV-B3) se inicijalno veže za koreceptor DAF na apikalnoj membrani epitelnih stanica. Vežanje aktivira tirozinsku kinazu Abl koja inducira reorganizaciju aktina. U procesu reorganizaciju dolazi do pomicanja kompleksa CV-B3-DAF do čvrstih spojeva (eng. *tight junctions*) gdje dolazi do interakcije s CAR receptorom i endocitoze. Nasuprot tome, adenovirusi se inicijalno vežu za CAR receptor i kao kompleks virus-receptor difundiraju u ovisnosti o aktinu i miozinu. Vežanjem za koreceptor αV integrin dolazi do ograničenja kretanja i endocitoze viriona. Antagonistička uloga dvaju receptora ima ulogu u disocijaciji površinski vlaknastih proteina koji služe za adsorpciju, ali sprečavaju aktivaciju proteina VI potrebnog za pucanje membrane endosoma nakon endocitoze virusa (Boulant, Stanifer and Lozach, 2015). Pokazano je da različita uloga istog receptora ovisi o signalizaciji povezanoj s intracelularnom domenom CAR receptora. Delecijom intracelularne domene ulazak CV-B3 u stanicu je značajno inhibiran za razliku od adenovirusa kod kojih nije zabilježena razlika (Loustalot, Kremer and Salinas, 2015).

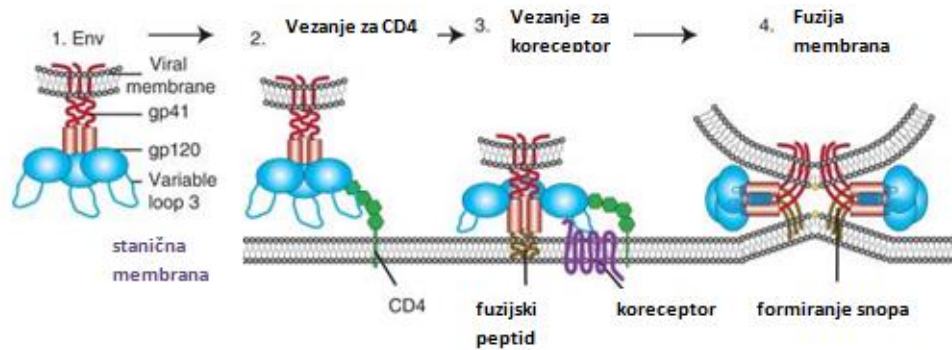
5. ULAZAK VIRUSA U STANICU

Ulazak virusa u stanicu u užem smislu predstavlja proces kojim se virus vezan za površinu stanice unosi u stanicu. Neki virusi mogu ući u stanicu izravno fuzijom s staničnom membranom, ali velika većina virusa u stanicu ulazi endocitozom te se po ulasku nalaze u endosomima. Sustav endosoma dinamičan je sustav koji uključuje kretanje endosoma i složen proces signalizacije i sortiranja u koji su uključene stotine staničnih faktora (Yamauchi and Helenius, 2013). Premda se virus unutar endosoma ne nalazi u citoplazmi već u svojevrsnoj karanteni koja može završiti čak i razgradnjom ukoliko virus ne uđe u citosol prije stapanja sa lizosomom, transportni sistem vezikula omogućuje lakši pristup replikacijskoj mašineriji nakon penetracije membrane i ulaska u citosol. Virusi reagiraju na cijeli niz signala povezanih s položajem u stanici i mogu „tempirati“ ulazak u sam citosol u skladu sa svojim genomom (DNA ili RNA) što ukazuje na visok stupanj prilagodbe i važnu ulogu endocitoze u odnosu na ostale faze replikacijskog ciklusa virusa.

Sustavan prikaz ovog koraka zahtjevan je zadatak iz razloga što virusi nerijetko koriste više načina ulaska u stanicu, što ovisi o tipu stanice domaćina, o samom domaćinu ukoliko se virus može replicirati u različitim vrstama, o soju virusa ili o uvjetima u organizmu domaćina. Primjeri virusa s nekoliko različitih strategija ulaska su FLUAV i Epstein-Barrov virus (EBV) (Helenius, 2018). Osim toga, eksperimenti izvođeni *in vitro* ne mogu sa sigurnošću odrediti strategiju pojedinog virusa u uvjetima *in vivo*, o čemu je već bilo riječi u ranijim poglavljima.

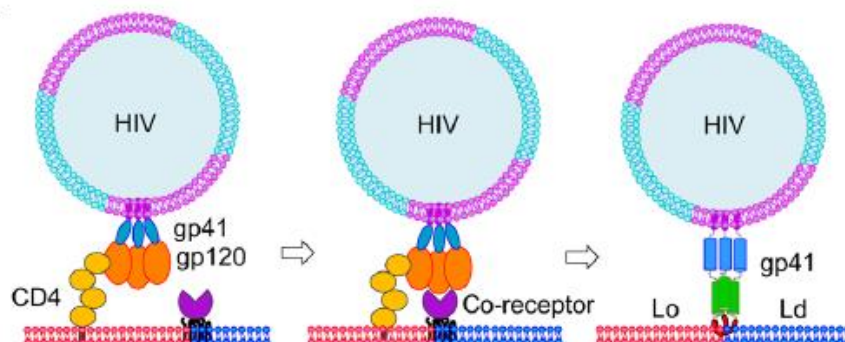
5.1 FUZIJA SA STANIČNOM MEMBRANOM

Za nekolicinu virusa zabilježeno je da mogu ući u stanicu fuzijom s plazmatskom membranom. Taj proces još nazivamo (premda manje ispravno) fuzijom neovisnom o pH, budući da je kod virusa koji ulaze u stanicu endocitozom upravo promjena pH najčešće signal za fuziju membrana. Herpesvirusi grupe α mogu vršiti takvu fuziju. Fuzijski glikoproteini gB, gH, gL i gD na površini virusa vežu se na gD-receptor. Vezanjem dolazi do konformacijske promjene koja omogućuje proces miješanja lipida kojim nastaje tzv. hemifuzijski intermedijer. Naposljetku se formira fuzijska pora koja omogućuje izmjenu citoplazmatskog sadržaja što dovodi do ulaska nukleokapside virusa u citoplazmu (Akhtar and Shukla, 2009). HIV1 može nakon vezanja za receptor CD4 i koreceptor CCR5/CXCR4 ući u stanicu i endocitozom i izravnom fuzijom sa staničnom membranom (Slika 7). Fuzija je u oba slučaja posredovana proteinom gp41.



Slika 7. Ulazak HIV-a u stanicu fuzijom sa staničnom membranom prilagođeno prema Wilen, Tilton and Doms, 2012.

Miyauchi *et al.*, 2009 tvrde da ulazak HIV-a fuzijom s plazmatskom membranom ne napreduje dalje od miješanja lipida. Međutim, eksperimenti su pokazali da unošenjem gena za Env u stanicu i njegovom ekspresijom na membrani dolazi do međusobne fuzije stanica. To dokazuje da je Env dovoljan za fuziju te da je fuzija neovisna o pH. Nadalje, mutacija citoplazmatkse domene CD4 koja onemogućuje endocitozu ne utječe na infekciju HIV-om. Uzevši u obzir te činjenice, kao i genetičku varijabilnost HIV-a i tipova stanica koje mogu biti inficirane HIV-om, konačan zaključak nije moguće donijeti (Wilen, Tilton and Doms, 2012). HIV na površini ima oko 14 Env proteina što je vrlo malo u odnosu na većinu virusa. Mali broj proteina na površini čestice može uzrokovati neefikasan ulazak viriona u stanicu. Osim toga, CD4 receptor je uglavnom lokaliziran unutar membranskih domena bogatih kolesterolom, koje se zbog svoje čvrste strukture smatraju vrlo nepogodnim za endocitozu i fuziju. Nameće se pitanje kako je infekcija uopće moguća. Odgovor možda leži u otkriću da se koreceptor CCR5 ne nalazi unutar spomenutih lipidnih domena pa se interakcija s CD4 i CCR5 istovremeno može dogoditi samo na granici membranskih domena (Slika 8). Zbog nejednake visine lipida u različitim domenama postoji linijska napetost na granicama domena, koja ih čini najslabijim mjestima na membrani u smislu stabilnosti i kompaktnosti. To svojstvo omogućuje HIV-u da unatoč malom broju antireceptora uđe u stanicu (Yang *et al.*, 2017).

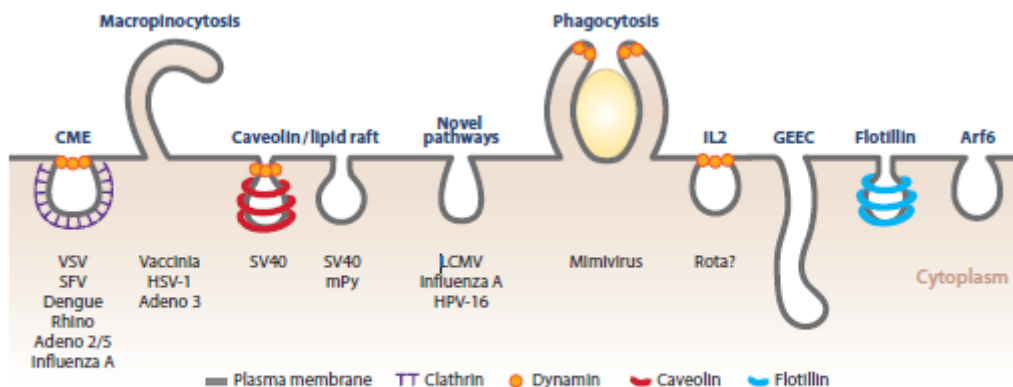


Slika 8. Vežanje HIV-a za receptor i koreceptor na granici membranskih domena, prilagođeno prema Yang *et al.*, 2017.

5.2 ENDOCITOZA

Endocitoza je najčešći način ulaska virusa u stanicu. To je skupni naziv za sve puteve koji uključuju nastajanje endosoma. Endocitoza je potaknuta složenom signalizacijom koju pokreće vezanje virusa za receptor. Za VSV i FLUAV utvrđeno je da je frekvencija nastajanja vezikula obloženih klatrinom kad je virus vezan za receptor 16-20 puta veća od uobičajene (Boulant, Stanifer and Lozach, 2015). U procesu endocitoze SV40 u stanice HeLa, nakon vezanja za receptore MHC-I i GM1 sudjeluje preko 40 različitih kinaza uključujući FAK, Src, FYN i AKT1 (Pelkmans *et al.*, 2005). Poznati su i primjeri signalizacije integrina kod ulaska adenovirusa te složena signalizacija koja dovodi do radikalnog rearanžiranja aktina kod endocitoze virusa Kaposijevog sarkoma (KSHV).

Najvažniji putevi endocitoze su: (i) endocitoza posredovana klatrinom, (ii) kaveolarna ili endocitoza posredovana lipidnim splavima, te (iii) makropinocitoza. Uočene su i varijante endocitoze neovisne o klatrinu i kaveolinu. Značajan faktor koji određuje mogućnost pojedinog puta endocitoze je veličina virusa. Tako je endocitoza posredovana klatrinom uobičajeni mehanizam unosa manjih virusa, a makropinocitoza mehanizam unosa uglavnom većih virusa. Za mnoge viruse nije karakterističan jedan put, nego je zabilježeno da mogu koristiti različite mehanizme ulaska u stanicu (Yamauchi and Helenius, 2013). Zabilježeno je čak i da inhibicija pojedinog puta može biti kompenzirana preostalim varijantama endocitoze koje mogu koristiti i virusi.



