

Anna Słońska¹, Anna Golke¹, Magdalena Solarska²,
Joanna Cymerys^{1*}, Tomasz Dzieciatkowski², Marcin Bańbura¹

¹Zakład Wirusologii, Katedra Nauk Przedklinicznych, Wydział Medycyny Weterynaryjnej SGGW
ul. Ciszewskiego 8, 02-789 Warszawa

²Katedra i Zakład Mikrobiologii Lekarskiej, Warszawski Uniwersytet Medyczny
ul. Chałubińskiego 5, 02-004 Warszawa

Wpłynęło w styczniu 2011 r.

1. Wprowadzenie do budowy cytoszkieletu komórkowego. 2. Rola cytoszkieletu w zakażeniach wirusowych. 3. Oddziaływanie wirusów na mikrofilamenty aktynowe. 4. Relacje pomiędzy zakażeniem wirusowym a strukturą i funkcjonowaniem mikrotubul. 5. Podsumowanie

Viral manipulations of cells cytoskeleton

Abstract: Viral particles are generally too large to diffuse freely within the crowded environment of the cytoplasm. Viruses depend on mammalian cell transport systems and deliver their genome into host cells, where they subsequently replicate and multiply. They can reorganize the cytoskeleton and restructure the cell transport machinery. Viruses use different cellular motor proteins to move along microtubules toward the cell interior during the entry process; some reverse this transport during egress to move assembling virus particles toward the plasma membrane. The actin cytoskeleton of the host cell does not escape viral infection unscathed, but is often co-opted by the virus at many different stages of its life cycle to facilitate the infection process. Indeed the tactics used by any given virus to achieve its infectious life cycle are certain to involve multiple interactions with cytoskeleton. This review summarizes viral intracellular pathways and manipulations of the cell cytoskeleton.

1. Introduction to cytoskeleton biology. 2. The role of the cytoskeleton during viral infection. 3. Interactions between viruses and actin filaments. 4. Viral effect on cytoskeleton microtubules. 5. Summary

Słowa kluczowe: aktyna, mikrotubule, zakażenie wirusowe
Key words: actin filaments, microtubules, viral infection

1. Wprowadzenie do budowy cytoszkieletu komórkowego

Wirusy jako bezwzględne pasożyty komórkowe, nie wykazujące cech organizmu żywego poza komórką gospodarza, wykształciły wiele mechanizmów ułatwiających im korzystanie ze struktur komórki gospodarza, między innymi cytoszkieletu komórkowego.

Cytoszkielet jest siecią trudno rozpuszczalnych białek, stanowiącą zasadniczą część cytozolu. Jako struktura niezwykle dynamiczna, ulegająca ciągłej przebudowie z monomerów w filamenti i odwrotnie, cytoszkielet bierze udział w ruchu komórki, w transporcie wewnątrzkomórkowym, a także przemieszczaniu się organelli. Pełni funkcję ochronną przed urazami mechanicznymi oraz stanowi rusztowanie dla organelli komórkowych i odpowiada za sprężystość cytoplazmy [1, 47]. Umożliwia także jej rozdział, a co za tym idzie odpowiada za uporządkowane rozmieszczenie enzymów wewnątrzkomórkowych i utrzymanie różnic w lokalnych stężeniach ATP i ADP. Struktura ta ważna jest także podczas podziałów komórkowych – w trakcie wędrówki chromosomów do bieguna wrzeczona kariokinetycznego [1, 47, 58, 62, 68].

Cytoszkielet zbudowany jest z trzech głównych elementów, do których należą mikrotubule (MT), mikrofilamenty (filamenty aktynowe, MF) oraz filamenti pośrednie (IF) [1].

Mikrofilamenty występują w niemal wszystkich komórkach eukariotycznych. Zbudowane są z aktyny, która tworzy gęstą sieć zlokalizowaną tuż pod błoną komórkową, w tak zwanej warstwie korowej cytoplazmy. W komórce aktyna występuje w dwóch postaciach – fibrylarnej F (filamenty) oraz globularnej G. Pojedyncza cząsteczka aktyny jest polipeptydem o masie cząsteczkowej 43 kDa. Ma ona sferyczny, globularny kształt, stąd też monomery aktyny nazywane są inaczej G-aktyną. Liniowe przyłączenie monomerów (polimeryzacja) prowadzi do powstania długich filamentów aktynowych określanymi mianem F-aktyny. W komórkach zwierzęcych obie formy pozostają między sobą w równowadze, co oznacza, że 50% aktyny występuje w formie monomerów, zaś pozostałe 50% stanowią filamenti. Przechodzenie aktyny z formy G do formy F i odwrotnie zależy od siły jonowej, stężenia ADP i ATP oraz pH roztworu [1].

Pojedynczy filament aktyny ma średnicę około 7 nm i podobnie jak mikrotubule, jest strukturą spolaryzowaną.

