

Received: 28.04.2017
Accepted: 19.12.2017
Published: 12.04.2018

Katepsyny: proteazy odporności wrodzonej regulujące wnikanie wirusów do komórek gospodarza*

Cathepsins: innate immune proteases that regulate viral entry into host cells

Magdalena Bossowska-Nowicka¹, Felix N. Toka^{1,2}, Matylda Mielcarska¹, Lidia Szulc-Dąbrowska¹

¹Zakład Immunologii, Katedra Nauk Przedklinicznych, Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

²Department of Biomedical Sciences, Ross University School of Veterinary Medicine, St. Kitts, West Indies

Keywords:

Streszczenie

Katepsyny są grupą proteaz endolizosomalnych, które regulują mechanizmy odporności wrodzonej i nabytej, włączając adhezję i migrację komórek, przetwarzanie i prezentację antygenów oraz oporność na liczne zakażenia wirusowe. Niektóre katepsyny są odpowiedzialne za proteolityczne cięcie receptorów Toll-podobnych (TLR)3, TLR7 i TLR9 oraz powstawanie ich funkcjonalnych wariantów, uczestniczących w rozpoznawaniu wirusowych kwasów nukleinowych. Ponadto katepsyny bezpośrednio stymulują lub hamują wydzielanie cytokin, zaangażowanych w regulację wrodzonej odpowiedzi przeciwwirusowej. W niedawnych badaniach podkreślano ważną rolę katepsyn we wnikaniu filowirusów, reowirusów, retrowirusów oraz innych wirusów do wnętrza komórek gospodarza. Liczne wirusy osłonkowe wymagają obecności katepsyn do skutecznej fuzji z błonami zakażonej komórki, a zahamowanie ich aktywności znacznie obniża wydajność wirusowej replikacji. Wirusy wykorzystują konserwatywne mechanizmy komórkowe do skutecznej penetracji do wnętrza komórki, takie jak endocytoza lub niskie pH wewnątrz endosomów, demontażu kapsydu oraz innych etapów produktywnego cyklu replikacyjnego. Dlatego lepsze zrozumienie funkcjonalnej roli katepsyn w patogenezie zakażeń wirusowych powinno się przyczynić do rozwoju nowych metod terapii w zwalczaniu patogenów szczególnie groźnych dla człowieka.

Słowa kluczowe:

katepsyny • wnikanie wirusów • endocytoza • lizosomy

Summary

Cathepsins are group of endolysosomal proteases that regulate the mechanisms of innate and adaptive immunity, including cell adhesion and migration, antigen processing and presentation and resistance to several viral infections. Some cathepsins are required for Toll-like receptor (TLR)3, TLR7 and TLR9 cleavage and the formation of functional receptors that participate

*Praca powstała w ramach projektu nr KNOW2016/CB/ESR3/3 finansowanego ze środków dotacji KNOW Konsorcjum „Zdrowe Zwierzę - Bezpieczna Żywność”, Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego decyzją nr 05-1/KNOW2/2015 oraz grantu nr UMO-2012/05/D/NZ6/02916 Narodowego Centrum Nauki w Krakowie (dla L.S.D.).

	in sensing viral nucleic acids. Moreover, cathepsins directly stimulate or inhibit cytokine secretion involved in the regulation of antiviral innate immune response. Recent findings underline the important role of cathepsins in the entry of filoviruses, reoviruses, retroviruses and other types of viruses into the host cell. Many enveloped viruses require the presence of cathepsins for efficient fusion with membranes of infected cells, and the inhibition of their activity results in a significant reduction of virus replication. In addition, many viruses utilize conserved cellular mechanisms, such as endocytosis or low pH within the endosome, for efficient penetration into the cell interior, disassembly of viral capsid, and other stages of productive viral replication cycle. Therefore, a better understanding of the functional role of cathepsin proteases in the pathogenesis of viral infections should lead to the development of novel therapeutics for a variety of particularly dangerous human pathogens. cathepsins • viral entry • endocytosis • lysosomes
GICID: DOI: Word count: Tables: Figures: References:	01.3001.0011.7519 10.5604/01.3001.0011.7519 6798 1 1 87

Adres autorki:

dr n. wet. Lidia Szulc-Dąbrowska, Zakład Immunologii, Katedra Nauk Przedklinicznych, Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie, ul. Ciszewskiego 8, 02-786 Warszawa; e-mail: lidia_szulc@sggw.pl

Wykaz skrótów:

AEP – endopeptydaza asparaginianowa (asparagine endopeptidase); **AIDS** – zespół nabytego niedoboru odporności (acquired immune deficiency syndrome); **APC** – komórka prezentująca antygen (antigen presenting cell); **DC** – komórka dendrytyczna (dendritic cell); **ECTV** – wirus ektromelii (ectromelia virus); **EBOV** – wirus Ebola (Ebola virus); **GP** – glikoproteina (glycoprotein); **HIV** – ludzki wirus niedoboru odporności (human immunodeficiency virus); **HTLV** – wirus białaczki limfocytów T (human T-cell leukemia virus); **HSV** – wirus opryszczki pospolitej (herpes simplex virus); **IFN** – interferon (interferon); **IL** – interleukina (interleukin); **ISVP** – pośrednia cząstka subwironowa (intermediate subviral particles); **LPS** – lipopolisacharyd (lipopolysaccharide); **MARV** – wirus Marburg (Marburg virus); **MCMV** – myszy cytomegalowirus (murine cytomegalovirus); **MLV** – myszy wirus białaczki (murine leukemia virus); **MyD88** – mieloidalny czynnik różnicowania 88 (myeloid differentiation factor 88); **NK** – naturalny zabójca (natural killer); **PAMP** – molekularny wzorzec związany z patogenami (pathogen-associated molecular pattern); **PGN** – peptydoglikan (peptidoglycan); **poly(I:C)** – kwas poliribonukleotydowy; **poly(I:C)** – kwas poliribonukleotydowy (polyinosinic-polycytidylic acid); **PRR** – receptor rozpoznający wzorce (pattern recognition receptor); **RPE** – komórki nabłonka barwnikowego siatkówki (retinal pigment epithelial cells); **STLR9** – rozpuszczalna postać TLR9 (soluble TLR9); **TLR** – receptor Toll-podobny (Toll-like receptor); **TNF** – czynnik martwicy nowotworu (tumor necrosis factor) **VSV** – wirus pęcherzykowego zapalenia jamy ustnej (vesicular stomatitis virus).

WSTĘP

Proteazy to enzymy znajdujące się w lizosomach, które biorą udział nie tylko w hydrolizie wiązań peptydowych w łańcuchu polipeptydowym, ale są zaangażowane również w wiele ważnych fizjologicznych procesów komórkowych, takich jak proliferacja i różnicowanie się komórek, przemiany tkanki chrzęstnej i kostnej czy apoptoza. Ich udział opisano także w procesach patologicznych, jak progresja nowotworów, zapalenie i neurodegeneracja [7,44,49,78]. Ponadto proteazy kontrolują główne funkcje wrodzonej i nabytej odpowiedzi immunologicz-

nej, takie jak: adhezja i migracja komórek, przetwarzanie i prezentacja antygeny limfocytom T oraz regulują oporność na zakażenia bakteryjne i wirusowe [63].

Spośród licznych peptydaz zaangażowanych w fizjologiczne oraz patologiczne procesy odpowiedzi immunologicznej największą uwagę naukowców w ciągu ostatnich lat zwróciły katepsyny cysteinowe. Nazwa katepsyna, służąca do określenia enzymu proteolitycznego aktywnego w lekko kwaśnym pH, pochodzi od greckiego słowa *kathepsin*, oznaczającego trawic [79]. Do rodziny katepsyn należą katepsyny A, B, C, D, E, F, G, H, L, K, O,

S, V, W oraz X. Katepsyny B, C, F, H, L, K, O, S, V, W i X są proteazami cysteinowymi z rodziny papainy i tworzą największą i najbardziej znaną klasę katepsyn. Natomiast katepsyny A i G należą do proteaz serynowych, a katepsyny D i E do proteaz asparaginianowych [75]. Katepsyny cysteinowe są szeroko rozpowszechnione u większości zwierząt. Poziom ekspresji tych białek, ich stosunek oraz swoistość różni się w zależności od umiejscowienia w komórce, co sugeruje, że poszczególne katepsyny pełnią bardzo swoiste funkcje komórkowe [15,79]. Niektóre z nich występują powszechnie w różnych komórkach i tkankach, natomiast inne, takie jak katepsyna F, K, O, S, X, V lub W znajdują się tylko w szczególnych typach komórek. Katepsyna K jest uwalniana przez osteoklasty podczas resorpcji kości, katepsynę O wykryto w ludzkich komórkach raka piersi, natomiast ekspresję katepsyny W zidentyfikowano w limfocytach T CD8⁺. Katepsyna V jest również enzymem swoistym dla tkanek i znajduje się w grasicy oraz jądrach, a katepsyny F i X występują bardziej powszechnie. Ponadto aby zapobiec niekontrolowanej aktywności proteolitycznej katepsyn, ich aktywność jest ściśle regulowana przez cystatyny – endogenne inhibitory lizosomalnych proteaz cysteinowych na każdym poziomie ich biosyntezy, ze względu na duże stężenie w komórkach oraz zdolność do działania w środowisku kwaśnym [78]. Wszystkie katepsyny są syntetyzowane jako zymogeny. Przetwarzanie nieaktywnego proenzymu w katalitycznie aktywny enzym zwykle występuje w lizosomie za pomocą innych aktywnych proteaz, autokatalizy w odpowiednich warunkach, np. w niskim pH lub w obecności glikozaminoglikanów [15]. Jednak głównymi modulatorami aktywności katepsyn są cystatyny, endogenne inhibitory proteaz cysteinowych. Działanie cystatyn jest odwracalne, a ich aktywność na ogół jest nieswoista wobec poszczególnych katepsyn [49].