Slika 9. Različiti putevi endocitoze s naznačenim primjerima virusa koji koriste pojedini put, preuzeto iz Mercer *et al.*, 2010.

5.2.1 ENDOCITOZA POSREDOVANA KLATRINOM

Endocitoza posredovana klatrinom važan je stanični put unosa receptora (EGF receptor) i liganda (LDL, transferin), a mnogi virusi koriste upravo taj put za ulazak u stanicu. Nakupljanjem klatrina i drugih proteina s unutarnje strane membrane nastaju invaginacije, klatrinom obložene jažice. Uvlačenjem nastaju vezikule obavijene klatrinom promjera 60-200 nm (Kirchhausen, 2000). Građa jažica obloženih klatrinom (kasnije vezikula) nije uvijek jednaka. Pokazalo se da je za proces neophodan dinamin-2, velika GTPaza uključena u više

puteva endocitoze. Važan, ali ne i neophodan faktor je adaptorski kompleks AP2. Nije poznato što točno uzrokuje nastajanje klatrinskog omotača, ali pretpostavlja se da grupiranje receptora potaknuto virusom može formirati specifičnu mikrodomenu membrane s izmijenjenim svojstvima koja olakšavaju nakupljanje klatrina i endocitozu. Endocitoza posredovana klatrinom je uglavnom brz proces koji traje svega nekoliko minuta po vezanju virusa za membranu. Prijenos u rani endosom događa se nakon jedne do dvije minute, nakon čega slijedi proces acidifikacije (detaljno u poglavlju 6). Virusi koji koriste endocitozu posredovanu klatrinom su VSV, FLUAV, DENV, reovirusi, virus poliomijelitisa, adenovirusi, HCV, FMDV i još mnogi virusi. Parvovirusi, jedni od najmanjih DNA virusa, također ulaze u stanicu ovim putem endocitoze (Mercer, Schelhaas and Helenius, 2010; Kalia and Jameel, 2011).

5.2.2 KAVEOLARNI PUT/ E. OVISNA O LIPIDNIM SPLAVIMA

Mnogi virusi koji se vežu na glikosfingolipide koriste ovaj put. Njegova glavna karakteristika je da ovisi o kolesterolu, lipidnim splavima i o kompleksnom signalnom putu koji uključuje tirozinske kinaze i fosfataze. Proces je potaknut vezanjem liganda (na primjer albumina ili antireceptora nekih virusa) (Sandvig, Kavaliauskiene and Skotland, 2018). Najbolje proučavani virusi koji koriste kaveolarni put su virusi iz porodice *Polyomaviridae*. U njih spadaju SV40, mPy i dva patogena ljudi, BK i JC (Mercer, Schelhaas and Helenius, 2010). Ovaj put endocitoze je nešto sporiji od onog posredovanog klatrinom, a vezikula ne podliježe acidifikaciji. Dugo se smatralo da se sadržaj vezikula prenosi u posebne organele, nazvane kaveosomima, no neka istraživanja te organele povezuju s kasnim endosomima modificiranim tek prekomjernom ekspresijom kaveolina 1 (CAV1) (Hayer *et al.*, 2010).

5.2.3 MAKROPINOCITOZA

Makropinocitoza može se definirati kao put endocitoze za nespecifični unos tekućine, otopljenih tvari i čestica, a koji ovisi o aktinu. Glavna je karakteristika ovog puta značajno razmještanje elemenata citoskeleta (najviše aktina) u stanici i stvaranje nabora membrane. Stoga makropinocitoza nije tek lokalni površinski proces, nego uključuje sustavan stanični odgovor. Aktivacija makropinocitoze uključuje tirozin-kinazne receptore, integrine, TIM/TAM skupinu receptora koje aktivira fosfatidil-serin na površini viriona te cijeli niz staničnih faktora (Helenius, 2018). Makropinocitoza nije posredovana niti česticama niti nakupljanjem proteina s unutarnje strane membrane pa su nastale vezikule nepravilnog oblika i različite veličine. Vezikule nastale makropinocitozom mogu biti promjera do 10 μm , značajno veće od vezikula nastalih ostalim endocitičkim procesima (Mercer, Schelhaas and Helenius, 2010). Makropinocitoza je stoga čest put unosa velikih virusa poput poksvirusa, filovirusa, FLUAV-a, AdV-a, HSV-a i HIV-a. Posebno se ističe vakcinia virus (VACV) koji ulazi u makrofage imitirajući apoptotička tjelešca. VACV na svojoj površini sadrži fosfatidil-serin, stanični signal za apoptozu. Stanice sadrže enzim flipazu koji trošeći ATP održava fosfatidil-serin u unutrašnjem sloju membrane, ali budući da virusi nemaju metabolizam, fosfatidil-serin prelazi i u vanjski sloj membrane što prepoznaju makrofagi preko TIM/TAM receptora te pokreću proces makropinocitoze. *Rubella virus* (RUBV) i adenovirusi su virusi koji ne koriste makropinocitozu kao mehanizam ulaska, ali je ona nužna za njihovu

infektivnost. Formiranje i pucanje makropinosoma omogućuje virusima penetraciju membrane, pretpostavlja se uslijed oslobađanja njegovih komponenti (Gastaldelli *et al.*, 2008; Mercer, Schelhaas and Helenius, 2010).

5.2.4 OSTALI PUTEVI

Osim ranije opisanih varijanti endocitoze, u mnogo navrata elektronskim mikroskopom uočene su vezikule bez omotača koje sadrže viruse (Marsh and Helenius, 2006). Virusi koji ulaze alternativnim putevima endocitoze uglavnom koriste i već ranije opisane strategije, no put neovisan o kaveolinu, klatrinu i dinaminu-2 može omogućiti inficiranje širokog spektra stanica, što je poznato na primjeru SV40 (Damm *et al.*, 2005). Osim SV40, dokazano je da alternativne puteve koriste HPV-16, HSV, *Rotavirus*, FLUAV i još neki (Mercer, Schelhaas and Helenius, 2010). *Rotavirus* je RNA virus bez ovojnice. Veže se serijski za molekule koje sadrže sijaličnu kiselinu, integrin $\alpha 2\beta 1$, Hsc70 i integrine $\alpha 5\beta 3$ i $\alpha X\beta 2$. Sam proces endocitoze je ovisan o dinaminu-2 i osjetljiv na nedostatak kolesterola, ali ne uključuje proteinski omotač kod stvaranja jažica i vezikula. Ulazak virusa HPV-16 pokazuje osobine koje se ne uklapaju ni u jedan do danas opisani put endocitoze. Prema osobinama puta ulaska radi se o hibridnom putu s karakteristikama makropinocitoze i puta koji koristi arenavirus *Lymphocytic choriomeningitis virus* (LCMV) (Ibid, 2010). Rezultati su ukazivali da je endocitoza HPV-a neuobičajeno spora i neefikasna, ali pokazano je da je razlog takvih opservacija ovisnost endocitoze HPV-a o fazi staničnog ciklusa što otvara novo područje istraživanja (Broniarczyk *et al.*, 2015). Postoje i naznake da relativno nedavno otkriveni put, tzv. GEEC (eng. *GPI-AP enriched early endosomal compartments*) put može poslužiti virusu hepatitisa E za ulazak u stanicu (Kalia and Jameel, 2011).

6. PRODIRANJE (PENETRACIJA)

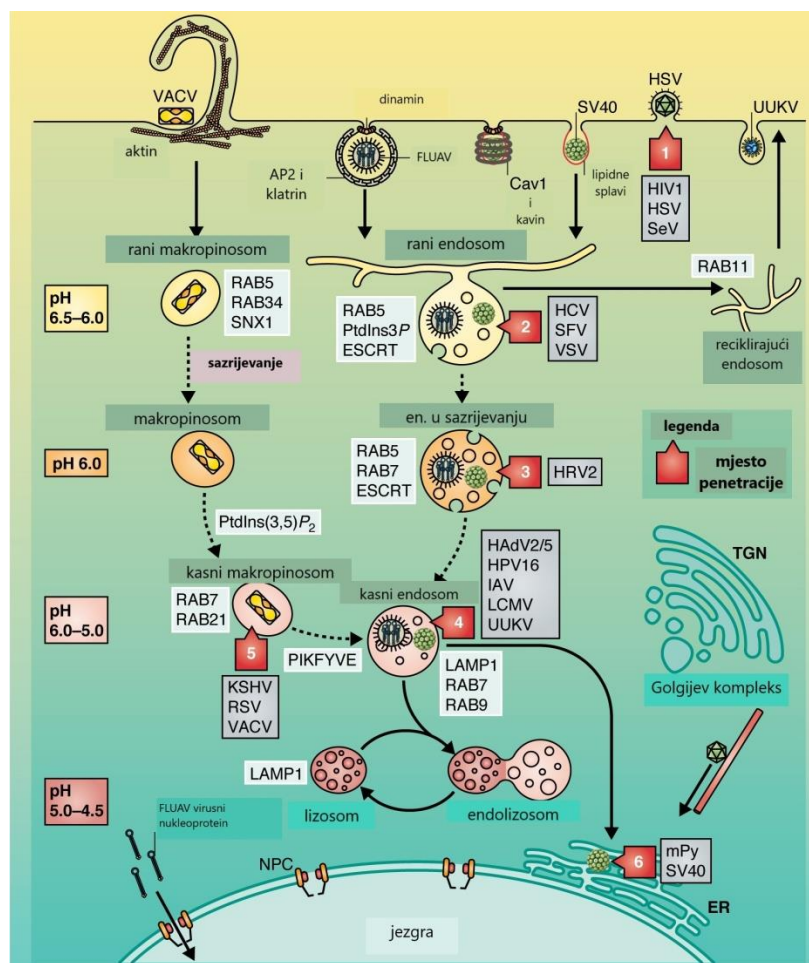
Virusi koji u stanicu ulaze fuzijom sa staničnom membranom, ulaze izravno u citoplazmu, gdje svlačenjem kapside (eng. *uncoating*) u blizini replikacijske mašinerije oslobađaju genom u stanicu. Većina virusa, kao što je navedeno u prethodnom poglavlju, u stanicu ulazi endocitozom, što uvjetuje dodatan korak u replikacijskom ciklusu - izlazak iz sustava endosoma. Unutar vezikula, endosoma, kaveosoma ili makropinosoma virusi su izolirani od ostatka stanice i nalaze se u svojevrsnoj karanteni. Dvije su osnovne karakteristike sustava endosoma: i) to je dinamičan sustav u kojem ti organeli prolaze kroz procese sazrijevanja, fuzija i fisija i ii) njihovo krajnje odredište su lizosomi ili ponovno stanična membrana u slučaju reciklirajućih endosoma (Slika 10). Iz ovih temeljnih svojstava proizlazi nekoliko implikacija vezanih uz viruse. Prvo, proces sazrijevanja, koji uključuje pad pH, zamjenu staničnih Rab faktora, konverziju fosfatidil-inozitola, unos hidrolaza i lizosomalnih proteina te druge procese, uvjetuje promjenjivi okoliš na koji virusi moraju biti prilagođeni (Helenius, 2018). Nadalje, krajnje odredište endosoma, bilo ono lizosom ili stanična membrana, sprječava produktivnu infekciju. Virus stoga moraju u pogodnom trenutku napustiti endosom. Unatoč brojnim nužnim prilagodbama virusa sustavu endosoma, taj sustav za viruse ima i brojne prednosti. Glikoproteini virusne ovojnice kod ulaska virusa endocitozom ne ostaju izloženi na staničnoj membrani, čime se izbjegava rano prepoznavanje i pokretanje imunskog odgovora domaćina. Osim toga, virusi su stekli niz prilagodbi koje im omogućuju ulazak u citoplazmu u pogodnom dijelu stanice. Sagledavajući cijeli replikacijski ciklus, činjenica da prilagodba na ulazak endocitozom osigurava svlačenje i oslobađanje genoma samo u uvjetima kad se virus nalazi u stanici predstavlja možda i ključnu prednost ulaska endocitozom (Mercer, Schelhaas and Helenius, 2010; Schelhaas, 2010; Helenius, 2018).

