

**Dr n. biol. Małgorzata Bieńkowska-Haba**

### **Streszczenie wykładu**

#### **AUTOSTOPEM DO JĄDRA KOMÓRKOWEGO CZYLI MECHANIZMY ZAKAŻENIA WIRUSEM HPV16**

Podstawowym celem każdego wirusa jest bezpieczne dostarczenie genomu do miejsca jego replikacji w komórce gospodarza. W przypadku większości wirusów DNA miejscem tym jest jądro komórkowe. Wirusy nie są zdolne poruszać się na własny rachunek i aby to osiągnąć opracowały strategię koni trojańskich. Wykorzystują one liczne komórkowe mechanizmy w celu wniknięcia do komórki, transportu w pęcherzykach, przenikania przez błony, transportu przez cytoplazmę oraz importu do jądra. Około 300-400 białek komórkowych zostaje "oszukanych" aby przeprowadzić wirusa do miejsca, w którym przejmuje on kontrolę nad komórką. Wirusy brodawczaka ewoluowały wraz z gatunkami gospodarza przez miliony lat. Opracowały one odpowiednie strategie, aby nie tylko dostarczyć swój materiał genetyczny do jądra komórkowego, ale również skutecznie uniknąć rozpoznania wirusowego DNA przez system obronny komórki.

Wirusy brodawczaka ludzkiego (ang. Human Papilloma Virus – HPV) należą do rodziny *Papillomaviridae*. Są to małe, bezosłonkowe wirusy z kapsydem o ikozaedralnej symetrii oraz dwuniciowym, kolistym DNA. Wirusy te są gatunkowo specyficzne i wykazują tropizm do komórek nabłonka wielowarstwowego błon śluzowych i skóry gospodarza. Obecnie rodzina *Papillomaviridae* skupia kilkaset gatunków wirusów zakażających ssaki (w tym ponad 200 typów wirusa ludzkiego), ptaki i gady. Zazwyczaj HPV powodują samoograniczające się zmiany i łagodne nowotwory nabłonka płaskiego. Niekiedy jednak, zakażenia mogą wywoływać zmiany prowadzące do rozwoju nowotworów złośliwych, z których najczęstszym jest rak szyjki macicy. W obrębie papillomawirusów istnieją dwie główne grupy o różnym powinowactwie do miejsca zakażenia. Pierwsza, to typy „skórne” czyli wirusy, które mogą powodować różne rodzaje brodawek (kurzajek), takich jak brodawki pospolite, podeszwowe i płaskie, przy czym różne rodzaje brodawek związane są z różnymi szczepami HPV. Druga, to typy wirusów zakażających błony śluzowe okolic narządów płciowych i krtani. Przewlekłe zakażenia niektórymi wirusami z tej właśnie grupy mogą prowadzić do rozwoju nowotworów złośliwych. Obecnie szacuje się, że zakażenia

papillomawirusami odpowiedzialne są za ponad 5% wszystkich nowotworów złośliwych na świecie. Dotychczas zidentyfikowanych zostało kilkanaście typów HPV "wysokiego ryzyka" (HPV16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 i 68), które mogą powodować tworzenie się zmian złośliwych. Ocenia się, że HPV powoduje 100% przypadków raka szyjki macicy, 90% przypadków raka odbytu i 40% przypadków nowotworów zewnętrznych narządów płciowych (sromu, pochwy i prącia). Typy 16 i 18 uznane są za najbardziej niebezpieczne, gdyż są odpowiedzialne za aż około 70% przypadków raka szyjki macicy. Aktualnie obserwowany jest również wzrost liczby nowotworów jamy ustnej i gardła spowodowanych zakażeniem HPV. Pozostałe typy wirusa atakujące narządy płciowe człowieka określane są jako typy o niskim ryzyku onkogennym (HPV 6, 11, 40, 42, 43, 44, 53, 54, 61, 72, 73 i 81), bądź o nieznaney wysokości ryzyka. Wirusy te mogą powodować powstawanie brodawek narządów płciowych. Najczęściej występujące typy HPV6 i 11, odpowiedzialne są za około 90 procent brodawek narządów rodnych.