Katepsyny są produktami jednego genu, ale produkty białkowe mogą być polimorficzne w wyniku allelicznych wariantów genu, alternatywnego splicingu RNA i/lub modyfikacji potranslacyjnych [49]. Wielkość katepsyn wynosi około 30 kDa. Katepsyny występują w postaci monomerów, z wyjątkiem tetramerycznej katepsyny C. Wszystkie katepsyny charakteryzują się podobną sekwencją aminokwasów (tabela 1), są zbudowane z łańcucha ciężkiego i lekkiego, połączonych wiązaniem dwusiarczkowym i występują w postaci jedno- lub dwułańcuchowej w zależności od gatunku. Białka te różnią się nieznacznie składem i długością aminokwasów, natomiast wszystkie z nich wykorzystują podobny mechanizm degradacji białka [79,87]. Łańcuch peptydowy składa się z dwóch domen nazwanych, podobnie jak w cząsteczce papainy, domeną L (left) i R (right). Domena L składa się z trzech struktur α -helikalnych, natomiast domena R jest zbudowana z wiązań peptydowych o motywie β -harmonijki tworząc strukturę spiralną. Między domenami obserwuje się szczelinę w kształcie litery V, a na jej dnie znajduje się centrum aktywne enzymu [33]. Interakcja między domenami ma charakter zarówno hydrofilowy, jak i hydrofobowy oraz jest swoista dla poszczególnych katepsyn [72].

Wśród katepsyn cysteinowych wyróżniono endopeptydazy (katepsyny D, E, F, G, K, L, S i V), które hydrolizują wiązania wewnątrz łańcucha peptydowego oraz egzopeptydazy (katepsyny A, C i X), które odszczepiają tylko aminokwasy na N- lub C-końcu łańcucha peptydowego. Katepsyna B oraz H mogą działać zarówno jako endopeptydazy, jak i egzopeptydazy. Wraz z odkrywaniem i charakterystyką nowych przedstawicieli proteaz cysteinowych możliwe stało się poznawanie ich roli zarówno w wyspecjalizowanych procesach fizjologicznych, jak

Tabela 1. Porównanie procentowe podobieństwa sekwencji aminokwasów wybranych ludzkich katepsyn cysteinowych

Nazwa katepsyny	B	C	F	H	K	L	O	S	W
B		19,84	12,801	21,485	19,582	19,685	21,081	20,779	19,759
C	19,84		20,893	23,176	19,958	21,702	17,094	19,789	19,4
F	12,801	20,893		23,984	21,272	23,077	20,612	20,122	24
H	21,485	23,176	23,984		38,551	36,311	38,551	33,239	26,823
K	19,582	19,958	21,272	38,551		49,112	26,286	54,192	25,521
L	19,685	21,702	23,077	36,311	49,112		25,915	47,181	25,521
O	21,081	17,094	20,612	38,551	26,286	25,915		27,586	24,611
S	20,779	19,789	20,122	33,239	54,192	47,181	27,586		24,235
W	19,759	19,4	24	26,823	25,521	25,521	24,611	24,235	

Porównanie procentowe podobieństwa sekwencji aminokwasów wykonano programem UniProt (sekwencje aminokwasów poszczególnych białek według bazy danych Gene Cards).

i patologicznych. Ze względu na to, iż katepsyny pełnią niezaprzeczalną rolę podczas replikacji i rozprzestrzeniania się wirusów oraz bakterii, stanowią istotny cel w przypadku leczenia wielu chorób, podczas których ich funkcja zostaje rozregulowana [9,76].

UDZIAŁ KATEPSYN W REGULACJI WRODZONEJ ODPOWIEDZI IMMUNOLOGICZNEJ

Mechanizmy odporności wrodzonej

Do najważniejszych mechanizmów wrodzonej odporności należy przede wszystkim wytwarzanie cytokin, chemokina oraz interleukina, nieswoiste zabijanie patogenów lub zakażonych komórek, a także fagocytoza [71]. Podczas prawidłowego przebiegu reakcji odpornościowej główną rolę odgrywają makrofagi, komórki dendrytyczne (DC), komórki NK, limfocyty T $\gamma\delta$ oraz granulocyty (przede wszystkim neutrofile). Ich udział w kształtowaniu mechanizmów, zarówno odporności wrodzonej, jak i nabytej, jest różny. Jednak najistotniejszą rolę w nieswoistej odporności przeciwwirusowej pełnią makrofagi i DC, ze względu na aktywność fagocytarną i pinocytarną, zdolność do indukowania syntezy cytokin prozapalnych, przetwarzanie antygenów, a następnie prezentację antygenów limfocytom T i w konsekwencji rozwój nabytej odpowiedzi immunologicznej [18,77]. Udokumentowano, że katepsyny cysteinowe odgrywają znaczącą rolę w procesach wrodzonej i nabytej odpowiedzi immunologicznej. Konstytutywną ekspresją katepsyn B, H i L charakteryzuje się większość komórek odpornościowych, a ich najwyższy poziom zidentyfikowano w makrofagach. Ponadto swoistą ekspresję katepsyny S odnotowano w komórkach prezentujących antygen (APC), takich jak DC, limfocyty B i makrofagi, a katepsyny F i W są obecne, odpowiednio, głównie w makrofagach i komórkach NK [63]. Mechanizm działania poszczególnych katepsyn nie jest jeszcze dokładnie poznany, jednak wydaje się kluczowy dla prawidłowego funkcjonowania i przebiegu odpowiedzi immunologicznej.

Znaczenie katepsyn w regulacji receptorów Toll-podobnych

Wrodzona odpowiedź immunologiczna jest pierwszą linią obrony przeciwko patogenom. Głównym elementem aktywacji tego rodzaju odpowiedzi jest rozpoznawanie stałych struktur drobnoustrojów, określanymi jako wzorce molekularne związane z patogenami (PAMP), powszechnie występujących u większości czynników zakaźnych, przez receptory rozpoznające wzorce (PRR), m.in. receptory Toll-podobne (TLR) [6,51]. Obecność genów kodujących te receptory wykryto nie tylko w genomach kręgowców, ale także bezkręgowców oraz w roślinach, dlatego są uważane za najstarsze elementy mechanizmów obrony gospodarza [48].

Do TLR, zlokalizowanych w błonie komórkowej makrofagów, limfocytów B, DC, komórek tucznych, neutrofilów oraz eozynofili, należą TLR1, TLR2, TLR4, TLR5,

TLR6 oraz TLR10, dzięki czemu rozpoznają molekularne wzorce patogennych mikroorganizmów, pochodzące ze ścian komórkowej, otoczki czy też aparatów ruchu. Natomiast TLR3, TLR7, TLR8, TLR9, TLR11, TLR12 i TLR13 są umiejscowione w organellach wewnątrzkomórkowych – endosomach i uczestniczą przede wszystkim w rozpoznawaniu kwasów nukleinowych fagocytowanych patogenów [1,2,50]. TLR2 rozpoznaje peptydoglikan (PGN), istotny składnik ścian bakterii Gram-dodatnich, natomiast lipopolisacharyd (LPS) wszystkich bakterii Gram-ujemnych jest wykrywany przez TLR4. TLR5 rozpoznaje flagellinę – białko bakterii Gram-ujemnych. TLR3, TLR7, TLR8 i TLR9 należą do receptorów wewnątrzkomórkowych, umiejscowionych w błonie siateczki śródplazmatycznej i tylko po stymulacji przez PAMP są kierowane do endosomów. TLR3 rozpoznaje dsRNA pochodzący od reowirusów, a także syntetyczny kwas poliribonukleotowy: poliribocytidylowy [poly(I:C)], a ssRNA ludzkiego wirusa niedoboru odporności (HIV) lub wirusa grypy są rozpoznawane przez TLR7 i TLR8. TLR9 wykrywa fragmenty DNA bakterii i wirusów bogate w niemetylowane dinukleotydy cytozyno-guaninowe tzw. motywy CpG wirusów DNA, takich jak wirus opryszczki pospolitej typu 1 (HSV-1), typu 2 (HSV-2) lub myszy cytomegalowirus (MCMV). Sygnalizacja za pośrednictwem TLR1, TLR2, TLR4, TLR5 i TLR6 indukuje głównie wytwarzanie cytokin zapalnych, natomiast TLR7 i TLR9 wywołuje uwalnianie interferonów (IFN) typu I [46,74,81].

