

Received: 2012.06.21
Accepted: 2013.01.10
Published: 2013.04.15

Strategie przetrwania herpeswirusów – latencja i apoptoza

Herpesviruses survival strategies – latency and apoptosis

Dariusz Mischak², Anna Słońska¹, Anna Golke¹, Joanna Cymerys¹

¹ Division of Virology, Department of Preclinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine,
Warsaw University of Life Sciences – SGGW

² Interfaculty Studies of Biotechnology, Warsaw University of Life Sciences – SGGW

Streszczenie

Apoptoza to proces śmierci komórki zachodzący pod wpływem różnych bodźców, do których należą m.in. zakażenia wirusowe. Herpeswirusy wykształciły zdolność zarówno hamowania apoptozy, jak i jej indukowania w komórkach gospodarza. Wirusy te potrafią ingerować w szlak zewnętrzny i wewnętrzny apoptozy. Szczególną cechą herpeswirusów jest ustanawianie zakażenia latentnego, podczas którego ekspresja genów wirusowych jest bardzo ograniczona i nie obserwuje się wytwarzania zakaźnych cząstek wirusowych. HSV-1 ustala latencję w neuronach, CMV – w komórkach progenitorowych szpiku kostnego i monocytach, a EBV i HHV-8 w limfocytach B. Badania wykazały, że zakażenia latentne komórek gospodarza zależą także od zahamowania śmierci zakażonych komórek. Kontrola maszynarii apoptotycznej przez wirusy może być istotna dla ich replikacji oraz zapewnienia wytworzenia odpowiedniej liczby wirionów potomnych. W pracy omówiono latentne zakażenia wirusowe i mechanizmy modulacji apoptozy na wybranych przykładach wirusów z rodziny *Herpesviridae*.

Słowa kluczowe: herpeswirusy • latencja • apoptoza • reaktywacja

Summary

Apoptosis is a process of programmed cell death in response to various stimuli, including virus infection. Herpesviruses have evolved the ability to interfere with apoptosis by its inhibition or activation in host cells. They can interfere with the extrinsic and intrinsic pathways of apoptosis. A special feature of herpesviruses is establishing a latent infection, during which expression of virus genes is strongly restricted and production of infectious virus particles is not observed. HSV-1 establishes latency in neurons, CMV in bone marrow progenitor cells and monocytes, EBV and HHV-8 in B cells. Studies show that latent infections also depend on prevention of the death of the infected cells. Control of apoptosis machinery by viruses may be critical for their reproduction and provision of the adequate yield of progeny virions.

The present article summarizes the current knowledge about the latent viral infection and mechanisms of apoptosis modulation by selected viruses from the *Herpesviridae* family.

Keywords: herpesviruses • latency • apoptosis • reactivation

Full-text PDF: <http://www.phmd.pl/fulltxt.php?ICID=1044688>

Word count: 5577
Tables: 1
Figures: 1
References: 55

Author's address: dr Joanna Cymerys, Zakład Wirusologii, Katedra Nauk Przedklinicznych, Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie – SGGW, ul. Ciszewskiego 8, 02-786 Warszawa; e-mail: jcymerys@op.pl

Wykaz skrótów: **ADV** – wirus choroby Aujeszky'ego (Aujeszky's disease virus), **AIF** – czynnik indukujący apoptozę (apoptosis inducing factor), **ANA** – antygen jądrowy LANA (latency associated nuclear antigen), **BHV-1** – bydłęcy herpeswirus typu 1 (bovine herpesvirus 1), **BLIMP1** – czynnik transkrypcyjny BLIMP 1 (B lymphocyte-induced maturation protein 1), **c/v-FLIP** – komórkowe/wirusowe białko FLIP (cellular/viral FLICE inhibitory protein), **EBV** – wirus Epsteina-Barr (Epstein-Barr virus), **FADD** – białko adaptorowe FADD (Fas associated death domain), **HHV-1; HSV-1** – ludzki herpeswirus typu 1; wirus opryszczki pospolitej typu 1 (human herpesvirus type 1; herpes simplex virus type 1), **HHV-2; HSV-2** – ludzki herpeswirus typu 2; wirus opryszczki typu 2 (human herpesvirus type 2; herpes simplex virus type 2), **HHV-3; VZV** – ludzki herpeswirus typu 2; wirus ospy wietrznej/półpaśca (human herpesvirus type 3; varicella-zoster virus), **HHV-4; EBV** – ludzki herpeswirus typu 4; wirus Epsteina-Barr (human herpesvirus type 4; Epstein-Barr virus), **HHV-5; CMV** – ludzki herpeswirus typu 5; wirus cytomegalii (human herpesvirus type 5; cytomegalovirus), **HHV-6; HHV-7** – wirusy rumienia nagłego (gorączka trzydniowa) (human herpesvirus type 6; human herpesvirus type 7), **HHV-8; KSHV** – ludzki herpeswirus typu 8; wirus mięsaka Kaposiego (human herpesvirus type 8; Kaposi's sarcoma associated herpesvirus), **IAP** – białkowy inhibitor apoptozy (inhibitor of apoptosis protein), **K-bZIP** – regulator transkrypcyjny K-bZIP (KSHV basic zipper), **LAT** – transkrypt związany z latencją (latency associated transcript), **LRP** – białko LRP (latency related protein), **MIEP** – główny promotor genów przedwczesnych (major intermediate early promoter), **PCD** – programowana śmierć komórki, apoptoza (programmed cell death, apoptosis), **RISC** – kompleks wyciszający RNA (RNA induced silencing complex), **SAPK** – kinaza białkowa SAPK (stress activated protein kinase), **TNF-α** – czynniki martwicy nowotworu alfa (tumor necrosis factor α), **TRADD** – białko adaptorowe TRADD (TNF receptor associated death domain).

WPROWADZENIE

Herpeswirusy są dużymi osłonkowymi wirusami, których genomem jest dwuniciowy DNA o wielkości 120-130 kb. W taksonomii herpeswirusów wyróżniono trzy podrodziny: *Alphaherpesvirinae*, *Betaherpesvirinae*, *Gammaherpesvirinae*. Herpeswirusy patogenne dla człowieka reprezentują wszystkie podrodziny *Herpesviridae*. Do pierwszej podrodziny zalicza się HSV-1 (HHV-1) i HSV-2 (HHV-2) (wirusy opryszczki pospolitej) oraz HHV-3 (wirus ospy wietrznej i półpaśca VZV). Podrodzinę *Betaherpesvirinae* reprezentują: ludzki cytomegalowirus CMV (HHV-5) oraz ludzkie herpeswirusy typu 6 i 7 (HHV-6 i HHV-7). Przedstawicielami *Gammaherpesvirinae* są natomiast wirus Epsteina-Barr (HHV-4) oraz ludzki herpeswirus typu 8 (HHV-8).

Wspólną cechą herpeswirusów jest zdolność do latencji [7], która może być zdefiniowana jako brak zakaźnych cząstek wirusowych w komórce gospodarza z jednoczesną możliwością ich wytwarzania w sprzyjających warunkach [18]. W trakcie latencji cały wirusowy genom znajduje się w komórce, a jego ekspresja jest bardzo ograniczona. Aby dane zakażenie można było zakwalifikować jako zakażenie latentne, muszą zostać spełnione dwa warunki. Zakażenie musi być trwałe, czyli utrzymane mimo odpowiedzi ze strony układu immunologicznego gospodarza, a także w obliczu innych niesprzyjających sygnałów w środowisku komórki. Musi to być zakażenie odwracalne, a więc w określonych okolicznościach dochodzi do reaktywacji wirusa, czyli następuje pełna ekspresja wirusowych genów

z jednoczesnym wytwarzaniem wirionów potomnych, co jest określane jako zakażenie produktywne [48]. Latencja jest zjawiskiem swoistym komórkowo, co oznacza, że wirus wywołuje zakażenie latentne tylko w określonych komórkach. Podział herpeswirusów na podrodziny odzwierciedla ich tropizm do różnych typów komórek gospodarza: alfa-herpeswirusy ustalają zakażenie latentne głównie w neuronach, beta-herpeswirusy – w subpopulacjach komórek hematopoetycznych, natomiast miejscem latencji gamma-herpeswirusów są limfocyty B (tab. 1) [40].

Jednym z mechanizmów obronnych skierowanych przeciwko wewnątrzkomórkowemu czynnikom chorobotwórczym jest programowana śmierć komórki, czyli apoptoza. Podczas apoptozy degradacji ulegają białka i kwasy nukleinowe zarówno komórki, jak i wirusa, który do niej wtrągnięty. W ten sposób śmierć zakażonej komórki zapobiega rozprzestrzenianiu się zakażenia. W „interesie” wirusów leży więc przeciwdziałanie zniszczeniu komórek, które są miejscem ich replikacji. Co więcej, w przypadku herpeswirusów, których główną strategią przetrwania w środowisku jest zdolność do ustalania zakażenia latentnego, możliwość zablokowania śmierci komórki poprzez oddziaływanie na szlaki apoptotyczne odgrywa główną rolę.

