

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

Studijní program:
Molekulární biologie a biochemie organismů

Studijní obor:
Speciální chemicko-biologické obory



Eva Bílková

Doprava genomů neobalených DNA virů do buněčného jádra
Delivery of genomes of nonenveloped DNA viruses into the cell nucleus

Bakalářská práce

Školitel: Doc. RNDr. Jitka Forstová, CSc.

Praha, 2012

Prohlášení:

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

V Praze, 5.5.2012

.....

Děkuji Doc. RNDr. Jitce Forstové, CSc. za cenné připomínky a rady při vypracování bakalářské práce. Dále bych chtěla poděkovat Miroslavu Křížkovi za pomoc s grafickou úpravou.

Obsah

Seznam použitých zkratek	v
Abstrakt	vi
1 Úvod	1
2 Jaderný transport	2
2.1 Jaderný obal	2
2.2 Zprostředkovaný transport do jádra	2
3 Cesta genomů neobalených DNA virů do jádra	3
3.1 Adenoviry	3
3.1.1 Charakterizace čeledi	3
3.1.2 Vstup do buňky	3
3.1.3 Únik z endozomu a rozvolnění kapsidy	3
3.1.4 Putování cytosolem	5
3.1.5 Vstup do jádra	5
3.2 Parvoviry	7
3.2.1 Charakterizace čeledi	7
3.2.2 Vstup do buňky	7
3.2.3 Únik z endozomu a rozvolnění kapsidy	8
3.2.4 Putování cytosolem	9
3.2.5 Vstup do jádra	9
3.3 Papillomaviry	12
3.3.1 Charakterizace čeledi	12
3.3.2 Vstup do buňky	12
3.3.3 Únik z endozomu a rozvolnění kapsidy	14
3.3.4 Vstup do jádra	15
3.4 Polyomaviry	16
3.4.1 Charakterizace čeledi	16
3.4.2 Vstup do buňky	16
3.4.3 Pohyb uvnitř buňky	17
3.4.4 Únik z endoplazmatického retikula	18
3.4.5 Vstup do jádra	21
4 Závěr	23

Seznam použitých zkratek

AAV	adeno-associated virus	adeno-asociovaný virus
Ad2, Ad5	adenovirus type 2, resp. type 5	adenovirus typu 2, resp. typu 5
BPV1	bovine papillomavirus type 1	hovězí papillomavirus typu 1
BAP	BiP-associated protein	protein asociovaný s BiP
BiP	binding immunoglobulin protein	protein vážící imunoglobuliny
CyPB	cyclophilin B	cyclophilin B
CAR	Coxsackievirus and adenovirus receptor	coxsackie-adenovirový receptor
CPV	canine parvovirus	psí parvovirus
CRM1	chromosome region maintenance protein 1	protein údržby chromosomálního regionu 1
FPV	feline parovirus	kočičí parvovirus
DNA	deoxyribonucleic acid	deoxyribonukleová kyselina
ER	endoplasmic reticulum	endoplazmatické retikulum
ERp	endoplasmic reticulum protein	protein endoplazmatického retikula
ERAD	endoplasmic reticulum associated degradation	degradace spojená s endoplazmatickým retikulem
HPV	human papillomavirus	lidský papillomavirus
Hsc70, Hsc40	heat shock protein 70, resp. 40	protein teplotního šoku 70, resp. 40
HSPG	heparan sulfate proteoglycan	proteoglykan heparan sulfátu
<i>I_{CRAC}</i>	calcium-release activated calcium current channel	napěťový vápníkový kanál řízený vyjitím vápníku
MAP	mitogen activated protein	mitogenem aktivovaný protein
MCPyV	Merkel cell polyomavirus	polyomavirus karcinomu Merkelových buněk
MVM	minute virus of mice	myší minute virus
MPyV	murine polyomavirus	myší polyomavirus
mRNA	messenger RNA	mediátorová DNA
ND10	nuclear domain 10	jaderná doména 10
nedd4	neural precursor cell expressed developmentally down-regulated protein 4	vývojově regulovaný protein exprimovaný prekuzory nervových buněk 4
NLS	nuclear localisation signal	jaderný lokalizační signál
PDI	protein disulfide-isomerase	protein disulfid izomeráza
PKA	protein kinase A	protein kináza A
PLA2	phospholipase A2	fosfolipáza A2
PML	promyelocytic leukemia protein	protein promyelocytické leukemie
ROS	reactive oxygen species	reaktivní kyslíkové radikály
SNX17	sorting nexin 17	třídící nexin 17
SV40	Simian virus 40	opičí polyomavirus 40
VLPs	viral-like particles	virům podobné částice

Abstrakt

Většina DNA virů musí pro úspěšnou infekci nejprve dopravit svůj genom do buněčného jádra, které jim poskytuje faktory nutné pro jejich replikaci a transkripci. Tato práce je zaměřena na tento proces u malých neobalených DNA virů. Popisuje dopravu genomů adenovirů, parvovirů, papillomavirů a polyomavirů do buněčného jádra. Tyto viry jsou endocytovány buňkou a putují do určitého membránou obaleného kompartmentu. Virová částice prochází změnami vlivem okolního prostředí a aktivity buněčných enzymů, které vyústí v její únik z obaleného váčku za použití virových proteinů. Některé viry pro pohyb v cytoplazmě k jádru využívají přímé interakce s komponentami cytoskeletárního transportu. Ve většině případů virová DNA vstupuje do buněčného jádra přes jaderný pór, existují ale důkazy o alternativních mechanismech. Tato práce pojednává o časných fázích životních cyklů vybraných virů a cílení jejich genomů do jádra. Pochopení mechanismů jaderného importu virové DNA může přispět k objevu nových protivirových způsobů léčby.

Klíčová slova: malé DNA viry, jaderný import, virový vstup

Abstract

The majority of DNA viruses have to deliver their genome to the cell nucleus, which provides factors required for their replication and transcription. This work is focused on this process of small nonenveloped DNA viruses. It describes delivery of the adenovirus, parvovirus, papillomavirus and polyomavirus genomes into the cell nucleus. These viruses are endocytosed by the cell and travel to the enveloped compartments. Viral particle undergoes changes affected by surrounding environment and activity of cellular enzymes, which results in its escape from enveloped vesicle mediated by the viral proteins. Some viruses use direct interactions with cytoskeletal transport components for travelling to the cell nucleus. In most cases, viral DNA enters cell nucleus via nuclear pore complex, although the evidence of alternative mechanisms exists as well. This work focuses on early phases of the life cycle of the selected viruses and the nucleus targeting of their genomes. Understanding the mechanisms of viral DNA nuclear import may contribute to discovery of new anti-viral therapies.

Keywords: small DNA viruses, nuclear import, virus entry

1. Úvod

Viry jako obligátní buněční parazité využívají buněčnou energii a mechanismy ke své replikaci. K dosažení tohoto cíle je nejdříve potřeba zajistit dopravu jejich genomu do místa v buňce, které poskytuje faktory nutné pro replikaci genomu, jeho transkripci i posttranskripční úpravy vzniklých RNA. Pro většinu DNA virů je touto žádanou destinací buněčné jádro. Jako výjimku uveďme poxviry, které mají samy o sobě dostatečnou proteinovou i genomovou výbavu na to, aby tyto procesy zvládly realizovat v cytoplazmě. Menší DNA viry ale spoléhají na buněčnou mašinerii a virová částice slouží hlavně k dopravě virového genomu do jádra a zahájení procesů, které dále z větší části obstarávají buněčné proteiny. Další virové proteiny pak tento ohromný a komplexní buněčný systém upravují a přizpůsobují ve prospěch virové infekce.

Tento nesnadný úkol vyžaduje po virové částici překonání mnoha bariér. Na buněčné úrovni je první z nich plazmatická membrána. Obalené viry často překonávají tuto překážku pomocí fúze vlastní fosfolipidové membrány s membránou buňky a kapsida se poté ocitá v cytoplazmě. Neobalené viry, které nemají fosfolipidovou membránu, podobné principy využít nemohou. Mechanismy, kterými překonávají membrány, jsou obecně méně osvětleny než u obalených virů. Virová částice dále musí zajistit putování genomu v buňce směrem k jádru a překonání jaderného obalu. Malé neobalené viry vlastní relativně krátký genom, který jim dovoluje produkovat pouze omezené spektrum virových proteinů. Tato skromná výbava musí postačit pro vytvoření virové kapsidy, která je schopna překonat všechny tyto překážky. Doručení genomu do jádra buňky je pak předpokladem k produkci virového potomstva. U čeledi popsaných v této práci zahrnuje úspěšná infekce tvorbu nových virových částic v buněčném jádře.

Je tedy zjevné, že problematika dopravy genomů neobalených virů do jádra je velmi široká. Týká se např. interakce virů s jejich receptory, vstup do buňky, putování cytoplazmou, interakce s cytoskeletem, systémem zajišťujícím jaderný import atd. Cílem této bakalářské práce je však popsat hlavní principy, jevy charakteristické pro danou skupinu, zasadit do tohoto kontextu nové poznatky získané v posledních letech a vytvořit tak aktuální ucelený pohled na toto téma. Účelem této literární rešerše tedy není postihnout veškeré poznatky v této oblasti.

Předmětem této práce jsou mechanismy dopravy genomů malých neobalených DNA virů. Práce se zabývá DNA viry v úzkém slova smyslu. Zahnuje pouze čeledi virů, jejichž genomem je DNA a v podobě RNA se nevyskytuje ani jako replikační meziprodukt (jako k tomu dochází například u Hepadnavirů). Malými viry zde rozumíme čeledi s genomem menším než 50 kpb a průměrem virionu menším než 100 nm. Mezi popsané čeledi tedy patří adenoviry, parvoviry, papillomaviry a polyomaviry.

2. Jaderný transport

2.1 Jaderný obal

Jaderný obal odděluje dvě rozdílné části buňky, cytoplazmu a jádro. Propustnost jaderného obalu připomíná molekulární síto. Zatímco molekuly menší než přibližně 40 kD procházejí relativně volně, pasivní difúzí, průchod větších molekul je selektivní.

Jádro je od cytoplazmy odděleno vnější a vnitřní jadernou membránou. Mezi nimi se nachází perinukleární prostor široký cca 30-50 nm. Ke spojení těchto dvou membrán dochází v místě, kde se nachází komplex jaderného póru (Callan & Tomlin 1950).

Vnitřní a vnější jaderná membrána mají rozdílné složení. Vnitřní jaderná membrána obsahuje paletu unikátních integrálních membránových proteinů, vnější jaderná membrána naopak sdílí některé proteiny a funkce s membránou endoplazmatického retikula (Schirmer & Gerace 2005, review).

Komplex jaderného póru má osmičetnou symetrii, jeho šířka je přibližně 100 nm (Hinshaw et al. 1992) a průměr jeho centrálního kanálu je cca 26 nm (Dworetzky & Feldherr 1988). Komplexů jaderného póru se v běžné somatické buňce obratlovce nachází okolo tisíce. Celková hmotnost tohoto komplexu je asi 60-125 MDa u obratlovců (Cronshaw et al. 2002; Reichelt et al. 1990) a 44-66 MDa u kvasinek (Rout & Blobel 1993; Rout et al. 2000; Yang et al. 1998). Počet proteinů tvořících tento komplex se odhaduje na 50 u kvasinek a přes 100 u vyšších eukaryot. Jaderný pór můžeme pomyslně rozdělit na tři podstruktury: cytoplazmatické fibrily, prstenec ukotvený v membráně a jaderný koš.

2.2 Zprostředkovaný transport do jádra

Výlučným místem jaderného transportu je komplex jaderného póru. Každý jaderný pór je schopen zároveň zprostředkovat import i export (Feldherr et al. 1984) proteinů, RNA a jejich komplexů. Transport je velice rychlý, podle odhadů pórem projde několik set makromolekul za sekundu (Ribbeck & Gorlich 2001).

Větší molekula, která má projít jaderným pórem, musí obsahovat jaderný lokalizační signál. Ten je rozpoznán proteiny, které dále zprostředkují transport do jádra. Tyto pomocné proteiny se nazývají karyopheriny nebo importiny. Každý člen importinové rodiny je přitom schopen rozpoznat několik typů signálů. Importin α váže jaderný lokalizační signál nákladu, který má být přemístěn. Na importin α v komplexu s nákladem se dále váže importin β . Tento trimer nasedne na cytoplazmatickou stranu komplexu jaderného póru a následuje vlastní transport. Trimer se v jádře rozloží na jednotlivé komponenty díky vazbě RanGTP (Mataj & Englmeier 1998). Dalším hlavním importním receptorem je transportin (importin beta-2), který transportuje proteiny bez adaptorové molekuly.

3. Cesta genomů neobalených DNA virů do jádra

3.1 Adenoviry

3.1.1 Charakterizace čeledi

Adenoviry jsou neobalené viry o průměru kapsidy přibližně 90 nm. Jejich genomem je dvouvláknová lineární DNA, dlouhá zhruba 36 kpb. Lidské adenoviry se dělí do šesti podskupin A až F podle jejich schopnosti aglutinovat erytrocyty.

Virová částice obsahuje celkem 11 virových proteinů. Kapsidu adenovirů si můžeme představit jako částici s ikosahedrální symetrií, kde z každého z jejích dvanácti vrcholů vyčnívá vlákno (fiber). To je připojeno ke kapsidě přes pentonovou bázi. Nejhojnějším proteinem kapsidy je hexon, na každé virové částici se nachází 240 jeho trimerů, 12 z nich na každé stěně pomyslné ikosahedrální částice. Minoritní kapsidové proteiny IIIa, VI, VIII, a IX působí jako pojivo, které virovou částici zpevňuje.

Uvnitř kapsidy se nachází několik proteinů a virový genom. Bazické proteiny V, VII, a μ váží DNA, terminální protein je kovalentně připojen na její 5' konce. Dále se zde nachází cysteinová proteáza L3/p23.

3.1.2 Vstup do buňky

Vstup adenoviru typu 2 a typu 5 (Ad2, Ad5, podskupina C) do buňky začíná vazbou vlákna na coxsackie-adenovirový receptor (CAR) na povrchu buňky, následuje interakce pentonové báze s $\alpha_V\beta_5$ integriny (Wickham et al. 1993). Vazba receptoru a shlukování integrinových koreceptorů vlivem pentonové báze podporuje pro virus příznivou buněčnou signalizaci. Adenovirová částice je následně endocytována pomocí klatrinem obalených váčků (Nemerow & Stewart 1999; Wang et al. 1998). Současně se vstupem do buňky Ad2 a Ad5 také podporují makropinocytózu. Markopinocytické váčky vytvořené díky působení viru následně lyzují v době, kdy virus opouští endozomy (Imelli et al. 2004; Meier et al. 2002). Endocytóza adenoviru typu 3 je naopak na klatrinu nezávislá a využívá makropinocytósu (Amstutz et al. 2008).

Jakmile se kapsida adenoviru ocitne uvnitř buňky, začne procházet komplexními změnami, které jí umožní překonat membránu endozomu.

3.1.3 Únik z endozomu a rozvolnění kapsidy

Konformační změna virové částice a následné protržení endocytického váčku byly pozorovány pomocí elektronové mikroskopie již před desetiletími (Morgan et al. 1956). Dodnes ale není mechanismus těchto dějů zcela objasněn. Pro osvobození adenoviru je důležité snížení pH během vyžrávání endozomu, které indukuje konformační změny některých virových proteinů (Seth 1994).

Nejdříve virus ztrácí vlákna, následuje uvolnění proteinů, které stabilizují kapsidu a zprostředkují vazbu DNA ke kapsidě. Následně virová částice penetruje přes endosomální membránu a uniká do cytosolu. Tím nejen získává volnou cestu k jádru a jadernému póru, ale uniká i hrozbě

degradace lyzozomálními enzymy. Vývoj událostí je přitom často velice rychlý, 15 minut po infekci již částice adenovirových podskupin A,C,D, E a F unikly z endozomu (Gastaldelli et al. 2008), zatímco částice podskupiny B zůstávají v endozomální a lyzozomální dráze až osm hodin (Miyazawa et al. 2001, 1999).

Složkou, která rozhoduje o načasování úniku z endozomu, je pravděpodobně protein tvořící adenovirové vlákno. Adenovirus typu 5 (podskupina C, Ad5) opouští endozomy při pH 6 a nachází se u periferie buňky, adenovirus typu 7 (podskupina B, Ad7) při pH 5.5, a vyskytuje se v pozdních endozomech a lyzozomech blíže jádru. Bylo ukázáno, že výměna vláken těchto virů tyto charakteristiky prohazuje (Miyazawa et al. 2001, 1999), což dohromady napovídá, že vlákno se podílí na regulaci úniku z endozomu. Procesy, které vedou k osvobození adenoviru z endozomu, začínají již na cytoplazmatické membráně. Interakce virové částice s receptory a koreceptory podporují odhození vlákna, které nastává velice brzy po endocytóze. To dále napomáhá expozici proteinu VI (Burckhardt et al. 2011).