Obecnie intensywnie bada się udział katepsyn cysteinowych w powstawaniu funkcjonalnego TLR9, zdolnego do rozpoznawania motywów CpG. Różne zespoły badawcze wykazały, że katepsyny B, H, K, L i S pełnią istotną rolę w przetwarzaniu TLR9 w makrofagach oraz limfocytach B [4,25,26,50,62]. Wprawdzie początkowo uważano, że na powstawanie aktywnego TLR9 wpływa niskie pH wewnątrz endosomów [65], udokumentowano, iż nie tylko odczyn środowiska, lecz przede wszystkim obecność katepsyn, ma znaczenie podczas wiązania sekwencji CpG przez TLR9. Proces rozszczepiania TLR9 dokładnie opisali Ewald i wsp. [25]. Polega na dwuetapowej proteolizie, w której początkowo biorą udział zarówno endopeptydaza asparaginianowa (AEP), jak i katepsyny, odcinając większą część ektodomeny TLR9, dzięki czemu powstaje tzw. pre-C-końcowy fragment TLR9 o długości około 100 kDa. W drugim etapie proteolizy katepsyny są odpowiedzialne za „docięcie” formy C-końcowej receptora i powstanie w pełni funkcjonalnego białka o wielkości 80 kDa, zdolnego do rozpoznawania fragmentów CpG. W przypadku braku aktywności AEP, katepsyny mogą kompensować jej działanie i przeprowadzać proces proteolizy, doprowadzając do powstania funkcjonalnej postaci TLR9. Natomiast jeśli aktywność katepsyn jest zablokowana, wówczas początkowy etap cięcia receptora jest przeprowadzany przez AEP, bez dalszej obróbki, powodując powstawanie dłuższej postaci TLR9 oraz zaburzenie sygnalizacji [25,26]. Po zablokowaniu aktywności katepsyn B, L i S w makrofagach mysich linii RAW 264.7 za pomocą swoistego inhibitora – z-FA-FMK wykazano, że dochodzi do powstawania tylko formy o wiel-

kości około 100 kDa, co świadczy o tym, że katepsyny B, L i S są niezbędne do przetwarzania TLR9 do wielkości 80 kDa [62]. Ponadto dzięki proteolizie przeprowadzanej przez te katepsyny receptor znacznie silniej wiąże motywy CpG i może indukować ścieżkę sygnałową zależną od białka adaptorowego MyD88 (mieloidalny czynnik różnicowania 88), prowadząc do transkrypcji genów cytokin prozapalnych, chemokin oraz IFN typu I, co jest głównym elementem wrodzonej odpowiedzi immunologicznej [15,42].

Zidentyfikowano również rozpuszczalną postać TLR9 (sTLR9), której powstawanie zależy głównie od aktywności katepsyny S w endosomach. Katepsyna S bierze udział w obróbce proteolitycznej TLR9, podczas której dochodzi do rozszczepienia łańcucha polipeptydowego między aminokwasami w pozycji 724 oraz 735. Tak powstała wewnątrzkomórkowa postać receptora, podobnie jak TLR9 o wielkości 80 kDa, jest również zdolna do wiązania ligandów. Według badaczy sTLR9 funkcjonuje jako antagonist receptor, wpływa na rozpoznawanie DNA oraz hamuje ścieżkę sygnałową indukowaną przez TLR9 [14]. Ponadto zmiany w aktywności proteaz cysteinowych, odpowiedzialnych za generowanie aktywnej i hamującej postaci TLR9, mogą się przyczynić do rozwoju chorób autoimmunologicznych [70].

Liczne badania wykazały, że TLR3 i TLR7 również ulegają przetwarzaniu przez AEP i katepsyny, w podobny sposób jak TLR9, co oznacza, że proteoliza TLR, rozpoznających kwasy nukleinowe, jest wymagana do ich prawidłowej regulacji [40,64,69]. Ponadto istotną rolę katepsyn B i H w przetwarzaniu TLR3 zbadano w ludzkich komórkach nabłonka barwnikowego siatkówki (RPE1). Uzyskane wyniki wykazały, że po cięciu proteolitycznym tego receptora przez obie badane katepsyny powstaje funkcjonalny receptor rozpoznający poly(I:C) oraz indukujący transdukcję sygnału. Natomiast po wyciszeniu katepsyn B i H przetwarzanie TLR3 jest zmniejszone, a sygnał po rozpoznaniu liganda zostaje zahamowany [29].

Zależności między katepsynami a cytokinami

Wyniki licznych badań potwierdziły bezpośredni wpływ aktywności katepsyn na stymulowanie bądź hamowanie wydzielania cytokin, odgrywających ważną rolę w regulacji wrodzonej odpowiedzi immunologicznej. Wykazano, że katepsyna B jest niezbędna podczas optymalnej potranslacyjnej obróbki i wytwarzania czynnika martwicy nowotworu (TNF- α) w odpowiedzi na LPS w makrofagach mysich [34]. Natomiast katepsyna L zwiększa aktywność IL-8 w ludzkich fibroblastach przez skrócenie domeny N-końcowej, co zdaniem autorów badań sugeruje jej istotną rolę w przetwarzaniu IL-8 w miejscu reakcji zapalnej [60]. Badania przeprowadzone przez Müllera i wsp. [58] również wskazują na bardzo istotną funkcję katepsyny L w makrofagach zakażonych *Staphylococcus aureus* podczas niezależnych od tlenu mechanizmów zwalczania patogenu. Autorzy podkreślają, że

także katepsyna K jest niezbędna do indukcji wytwarzania cytokin prozapalnych w komórkach, zwłaszcza IL-6 w początkowym okresie zakażenia. Natomiast proteazy wydzielane przez neutrofile, takie jak katepsyna G i proteinaza 3, zwiększają aktywność IL-8, a znacznie obniżają aktywność biologiczną IL-6 w miejscach wystąpienia stanów zapalnych [5,61]. Z badań wynika, że proteazy serynowe, np. katepsyna G, aktywna elastaza czy proteinaza 3 oraz katepsyny mogą być ważnymi regulatorami wrodzonej odpowiedzi immunologicznej i mogą stanowić cele terapeutyczne w chorobach zapalnych i walce z patogenami.

Przeprowadzono także doświadczenie sprawdzające aktywność katepsyn B, L i S w makrofagach po stymulacji TLR odpowiednimi ligandami. Komórki traktowano PGN – ligandem TLR2, poly(I:C) – ligandem TLR3 oraz LPS – ligandem TLR4. Zaobserwowano, że w mysich makrofagach oraz monocytach ludzkich pod wpływem obecności LPS aktywność katepsyn B, L i S znacząco wzrosła. Zwiększoną aktywność proteolityczną katepsyn L i S uzyskano także po traktowaniu komórek PGN oraz poly(I:C). Jednak wzrost aktywności katepsyny B nie był znaczący, jedynie po stymulacji komórek poly(I:C) zaobserwowano niewielkie różnice. Autorzy badań podkreślają, że aktywność proteaz cysteinowych nie jest bezpośrednio regulowana przez kaskady sygnałowe TLR, jest natomiast kontrolowana przez cytokiny, których synteza jest indukowana w sposób zarówno MyD88-zależny, jak i MyD88-niezależny w następstwie aktywacji tych receptorów. Wykazano również, że aktywność katepsyny B zależy od TNF- α , natomiast na zwiększenie aktywności katepsyny L i S w odpowiedzi na LPS wpływa zarówno TNF- α , jak i IL-1 β . Ponadto IFN- β zwiększa aktywność katepsyn L i S w makrofagach mysich stymulowanych poly(I:C) [17].

ROLA KATEPSYN PODCZAS WNIKANIA WYBRANYCH WIRUSÓW DO KOMÓRKI

Wirusy wypracowały różne strategie pokonywania barier wytworzonych przez komórkę, a ich sposoby wnikania są przeważnie określone przez oddziaływania między cząstkami wirusa a receptorami je rozpoznającymi, znajdującymi się na powierzchni komórek. Do mechanizmów tych oddziaływań należą: adsorpcja wirusa do powierzchni komórki, wnikanie do komórki za pośrednictwem fuzji lub endocytozy, rozpad kapsydu i replikacja genomu wirusa oraz przenikanie wirionów do cytoplazmy zakażonej komórki [38,43]. Mimo że mechanizmy wnikania wirusów są podobne, to wiele z nich wypracowało unikalne metody, zapewniające ich przedostanie się do optymalnych miejsc w komórce w celu replikacji. Wyjaśnienie skomplikowanej współzależności między wirusami i ich receptorami oraz określenie udziału katepsyn podczas wnikania poszczególnych wirusów do wnętrza komórek jest niezbędne do pełnego zrozumienia mechanizmów tej interakcji, jak również do opracowania skutecznych metod zwalczania zakażeń wirusowych [33].