Prodiranje kroz membranu (penetracija) i ulazak virusa u citosol može se dogoditi na površini stanice, u organelima sustava endosoma (rani, kasni ili endosom u procesu sazrijevanja, reciklirajući endosom, makropinosom, endolizosom) te u organelima staničnog sustava endomembrana (endoplazmatski retikulum (ER) i *trans*-Golgijev aparat) (Slika 10). Osnovni način prodiranja je promjena konformacije proteina virusa koja dovodi do fuzije virusne ovojnice s membranom, pucanja membrane ili stvaranja pore u membrani organela u kojem se virus nalazi. Okidači za taj proces mogu biti nizak pH u lumenu endosoma, proteolitička cijepanja, interakcije molekula s receptorom, interakcije s proteinskim šaperonima te promjena membranskog potencijala membrane endosoma (Berka *et al.*, 2009; Helenius, 2018).

Najznačajniji i najdetaljnije proučavani okidač je acidifikacija, odnosno snižavanje vrijednosti pH. Unatoč raznolikosti strategija ulaska u stanicu i ostalih koraka replikacijskog ciklusa, prodiranje kao odgovor na sniženu vrijednost pH gotovo je univerzalno za sve viruse (Vázquez-Calvo *et al.*, 2012). Proces acidifikacije najčešće počinje fuzijom endocitirane vezikule s ranim endosomom. Fuzija je posredovana interakcijom SNARE receptora (primjerice sintaksina-6 i sintaksina-13) i GTPaze Rab5 na površini vezikule s EEA-1 antigenom ranog endosoma (Vázquez-Calvo *et al.*, 2012; Li and Marlin, 2015). Rab GTPaze su važne za unutarstanični transport jer sudjeluju u fuziji membrana i usmjeravanju vezikule

prema endosomu, što omogućuju posebne posttranslacijske modifikacije cisteina na C-kraju proteina (Li and Marlin, 2015). Za samu acidifikaciju endosoma odgovorna je aktivnost vakuolarnih H⁺-ATPaza (V-ATPaza). Aktivnim transportom H⁺ iona u lumen endosoma pH postepeno pada na 6,0-6,5 u ranom endosomu, do vrijednosti 5,0-5,5 koju nalazimo u kasnom endosomu (Jefferies, Cipriano and Forgac, 2008) (Slika 10). Važnost pH za prodiranje odražava se u primjeru virusa koji kao okidač za prodiranje koriste druge mehanizme, primjerice virus BK. Ovom virusu za prodiranje je potrebna interakcija sa proteinskim šaperonima koji kataliziraju izomerizaciju međumolekulskih disulfidnih veza. Interakcija se događa u okolišu neutralnog pH, u endoplazmatskom retikulumu. Međutim, pokazano je da je za transport virusa do ER-a nužan proces acidifikacije. Slični rezultati zabilježeni su za SV40 (Schelhaas *et al.*, 2007; Jiang *et al.*, 2009).

Osnovni mehanizam prodiranja razlikuje se kod virusa s ovojnicom i virusa bez ovojnice. Virusi s ovojnicom prodiranje vrše fuzijom s membranom organela iz sustava endosoma, na taj način izokrećući ovojnicu iznutra prema van i oslobađajući kapsidu u citosol. Virusi bez ovojnice svojim proteinima uzrokuju ili pucanje membrane endosoma i izlijevanje cijelog sadržaja endosoma u citosol, ili stvaranje pore na membrani endosoma kroz koju kapsida može proći u citosol.



Slika 10. Putevi ulaska virusa u stanicu, transport sustavom endosoma i mjesta penetracije: stanična membrana (1), rani endosom (2), endosom u sazrijevanju (3), kasni endosom (4), makropinosom (5) i endoplazmatski retikulum (6). Prilagođeno prema Yamauchi and Helenius, 2013.

6.1 VIRUSI S OVOJNICOM

Virusi s ovojnicom koji ulaze u stanicu endocitozom, potaknuti uvjetima u endosomu pokreću fuziju vlastite ovojnice s membranom endosoma i ulazak genoma u stanicu. Ovisno o tipu genoma virusa može doći do oslobađanja samo genomske nukleinske kiseline (+ssRNA), odnosno genoma u kompleksu s proteinima za transport u jezgru (DNA) ili polimerazama (-ssRNA) (Vázquez-Calvo *et al.*, 2012).

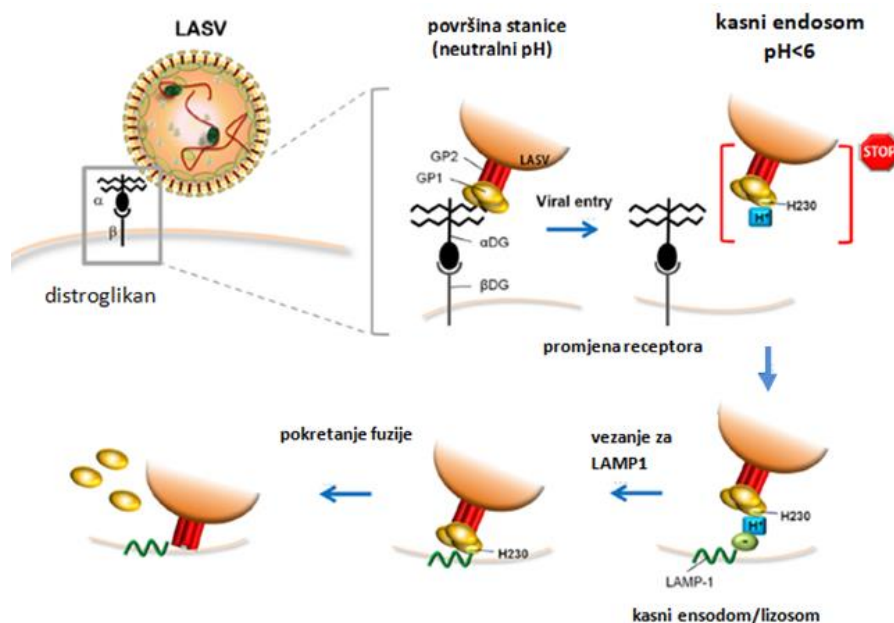
Mehanizam prodiranja FLUAV-a detaljno je istražen. Početak ciklusa predstavlja vezanje HA za sijaličnu kiselinu na površini stanice. Nakon vezanja i lateralne difuzije uz površinu stanične membrane, FLUAV u stanicu ulazi uglavnom endocitozom posredovanom klatrinom. Ovaj virus pripada grupi virusa s kasnim prodiranjem, za koje je značajno da moraju dobro tempirati izlazak iz endosoma prije razgradnje u lizosomu. Virusi s kasnim prodiranjem osim niskog pH trebaju i druge signale za oslobađanje iz endosoma, poput ubikvitina, ESCRT kompleksa, specifičnog sastava lipida i sl. Pokazano je da uklanjanje kulina-3, proteina uključenog u transport endosoma, inhibira infekciju FLUAV-om (Yamauchi and Helenius, 2013). Protein ovojnice HA nalazi se u obliku trimera na površini viriona i odgovoran je za vezanje za receptor. Monomer HA se sintetizira kao HA0 prekursorski peptid. U uvjetima niskog pH dolazi do cijepanja na globularnu podjedinicu HA1 koja se veže za receptor i podjedinicu HA2 koja sadrži transmembransku domenu i fuzijski peptid na svojem N-kraju. Cijepanjem se fuzijski peptid oslobađa i može ući u membranu endosoma te pokrenuti proces fuzije membrane endosoma i viriona (Vázquez-Calvo *et al.*, 2012; Di Lella, Herrmann and Mair, 2016). Važna je i uloga virusnog proteina matriksa M2, malog ionskog kanala koji prenosi protone u unutrašnjost virusne ovojnice prije samog prodiranja. Snižavanje pH unutar virusne ovojnice dovodi do odvajanja ribonukleoproteina⁵ (RNP) od proteina matriksa čime je moguće njihovo oslobađanje u citoplazmu nakon prodiranja (Manzoor, Igarashi and Takada, 2017).

HCV također ima RNA genom i posjeduje ovojnicu. U stanicu ulazi endocitozom posredovanom klatrinom, prenosi se do ranih endosoma koji sazrijevaju do kasnih endosoma (multivezikularnih tijela). Sazrijevanje prati disocijacija Rab5 i akvizicija Rab7 GTPaze. Snižavanjem pH dolazi do konformacijske promjene i izlaganja fuzijskog peptida E1 koji posreduje u procesu fuzije (Miao *et al.*, 2017).

Premda je prodiranje virusa s ovojnicom predmet istraživanja već 40-ak godina, nedavno su otkrivene posve nove strategije virusa vezane za ovaj proces. Pokazalo se da klasična teorija o ulasku virusa u stanicu nije točna za sve viruse. Dugo se smatralo se da se virus veže za receptor na površini stanične membrane i da potom taj receptor posreduje u svim procesima do oslobađanja genoma u citosol, preuzimajući ulogu svojevrsnog vodiča kroz stanicu. Međutim, za *Lassa virus* (LASV) i virus Ebole (EBOV) utvrđeno je zanimljivo svojstvo – promjena receptora unutar endosoma (Jae and Brummelkamp, 2015). LASV se

⁵ FLUAV ima genom fragmentiran u 8 RNA molekula koji s proteinima čine ribonukleoproteine.

inicijalno svojim glikoproteinom-1 (GP1) veže za distroglikan, glikoprotein važan za stabilnost membrane koji povezuje izvanstanični matriks i elemente citoskeleta. Virus ulazi u stanicu makropinositom. Sazrijevanjem makropinosoma i fuzijom s kasnim endosomom LASV dolazi u uvjete niskog pH, pri čemu dolazi do protonacije GP1 i disocijacije s distroglikana, te interakcije između GP1 i LAMP1 receptora (Torriani, Galan-Navarro and Kunz, 2017). Premda LAMP1 nije odgovoran za fuziju virusne ovojnice s membranom endosoma *per se*, uklanjanjem tog receptora prodiranje je moguće tek pri nižoj vrijednosti pH. Stoga se može zaključiti da se interakcijom virusnog proteina GP1 s LAMP1 prilagođava granični pH pri kojem LASV može prodrijeti kroz membranu, što je prvo takvo svojstvo zabilježeno kod virusa. Slična strategija, ali uz razlike koje ukazuju da se ne radi o varijantama jednakog mehanizma, uočena je kod EBOV-a. Pad pH za EBOV ima indirektni značaj i ne dovodi izravno do konformacijske promjene virusnog proteina. Naime, promjenu kataliziraju proteaze katepsini, koji su aktivni u kiselom lumenu kasnog endosoma. Za razliku od LASV-a, za EBOV je nužno i djelovanje HOPS (eng. *homotypic fusion and vacuole protein sorting*) kompleksa. Za EBOV je također karakteristična promjena receptora u endosomu, gdje virus disocira s glikozaminoglikana, lektina, ili drugih faktora adsorpcije i veže se za NPC1, analogno vezanju LASV-a za LAMP1. Nije poznato zbog čega se razvila strategija promjene receptora, no uočeno je nekoliko prednosti koje ona donosi. EBOV proteolitičkim cijepanjem izlaže domene koje su do tada bile sakrivene, te ih stoga antitijela ne mogu prepoznati. LASV se veže za distroglikan koji je vrlo velika molekula, stoga je moguće da se virus vezan za nju nalazi predaleko od membrane da bi se pokrenuo proces fuzije pa disocijacija omogućuje približavanje viriona membrani endosoma. Budući da je jedan od mogućih scenarija kod unosa endocitozom recikliranje stanične membrane, vezanje za receptore povezane s transportom do lizosoma osigurava da nakon fuzije ne dođe do recikliranja i mogućeg izlaganja proteina virusne ovojnice, koji mogu dovesti do imunskog odgovora (Jae and Brummelkamp, 2015).