U tohoto proteinu byla opakovaně dokázána schopnost lyzovat membrány a je považován za protein kritický pro protržení membrány endozomu. Samotný lyzační proces je nezávislý na pH a je pro něj nepostradatelná N-koncová doména proteinu VI, která tvoří amfipatický alfa-helix (Wiethoff et al. 2005). Nejnovější poznatky funkci proteinu VI nejen potvrzují, ale i identifikují lyzin 40 jako jeho kritickou aminokyselinu. Bylo popsáno, že změna této aminokyseliny snižuje inzerci proteinu VI do membrán a zároveň inhibuje schopnost viru narušit endozomální membránu (Moyer et al. 2011). Dále bylo ukázáno, že N-koncový alfa-helix proteinu VI způsobuje zakřivení membrán a jejich fragmentaci (Maier & Wiethoff 2010). Uvolnění proteinu VI je pro protržení membrány endozomu nezbytné. Dokazuje to i strategie hostitelské obrany, kdy defenziny zabraňují adenovirové infekci právě tím, že stabilizují kapsidu a znemožní uvolnění proteinu VI (Nguyen et al. 2010; Smith et al. 2010). Ztráta proteinu VI při průchodu endozomem ale není stoprocentní a určitá populace proteinu zůstává ve spojení s kapsidou (Wodrich et al. 2010).

Pro únik virové částice do cytoplazmy je ale třeba nejen správná funkce proteinu VI, ale i dalších podjednotek. Na úspěšné penetraci se zřejmě podílí i protein pentonové báze, který v nízkém pH vystavuje své hydrofobní domény (Nakano & Greber 2000). Během průchodu endozomem se značná část populace tohoto proteinu uvolňuje z virové částice (Wiethoff et al. 2005). Aplikace protilátek proti proteinu pentonové báze totiž adenoviru znemožní protržení váčků, odvozených od cytoplazmatické membrány (Seth 1994). Protože se protein VI nachází až pod pentonovou bází, lze předpokládat, že se protein pentonové báze neúčastní penetrace přímo, ale jeho uvolnění poskytuje nutné pole působnosti pro lytický protein VI.

Protržení endozomu adenovirem nezůstává bez buněčné odpovědi. Infekce makrofágů Ad5 vede k produkci reaktivních kyslíkových radikálů (ROS, reactive oxygen species) a rychlé sekreci interleukinu-1beta, který se podílí na zánětlivé odpovědi. Oba tyto jevy mají přímou souvislost s protržením endozomu (Barlan et al. 2011). Vzniklé ROS jsou důsledkem vylití katepsinů do cytoplazmy. Tyto lyzozomální proteázy vedou k poškození mitochondrií a následnému uvolnění radikálů z těchto organel. Produkované ROS způsobují sekreci cytokinů a vznik mitochondriálního stresu (Mcguire et al. 2011).

3.1.4 Putování cytosolem

Když se kapsida úspěšně ocitne v cytoplazmě, začne se pohybovat směrem k jádru. Kapsidy se shromažďují v jeho blízkosti, často poblíž centrozomu. Částice podskupiny C zde najdeme už po 30-45 minutách od protržení endozomu. K pohybu k jádru využívají adenoviry mikrotubuly a motory na nich závislé (Bremner et al. 2009; Suomalainen et al. 2001; Leopold et al. 2000).

Použití nocodazolu, který depolymerizuje mikrotubuly, ruší tuto lokalizaci adenoviru v blízkosti jádra. Nocodazol dále snižuje infektivitu a pohyb virových částic pak vykazuje charakteristiky Brownova pohybu (Mabit et al. 2002; Suomalainen et al. 2001; Leopold et al. 2000). Pohyb kapsid je možné detekovat v plus směru (od jádra) i minus směru (k jádru). Pohyb adenoviru po mikrotubulech k jádru je závislý na dyneinu (Kelkar et al. 2003) a je podporován dynactinem (Engelke et al. 2011).

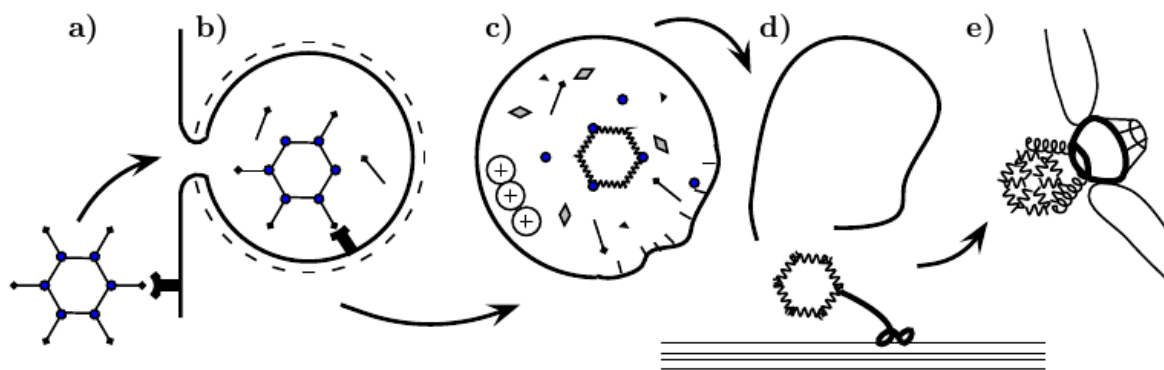
Až v nedávné době se ukázalo, že za interakci virové částice s dyneinem je odpovědný hexon (Smith et al. 2008; Bremner et al. 2009). Na pohybu po mikrotubulech se však nepodílí pouze hexon, ale i ta populace proteinu VI, která se z kapsidy neuvolnila při průchodu endozomem. Motiv PPxY proteinu VI přitahuje nedd4 E3 ubiquitin ligázu, která následně modifikuje protein VI přidáním ubiquitinu. Při porušení tohoto motivu virus sice účinně vystupuje z endozomu, ale pohyb uvnitř buňky je narušen (Wodrich et al. 2010). Celkově nám získané poznatky dovolují tvrdit, že adenoviry používají mikrotubuly k pohybu k jádru přímou interakcí virové částice s komponentami mikrotubulového transportu.

Jakým mechanismem částice z mikrotubulů "vystoupí" ale zůstává záhadou. Možnými aktéry jsou jaderný exportní faktor CRM1 na straně buňky a DNA-vazebný protein V na straně viru. Bylo popsáno, že při inhibici CRM1 je narušen transport viru do nukleoplazmy a můžeme najít více částic v blízkosti centrozomu. (Strunze et al. 2005). Možné vysvětlení těchto jevů je, že CRM1 nebo protein jím exportovaný se nějak podílí na odlepení viru z mikrotubulů a bez něj uvízne v blízkosti jádra, aniž by byl schopen svou cestu dokončit.

3.1.5 Vstup do jádra

Po cestě cytosolem adenovirová částice nasedá na jaderný pór, kde se dále rozvolňuje. DNA v komplexu s dalšími virovými proteiny se pak dostává přes jaderný pór do nukleoplazmy. Přesné složení komplexu, který prochází pórem, zatím není dobře definováno (Greber et al. 1997). Podle fluorescenční mikroskopie označených virů transport adenoviru do jádra nastává ve dvou vlnách. Při první vlně transportu, která kulminovala 90 min po infekci, autoři pozorovali znatelnou kontrakci buňky, při druhé vlně v čase 120-240 min již nikoli (Nakano & Greber 2000).

Kapsida Ad2 nasedá na jaderný pór přes interakci s jeho filamentárním proteinem CAN/Nup214, a to nezávisle na faktorech cytosolu (Trotman et al. 2001). Pokud se virus úspěšně nenaváže, nedochází k potřebnému rozvolnění kapsidy. Takový případ byl popsán např. při zablokování O-vázaných glykoproteinů jaderného póru (Greber et al. 1997). To naznačuje, že komplex jaderného póru se na tomto procesu podílí. Vhodným kandidátem jsou flexibilní vlákna O-vázaných glykoproteinů. Dále je pro rozebrání virové částice nezbytná virová proteáza L3/p23, která degraduje zbylou populaci proteinu VI (Greber & Kasamatsu 1996). Výše zmíněný protein



Obrázek 3.1: Schéma časné fáze infekce adenovirů. Vlákno virové částice interaguje s CAR receptorem (a). Buňka virus endocytuje pomocí klatrinem obaleného váčku (b). V endozomu se snižuje pH a virová částice prochází komplexními změnami. Odpadávají vlákna, část populace proteinů pentonové báze a další proteiny (c), včetně proteinu VI, který způsobí zakřivení a protržení membrány endozomu. Částečně rozvolněná virová částice se pak přes interakci s dyneinem vydává po mikrotubulech směrem k jádru (d). Zde nasedne na komplex jaderného póru, kde se s pomocí buněčných faktorů dále rozvolní (e). Virová DNA v komplexu s proteiny pak prochází pórem do jádra.

VI totiž nejen lyzuje membránu endozomu, ale také stabilizuje kapsidu.

Protein VII zaujímá v přesunu do jádra důležitou funkci. Adenovirová DNA vstupuje do nukleoplazmy přes jaderný pór spolu s ním (Greber et al. 1997) a podle nedávné práce je možné shluky proteinu VII v jádře považovat za ekvivalentní k počtu infekčních částic a lze je použít k titraci viru (Walkiewicz et al. 2009). Tento protein vlastní několik jaderných a jadérkových lokalizačních signálů (Lee et al. 2003) a zároveň váže několik z hojných buněčných receptorů jaderného importu (Wodrich et al. 2006). Je tedy pravděpodobné, že se významně podílí na samotném přesunu uvolněné virové DNA do jádra.

Adenovirus v této fázi potřebuje několik buněčných faktorů. Pro úspěšné doručení DNA do jádra vyžaduje nejen importní faktory pro přesun do nukleoplazmy, ale několik dalších proteinů, které pravděpodobně umožní částečně rozvolněné kapsidě se ještě více rozpadnout a uvolnit DNA v komplexu s proteiny pro přesun. Rozebrání kapsidy patrně napomáhá chaperon Hsc70 (Saphire et al. 2000). Rozvolnění kapsidy dále vyžaduje histon H1 a jeho importní faktory importin β a importin7 (Trotman et al. 2001). K přesunu virového genomu do jádra ale tyto faktory nestačí. Přes pór se pak pravděpodobně přesunuje komplex H1-hexon s importiny.

Z buněčných faktorů dále virus vyžaduje transportin. Jeho inhibice narušuje import proteinu VII i DNA, zatímco narušení klasické importin α importin β dráhy má jen malý efekt. Prekursor proteinu VII (preVII) přitom využívá α a β importiny, zatímco protein VII transportiny, což patrně hraje roli v různých fázích životního cyklu viru (Hindley et al. 2007). Během replikace je nutné zajistit dopravu proteinu preVII do jádra, během časné fáze infekce dopravu proteinu VII. Překvapivě se na těchto dějích podílejí nejen jaderné importní, ale i exportní faktory. Jak bylo částečně zmíněno výše, bylo popsáno, že inhibice jaderného exportního faktoru CRM1 narušuje rozvolnění virové částice a přesun virové DNA do nukleoplazmy (Strunze et al. 2005). Přesná funkce CRM1 ale zatím nebyla objasněna.

3.2 Parvoviry

3.2.1 Charakterizace čeledi

Parvoviry jsou nejmenší DNA viry. Obratlovce infikují tři rody z čeledi parvovirů: rod Parvovirus (autonomní parvoviry), Erythrovirus a Dependovirus. Parvoviry sice dokáží svůj genom dopravit do jádra, ale pro jeho replikaci vyžadují hostitelské buňky v S-fázi. Zástupci rodu Dependovirus potřebují pro dokončení životního cyklu koinfekci buňky adenovirem nebo herpesvirem.

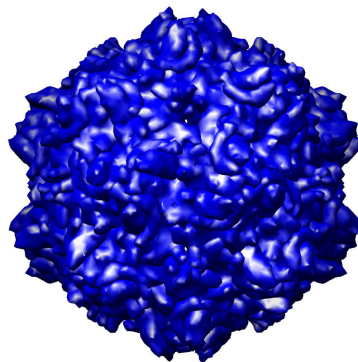
Ikosahedrální kapsida parvovirů má průměr pouhých 18-26 nm a skládá se ze šedesáti kopií strukturních proteinů VP1, VP2 a VP3 (obr. 3.2). Protein VP1 obsahuje celou sekvenci VP2 a navíc vlastní unikátní N-koncovou část. Protein VP3 vzniká odštěpením N-konce VP2. Genomem parvovirů je jednořetězová DNA o délce cca 5 kpb, která na koncích tvoří dvouřetězové úseky ve tvaru T nebo Y.

3.2.2 Vstup do buňky

Jako cesta dovnitř buňky slouží parvovirům receptorem zprostředkovaná endocytóza. Spektrum receptorů je velice široké, například pro myší parvovirus MVM (Minute virus of mice) jsou receptorem sialové kyseliny (Linser et al. 1977), pro AAV2 (Adeno-associated virus serotype 2) heparin sulfát (Bartlett et al. 2000) a psí parvovirus (CPV, canine parvovirus) a kočičí parvovirus (FPV, feline parvovirus) transferinový receptor (Parker et al. 2001). Hlavním zprostředkovatelem internalizace je pro parvoviry klatrinem obalený váček (Bartlett et al. 2000; Duan et al. 1999; Parker & Parrish 2000). Pojmutí kapsidy do buňky probíhá velice rychle, např. poločas u AAV2 je 10 min.

Klatrinová cesta je pravděpodobně nejdůležitější, ale ne jedinou, kterou se parvoviry dostávají do buňky. Narušení funkce dynaminu, GTPázy, která podškrcuje klatrinem obalené váčky, infekci AAV2 i CPV významně sníží, ale nezabrání jí úplně (Duan et al. 1999; Parker & Parrish 2000). Podobně mutace v oblasti internalizačního signálu na cytoplazmatické části transferinového receptoru, který je substrátem pro klatrinovou endocytózu, infekci FPV pozdrží, ale nezastaví (Hueffer et al. 2004). Parvoviry tedy musí využívat ještě další způsob vstupu do buňky. Skutečně bylo ukázáno, že AAV5 používá nejen klatrinovou, ale i kaveolární endocytózu (Bantel-Schaal et al. 2009). Dále prasečí parvovirus (PPV, porcine parvovirus) vstupuje do buněk přes makropinocytósu i cestu závislou na klatrinu. Ani inhibitory obou internalizačních drah aplikované najednou ale úplně nezabrání infekci (Boisvert et al. 2010).

Parvovirové kapsidy pak můžeme najít v několika buněčných kompartmentech, především endozomálního původu. Jednu z mála výjimek tvoří kapsidy AAV5, které se shromažďují v Golgiho aparátu (Bantel-Schaal et al. 2002). Nejčastěji najdeme největší populaci parvovirových kapsid v pozdním endozomu v blízkosti jádra. Objevují se ale i v recyklujících endozomech a lyzozomech. Závislost parvovirové infekce na nízkém pH je dobře doložena (viz níže), stále však není jasné, kterým váčkem o nízkém pH kapsida musí projít pro úspěšnou infekci.



Obrázek 3.2: Vizualizace částice MVM na základě strukturních dat.

Převzato ze stránek University of California, Computer graphics laboratory (<http://www.cgl.ucsf.edu/Research/virus/capsids/viruses.html>).

3.2.3 Únik z endozomu a rozvolnění kapsidy

Pro produktivní infekci potřebují parvoviry překonat membránu endozomu. Snížené pH ve zra-
jících endozomálních váčcích je pro parvoviry nezbytné a způsobuje změny konformace proteinů
kapsidy, které nakonec vedou k jeho úniku.

Na zvýšení pH v endozomálních váčcích je AAV2 citlivý během prvních 30min, CPV i 90min
po infekci (Bartlett et al. 2000; Parker & Parrish 2000). U mnohých parvovirů bylo popsáno, že
kyselé prostředí způsobí vystavení N-konce VP1 proteinu na povrch kapsidy (Mani et al. 2006;
Suikkanen et al. 2003; Sonntag et al. 2006; Ros et al. 2006), pravděpodobně přes kapsidový pór
v pětičetné ose symetrie (Farr & Tattersall 2004; Cotmore et al. 1999). Stejného efektu bylo
u některých zástupců dosaženo zvýšením teploty. Dále je endozomálními proteázami odštěpen
N-konec VP2, což vytržení jinak skrytého N-konce VP1 usnadní (Farr et al. 2006). Parvovirus
proto může vyžadovat nízké pH i jako příznivé prostředí pro aktivitu endozomálních enzymů,
které kapsidu výhodně modifikují.