W procesie apoptozy można wyróżnić następujące etapy – fazę inicjatorową (wzbudzenia), podczas której komórki otrzymują sygnały, mogące prowadzić do aktywacji szlaków PCD, fazę wykonawczą obejmującą transdukcję sygnału do systemu bezpośrednich wykonawców śmierci oraz zwią-

Tabela 1. Komórki docelowe replikacji oraz komórki zakażone latentnie przez herpeswirusy

Podrodzina	Wirus	Komórki docelowe replikacji	Komórki zakażone latentnie
Alphaherpesvirinae	HSV-1	nabłonkowe i keratynocyty	neurony
	HSV-2	nabłonkowe i keratynocyty	neurony
	VZV	nabłonkowe, śródbłonkowe, Langerhansa, keratynocyty, limfocyty T, sebocyty, monocyty, jednojądrzaste komórki krwi obwodowej	neurony
	BHV-1	nabłonkowe	neurony
	EHV-1	nabłonkowe, leukocyty	leukocyty, neurony
	PRV	nabłonkowe	neurony
Betaherpesvirinae	HCMV	makrofagi, kom. dendrytyczne, nabłonkowe, mięśni gładkich, śródbłonkowe i fibroblasty	komórki szpiku kostnego CD34 ⁺ monocyty
	HHV-6	limfocyty T	komórki progenitorowe szpiku kostnego
	HHV-7	limfocyty T	limfocyty T
Gammaherpesvirinae	EBV	limfocyty B i kom. nabłonkowe	limfocyty B
	HHV-8	limfocyty	limfocyty B

Opracowano na podstawie [3,10,40]

zaną z aktywacją proteaz i ich regulatorów, a także fazę zniszczenia, podczas której aktywne proteazy niszczą struktury komórkowe, zarówno bezpośrednio, jak i pośrednio, poprzez aktywację innych enzymów. W tej fazie dochodzi do fragmentacji DNA, rozbicia cytoszkieletu, formowania ciałek apoptotycznych oraz ich fagocytozy przez otaczające, nieuszkodzone komórki tkanki lub narządu [15,36].

MODULACJA APOPTOZY PODCZAS ZAKAŻENIA LATENTNEGO

Wirusy w trakcie ewolucji wykształciły mechanizmy ingerowania w szlaki przebiegu apoptozy, aby w ten sposób dostosować czas życia i śmierci komórki do własnych potrzeb. Z jednej strony wirusy blokują apoptozę, zapobiegając przedwczesnej śmierci komórki, gdyż ich replikacja jest całkowicie od niej uzależniona. Z drugiej strony niektóre wirusy mają zdolność indukcji apoptozy, aby w ten sposób móc łatwiej rozprzestrzenić się na sąsiadujące komórki, bez wywoływania odpowiedzi zapalnej [24,38]. Mogą również ingerować w szlaki apoptozy na różnych etapach ich przebiegu. Produkty genów wirusowych mogą wpływać na przekazanie sygnału do komórki, szlak indukcji apoptozy związany z interferonem, a ponadto mogą stanowić homologii białek Bcl-2, inhibitory kaspaz, manipulatory cyklu komórkowego, regulatory stresu oksydacyjnego, kinazy białkowe, czynniki transkrypcyjne i czynniki działające na siateczkę śródplazmatyczną, aby mieć możliwość efektywnego namnożenia się w komórce (ryc. 1) [24].

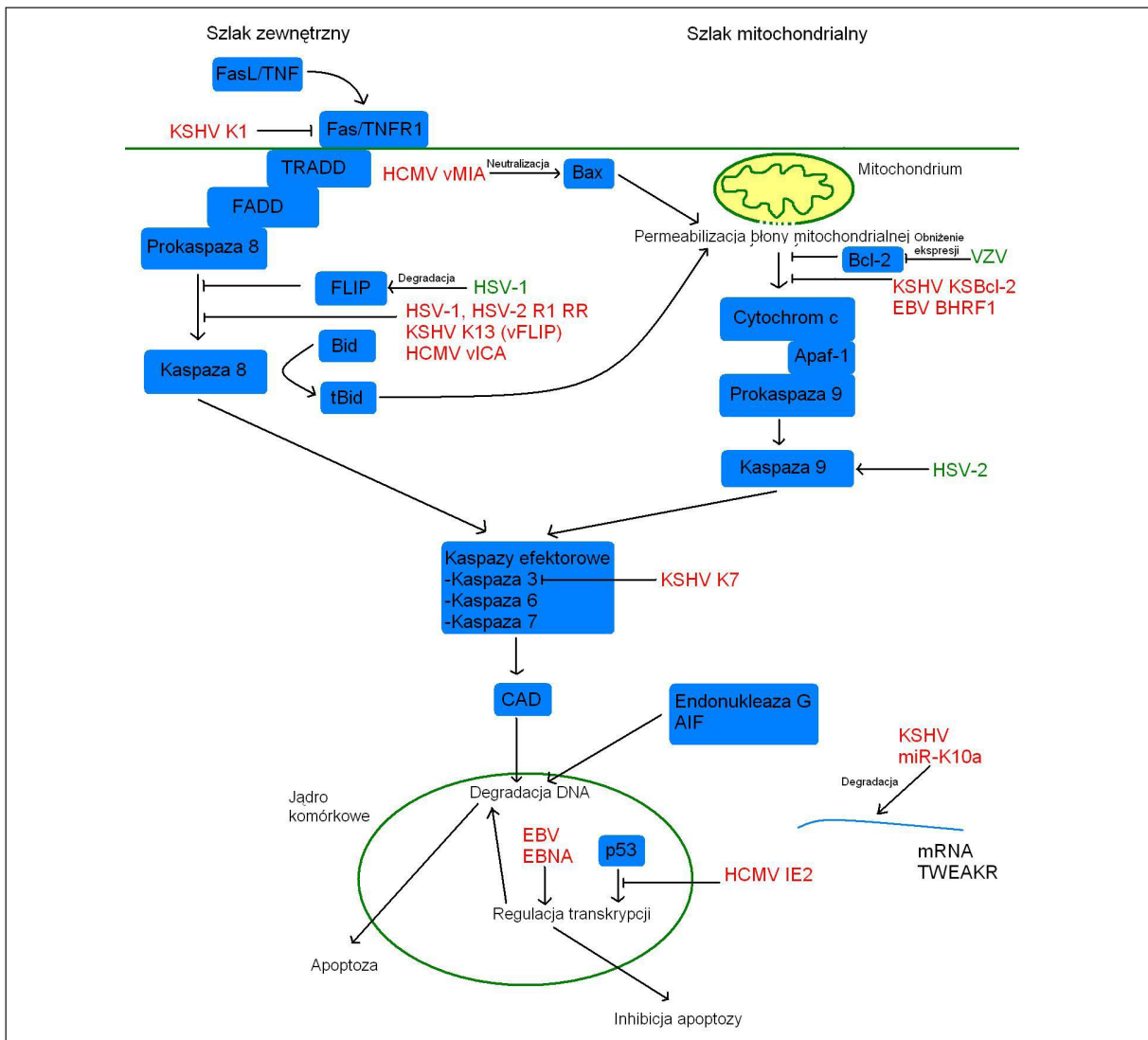
Latencja wirusa herpes simplex typu 1

Wirus opryszczki pospolitej (herpes simplex virus – HSV-1) po wnikięciu do organizmu, odbywającym się na ogół przez bezpośredni kontakt błony śluzowej przedstonka jamy ustnej, replikuje się w komórkach nabłonkowych i wnika do zakończeń neuronów czuciowych w pobliżu miejsca pierwotnej

replikacji. Wirion HSV-1 poprzez transport aksonalny przemieszcza się do ciała komórek nerwowych umiejscowionych w zwoju nerwu trójdzielnego [7]. Ustanowienie zakażenia latentnego wiąże się z wygaszeniem ekspresji genów przedwczesnych, odpowiedzialnych za aktywację pozostałych genów. Prawdopodobnie odbywa się to na skutek utraty funkcji białka VP16 lub zablokowania genów przedwczesnych, mimo obecności funkcji VP16. Białko to jest składnikiem tegumentu wirusa i wraz z białkami komórkowymi: HCF-1 (host cell factor-1) i Oct odpowiada za uruchomienie pełnej ekspresji genów wirusowych [40]. Najnowsze doniesienia [11] wskazują również na rolę układu immunologicznego w procesie ustanowienia latencji. Dowiedziono, iż interferon alfa jest konieczny do skutecznego ustanowienia latencji przez herpeswirusy.

Zakażenie latentne polega na przetrwaniu genomu wirusowego w komórce oraz utrzymaniu komórki przy życiu. Jedyńm transkryptem wykrywanym w latentnie zakażonej komórce jest transkrypt związany z latencją (latency associated transcript – LAT). Jego promotor ma miejsca wiązania dla czynników transkrypcyjnych swoistych dla neuronów oraz – w przeciwieństwie do promotorów genów uczestniczących w fazie litycznej – jest powiązany z histonami wykazującymi cechy aktywnej transkrypcyjnie euchromatyny. Dotąd nie wykazano, aby LAT kodował jakiekolwiek białko. Raczej uznaje się, że LAT jest przekształcany w cząsteczki miRNA i przynajmniej jedna z nich ma zdolność do wyciszania mRNA kodowanych przez przedwczesny gen *ICP0*, który może indukować ekspresję innych genów wirusowych i w ten sposób aktywować cykl lityczny [40].

LAT wykrywany jest głównie w jądrze komórkowym, ale jest także obecny w cytoplazmie, związany z poliribosomami lub czynnikami odpowiadającymi za splicing. *Locus*



Ryc. 1. Schemat ingerencji herpeswirusów w szlaki apoptotyczne. Wirusy i produkty genów wirusowych promujące apoptozę są oznaczone na zielono, natomiast hamujące apoptozę na czerwono. Opracowanie własne na podstawie [24]

LAT koduje małe niekodujące RNA, które mogą odpowiadać za regulację ekspresji genów. LAT miR-H6 zmniejsza stężenie białka ICP4, natomiast LAT miR-H2-3p zmniejsza stężenie białka ICP0. Oba rodzaje miRNA nie mają wpływu na poziom cząsteczek mRNA, które je kodują. Blokowanie syntezy białek ICP0 i ICP4 przez miRNA sugeruje, że mogą być ważne w ustanowieniu lub utrzymaniu zakażenia latentnego [41].