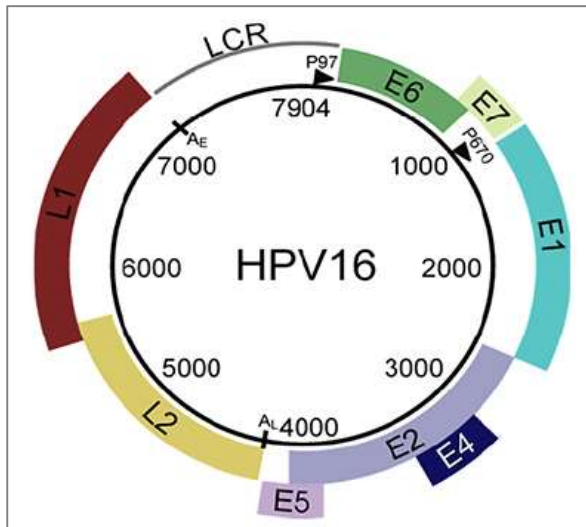
### **Szczepionki**

Szczepionki przeciwko HPV zostały wprowadzone w 2006 roku i są przeznaczone do stosowania zarówno u dziewcząt/młodych kobiet jak również chłopców/młodych mężczyzn. Najnowsza szczepionka (Gardasil 9) skierowana jest przeciwko dziewięciu typom HPV. Może (i powinna) być stosowana jako ochrona przed zmianami przednowotworowymi i nowotworami narządów płciowych i odbytu (HPV16, 18, 31, 33, 45, 52, 58) oraz brodawkami narządów płciowych (HPV 6, 11).

### **Budowa wirionu i organizacja genomu HPV16**

Wirion papillomawirusów ma średnicę około 55 nm. Kapsyd HPV 16 składa się z 360 kopii głównego białka kapsydu L1 i maksymalnie do 72 kopii mniejszego białka kapsydu L2. Białka L1 zorganizowane są w 72 pentamery (tzw. kapsomery) i pośredniczą w początkowym przyłączeniu wirusa do receptorów. Białko L2, które głównie ukryte jest w kapsydie, wymagane jest przede wszystkim do późniejszych etapów infekcji. Kapsyd chroni genom wirusa, którym jest kolistą cząsteczką dwuniciowego DNA (w przybliżeniu 8000 par zasad), zorganizowaną w strukturę podobną do chromatyny. Genom papillomawirusa można ogólnie podzielić na trzy główne regiony. Wczesny region składa się z genów odpowiedzialnych za transkrypcję i replikację wirusa oraz transformację nowotworową komórek gospodarza. Region późny koduje białka kapsydu, a długi region kontrolny zawiera elementy regulujące transkrypcję i replikację (LCR lub region niekodujący [NCR]). Przyjmuje

się, że podczas całego cyklu życiowego papillomawirusa w komórkach gospodarza produkowanych jest co najmniej 8 białek niestrukturalnych i dwa białka kapsydu.



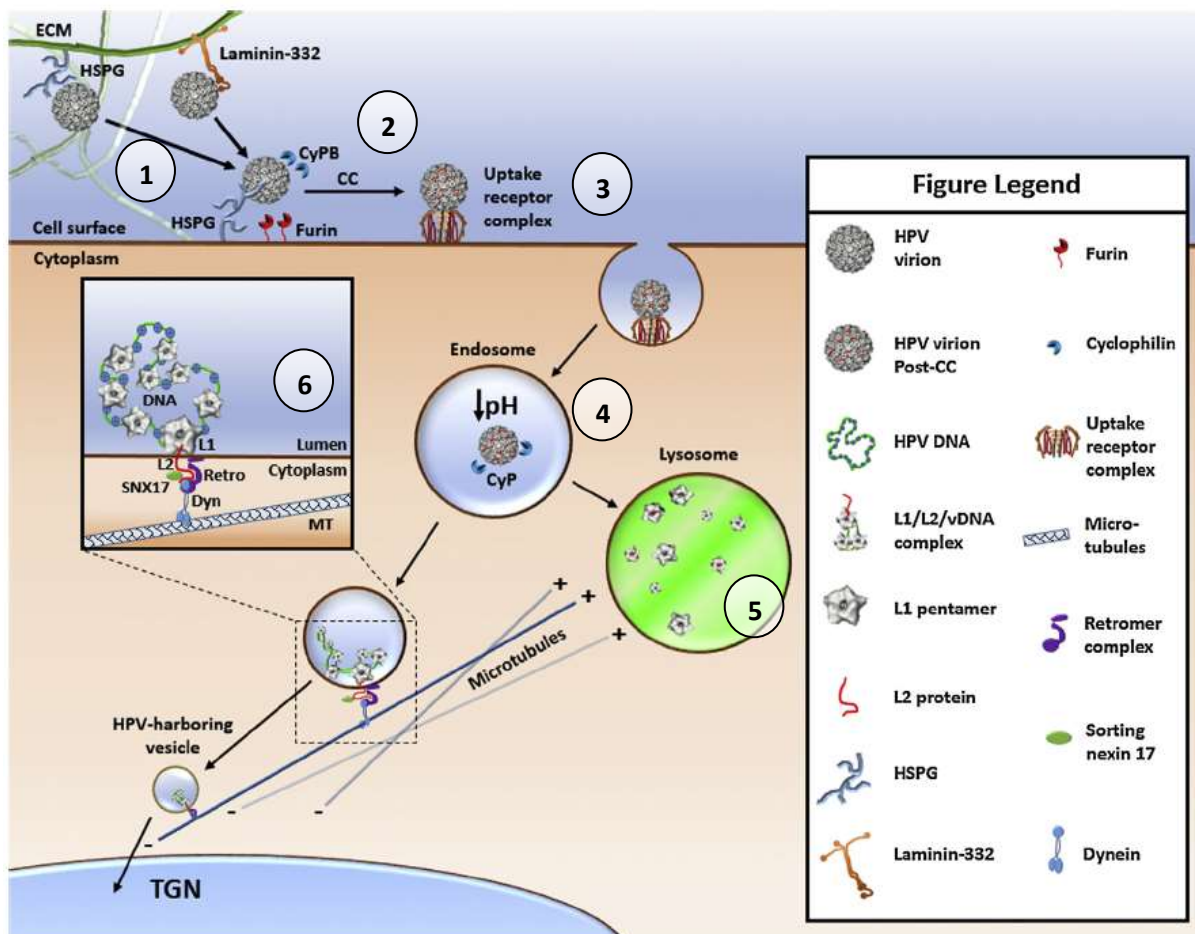
**Ryc. 1. Schemat genomu wirusa HPV16.**