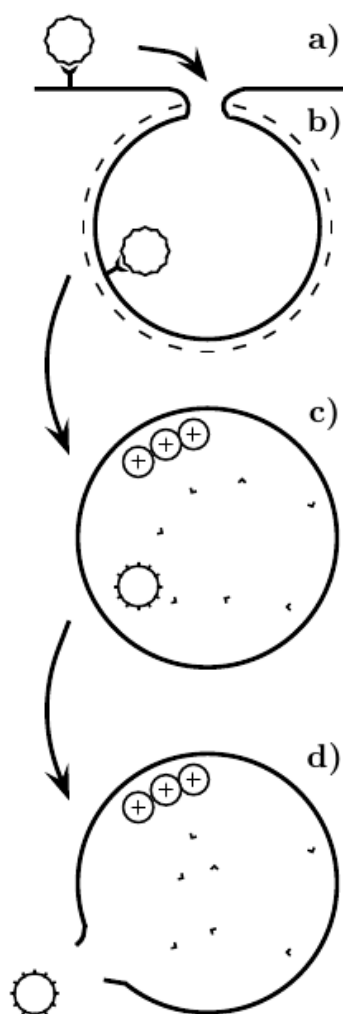
Na N-konci kapsidového proteinu VP1 se nachází doména s aktivitou fosfolipázy A2 (PLA2),
která je pravděpodobně zodpovědná za únik parvoviru z endozomu. Například podle Farr et al.
(2005) bodové mutace v aktivním centru PLA2 domény zruší infektivitu virionů MVM. Tuto
mutaci bylo možné kompenzovat koinfekcí s nemutovaným virem, lyzí endozomu polyethyleni-
minem nebo koinfekcí adenovirem. Podle dalších publikací protilátky proti N-konci VP1 B19
zabraňují infekci (Ros et al. 2006) a inhibice PLA2 aktivity VP1 u CPV způsobí, že virus zůstane
v endozomálních váčcích (Suikkanen et al. 2003). Další užitečné údaje poskytl nedávný *in vitro*
experiment, který prokázal, že v kyselých podmínkách narušuje CPV dipalmitoylphosphatidyl-
cholin:cholesterolové membrány (Pakkanen et al. 2008). Podobný efekt byl přitom pozorován
na populacích endozomů během infekce. Autoři tuto schopnost přisuzují unikátnímu N-konci
VP1, neboť kapsidy bez genomu a VP1 neměly na umělé membrány žádný vliv. Zároveň ale do-
dávají, že samotná doména PLA2 membránové váčky nenarušovala. Aktivita PLA2 má zřejmě
ještě další význam, aktivuje totiž vstup vápenatých iontů do cytoplazmy přes I_{CRAC} kanál (Lu-
pescu et al. 2006). Hladina vápenatých iontů je přitom citlivým spouštěčem mnoha provázaných
signálních drah, proto je možné, že virová infekce některou z nich ovlivní.

Jedním z faktorů nutných pro parvovirovou infekci mohou být endozomální proteázy. Bylo
popsáno, že cysteinové proteázy endozomu cathepsiny B a L interagují s kapsidou AAV2 a AAV8

a štěpí kapsidy *in vitro*. Pro AAV5 stejná interakce nebyla potvrzena (Akache et al. 2007).

Parvivory pravděpodobně způsobují spíše malé perforace membrány endozomu, než její úplné protržení. Z endozomu do cytoplazmy 8h po infekci CPV prostoupí jen malé dextrany o molekulové hmotnosti 3000, ale nikoli o velikosti 10 000 (Suikkanen et al. 2003). Stejně tak CPV nepermeabilizuje buňky pro α -sarcin, psí adenovirus typu 1 (Canine adenovirus 1) to ale dokáže (Parker & Parrish 2000).

3.2.4 Putování cytolem



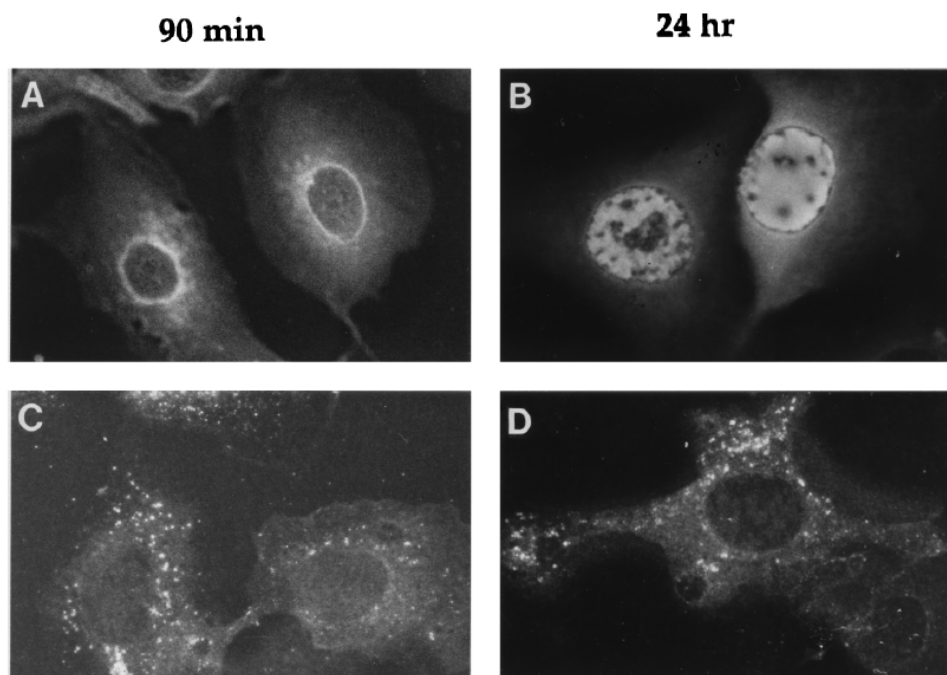
Obrázek 3.3: Schématické znázornění časných fází parvovirové infekce. Virová částice interaguje s receptorem a je endocytována pomocí klatrinu obaleného váčku. V něm se snižuje pH (+, protony) a kapsidové proteiny podléhají změnám, N-konec VP2 je odštěpen a N-konec VP1 je vystaven na povrchu kapsidy. Blíže neobjasněným způsobem za přispění VP1 tak parvovirus opouští endozom.

Po úniku z obalených váčků se parvovirus ocitá v cytoplazmě, kde interaguje s cytosolickými faktory. Dokazuje to i poznatek, že protilátky proti CPV v cytoplazmě zastavují virovou infekci (Vihinen-Ranta et al. 2000).

Infekce parvovirů je závislá na mikrotubulech, není však dobře objasněno, ve kterém kroku infekce je virus potřebuje. Kapsidy CPV při aplikaci nocodazolu zůstávají ve váčcích a virová infekce je na nocodazol citlivá do první hodiny po infekci. Z toho autoři usuzují, že funkční mikrotubuly jsou nezbytné pro vyzrání časných endozomů v pozdní endozomy a tím i potřebné snížení pH (Vihinen-Ranta et al. 1998, obr. 3.4). Navíc AAV2 vyžaduje pro internalizaci a pohyb k jádru kromě mikrotubulů i mikrofilamenta (Sanlioglu et al. 2000). Podobně infekce PPV je závislá na mikrotubulech během prvních 10 h po infekci a na aktinu během celého virového cyklu (Boisvert et al. 2010). Protože váčky s virovými částicemi je možné často pozorovat v blízkosti jádra, je možné, že parvivory je opouštějí až v těchto místech. Nepoškozený cytoskelet je pak nutný pouze k dopravě váčků s virem do blízkosti jádra. Na druhou stranu, pohyb částic CPV vstříknutých do cytoplazmy k jádru lze také inhibovat nocodazolem (Vihinen-Ranta et al. 2000). Parvivory mohou teoreticky využívat mikrotubuly jak ve fázi, kdy jsou ještě v obaleném váčku, tak přímo v cytoplazmě. Pro porozumění pohybu závislého na cytoskeletu v cytoplazmě budou potřeba další studie.

3.2.5 Vstup do jádra

Dalším krokem v parvovirové infekci je doručení virové DNA z cytoplazmy do jádra. Většina populace kapsid CPV může být spatřena v jeho blízkosti 30-90 min po infekci (Vihinen-Ranta et al. 1998; Parker & Parrish 2000). Virové částice se ale do jádra dostanou za několik hodin. Kapsidy CPV vstřík-

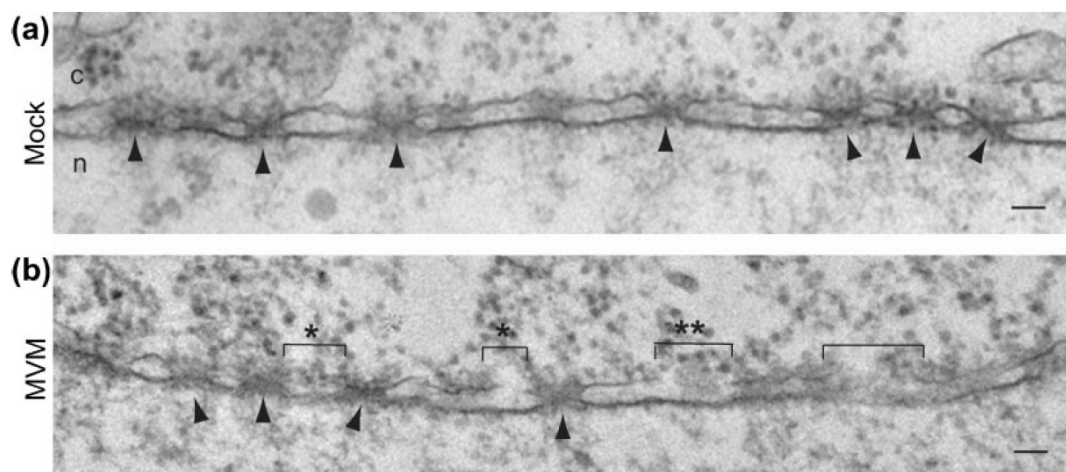


Obrázek 3.4: Fluorescence CPV částic v infikovaných neošetřených buňkách (A, B) nebo po aplikaci nocodazolu (C, D). V čase 90 min po infekci se většina kapsid nachází na okraji jádra (A) a 24 h p.i. dochází k množení parvoviru (B). Buňky infikované v přítomnosti nocodazolu vykazují fluorescenci pouze v cytoplasmě a v blízkosti jádra 90 min (C) i 24 h (D) po infekci. Převzato z Vihinen-Ranta et al. (1998).

nuté do cytoplazmy se rychle shromáždí u jádra, vstoupí do něj až 3-6 h po infekci (Vihinen-Ranta et al. 1998). I pozorování živých buněk fluorescenčně označeným AAV spíše nasvědčují tomu, že vstup do jádra je velmi neúčinný proces (Lux et al. 2005).

Teoreticky jsou kapsidy parvovirů dost malé na to, aby prošly celé jaderným pórem. Kapsidy pavovirů skládají v jádře, proto nepřekvapí, že kapsidové proteiny obsahují několik jaderných lokalizačních signálů (Lombardo et al. 2002; Vihinen-Ranta et al. 1997). Zajímavější už jsou studie, které určily na kapsidových proteinech AAV2 jeden jaderný lokalizační signál, který se nachází na společné části VP1 i VP2, není podstatný pro tvorbu kapsid, ale při mutaci v této oblasti se virová DNA není schopna dostat do jádra (Grieger et al. 2006).

V nedávné době se ale objevily důkazy, že by virus mohl do jádra vstupovat přes jím indukované perforace v jaderné membráně. Nejprve bylo pozorováno, že MVM při infekci oocytů drápatky způsobuje poškození jaderné membrány, převážně na cytosolické straně (Cohen & Pante 2005, obr. 3.5). Další studie tohoto jevu na myších fibroblastech ukázaly, že dochází k dramatickým změnám tvaru a morfologie jádra a zlomům v jaderné membráně (Cohen et al. 2006). Následně bylo popsáno, že pro tyto perforace membrán virus využívá buněčné kaspázy, které obvykle ničí jadernou membránu během apoptózy. Nejdůležitější roli při infekci parvoviru hraje kaspáza 3. V infikovaných buňkách její aktivita nepřesahuje klidové hodnoty, ale přesunuje se do jádra. Inhibice kaspázy 3 snižuje množství virových částic v jádře asi na polovinu (Cohen et al. 2011). Další podporu této penetrační teorii poskytují experimenty, které ukazují nezávislost přesunu AAV2 do jádra na komplexu jaderného póru. Transport AAV2 do purifikovaných



Obrázek 3.5: Poškození vnější jaderné membrány oocytů drápatky vlivem MVM. Do oocytů *Xenopus laevis* byl vstříknut roztok PBS (a, mock) nebo MVM (b). Po jedné hodině inkubace za pokojové teploty proběhlo zpracování vzorků. Snímky pořízené pomocí elektronové mikroskopie na hranici cytoplazmy (c) a jádra (n), šipka označují komplex jaderného póru, svorky ohraničují zlomy v jaderném obalu. Zlomy byly často pozorovány v blízkosti jaderného póru (označeno *) a virové kapsidy se objevovaly poblíž zlomů (označeno **). Převzato z Cohen & Pante (2005).

jader se děje bez účasti komplexu jaderného póru (Hansen et al. 2001) a přesun tohoto parvoviru do jádra při koinfekci adenovirem nenarušuje thapsigargan, který blokuje komplex jaderného póru (Xiao et al. 2002).

Nepanuje ani jistota v tom, v jakém stavu se kapsida parvovirů do buněčného jádra dostává. Několik důkazů podporuje verzi, kdy kapsidové proteiny doprovázejí genom viru až do jádra, nebo se do této destinace dostává kapsida téměř celá. Podle práce Sonntag et al. (2006) mikroinjekce protilátek proti kapsidovým proteinům do jádra blokuje infekci AAV2 úplně. Z toho lze soudit, že se jeho DNA dostává do jádra patrně v komplexu s kapsidovými proteiny. Dále při infekci AAV2 je pozorováno jen málo neporušených kapsid v jádře, při koinfekci adenovirem ale jejich počet rychle stoupne (Xiao et al. 2002). Experimenty s izolovanými jádry a jejich infekcí AAV2 zase dokazují, že jádro obsahuje všechny faktory, které jsou nutné pro uvolnění genomu z kapsidy a začátku replikace (Hansen et al. 2001). Pokud by se tedy virová částice dostala do jádra, patrně by nebylo obtížné z ní DNA vysvobodit.

Naopak některé studie si všimly, že v jádře je možné detekovat pouze malé množství kapsidových proteinů v době, kdy se zde již nachází virový genom. Počet celkově pozorovaných virionů přitom s časem klesá (Lux et al. 2005). Protilátky proti kapsidovým proteinům přítomné v cytoplazmě jsou schopny blokovat CPV ještě 8 h po infekci (Vihinen-Ranta et al. 2000), z čehož lze soudit, že genom zůstává zabalen v kapsidě patrně ještě v cytoplazmě. Protilátky pak nutné rozvolnění neumožní. Tyto poznatky nahrávají spíše verzi, kdy se virové proteiny od DNA uvolňují ještě před vstupem a jsou pak degradovány. Také je možné, že před transportem se většina kapsidových proteinů uvolní (signál je proto slabý), ale genom pro svůj transport vyžaduje vazbu pouze několika málo z nich (a jejich zablokování znemožní infekci). Tato cesta by mohla převažovat v případech, kdy neprobíhá prospěšná koinfekce adenovirem, který pomůže aktivovat alternativní, účinnější mechanismus. Další možností je velmi rychlé rozbalení částice v jádře a

blesková degradace kapsidových proteinů.

3.3 Papillomaviry

3.3.1 Charakterizace čeledi

Kapsida papillomavirů má průměr asi 55 nm a skládá se ze dvou strukturních proteinů L1 a L2. Jejich genomem je dvouvláknová DNA o délce zhruba 8 kpb. V kapsidě papillomavirů najdeme 360 kopií proteinu L1 (Baker et al. 1991), které jsou uspořádány do 72 pentamer. Dvanáct z těchto kapsomer má kolem sebe pět sousedních pentamerů (jsou pentavalentní), zbylých šedesát obklopuje 6 sousedních pentamerů (jsou hexavalentní)(obr. 3.6). Protein L2 se pak nachází ve vnitřní prohlubni pentameru VP1, kde je uchycen C-koncem pomocí hydrofobních interakcí (Finnen et al. 2003). V současné době převládá názor, že v každém virionu se nachází 12 kopií L2 (Trus et al. 1997). Většina proteinu L2 je skryta v kapsidě, na jejím povrchu je přístupný pouze úsek polypeptidu tvořený aminokyselinami přibližně 60-130 (Liu et al. 1997; Kondo et al. 2007; Yang et al. 2003).