Istotną rolę w reaktywacji zakażenia latentnego HSV-1 odgrywa odpowiedź centralnego i obwodowego układu nerwowego na uraz, stres czy immunosupresję. Stres podwyższa poziom kortykosteroidów, które z kolei wpływają na aktywność neuronów. Stwierdzono, że deksametazon, syntetyczny kortykosteroid, aktywuje ekspresję genów wirusowych i stymuluje miejsce replikacji HSV-1 (ori-L) w komórkach nerwowych [41].

Białkiem najczęściej uznawanym za induktora reaktywacji jest ICP0. Na modelach zwierzęcych dowiedziono, iż wiru-

sy z mutacją w tym genie wyraźnie nie wykazują zdolności do reaktywacji. Bezpośrednim zdarzeniem rozpoczynającym reaktywację jest prawdopodobnie ekspresja białka VP16 *de novo*, na skutek aktywacji jego promotora pod wpływem czynników stresowych [40].

Jak już wcześniej wspomniano, główną rolę w ochronie komórki przed bodźcami apoptotycznymi podczas latencji zapewnia LAT. Główny LAT (major LAT – mLAT) obejmuje transkrypt o długości 8,3 kb zaczynający się od 118803 nukleotydu do miejsca poliadenylacji – 127140 nukleotyd [2]. Pierwotny 8,3 kb LAT ulega splicingowi, dając stabilny 2,0 kb intron z dosyntetyzowanym ogonkiem polyA [31,39]. Badania wykazały, iż LAT wpływa na akumulację transkryptów (Bcl-XL i Bcl-XS), których białka biorą udział w regulacji apoptozy. Hamuje akumulację proapoptotycznego Bcl-XS, co wskazuje, że LAT nasila splicing Bcl-X w kierunku antyapoptotycznego Bcl-XL lub stabilizuje Bcl-XL RNA i jednocześnie destabilizuje Bcl-XS RNA [39]. Badania Li i wsp. [31], wskazują na in-

terakcje sekwencji kodowanych przez LAT (bezpośrednio lub pośrednio) z białkową kinazą serynowo-treoninową Akt, znaną także jako kinaza białkowa B (protein kinase B – PKB). Wpływa m.in. na fosforylację Akt (seryna 473) podczas indukcji apoptozy, wywołanej niedoborem surowicy w komórkach mysiej neuroblastomy.

Podczas zakażenia produktywnego HSV-1 bardzo ważną rolę pełni wirusowa kinaza serynowo-treoninowa Us3, która fosforyluje białka w obrębie sekwencji bogatych w argininę. We współpracy z Us5 silnie hamuje apoptozę zaindukowaną zarówno aktywacją receptora Fas, jak i pod wpływem promieniowania UV [24,38]. Przypisuje się jej także inne role, takie jak: regulacja opuszczania jądra przez nukleokapsydy wirusa czy obniżenie ilości osłonkowej glikoproteiny B na powierzchni komórki [35,45]. Kinaza białkowa Us3 może także powodować hiperfosforylację deacetylazy histonowej 2, która wycisza transkrypcję wirusowego DNA, a w efekcie replikację wirusa, powodując deacetylację lizyny w ogonkach histonowych, co skutkuje kondensacją chromatyny [53]. Mechanizm działania kinazy Us5 nie został jeszcze poznany, za to dowiedziono, że w zakażonych komórkach jest umiejscowiona w różnych strukturach błonowych i może wpływać na generowanie reaktywnych form tlenu, których wpływ na apoptozę jest złożony (zarówno pro- jak i antyapoptotyczny) [4]. Ekspresja Us5 chroni przed apoptozą indukowaną granzymem B i aktywacją receptora Fas [21]. Ochronę przed śmiercią komórki zapewnia także podjednostka R1 reduktazy rybonukleotydowej występująca zarówno u HSV-1 jak i HSV-2. Chroni ona komórkę przed apoptozą spowodowaną przez TNF- α i FasL pod wpływem oddziaływania z kaspazą 8. Dokładniejszy mechanizm działania został zaproponowany dla podjednostki R1 należącej do HSV-2 [14]. Ostatnim już białkiem uczestniczącym w ochronie komórki przed apoptozą jest glikoproteina D, która dodatkowo odgrywa ważną rolę w procesie przenikania HSV-1 do komórki gospodarza. Badania nad tą glikoproteiną wskazują, że ma ona oddzielne domeny pełniące dwie różne funkcje: wniknięcie do komórki i hamowanie apoptozy [55].

Aubert i wsp. [5], zaproponowali nowy mechanizm zapobiegający śmierci komórki przez HSV-1. Wykazali, że HSV-1 hamuje apoptozę zakażonych ludzkich komórek nabłonkowych przez niedopuszczenie do uwolnienia cytochromu c z mitochondrium niezależnie od aktywacji kaspazy. Mechanizm tego zjawiska opiera się na blokowaniu translokacji proapoptotycznego białka Bax do mitochondriów.

HSV-1 poza blokowaniem programowanej śmierci komórki, ma także zdolność wytwarzania czynników, mogących indukować apoptozę w komórkach układu immunologicznego – limfocytach T, limfocytach B, makrofagach i komórkach dendrytycznych [21,27]. Apoptoza w komórkach dendrytycznych przez HSV-1 jest spowodowana przez obniżenie ekspresji komórkowych białek blokujących aktywację kaspazy 8 – cFLIP (na poziomie białka przez wirusowe lub komórkowe proteazy), a także zmniejszenie ekspresji LAT [27,33]. Mechanizm wywołania apoptozy

w limfocytach T nie jest do końca wyjaśniony, ale odkryto, że wirus opryszczki podczas infekcji blokuje transdukcję sygnału spowodowaną aktywacją receptora TcR [21].

Latencja wirusa cytomegalii

CMV powoduje długotrwałe zakażenie latentne komórek hematopoetycznych linii mieloidalnej. Dzięki technice PCR, DNA tego wirusa wykryto w komórkach o fenotypie CD34 i CD33 w szpiku, a także w jednojądrzastych komórkach krwi obwodowej o fenotypie CD14 [47]. Badania Reevesa i wsp. [44] wykazują, że CMV występuje także w progenitorowych komórkach dendrytycznych pochodzących z linii mieloidalnej.

Ustanowienie latencji jest bezpośrednio związane z procesem wyciszenia genów przedwczesnych. Ekspresja genów wirusa cytomegalii, podobnie jak innych herpeswirusów, następuje w sposób kaskadowy. Głównymi transaktywatorami ekspresji genów są białka IE1 oraz IE2 [47]. Ekspresja obu białek pozostaje pod kontrolą głównego promotora genów przedwczesnych (major intermediate early promoter – MIEP), który jest uzależniony od białka pp71 będącego składnikiem tegumentu. Po zakażeniu komórki pp71 przemieszcza się do jądra komórkowego i aktywuje MIEP przez inaktywację komórkowych mechanizmów obronnych wyciszających ekspresję genów CMV, co umożliwia replikację lityczną. Szczególnym wydarzeniem w przeciwdziałaniu temu procesowi jest degradacja białka Daxx zaindukowana przez pp71. Jak wcześniej wspomniano, podczas ustanawiania latencji nie dochodzi do ekspresji genów przedwczesnych CMV. Przypuszczalnie następuje to w wyniku utraty funkcji przez pp71, blokowanie IE lub kombinację obu mechanizmów. Wydaje się, iż w populacji komórek CD34⁺ oba mechanizmy są wykorzystywane, a degradacja Daxx przez pp71 jest niemożliwa ze względu na brak transportu pp71 do jądra komórkowego [40].

Utrzymanie latencji przez CMV jest słabo poznane. W przeciwieństwie do innych beta-herpeswirusów, które mają zdolność insercji genomu do genomu komórkowego, genom CMV w czasie latencji jest episomalną, kolistą cząsteczką [40].

Podczas latencji CMV ekspresji ulega tylko kilka genów, do których należą *CLT3*, *US28*, *vIL-10*, *LUNA* i *UL138*. *CLT3* (CMV latency transcripts) są sensownymi i antysensownymi cząsteczkami RNA mogącymi ulegać translacji. *US28* jest receptorem dla chemokiny, którego rola w latencji nie została jeszcze zbadana. *vIL-10* jest wirusowym analogiem IL-10, która może zapewniać ochronę przed nadzorem immunologicznym. *LUNA* (latency unidentified nuclear antigen) stanowi ramkę odczytu kodowaną przez transkrypt antysensowny do regionu genomu *UL81-UL82*. *LUNA* może być białkiem funkcjonalnym, a transkrypt ma możliwość regulacji ekspresji pp71 *de novo* (pp71 kodowany jest przez gen *UL82*). *UL138* koduje białko niezbędne do utrzymania latencji [40]. Wykazano, iż przerwanie sekwencji kodującej tego genu uniemożliwiło ustanowienie latencji i doprowadziło do produktywniej replikacji wirusa. Gen ten koduje trzy

transkrypty, z których otrzymywanych jest następnie kilka białek (pUL133, pUL135, pUL136, pUL138), co dowodzi, że może być genem odpowiadającym za koordynację ekspresji genów odpowiedzialnych za latencję [19].