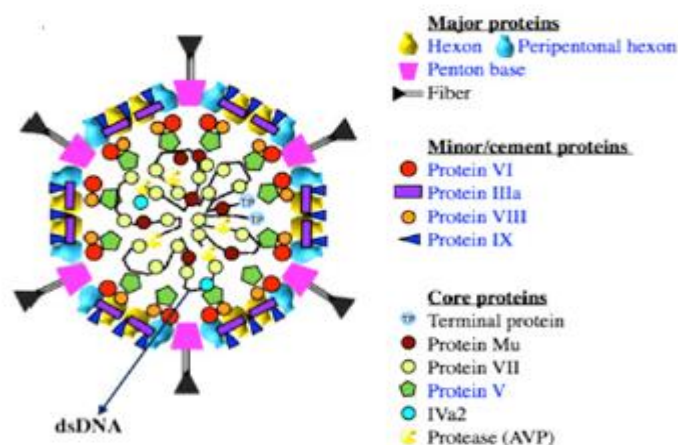


Slika 11. Model promjene receptora Lassa virusa, prilagođeno prema Torriani, Galan-Navarro and Kunz, 2017.

6.2 VIRUSI BEZ OVOJNICE

Virusi bez ovojnice kapsidu s relativno malim brojem proteina koriste i za zaštitu genoma i za sve procese uključene u ulazak u stanicu, stoga se mogu smatrati vrlo efikasnim genskim vektorima (Bilkova, Forstova and Abrahamyan, 2014). U DNA-viruse bez ovojnice ubrajaju se *Adenoviridae*, *Papillomaviridae*, *Polyomaviridae*, i *Parvoviridae*, dok su *Picornaviridae* RNA-virusi bez ovojnice. U usporedbi s virusima s ovojnicom, prodiranje je kod ovih virusa puno manje istraženo, ali poznato je da osnovni mehanizam uključuje stvaranje pore u membrani ili narušavanje membrane endosoma. Kod nekih virusa, primjerice rinovirusa (porodica *Parvoviridae*), zabilježena su oba spomenuta mehanizma (Vázquez-Calvo *et al.*, 2012).

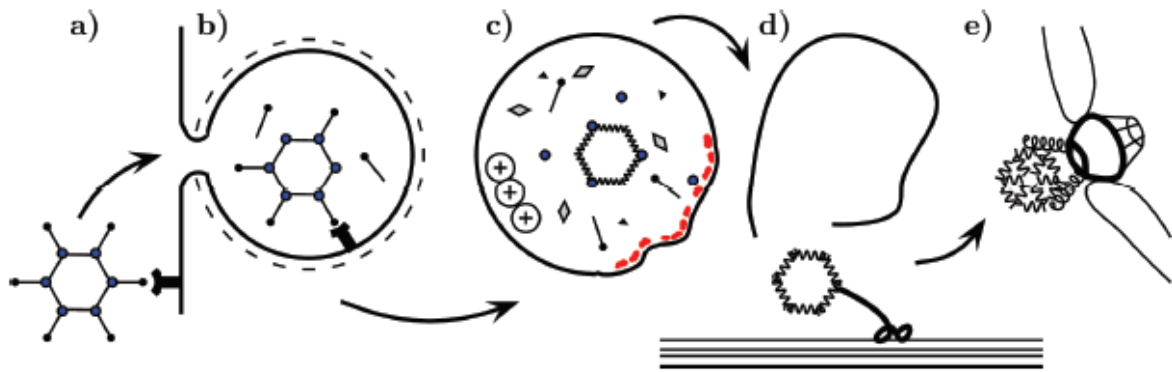
Kapsida ljudskog adenovirusa (HAdV) građena je od tri glavna proteina: pentona heksona i vlaknastih proteina te 4 mala (tzv. cementna) proteina nazvana brojevima: IIIa, VI, VII i IX (Slika 12). Osim tih proteina postoje i proteini jezgre (eng. *core proteins*) u unutrašnjosti kapside zajedno sa 36kb velikom dvolančanom DNA. Kapsida ima pseudo-ikozaedarsku simetriju (Reddy and Nemerow, 2014).



Slika 12. Građa kapside HAdV-a, prilagođeno prema Reddy and Nemerow, 2014.

Kao što je navedeno u poglavlju 4.3, HAdV se veže najprije za CAR, a potom za integrine koji zaustavljaju lateralnu difuziju virusa i posreduju u procesu endocitoze. Te interakcije su bitne jer dovode do disocijacije vlaknastih proteina što omogućuje izlazak pentona i cementnih proteina u endosom (Slika 13). Posebno je značajan protein VI koji ima litičku funkciju u stanici. Premda se prvotno pretpostavljalo da je prodiranje adenovirusa povezano s padom pH u endosomu, novija istraživanja pokazala su da se ulazak u citoplazmu događa vrlo blizu površine stanice. Proces je vjerojatno primarno vremenski reguliran otpuštanjem proteina VI i vremenom potrebnim za njegovo umetanje u membranu. Protein VI oslobađa se kao pVI prekursor kojeg cijepanjem aktivira virusna cisteinska proteaza L2/p23. Aktivni oblik, nakon cijepanja C-kraja i N-kraja proteina, dugačak je 206 aminokiselina. Posebno je važna amfipatska α -zavojnica na N-kraju proteina VI koja svojim umetanjem u membranu endosoma narušava njezin integritet. S obzirom na način djelovanja proteina VI i

veličinu pore (oko 90nm) smatra se da je nemoguće formiranje stabilne pore te da dolazi do neravnoteže i pucanja cjelokupne membrane endosoma (Bilkova, Forstova and Abrahamyan, 2014; Wiethoff and Nemerow, 2015).



Slika 13. Ulazak HAdV-a u stanicu. Nakon adsorpcije (a) dolazi do endocitoze (b). Disocijacijom vlaknastih proteina oslobađa se protein VI koji ulazi u membranu i izaziva njezino pucanje (c). Ostatak kapside s genomom kreće se prema jezgri uz mikrotubule (d) i daljnjim svlačenjem omogućuje ulazak genoma u jezgri (e). Preuzeto iz Bilkova, Forstova and Abrahamyan, 2014.

Ljudski rinovirus 2 (HRV2) izlazi iz endosoma kroz poru u membrani. U uvjetima niskog pH, pet proteina VP4 i 5 N-terminalnih krajeva proteina VP1 tvore ionski kanal u membrani endosoma kroz koji može proći kapsida virusa. Može se dogoditi i da interakcije VP proteina i membrane endosoma dovedu izravno do pucanja membrane (Fuchs and Blaas, 2010).

SV40 i mPy (porodica *Polyomaviridae*) u citoplazmu ulaze iz ER-a. Endocitoza ovisi o lipidnim splavima, nakon čega slijedi transport do ER-a, gdje virusi stupaju u interakciju s proteinskim šaperonom Erp29. Kod SV40 dolazi do izomerizacije međumolekulskih disulfidnih veza, a kod mPy se mijenja konformacija C-terminalne ruke VP1 što dovodi do stvaranja hidrofobne čestice koja može pokrenuti prodiranje (Magnuson *et al.*, 2005; Schelhaas *et al.*, 2007).

U prethodnim poglavljima bilo je riječi o prilagodbama virusa (neovisno o tome imaju li ovojnici) na sustav endosoma, koji virusi uglavnom koriste za ulazak u stanicu. Međutim, neke stanice, poput makrofaga, imaju vrlo aktivan sustav unutarstaničnog transporta endosoma prema lizosomima, što onemogućuje infekciju stanice virusima poput FMDV (porodica *Picornaviridae*). Nasuprot tome, u epitelnim stanicama dinamika endosoma je povoljnija pa ih to čini pogodnim stanicama za uspostavljanje infekcije (Summerfield *et al.*, 2009).

7. KRETANJE VIRUSA KROZ CITOPLAZMU

Od mjesta ulaska u stanicu do mjesta replikacije virusnih genoma postoje brojne prepreke koje moraju biti savladane kako bi virusni replikacijski ciklus bio uspješan. Barijeru ne predstavlja samo stanična membrana, već i kortikalna mreža elemenata citoskeleta te gusta i neprohodna citoplazma. Izlaskom iz sustava endosoma virusna kapsida oslobađa se u citoplazmu, ali rijetko na mjestu gdje je moguća replikacija. Zbog brojnih organela i citoskeleta u citoplazmi eksperimenti su pokazali da je slobodna difuzija moguća samo za vrlo male čestice, dok su čestice od svega 20 nm promjera gotovo nepomične (Luby-Phelps, 2002; Leopold and Pfister, 2006). S obzirom da promjer kapsida nekih virusa doseže i nekoliko stotina nanometara, očito je da za produktivnu infekciju mora postojati aktivni mehanizam kretanja. To se posebno odnosi na viruse za čiju su replikaciju potrebni jezgri vezani proteini. U skladu s dosadašnjim strategijama vezanim za ulazak u stanicu, kretanje unutar citoplazme omogućeno je adaptacijom na postojeće stanične mehanizme. Uz iznimku porodice *Baculoviridae* koja koristi aktin (Yamauchi and Greber, 2016), virusi se unutar citoplazme kreću pomoću molekularnih motora vezanih za mikrotubule (Leopold and Pfister, 2006).

Mikrotubuli su građeni od polimera tubulina koje nazivamo protofilamentima. Vrlo bitna karakteristika mikrotubula je njihova polarnost koja omogućuje polaran transport prema njihovom plus (+) ili minus (-) kraju. Minus kraj je orijentiran prema centru organizacije mikrotubula (MTOC), koji se nalazi u blizini jezgre, a (+) kraj se nalazi na periferiji. Dok su kinezini proteinski motori odgovorni za transport prema (+) kraju, citoplazmatski dinein 1 pokreće transport prema (-) kraju mikrotubula, stoga je vrlo značajan za viruse čiji se genomi repliciraju u jezgri. U fiziološkim uvjetima u stanici, dinein je odgovoran za transport organela, proteinskih agregata i nepravilno smotanih proteina, a dolaskom u interakciju s virusima može omogućiti njihov brz transport do neposredne blizine jezgre.