Papillomaviry infikují bazální keratinocyty a jsou schopny produkovat virové potomstvo pouze v terminálně diferencovaných keratinocytech, což v minulosti značně ztížilo a dodnes velmi zpomaluje jejich výzkum. Teprve přibližně před dvaceti lety se začal dařit vývoj systémů, které umožnily produkci virových částic vhodných ke studiu. Zprvu byly výtěžky nízké, další optimalizace ale produkci virových částic značně vylepšily (Meyers et al. 1992; Roden et al. 1996; Rossi et al. 2000; Unckell et al. 1997).

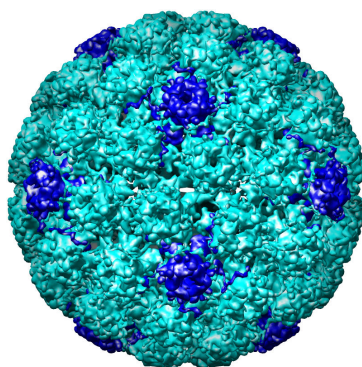
Poměrně nedávno byl vyvinut myší model, který poskytuje příležitost poznatky o papillomavirech získané na buněčné úrovni testovat *in vivo* (Roberts et al. 2007).

3.3.2 Vstup do buňky

Většina papillomavirů používá proteoglykan heparan sulfátu (heparan sulfate proteoglykan, HSPG) jako svůj primární receptor (Giorgi et al. 2001; Joyce et al. 1999). Pro vazbu viru na tuto molekulu jsou pak zvláště důležité glykosylace heparan sulfátu. Není překvapivé, že za tuto vazbu zodpovídá L1 protein (Roden et al. 1994; Volpers et al. 1995).

Papillomaviry infikují bazální keratinocyty, ke kterým získají přístup patrně při poranění sliznice. Částečně se podařilo objasnit princip, který by mohl viru pomoci najít právě tyto buňky. Hromadí se důkazy, že papillomaviry se ještě před interakcí s receptorem váží k bazální membráně, která může být odhalena v souvislosti s poraněním. Laminin 5 je hojná složka bazální membrány sliznice a kůže, produkovaná keratinocyty. Existují důkazy pro vazbu lidských papillomavirů (human papillomavirus, HPV) právě k lamininu 5 (Culp et al. 2006a,b). Podle jiných autorů interaguje HPV spíše se sekretovanou formou heparin sulfátu (Selinka et al. 2007). Vazbu virionů na bazální membránu podporují i výsledky získané s již zmíněným myším modelem (Roberts et al. 2007). Papillomavirová částice tedy převděpodobně váže některou složku bazální membrány, o jejíž přesné identitě se ale vedou spory.

Virová částice prochází ještě před internalizací několika procesy. Vazba na HSPG způsobí konformační změnu kapsidy, která vyústí ve vytržení N-konce proteinu L2. Tento jev je nepo-



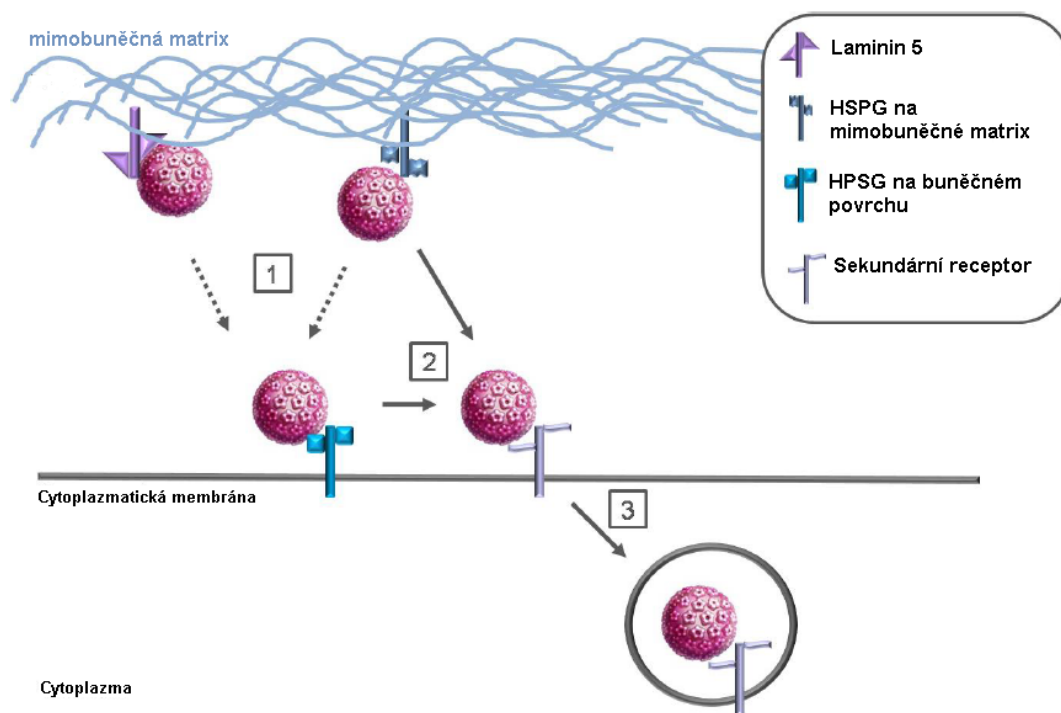
Obrázek 3.6: Vizualizace částice lidského papillomaviru typu 16 (HPV16) na základě strukturních dat. Tmavě modrá barva označuje pentavalentní pentamery, světle modrá hexavalentní pentamery. Převzato ze stránek University of California, Computer graphics laboratory (<http://www.cgl.ucsf.edu/Research/virus/capsids/viruses.html>).

stradatelný pro úspěšné doručení virové DNA do jádra a patrně se na něm podílí další faktory vně buňky, např. peptidyl prolyl cis-trans izomeráza cyclophilinB (CyPB), která se nachází na povrchu buňky v uskupení s HSPG (Vanpouille et al. 2007). Ta usnadňuje vytržení N-konce L2 proteinu HPV16 (Bienkowska-Haba et al. 2009). Na této části proteinu L2 pak dochází ještě na povrchu buňky k proteolytickému štěpení proteázou furinem, které je nezbytné pro úspěšnou infekci (Richards et al. 2006).

V posledních letech se hromadí důkazy, že na vstupu do buňky se podílí ještě další, sekundární receptor, který nemá povahu heparan sulfátu. Například viriony HPV16 štěpené furinem již nepotřebují pro infekci HSPG (Day et al. 2008; Selinka et al. 2007).

Časová souslednost dějů před internalizací není zcela jasná. Výsledky *in vivo* experimentů tvrdí, že ke štěpení a vystavení L2 na povrchu dochází ještě na bazální membráně a tyto změny pak dovolí přesun virionů z vazebných faktorů typu HSPG na specifický receptor bazálních keratinocytů (Kines et al. 2009). Celkově poznatky podporují model, kdy virová částice vyžaduje vazbu na HSPG, ať už vázaný na povrch buňky nebo sekretovaný v bazální membráně, pro konformační změny, které jí následně umožní silnější vazbu na další, zatím neznámý receptor. Ve vazbě na sekundární receptor pak částice vstoupí do buňky (obr. 3.7).

Do kterých buněčných kompartmentů a jakým způsobem následně papillomaviry putují však není příliš jasné, navíc jednotlivé typy papillomavirů preferují různé alternativy a jednotlivé publikace si nezdídkou odporují. Přesný popis proto přesahuje rámec této práce, uvedme však alespoň základní poznatky. Hovězí papillomavirus typu 1 (bovine papillomavirus type 1, BPV1) vstupuje do buněk endocytózou závislou na klatrinu, následně používá kaveolární váčky a existují důkazy, že poté se vyskytuje i v ER (Bossis et al. 2005; Laniosz et al. 2007). Lidský papillomavirus typu 31 (HPV31) pro internalizaci využívá kaveoly (Smith et al. 2007; Bousarghin et al. 2003). Endocytóza a putování HPV16 v buňce jsou velice sporné. Převažují práce, které popisují závislost infekce na klatrinu a kaveolinu 1 (Bousarghin et al. 2003; Hindmarsh & Laimins 2007; Laniosz et al. 2009). Podle práce Spoden et al. (2008) naopak nemá inhibice klatrinové ani kaveolinové endocytózy na infekci HPV16 vliv. Tato publikace dále ukazuje, že možným zprostředkovatelem vstupu by mohly být tetraspaninem obohacené membránové mikrodomény.



Obrázek 3.7: Navržený model interakce kapsid HPV s mimobuněčnou matrix a povrchem buňky. HSPG je považován za prvotní receptor HPV. Kapsidy se také váží na laminin 5 (1). Vstupu HPV do buňky se účastní další, sekundární receptor (2). Není jasné, ve kterém kroku se virová částice dostane z mimobuněčné matrix na povrch buňky (tečkované šipky). Interakce s HSPG vede k expozici místa štěpeného furinem na L2 proteinu. Po tomto proteolytickém štěpení virová částice projde konformační změnou, ztrácí schopnost vázat se k HSPG a interaguje se sekundárním receptorem, následuje endocytóza částice (3). Převzato a upraveno z Horvath et al. (2010).

Autoři pak rozdílné výsledky přikládají například použití inhibitorů s mnoha vedlejšími efekty nebo jiných buněčných linií.

Společnou potřebou všech papillomavirů je ale okyselení endocytických váček, což značí, že částice pravděpodobně musí projít jedním z kyselých endozomálních kompartmentů (Spoden et al. 2008; Day et al. 2003; Selinka et al. 2002; Smith et al. 2008).

3.3.3 Únik z endozomu a rozvolnění kapsidy

V buňce prochází kapsida dalšími rozsáhlými změnami. Po internalizaci HPV16 se ztratí většina epitopů na L1, které byly přes internalizaci rozpoznávány protilátkami (Selinka et al. 2007). Svůj podíl na konformačních změnách má pravděpodobně i snížení pH.

Mnoho důkazů nasvědčuje tomu, že za únik viru z endozomu je zodpovědný protein L2, který je pro úspěšnou infekci nepostradatelný. Přesný mechanismus překonání membrány ale zatím nebyl objasněn. Do cytoplazmy pravděpodobně vstupuje jen protein L2 a genom, protein L1 je nejspíše degradován (Day et al. 2004). Přestože se štěpení L2 odehrává na povrchu buňky, je důležité pro únik viru z endozomu (Richards et al. 2006). Kamper et al. (2006) nejen dokázali, že L2 je nezbytný pro přesun genomu papillomaviru do cytoplazmy, ale také ukázali, že tuto funkci zastává úsek dvaceti tří aminokyselin na jeho C-konci. Tento peptid má schopnost narušovat membrány. Při pH 6 přitom lyzuje eukaryotické buňky účinněji než v neutrálním pH.

Infekce papillomavirů je dále závislá na gama-sekretáze, což je membránová proteáza, která štěpí proteiny v jejich transmembránové oblasti. Zdá se, že je vyžadována právě pro únik z endozomu, neboť její inhibice nezabraňuje rozvolnění kapsidy, ale znemožní transport genomu a L2 proteinu do jádra (Huang et al. 2010; Karanam et al. 2010). Nepodařilo se však prokázat, že by tato sekretáza přímo štěpila kapsidové proteiny. Je možné, že se podílí na zpracování jiného proteinu, který virus vyžaduje.

Nedávná práce Marusic et al. (2012) popisuje interakci proteinu L2 s proteinem SNX17 (sorting nexin 17), který se podílí na funkci recyklujících endozomů. Při jejím narušení dramaticky klesá množství genomů dopravených do jádra a stoupá množství kapsid v lyzozomálním kompartmentu. Zdá se, že SNX17 se podílí na zadržení virionů v endozomálních kompartmentech a zabráňuje tak jejich předčasné lyzozomální degradaci.

Další práce ukazuje vazbu L2 BPV1 na syntaxin 18 přes aminokyselinový úsek 40-44 L2 proteinu. Při mutaci v tomto úseku se pseudoviriony stávají neinfekční. Syntaxin 18 se podílí např. na putování váčků mezi ER a cis-Golgi (Bossis et al. 2005; Laniosz et al. 2007). Přibývají tedy důkazy, že minoritní kapsidový protein L2 se tedy pravděpodobně podílí i na pohybu virionů uvnitř buňky.

Pro následné putování cytoelem papillomaviry vyžadují mikrotubuly. Aplikace nocodazolu dramaticky snižuje infektivitu BPV1 a HPV33 (Day et al. 2003; Selinka et al. 2002). Částice BPV1 byly pozorovány pomocí elektronové mikroskopie společně s mikrotubuly (Liu et al. 2001). Existují práce, které ukazují interakci proteinu L2 HPV16 a HPV33 s dyneinem (Florin et al. 2006; Schneider et al. 2011), což podporuje model pohybu virového komplexu přímo v cytoplazmě. Zatím si však nemůžeme být jisti, jestli virus vyžaduje mikrotubuly ještě v endozomálních váčcích, jako z váčků uvolněná virová částice v cytoplazmě, nebo obojí.

3.3.4 Vstup do jádra

Přesun papillomaviru z cytoplazmy do jádra zatím není příliš objasněn. Je ale pravděpodobné, že na tomto úkolu významně podílí L2 protein. Existují důkazy, že genom se do jádra dostává spolu s L2 proteinem a oba se pak vyskytují v jaderných doménách 10 (ND10, PML tělíska), tato lokalizace je pro infekci viru nezbytná (Day et al. 2004). Bylo pozorováno, že při nízké buněčné expresi se však protein L2 v ND10 doménách nevyskytuje, jeho lokalizace v nich převládne při vysoké produkci tohoto proteinu a nebo vpřítomnosti dalších faktorů (Kieback & Muller 2006). Příčina lokalizace v ND10 doménách tak zůstává záhadou, nicméně L2 pravděpodobně skutečně doprovází genom do jádra. Bylo popsáno, že protilátky proti L2 zabráňují virové infekci ve dvou krocích. Menší podíl měl negativní vliv na samotný vstup do buňky, dále pak protilátky blokovaly dopravu virové DNA do jádra (Ishii et al. 2010).

Jakým způsobem se ale virová DNA dostane do nukleoplazmy zatím není dobře prostudováno. Literatura v současné době poskytuje pouze relativně malé množství nepřímých důkazů. Minoritní kapsidový protein L2 by mohl fungovat jako adaptér mezi virovou DNA a importními faktory, které by mohly následně zprostředkovat přesun komplexu do jádra přes jaderný pór. Interakce L2 s importními faktory byla dokázána. Protein L2 BPV1 a HPV16 má na svém C i N-konci jaderné lokalizační signály, které vážou heterodimer karyopherinů $\alpha_2\beta_1$ (Fay et al.

2004; Darshan et al. 2004; Mamoor et al. 2012). Taktéž byla ukázána interakce L1 s karyopheriny (Nelson et al. 2000). Samotná interakce L1 a L2 s jadernými importními faktory a výskyt NLS však není překvapivý, neboť i papillomaviry produkují nové viriony v jádře a musí do nukleoplazmy dopravit složky kapsidy. Chybí studie, která by alespoň ukázala, jestli papillomaviry NLS na L2 proteinu potřebují při vstupu do jádra během časně fáze infekce.

Málo prostudovaný jaderný import papillomavirů poskytuje prostor pro alternativní teorie, které nepředpokládají vstup viru do jádra přes jaderný pór. Například práce Pyeon et al. (2009) tvrdí, že papillomaviry pro infekci potřebují buňky procházející buněčným cyklem, přesněji musí projít časnou profází, kdy je jaderná membrána fragmentována. Virus by se tak úplně vyhnul nutnosti překonat jaderný obal a skvěle by to vysvětlovalo limit infekce pouze na bazální část epitelu, která prochází dělením. Otázkou je, jestli HPV skutečně časnou profázi nezbytně vyžaduje, nebo mu jen infekci značně usnadní. Pro úplné prokázání této teorie by však byly potřeba další studie. To ostatně platí o celém papillomavirovém vstupu do buňky, což je téma, kde zatím nacházíme více otázek než faktů.