Różnicowanie się monocytów krwi obwodowej prowadzi do powstania fenotypu pozwalającego na infekcję, a w komórkach, które przetrzymywały genom wirusowy w stanie utajonym umożliwia to indukcję ekspresji genów przedwczesnych. Sugeruje to, że ekspresja genów przedwczesnych jest zależna od stopnia zróżnicowania komórki. Procesowi różnicowania towarzyszy wzrost poziomu aktyuatorów MIEP i dlatego wydaje się prawdopodobne, że stan latencji CMV jest uzależniony od równowagi między aktyuatorami i represorami genów przedwczesnych tego wirusa. Zmiany zachodzące podczas różnicowania się monocytów w makrofagii prowadzą do obniżenia poziomu represorów i wzrostu poziomu aktyuatorów, co uaktywnia MIEP, ekspresję genów przedwczesnych oraz pozostałych, co z kolei skutkuje reaktywacją i uwolnieniem zakaźnych cząstek wirusowych [47].

Indukcja reaktywacji CMV jest procesem nie do końca poznanym. Zaproponowano dwa modele:

- ekspresję *de novo* komórkowych czynników transkrypcyjnych – swoistych dla MIEP po różnicowaniu lub
- syntezę *de novo* białka pp71 [40].

CMV ma dwa geny przedwczesne, których produkty w sposób niezależny blokują apoptozę. *IE1* i *IE2* są czynnikami transkrypcyjnymi; *IE2* wiąże się z białkami oddziałującymi z sekwencjami TATA box – pRb i p53. Wykazano, że *IE2* hamuje aktywność transkrypcyjną p53, co może świadczyć o jego zdolności do zapobiegania śmierci komórki [38]. Najlepiej scharakteryzowanym czynnikiem CMV jest produkt genu UL37, znany jako vMIA (viral mitochondria localized inhibitor of apoptosis), który hamuje apoptozę indukowaną różnymi bodźcami (np. aktywacja receptora śmierci czy substancje cytotoksyczne). Mimo że vMIA nie wykazuje żadnego strukturalnego podobieństwa do Bcl-2, zapobiega permeabilizacji błony mitochondrialnej na poziomie mitochondrium poprzez neutralizację Bax [16].

Inny gen CMV – *UL36* koduje wirusowy inhibitor aktywacji kaspazy 8 (viral inhibitor of caspase 8 activation – vICA), który blokuje apoptozę indukowaną aktywacją receptora Fas przez wiązanie się do prodomeny kaspazy 8 i uniemożliwienie autoproteolitycznej aktywacji. Ostatnio odkryto inny mechanizm, który opiera się na interakcji 2,7 kb wirusowego RNA ($\beta 2,7$) z kompleksem I łańcucha oddechowego. Zapobiega to uwolnieniu z mitochondrium podjednostki GRIM-19 kompleksu I [16].

Latencja wirusa Epsteina-Barr

Podczas zakażenia wirusem Epsteina-Barr (Epstein-Barr Virus – EBV), w fazie latentnej mogą wystąpić trzy różne modele ekspresji genów, dzięki czemu wyróżnia się trzy

typy latencji. Pierwszy typ latencji charakteryzuje się ekspresją EBNA-1 (Epstein-Barr nuclear antigen 1) oraz małe niekodujących RNA – EBER1 i EBER2 (EBV Encoded small RNA). Ten model ekspresji genów występuje w przypadku chłoniaka Burkitta. W latencji drugiego typu poza EBNA i EBER występują dodatkowo błonowe antygeny LMP-1, LMP-2A, LMP-2B (latent membrane protein). Jest on charakterystyczny dla takich chorób jak: rak nosogardzieli, chłoniak Hodgkina i chłoniak T-komórkowy. Podczas utajenia typu trzeciego, występującego w przebiegu chorób limfoproliferacyjnych związanych z immunosupresją dochodzi do ekspresji: EBNA-1, EBNA-2, EBNA-3A, EBNA-3B, EBNA-3C, EBNA-LP, trzech białek błonowych – LMP-1, LMP-2A i LMP-2B oraz dwóch EBERs. Ponadto we wszystkich typach latencji występują jeszcze transkrypty z regionu BamH1A genomu wirusa, których funkcja nie jest znana [8].

Wirus Epsteina-Barr wykrywany jest w krwi obwodowej głównie w spoczynkowych limfocytach B. Można go wykryć także w limfocytach Th1 oraz rzadko w monocytach. Po ustanowieniu latencji w spoczynkowych limfocytach B przedostaje się do puli komórek B pamięci. Obecność EBV stwierdzono w:

- limfocytach B (CD19+, sIgD+), które wykazują fenotyp limfoblastów oraz typ III latencji;
- ośrodkach namnażania limfocytów B (typ II latencji);
- proliferujących limfocytach B pamięci (typ I latencji) oraz
- komórkach plazmatycznych, w których EBV uruchamia cykl lityczny. Genom wirusa przechodzi do jądra komórkowego, gdzie staje się kolistą cząsteczką funkcjonującą jako episom [48].

Po pierwotnej infekcji w limfocytach B dochodzi do ustanowienia w nich zakażenia latentnego. Przynajmniej trzy geny fazy litycznej ulegają ekspresji po latentnej infekcji spoczynkowych limfocytów B. Należą do nich homologii białek Bcl-2: BALF1 i BHRF1 oraz białko BZLF1. Dwa pierwsze geny kodują czynniki o aktywności antyapoptotycznej. Gen *BZLF1* koduje białko Z, które jest czynnikiem transkrypcyjnym zaangażowanym w aktywację kolejnych klas genów podczas zakażenia litycznego. Rola białka Z podczas ustalania latencji jest odmienna od funkcji, jaką pełni w trakcie reaktywacji, podczas której uruchamia ekspresję wczesnych i późnych genów oraz aktywuje miejsce ori podczas zakażenia produktywnego. Podczas ustanawiania zakażenia latentnego ekspresja genów wczesnych i późnych pozostaje wyciszona, mimo obecności białka Z, co tłumaczy się brakiem metylacji genomu EBV na początku zakażenia. Białko Z wykazuje zdolność silniejszego wiązania się z metylowanym DNA w porównaniu do DNA niemetylowanego, co z kolei zwiększa aktywność metylowanych promotorów. Podczas ustanawiania latencji genom wirusa jest niemetylowany, więc białko Z nie jest w stanie włączyć ekspresji białek wczesnych i późnych [40,48]. Główną rolę w ustaleniu latencji pełni ZIIR, który jest elementem *cis*-regulatorowym

promotora genu białka Z. Przyłączenie się do niego czynnika komórkowego (do tej pory niepoznanego) powoduje wyciszenie genu *BZLF1* [54]. Innym białkiem wirusowym, ważnym w indukcji fazy litycznej, jest białko R kodowane przez gen *BRLF1*. Jest ono czynnikiem transkrypcyjnym, który w przeciwieństwie do Zta aktywuje promotory niemetylowane [40,48]. Ostatnie doniesienia wskazują na rolę białka tegumentu EBV jako niezbędnego czynnika, biorącego udział w ustanowieniu zakażenia latentnego. Białkiem tym jest BNRF1, które wiąże się do komórkowego białka Daxx oraz rozkłada kompleksy Daxx i ATRX (alpha thalassemia/mental retardation syndrome X-linked). Oba te białka hamują ekspresję wirusowych genów [51]. Badania Kruga i wsp. [28] nad myślim gamma-herpeswirusem 68 (γHV68) ustalającym zakażenie latente podobnie jak EBV w limfocytach B, wskazują na podstawową rolę NF-κB w ustanowieniu latencji u gamma-herpeswirusów.

Wirus Epsteina-Barr transformuje i powoduje immortalizację limfocytów B, tworząc w ten sposób limfoblastoidalne linie komórkowe. Komórki te ulegają podziałom, więc musi być zapewniona replikacja wirusowego genomu i przekazanie go do komórek potomnych w stanie latencji [40]. W latentnie zakażonych komórkach zidentyfikowano 9 wirusowych białek oraz kilka wirusowych, niekodujących RNA. Wirusowe białka występujące w trakcie latencji można podzielić na dwie zasadnicze grupy: 6 antygenów jądrowych (EBNAs) oraz 3 antygeny błonowe (LMPs) [48].

We wstępnej fazie zakażenia wirusem Epsteina-Barr, transkrypcja genu *EBNA* jest inicjowana przez promotor Wp. W genomie wirusa występuje wiele kopii tego promotora, a jego funkcją jest uruchamianie transkrypcji *EBNA* w nowo zainfekowanych, spoczynkowych limfocytach B. Pierwszymi białkami ulegającymi ekspresji są EBNA-LP i EBNA2, które przełączają ekspresję na inny promotor, nazywany promotorem Cp, odpowiadający za ekspresję pozostałych białek EBNA. Alternatywnym promotorem jest promotor Qp, którego transkrypty ulegają splicingowi wyłącznie do EBNA1, z jednoczesnym pominięciem białka EBNA3. W przeciwieństwie do promotorów Wp i Cp, promotor Qp nie zawiera sekwencji TATA, co wydaje się zjawiskiem podobnym dla promotorów genów housekeeping. Sugeruje to, że może pełnić on funkcję dodatkowego promotora gwarantującego ekspresję EBNA1 podczas braku inicjacji transkrypcji z promotora Cp i/lub Wp [40].