Rola katępsyn podczas wnikania filowirusów do komórki

Do rodziny filowirusów (*Filoviridae*) należy wirus Ebola (EBOV) oraz wirus Marburg (MARV). W zależności od miejsca występowania EBOV wyróżniono jego 5 podtypów: Ebola-Zair (ZEBOV), Ebola-Sudan (SEBOV), Ebola-Cote d'Ivoire (Wybrzeże Kości Słoniowej; CIEBOV), Ebola-Taï Forest (TAFV), Ebola-Reston (REBOV) oraz Ebola-Bundibugyo (BEV) [27]. U ludzi i zwierząt filowirusy wywołują gorączkę krwotoczną – chorobę, która bardzo szybko rozprzestrzenia się między ludźmi przez bezpośredni kontakt z zakażoną krwią lub płynami ustrojowymi. Śmiertelność osób zakażonych wynosi niemal 90%, natomiast nie ma żadnych dostępnych leków ani szczepionek, które mogłyby być zastosowane w skutecznym leczeniu i profilaktyce zakażeń wywołanych przez te patogeny [83]. Dlatego też prowadzone badania skoncentrowano przede wszystkim na znalezieniu środka terapeutycznego, hamującego ich replikację. Jest to związane z dokładnym poznaniem molekularnego mechanizmu zakażenia filowirusami.

EBOV jest wirusem osłonkowym, zawierającym liniowy materiał genetyczny w postaci pojedynczej, ujemnie spolaryzowanej nici ssRNA. Wielkość pojedynczej cząstki wirusa wynosi 80-14 000 nm, a wielkość genomu 19 kpz. Wirusowy RNA składa się z siedmiu genów kodujących, odpowiednio: nukleoproteinę, glikoproteiny (GP), zależną od RNA polimerazę RNA (białko L) oraz cztery białka strukturalne, zwane VP24, VP30, VP35 i VP40. Do białek wiążących się z błoną komórki gospodarza należą: glikoproteina oraz VP24 i VP40 [3]. W przypadku filowirusów pierwszymi zakażanymi komórkami są makrofagi oraz DC, lecz wirusy te mogą również atakować większość typów komórek, z wyjątkiem limfocytów oraz innych komórek nieadherentnych (*in vitro*) [22]. Po związaniu z powierzchnią komórki, wirusy są internalizowane w wyniku makropinocytozy do wczesnych endosomów, które następnie są przekształcane w późne endosomy/lizosomy [66]. Przenikanie wirusa do cytoplazmy odbywa się za pośrednictwem fuzji osłonki wirusa z błoną otaczającą późny endosom/lizosom. Podczas fuzji zasadniczą rolę odgrywają wirusowe GP osłonkowe, składające się z dwóch podjednostek GP1 i GP2, które są regularnie rozmieszczone na powierzchni osłonki wirusowej. Ponadto jako jedyne białko osłonki wirusowej, odgrywają decydującą rolę we wnikaniu wirusa do cytoplazmy komórki [12,47]. Liczne dane literaturowe wskazują, że proteoliza glikoproteiny w późnych endosomach/lizosomach pod wpływem katępsyn B i L jest krytycznym etapem podczas wnikania EBOV do komórki gospodarza (ryc. 1A) [67,68,82]. Początkowo katępsyna L powoduje usunięcie około 60% aminokwasów GP, w tym domenę mucynopodobną (mucin-like domain) i resztę glikanową (glycan cap), generując białko o masie około 50 kDa. Następnie podjednostka GP1 jest dodatkowo proteolizowana przez katępsynę B i/lub L do jeszcze krótszej formy. Ostatecznie katępsyna B może dodatkowo usunąć 1 kDa masy GP1. Dokładna wielkość GP1 nie jest

znana, ale wiadomo, że wynosi 17-19 kDa [12,68]. Proteoliza z udziałem katępsyn powoduje wytworzenie podjednostki, która następnie wiąże się z niedawno zidentyfikowanym receptorem Niemann-Pick typu C1 (NPC1), znajdującym się w błonie endosomu, umożliwiając w ten sposób fuzję błon wirusa oraz komórki gospodarza i wnikanie EBOV do wnętrza zakażonej komórki (ryc. 1A) [10,16].

W celu wyjaśnienia roli katępsyn B i L zbadano wpływ selektywnego inhibitora katępsyny B (CA074) oraz inhibitora katępsyny B i L (FYdmk) na zakażenie komórek Vero wirusem pęcherzykowego zapalenia jamy ustnej (VSV), zawierającego pseudotyp GP EBOV z brakującą domeną mucynopodobną w podjednostce GP1 (VSV-GPΔMuc). Przeprowadzone badania wykazały, że hamowanie zakażenia następuje w przypadku inaktywacji katępsyny B, lecz nie katępsyny L [12]. Natomiast Kaletsky i wsp. [39], stosując w badaniach różne inhibitory proteaz w komórkach VeroE6, wskazali na istotną rolę katępsyny L w zakażeniu HIV-Ebola, zawierającym pseudotyp GP. Autorzy zaobserwowali, że po traktowaniu pseudowirionów katępsyną L skraca się GP1 do wielkości 18 kDa, a także następuje dziesięciokrotny wzrost ich zakaźności w komórkach w porównaniu do wirionów typu dzikiego. Ponadto badania wykazały, że zakażenie komórek VeroE6 przez pseudowiriony było silnie hamowane przez swoisty inhibitor katępsyny L – Z-LLL-FMK, natomiast znacznie słabiej przez inhibitor katępsyny B – CA074, co sugeruje istotny udział katępsyny L w skutecznym wnikaniu EBOV do wnętrza komórki, podczas gdy katępsyna B odgrywa w tym przypadku mniej znaczącą rolę. Według Gnirssa i wsp. [30] proces przekształcania glikoproteiny 4 podtypów EBOV: ZEBOV, SEBOV, CIEBOV oraz REBOV zależy od aktywności obu katępsyn B i L podczas wnikania wirusów do komórek 293T *in vitro*, chociaż w różnym stopniu. Według Misasi i wsp. [54] wnikanie wirusów ZEBOV oraz CIEBOV ściśle zależy od katępsyny B, natomiast w przypadku wnikania wirusów SEBOV, REBOV i MARV jej obecność nie jest wymagana. Jednak wyniki późniejszych badań jednoznacznie wskazują, że glikoproteina EBOV nie tylko pośredniczy, ale również promuje transmisję wirusa z komórki do komórki, a katępsyny B i L oraz receptor NPC1 są niezbędne podczas tej transmisji. Ponadto inhibitory proteaz, takie jak leupeptyna i E64d, jak również swoisty inhibitor katępsyny B – CA074, powodują znaczne zahamowanie procesu transmisji wirusa [53]. Niewątpliwie przedstawione dane literaturowe wskazują, że zarówno katępsyna B, jak i L odgrywają niezwykle istotną rolę podczas zakażenia wywołanego przez filowirusy na etapie przekształcania glikoproteiny wirusowej w celu przedostania się materiału genetycznego wirusa do cytoplazmy.

Udział katępsyn we wnikaniu reowirusów do komórki

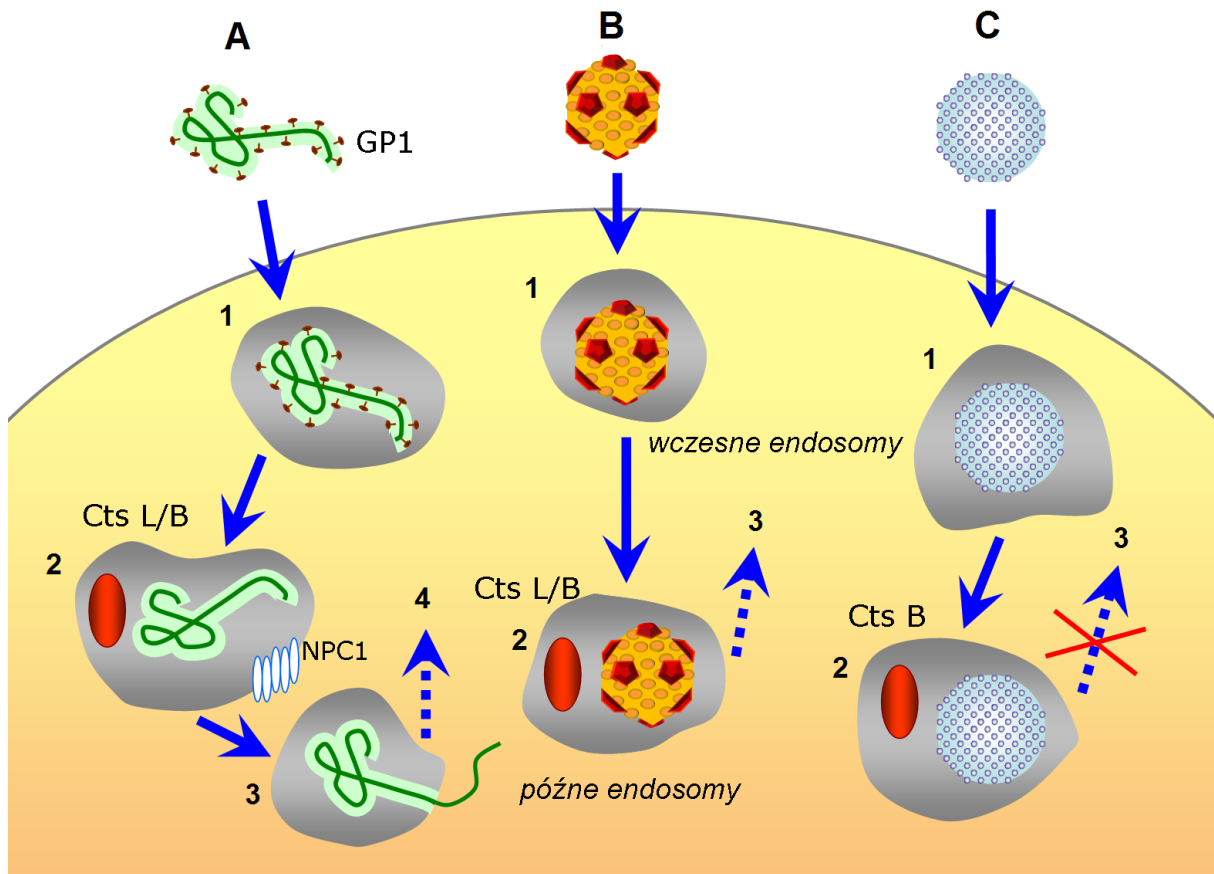
Rodzina *Reoviridae* jest podzielona na 9 rodzajów, a 4 z nich, tzn. rotawirusy (*Rotavirus*), orbiwirusy (*Orbivirus*),