Što se tiče mehanizma interakcije virusa s molekularnim motorima vezanima za mikrotubule, postoje dvije hipoteze. Prema jednoj, riječ je o nespecifičnim interakcijama analognim interakcijama u proteinskim agregatima, dok se druga temelji na pretpostavci da se virusni proteini mogu specifično vezati za molekularne motore (Vallee *et al.*, 2004; Leopold and Pfister, 2006). Postoje rezultati eksperimenata koji idu u prilog obje hipoteze, te je moguće da tip interakcije ovisi o virusu. Mehanizam disocijacije virusa s citoplazmatskog dineina 1 na određitu također nije do kraja razjašnjen. Uzrok disocijacije vjerojatno je veći afinitet proteina kapside za jezgrinu ovojnica nego za dinein, pa transportom u blizinu jezgre dolazi do prekida postojećih i stvaranja novih proteinskih interakcija.

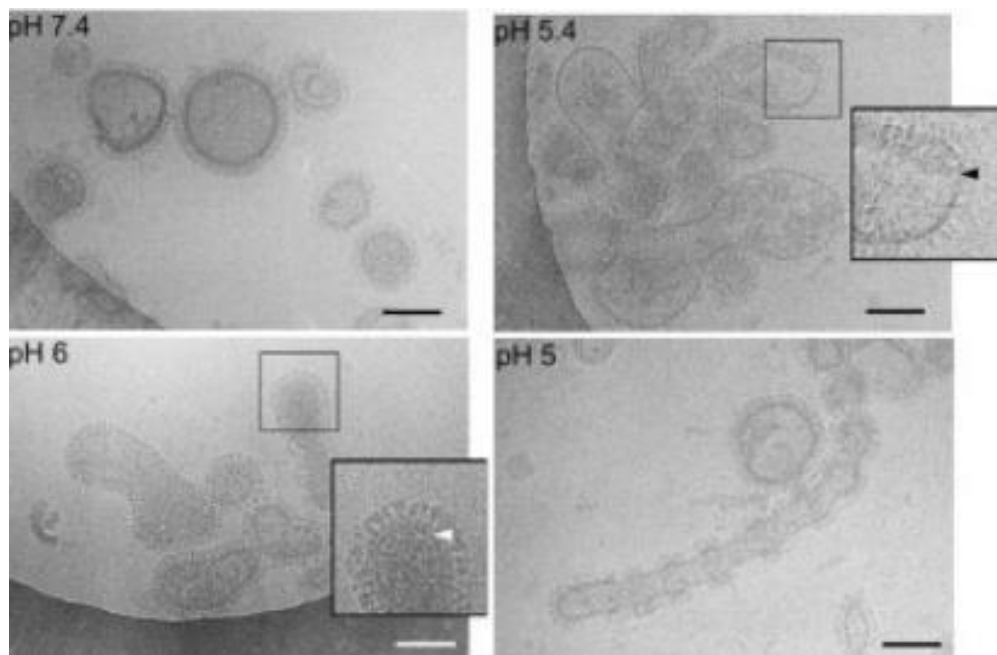
8. SVLAČENJE I ULAZAK VIRUSA U JEZGRU

8.1. SVLAČENJE

Svlačenje (eng. *uncoating*) označava otvaranje kapside virusa ili rastavljanje njezinih elemenata u svrhu oslobađanja genoma. To je ujedno i posljednji korak u procesu ulaska virusa u stanicu. Sam proces odvija se postepeno i uključuje više koraka ili stupnjeva. Rastavljanje kapside kod virusa iz porodica *Adenoviridae* i *Polyomaviridae*, na primjer, počinje već prije prodiranja u citoplazmu (Cerqueira and Schelhaas, 2012; Suomalainen and Greber, 2013). Mehanizmi i strategije svlačenja vrlo su raznoliki i ovise o virusu i stanici, ali zajednička karakteristika im je da se završni korak svlačenja događa na mjestu replikacije (Yamauchi and Greber, 2016). Naime, kapsida virusa ima dvostruku ulogu - zaštitnu i funkcionalnu. Zaštitna uloga odnosi se na zaštitu genoma od nepovoljnih uvjeta izvan domaćina (UV zračenje, dehidracija), u međustaničnom prostoru (komplement, čimbenici imunskog sustava) te u stanici (pH, nukleaze) (Kilcher and Mercer, 2015). Funkcionalna uloga se ostvaruje u brojnim interakcijama sa stanicama domaćina koje posreduju u procesima uključenim u ulazak virusa u stanicu. Posljednji proces posredovan proteinima kapside je kretanje virusa u citoplazmi, iz čega proizlazi da se oslobađanje genoma mora dogoditi na mjestu replikacije.

Pojedini stupnjevi svlačenja inducirani su različitim staničnim signalima, koji mogu biti posredovani receptorima, enzimima i staničnim faktorima, ili kemijskim uvjetima u kojima se virus nalazi u stanici. Interakcije virusa s faktorima adsorpcije i receptorima na površini stanice mogu rezultirati konformacijskim promjenama koje uzrokuju prelazak iz stabilnog u tzv. metastabilno stanje. U stanici, signali mogu biti posredovani receptorima, staničnim faktorima povezanim sa sazrijevanjem endosoma ili promjenom kemijskih uvjeta poput koncentracije iona i vrijednosti pH. Primjeri enzimskih signala su enzimi za kontrolu kvalitete proteina u ER-u, koji su nužni za svlačenje SV40 (Yamauchi and Greber, 2016; Toscano and de Haan, 2018). Svi navedeni signali mogu, ovisno o virusu, dovesti do promjene fizikalnih svojstava kapside. Za FLUAV je utvrđeno da u uvjetima niskog pH dolazi do mekšanja kapside i disocijacije virusnog proteina M1 s kapside (Slika 14). Zanimljivo je da se proces sastoji od dva koraka pri čemu pH vrijednosti pri kojima se oni odvijaju odgovaraju ranom endosomu u prvom, te kasnom endosomu u drugom koraku. Ukoliko bi došlo do naglog pada pH, npr. izravnom fuzijom s kasnim endosomom, do produktivne infekcije najvjerojatnije ne bi moglo doći. Eksperimenti su pokazali da kod naglog pada pH na 5,5 dolazi do stvaranja agregata M1 i nukleoproteina (NP), što upućuje na disocijaciju NP i RNA ili stvaranje agregata RNA-NP-M1. U oba su slučaja daljnji koraci infekcijskog ciklusa su inhibirani (Li *et al.*, 2014).

DNA adenovirusa, savinuta unutar kapside, zbog elektrostatskih odbijanja negativnih naboja i entropijske komponente uzrokuje unutarnji tlak na kapsidu u iznosu 30 atmosfera. Slabljenjem kapside dolazi do pucanja u centru peterozrakaste simetrije, takozvanom tjemenu, i virusna DNA se izbacuje u jezgru, analogno ulasku DNA bakteriofaga u bakterijsku stanicu. Slična strategija uočena je i kod virusa iz porodice *Herpesviridae*.



Slika 14. Krioelektronska mikrografija FLUAV pri različitim pH vrijednostima. Pri pH 7,4 i 6,0 vidljiv je s unutarnje strane kapside sloj M1 (bijela strelica); pri pH 5,4 dolazi do djelomičnog (crna strelica), a pri 5,0 i do potpunog odvajanja M1 od kapside. Preuzeto iz Li *et al.*, 2014.

Prilikom proučavanja svlačenja, postavlja se pitanje kako je moguće da se u istoj stanici virusi prvo svlače, a kasnije sastavljaju, tj. kako je moguće da u inficiranoj stanici sintetizirani virus bude stabilan, a u neinficiranoj nestabilan. U literaturi se to naziva paradoksom sastavljanja i rastavljanja (eng. *Assembly-disassembly paradox*). Jedno od mogućih rješenja tog problema je da prilikom izlaska iz stanice dolazi do prelaska iz stabilnog u metastabilno stanje, tj. da dolazi do promjene kapside koja omogućuje primanje signala za svlačenje u neinficiranoj stanici. Primjer ove strategije su adenovirusi (Mangel and Martín, 2014). Druga mogućnost je da virus ostaje nepromijenjen, ali da uvjeti u inficiranoj i neinficiranoj stanici nisu jednaki, što je uočeno na primjeru FLUAV-a kod kojeg je prilikom sastavljanja aktivna M2 protonska pumpa koja neutralizira kiseli pH u Golgijevom aparatu, i na taj način sprječava cijepanje HA (opisano u poglavlju 6.1) (Grambas and Hay, 1992). Treća mogućnost je da su svlačenje i sastavljanje strogo prostorno odijeljeni. Na primjer, virusi iz porodice *Polyomaviridae* svlače se u ER-u, a sastavljaju u jezgri (Schelhaas *et al.*, 2007).

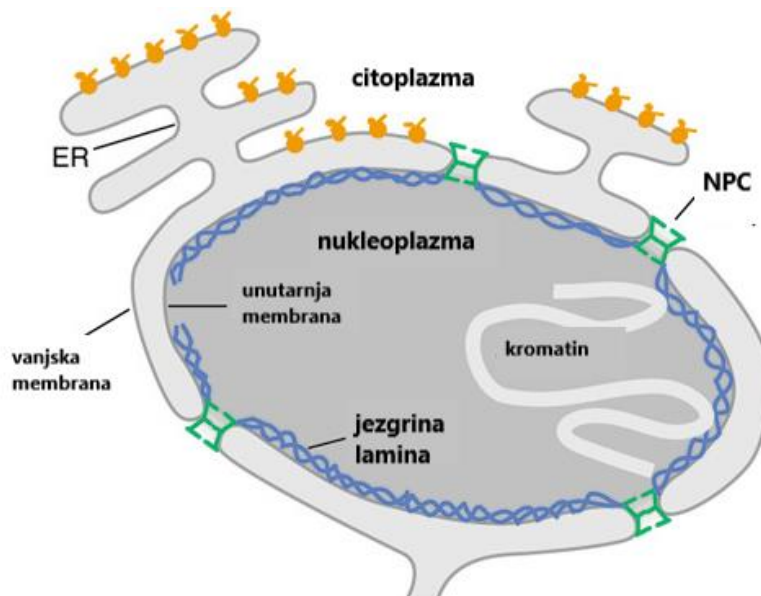
8.2 ULAZAK VIRUSA U JEZGRU

Kod virusa kod kojih se replikacija genoma odvija u jezgri stanice, procesi svlačenja i ulaska u jezgru usko su povezani i međusobno ovisni. Zbog toga se ta dva procesa najbolje proučavaju zajedno.

Mnogi virusi tijekom replikacijskog ciklusa uopće ne ulaze u jezgru. Većinom su to RNA virusi koji nose sa sobom vlastite RNA-polimeraze ovisne o RNA i čija se replikacija odvija u citoplazmi, primjerice HCV, EBOV, DENV i virus poliomijelitisa. Porodice RNA virusa *Retroviridae* i *Orthomyxoviridae*, čiji su najpoznatiji predstavnici HIV i virusi gripe,

ne ulaze u tu kategoriju te se njihova replikacija odvija u jezgri. Genomi tiju porodica DNA virusa također ne ulaze u jezgru. To su: *Poxviridae*, *Asfviridae* i *Mimiviridae*, veliki i kompleksni virusi koji sa sobom nose sve potrebne replikacijske i transkripcijske enzime. Genomi ostalih DNA virusa, uz spomenute dvije porodice RNA virusa, moraju ući u jezgru (Kobiler *et al.*, 2012). Rezultati recentnih istraživanja upućuju na zaključak da ulazak u jezgru virusima predstavlja vjerojatno najveću prepreku u replikacijskom ciklusu. Zbog toga je taj proces potencijalno pogodna meta za razvoj antivirusnih lijekova (Cohen, Au and Panté, 2011; Kobiler *et al.*, 2012).