Ważnym białkiem, będącym produktem transkryptów promotora Cp, jest EBNA-1, które odgrywa główną rolę w latencji przez wiązanie się z sekwencjami oriP i inicjowanie replikacji episomalnego DNA. Replikacja dokonana jest z udziałem głównie enzymów komórkowych i dokonuje się wspólnie z replikacją DNA komórkowego. Dodatkowo EBNA-1 pełni ważną funkcję w segregacji DNA w dzielących się komórkach dzięki wiązaniu się z chromosomami metafazowymi [48].

Poszczególne typy latencji są wyrażone poprzez alternatywne konformacje chromatyny. Badania wykazały, iż wzmacniacz transkrypcyjny znajdujący się w miejscu oriP

tworzy stabilną pętlę z jednym z dwóch różnych promotorów. W pierwszym typie latencji oriP tworzy pętlę z aktywnym promotorem Qp, natomiast w trzecim typie latencji z aktywnym promotorem Cp. W tworzeniu pętli istotną rolę pełni CTCF (CCCTC binding factor) [49]. Ponadto CTCF zapobiega dryftowi epigenetycznemu [50].

Reaktywacja EBV następuje, gdy zakażone limfocyty B pamięci podczas stymulacji antygenem różnicują się w komórki plazmatyczne. Wydaje się, że istotną rolę we włączeniu litycznej ekspresji genów odgrywa aktywacja komórkowych czynników transkrypcyjnych BLIMP1 (B lymphocyte-induced maturation protein 1) i XBP-1 (X-box binding protein 1), następująca po różnicowaniu. Absolutnie niezbędne jest w czasie reaktywacji białko Z, które skutecznie aktywuje ekspresję wirusowych genów wczesnych i przedwczesnych. Jego ekspresja w czasie latencji jest blokowana przez komórkowe białka Zeb. Badania wskazują, że podczas różnicowania limfocytów B poziom mRNA kodujących białka Zeb spada po utworzeniu komórek plazmatycznych. Z ostatnich badań wynika, iż do indukcji ekspresji białka Z niezbędne jest także uruchomienie *de novo* ekspresji genów wirusowych. Przypuszcza się, że jego ekspresja może być uruchomiona przez syntetyzowane *de novo* białko tegumentu BNRF1 [40].

Wirus Epsteina-Barr wytwarza wiele białek związanych z kontrolą programowanej śmierci komórki, zwłaszcza podczas zakażenia latentnego. Jednym z nich jest antygen błonowy LMP-1, który działa antyapoptotycznie przez podwyższenie ekspresji białek Bcl-2, a ponadto może ingerować w kaskadę sygnałną zainicjowaną aktywacją receptora dla TNF-α oraz receptora Fas. LMP-1 hamuje apoptozę indukowaną białkiem p53 na skutek zwiększenia ilości białka A20, które jest komórkowym czynnikiem blokującym apoptozę. A20 wpływa na zewnętrzny szlak apoptozy poprzez wiązanie się do TRAF (TNFR associated factor) 1 i 2. Heteroagregaty TRAF 1 i TRAF 2 wiążą się z LMP-1 i takie kompleksy powodują rekrutację białek IAP sprzyjających przeżyciu komórki [38]. Antygen błonowy LMP-1 został uznany za główny czynnik powodujący immortalizację limfocytów B w trakcie zakażenia latentnego [48].

Inne białka tego wirusa będące antygenami jądrowymi EBNA A oraz EBNA C, lecz nie EBNA B mogą obniżyć ekspresję białka z rodziny Bcl-2 zawierającego wyłącznie domenę BH3 – białka Bim i w ten sposób obniżyć podatność komórek gospodarza na apoptozę. Ponadto udowodniono, że EBNA LP może nie tylko wpływać na transkrypcję genów gospodarza, ale również oddziałuje z „maszyną” apoptotyczną. Zaproponowano, że EBNA LP może wchodzić w interakcje z Bcl-2, mimo aktywności białka HAX1 (HCLS1 associated protein X1), mitochondrialnego inhibitora apoptozy regulowanego przez Omi/HtrA2 [16].

Modulacja apoptozy przez EBV jest możliwa również dzięki BALF1 i BHRF1, które są podobne pod względem sekwencji i struktury do Bcl-2. O ile BHRF1 wyraźnie przy-

pomina Bcl-2 pod względem pełnionej funkcji, o tyle rola BALF1, który jest zdolny do interakcji z Bax i Bak, wydaje się kontrowersyjna. Badania z wykorzystaniem mikroskopii immunoelektronowej wskazały, że BHRF1 gromadzi się razem z Bcl-2 w zewnętrznej błonie mitochondrialnej. C-końcowy fragment BHRF1, odpowiedzialny za umiejscowienie tego białka w wewnętrznych błonach komórkowych, wykazuje wysoki stopień homologii z kilkoma członkami rodziny białek Bcl-2: Bcl-2 (38%), Bcl-XL (32%) oraz Bax (34%). BHRF1 w przeciwieństwie do Bcl-2 czy Bcl-XL nie jest w stanie hamować działania białek zawierających domenę BH3, przypuszczalnie ze względu na brak miejsca wiążącego tę domenę. Mimo to, skutecznie zapobiega permeabilizacji błony mitochondrialnej i apoptozie indukowanej przez aktywację receptorów śmierci, aktywację c-myc, granzym B, zakażenia wirusowe, uszkodzenie DNA, promieniowanie gamma i wiele chemicznych induktorów apoptozy. Ponadto hamuje apoptozę spowodowaną TRA-IL (TNF related apoptosis inducing ligand), poprzez zapobieganie permeabilizacji błony mitochondrialnej przez aktywowany proteolitycznie Bid [16].

EBV ma także możliwość regulacji apoptozy przez małe cząsteczki niepoliadenylowanego RNA – EBER1 i EBER2. Uczestniczą one w ochronie przed apoptozą indukowaną IFN- α przez blokowanie szlaku białkowej kinazy R (protein kinase R – PKR), w komórkach chłoniaka Burkitta. EBER zapewnia także ochronę komórki przed apoptozą spowodowaną aktywacją receptora Fas [37].

Latencja ludzkiego herpeswirusa typu 8

Ludzki herpeswirus typu 8 (HHV-8) ustanawia zakażenia latentne w limfocytach B, w których jego genom w trakcie latencji występuje w jądrze komórkowym w postaci kolistej, dwuniciowej cząsteczki DNA związanej z białkami histonowymi. Podczas ustanawiania latencji ważną rolę odgrywa odporność nieswoista, która hamuje ekspresję genów wirusowych i replikację wirusa. Głównymi czynnikami związanymi z hamowaniem replikacji wirusa są IFN- α (blokuje inicjację replikacji) i IFN- γ (blokuje końcowe etapy replikacji). Ponadto wyciszenie ekspresji genów wirusowych jest wywoływane przez modyfikacje histonów. W regionie genomu ulegającym ekspresji podczas latencji obserwuje się zmniejszone hamowanie modyfikacji H3K27-me3 w porównaniu z resztą genomu [42].

Podczas zakażenia latentnego HHV-8 ekspresji ulega LANA (latency associated nuclear antigen), vCyklina, vFLIP oraz zestaw 25 dojrzałych cząsteczek miRNA pochodzących z 12 prekursorowych microRNA (miR-K1-K12) oraz białka należące do rodziny kaposin [42,48].

Ludzki herpeswirus typu 8, tak jak w przypadku EBV utrzymuje się w komórce i jest przekazywany do komórek potomnych w trakcie podziału. Za utrzymanie i segregację wirusowego materiału genetycznego w limfocytach B jest odpowiedzialny antygen jądrowy LANA, którego C-końcowa domena ma swoiste sekwencje wiążące się z końcowymi powtórzeniami wirusowego DNA. Zadaniem LANA

jest zainicjowanie syntezy DNA z miejsca oriP oraz rozdzielenie powielonego DNA do komórek potomnych po podziale dzięki zdolności wiązania się do chromosomów metafazowych. Funkcja ta jest niezwykle ważna do utrzymania latencji w szybko dzielących się komórkach. Dodatkowo LANA spełnia inne funkcje bezpośrednio związane z utrzymaniem zakażenia latentnego, do których należą: promowanie wzrostu i przetrwania komórki poprzez inhibicję białka p53 i pRb, a także bierze udział w blokowaniu ekspresji genów litycznych. Innym czynnikiem, ważnym podczas latencji jest v cyklina, która sprzyja utrzymaniu zakażenia latentnego przez promowanie proliferacji komórek. Wykazano, iż v cyklina tworzy aktywny kompleks z komórkowym białkiem CDK6, co w efekcie prowadzi do progresji cyklu komórkowego poprzez fosforylację pRb [42,48].

Głównym czynnikiem zapobiegającym apoptozie jest wirusowy analog komórkowych białek hamujących aktywację prokaspazy 8, są to tzw. vFLIP (K13). Białko K13 odpowiada za długotrwałe przeżycie zakażonych komórek, a jego obecność w komórce sprzyja aktywacji NF- κ B przez częściowo odrębne szlaki, które prowadzą do zmniejszenia wrażliwości komórki na indukację apoptozy przez szlak zewnętrzny i wewnętrzny oraz zmniejszenia ekspresji cytokin (IL-6, IL-8) [16,42,48].

Ponadto w ochronie komórki przed apoptozą bierze udział kaposina A, która wchodzi w interakcje z septyną 4, uważaną za domniemany aktywator kaspazy 3 [48].