ortoreowirusy (*Orthoreovirus*) oraz coltiwirusy (*Coltivirus*) powodują zakażenia u ludzi i zwierząt. Rotawirusy u ludzi wywołują stan zapalny, głównie górnego odcinka przewodu pokarmowego, które zwykle dotyka dzieci między 6 a 24 miesiącem życia. Śmiertelność dzieci w tym okresie, spowodowana zakażeniami rotawirusowymi wynosi 10-20% [59]. Natomiast u nowo narodzonych myszy zakażonych tego rodzaju wirusem występują uszkodzenia wielu narządów, w tym mózgu, serca i wątroby [38].

Reowirusy to wirusy bezosłonkowe, charakteryzujące się ikosaedralną symetrią i średnicą około 80 nm. Ich genom składa się z 10 segmentów dwuniciowego RNA (dsRNA) i stanowi 15-20% masy wirionu. Kapsyd reowirusów ma złożoną budowę i składa się z 6 białek strukturalnych ($\sigma 1$, $\sigma 2$, $\sigma 3$, $\mu 1$, $\lambda 1$, $\lambda 2$), które tworzą dwie koncentryczne warstwy otaczające genom, zwane kapsydem wewnętrznym i zewnętrznym. W większości kapsyd zewnętrzny jest zbudowany z 600 kopii każdego z białek $\sigma 3$ oraz

$\mu 1$ [21,57]. Białko $\sigma 3$ zapewnia stabilność wirionu w środowisku, natomiast $\mu 1$ jest odpowiedzialne za penetrację błony podczas wnikania wirusa do komórki [31]. Rodzina reowirusów jest ważnym modelem badań interakcji wirus-gospodarz, a także patogenyzy chorób wirusowych. Zakażenie reowirusem rozpoczyna się od połączenia $\mu 1$ z odpowiednimi receptorami komórkowymi. Następnie wiriony związane z receptorem są internalizowane w procesie endocytozy. Podczas transportu endocytarnego kapsyd zewnętrzny ulega częściowej degradacji proteolitycznej, a to powoduje utworzenie zakaźnych cząstek subwirionowych (ISVP). ISVP przenikają przez błony endosomów, aby aktywne transkrypcyjne cząstki rdzenia mogły się przedostać do cytoplazmy zakażonej komórki [37].

Liczne badania wskazują, że katepsyny B, L oraz S biorą udział w endosomalnej obróbce proteolitycznej białek $\sigma 3$ i $\mu 1$ oraz są niezbędne podczas wnikania reowirusów do komórek (ryc. 1B) [23,24,33,37,38,41]. Aby zidentyfikować



Ryc. 1. Schemat poszczególnych etapów wnikania filowirusów, reowirusów i retrowirusów z udziałem katepsyn do cytoplazmy zakażonej komórki. **A** - wnikanie filowirusów do wnętrza komórki w procesie makropinocytosis: 1) utworzenie wczesnych endosomów; 2) internalizacja filowirusa w późnych endosomach/lizosomach, proteoliza glikoproteiny osłonkowej (GP1) przez katepsynę B i L; 3) wiązanie rozszczepionej podjednostki GP1 z receptorem Niemann-Picka typu C1 (NPC1); 4) przenikanie filowirusa do wnętrza zakażonej komórki. **B** - wnikanie reowirusów do wnętrza komórki na drodze endocytozy: 1) powstawanie wczesnych endosomów; 2) proteoliza białek kapsydu reowirusa z udziałem katepsyny B i L, utworzenie zakaźnych cząstek subwirionowych (ISVP); 3) przenikanie aktywnych transkrypcyjnych cząstek do cytoplazmy zakażonej komórki. **C** - wnikanie retrowirusów do wnętrza komórki na drodze endocytozy: 1) powstawanie wczesnych endosomów; 2) powstawanie późnych endosomów; 3) hamowanie przez katepsynę B uwalniania cząstek wirusowych HIV do cytoplazmy zakażonej komórki na drodze CD4-niezależnej

kować swoiste proteazy, które powodują demontaż kapsydu reowirusów, zbadano ich udział w fibroblastach mysich (L929) traktowanych specyficznymi inhibitorami katepsyn B lub L oraz w mysich fibroblastach zarodkowych (MEFs) pochodzących od myszy z niedoborem katepsyny B lub L. Na podstawie badań zaobserwowano nieefektywną proteolizę białek kapsydu oraz obniżenie replikacji wirusa w komórkach linii L929 traktowanych inhibitorem katepsyny L (Z-Phe-Tyr) oraz w komórkach linii MEFs z niedoborem katepsyny L. Jednocześnie stwierdzono, że w fibroblastach linii L929 traktowanych inhibitorem katepsyny B (CA-074Me) oraz w komórkach MEFs z niedoborem katepsyny B zachodzi rozkład białek wirusa oraz następuje wzrost miana wirusa. Ponadto wykazano, że katepsyna L jest głównym mediatorem konwersji wirionów reowirusa do ISVP w mysich fibroblastach [23]. Według autorów brak obecności katepsyny L w mysich fibroblastach zarodkowych sprawia, że są znacznie mniej podatne na zakażenie reowirusami. Mimo że obie katepsyny pośredniczą w przetwarzaniu wirusa, to katepsyna L jest głównym mediatorem tego procesu. Inne badania wykazały, że katepsyna S również bierze udział w rozkładzie białka $\sigma 3$ w mysich makrofagach linii P388D, natomiast katepsyna B nie odgrywa zasadniczej roli w tych komórkach, gdyż po zastosowaniu inhibitora CA-074 aktywność katepsyny B była zablokowana, lecz przetwarzanie $\sigma 3$ nie zostało zahamowane [31]. Johnson i wsp. [38] również sprawdzali wpływ katepsyn B, L i S na przetwarzanie kapsydu zewnętrznego reowirusów u myszy szczepu dzikiego oraz u myszy pozbawionych poszczególnych katepsyn (*Ctsb*^{-/-}, *Ctsl*^{-/-} i *Ctss*^{-/-}) zakażonych zjadliwym szczepem T3SA+ reowirusa. Autorzy zaobserwowali, że obecność tych proteaz cysteinowych powoduje powstanie ISVP. Ponadto miana wirusa w poszczególnych narządach wszystkich szczepów myszy z niedoborem katepsyn B, L lub S były niższe w porównaniu do myszy typu dzikiego, co oznacza, że katepsyny te są niezbędne do przeprowadzenia skutecznego zakażenia wywołanego przez reowirusy [38].

Rola katepsyn podczas wnikania retrowirusów do komórki

Ludzki wirus niedoboru odporności (HIV), należący do rodziny *Retroviridae* i rodzaju *Lentivirus*, jest czynnikiem etiologicznym zespołu nabytego niedoboru odporności (AIDS). Do rodziny retrowirusów należy także wirus białaczki limfocytów T (HTLV), powodujący białaczkę dojrziałych limfocytów T oraz mysi wirus białaczki (MLV), wykorzystywany jako model do badań ludzkich chorób, takich jak białaczka, niedobór odporności, czy choroby neuropatologiczne [19,80,84]. Genom HIV o wielkości około 9800 par zasad składa się z dwóch cząsteczek ssRNA, znajdujących się w kapsydie wraz z enzymem – odwrotną transkryptazą DNA, odpowiadającym za replikację materiału genetycznego. Kapsyd jest otoczony dwuwarstwową osłonką lipidową, na której powierzchni znajdują się glikoproteiny: gp41 – zakotwiczonej w osłonce wirusowej oraz gp120 – występującej na powierzchni osłonki. Glikoproteina powierzchniowa

odgrywa istotną rolę podczas zakażenia, gdyż silnie wiąże się z receptorem CD4 na powierzchni limfocytów T pomocniczych, makrofagów oraz DC. Po związaniu białka gp120 z receptorem dochodzi do zmiany jego konformacji, co umożliwia wiązanie do jednego z dwóch koreceptorów: CCR5 lub CXCR4 (receptorów chemokin), a to prowadzi do fuzji z błoną komórkową i przenikanie do komórki docelowej [8,45].