3.4 Polyomaviry

3.4.1 Charakterizace čeledi

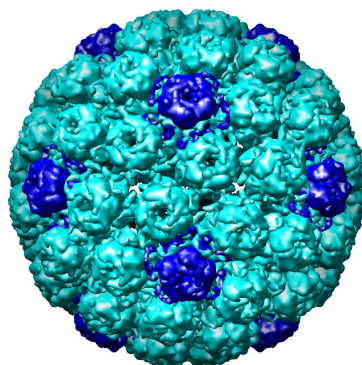
Polyomavirový genom je tvořen přibližně 5 kpb dvouvláknové DNA. Jejich kapsida s ikosaedrální symetrií se skládá ze tří proteinů. Hlavní kapsidový protein VP1 je uspořádán do 72 pentamer (Liddington 1991). Dvanáct z těchto kapsomer je pentavalentních, šedesát je hexavalentních (obr. 3.8). V centrální dutině VP1 pentameru zevnitř kapsidy je hydrofobními interakcemi přichycen minoritní protein VP2 nebo VP3 pomocí jejich společného C-konce. Oba minoritní proteiny jsou translatovány ze stejného čtecího rámce, VP2 výsledně obsahuje celou sekvenci VP3 a navíc unikátní N-koncovou část dlouhou přibližně 120 aminokyselin, jejíž koncový glycin je myristylován.

Kapsida polyomavirů je stabilizována vápenatými ionty a disulfidickými vazbami. Sousední kapsomery jsou navzájem vázány C-koncovým ramenem VP1 proteinu.

3.4.2 Vstup do buňky

Polyomaviry se nejprve vážají na buňku pomocí interakcí s molekulami na jejím povrchu. Tato vazba zprostředkuje prvotní kontakt a je méně specifická než vazba na samotný receptor, pomocí kterého je virus internalizován. Ve většině případů se jedná o sialové kyseliny, které jsou součástí větších molekul. Pro myší polyomavirus (murine polyomavirus, MPyV) i lidský BK virus jsou to $\alpha(2,3)$ vázané sialové kyseliny, pro další lidský patogen JC virus $\alpha(2,3)$ nebo $\alpha(2,6)$ vázané sialové kyseliny (Cahan & Paulson 1980; Fried et al. 1981; Dugan et al. 2005). Polyomavirus karcinomu Merkelových buněk (Merkel cell polyomavirus, MCPyV) pro tyto účely vyžaduje glykosaminoglykany, pravděpodobně heparan sulfát (Schowalter et al. 2011). Patrně však také váže sialové kyseliny vázané na molekule svého receptoru (Erickson et al. 2009).

Receptory pro polyomaviry se liší, nejčastěji se však jedná o gangliosidy. Myší polyomavirus využívá jako receptor pro vstup do buňky gangliosidy GD1a a GT1b, receptorem pro SV40 je



Obrázek 3.8: Vizualizace částice SV40 na základě strukturních dat. Tmavě modrá barva označuje pentavalentní pentamery, světle modrá hexavalentní pentamery.

Převzato ze stránek University of California, Computer graphics laboratory (<http://www.cgl.ucsf.edu/Research/virus/capsids/viruses.html>).

GM1, BK virus využívá GD1b a GT1b a MCPyV GT1b gangliosid (Tsai et al. 2003; Qian & Tsai 2010; Low et al. 2006; Erickson et al. 2009). Narozdíl od této většiny JC virus používá $\alpha(2,6)$ vázanou sialovou kyselinu přichycenou k serotonin 5-TH(A2) receptoru (Elphick et al. 2004).

Už vazba viru na receptor má mnohé důsledky. Vazba MPyV na sialovou kyselinu indukuje konformační změny virové kapsidy, z formy citlivé na proteázy do formy rezistentní, které mohou ovlivnit a nejspíše ovlivňují další kroky infekce (Cavaladesi et al. 2004). Dále pouhá vazba SV40 na GM1 je postačující k vytvoření zakřivení na membráně a hlubokých invaginací (Ewers et al. 2010). Receptor má také vliv i na pozdější pohyb viru v buňce a jeho zacílení (viz níže).

SV40 a BK virus používají endocytózu závislou na kaveolinu, naproti tomu infekce MPyV účinně probíhá i bez jeho účasti (Anderson et al. 1996; Eash et al. 2004; Gilbert & Benjamin 2004; Liebl et al. 2006). JC virus opět tvoří výjimku a používá klatrinový mechanismus (Pho et al. 2000; Querbes et al. 2004).

3.4.3 Pohyb uvnitř buňky

Putování polyomavirů uvnitř buňky je opředeno mnohými záhadami. Výzkum ztěžuje mimo jiné fakt, že mezi jednotlivými cestami po endocytóze existují různá propojení. Pro naše účely, tedy pochopení cesty virů do jádra, se soustředíme spíše na obecné principy a vyžadované faktory.

Polyomaviry procházejí mnohými buněčnými kompartmenty. Nakonec se dostávají do endoplazmatického retikula. Cesta k tomuto cíli ale není úplně jasná. K tomuto pohybu vyžadují neporušenou funkci mikrotubulů (Gilbert & Benjamin 2004; Pelkmans et al. 2001; Eash & Atwood 2005).

Pro SV40 bylo popsáno, že z váčků odvozených z kaveol, obsahujících kaveolin 1, putují viriony do kaveozomu, nové objevené organely (Pelkmans et al. 2001). Existence kaveozomů velice dobře zapadla i do představ o pohybu dalších polyomavirů v buňce a byla vřele přijata. Například putování přes kaveozomy bylo také ukázáno u JC viru (Querbes et al. 2006). O několik let později byla existence kaveozomu vyvrácena (Hayer et al. 2010). Následně byla cesta SV40 přehodnocena a další práce ukázaly, že prochází časnými i pozdními endozomy a vyžaduje okyselení endozomů (Engel et al. 2011).

Myší polyomavirus nalézáme v časných, recyklujících i pozdních endozomech. Jeho putování do ER je závislé na okyselení endozomu (Liebl et al. 2006; Mannova & Forstova 2003; Qian et al. 2009). Myší polyomavirus může sloužit jako ukázka toho, že i receptory z povrchu buňky mohou mít významný vliv na pohyb viru v buňce. Qian et al. (2009) ukázali, že vazba na GD1a podporuje cílení viru do ER. Později bylo popsáno, že glykoproteiny (obsahující kyselinu sialovou) mají na infekci myšího polyomaviru opačný vliv a podporují jeho transport do jiných kompartmentů, než je ER (Qian & Tsai 2010).

3.4.4 Únik z endoplazmatického retikula

Přesun genomu polyomavirů z endoplazmatického retikula (ER) do nukleoplazmy není zatím příliš dobře vysvětlen a popsán. Současné znalosti podporují následující schéma. V ER virová partikule prochází dramatickou proměnou, která jí dovolí z tohoto kompartmentu uniknout. Mění se disulfidické vazby, které jinak přispívají ke stabilitě kapsidy. Virová částice se rozvolňuje a získává afinitu k membránám. Tyto změny pak umožní polyomavirům opustit ER.

Samotná přímá lokalizace polyomavirů v ER možná nebyla ukázána příliš důkladně, existuje ale mnoho důkazů o interakci polyomavirů s proteiny ER a o jejich potřebě dalších faktorů v ER obsažených. Často přitom inhibice těchto faktorů způsobí, že virus není schopen přesunu genomu do jádra.

Polyomaviry během svého pobytu v ER podstupují značnou změnu disulfidických vazeb, což má pochopitelně značný vliv na podobu kapsidy. Konkrétní proteiny, které jsou za tyto změny zodpovědné, se mezi druhy polyomavirů liší.

Vliv disulfidických izomeráz ER

Existují důkazy, že protein ERp29, který má funkci podobnou protein disulfid izomeráze (PDI), způsobuje expozici C-konce VP1 proteinu MPyV. Tato část VP1 je přitom zodpovědná za interakce v rámci pentameru i mezi nimi. Působení frakce ER obohacené proteinem ERp29 dále vede k utvoření částice, která je více hydrofobní, snáze se váže k lipidové membráně a dokáže ji perforovat. Schopnost proděravět membránu je přitom připisována proteinu VP2, který je v průběhu této změny exponován (Magnuson et al. 2005; Rainey-Barger et al. 2007, 2009). Virové částice byly vystaveny frakci ER bohaté na ERp29, nikoli čistému proteinu, proto se na některých změnách mohly podílet i jiné proteiny ER. Tyto výsledky nám ale mohou dát užitečnou představu o tom, v jakém stavu se v ER virová částice nachází.

Další výzkum našel další členy z PDI rodiny, které se na infekci myšího polyomaviru podílí. Jsou to proteiny ERp57, PDI a ERp72. Dále bylo ukázáno, že alkylovaný virus není infekční. Protože alkylace zruší cysteinové můstky, lze z toho odvodit, že disulfidické můstky hrají v životním cyklu polyomaviru důležitou roli (Walczak & Tsai 2011).

V životním cyklu SV40 mají svou roli izomerázy ERp57 a PDI. Podle práce Schelhaas et al. (2007) jimi indukovaná změna disulfidických vazeb vede částečnému uvolnění dvanácti ze 72 pentamer. Těchto dvanáct pentamer se uvolňují z virionu při nízké hladině vápenatých iontů.

Autoři této práce navrhuji, že virion se v ER takto destabilizuje, a v cytoplazmě, kde je

nízká hladina vápenatých iontů, se uvolní 12 pentamerů a virová částice se rozbalí úplně. Tato představa je vcelku opodstatněná, ačkoliv ve skutečnosti nemusí hrát rozvolňující roli přesně tyto proteiny. Disulfidické můstky i vápenaté ionty kapsidu stabilizují, izomerace cysteinových vazeb kapsidy je doložena (Inoue & Tsai 2011; Schelhaas et al. 2007; Walczak & Tsai 2011) a hladina vápenatých iontů bude po úniku z ER nízká, ať už poté virus vstupuje do cytoplazmy nebo přímo do jádra. Přitom existují důkazy, že by se virová částice mohla dostávat do cytoplazmy téměř celá (viz níže).

Role minoritních proteinů v úniku z ER

Jak bylo naznačeno výše, na překonání membrány ER se pravděpodobně podílí minoritní kapsidové proteiny VP2 a VP3. Oba tyto proteiny jsou skryty pod proteinovým obalem kapsidy a pravděpodobně se objevuje jejich část na povrchu až po rozvolnění virové částice v ER. Oba minoritní proteiny lze detekovat v době, kdy se většina virového signálu nachází ER, jejich expozice je pravděpodobně spřažená se změnami kapsidy v tomto kompartmentu (Norkin et al. 2002; Magnuson et al. 2005). Během časně fáze infekce VP2 patrně zpřístupní svůj N-konec (Geiger et al. 2011).

Při samostatné expresi mají minoritní proteiny schopnost vázat se na membrány, destabilizovat je a perforovat. Pokud se však v buňkách zároveň produkuje VP1 protein, VP2 a VP3 se přesunou spolu s ním do jádra a perforační efekt vymizí (Daniels et al. 2006; Forstova et al. 1993; Huerfano et al. 2010). Protein VP1 tedy reguluje působení VP2 a VP3. V kompletní kapsidě minoritní kapsidové proteiny jsou vázané v pentamerech, při rozvolnění kapsidy v ER by se mohly částečně nebo úplně uvolnit a permeabilizovat membránu pro virovou částici. Zároveň se podařilo získat důkaz, že VP2 a VP3 by mohly oligomerizovat (Daniels et al. 2006), mohly by tedy vytvořit pór membráně a tím ji destabilizovat. Permeabilizační účinek minoritních proteinů by se mohl spolu s dalšími mechanismy významně podílet na úniku virové částice z ER.

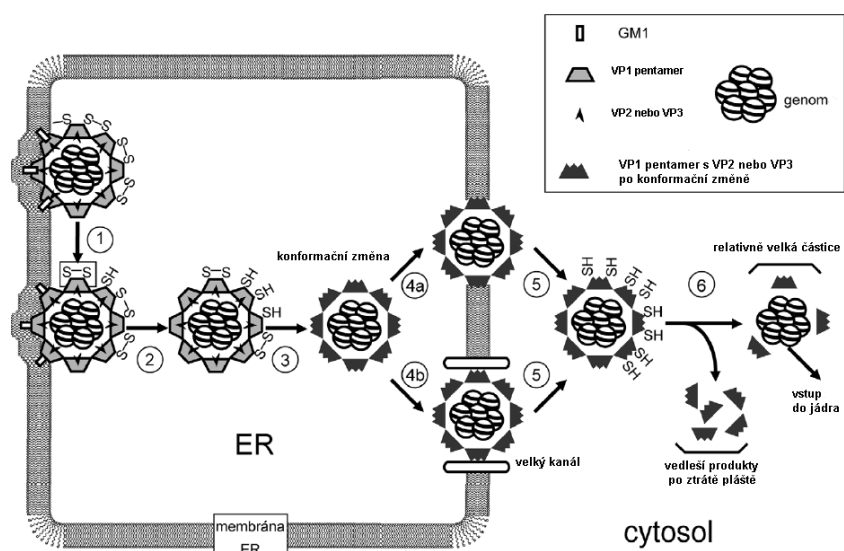
Úloha ERAD dráhy a chaperonů

Máme doklady o interakci polyomavirových částic s komponentami dráhy, která zajišťuje likvidaci proteinů z endoplazmatického retikula (endoplasmic reticulum associated degradation, ERAD). Celkově podporují model, kdy polyomavirová částice překonává membránu pomocí komponent této dráhy, nebo ty jí alespoň napomáhají.

Bylo popsáno, že MPyV v době, kdy se nachází v ER, vyžaduje protein derlin2, který se účastní translokace špatně sbalených proteinů ven z ER (Lilley et al. 2006).

Infekce SV40 je významně narušena při inhibici několika molekulárních kochaperonů typu DNAJ nebo jejich partnera BiP. Protein BiP je hlavní chaperon ER, patří do rodiny Hsp70 a figuruje v ERAD dráze. DNAJ proteiny patří do rodiny Hsp40 kochaperonů. Virová částice se při narušení funkce těchto proteinů sice rozvolní, ale nedokáže uniknout z ER (Goodwin et al. 2011).

SV40 dále pro infekci vyžaduje retrotranslokační proteiny derlin1 a Sel1L (Schelhaas et al. 2007) nebo membránový protein BAP31. Bylo pozorováno, že BiP a BAP31 kolokalizují s SV40.



Obrázek 3.9: Jeden z možných modelů penetrace SV40 z ER do cytoplazmy. SV40 vstupuje do ER vázán na GM1 receptor (1), od kterého se odloučí (2). V ER lumen prochází změnami disulfidických vazeb, které vyústí v konformační změny kapsidy (3). Ty jí umožní projít membránou ER, teoretické cesty zahrnují lipidickou dvouvrstvu (4a) nebo proteinový kanál (4b) a částice se ocitá v cytoplazmě (5). Virová částice pak v cytosolu odhazuje část proteinového pláště. Převzato a upraveno z Inoue & Tsai (2011).

Stejná práce si všímá i toho, že během infekce se exponuje N-konec VP2 a viriony bez VP2 nejsou schopny uniknout do cytosolu (Geiger et al. 2011). Při infekci BK viru hraje roli derlin1, se kterým byla i prokázána interakce (Jiang et al. 2009).

Přes všechny tyto důkazy o začlenění ERAD dráhy ale není jisté, zda se její komponenty přímo podílí na přesunu virového genomu z ER. Zatím nebyl navržen mechanismus, jakým by ERAD dráha mohla bezpečně přenést přes membránu tak velký substrát, jakým je celá virová částice nebo komplex genomu a dalších proteinů. Je třeba si také uvědomit, že jen u některých z výše zmíněných proteinů byla prokázána přímá interakce s virovou částicí. Navíc často zmiňované proteiny s chaperonovou aktivitou se nepodílí pouze na ERAD dráze a mohou přispívat infekci jiným mechanismem. Vyžadované ERAD a chaperonové proteiny se také mohou podílet na infekci nepřímo, například mohou zodpovídat za správné sbalení jiného proteinu, který se na úniku z ER podílí.

Podoba virové částice po úniku z ER

V dnešní době převažuje model, kdy se polyomavirus dostává z ER do cytoplazmy a odtud dále do jádra (viz níže). Vzezření virové částice, která se dostává do cytoplazmy, se daří odhalovat jen s částečným úspěchem. Kuksin & Norkin (2012) ukázali, že při infekci se DNA SV40 stává přístupná detekci nikoli v ER, ale až v cytoplazmě. Tyto částice v cytoplazmě si ponechávají část kapsidových proteinů, VP1, VP2 i VP3. Částečné rozvolnění kapsidy proběhne už v ER, VP2 a VP3 se vystavují na povrchu. To souhlasí s prací, která tvrdí, že SV40 překonává membránu ER i jako velká, celistvá částice (Inoue & Tsai 2011, obr. 3.9).