Reaktywacja wirusa zachodzi pod wpływem czynników, takich jak: hipoksja, zakażenie wirusem niedoboru odporności (human immunodeficiency virus – HIV) i inne zakażenia, stan zapalny oraz stres oksydacyjny. Genami niezbędnymi w trakcie reaktywacji i mającymi na celu uruchomienie produktywnego cyklu replikacyjnego HHV-8 są geny natychmiastowo wczesne i wczesne: Rta, Mta oraz K-bZIP, których zadaniem jest regulacja ekspresji pozostałych genów wirusowych [42].

Podczas zakażenia produktywnego ochronę przed apoptozą zapewnia gen *ORF16*, który koduje homolog białka Bcl-2, białko KSBcl-2, wykazujące niewielkie podobieństwo sekwencji (15-20%) do białek takich jak: Bcl-2, Bcl-XL, Bax, Bak i BHRF1. Wydaje się interesujące, że znaczące podobieństwo w sekwencji aminokwasowej tego białka dotyczy domen BH1 i BH2, ale nie BH3. Przypuszcza się, że odmiennosć pod względem struktury i sekwencji w porównaniu do Bcl-2 wynika z tego, że KSBcl-2 nie ulega hetero- ani homodimeryzacji z innymi członkami rodziny białek Bcl-2, co może sugerować, że w trakcie ewolucji KSBcl-2 może uniknąć negatywne efekty regulatorowe proapoptotycznych białek z rodziny Bcl-2. Innym białkiem mającym ograniczoną homologię z Bcl-2 jest glikoproteina K7, strukturalnie związana z wariantem splicingu ludzkiej surwiwiny, inhibitorem apoptozy. K7 wydajnie zapobiega apoptozie zaindukowanej aktywacją receptorów śmierci, nadekspresją Bax i stresem ER wywołanym tasygarginą. K7 podobnie jak białkowe inhibitory apoptozy (IAP)

wiąże i w ten sposób hamuje kaspazę 3 przez swoją domenę BIR. Antyapoptotyczne działanie białka K7 zależy od domeny BH2, która pośredniczy w interakcjach z Bcl-2. Wydaje się, że mechanizm ten polega na łączeniu kaspaz efektorowych i Bcl-2, co prowadzi do inhibicji kaspaz przez białka Bcl-2 [16].

Innym czynnikiem antyapoptotycznym, kodowanym przez HHV-8, jest mitochondrialne białko K15. Gen K15 składa się z 8 alternatywnie składanych eksonów i koduje białka membranowe ze zróżnicowaną liczbą domen transmembranowych oraz C-końcowym regionem z domniemanym miejscem wiązania dla domen homologicznych z kinazą tyrozynową Src: SH2 (Src homology) i SH3. Kodowane przez HHV-8 białko o masie cząsteczkowej 45 kDa, składające się ze wszystkich 8 eksonów i zawierające 12 domen transmembranowych uczestniczy w regulacji ekspresji genów gospodarza ze względu na możliwość aktywacji kilku kinaz sygnałowych (JNK, ERK) oraz czynników transkrypcyjnych (NF- κ B oraz activator protein 1 – AP1). Krótsze warianty białka K15 wielkości 35 i 23 kDa, zawierające domniemane obszary C-końcowe MTS (mitochondrial targeting sequence), umiejscawiają się w mitochondrium i ER. Te izoformy genu K15 oddziałują z HAX-1 [16]. Blokowanie apoptozy przez HHV-8 odbywa się również dzięki onkoproteinie K1, która łączy się z receptorem Fas i w ten sposób zaburza indukcję apoptozy zainicjowanej przez FasL [6]. Ekspresja białka K1 występuje także w trakcie latencji, jednak jego poziom w komórce jest niezwykle niski i zwiększa się podczas cyklu litycznego [48].

HHV-8 jest zdolny regulować ekspresję genów gospodarza poprzez wirusowy miRNA, który przyłącza się do mRNA, aby w ten sposób oznaczyć transkrypt jako cel dla kompleksu RISC (RNA induced silencing complex), degradującego mRNA. Wykazano, że miR-K10a kodowany przez HHV-8 wycisza ekspresję TWEAKR (tumor necrosis factor like weak inducer of apoptosis), co wydaje się ważne przy hamowaniu apoptozy w odpowiedzi na stymulację cytokinami w komórkach nowotworowych wyprawdzonych z mięsaka Kaposiego [1]. Ekspresja mir-K10a obecna jest w trakcie latencji, lecz wzrasta po indukcji fazy litycznej [42].

JAK RADZA SOBIE Z APOPTOZĄ I INNE HERPESWIRUSY?

Ponieważ HSV-2 jest blisko spokrewniony z HSV-1, dysponuje zbliżonymi mechanizmami modulacji apoptozy. HSV-2 ma gen kodujący białkową kinazę Us3, lecz pełni ona u tego wirusa nieco inne funkcje niż kinaza Us3 HSV-1. Wykazano, że Us3 HSV-2 nie ma związku z regulacją ekspresji glikoproteiny B w błonie komórkowej, lokalizacją UL31 i UL34, a także z opuszczaniem jądra komórkowego przez nukleokapsydy [35].

Dokładniej zbadanym genem HSV-2 hamującym apoptozę jest gen *UL39* kodujący podjednostkę R1 reduktazy rybonukleotydowej, blokującej apoptozę powodowaną przyłączeniem TNF- α i FasL do odpowiednich receptorów

śmierci. Podjednostka R1 reduktazy rybonukleotydowej wchodzi w interakcję z kaspazą 8, co zaburza jej dimeryzację/aktywację i zakłóca wiązanie się kaspazy z FADD. Początkowo badania nad podjednostką R1 sugerowały jej związek ze szlakiem mitochondrialnym poprzez aktywację wielu procesów, w których uczestniczą zewnątrzkomórkowo regulowana kinaza 1/2 (extracellular regulated Kinase 1/2 – ERK 1/2), kinaza fosfatydylinozytolu 3 (phosphatidylinositol 3 kinase – PI3K) i kinaza Akt, lecz kolejne prace to wykluczyły [14]. Han i wsp. [20] udowodnili, że ekspresja genu ICP10 indukuje apoptozę w komórkach linii Jurkat, podczas gdy jego ekspresja w komórkach nabłonkowych HEP-2 (human epithelial cells), chroni komórki przed apoptozą wywołaną przez cykloheksamid i TNF- α . Sugeruje to, że skutki spowodowane przez ekspresję tego genu zależą od typu komórki.

Badania Krzyżowskiej i wsp. [29] nad rolą szlaku aktywowanego przez Fas podczas zakażenia HSV-2 mysich keratynocytów i komórek nabłonkowych *in vitro* i *in vivo*, wykazują umiarkowaną liczbę keratynocytów i komórek nabłonkowych przechodzących apoptozę. Nadmierne wytwarzanie Fas i FasL sugeruje uwrażliwienie komórek na apoptozę wywołaną obecnością FasL na sąsiadujących komórkach lub dostarczanego w sposób autokryny, jednak mimo to komórki zakażone HSV-2 są względnie odporne na apoptozę spowodowaną aktywacją receptora Fas, a śmierć tych komórek wynika z uruchomienia innego szlaku.

HSV-2, podobnie jak HSV-1, ma zdolność indukcji apoptozy w komórkach układu odpornościowego [21]. Do indukcji apoptozy w limfocytach T przez HSV-2 niezbędna jest kaspaza 9, co wskazuje na udział szlaku mitochondrialnego. Jednocześnie wykluczono zaangażowanie szlaku zewnątrzennego w śmierć limfocytów T [52].

Wirus ospy wietrznej i półpaśca (varicella zoster virus – VZV) jest kolejnym przedstawicielem podrodziny *Alphaherpesvirinae*. Reaktywacja tego wirusa w trakcie zakażenia latentnego wywołuje chorobę nazywaną półpaścem. Bóle związane z wystąpieniem tej choroby są prawdopodobnie związane z uszkodzeniem tkanki nerwowej. Ze względu na to, że czuciowe neurony, w przeciwieństwie do fibroblastów, nie ulegają apoptozie pod wpływem zakażenia VZV [26] zasugerowano, że uszkodzenie tkanki nerwowej w trakcie reaktywacji *in vivo* może być spowodowana odpowiedzią komórek układu immunologicznego [25,30].

VZV przeciwdziała mechanizmom obronnym indukowanym poprzez IFN, wskutek unikania indukcji antywirusowych działań powiązanych z aktywnością PKR i RNA-zy L. Dodatkowo, zaobserwowano przejściową aktywację szlaków kinaz z grupy MAPK (mitogen activated protein kinase), do których zalicza się m.in.: c-Jun N-terminal kinase/stress activated protein kinase (JNK/SAPK), p38/MAPK oraz ERK 1/2. Aktywacja szlaków MAPK skutkowałą powstaniem komórkowych czynników transkrypcyjnych, niezbędnych do wirusowej replikacji, bez indukowania śmierci komórki. Wydaje się, że gen *IE61* jest głównym

czynnikiem regulującym aktywność JNK/SAPK. W trakcie zakażenia VZV dochodzi również do aktywacji kaskady ERK. ERK 1/2 może fosforyzować białko Bad przez co staje się ono niezdolne do indukowania śmierci komórki [43]. Genem VZV pełniącym funkcje antyapoptotyczne jest gen *ORF63*, lecz mechanizm jego działania nie został jeszcze określony [25].

VZV indukuje apoptozę w komórkach nerki małpy, fibroblastach oraz w jednojądrzastych komórkach krwi obwodowej pobranych od zdrowych dawców, a także izolowanych od dzieci zakażonych tym wirusem. Jednak mechanizm indukcji apoptozy jest nieznan. Najnowsze doniesienia wykazują, że ważną rolę w indukcji apoptozy przez VZV w komórkach czerniaka linii MeWo odgrywa obniżenie ekspresji białek Bcl-2 [9].