Jezgra je organel obavijen dvostrukom ovojnicom, koja se sastoji od vanjske membrane, perinuklearne membrane i unutarnje membrane. Vanjska membrana je nastavak membrane ER-a, a unutarnja membrana je povezana s jezgrinom laminom na površini nukleoplazme (Slika 15). Komunikacija jezgre i citoplazme odvija se preko kompleksa jezgrinih pora (NPC), cilindričnih struktura sastavljenih od međusobno povezanih proteinskih prstenova.



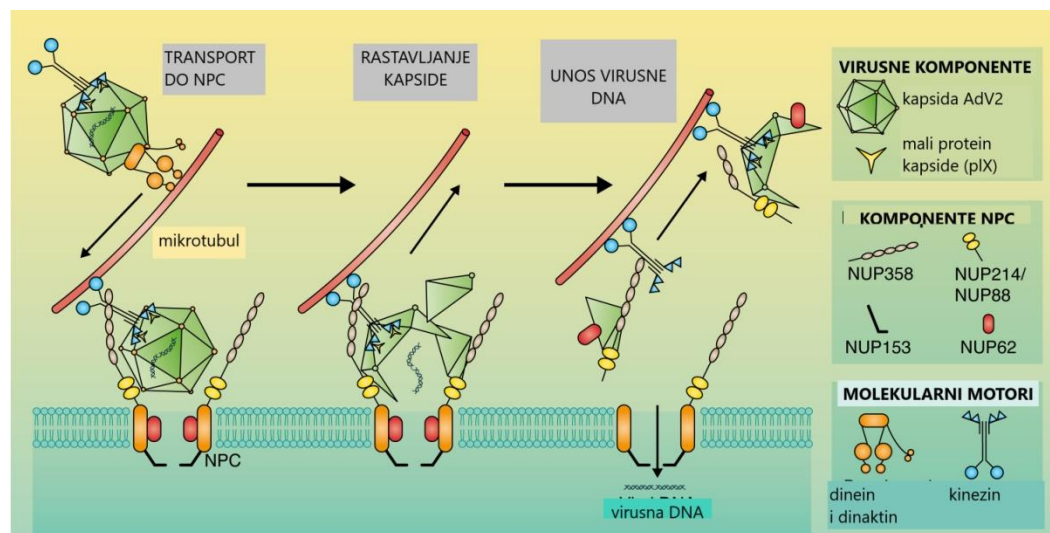
Slika 15. Ilustracija jezgre, preuzeto iz Schirmer and Gerace, 2002.

Strategije ulaska virusa u jezgru stanice su raznolike (Slika 17). Neki virusi ulaze u jezgru tijekom mitoze, kada je jezgrina ovojnica fragmentirana (Slika 17-1). Prednost ove strategije je u tome što nema potrebe za posebnim interakcijama i prilagodbama za transport kroz NPC. Glavni, značajni nedostatak je mogućnost inficiranja samo onih stanica koje se dijele. Retrovirus *Murine leukemia virus* (MLV) i HPV-16 su virusi za koje je utvrđeno da koriste ovu strategiju (Goff, 2007; Pyeon *et al.*, 2009).

Za razliku od MLV-a, lentivirusi, u koje se ubraja HIV-1, mogu završiti replikacijski ciklus i u stanicama koje se ne dijele. Ulazak HIV-a u jezgru predmet je brojnih istraživanja. Eksperimenti s HIV-MLV hibridom otkrili su da važnu ulogu u ulasku u jezgru kroz NPC ima kapsida HIV-a. Nadalje, uočena je uloga integraze HIV-a koja sadrži signalne sekvence za lokalizaciju u jezgri (NLS). U nedostatku te sekvence, unos DNA nastale reverznom

transkripcijom nije moguć. Još jedno važno svojstvo je *DNA Flap*, preklapanje od oko 99 nukleotida u pozitivnom lancu DNA tijekom reverzne transkripcije koje se povezuje sa sazrijevanjem kapside HIV-a, a koja je inicijalno prevelika za ulazak u jezgru (Arhel *et al.*, 2007). Ulazak HIV-a u jezgru ovisi i o staničnim faktorima nukleoporinu NUP153, ciklofilinu A, SUN2 i drugim. Posebno je zanimljiva regulacija vezana za SUN2, gdje je dokazano da i utišavanje i prekomjerna ekspresija tog proteina inhibiraju proces ulaska u jezgru. Zaključno, prilagodba HIV-a za ulazak u jezgru je vrlo složena, stoga ne čudi da je virus izrazito osjetljiv na mutacije. Unatoč brojnim istraživanjima, moguće je da će za potpuno objašnjenje navedenog mehanizma biti potrebna kompletna promjena paradigme (Kobiler *et al.*, 2012; Bhargava, Lahaye and Manel, 2018). Osim HIV-a, sličnu strategiju koristi i FLUAV (Slika 17-2). Od 4 proteina koji uz RNA čine ribonukleoproteine, najvažniji je protein NP i njegova NLS (O'Neill *et al.*, 1995). Unos u jezgru posredovan je staničnim importinom α . Različite varijante importina vjerojatno određuju specifičnost virusa za domaćine, što je vrlo važan podatak za medicinska istraživanja (Gabriel *et al.*, 2011).

Veliki virusi, poput virusa iz porodice *Herpesviridae*, ne mogu proći kroz NPC, stoga HHV-1 ulazi u stanicu fuzijom sa staničnom membranom. Dineinskim motorom kapsida se po površini mikrotubula prenosi do jezgre. Nakon toga dolazi do vezanja (usidrenja, eng. *docking*) za NPC (Slika 17-3) interakcijom virusnih proteina VP1/2 i UL25 sa NUP358 ili NUP214 (Rode *et al.*, 2011). Uslijed vezanja dolazi do destabilizacije kapside u tjemenu i jedan fragment kapside se odvaja oslobađajući DNA u jezgru (Yamauchi and Greber, 2016). Sličnu strategiju nalazimo kod adenovirusa. Po dolasku do jezgre, virusna kapsida se veže za NPC. Istovremena interakcija kapside s Nup 14 i kinezinom, koji stvara silu krećući se prema (+) kraju mikrotubula, dovodi do rastavljanja kapside (Slika 16). Ulazak genoma u jezgru posredovan je histonom H1 (Ibid, 2016).



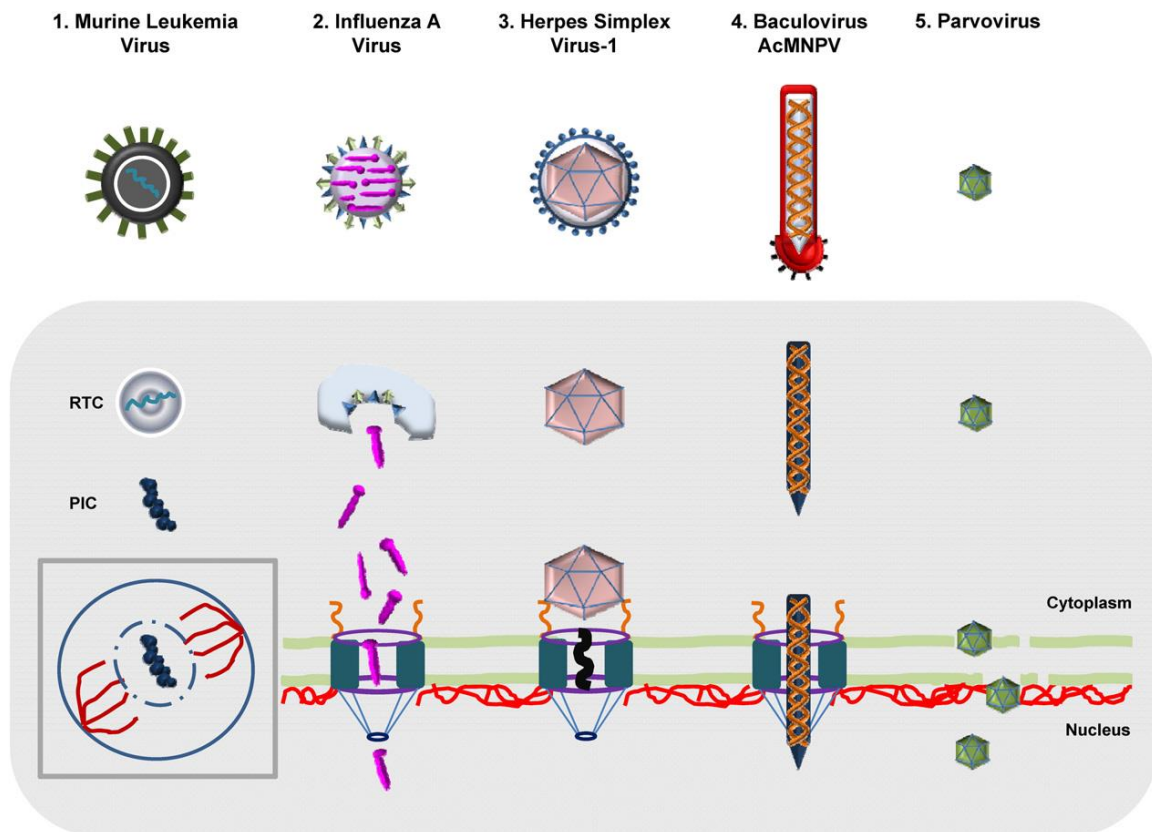
Slika 16. Ulazak adenovirusa u stanicu, prilagođeno prema Yamauchi and Helenius, 2013.

HBV i virusi iz porodice *Baculoviridae* dovoljno su mali (promjer 40-ak nm) da mogu proći kroz jezgrinu poru (Slika 17-4). Proces ulaska virusa hepatitisa B (HBV) u jezgru uključuje fosforilaciju virusnih proteina jezgre i importine α i β (Kann *et al.*, 1999). Posebnost HBV-a je njegova replikacija tijekom koje nastaje RNA koja se nakon pakiranja u virione

reverzno transkribira u DNA. Ovakav tip replikacije vjerojatno je utjecao na specifičnu adaptaciju na ulazak u jezgru. Pokazano je, naime, da nezrela kapsida koja sadrži RNA nakon ulaska u unutrašnjost pore ostaje zarobljena, dok se zrela kapsida unutar pore rastavlja oslobađajući DNA u jezgru (Rabe *et al.*, 2009; Kobiler *et al.*, 2012).

Virusi iz porodice *Parvoviridae*, jedni su od najmanjih DNA virusa. Smatra se da u jezgru mogu ući kroz NPC, ali i privremenim narušavanjem integriteta vanjske membrane jezgrine ovojnice (Slika 17-5). Proces svlačenja odvija se unutar jezgre.

Za SV40 i neke viruse iz porodice *Polyomaviridae* karakteristično je da se proces svlačenja odvija u ER-u. Postoje 2 mogućnosti za ulazak SV40 u jezgru. Prva je izlazak iz ER-a u citoplazmu i naknadni ulazak u jezgru (Nakanishi *et al.*, 2007). Druga mogućnost je ulazak izravno u jezgru budući da ER i vanjska membrana jezgre čine kontinuiranu membranu (Daniels *et al.*, 2006).