3.4.5 Vstup do jádra

Dnes panuje názor, že se polyomaviry dostávají do jádra z cytoplazmy přes jaderný pór. Tento model podporují početné výsledky experimentů, přesto však nelze tvrdit, že vstup polyomavirů do jádra je dobře prostudován. Každopádně doprava polyomavirové DNA do jádra je, podobně jako u jiných virů, neefektivní proces. Pouze malá část částic v tomto úkolu obstojí. Bylo pozorováno, že většina genomů skončí v cytoplazmě, kde je degradována (Mannova & Forstova 2003).

Podstatná část důkazů ohledně vstupu polyomavirů přes jaderný pór pochází z experimentů, kdy se virové částice injikují do cytoplazmy. Podle Nakanishi et al. (1996) protilátky proti kapsidovým proteinům VP1 a VP3 v cytoplazmě zabrání SV40 ve vstupu do jádra jak mikroinjikovaným částicím, tak viru, který podstupuje běžnou cestu infekce. Dále stejný efekt má i protilátka proti VP3 v buněčném jádře. Z toho lze soudit, že virový genom se dostává do jádra přes cytoplazmu, na procesech v cytoplazmě se podílejí kapsidové proteiny a do nukleoplazmy genom provází VP3.

U SV40 byly 2 h po mikroinjekci pozorovány strukturní proteiny v jádře, za těchto podmínek virus vstupuje do jádra přes jaderný pór a je schopen vyprodukovat virové potomstvo (Clever et al. 1991; Yamada & Kasamatsu 1993).

Tyto výsledky z mikroinjekčních studií dokazují, že pokud se kompletní virová částice dostane do cytoplazmy, je schopna zajistit doručení virové DNA do jádra. Nemůžeme si být jisti, že se ale v tomto nebo v podobném stavu skutečně do cytoplazmy dostává, tento jev může být nespecifickým vedlejším efektem. Samotné tyto studie nepostačují jako záruka toho, že polyomaviry dosahují nukleoplazmy přes jaderný pór, tuto teorii ale podporují další výzkumy.

Například tým Nakanishi et al. dále přinesl několik zajímavých poznatků. Ukázali, že DNA SV40 interaguje s importinem α i importinem β . Jednalo se o DNA z malého zlomku populace virových částic. Tyto rozvolněné částice byly o něco menší než virion, obsahovaly VP1 i VP3. Dále zjistili, že DNA virových částic bez VP2 a VP3 nebyla schopna interagovat s importiny. Na vstupu genomu SV40 do jádra se podílí interakce NLS VP3 s importinem $\alpha 2/\beta$ (Nakanishi et al. 2002, 2006, 2007).

Studie o JC viru část těchto výsledků potvrzují, na druhou stranu některé poznatky zcela neodpovídají zjištěním u SV40. Jednotlivé druhy polyomavirů tedy mohou zaujímat mírně odlišné strategie. Vstup JC viru do jádra v permeabilizovaných buňkách závisí na jaderném póru a na importinech α a β , což podporuje model o polyomavirovém vstupu přes jaderný pór. Interakce s importiny a zprostředkování vstupu do jádra ale bylo přisuzováno NLS na VP1 (Qu et al. 2004). Role minoritních proteinů v přesunu genomu do jádra tak zůstává poněkud sporná. Přinejmenším u některých druhů polyomavirů ale pravděpodobně svou roli mají.

Polyomavirová částice je příliš velká na to, aby mohla projít jaderným pórem celá. Ostatně výše zmíněné výzkumy spíše podporují model, kdy se virová částice alespoň částečně rozbálí v cytoplazmě. Naproti tomu starší publikace pozorují často pomocí elektronové mikroskopie téměř neporušené částice v jádře (Hummeler et al. 1970; Mackay & Consigli 1976). To ponechává prostor pro alternativní teorie, které nezahrnují přesun virové částice přes cytoplazmu.

Například by mohly uniknout z ER přes jaderný obal přímo do jádra. Dále by váčky obsahující virus mohly fúzovat s jaderným obalem, jak ukázali Griffith et al. 1988. Někteří výše zmínění autoři však přiznávají, že při použití jejich metod elektronové mikroskopie je někdy obtížné rozeznat artefakty nebo jiné buněčné komponenty od virové částice. Pochopitelně se snažili toto riziko různými způsoby minimalizovat, avšak tento fakt mluví ve prospěch spíše novějšího modelu.

4. Závěr

O cestě genomu malých neobalených virů do buněčného jádra máme velké množství dílčích poznatků. Přesto však zůstávají některé kroky v tomto putování opředeny tajemstvím. Existují modely, které tyto mezery v našich znalostech zdánlivě vyplňují a skvěle vysvětlují současná pozorování, nesmíme však zapomenout, že se jedná jen o návrhy a ne o dostatečně prokázaná fakta.

Nejlépe chrakterizovaná část časné fáze infekce virů, zahrnutých v této práci, je patrně vstup do buňky. O úniku z buněčných váčků máme často pouze částečnou představu, ačkoli většinou známe mnohé buněčné a virové faktory, které v tomto procesu hrají roli. Současná úroveň poznání nám nezdírá také nedává úplný obrázek toho, jakým způsobem genom těchto virů vstupuje do jádra, přestože na toto téma bylo získáno nemálo výsledků.

S těmito neduhy se ale většinou nesetkáváme u adenovirů. Z čeledi popsaných v této práci je doprava genomu do jádra nejlépe charakterizována právě u nich. Poté, co se částice ocitne v endozomu, odhazuje některé své proteiny a jiné procházejí konformačními změnami. Pomocí lytických proteinů adenovirová částice způsobí protržení membrány endozomu a ocitá se v cytoplazmě. Zde pak k pohybu směrem k jádru využívá mikrotubuly. Virová částice dále nasedá na jaderný pór, kde dochází k dalšímu rozvolňování kapsidy. To umožní transport adenovirového genomu v komplexu s dalšími proteiny do nukleoplazmy.

Parvovirové částice putují různými endozomálními kompartmenty a jejich prostředí indukuje konformační a proteolytické změny kapsidových proteinů. Parvoviry se pak dostávají do cytoplazmy pravděpodobně přes malé perforace v membráně, indukované kapsidovými proteiny. Pohyb virové částice k jádru zatím není dobře objasněn. Přestože je parvovirová částice dost malá na to, aby prošla jaderným pórem, je možné, že se do jádra dostává přes perforace v membráně, které sama způsobuje. Pro objasnění těchto posledních kroků v dopravě genomu do jádra budou třeba další studie.

Nejméně objasněná je doprava genomu papillomavirů, pravděpodobně kvůli obtížnosti jejich kultivace. Kapsida papillomavirů prochází komplexními změnami ještě na povrchu buňky. Přes veškeré dosud uskutečněné výzkumy jsou ale další kroky objasněny jen chabě, ačkoli známe některé interakční partnery kapsidy a známe úlohu kapsidových proteinů v daném kroku infekce. Kapsida se pravděpodobně dostává z endozomu do cytoplazmy a odtud neobjasněným mechanismem do jádra.

Polyomavirová časná fáze infekce se liší od výše zmíněných čeledí především tím, že se kapsidy dostávají do endoplazmatického retikula. Zde kapsida prochází komplexními změnami, které jí umožní z něj uniknout, pravděpodobně za spolupráce buněčných i virových proteinů. Existují náznaky, že virová částice se dále dostává do cytoplazmy a přes jaderný pór do jádra.

Tato práce podává ucelený pohled na současné znalosti, které se týkají dopravy genomů neobalených DNA virů do jádra. Je zřejmé, že v této oblasti máme již mnoho poznatků. Pro plné pochopení těchto jevů ale bude třeba tyto poznatky prohloubit a provést studie, které nám dovolí proniknout do dosud neobjasněných kroků časné fáze infekce těchto virů. Tyto znalosti mohou být použity k vytvoření nových terapeutických postupů pro patologické stavy, způsobené těmito viry.

4. Literatura

- Akache, B., Grimm, D., Shen, X., Fuess, S., Yant, S., Glazer, D., Park, J., and Kay, M., 2007, *A two-hybrid screen identifies cathepsins B and L as uncoating factors for adeno-associated virus 2 and 8*, *Molecular Therapy* **15**(2), 330
- Amstutz, B., Gastaldelli, M., Kalin, S., Imelli, N., Boucke, K., Wandeler, E., Mercer, J., Hemmi, S., and Greber, U., 2008, *Subversion of CtBP1-controlled macropinocytosis by human adenovirus serotype 3*, *EMBO Journal* **27**(7), 956
- Anderson, H., Chen, Y., and Norkin, L., 1996, *Bound simian virus 40 translocates to caveolin-enriched membrane domains, and its entry is inhibited by drugs that selectively disrupt caveolae*, *Mol Biol Cell* **7**(11), 1825
- Baker, T., Newcomb, W., Olson, N., Cowser, L., Olson, C., and Brown, J., 1991, *Structures of bovine and human papillomaviruses - analysis by cryoelectron microscopy and 3-dimensional image-reconstruction*, *Biophysical J* **60**(6), 1445
- Bantel-Schaal, U., Braspenning-wesch, I., and Kartenbeck, J., 2009, *Adeno-associated virus type 5 exploits two different entry pathways in human embryo fibroblasts*, *J Gen Virol* **90**, 317
- Bantel-Schaal, U., Hub, B., and Kartenbeck, J., 2002, *Endocytosis of adeno-associated virus type 5 leads to accumulation of virus particles in the Golgi compartment*, *J Virol* **76**(5), 2340
- Barlan, A., Griffin, T., McGuire, K., and Wiethoff, C., 2011, *Adenovirus Membrane Penetration Activates the NLRP3 Inflammasome*, *J Virol* **85**(1), 146
- Bartlett, J., Wilcher, R., and Samulski, R., 2000, *Infectious entry pathway of adeno-associated virus and adeno-associated virus vectors*, *J Virol* **74**(6), 2777
- Bienkowska-Haba, M., Patel, H., and Sapp, M., 2009, *Target Cell Cyclophilins Facilitate Human Papillomavirus Type 16 Infection*, *PLOS Pathogens* **5**(7)
- Boisvert, M., Fernandes, S., and Tijssen, P., 2010, *Multiple Pathways Involved in Porcine Parvovirus Cellular Entry and Trafficking toward the Nucleus*, *J Virol* **84**(15), 7782
- Bossis, L., Roden, R., Gambhira, R., Yang, R., Tagaya, M., Howley, P., and Meneses, P., 2005, *Interaction of tSNARE syntaxin 18 with the papillomavirus minor capsid protein mediates infection*, *J Virol* **79**(11), 6723
- Bousarghin, L., Touze, A., Sizaret, P., and Coursaget, P., 2003, *Human papillomavirus types 16, 31, and 58 use different endocytosis pathways to enter cells*, *J Virol* **77**(6), 3846
- Bremner, K., Scherer, J., Yi, J., Vershinin, M., Gross, S., and Vallee, R., 2009, *Adenovirus Transport via Direct Interaction of Cytoplasmic Dynein with the Viral Capsid Hexon Subunit*, *Cell Host & Microbe* **6**(6), 523
- Burckhardt, C., Suomalainen, M., Schoenenberger, P., Boucke, K., Hemmi, S., and Greber, U., 2011, *Drifting Motions of the Adenovirus Receptor CAR and Immobile Integrins Initiate Virus Uncoating and Membrane Lytic Protein Exposure*, *Cell Host & Microbe* **10**(2), 105
- Cahan, L. and Paulson, J., 1980, *Polyoma-virus adsorbs to specific sialoligosaccharide receptors on erythrocytes*, *Virology* **103**(2), 505
- Callan, H. and Tomlin, S., 1950, *Experimental studies on amphibian oocyte nuclei .1. Investigation of the structure of the nuclear membrane by means of the electron microscope*, *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* **137**(888), 367
- Cavaldesi, M., Caruso, M., Sthandier, O., Amati, P., and Garcia, M., 2004, *Conformational changes of murine polyomavirus capsid proteins induced by sialic acid binding*, *J Biol Chem* **279**(40), 41573
- Clever, J., Yamada, M., and Kasamatsu, H., 1991, *Import of simian virus-40 virions through nuclear-pore complexes*, *PNAS* **88**(16), 7333
- Cohen, S., Behzad, A., Carroll, J., and Pante, N., 2006, *Parvoviral nuclear import: bypassing the host nuclear-transport machinery*, *J Gen Virol* **87**(Part 11), 3209
- Cohen, S., Marr, A., Garcin, P., and Pante, N., 2011, *Nuclear Envelope Disruption Involving Host Caspases Plays a Role in the Parvovirus Replication Cycle*, *J Virol* **85**(10), 4863

- Cohen, S. and Pante, N., 2005, *Pushing the envelope: microinjection of Minute virus of mice into Xenopus oocytes causes damage to the nuclear envelope*, *J Gen Virol* **86(Part 12)**, 3243
- Cotmore, S., D'abramo, A., Ticknor, C., and Tattersall, P., 1999, *Controlled conformational transitions in the MVM virion expose the VP1 N-terminus and viral genome without particle disassembly*, *Virology* **254(1)**, 169
- Cronshaw, J., Krutchinsky, A., Zhang, W., Chait, B., and Matunis, M., 2002, *Proteomic analysis of the mammalian nuclear pore complex*, *J Cell Biol* **158(5)**, 915
- Culp, T., Budgeon, L., and Christensen, N., 2006a, *Human papillomaviruses bind a basal extracellular matrix component secreted by keratinocytes which is distinct from a membrane-associated receptor*, *Virology* **347(1)**, 147
- Culp, T., Budgeon, L., Marinkovich, M., Meneguzzi, G., and Christensen, N., 2006b, *Keratinocyte-secreted laminin 5 can function as a transient receptor for human papillomaviruses by binding virions and transferring them to adjacent cells*, *J Virol* **80(18)**, 8940
- Daniels, R., Rusan, N. M., Wilbuer, A. K., Norkin, L. C., Wadsworth, P., and Hebert, D. N., 2006, *Simian virus 40 late proteins possess lytic properties that render them capable of permeabilizing cellular membranes*, **80(13)**, 6575
- Darshan, M., Lucchi, J., Harding, E., and Moroianu, J., 2004, *The L2 minor capsid protein of human papillomavirus type 16 interacts with a network of nuclear import receptors*, *J Virol* **78(22)**, 12179
- Day, P., Baker, C., Lowy, D., and Schiller, J., 2004, *Establishment of papillomavirus infection is enhanced by promyelocytic leukemia protein (PML) expression*, *PNAS* **101(39)**, 14252
- Day, P., Garnbhira, R., Roden, R., Lowy, D., and Schiller, J., 2008, *Mechanisms of human papillomavirus type 16 neutralization by L2 cross-neutralizing and L1 type-specific antibodies*, *J Virol* **82(9)**, 4638
- Day, P., Lowy, D., and Schiller, J., 2003, *Papillomaviruses infect cells via a clathrin-dependent pathway*, *Virology* **307(1)**, 1
- Duan, D., Li, Q., Kao, A., Yue, Y., Pessin, J., and Engelhardt, J., 1999, *Dynamin is required for recombinant adeno-associated virus type 2 infection*, *J Virol* **73(12)**, 10371
- Dugan, A., Eash, S., and Atwood, W., 2005, *An N-linked glycoprotein with alpha-(2,3)-linked sialic acid is a receptor for BK virus*, *J Virol* **79(22)**, 14442
- Dworetzky, S. and Feldherr, C., 1988, *Translocation of RNA-coated gold particles through the nuclear-pores of oocytes*, *J Cell Biol* **106(3)**, 575
- Eash, S. and Atwood, W., 2005, *Involvement of cytoskeletal components in BK virus infectious entry*, *J Virol* **79(18)**, 11734
- Eash, S., Tavares, R., Stopa, E., Robbins, S., Brossay, L., and Atwood, W., 2004, *Differential distribution of the JC virus receptor-type sialic acid in normal human tissues*, *American J Pathol* **164(2)**, 419
- Elphick, G., Querbes, W., Jordan, J., Gee, G., Eash, S., Manley, K., Dugan, A., Stanifer, M., Bhatnagar, A., Kroeze, W., Roth, B., and Atwood, W., 2004, *The human polyomavirus, JCV, uses serotonin receptors to infect cells*, *Science* **306(5700)**, 1380
- Engel, S., Heger, T., Mancini, R., Herzog, F., Kartenbeck, J., Hayer, A., and Helenius, A., 2011, *Role of Endosomes in Simian Virus 40 Entry and Infection*, *J Virol* **85(9)**, 4198
- Engelke, M., Burckhardt, C., Morf, M., and Greber, U., 2011, *The Dynactin Complex Enhances the Speed of Microtubule-Dependent Motions of Adenovirus Both Towards and Away from the Nucleus*, *Viruses-Basel* **3(3)**, 233
- Erickson, K., Garcea, R., and Tsai, B., 2009, *Ganglioside GT1b Is a Putative Host Cell Receptor for the Merkel Cell Polyomavirus*, *J Virol* **83(19)**, 10275