Kolejnym członkiem podrodziny *Alphaherpesvirinae* jest bydlęcy herpeswirus typu 1 (bovine herpesvirus type 1 – BHV-1), który jest czynnikiem etiologicznym zakaźnego zapalenia nosa i tchawicy oraz zapalenia sromu i pochwy u krów [12,22]. Wirus ten indukuje apoptozę w stymulowanych miogieniem, jednojądrzastych komórkach krwi obwodowej. Indukcja apoptozy następuje w fazie G_0/G_1 , zatrzymując postęp cyklu komórkowego [22]. Do indukcji apoptozy wystarczy już adsorpcja BHV-1 do komórki, co wskazuje, że czynnikiem ją wywołującym jest jedna z glikoprotein wirusa. Zaproponowano, że w indukcji apoptozy w PMBC może brać udział, w sposób pośredni lub bezpośredni, glikoproteina D [23]. Badania Delhona i wsp. [12] wykazały, że neurony czuciowe nie są odporne na apoptozę wywołaną przez BHV-1, a replikacja wirusowa odgrywa rolę w wywołaniu śmierci komórki.

Genem BHV-1 hamującym apoptozę jest gen LR (latency related), który zapobiega apoptozie spowodowanej C_6 -ceramidem, fumonizyną B_1 , etopsydem w trzech różnych hodowlach komórkowych: CV-1 (fibroblasty nerki kaczki kodowana zielonosiwego), w ludzkich fibroblastach i w komórkach neuroblastomy myszy. Produkt genu LR, czyli LRP, jest powiązany z kompleksami tworzonymi przez kinazy zależne od cyklin 2 (Cdk2). Hamuje wejście w fazę S cyklu komórkowego [10]. Gen *LR* ulega transkrypcji w latentnie zakażonych neuronach i ma dwie otwarte ramki odczytu (ORF1 i ORF2) oraz dwie ramki odczytu niemające początkowej sekwencji ATG (RF-B i RF-C). Część LR RNA ulega poliadenylacji i alternatywnemu splicingowi, co sugeruje, że różne białka LR są syntetyzowane podczas określonych etapów cyklu latencja-reaktywacja [34]. Produkty genu *LR*, poza inhibicją apoptozy, hamują proliferację komórek oraz ekspresję bICP0 RNA [47]. Odkryto, że siedem dni po zakażeniu syntetyzowany jest transkrypt, który koduje białko fuzyjne ORF1/ORF2 ma-

jące możliwość wiązania się z proapoptotycznymi czynnikami komórkowymi Bid i Cdc42 [34]. ORF2 kodowany przez gen LR chroni komórki neuroblastomy Neuro-2A poprzez ingerencję zarówno w szlak zewnętrzny, jak i szlak mitochondrialny [46].

Kolejnym zwierzęcym patogenem jest wirus choroby Aujeszkiego (Aujeszky's disease virus – ADV), który po pierwotnej replikacji w nabłonku błony śluzowej jamy nosowo-gardłowej atakuje ośrodkowy układ nerwowy [3,32]. ADV jest zdolny do inhibicji apoptozy w neuronach zwoju nerwu trójdzielnego zaindukowanej obecnością wirusa w komórkach, a także wywołanej przez komórki cytotoksyczne [3]. Neurony zwoju nerwu trójdzielnego charakteryzują się większą opornością na apoptozę spowodowaną zakażeniem ADV w porównaniu z innymi komórkami świni, przy czym nie zależy to od aktywności antyapoptotycznej wirusowej kinazy Us3 [17]. Inne doniesienia wskazują na tymczasowe zahamowanie apoptozy w neuronach zakażonych przez ADV, które i tak następnie ulegają programowanej śmierci [32]. Hamowanie apoptozy przez kinazę Us3 wydaje się nie mieć znaczenia w efektywnym namnożeniu się wirusa w komórce, w przeciwieństwie do innych funkcji tego białka, np. wpływu na cytoskielet aktynowy czy regulacji transportu z jądra komórkowego [13].

PODSUMOWANIE

Herpeswirusy rozwinęły różnorodne mechanizmy ułatwiające ich ucieczkę spod kontroli układu immunologicznego gospodarza, jednakże główną strategią przetrwania w środowisku pozostaje zdolność do ustalania zakażenia latentnego. Szczególnie ważna dla utrzymania zakażenia latentnego jest regulacja szlaków apoptotycznych, dzięki czemu komórka nie ulega programowanej śmierci, zachowując zintegrowany genom wirusowy. Liczne badania wykazują, iż herpeswirusy mogą uruchamiać mechanizmy zakłócania szlaku apoptozy, a także mechanizmy umożliwiające wykorzystanie apoptozy w szerzeniu się zakażenia, przystosowujące czas życia i śmierci komórki do własnych potrzeb.

Modulacja apoptozy przez herpeswirusy, pod wieloma względami, stanowi wyzwanie dla naukowców. Istnieje wciąż wiele niejasności co do sposobu przekazywania sygnału śmierci wzbudzanego przez pojawienie się wirusów w komórce gospodarza, a także molekularnych uwarunkowań komórki do włączenia, czy też zahamowania apoptozy podczas zakażenia, zwłaszcza zakażenia latentnego. U podstaw zainteresowania mechanizmem modulacji apoptozy przez herpeswirusy leży, oprócz celów poznawczych, potencjalna możliwość regulowania i kontroli procesu zakażenia wirusowego.