Oprócz wnikania retrowirusów do komórki z udziałem receptora CD4 opisano również mechanizm zakażenia w sposób CD4-niezależny. Polega na bezpośrednim oddziaływaniu gp120 z koreceptorem CXCR4, w następstwie tego wirus wnika do komórki gospodarza. W przypadku przedostawania się patogenu w sposób CD4-niezależny uważa się, że niskie pH jest warunkiem podstawowym podczas przenikania wirusa do cytoplazmy zakażanej komórki, ze względu na obecność katepsyn cysteinowych w późnych endosomach [13,85]. Istnieje natomiast wiele kontrowersji o roli endocytozy podczas wnikania wirusa w sposób CD4-zależny. Wcześniejsze doniesienia wskazują, że zahamowanie funkcji lizosomów o niskim pH zwiększa lub nie wpływa na zakażenie HIV na drodze CD4-zależnej, co sugeruje, że HIV nie wnika do komórek z udziałem pęcherzyków endosomalnych [28,52]. Jednak niedawno opublikowane wyniki udowadniają, że zastosowanie inhibitorów endocytozy zmniejsza wnikanie wirusa zależnie od receptora CD4 [11,55]. Ponadto wizualizacja wyznakowanych za pomocą GFP cząstek wirusowych wykazała, że HIV ulega internalizacji i jest kierowany do endosomów o niskim pH [56]. Z badań przeprowadzonych przez Yoshii i wsp. [86] wynika, że katepsyna B hamuje wnikanie HIV na drodze CD4-niezależnej (ryc. 1C). Zastosowanie inhibitora katepsyny B – CA047Me zwiększa zakażenie komórek HeLa na drodze niezależnej od CD4. Ponadto inhibitory endocytozy znacząco tłumią wnikanie HIV w ten sposób, natomiast na drodze CD4-zależnej przedostawanie wirusa do komórki nie jest hamowane. Według autorów katepsyna B jest jednym z mechanizmów wrodzonej odpowiedzi immunologicznej gospodarza do obrony przed wnikaniem patogenu na drodze CD4-niezależnej. Uzyskane wyniki sugerują również, że wnikanie HIV oraz innych retrowirusów na drodze CD4-niezależnej następuje z udziałem zakwaszonych późnych endosomów, gdzie obecne są proteazy cysteinowe. Uważa się jednak, że cząstki wirusowe na drodze CD4-zależnej są internalizowane do komórek przez endocytozę, a wnikanie HIV odbywa się głównie we wczesnych endosomach, niezależnie od ich zakwaszenia [45].

Rolę katepsyny B w uwalnianiu niedojrzałych cząstek wirusowych utworzonych m.in. z białek Gag (HIV-1 Gag) zbadali Ha i wsp. [35]. Autorzy wykazali, że brak aktywności katepsyny B w makrofagach oraz komórkach HEK293T w wyniku działania inhibitora CA-074Me lub w razie niedoboru tej katepsyny prowadzi do defektywnego uwalniania HIV-1 Gag do środowiska zewnątrzkomórkowego i akumulację cząstek wirusowych w autofagosomach. Inne badania, dotyczące proteaz

cysteinowych wykazały, że aktywność katepsyn B, C, L, H, S i Z jest znacząco obniżona w DC po 48 h od zakażenia HIV-1 [36]. Autorzy sugerują, że znaczne zmniejszenie aktywności endosomalnych proteaz może zwiększyć przeżywalność potomnych cząstek wirusowych, które co prawda są uwalniane z DC, ale ulegają ponownej endocytozie, ułatwiając przypuszczalnie transfer cząstek HIV do limfocytów T przez synapsę immunologiczną [36].

Wnikanie retrowirusów do komórek gospodarza odbywa się przez endocytozę wirionu, zakwaszenie pęcherzyka endosomalnego oraz proteolizę z udziałem katepsyn. Są to mechanizmy, zwłaszcza endocytoza, które chronią przed wnikającymi patogenami, w celu wywołania skutecznej odpowiedzi immunologicznej. Retrowirusy wykorzystują te mechanizmy, aby efektywnie ominąć reakcje odpornościowe i wprowadzić swój materiał genetyczny do komórki docelowej. Dlatego też dokładne poznanie roli katepsyn podczas procesu wnikania retrowirusów oraz innych wirusów do komórek gospodarza może być szansą na identyfikację nowych strategii terapeutycznych przeciwko licznym patogenom.

KATEPSYNY W ZAKAŻENIU WIRUSEM EKTROMELII

Katepsyny mogą odgrywać także ważną rolę w replikacji pokswirusów w komórkach permissywnych. Badania prowadzone w naszym zespole wykazały, że podczas zakażenia wirusem ektromelii (ECTV) dochodzi do obniżenia ekspresji katepsyny B, L oraz S w makrofagach otrzewnowych, zarówno myszy wrażliwych BALB/c, jak i opornych C57BL/6 [20]. Zaobserwowano również zmniejszenie ekspresji katepsyny B, L i S w DC wyhodowanych z komórek prekursorowych szpiku kostnego [73] oraz w mysich makrofagach linii RAW 264.7, odpowiednio, w 24 i 48 h po zakażeniu ECTV (dane nieopublikowane). Po przeprowadzeniu przez nasz zespół wstępnych badań, dotyczących wpływu katepsyn na

replikację ECTV okazało się, że wyciszenie katepsyny B i L (siRNA) w makrofagach mysich linii RAW 264.7 znacząco podwyższa tempo wirusowej replikacji oraz morfogenezy potomnych cząstek ECTV. Natomiast nadekspresja katepsyny L (CRISPR/Cas9) w komórkach RAW 264.7 obniża miano ECTV (dane nieopublikowane). Na podstawie dostępnych danych literaturowych oraz uzyskanych przez nas wyników można twierdzić, że katepsyny regulują replikację ECTV w makrofagach myszy. Ponadto można przypuszczać, że ECTV celowo hamuje aktywność katepsyn, aby zwiększyć swoją replikację i przeżywalność w zakażonych komórkach.

PODSUMOWANIE

Katepsyny odgrywają istotną funkcję w różnych procesach układu odpornościowego, a ich działanie jest ściśle kontrolowane przez odpowiednie inhibitory, aby nie doszło do patologicznego uszkodzenia komórek lub tkanek. Wyniki najnowszych badań podkreślają główną rolę katepsyn podczas przedostawania się filowirusów, reowirusów i retrowirusów, a także innych rodzajów wirusów do wnętrza komórki gospodarza. Wiele patogenów wymaga obecności katepsyn do efektywnej fuzji z błoną zakażanej komórki, a zahamowanie ich aktywności obniża wydajność replikacji wirusów. Ponadto wiele wirusów wykorzystuje konserwatywne mechanizmy komórkowe, takie jak endocytoza czy niskie pH wewnątrz endosomu, w celu efektywnego przedostawania się do wnętrza komórki oraz intensywnej replikacji. Zatem poznanie mechanizmów regulujących udział katepsyn wydaje się niezwykle istotnym aspektem we wczesnych etapach wnikania wirusów do wnętrza komórek. Dokładne określenie funkcji tych enzymów może się przyczynić do rozwoju nowatorskich metod terapii przeciwwirusowej.

PIŚMIENNICTWO

- [1] Ahmad-Nejad P., Häcker H., Rutz M., Bauer S., Vabulas R.M., Wagner H.: Bacterial CpG-DNA and lipopolysaccharides activate Toll-like receptors at distinct cellular compartments. *Eur. J. Immunol.*, 2002; 32: 1958-1968
- [2] Akira S.: Mammalian Toll-like receptors. *Curr. Opin. Immunol.*, 2003; 15: 5-11
- [3] Ansari A.A.: Clinical features and pathobiology of Ebolavirus infection. *J. Autoimmun.*, 2014; 55: 1-9
- [4] Asagiri M., Hirai T., Kunigami T., Kamano S., Gober H.J., Okamoto K., Nishikawa K., Latz E., Golenbock D.T., Aoki K., Ohya K., Imai Y., Morishita Y., Miyazono K., Kato S. i wsp.: Cathepsin K-dependent toll-like receptor 9 signaling revealed in experimental arthritis. *Science*, 2008; 319: 624-627
- [5] Bank U., Küpper B., Reinhold D., Hoffmann T., Ansorge S.: Evidence for a crucial role of neutrophil-derived serine proteases in the inactivation of interleukin-6 at sites of inflammation. *FEBS Lett.*, 1999; 461: 235-240
- [6] Barbalat R., Ewald S.E., Mouchess M.L., Barton G.M.: Nucleic acid recognition by the innate immune system. *Ann. Rev. Immunol.*, 2011; 29: 185-214
- [7] Berdowska I., Siewiński M.: Rola katepsyn cysteinowych oraz ich inhibitorów w procesach fizjologicznych i nowotworowych. *Postępy Bioch.*, 2000; 46: 73-84
- [8] Berger E.A., Murphy P.M., Farber J.M.: Chemokine receptors as HIV-1 coreceptors: roles in viral entry, tropism, and disease. *Annu. Rev. Immunol.*, 1999; 17: 657-700
- [9] Brix K., McInnes J., Al-Hashimi A., Rehders M., Tamhane T., Haugen M.H.: Proteolysis mediated by cysteine cathepsins and legumain-recent advances and cell biological challenges. *Protoplasma*, 2015; 252: 755-774
- [10] Carette J.E., Raaben M., Wong A.C., Herbert A.S., Obernosterer G., Mulharkar N., Kuehne A.I., Kranzusch P.J., Griffin A.M., Ruthel G., Dal Cin P., Dye J.M., Whelan S.P., Chandran K., Brummelkamp T.R.: Ebola virus entry requires the cholesterol transporter Niemann-Pick C1. *Nature*, 2011; 477: 340-343
- [11] Carter G.C., Bernstone L., Baskaran D., James W.: HIV-1 infects macrophages by exploiting an endocytic route dependent on dynamin, Rac1 and Pak1. *Virology*, 2011; 409: 234-250
- [12] Chandran K., Sullivan N.J., Felbor U., Whelan S. P., Cunningham J. M.: Endosomal proteolysis of the Ebola virus glycoprotein is necessary for infection. *Science*, 2005; 308: 1643-1645