Slika 17. Neke od strategija ulaska virusa u jezgru s primjerima virusa. Ulazak za vrijeme mitoze (1), svlačenje u citoplazmi i ulazak genoma vezanog za proteine sa signalnim sekvencama za unos u jezgru (2), svlačenje nakon vezanja za importine s citoplazmatske strane NPC (3), prolazak kapside kroz NPC (4), prolazak kapside kroz privremeni prolaz u NE (5). Preuzeto iz Cohen, Au and Panté, 2011.

ZAKLJUČAK

Jednostavnost u građi i strukturi virusa može se okarakterizirati kao varljiva ili obmanjujuća, kao što je navedeno u Helenius, 2018. Navedena jednostavnost ne korelira s iznimnom i jedinstvenom kompleksnošću, koju uočavamo ako proučavamo virusni replikacijski ciklus. Budući da ne posjeduju metabolizam, za viruse su u svakom koraku replikacijskog ciklusa nužne određene adaptacije na postojeće stanične mehanizme. Ti mehanizmi mogu u normalnim uvjetima u stanici biti uključeni u metaboličke puteve, transport tvari, replikaciju genoma ili, što je najintragantnije, borbu protiv patogena, uključujući viruse. Izraz otmica (eng. *hijacking*) staničnih mehanizama zbog toga se vrlo često navodi u znanstvenoj literaturi.

Prva faza replikacijskog ciklusa, ulazak virusa u stanicu, ključna je za uspostavljanje produktivne infekcije. Na temelju brojnih otkrića u biokemiji, staničnoj biologiji i virologiji, jasno je da se ulazak virusa u stanicu sastoji od brojnih koraka i prepreka koje moraju biti savladane da bi se virusni genom dopremio do mjesta replikacije. U ovom preglednom radu navedeni su i opisani sljedeći koraci: adsorpcija i vezanje za receptor, lateralno kretanje virusa uz površinu stanične membrane, ulazak virusa u citoplazmu, transport unutar citoplazme, prodiranje virusa kroz membranu, svlačenje, transport genoma i kapside u citoplazmi, te ulazak virusa/virusnog genoma u jezgru. Proučavanje pojedinačnih koraka, počevši od adsorpcije na površinu stanice, koja je ključna zbog izbjegavanja imunskog odgovora domaćina i mogućih destabilizirajućih uvjeta izvanstaničnog matriksa, ukazuju na veliku raznolikost strategija različitih virusa. Osim toga, očito je da su mnogi koraci međusobno povezani i nisu strogo prostorno i vremenski odijeljeni. Primjerice, proces svlačenja kod nekih virusa, poput virusa iz porodice *Adenoviridae*, počinje i prije ulaska u citoplazmu (Cerqueira and Schelhaas, 2012). Transport genoma povezan je s replikacijom, dok o međuovisnosti ulaska virusa u stanicu te sklapanja novih čestica i egzocitoze govori tzv. paradoks sastavljanja i rastavljanja (Yamauchi and Greber, 2016).

Ulazak virusa u stanicu predstavlja područje interesa mnogih znanosti: biokemija proučava strukturu proteina (npr. proteina VI kod HAdV-a), virologija na temelju određenih strategija propituje srodstvene odnose i pobliže karakterizira viruse, evolucijska biologija proučava koevoluciju virusa i domaćina i rezultat snažnog selektivnog pritiska kroz dugo vremensko razdoblje, koji je formirao precizno regulirane procese (kriptičke domene proteina na površini virusne ovojnice, promjena receptora kod LASV-a i sl.), dok epidemiologija i medicina saznanja o načinu ulaska virusa u stanicu može koristiti za prevenciju širenja bolesti i razvoj novih antivirusnih lijekova.

Unatoč preko 40 godina intenzivnog proučavanja strategija ulaska virusa u stanicu, mnogi procesi (primjeri su navedeni u nekoliko poglavlja) još uvijek nisu razjašnjeni, a za mnoga saznanja zbog veličine virusa bile su potrebne tek nedavno dostupne tehnologije pa je ovo područje i danas vrlo zanimljivo za istraživanja.

SAŽETAK

Virusi su obligatni unutarstanični paraziti građeni od nukleinske kiseline (DNA ili RNA) i proteinske kapside, dok je lipidna ovojnica, koju neki virusi posjeduju, porijeklom od domaćinske stanice. Virusi ne posjeduju metabolizam, stoga svi koraci virusnog replikacijskog ciklusa ovise o stanici domaćina koju virus inficira. Virusi su dobro adaptirani na stanicu domaćina i koriste brojne stanične mehanizme koji u stanici imaju ulogu u metaboličkim putevima, transportu tvari, replikaciji genoma ili borbi protiv patogena. Ovaj rad pobliže opisuje strategije ulaska virusa životinja u stanicu. To je prva i često ključna faza kod uspostavljanja produktivne infekcije. Sam proces se može podijeliti na nekoliko koraka: od inicijalnog vezanja za površinu stanice, ulaska u citoplazmu i transporta unutar citoplazme, do početka replikacije, bilo u citoplazmi ili jezgri domaćinske stanice. Uočeno je da su svi koraci uključeni u ulazak virusa u stanicu precizno regulirani, i da postoji izuzetna raznolikost različitih strategija i adaptacija vezanih za taj proces, što je predstavljeno kroz ovaj pregledni rad.

SUMMARY

Viruses are obligatory intracellular parasites, constituted of a nucleic acid (DNA or RNA) and a protein capsid, while a lipid envelope, which some viruses possess, originated from an infected cell. Viruses do not possess metabolism, hence all steps in their replication cycle depend on host cells which are infected by virus. Viruses are well adapted to host cells and make use of numerous cellular mechanisms, which in cell have roles in metabolic pathways, transport of substances, genome replication or fight against pathogens. This paper describes in detail cell entry strategies of animal viruses. That is the first and often crucial phase in establishing a productive infection. The process itself can be divided into several steps: from initial binding to the cell surface, entry into cytoplasm and transport within the cytoplasm, to the beginning of the replication of the viral genome, either in cell nucleus or cytosol. It is observed that all steps included in cell entry are precisely regulated, and that there is a remarkable diversity of different strategies and adaptations regarding that process, which is presented through this review.

LITERATURA

- Akhtar, J. and Shukla, D. (2009) 'Viral entry mechanisms: cellular and viral mediators of herpes simplex virus entry.', *The FEBS journal*. doi: 10.1111/j.1742-4658.2009.07402.x.
- Anderluh, M. *et al.* (2012) 'DC-SIGN antagonists, a potential new class of anti-infectives', *Curr Med Chem*. doi: CMC-EPUB-20120117-012 [pii].
- Arhel, N. J. *et al.* (2007) 'HIV-1 DNA Flap formation promotes uncoating of the pre-integration complex at the nuclear pore', *EMBO Journal*. doi: 10.1038/sj.emboj.7601740.
- Berka, U. *et al.* (2009) 'Human Rhinovirus Type 2 Uncoating at the Plasma Membrane Is Not Affected by a pH Gradient but Is Affected by the Membrane Potential', *Journal of Virology*. doi: 10.1128/JVI.01739-08.
- Bhargava, A., Lahaye, X. and Manel, N. (2018) 'Let me in: Control of HIV nuclear entry at the nuclear envelope', *Cytokine and Growth Factor Reviews*. Elsevier Ltd, 40, pp. 59–67. doi: 10.1016/j.cytogfr.2018.02.006.
- Bilkova, E., Forstova, J. and Abrahamyan, L. (2014) 'Coat as a dagger: The use of capsid proteins to perforate membranes during non-enveloped DNA viruses trafficking', *Viruses*, 6(7), pp. 2899–2937. doi: 10.3390/v6072899.
- Boulant, S., Stanifer, M. and Lozach, P. Y. (2015) 'Dynamics of virus-receptor interactions in virus binding, signaling, and endocytosis', *Viruses*, 7(6), pp. 2794–2815. doi: 10.3390/v7062747.
- Broniarczyk, J. *et al.* (2015) 'Human Papillomavirus Infectious Entry and Trafficking Is a Rapid Process', *Journal of Virology*. doi: 10.1128/JVI.00722-15.
- Brooks, G. F. *et al.* (2013) *Jawetz, Melnick & Adelberg's Medical Microbiology, 26th Edition, Journal of Chemical Information and Modeling*. doi: 10.1017/CBO9781107415324.004.
- Burckhardt, C. J. and Greber, U. F. (2009) 'Virus movements on the plasma membrane support infection and transmission between cells', *PLoS Pathogens*, 5(11). doi: 10.1371/journal.ppat.1000621.
- Cann, A. J. (2012) *Principles of molecular virology 5th Edition, Trends in Biochemical Sciences*. doi: 10.1016/0968-0004(94)90095-7.
- Cerqueira, C. and Schelhaas, M. (2012) 'Principles of polyoma- and papillomavirus uncoating', *Medical Microbiology and Immunology*. doi: 10.1007/s00430-012-0262-1.
- Cohen, S., Au, S. and Panté, N. (2011) 'How viruses access the nucleus', *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*. Elsevier B.V., 1813(9), pp. 1634–1645. doi: 10.1016/j.bbamcr.2010.12.009.
- Damm, E. M. *et al.* (2005) 'Clathrin- and caveolin-1-independent endocytosis: Entry of simian virus 40 into cells devoid of caveolae', *Journal of Cell Biology*. doi: 10.1083/jcb.200407113.
- Daniels, R. *et al.* (2006) 'SV40 VP2 and VP3 Insertion into ER Membranes Is Controlled by the Capsid Protein VP1: Implications for DNA Translocation out of the ER', *Molecular Cell*. doi: 10.1016/j.molcel.2006.11.001.
- Fuchs, R. and Blaas, D. (2010) 'Uncoating of human rhinoviruses', *Reviews in Medical Virology*. doi: 10.1002/rmv.654.
- Gabriel, G. *et al.* (2011) 'Differential use of importin- α isoforms governs cell tropism and host adaptation of influenza virus', *Nature Communications*. doi: 10.1038/ncomms1158.