LCR – długi region regulatorowy, E1-E7 – otwarte ramki odczytu kodujące białka wczesne wirusa, L1-L2 – otwarte ramki odczytu kodujące białka późne wirusa, AL – późne miejsca poliadenylacji, AE – wczesne miejsca poliadenylacji, P97 – wczesny promotor, P670 – późny promotor; numery zawarte w wewnętrznym okręgu wskazują pozycję nukleotydów

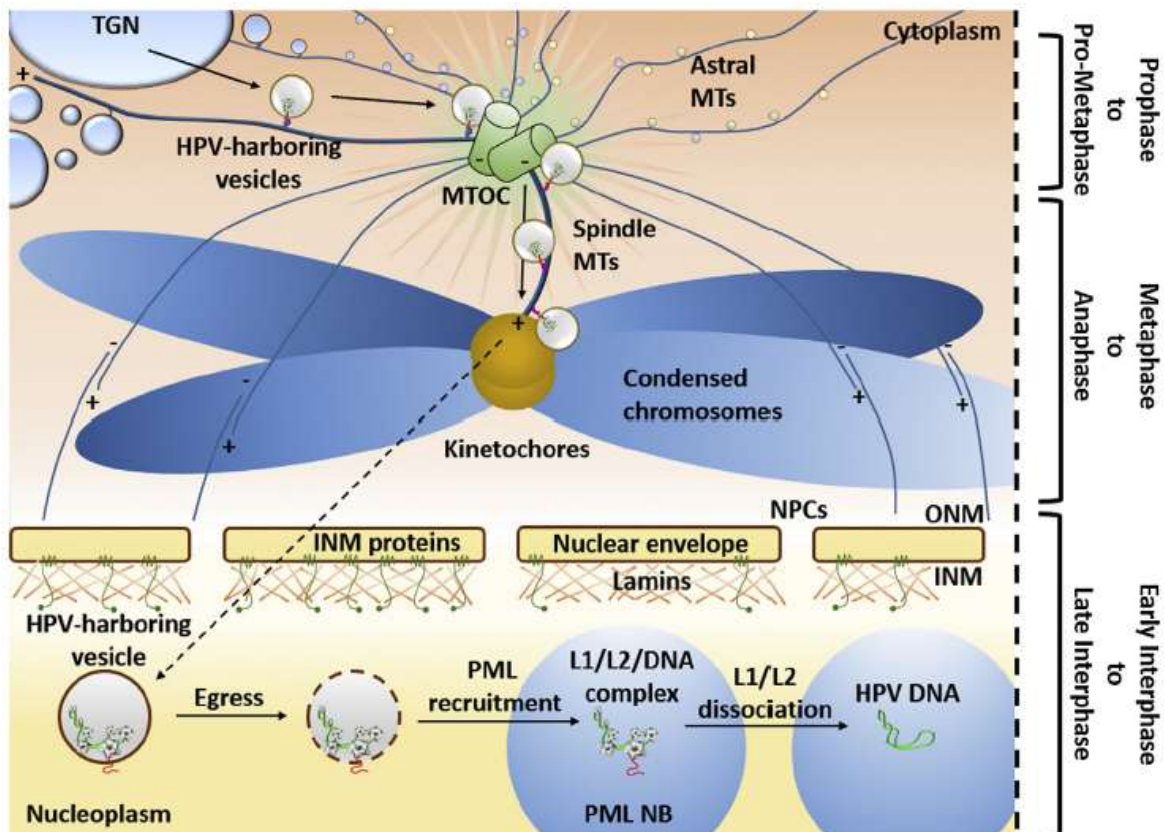
### Cykl życiowy HPV

Cykl życiowy HPV jest ściśle związany z różnicowaniem nabłonka. Ludzkie wirusy brodawczaka zakażają keratynocyty w warstwie podstawowej nabłonka, po jej wyeksponowaniu w wyniku mikrourazów. Po dostarczeniu wirusowego DNA do jądra komórkowego, dochodzi do początkowej amplifikacji genomu wirusa. Infekcja rozprzestrzenia się podczas podziałów komórkowych, którym towarzyszy powstawanie niewielkiej liczby kopii genomu wirusowego. W komórkach niezróżnicowanych ekspresja wczesnych białek wirusowych jest bardzo niska. Natomiast proces różnicowania zakażonych keratynocytów uruchamia wzmożoną ekspresję białek wirusa, co prowadzi do intensywnej amplifikacji jego genomu i ekspresji genów strukturalnych. Cykl produktywny wirusa kończy się upakowaniem wirusowego DNA do kapsydów wirionów potomnych w górnych warstwach nabłonka. Nowo powstałe wirusy uwalniane są z końcowo zróżnicowanych keratynocytów warstwy zrogowaciałej.

Przyłączenie wirionów HPV16 do komórki oraz poszczególne etapy transportu wewnątrzkomórkowego podczas zakażenia, które są głównym tematem wykładu, zostały przedstawione poniżej, w formie graficznej.



**Ryc. 2. Wczesne etapy zakażenia komórki wirusem HPV16 - od wiązania wirusa do receptorów do transportu do bieguna trans aparatu Golgiego.** 1) Wiriony HPV przyłączają się do proteoglikanów siarczanu heparanu (HSPGs) lub lamininy-332 obecnych na pozakomórkowej macierzy (ECM). Na powierzchni komórki wiriony wiążą się bezpośrednio do HSPG. 2) Związanie z receptorami uruchamia zmiany w konformacji (CC) obu białek kapsydu: L1 i L2. Cyklofilina B (CyPB) ułatwia odsłonięcie końca aminowego L2 i konwertaza furynowa odcina 12 aminokwasów od N-końca tego białka. 3) Wiriony HPV przyłączają się do receptora wychytującego i wraz z nim są internalizowane do wnętrza komórki. 