- [13] Chenine A.L, Pion M., Matouskova E., Gondo-Rey F., Vigne R., Hirsch I.: Adaptation of a CXCR4-using human immunodeficiency type 1 NDK virus in intestinal cells is associated with CD4-independent replication. *Virology*, 2002; 304: 403-414
- [14] Chockalingam A., Cameron J.L., Brooks J.C., Leifer C.A.: Negative regulation of signaling by a soluble form of toll-like receptor 9. *Eur. J. Immunol.*, 2011; 41: 2176-2184
- [15] Conus S., Simon H.U.: Cathepsins and their involvement in immune responses. *Swiss. Med. Wkly.*, 2010; 20: 140: w13042
- [16] Côté M., Misasi J., Ren T., Bruchez A., Lee K., Filone C.M., Hensley L., Li Q., Ory D., Chandran K., Cunningham J.: Small molecule inhibitors reveal Niemann-Pick C1 is essential for Ebola virus infection. *Nature*, 2011; 477: 344-348
- [17] Creasy B.M., McCoy K.L.: Cytokines regulate cysteine cathepsins during TLR responses. *Cell Immunol.*, 2011; 267: 56-66
- [18] Dempsey P.W., Vaidya S.A., Cheng G.: The art of war: Innate and adaptive immune responses. *Cell. Mol. Life Sci.*, 2003; 60: 2604-2621
- [19] Denner J.: Immunising with the transmembrane envelope proteins of different retroviruses including HIV-1: a comparative study. *Hum. Vaccin. Immunother.*, 2013; 9: 462-470
- [20] Dolega P., Szulc-Dąbrowska L., Bossowska M., Mielcarska M., Nowak Z., Toka F.N.: Innate immune gene transcript level associated with the infection of macrophages with ectromelia virus in two different mouse strains. *Viral Immunol.*, 2017; 30: 315-329
- [21] Doyle J.D., Danthi P., Kendall E.A., Ooms L.S., Wetzel J.D., Dermody T.S.: Molecular determinants of proteolytic disassembly of the reovirus outer capsid. *J. Biol. Chem.*, 2012; 287: 8029-8038
- [22] Dube D., Schornberg K.L., Shoemaker C.J., Delos S.E., Stantchev T.S., Clouse K.A., Broder C.C., White J.M.: Cell adhesion-dependent membrane trafficking of a binding partner for the ebolavirus glycoprotein is a determinant of viral entry. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2010; 107: 16637-16642
- [23] Ebert D.H., Deussing J., Peters C., Dermody T.S.: Cathepsin L and cathepsin B mediate reovirus disassembly in murine fibroblast cells. *J. Biol. Chem.*, 2002; 277: 24609-24617
- [24] Ebert D.H., Kopecky-Bromberg S.A., Dermody T.S.: Cathepsin B is inhibited in mutant cells selected during persistent reovirus infection. *J. Biol. Chem.*, 2004; 279: 3837-3851
- [25] Ewald S.E., Engel A., Lee J., Wang M., Bogoy M., Barton G.M.: Nucleic acid recognition by Toll-like receptors is coupled to stepwise processing by cathepsins and asparagine endopeptidase. *J. Exp. Med.*, 2011; 208: 643-651
- [26] Ewald S.E., Lee B.L., Lau L., Wickliffe K.E., Shi G.P., Chapman H.A., Barton G.M.: The ectodomain of Toll-like receptor 9 is cleaved to generate a functional receptor. *Nature*, 2008; 456: 658-662
- [27] Feldmann H., Geisbert T.W.: Ebola hemorrhagic fever. *Lancet*, 2011; 377: 849-862
- [28] Fredericksen B.L., Wei B.L., Yao J., Luo T., Garcia J.V.: Inhibition of endosomal/lysosomal degradation increases the infectivity of human immunodeficiency virus. *J. Virol.*, 2002; 76: 11440-11446
- [29] Garcia-Cattaneo A., Gobert F.X., Müller M., Toscano F., Flores M., Lescure A., Del Nery E., Benaroch P.: Cleavage of Toll-like receptor 3 by cathepsins B and H is essential for signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2012; 109: 9053-9058
- [30] Gnirss K., Kühl A., Karsten C., Glowacka I., Bertram S., Kaup F., Hofmann H., Pöhlmann S.: Cathepsins B and L activate Ebola but not Marburg virus glycoproteins for efficient entry into cell lines and macrophages independent of TMPRSS2 expression. *Virology*, 2012; 424: 3-10
- [31] Golden J.W., Bahe J.A., Lucas W.T., Nibert M.L., Schiff L.A.: Cathepsin S supports acid-independent infection by some reoviruses. *J. Biol. Chem.*, 2004; 279: 8547-8557
- [32] Grove J., Marsh M.: The cell biology of receptor-mediated virus entry. *J. Cell Biol.*, 2011; 195: 1071-1082
- [33] Guha S., Padh H.: Cathepsins: Fundamental effectors of endolysosomal proteolysis. *Indian J. Biochem. Biophys.*, 2008; 45: 75-90
- [34] Ha S.D., Martins A., Khazaie K., Han J., Chan B.M., Kim S.O.: Cathepsin B is involved in the trafficking of TNF- α -containing vesicles to the plasma membrane in macrophages. *J. Immunol.*, 2008; 181: 690-697
- [35] Ha S.D., Park S., Hattlmann C.J., Barr S.D., Kim S.O.: Inhibition or deficiency of cathepsin B leads defects in HIV-1 Gag pseudoparticle release in macrophages and HEK293T cells. *Antiviral Res.*, 2012; 93: 175-184
- [36] Harman A.N., Kraus M., Bye C.R., Byth K., Turville S.G., Tang O., Mercier S.K., Nasr N., Stern J.L., Slobedman B., Driessen C., Cunningham A.L.: HIV-1-infected dendritic cells show 2 phases of gene expression changes, with lysosomal enzyme activity decreased during the second phase. *Blood*, 2009; 114: 85-94
- [37] Jané-Valbuena J., Breun L.A., Schiff L.A., Nibert M.L.: Sites and determinants of early cleavages in the proteolytic processing pathway of reovirus surface protein $\sigma 3$. *J. Virol.*, 2002; 76: 5184-5197
- [38] Johnson E.M., Doyle J.D., Wetzel J.D., McClung R.P., Katunuma N., Chappell J.D., Washington M.K., Dermody T.S. Genetic and pharmacologic alteration of cathepsin expression influences reovirus pathogenesis. *J. Virol.*, 2009; 83: 9630-9640
- [39] Kaletsky R.L., Simmons G., Bates P.: Proteolysis of the Ebola virus glycoproteins enhances virus binding and infectivity. *J. Virol.*, 2007; 81: 13378-13384
- [40] Kanno A., Yamamoto C., Onji M., Fukui R., Saitoh S., Motoi Y., Shibata T., Matsumoto F., Muta T., Miyake K.: Essential role for Toll-like receptor 7 (TLR7)-unique cysteines in an intramolecular disulfide bond, proteolytic cleavage and RNA sensing. *Int. Immunol.*, 2013; 25: 413-422
- [41] Katayama Y., Terasawa Y., Tachibana M., Mizuguchi H., Sakurai F.: Proteolytic disassembly of viral outer capsid proteins is crucial for reovirus-mediated type-I interferon induction in both reovirus-susceptible and reovirus-refractory tumor cells. *Biomed. Res. Int.*, 2015; 2015: 468457
- [42] Kawai T., Akira S.: Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity. *Immunity*, 2011; 34: 637-650
- [43] Kopitar-Jerala N.: The role of cysteine proteinases and their inhibitors in the host-pathogen cross talk. *Curr. Protein Pept. Sci.*, 2012; 13: 767-775
- [44] Kos J., Mitrović A., Mirković B.: The current stage of cathepsin B inhibitors as potential anticancer agents. *Future Med. Chem.*, 2014; 6: 1355-1371
- [45] Kubo Y., Hayashi H., Matsuyama T., Sato H., Yamamoto N.: Reovirus entry by endocytosis and cathepsin proteases. *Adv. Virol.*, 2012; 2012: 640894
- [46] Latz E., Schoenemeyer A., Visintin A., Fitzgerald K.A., Monks B.G., Knetter C.F., Lien E., Nilsen N.J., Espevik T., Golenbock D.T.: TLR9 signals after translocating from the ER to CpG DNA in the lysosome. *Nat. Immunol.*, 2004; 5: 190-198
- [47] Lee J.E., Saphire E.O.: Ebolavirus glycoprotein structure and mechanism of entry. *Future Virol.*, 2009; 4: 621-635
- [48] Leulier F., Lemaitre B.: Toll-like receptors – taking an evolutionary approach. *Nat. Rev. Genet.*, 2008; 9: 165-178
- [49] Magister Š., Kos J.: Cystatins in immune system. *J. Cancer*, 2013; 4: 45-56
- [50] Matsumoto F., Saitoh S., Fukui R., Kobayashi T., Tanimura N., Konno K., Kusumoto Y., Akashi-Takamura S., Miyake K.: Cathepsins are required for Toll-like receptor 9 responses. *Biochem. Biophys.*