PIŚMIENICTWO

- [1] Abend J.R., Uldrick T., Ziegelbauer J.Z.: Regulation of tumor necrosis factor-like weak inducer of apoptosis receptor protein (TWEAKR) expression by Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus microRNA prevents TWEAK-induced apoptosis and inflammatory cytokine expression. *J. Virol.*, 2010; 84: 12139-12151
- [2] Ahmed M., Lock M., Miller C.G., Fraser N.W.: Regions of the herpes simplex virus type 1 latency associated transcript that protect cells from apoptosis in vitro and protect neuronal cells in vivo. *J. Virol.*, 2002; 76: 717-729
- [3] Aleman N., Quiroga M.I., Lopez-Pena M., Vazquez S., Guerrero F.H., Nieto J.M.: Induction and inhibition of apoptosis by pseudorabies virus in the trigeminal ganglion during acute infection of swine. *J. Virol.*, 2001; 75: 469-479
- [4] Aubert M., Chen Z., Lang R., Dang C.H., Fowler C., Sloan D.D., Jerome K.R.: The antiapoptotic herpes simplex virus glycoprotein J localizes to multiple cellular organelles and induces reactive oxygen species formation. *J. Virol.*, 2008; 82: 617-629
- [5] Aubert M., Pomeranz L.E., Blaho J.A.: Herpes simplex virus blocks apoptosis by precluding mitochondrial cytochrome c release independent of caspase activation in infected human epithelial cells. *Apoptosis*, 2007; 12: 19-35
- [6] Berkova Z., Wang S., Wise J.F., Maeng H., Ji Y., Samaniego F.: Mechanism of Fas signaling regulation by human herpesvirus 8 K1 oncoprotein. *J. Natl. Cancer Inst.*, 2009; 101: 399-411
- [7] Bloom D.C., Giordani N.V., Kwiatkowski D.L.: Epigenetic regulation of latent HSV-1 gene expression. *Biochim. Biophys. Acta*, 2010; 1799: 246-256
- [8] Bocian J., Januszkiewicz-Lewandowska D.: Zakażenia EBV- cykl życiowy, metody diagnostyki, chorobotwórczość. *Postępy Hig. Med. Dośw.*, 2011; 65: 286-298
- [9] Brazeau E., Mahalingam E., Gilden D., Wellish M., Kaufer B.B., Osterrieder N., Pugazhenth S.: Varicella zoster virus induced apoptosis in MeWo cells is accompanied by downregulation of Bcl-2 expression. *J. Neurovirol.*, 2010; 16: 133-140
- [10] Ciacci-Zanella J., Stone M., Henderson G., Jones C.: The latency-related gene of bovine herpesvirus 1 inhibits programmed cell death. *J. Virol.*, 1999; 73: 9734-9740
- [11] De Regge N., Van Opendenbosch N., Nauwynck H.J., Efstathiou S., Favoreel H.W.: Interferon alpha induces establishment of alpha-herpesvirus latency in sensory neurons in vitro. *PLoS One*, 2010; 5: e13076
- [12] Delhon G.A., Gonzalez M.J., Murcia P.R.: Susceptibility of sensory neurons to apoptosis following infection by bovine herpesvirus type 1. *J. Gen. Virol.*, 2002; 83: 2257-2267
- [13] Deruelle M.J., De Corte N., Englebiene J., Nauwynck H.J., Favoreel H.W.: Pseudorabies virus Us3 mediated inhibition of apoptosis does not affect infectious virus production. *J. Gen. Virol.*, 2010; 91: 1127-1132
- [14] Dufour F., Sasseville A.M., Chabaud S., Massie B., Siegel R.M., Langelier Y.: The ribonucleotide reductase R1 subunits of herpes simplex virus types 1 and 2 protect cells against TNF α and FasL-induced apoptosis by interacting with caspase 8. *Apoptosis*, 2010; 16: 256-271
- [15] Elmore S.: Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol. Pathol.*, 2007; 35: 495-516
- [16] Galluzzi L., Brenner C., Morselli E., Touat Z., Kroemer G.: Viral control of mitochondrial apoptosis. *PLoS Pathog.*, 2008; 4: e1000018
- [17] Geenen K., Favoreel H.W., Nauwynck H.J.: Higher resistance of porcine trigeminal ganglion towards pseudorabies virus-induced cell death compared with other porcine cell types in vitro. *J. Gen. Virol.*, 2005; 86: 1251-1260
- [18] Gesser R.M.: The role of latency in herpesvirus infections. *Sem. Pediatric Infect. Dis.*, 1997; 8: 128-135
- [19] Grainger L., Cicchini L., Rak M., Petrucelli A., Fitzgerald K.D., Semler B.L., Goodrum F.: Stress inducible alternative translation initiation of human cytomegalovirus latency protein pUL138. *J. Virol.*, 2010; 84: 9472-9486
- [20] Han J.Y., Miller S.A., Wolfe T.M., Pourhassan H., Jerome K.R.: Cell type specific induction and inhibition of apoptosis by herpes simplex virus type 2 ICP10. *J. Virol.*, 2009; 83: 2765-2769
- [21] Han J.Y., Sloan D.D., Aubert M., Miller S.A., Dang C.H., Jerome K.R.: Apoptosis and antigen receptor function in T and B cells following exposure to herpes simplex virus. *Virology*, 2007; 359: 253-263
- [22] Hanon E., Hoornaert S., Dequiedt F., Vanderplasschen A., Lyaku J., Willems L., Pastoret P.P.: Bovine herpesvirus 1-induced apoptosis occurs at the G0/G1 phase of the cell cycle. *Virology*, 1997; 232: 351-358
- [23] Hanon E., Keil G., Van Drunen Little-Van den Hurk S., Griebel P., Vanderplasschen A., Rijsewijk F.A.M., Babiuk L., Pastoret P.P.: Bovine herpes virus 1-induced apoptotic cell death: role of glycoprotein D. *Virology*, 1999; 257: 191-197
- [24] Hay S., Kannourakis G.: A time to kill: viral manipulation of the cell death program. *J. Gen. Virol.*, 2002; 83: 1547-1564
- [25] Hood C., Cunningham A.L., Slobedman B., Arvin A.M., Sommer M.H., Kinchington P.R., Abendroth A.: Varicella zoster virus ORF63 inhibits apoptosis of primary human neurons. *J. Virol.*, 2006; 80: 1025-1031
- [26] Hood C., Cunningham A.L., Slobedman B., Boadle R.A., Abendroth A.: Varicella-zoster virus-infected human sensory neurons are resistant to apoptosis, yet human foreskin fibroblasts are susceptible: evidence for a cell-type specific apoptotic response. *J. Virol.*, 2003; 23: 12852-12864
- [27] Kather A., Raftery M.J., Devi-Rao G., Lippmann J., Giese T., Sandri-Goldin R.M., Schonrich G.: Herpes simplex virus type 1 (HSV-1) induced apoptosis in human dendritic cells as a result of downregulation of cellular FLICE inhibitory protein and reduced expression of HSV-1 antiapoptotic latency associated transcript sequences. *J. Virol.*, 2010; 84: 1034-1046
- [28] Krug L.T., Moser J.M., Dickerson S.M., Speck S.H.: Inhibition of NF- κ B activation in vivo impairs establishment of gammaherpesvirus latency. *PLoS Pathog.*, 2007; 3: e11
- [29] Krzyżowska M., Shestakov A., Eriksson K., Chiodi F.: Role of Fas/FasL in regulation of inflammation in vaginal tissue during HSV-2 infection. *Cell Death Dis.*, 2011; 2: e132
- [30] Lanier L.L.: Evolutionary struggles between NK cell and viruses. *Nat. Rev. Immunol.*, 2008; 8: 259-268
- [31] Li S., Carpenter D., Hsiang C., Wechsler S.L., Jones C.: Herpes simplex virus type 1 latency associated transcript inhibits apoptosis and promotes neurite sprouting in neuroblastoma cells following serum starvation by maintaining protein kinase B (AKT) levels. *J. Gen. Virol.*, 2010; 91: 858-866
- [32] Marcaccini A., Aleman N., Quiroga M.I., Lopez M., Guerrero F., Nieto J.M.: Temporary inhibition of neuronal apoptosis Aujeszky's disease virus-infected swine. *Vet. Microbiol.*, 2006; 113: 237-242
- [33] McLaughlin B.: The kinder side of killer proteases: caspase activation contributes to neuroprotection and CNS remodeling. *Apoptosis*, 2004; 9: 111-121
- [34] Meyer F., Perez S., Geiser V., Sintek M., Inman M., Jones C.: A protein encoded by bovine herpesvirus 1 latency related gene interacts with specific cellular regulatory proteins, including CCAAT enhancer binding protein alpha. *J. Virol.*, 2007; 81: 59-67

- [35] Morimoto A., Arii J., Tanaka M., Sata T., Akashi H., Yamada M., Nishiyama Y., Uema M., Kawaguchi Y.: Differences in the regulatory and functional effect of the Us3 protein kinase activities of herpes simplex virus 1 and 2. *J. Virol.*, 2009; 83: 11624-11634
- [36] Motyl T.: Apoptoza – śmierć warunkująca życie. *Postępy Biol. Kom.*, 1998; 25: 315-334
- [37] Nanbo A., Yoshiyama H., Takada K.: Epstein-Barr virus encoded poly(A)-RNA confers resistance to apoptosis mediated through Fas by blocking the PKR pathway in human epithelial intestine 407 cells. *J. Virol.*, 2005; 79: 12280-12285
- [38] O'Brien V.: Viruses and apoptosis. *J. Gen. Virol.*, 1998; 79: 1833-1845
- [39] Peng W., Henderson G., Perng G.C., Nesburn A.B., Wechsler S.L., Jones C.: The gene that encodes the herpes simplex virus type 1 latency associated transcript influences the accumulation of transcripts (Bcl-xl and Bcl-xs) that encode apoptotic regulatory protein. *J. Virol.*, 2003; 77: 10714-10718
- [40] Penkert R.R., Kalejta R.F.: Tegument protein control of latent herpesvirus establishment and animation. *Herpesviridae*, 2011; 2: 3
- [41] Perng G., Jones C.: Towards an understanding of the herpes simplex virus type I latency-reactivation cycle. *Interdiscip. Perspect. Infect. Dis.*, 2010; 262415
- [42] Rahaus M., Desloges N., Wolff M.H.: Varicella zoster virus influences the activities of components and targets of ERK signaling pathway. *J. Gen. Virol.*, 2006; 87: 749-758
- [43] Reeves M.B., MacAry P.A., Lehner P.J., Sissons J.G., Sinclair J.H.: Latency, chromatin remodeling and reactivation of human cytomegalovirus in the dendritic cells in healthy carriers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2005; 102: 4140-4145
- [44] Sagou K., Imai T., Sagara H., Uema M., Kawaguchi Y.: Regulation of the catalytic activity of herpes simplex virus I protein kinase Us3 by autophosphorylation and its role in pathogenesis. *J. Virol.*, 2009; 83: 5773-5783
- [45] Shen W., Jones C.: Open reading frame 2, encoded by the latency related gene of bovine herpesvirus 1 has antiapoptotic activity in transiently transfected neuroblastoma cells. *J. Virol.*, 2008; 82: 10940-10945
- [46] Sissons J.G.P., Bain M., Wills M.R., Sinclair J.H.: Latency and reactivation of human cytomegalovirus. *J. Infection*, 2002; 44: 73-77
- [47] Speck S.H., Ganem D.: Viral latency and its regulation: lessons from the gammaherpesviruses. *Cell Host Microbe*, 2010; 8: 100-115
- [48] Tempera I., Klichinsky M., Lieberman P.M.: EBV latency types adopt alternative chromatin conformations. *PLoS Pathog.*, 2011; 7: e1002180
- [49] Tempera I., Wiedmer A., Dheekollu J., Lieberman P.M.: CTCF prevents the epigenetic drift of EBV latency promoter Qp. *PLOS Pathog.*, 2010; 6: e1001048
- [50] Tsai K., Thikmyanova N., Wojcechowskyj J.A., Delecluse H.J., Lieberman P.M.: EBV tegument protein BNRF1 disrupts DAXX-ATRAX to activate viral early gene transcription. *PLoS Pathog.*, 2011; 7: e1002376
- [51] Vanden Oever M.J., Han J.Y.: Caspase 9 is essential for herpes simplex type 2 induced apoptosis in T cells. *J. Virol.*, 2010; 84: 3116-3120
- [52] Walters M.S., Kinchington P.R., Banfield B.W., Silverstein S.: Hyperphosphorylation of histone deacetylase 2 by alphaherpesvirus Us3 kinases. *J. Virol.*, 2010; 84: 9666-9676
- [53] Ye F., Lei X., Gao S.J.: Mechanisms of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus latency and reactivation. *Adv. Virol.*, 2011
- [54] Yu X., McCarthy P.J., Lim H.J., Iempridee T., Kraus R.J., Gorlen D.A., Mertz J.E.: The ZIIR element of the Epstein Barr virus BZLF1 promoter plays a central role in establishment and maintenance of viral latency. *J. Virol.*, 2011; 85: 5081-5090
- [55] Zhou G., Avitabile E., Campadelli-Fiume G., Roizman B.: The domains of glycoprotein D required to block apoptosis induced by herpes simplex virus 1 are largely distinct from those involved in cell-cell fusion and binding to nectin 1. *J. Virol.*, 2003; 77: 3759-3767

Autorzy deklarują brak potencjalnych konfliktów interesów.