- Ewers, H., Roemer, W., Smith, A., Bacia, K., Dmitrieff, S., Chai, W., Mancini, R., Kartenbeck, J., Chambon, V., Berland, L., Oppenheim, A., Schwarzmann, G., Feizi, T., Schwillle, P., Sens, P., Helenius, A., and Johannes, L., 2010, *GM1 structure determines SV40-induced membrane invagination and infection*, *Nature Cell Biol* **12**(1), 11
- Farr, G., Cotmore, S., and Tattersall, P., 2006, *VP2 cleavage and the leucine ring at the base of the fivefold cylinder control pH-dependent externalization of both the VP1 N terminus and the genome of minute virus of mice*, *J Virol* **80**(1), 161
- Farr, G. and Tattersall, P., 2004, *A conserved leucine that constricts the pore through the capsid fivefold cylinder plays a central role in parvoviral infection*, *Virology* **323**(2), 243
- Farr, G., Zhang, L., and Tattersall, P., 2005, *Parvoviral virions deploy a capsid-tethered lipolytic enzyme to breach the endosomal membrane during cell entry*, *PNAS* **102**(47), 17148
- Fay, A., Yutzy, W., Roden, R., and Moroianu, J., 2004, *The positively charged termini of L2 minor capsid protein required for bovine papillomavirus infection function separately in nuclear import and DNA binding*, *J Virol* **78**(24), 13447
- Feldherr, C., Kallenbach, E., and Schultz, N., 1984, *Movement of a eukaryotic protein through the nuclear-pore of oocytes*, *J Cell Biol* **99**(6), 2216
- Finnen, R., Erickson, K., Chen, X., and Garcea, R., 2003, *Interactions between papillomavirus L1 and L2 capsid proteins*, *J Virol* **77**(8), 4818
- Florin, L., Becker, K., Lambert, C., Nowak, T., Sapp, C., Strand, D., Streeck, R., and Sapp, M., 2006, *Identification of a dynein interacting domain in the papillomavirus minor capsid protein L2*, *J Virol* **80**(13), 6691
- Forstova, J., Krauzewicz, N., Wallace, S., Street, A., Dilworth, S., Beard, S., and Griffin, B., 1993, *Cooperation of structural proteins during late events in the life-cycle of polyomavirus*, *J Virol* **67**(3), 1405
- Fried, H., Cahan, L., and Paulson, J., 1981, *Polyoma-virus recognizes specific sialoligosaccharide receptors on host-cells*, *Virology* **109**(1), 188
- Gastaldelli, M., Imelli, N., Boucke, K., Amstutz, B., Meier, O., and Greber, U., 2008, *Infectious Adenovirus Type 2 Transport Through Early but not Late Endosomes*, *Traffic* **9**(12), 2265
- Geiger, R., Andrich, D., Friebe, S., Herzog, F., Luisoni, S., Heger, T., and Helenius, A., 2011, *BAP31 and BiP are essential for dislocation of SV40 from the endoplasmic reticulum to the cytosol*, *Nature Cell Biol* **13**(11), 1305
- Gilbert, J. and Benjamin, T., 2004, *Uptake pathway of polyomavirus via ganglioside GD1a*, *J Virol* **78**(22), 12259
- Giroglou, T., Florin, L., Schafer, F., Streeck, R., and Sapp, M., 2001, *Human papillomavirus infection requires cell surface heparan sulfate*, *J Virol* **75**(3), 1565
- Goodwin, E., Lipovsky, A., Inoue, T., Magaldi, T., Edwards, A., Van goor, K., Paton, A., Paton, J., Atwood, W., Tsai, B., and Dimaio, D., 2011, *BiP and Multiple DNAJ Molecular Chaperones in the Endoplasmic Reticulum Are Required for Efficient Simian Virus 40 Infection*, *MBIO* **2**(3)
- Greber, U. and Kasamatsu, H., 1996, *Nuclear targeting of SV40 and adenovirus*, *Trends Cell Biol* **6**(5), 189
- Greber, U., Suomalainen, M., Stidwill, R., Boucke, K., Ebersold, M., and Helenius, A., 1997, *The role of the nuclear pore complex in adenovirus DNA entry*, *EMBO Journal* **16**(19), 5998
- Grieger, J., Snowdy, S., and Samulski, R., 2006, *Separate basic region motifs within the adeno-associated virus capsid proteins are essential for infectivity and assembly*, *J Virol* **80**(11), 5199
- Griffith, G., Marriott, S., Rintoul, D., and Consigli, R., 1988, *Early events in polyomavirus*

- infection - fusion of monopinocytotic vesicles containing virions with mouse kidney-cell nuclei, Virus Research* **10(1)**, 41
- Hansen, J., Qing, K., and Srivastava, A., 2001, *Adeno-associated virus type 2-mediated gene transfer: Altered endocytic processing enhances transduction efficiency in murine fibroblasts, J Virol* **75(9)**, 4080
- Hayer, A., Stoeber, M., Ritz, D., Engel, S., Meyer, H., and Helenius, A., 2010, *Caveolin-1 is ubiquitinated and targeted to intralumenal vesicles in endolysosomes for degradation, J Cell Biol* **191(3)**, 615
- Hindley, C., Lawrence, F., and Matthews, D., 2007, *A role for transportin in the nuclear import of adenovirus core proteins and DNA, Traffic* **8(10)**, 1313
- Hindmarsh, P. and Laimins, L., 2007, *Mechanisms regulating expression of the HPV 31 L1 and L2 capsid proteins and pseudovirion entry, Virology Journal* **4**
- Hinshaw, J., Carragher, B., and Milligan, R., 1992, *Architecture and design of the nuclear-pore complex, Cell* **69(7)**, 1133
- Horvath, C., Boulet, G., Renoux, V., Delvenne, P., and Bogers, J.-P., 2010, *Mechanisms of cell entry by human papillomaviruses: an overview, Virology JOURNAL* **7**
- Huang, H.-S., Buck, C., and Lambert, P., 2010, *Inhibition of gamma secretase blocks HPV infection, Virology* **407(2)**, 391
- Hueffer, K., Palermo, L., and Parrish, C., 2004, *Parvovirus infection of cells by using variants of the feline transferrin receptor altering clathrin-mediated endocytosis, membrane domain localization, and capsid-binding domains, J Virol* **78(11)**, 5601
- Huerfano, S., Zila, V., Boura, E., Spanielova, H., Stokrova, J., and Forstova, J., 2010, *Minor capsid proteins of mouse polyomavirus are inducers of apoptosis when produced individually but are only moderate contributors to cell death during the late phase of viral infection, FEBS J* **277(5)**, 1270
- Hummeler, K., Tomassin, n., and Sokol, F., 1970, *Morphological aspects of uptake of simian virus 40 by permissive cells, J Virol* **6(1)**, 87
- Imelli, N., Meier, O., Boucke, K., Hemmi, S., and Greber, U., 2004, *Cholesterol is required for endocytosis and endosomal escape of adenovirus type 2, J Virol* **78(6)**, 3089
- Inoue, T. and Tsai, B., 2011, *A Large and Intact Viral Particle Penetrates the Endoplasmic Reticulum Membrane to Reach the Cytosol, Plos Pathogens* **7(5)**
- Ishii, Y., Tanaka, K., Kondo, K., Takeuchi, T., Mori, S., and Kanda, T., 2010, *Inhibition of nuclear entry of HPV16 pseudovirus-packaged DNA by an anti-HPV16 L2 neutralizing antibody, Virology* **406(2)**, 181
- Jiang, M., Abend, J., Tsai, B., and Imperiale, M., 2009, *Early Events during BK Virus Entry and Disassembly, J Virol* **83(3)**, 1350
- Joyce, J., Tung, J., Przysiecki, C., Cook, J., Lehman, E., Sands, J., Jansens, K., and Keller, P., 1999, *The L1 major capsid protein of human papillomavirus type 11 recombinant virus-like particles interacts with heparin and cell-surface glycosaminoglycans on human keratinocytes, J Biol Chem* **274(9)**, 5810
- Kamper, N., Day, P., Nowak, T., Selinka, H., Florin, L., Bolscher, J., Hilbig, L., Schiller, J., and Sapp, M., 2006, *A membrane-destabilizing peptide in capsid protein L2 is required for egress of papillomavirus genomes from endosomes, J Virol* **80(2)**, 759
- Karanam, B., Peng, S., Li, T., Buck, C., Day, P., and Roden, R., 2010, *Papillomavirus Infection Requires gamma Secretase, J Virol* **84(20)**, 10661
- Kelkar, S., Crystal, R., and Leopold, P., 2003, *Adenovirus binding triggers activation of cytoplasmic dynein, the molecular motor that drives adenovirus translocation to the nucleus,*

- Molecular Therapy* **7(5, Part 2)**, 13, 6th Annual Meeting of the American-Society-of-Gene-Therapy, WASHINGTON, D.C., JUN 04-08, 2003
- Kieback, E. and Muller, M., 2006, *Factors influencing subcellular localization of the human papillomavirus L2 minor structural protein*, *Virology* **345(1)**, 199
- Kines, R., Thompson, C., Lowy, D., Schiller, J., and Day, P., 2009, *The initial steps leading to papillomavirus infection occur on the basement membrane prior to cell surface binding*, *PNAS* **106(48)**, 20458
- Kondo, K., Ishii, Y., Ochi, H., Matsumoto, T., Yoshikawa, H., and Kanda, T., 2007, *Neutralization of HPV16, 18, 31, and 58 pseudovirions with antisera induced by immunizing rabbits with synthetic peptides representing segments of the HPV 16 minor capsid protein L2 surface region*, *Virology* **358(2)**, 266
- Kuksin, D. and Norkin, L., 2012, *Disassembly of Simian Virus 40 during Passage through the Endoplasmic Reticulum and in the Cytoplasm*, *J Virol* **86(3)**, 1555
- Laniosz, V., Dabydeen, S., Havens, M., and Meneses, P., 2009, *Human Papillomavirus Type 16 Infection of Human Keratinocytes Requires Clathrin and Caveolin-1 and Is Brefeldin A Sensitive*, *J Virol* **83(16)**, 8221
- Laniosz, V., Nguyen, K., and Meneses, P., 2007, *Bovine papillomavirus type 1 infection is mediated by SNARE syntaxin 18*, *J Virol* **81(14)**, 7435
- Lee, T., Blair, G., and Matthews, D., 2003, *Adenovirus core protein VII contains distinct sequences that mediate targeting to the nucleus and nucleolus, and colocalization with human chromosomes*, *J Gen Virol* **84(Part 12)**, 3423
- Leopold, P., Kreitzer, G., Miyazawa, N., Rempel, S., Pfister, K., Rodriguez-boulan, E., and Crystal, R., 2000, *Dynein- and microtubule-mediated translocation of adenovirus serotype 5 occurs after endosomal lysis*, *HUMAN Gene Therapy* **11(1)**, 151
- Liddington, R. C., 1991, *Structure of simian virus 40 at 3.8-Å resolution*, *Nature* **278**, 354
- Liebl, D., Difato, F., Horníková, L., Mannová, P., Štokrová, J., and Forstová, J., 2006, *Mouse polyomavirus enters early endosomes, requires their acidic pH for productive infection, and eets transferrin cargo in Rab11-positive endosomes*, **80(9)**, 4610
- Lilley, B., Gilbert, J., Ploegh, H., and Benjamin, T., 2006, *Murine polyomavirus requires the endoplasmic reticulum protein Derlin-2 to initiate infection*, *J Virol* **80(17)**, 8739
- Linser, P., Bruning, H., and Armentrout, R., 1977, *Specific binding-sites for a parvovirus, minute virus of mice, on cultured mouse cells*, *J Virol* **24(1)**, 211
- Liu, W., Gissmann, L., Sun, X., Kanjanahaluethai, A., Muller, M., Doorbar, J., and Zhou, J., 1997, *Sequence close to the N-terminus of L2 protein is displayed on the surface of bovine papillomavirus type 1 virions*, *Virology* **227(2)**, 474
- Liu, W., Qi, Y., Zhao, K., Liu, Y., Liu, X., and Frazer, I., 2001, *Association of bovine papillomavirus type 1 with microtubules*, *Virology* **282(2)**, 237
- Lombardo, E., Ramirez, J., Garcia, J., and Almendral, J., 2002, *Complementary roles of multiple nuclear targeting signals in the capsid proteins of the parvovirus minute virus of mice during assembly and onset of infection*, *J Virol* **76(14)**, 7049
- Low, J., Magnuson, B., Tsai, B., and Imperiale, M., 2006, *Identification of gangliosides GD1b and GT1b as receptors for BK virus*, *J Virol* **80(3)**, 1361
- Lupescu, A., Bock, C.-T., Lang, P., Aberle, S., Kaiser, H., Kandolf, R., and Lang, F., 2006, *Phospholipase A2 activity-dependent stimulation of Ca²⁺ entry by human parvovirus B19 capsid protein VP1*, *J Virol* **80(22)**, 11370
- Lux, K., Goerlitz, N., Schlemminger, S., Perabo, L., Goldnau, D., Endell, J., Leike, K., Kofler, D., Finke, S., Hallek, M., and Buning, H., 2005, *Green fluorescent protein-tagged adeno-*

- associated virus particles allow the study of cytosolic and nuclear trafficking, *J Virol* **79**(18), 11776
- Mabit, H., Nakano, M., Prank, U., Sam, B., Dohner, K., Sodeik, B., and Greber, U., 2002, *Intact microtubules support adenovirus and herpes simplex virus infections*, *J Virol* **76**(19), 9962
- Mackay, R. L. and Consigli, R. A., 1976, *Early events in polyoma virus infection: attachment, penetration, and nuclear entry*, **19**, 620–636
- Magnuson, B., Rainey, E., Benjamin, T., Baryshev, M., Mkrtchian, S., and Tsai, B., 2005, *ERp29 triggers a conformational change in polyomavirus to stimulate membrane binding*, *Mol Cell* **20**(2), 289
- Maier, O. and Wiethoff, C., 2010, *N-terminal alpha-helix-independent membrane interactions facilitate adenovirus protein VI induction of membrane tubule formation*, *Virology* **408**(1), 31
- Mamoor, S., Onder, Z., Karanam, B., Kwak, K., Bordeaux, J., Crosby, L., Roden, R., and Moroianu, J., 2012, *The high risk HPV16 L2 minor capsid protein has multiple transport signals that mediate its nucleocytoplasmic traffic*, *Virology* **422**(2), 413
- Mani, B., Baltzer, C., Valle, N., Almendral, J., Kempf, C., and Ros, C., 2006, *Low pH-dependent endosomal processing of the incoming parvovirus minute virus of mice virion leads to externalization of the VP1N-terminal sequence (N-VP1), N-VP2 cleavage, and uncoating of the full-length genome*, *J Virol* **80**(2), 1015
- Mannova, P. and Forstova, J., 2003, *Mouse polyomavirus utilizes recycling endosomes for a traffic pathway independent of COPI vesicle transport*, *J Virol* **77**(3), 1672
- Marusic, M., Ozbun, M., Campos, S., Myers, M., and Banks, L., 2012, *Human Papillomavirus L2 Facilitates Viral Escape from Late Endosomes via Sorting Nexin 17*, *Traffic* **13**(3), 455
- Mattaj, I. and Englmeier, L., 1998, *Nucleocytoplasmic transport: The soluble phase*, *Annual Review of Biochemistry* **67**, 265
- Mcguire, K., Barlan, A., Griffin, T., and Wiethoff, C., 2011, *Adenovirus Type 5 Rupture of Lysosomes Leads to Cathepsin B-Dependent Mitochondrial Stress and Production of Reactive Oxygen Species*, *J Virol* **85**(20), 10806
- Meier, O., Boucke, K., Hammer, S., Keller, S., Stidwill, R., Hemmi, S., and Greber, U., 2002, *Adenovirus triggers macropinocytosis and endosomal leakage together with its clathrin-mediated uptake*, *J Cell Biol* **158**(6), 1119
- Meyers, C., Frattini, M., Hudson, J., and Laimins, L., 1992, *Biosynthesis of human papillomavirus from a continuous cell-line upon epithelial differentiation*, *Science* **257**(5072), 971
- Miyazawa, N., Crystal, R., and Leopold, P., 2001, *Adenovirus serotype 7 retention in a late endosomal compartment prior to cytosol escape is modulated by fiber protein*, *J Virol* **75**(3), 1387
- Miyazawa, N., Leopold, P., Hackett, N., Ferris, B., Worgall, S., Falck-pedersen, E., and Crystal, R., 1999, *Fiber swap between adenovirus subgroups B and C alters intracellular trafficking of adenovirus gene transfer vectors*, *J Virol* **73**(7), 6056
- Morgan, C., Howe, C., Rose, H., and Moore, D., 1956, *Structure and development of Viruses observed in the electron microscope .4. Viruses of the RI-APC group*, *J Biophysical Biochem Cytol* **2**(3), 351
- Moyer, C., Wiethoff, C., Maier, O., Smith, J., and Nemerow, G., 2011, *Functional Genetic and Biophysical Analyses of Membrane Disruption by Human Adenovirus*, *J Virol* **85**(6), 2631
- Nakanishi, A., Clever, J., Yamada, M., Li, P., and Kasamatsu, H., 1996, *Association with capsid proteins promotes nuclear targeting of simian virus 40 DNA*, *PNAS* **93**(1), 96