Res. Commun., 2008; 367: 693-699

[51] Matzinger P.: The danger model: a renewed sense of self. *Science*, 2002; 296: 301-305

[52] McClure M.O., Marsh M., Weiss R.A.: Human immunodeficiency virus infection of CD4-bearing cells occurs by a pH-independent mechanism. *EMBO J.*, 1988; 7: 513-518

[53] Miao C., Li M., Zheng Y.M., Cohen F.S., Liu S.L.: Cell-cell contact promotes Ebola virus GP-mediated infection. *Virology*, 2016; 488: 202-215

[54] Misasi J., Chandran K., Yang J.Y., Considine B., Filone C.M., Côté M., Sullivan N., Fabbozzi G., Hensley L., Cunningham J.: Filoviruses require endosomal cysteine proteases for entry but exhibit distinct protease preferences. *J. Virol.*, 2012; 86: 3284-3292

[55] Miyauchi K., Kim Y., Latinovic O., Morozov V., Melikyan G.B.: HIV enters cells via endocytosis and dynamin-dependent fusion with endosomes. *Cell*, 2009; 137: 433-444

[56] Miyauchi K., Marin M., Melikyan G.B.: Visualization of retrovirus uptake and delivery into acidic endosomes. *Biochem. J.*, 2011; 434: 559-569

[57] Mohamed A., Johnston R.N., Shmulevitz M.: Potential for improving potency and specificity of reovirus oncolysis with next-generation reovirus variants. *Viruses*, 2015; 7: 6251-6278

[58] Müller S., Faulhaber A., Sieber C., Pfeifer D., Hochberg T., Gansz M., Deshmukh S.D., Dauth S., Brix K., Saftig P., Peters C., Henneke P., Reinheckel T.: The endolysosomal cysteine cathepsins L and K are involved in macrophage-mediated clearance of *Staphylococcus aureus* and the concomitant cytokine induction. *FASEB J.*, 2014; 28: 162-175

[59] Niczyporuk J.S., Samorel-Salmonowicz E., Czekaj H.: Reowirusy - budowa oraz chorobotwórczość dla ludzi i zwierząt. *Postępy Mikrobiol.*, 2009; 48: 143-150

[60] Ohashi K., Naruto M., Nakaki T., Sano E.: Identification of interleukin-8 converting enzyme as cathepsin L. *Biochem. Biophys. Acta*, 2003; 1649: 30-39

[61] Padrines M., Wolf M., Walz A., Baggiolini M.: Interleukin-8 processing by neutrophil elastase, cathepsin G and proteinase-3. *FEBS Lett.*, 1994; 352: 231-235

[62] Park B., Brinkmann M.M., Spooner E., Lee C.C., Kim Y.M., Ploegh H.L.: Proteolytic cleavage in an endolysosomal compartment is required for activation of Toll-like receptor 9. *Nat. Immunol.*, 2008; 9: 1407-1414

[63] Perišić-Nanut M., Sabotić J., Jewett A., Kos J.: Cysteine cathepsins as regulators of the cytotoxicity of NK and T cells. *Front. Immunol.*, 2014; 5: 616

[64] Qi R., Singh D., Kao C.C.: Proteolytic processing regulates Toll-like receptor 3 stability and endosomal localization. *J. Biol. Chem.*, 2012; 287: 32617-32629

[65] Rutz M., Metzger J., Gellert T., Lippa P., Lipford G.B., Wagner H., Bauer S.: Toll-like receptor 9 binds single-stranded CpG-DNA in a sequence- and pH-dependent manner. *Eur. J. Immunol.*, 2004; 34: 2541-2550

[66] Saeed M.F., Kolokoltsov A.A., Albrecht T., Davey R.A.: Cellular entry of ebola virus involves uptake by a macropinocytosis-like mechanism and subsequent trafficking through early and late endosomes. *PLOS Pathog.*, 2010; 6: e1001110

[67] Sanchez A.: Analysis of filovirus entry into vero e6 cells, using inhibitors of endocytosis, endosomal acidification, structural integrity, and cathepsin (B and L) activity. *J. Infect. Dis.*, 2007; 196: S251-S258

[68] Schornberg K., Matsuyama S., Kabsch K., Delos S., Bouton A., White J.: Role of endosomal cathepsins in entry mediated by the Ebola virus glycoprotein. *J. Virol.*, 2006; 80: 4174-4178

[69] Sepulveda F.E., Maschalidi S., Colisson R., Heslop L., Ghirelli C., Sakka E., Lennon-Duménil A.M., Amigorena S., Cabanie L., Manoury B.: Critical role for asparagine endopeptidase in endocytic Toll-like

receptor signaling in dendritic cells. *Immunity*, 2009; 31: 737-748

[70] Sinha S.S., Cameron J., Brooks J.C., Leifer C.A.: Complex negative regulation of TLR9 by multiple proteolytic cleavage events. *J. Immunol.*, 2016; 197: 1343-1352

[71] Sochocka M., Błach-Olszewska Z.: Mechanizmy wrodzonej odporności. *Postępy Hig. Med. Dośw.* 2005; 59: 250-258

[72] Stoka V., Turk B., Turk V.: Lysosomal cysteine proteases: structural features and their role in apoptosis. *IUBMB Life*, 2005; 57: 347-353

[73] Szulc-Dąbrowska L., Struzik J., Ostrowska A., Guzera M., Toka F.N., Bossowska-Nowicka M., Gieryńska M.M., Winnicka A., Nowak Z., Niemiałowski M.G.: Functional paralysis of GM-CSF-derived bone marrow cells productively infected with ectromelia virus. *PLoS One*, 2017; 12: e0179166

[74] Takeda K., Akira S.: TLR signaling pathways. *Semin. Immunol.*, 2004; 16: 3-9

[75] Tan G.J., Peng Z.K., Lu J.P., Tang F.Q.: Cathepsins mediate tumor metastasis. *World J. Biol. Chem.*, 2013; 4: 91-101

[76] Tokarziewicz A., Gorodkiewicz E.: Proteazy: znaczenie, rola i oznaczanie. *Chemik*, 2015; 69: 81-88

[77] Tsai C.Y., Lu S.L., Hu C.W., Yeh C.S., Lee G.B., Lei H.Y.: Size-dependent attenuation of TLR9 signaling by gold nanoparticles in macrophages. *J. Immunol.*, 2012; 188: 68-76

[78] Turk B., Turk D., Turk V.: Lysosomal cysteine proteases: more than scavengers. *Biochim. Biophys. Acta*, 2000; 1477: 98-111

[79] Turk V., Stoka V., Vasiljeva O., Renko M., Sun T., Turk B., Turk D.: Cysteine cathepsins: From structure, function and regulation to new frontiers. *Biochim. Biophys. Acta*, 2012; 1824: 68-88

[80] Vaidya S.A., Cheng G.: Toll-like receptors and innate antiviral responses. *Curr. Opin. Immunol.*, 2003; 15: 402-407

[81] Werling D., Jungi T.W.: TOLL-like receptors linking innate and adaptive immune response. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 2003; 91: 1-12

[82] White J.M., Schornberg K.L.: A new player in the puzzle of filovirus entry. *Nat. Rev. Microbiol.*, 2012; 10: 317-322

[83] Wichmann D., Schmiedel S., Kluge S.: Isolation in patients with Ebola virus disease. *Intensive Care Med.*, 2015; 41: 511-513

[84] Williams K.C., Burdo T.H.: HIV and SIV infection - the role of cellular restriction and immune responses in viral replication and pathogenesis. *APMIS*, 2009; 117: 400-412

[85] Xiao P., Usami O., Suzuki Y., Ling H., Shimizu N., Hoshino H., Zhuang M., Ashino Y., Gu H., Hattori T.: Characterization of a CD4-independent clinical HIV-1 that can efficiently infect human hepatocytes through chemokine (C-X-C motif) receptor 4. *AIDS*, 2008; 22: 1749-1757

[86] Yoshii H., Kamiyama H., Goto K., Oishi K., Katunuma N., Tanaka Y., Hayashi H., Matsuyama T., Sato H., Yamamoto N., Kubo Y.: CD4-independent human immunodeficiency virus infection involves participation of endocytosis and cathepsin B. *PLoS One*, 2011; 6: e19352

[87] Zhou J., Zhang Y.Y., Li Q.Y., Cai Z.H.: Evolutionary history of cathepsin L (L-like) family genes in vertebrates. *Int. J. Biol. Sci.*, 2015; 11: 1016-1025

Autorzy deklarują brak potencjalnych konfliktów interesów.