4) Proces odpłaszczenia kapsydu wirusa jest zapoczątkowany w endosomie, a obecne w pęcherzykach cyklofiliny ułatwiają odseparowanie od siebie białek L1 i L2. 5) Większość białek L1 jest skierowana do lizosomów, gdzie zostają strawione. 6) Niewielka ilość kopii L1 pozostaje związana w kompleks z L2 i genomem wirusa. Znaczna część białka L2 penetruje wewnątrzkomórkowe błony i wchodzi w interakcje z czynnikami wymaganymi do transportu do bieguna trans aparatu Golgiego (TGN) (na podstawie DiGiuseppe et al, Virus Res. 2017).



**Ryc. 3. Transport wewnątrzkomórkowy HPV podczas mitozy.** Po rozpoczęciu procesu mitozy (profaza - pro-metafaza) pęcherzyki transportujące zawierające HPV16 odłączają się od bieguna trans aparatu Golgiego (TGN) i przemieszczają się wzdłuż mikrotubul (MTs), a następnie gromadzą się w sąsiedztwie centrosomu (MTOC). W późniejszych etapach mitozy (metafaza – anafaza) pęcherzyki z HPV16 przemieszczają się wzdłuż wrzeciona podziałowego mikrotubuli i pozostają w sąsiedztwie skondensowanych chromosomów komórki do zakończenia podziału. W tym czasie oba białka kapsydu pozostają w kompleksie z wirusowym DNA. Po zakończeniu mitozy, kiedy błona jądrowa zostaje odbudowana (wczesna- późna interfaza), DNA wirusa jest uwalnianie z pęcherzyków. Białka kapsydu odłączają się od siebie i genom wirusa łączy się z ciałkami PML (PML NBs). Przypisy nie opisane w tekście: błona jądrowa zewnętrzna (ONM); błona jądrowa wewnętrzna (INM); pory jądrowe (NPCs); (na podstawie DiGiuseppe et al, Virus Res. 2017)

Dokładne poznanie mechanizmów zakażenia wirusem HPV ma nie tylko istotne znaczenie w rozwoju profilaktyki i terapii chorób wywołanych przez te wirusy, ale może również stanowić cenne źródło wiedzy na temat biologii komórek gospodarza. Badania interakcji wirusa HPV z czynnikami komórkowymi pozwoliły zrozumieć m.in. mechanizmy regulujące cykl komórkowy a także doprowadziły do odkrycia nowego rodzaju endocytozy. Kontynuacja badań wyjaśniających w jaki sposób wirusy brodawczaka manipulują komórkami gospodarza może umożliwić odkrycie nowych, niescharakteryzowanych dotychczas procesów komórkowych.