- Gastaldelli, M. *et al.* (2008) 'Infectious adenovirus type 2 transport through early but not late endosomes.', *Traffic (Copenhagen, Denmark)*. doi: 10.1111/j.1600-0854.2008.00835.x.
- Goff, S. P. (2007) 'Host factors exploited by retroviruses', *Nature Reviews Microbiology*. doi: 10.1038/nrmicro1541.
- Grambas, S. and Hay, A. J. (1992) 'Maturation of influenza A virus hemagglutinin—Estimates of the pH encountered during transport and its regulation by the M2 protein', *Virology*. doi: 10.1016/0042-6822(92)91187-Y.
- Hayer, A. *et al.* (2010) 'Caveolin-1 is ubiquitinated and targeted to intraluminal vesicles in endolysosomes for degradation', *Journal of Cell Biology*. doi: 10.1083/jcb.201003086.
- Helenius, A. (2018) 'Virus Entry: Looking Back and Moving Forward', *Journal of Molecular Biology*. Elsevier Ltd, 430(13), pp. 1853–1862. doi: 10.1016/j.jmb.2018.03.034.
- Herold, B. C. *et al.* (1991) 'Glycoprotein C of herpes simplex virus type 1 plays a principal role in the adsorption of virus to cells and in infectivity.', *Journal of virology*.
- Hyun, J. Y., Reuter, M. A. and McDonald, D. (2008) 'HIV traffics through a specialized, surface-accessible intracellular compartment during trans-infection of T cells by mature dendritic cells', *PLoS Pathogens*. doi: 10.1371/journal.ppat.1000134.
- Jae, L. T. and Brummelkamp, T. R. (2015) 'Emerging intracellular receptors for hemorrhagic fever viruses', *Trends in Microbiology*. Elsevier Ltd, 23(7), pp. 392–400. doi: 10.1016/j.tim.2015.04.006.
- Jefferies, K. C., Cipriano, D. J. and Forgac, M. (2008) 'Function, structure and regulation of the vacuolar (H⁺)-ATPases', *Arch Biochem Biophys.*, 476(1), pp. 33–42. doi: 10.1016/j.abb.2008.03.025.Function.
- Jiang, M. *et al.* (2009) 'Early Events during BK Virus Entry and Disassembly', *Journal of virology*. doi: 10.1128/JVI.02169-08.
- Jolly, C. L. and Sattentau, Q. J. (2006) 'Attachment factors', *Advances in Experimental Medicine and Biology*, vol 790(Pöhlmann S., Simmons G. (eds) *Viral Entry into Host Cells.*). doi: 10.1007/978-1-4614-7651-1_1.
- Kalia, M. and Jameel, S. (2011) 'Virus entry paradigms', *Amino Acids*, 41(5), pp. 1147–1157. doi: 10.1007/s00726-009-0363-3.
- Kann, M. *et al.* (1999) 'Phosphorylation-dependent binding of hepatitis B virus core particles to the nuclear pore complex.', *The Journal of cell biology*. doi: 10.1083/JCB.145.1.45.
- Kilcher, S. and Mercer, J. (2015) 'DNA virus uncoating', *Virology*. Elsevier, 479–480, pp. 578–590. doi: 10.1016/j.virol.2015.01.024.
- Kirchhausen, T. (2000) 'Three ways to make a vesicle', *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. doi: 10.1038/35043117.
- Kobiler, O. *et al.* (2012) 'Virus strategies for passing the nuclear envelope barrier', *Nucleus (United States)*, 3(6), pp. 526–539. doi: 10.4161/nucl.21979.
- Kwong, P. D. *et al.* (1998) 'Structure of an HIV gp 120 envelope glycoprotein in complex with the CD4 receptor and a neutralizing human antibody', *Nature*. doi: 10.1038/31405.
- Di Lella, S., Herrmann, A. and Mair, C. M. (2016) 'Modulation of the pH Stability of Influenza Virus Hemagglutinin: A Host Cell Adaptation Strategy', *Biophysical Journal*. Biophysical Society, 110(11), pp. 2293–2301. doi: 10.1016/j.bpj.2016.04.035.

- Leopold, P. L. and Pfister, K. K. (2006) 'Viral strategies for intracellular trafficking: Motors and microtubules', *Traffic*, 7(5), pp. 516–523. doi: 10.1111/j.1600-0854.2006.00408.x.
- Li, G. and Marlin, M. C. (2015) 'Rab family of GTPases', *Methods in Molecular Biology*. doi: 10.1007/978-1-4939-2569-8_1.
- Li, S. *et al.* (2014) 'PH-ontrolled two-step uncoating of influenza virus', *Biophysical Journal*. doi: 10.1016/j.bpj.2014.02.018.
- Loustalot, F., Kremer, E. J. and Salinas, S. (2015) 'The Intracellular Domain of the Coxsackievirus and Adenovirus Receptor Differentially Influences Adenovirus Entry', *Journal of Virology*, 89(18), pp. 9417–9426. doi: 10.1128/JVI.01488-15.
- Luby-Phelps, K. (2002) *Cytoarchitecture and physical propertoes of Cytoplasm: Volume, viscosity, diffudion, intracellular surface area*, *Int. Rev. Cytol.* doi: 10.1016/S0074-7696(08)60527-6.
- Magnuson, B. *et al.* (2005) 'ERp29 triggers a conformational change in polyomavirus to stimulate membrane binding', *Molecular Cell*. doi: 10.1016/j.molcel.2005.08.034.
- Mangel, W. F. and Martín, C. S. (2014) 'Structure, function and dynamics in adenovirus maturation', *Viruses*. doi: 10.3390/v6114536.
- Manzoor, R., Igarashi, M. and Takada, A. (2017) 'Influenza A virus M2 protein: Roles from ingress to egress', *International Journal of Molecular Sciences*, 18(12), pp. 1–16. doi: 10.3390/ijms18122649.
- Marsh, M. and Helenius, A. (2006) 'Virus entry: Open sesame', *Cell*, 124(4), pp. 729–740. doi: 10.1016/j.cell.2006.02.007.
- Maxfield, F. R. and Tabas, I. (2005) 'Role of cholesterol and lipid organization in disease', *Nature*. doi: 10.1038/nature04399.
- Mercer, J., Schelhaas, M. and Helenius, A. (2010) 'Virus entry by endocytosis', *Advances in Virology*. doi: 10.1155/2013/469538.
- Miao, Z. *et al.* (2017) 'Regulated entry of hepatitis C virus into hepatocytes', *Viruses*, 9(5), pp. 1–19. doi: 10.3390/v9050100.
- Miyauchi, K. *et al.* (2009) 'HIV Enters Cells via Endocytosis and Dynamin-Dependent Fusion with Endosomes', *Cell*. doi: 10.1016/j.cell.2009.02.046.
- Nakanishi, A. *et al.* (2007) 'Minor Capsid Proteins of Simian Virus 40 Are Dispensable for Nucleocapsid Assembly and Cell Entry but Are Required for Nuclear Entry of the Viral Genome', *Journal of Virology*. doi: 10.1128/JVI.02664-06.
- O'Donnell, V., LaRocco, M. and Baxt, B. (2008) 'Heparan Sulfate-Binding Foot-and-Mouth Disease Virus Enters Cells via Caveola-Mediated Endocytosis', *Journal of Virology*. doi: 10.1128/JVI.00732-08.
- O'Neill, R. E. *et al.* (1995) 'Nuclear import of influenza virus RNA can be mediated by viral nucleoprotein and transport factors required for protein import', *Journal of Biological Chemistry*. doi: 10.1074/jbc.270.39.22701.
- Pelkmans, L. *et al.* (2005) 'Genome-wide analysis of human kinases in clathrin- and caveolae/raft-mediated endocytosis', *Nature*. doi: 10.1038/nature03571.
- Pöhlmann, S. (2013) *Viral Entry into Host Cells*. doi: 10.1007/978-1-4614-7651-1.
- Pyeon, D. *et al.* (2009) 'Establishment of human papillomavirus infection requires cell cycle progression', *PLoS Pathogens*. doi: 10.1371/journal.ppat.1000318.

- Rabe, B. *et al.* (2009) 'Nuclear entry of hepatitis B virus capsids involves disintegration to protein dimers followed by nuclear reassociation to capsids', *PLoS Pathogens*. doi: 10.1371/journal.ppat.1000563.
- Reddy, V. S. and Nemerow, G. R. (2014) 'Structures and organization of adenovirus cement proteins provide insights into the role of capsid maturation in virus entry and infection', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(32), pp. 11715–11720. doi: 10.1073/pnas.1408462111.
- Rode, K. *et al.* (2011) 'Uncoupling uncoating of herpes simplex virus genomes from their nuclear import and gene expression.', *Journal of virology*. doi: 10.1128/JVI.02067-10.
- Sakai, T. *et al.* (2017) 'Influenza A virus hemagglutinin and neuraminidase act as novel motile machinery', *Scientific Reports*. doi: 10.1038/srep45043.
- Sandvig, K., Kavaliauskiene, S. and Skotland, T. (2018) 'Clathrin-independent endocytosis: an increasing degree of complexity', *Histochemistry and Cell Biology*. doi: 10.1007/s00418-018-1678-5.
- Schelhaas, M. *et al.* (2007) 'Simian Virus 40 Depends on ER Protein Folding and Quality Control Factors for Entry into Host Cells', *Cell*. doi: 10.1016/j.cell.2007.09.038.
- Schelhaas, M. (2010) 'Come in and take your coat off - how host cells provide endocytosis for virus entry', *Cellular Microbiology*, 12(10), pp. 1378–1388. doi: 10.1111/j.1462-5822.2010.01510.x.
- Schirmer, E. C. and Gerace, L. (2002) 'Organellar proteomics: the prizes and pitfalls of opening the nuclear envelope.', *Genome biology*.
- Sobhy, H. (2016) 'A Review of Functional Motifs Utilized by Viruses', *Proteomes*, 4(1), p. 3. doi: 10.3390/proteomes4010003.
- Summerfield, A. *et al.* (2009) 'Innate immune responses against foot-and-mouth disease virus: Current understanding and future directions', *Veterinary Immunology and Immunopathology*. doi: 10.1016/j.vetimm.2008.10.296.
- Suomalainen, M. and Greber, U. F. (2013) 'Uncoating of non-enveloped viruses', *Current Opinion in Virology*. doi: 10.1016/j.coviro.2012.12.004.
- Torriani, G., Galan-Navarro, C. and Kunz, S. (2017) 'Lassa Virus Cell Entry Reveals New Aspects of Virus-Host Cell Interaction', *Journal of Virology*. doi: 10.1128/JVI.01902-16.
- Toscano, M. G. and de Haan, P. (2018) 'How Simian Virus 40 Hijacks the intracellular protein trafficking pathway to Its Own Benefit ... and Ours', *Frontiers in Immunology*, 9(MAY), pp. 1–9. doi: 10.3389/fimmu.2018.01160.
- Vallee, R. B. *et al.* (2004) 'Dynein: An Ancient Motor Protein Involved in Multiple Modes of Transport', *Journal of Neurobiology*. doi: 10.1002/neu.10314.
- Vázquez-Calvo, Á. *et al.* (2012) 'Acid-dependent viral entry', *Virus Research*. Elsevier B.V., 167(2), pp. 125–137. doi: 10.1016/j.virusres.2012.05.024.
- Wiethoff, C. M. and Nemerow, G. R. (2015) 'Adenovirus membrane penetration: Tickling the tail of a sleeping dragon', *Virology*. doi: 10.1016/j.virol.2015.03.006.
- Wilen, C. B., Tilton, J. C. and Doms, R. W. (2012) 'HIV: Cell binding and entry', *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. doi: 10.1101/cshperspect.a006866.
- Yamauchi, Y. and Greber, U. F. (2016) 'Principles of Virus Uncoating: Cues and the Snooker Ball', *Traffic*, 17(6), pp. 569–592. doi: 10.1111/tra.12387.
- Yamauchi, Y. and Helenius, A. (2013) 'Virus entry at a glance', *Journal of Cell Science*, 126(6), pp.

1289–1295. doi: 10.1242/jcs.119685.

Yang, S. T. *et al.* (2017) ‘HIV virions sense plasma membrane heterogeneity for cell entry’, *Science Advances*, 3(6), pp. 1–13. doi: 10.1126/sciadv.1700338.

Zhang, Y. and Bergelson, J. M. (2005) ‘Adenovirus Receptors’, *Journal of Virology*. doi: 10.1128/JVI.79.19.12125-12131.2005.