- Nakanishi, A., Itoh, N., Li, P., Handa, H., Liddington, R., and Kasamatsu, H., 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*, *J Virol* **81**(8), 3778
- Nakanishi, A., Nakamura, A., Liddington, R., and Kasamatsu, H., 2006, *Identification of amino acid residues within simian virus 40 capsid proteins Vp1, Vp2, and Vp3 that are required for their interaction and for viral infection*, *J Virol* **80**(18), 8891
- Nakanishi, A., Shum, D., Morioka, H., Otsuka, E., and Kasamatsu, H., 2002, *Interaction of the Vp3 nuclear localization signal with the importin alpha-2/beta heterodimer directs nuclear entry of infecting simian virus 40*, *J Virol* **76**(18), 9368
- Nakano, M. and Greber, U., 2000, *Quantitative microscopy of fluorescent adenovirus entry*, *J Biol Chem* **129**(1), 57
- Nelson, L., Rose, R., Leroux, L., Lane, C., Bruya, K., and Moroianu, J., 2000, *Nuclear import and DNA binding of human papillomavirus type 45 L1 capsid protein*, *J Cell Biochem* **79**(2), 225
- Nemerow, G. and Stewart, P., 1999, *Role of alpha(v) integrins in adenovirus cell entry and gene delivery*, *MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY REVIEWS* **63**(3), 725+
- Nguyen, E., Nemerow, G., and Smith, J., 2010, *Direct Evidence from Single-Cell Analysis that Human alpha-Defensins Block Adenovirus Uncoating To Neutralize Infection*, *J Virol* **84**(8), 4041
- Norkin, L., Anderson, H., Wolfrom, S., and Oppenheim, A., 2002, *Caveolar endocytosis of Simian virus 40 is followed by brefeldin A-sensitive transport to the endoplasmic reticulum, where the virus disassembles*, *J Virol* **76**(10), 5156
- Pakkanen, K., Karttunen, J., Virtanen, S., and Vuento, M., 2008, *Sphingomyelin induces structural alteration in canine parvovirus capsid*, *Virus Research* **132**(1-2), 187
- Parker, J., Murphy, W., Wang, D., O'brien, S., and Parrish, C., 2001, *Canine and feline parvoviruses can use human or feline transferrin receptors to bind, enter, and infect cells*, *J Virol* **75**(8), 3896
- Parker, J. and Parrish, C., 2000, *Cellular uptake and infection by canine parvovirus involves rapid dynamin-regulated clathrin-mediated endocytosis, followed by slower intracellular trafficking*, *J Virol* **74**(4), 1919
- Pelkmans, L., Kartenbeck, J., and Helenius, A., 2001, *Caveolar endocytosis of simian virus 40 reveals a new two-step vesicular-transport pathway to the ER*, *Nature Cell Biol* **3**(5), 473
- Pho, M., Ashok, A., and Atwood, W., 2000, *JC virus enters human glial cells by clathrin-dependent receptor-mediated endocytosis*, *J Virol* **74**(5), 2288
- Pyeon, D., Pearce, S., Lank, S., Ahlquist, P., and Lambert, P., 2009, *Establishment of Human Papillomavirus Infection Requires Cell Cycle Progression*, *PLOS Pathogens* 5(2)
- Qian, M., Cai, D., Verhey, K., and Tsai, B., 2009, *A Lipid Receptor Sorts Polyomavirus from the Endolysosome to the Endoplasmic Reticulum to Cause Infection*, *PLOS Pathogens* 5(6)
- Qian, M. and Tsai, B., 2010, *Lipids and Proteins Act in Opposing Manners To Regulate Polyomavirus Infection*, *J Virol* **84**(19), 9840
- Qu, Q., Sawa, H., Suzuki, T., Semba, S., Henmi, C., Okada, Y., Tsuda, M., Tanaka, S., Atwood, W., and Nagashima, K., 2004, *Nuclear entry mechanism of the human polyomavirus JC virus-like particle - Role of importins and the nuclear pore complex*, *J Biol Chem* **279**(26), 27735
- Querbes, W., Benmerah, A., Tosoni, D., Di fiore, P., and Atwood, W., 2004, *A JC virus-induced signal is required for infection of glial cells by a clathrin- and eps15-dependent pathway*, *J Virol* **78**(1), 250
- Querbes, W., O'hara, B., Williams, G., and Atwood, W., 2006, *Invasion of host cells by JC*

- virus identities a novel role for caveolae in endosomal sorting of noncaveolar ligands*, *J Virol* **80**(19), 9402
- Rainey-Barger, E., Magnuson, B., and Tsai, B., 2007, *A chaperone-activated nonenveloped virus perforates the physiologically relevant endoplasmic reticulum membrane*, *J Virol* **81**(23), 12996
- Rainey-Barger, E., Mkrtchian, S., and Tsai, B., 2009, *The C-Terminal Domain of ERp29 Mediates Polyomavirus Binding, Unfolding, and Infection*, *J Virol* **83**(3), 1483
- Reichelt, R., Holzenburg, A., Buhle, E., Jarnik, M., Engel, A., and Aebi, U., 1990, *Correlation between structure and mass-distribution of the nuclear-pore complex and of distinct pore complex components*, *J Cell Biol* **110**(4), 883
- Ribbeck, K. and Gorlich, D., 2001, *Kinetic analysis of translocation through nuclear pore complexes*, *EMBO Journal* **20**(6), 1320
- Richards, R., Lowy, D., Schiller, J., and Day, P., 2006, *Cleavage of the papillomavirus minor capsid protein, L2, at a furin consensus site is necessary for infection*, *PNAS* **103**(5), 1522
- Roberts, J., Buck, C., Thompson, C., Kines, R., Bernardo, M., Choyke, P., Lowy, D., and Schiller, J., 2007, *Genital transmission of HPV in a mouse model is potentiated by nonoxynol-9 and inhibited by carrageenan*, *Nature Medicine* **13**(7), 857
- Roden, R., Greenstone, H., Kirnbauer, R., Booy, F., Jessie, J., Lowy, D., and Schiller, J., 1996, *In vitro generation and type-specific neutralization of a human papillomavirus type 16 virion pseudotype*, *J Virol* **70**(9), 5875
- Roden, R., Kirnbauer, R., Jenson, A., Lowy, D., and Schiller, J., 1994, *Interaction of papillomaviruses with the cell-surface*, *J Virol* **68**(11), 7260
- Ros, C., Gerber, M., and Kempf, C., 2006, *Conformational changes in the VP1-unique region of native human parvovirus B19 lead to exposure of internal sequences that play a role in virus neutralization and infectivity*, *J Virol* **80**(24), 12017
- Rossi, J., Gissmann, L., Jansen, K., and Muller, M., 2000, *Assembly of human papillomavirus type 16 pseudovirions in *Saccharomyces cerevisiae**, *Human Gene Therapy* **11**(8), 1165
- Rout, M., Aitchison, J., Suprapto, A., Hjertaas, K., Zhao, Y., and Chait, B., 2000, *The yeast nuclear pore complex: Composition, architecture, and transport mechanism*, *J Cell Biol* **148**(4), 635
- Rout, M. and Blobel, G., 1993, *Isolation of the yeast nuclear-pore complex*, *J Cell Biol* **123**(4), 771
- Sanlioglu, S., Benson, P., Yang, J., Atkinson, E., Reynolds, T., and Engelhardt, J., 2000, *Endocytosis and nuclear trafficking of adeno-associated virus type 2 are controlled by Rac1 and phosphatidylinositol-3 kinase activation*, *J Virol* **74**(19), 9184
- Saphire, A., Guan, T., Schirmer, E., Nemerow, G., and Gerace, L., 2000, *Nuclear import adenovirus DNA in vitro involves the nuclear protein import pathway and hsc70*, *J Biol Chem* **275**(6), 4298
- Schelhaas, M., Malmstrom, J., Pelkmans, L., Haugstetter, J., Ellgaard, L., Gruenewald, K., and Helenius, A., 2007, *Simian virus 40 depends on ER protein folding and quality control factors for entry into host cells*, *Cell* **131**(3), 516
- Schirmer, E. and Gerace, L., 2005, *The nuclear membrane proteome: extending the envelope*, *Trends in Biochemical Sciences* **30**(10), 551
- Schneider, M., Spoden, G., Florin, L., and Lambert, C., 2011, *Identification of the dynein light chains required for human papillomavirus infection*, *Cell Microbiol* **13**(1), 32
- Schowalter, R., Pastrana, D., and Buck, C., 2011, *Glycosaminoglycans and Sialylated Glycans Sequentially Facilitate Merkel Cell Polyomavirus Infectious Entry*, *PLOS Pathogens* **7**(7)

- Selinka, H., Giroglou, T., and Sapp, M., 2002, *Analysis of the infectious entry pathway of human papillomavirus type 33 pseudovirions*, *Virology* **299**(2), 279
- Selinka, H.-C., Florin, L., Patel, H., Freitag, K., Schmidtke, M., Makarov, V., and Sapp, M., 2007, *Inhibition of transfer to secondary receptors by heparan sulfate-binding drug or antibody induces noninfectious uptake of human papillomavirus*, *J Virol* **81**(20), 10970
- Seth, P., 1994, *Mechanism of Adenovirus-Mediated Endosome Lysis - Role of the Intact Adenovirus Capsid Structure*, *Biochem and Biophysical Research Communications* **205**(2), 1318
- Smith, J., Campos, S., and Ozbun, M., 2007, *Human papillomavirus type 31 uses a caveolin 1- and dynamin 2-mediated entry pathway for infection of human keratinocytes*, *J Virol* **81**(18), 9922
- Smith, J., Campos, S., Wandinger-ness, A., and Ozbun, M., 2008, *Caveolin-1-dependent infectious entry of human papillomavirus type 31 in human keratinocytes proceeds to the endosomal pathway for pH-dependent uncoating*, *J Virol* **82**(19), 9505
- Smith, J., Silvestry, M., Lindert, S., Lu, W., Nemerow, G., and Stewart, P., 2010, *Insight into the Mechanisms of Adenovirus Capsid Disassembly from Studies of Defensin Neutralization*, *PLOS Pathogens* 6(6)
- Sonntag, F., Bleker, S., Leuchs, B., Fischer, R., and Kleinschmidt, J., 2006, *Adeno-associated virus type 2 capsids with externalized VP1/VP2 trafficking domains are generated prior to passage through the cytoplasm and are maintained until uncoating occurs in the nucleus*, *J Virol* **80**(22), 11040
- Spoden, G., Freitag, K., Husmann, M., Boller, K., Sapp, M., Lambert, C., and Florin, L., 2008, *Clathrin- and Caveolin-Independent Entry of Human Papillomavirus Type 16-Involvement of Tetraspanin-Enriched Microdomains (TEMs)*, *Plos One* 3(10)
- Strunze, S., Trotman, L., Boucke, K., and Greber, U., 2005, *Nuclear targeting of adenovirus type 2 requires CRM1-mediated nuclear export*, *Mol Biol Cell* **16**(6), 2999
- Suikkanen, S., Antila, M., Jaatinen, A., Vihinen-ranta, M., and Vuento, M., 2003, *Release of canine parvovirus from endocytic vesicles*, *Virology* **316**(2), 267
- Suomalainen, M., Nakano, M., Boucke, K., Keller, S., and Greber, U., 2001, *Adenovirus-activated PKA and p38/MAPK pathways boost microtubule-mediated nuclear targeting of virus*, *EMBO Journal* **20**(6), 1310
- Trotman, L., Mosberger, N., Fornerod, M., Stidwill, R., and Greber, U., 2001, *Import of adenovirus DNA involves the nuclear pore complex receptor CAN/Nup214 and histone H1*, *Nature Cell Biol* **3**(12), 1092
- Trus, B., Roden, R., Greenstone, H., Vrhel, M., Schiller, J., and Booy, F., 1997, *Novel structural features of bovine papillomavirus capsid revealed by a three-dimensional reconstruction to 9 angstrom resolution*, *Nature Struct Biol* **4**(5), 413
- Tsai, B., Gilbert, J. M., Stehle, T., Lencer, W., Benjamin, T. L., and Rapoport, T. A., 2003, *Gangliosides are receptors for murine polyomavirus and SV40*, *EMBO* **22**, 4346
- Unckell, F., Streeck, R., and Sapp, M., 1997, *Generation and neutralization of pseudovirions of human papillomavirus type 33*, *J Virol* **71**(4), 2934
- Vanpouille, C., Deligny, A., Delehedde, M., Denys, A., Melchior, A., Lienard, X., Lyon, M., Mazurier, J., Fernig, D., and Allain, F., 2007, *The Heparin/Heparan sulfate sequence that interacts with cyclophilin B contains a 3-O-sulfated N-unsubstituted glucosamine residue*, *J Biol Chem* **282**(33), 24416
- Vihinen-Ranta, M., Kakkola, L., Kalela, A., Vilja, P., and Vuento, M., 1997, *Characterization of a nuclear localization signal of canine parvovirus capsid proteins*, *European J Biochem* **250**(2), 389

- Vihinen-Ranta, M., Kalela, A., Makinen, P., Kakkola, L., Marjomaki, V., and Vuento, M., 1998, *Intracellular route of canine parvovirus entry*, *J Virol* **72**(1), 802
- Vihinen-Ranta, M., Yuan, W., Weichert, W., Vuento, M., and Parrish, C., 2000, *The VP1N-terminal sequence of canine parvovirus is important for efficient cell infection.*, *Mol Biol Cell* **11**(S), 1516
- Volpers, C., Unckell, F., Schirmacher, P., Streeck, R., and Sapp, M., 1995, *Binding and internalization of human papillomavirus type-33 virus-like particles by eukaryotic cells*, *J Virol* **69**(6), 3258
- Walczak, C. and Tsai, B., 2011, *A PDI Family Network Acts Distinctly and Coordinately with ERp29 To Facilitate Polyomavirus Infection*, *J Virol* **85**(5), 2386
- Walkiewicz, M., Morral, N., and Engel, D., 2009, *Accurate single-day titration of adenovirus vectors based on equivalence of protein VII nuclear dots and infectious particles*, *J Virol Methods* **159**(2), 251
- Wang, K., Huang, S., Kapoor-munshi, A., and Nemerow, G., 1998, *Adenovirus internalization and infection require dynamin*, *J Virol* **72**(4), 3455
- Wickham, T., Mathias, P., Cheresch, D., and Nemerow, G., 1993, *Integrin-alpha-V-beta-3 and integrin alpha-V-beta-5 promote adenovirus internalization but not virus attachment*, *Cell* **73**(2), 309
- Wiethoff, C., Wodrich, H., Gerace, L., and Nemerow, G., 2005, *Adenovirus protein VI mediates membrane disruption following capsid disassembly*, *J Virol* **79**(4), 1992
- Wodrich, H., Cassany, A., D'angelo, M., Guan, T., Nemerow, G., and Gerace, L., 2006, *Adenovirus core protein pVII is translocated into the nucleus by multiple import receptor pathways*, *J Virol* **80**(19), 9608
- Wodrich, H., Henaff, D., Jammart, B., Segura-morales, C., Seelmeir, S., Coux, O., Ruzsics, Z., Wiethoff, C., and Kremer, E., 2010, *A Capsid-Encoded PPxY-Motif Facilitates Adenovirus Entry*, *PLOS Pathogens* 6(3)
- Xiao, W., Warrington, K., Hearing, P., Hughes, J., and Muzyczka, N., 2002, *Adenovirus-facilitated nuclear translocation of adeno-associated virus type 2*, *J Virol* **76**(22), 11505
- Yamada, M. and Kasamatsu, H., 1993, *Role of nuclear-pore complex in simian virus-40 nuclear targeting*, *J Virol* **67**(1), 119
- Yang, Q., Rout, M., and Akey, C., 1998, *Three-dimensional architecture of the isolated yeast nuclear pore complex: Functional and evolutionary implications*, *Mol Cell* **1**(2), 223
- Yang, R., Yutzy, W., Viscidi, R., and Roden, R., 2003, *Interaction of L2 with beta-actin directs intracellular transport of papillomavirus and infection*, *J Biol Chem* **278**(14), 12546