* Autor korespondencyjny: Zakład Wirusologii, Katedra Nauk Przedklinicznych, Wydział Medycyny Weterynaryjnej SGGW; ul. Ciszewskiego 8, 02-789 Warszawa; tel (22) 593 60 26

Przy końcu o ładunku dodatnim dochodzi do przyłączenia monomerów aktyny, podczas gdy na końcu ujemnym następuje proces ich odłączania. W procesie tworzenia filamentów aktynowych niezbędne jest utworzenie tzw. miejsca nukleacji F-aktyny. Jest to kompleks złożony z trzech monomerów G-aktyny, do którego przyłączone jest białko profilina. Jej odłączenie zapoczątkowuje proces polimeryzacji i tym samym pozwala na powstanie długich filamenów aktyny, których długość może dochodzić do kilkudziesięciu μm [1].

F-aktyna ma zdolność do tworzenia złożonych wiązek filamentów tzw. fibryl naprężeniowych (stress fibers). Wiązki te ułożone są wzdłuż linii naprężeń cytoplazmy i zakotwiczone dodatnimi końcami w błonie komórkowej [1].

Struktura, a tym samym funkcja filamentów aktynowych może być zakłócona przez inhibitory aktyny, do których zaliczane są toksyny wytwarzane przez grzyby i bakterie. Wśród nich są takie, które hamują polimeryzację aktyny (cytochalazyny) oraz takie, które stabilizują filamente aktyny zapobiegając ich depolimeryzacji (falloidyna, latrunkulina) [8, 66].

Kolejnym elementem cytoszkieletu niezbędnym do prawidłowego funkcjonowania komórki są mikrotubule. Decydują one o utrzymaniu kształtu komórki, biorąc udział w ruchu rozmaitych struktur w jej obrębie, odpowiadając za transport wewnątrzkomórkowy i rozmieszczenie organelli. Odgrywają także istotną rolę podczas podziału komórki, budując wrzeciono kariokinetyczne. Ponadto tworzą szkielet struktur takich jak wici i rzęski [1, 75].

Mikrotubule zbudowane są z cząsteczek globularnego białka tubuliny, występującego w dwóch formach, alfa- i beta-tubuliny, które tworzą dimery w kształcie hantli o długości 8 nm [1]. Cząsteczki tubuliny polimeryzują w obecności GTP (niezbędne do odkształcenia cząsteczek tubuliny) i jonów magnezowych tworząc protofilamenty, będące podstawową jednostką budulcową mikrotubul [1]. Na ogół 13 protofilamentów łączy się wzdłuż osi długiej tworząc ścianę mikrotubuli, która jest rurką o średnicy 18–25 nm, grubości ściany 5 nm i pustym środkiem o średnicy 20 nm [1, 47].

Tubulina wolna i tworząca mikrotubule pozostają w komórce w stanie dynamicznej równowagi. Co prawda procesy wydłużania i skracania mikrotubul zachodzą na obu ich końcach, lecz z różną intensywnością, dlatego mówimy, że są to struktury polarne. Koniec mikrotubuli, na którym dochodzi do jej wydłużania określane jest jako dodatni, a przeciwny jako ujemny. Mikrotubule zakotwiczone są końcem ujemnym w okolicy jądra komórkowego w centrum organizacji mikrotubul (MTOC – Microtubule Organizing Centre). Umożliwia to ukierunkowany transport w stronę jądra komórkowego (retrograde transport) oraz w kierunku przeciwnym (anterograde transport) [1].

Mikrotubulom towarzyszą białka określane jako MAPs (Microtubule-associated proteins), które mogą kontrolować polimeryzację mikrotubul, oraz decydować o ich stabilności [1]. Należą do nich kinezyiny odpowiedzialne za transport w kierunku błony komórkowej, dyneiny i dynaktyny, biorące udział w transporcie w kierunku jądra komórkowego, oraz białko tau powodujące

Wykaz skrótów używanych w pracy:

AcMNPV (*Autographa californica* multicapsid nucleopolyhedrovirus) – bakulowirus *Autographa californica*,
 CPV (canine parvovirus) – psi parwowirus,
 EHV-1 (equine herpesvirus type 1) – koński herpeswirus typu 1; wirus zakaźnego ronienia kłaczy,
 FV3 (frog virus 3) – iridowirus żab typu 3,
 HBV (hepatitis B virus) – wirus zapalenia wątroby typu B,
 HHV-1; HSV-1 (human herpesvirus type 1; herpes simplex virus 1) – ludzki herpeswirus typu 1; wirus opryszczki typu 1,
 HHV-2; HSV-2 (human herpesvirus type 2; herpes simplex virus 2) – ludzki herpeswirus typu 2; wirus opryszczki typu 2,
 HHV-3; VZV (human herpesvirus type 3; varicella-zoster virus) – ludzki herpeswirus typu 2; wirus ospy wietrznej/półpaśca,
 HHV-4; EBV (human herpesvirus type 4; Epstein-Barr virus) – ludzki herpeswirus typu 4; wirus Epsteina-Barr,
 HHV-5; CMV (human herpesvirus type 5; cytomegalovirus) – ludzki herpeswirus typu 5; wirus cytomegalii,
 HHV-8; KSHV (human herpesvirus type 8; Kaposi sarcoma herpesvirus) – ludzki herpeswirus typu 8; wirus mięsaka Kaposiego,
 HIV (human immunodeficiency virus) – ludzki wirus niedoboru odporności,
 HPIV-3 (human parainfluenza virus type 3) – ludzki wirus paragrypy typu 3,
 HTLV (human T-cell leukaemia virus) – ludzki wirus białaczki T-komórkowej,
 IF (intermediate filaments) – włókna pośrednie,
 MAPs (microtubule-associated proteins) – białka związane z mikrotubulami,
 MF (microfilaments) – mikrofilamenty,
 MT (microtubules) – mikrotubule,
 MTOC (microtubule organizing centre) – centrum organizacji mikrotubul,
 MV (measles virus) – wirus odry,
 NDV (Newcastle disease virus) – wirus choroby Newcastle,
 VACV (vaccinia virus) – wirus krowianki,
 SuHV-1; PRV (suid herpesvirus type 1; pseudorabies virus) – świński herpeswirus typu 1; wirus wścieklizny rzekomej,
 SV (Sendai virus) – wirus Sendai.

helikalne skrócenie protofilamentów w mikrotubulach [2, 15, 35, 38].

Podobnie, jak w przypadku filamentów aktynowych, struktura mikrotubul może zostać zaburzona przez niektóre alkaloidy roślinne np.: kolchicynę, winblastynę, winkrystynę, czy nokodazol. Wiążą się one z wolną tubuliną, co sprawia, że proces rozpadu mikrotubul dominuje nad ich wydłużaniem. Przeciwnie działanie wykazuje taksol, który stabilizuje mikrotubule [1, 35].

2. Rola cytoszkieletu w zakażeniach wirusowych

Badanie uszkodzeń cytoszkieletu w kontekście zakażenia wirusowego jest stosunkowo nowym kierunkiem badawczym, stąd skąpa ilość danych literaturowych na ten temat. Dowiedziono jednak, że odgrywa on szczególnie ważną rolę podczas zakażenia biorąc np. udział w wewnątrzkomórkowym transporcie wirionów lub ich części składowych. Ponadto, pod wpływem zakażenia wirusowego może dochodzić do polimeryzacji, bądź odwrotnie, fragmentacji włókien aktynowych. Możliwa jest również ich rearanżacja, uszkodzenie a nawet całkowite zniszczenie [13]. Cytoszkielet odgrywa ważną rolę podczas zakażenia wirusowego. Wiadomo, że jest on wykorzystywany przez wirusy na różnych etapach cyklu replikacyjnego, między innymi do transportu wirionów potomnych lub ich części składowych. W wielu przypadkach w procesie tym uczestniczą mikrotubule, przy czym cząstki wirusowe mogą być transportowane wzdłuż mikrotubul zarówno z obrzeży komórki do jądra komórkowego, po połączeniu z dyneiną lub dynaktyną, jak i w kierunku przeciwnym, prawdopodobnie z wykorzystaniem kinezy-1 [28, 36, 46, 63, 85]. Stwierdza się, że w komórkach zakażonych niektórymi wirusami mikrotubule wykazują większą stabilność, niż w komórkach niezakażonych, a procesy ich wydłużania dominują nad procesami skracania [86]. Ponadto wiadomo, że wirusy mogą powodować zarówno polimeryzację lub fragmentację włókien aktynowych, jak również rearanżację, uszkodzenie lub całkowite zniszczenie cytoszkieletu aktynowego [3]. W ciągu ostatnich kilku lat wzrosło zainteresowanie tym zagadnieniem i powstało wiele prac, których celem było zbadanie roli cytoszkieletu w kontekście zakażenia wirusowego.

3. Oddziaływanie wirusów na mikrofilamenty aktynowe

Najwięcej informacji o interakcji między wirusem a cytoszkieletem aktynowym dostarczyły badania nad wirusem krowianki (VACV; *vaccinia virus*), należącym do rodziny *Poxviridae*. Pierwsze doniesienia o oddziaływaniu wirusa krowianki z cytoszkieletem pochodzą

z 1976 roku. Wykazano wówczas obecność w zakażonej komórce mikrokosmków, znacznie większych niż te normalnie występujące w komórce, które miały na swoich zakończeniach cząsteczki wirusa [67]. Dalsze badania potwierdziły, że mikrokosmki te zawierały aktynę, jak również białka uczestniczące w jej wiązaniu – aktynę, filaminę i fimbrynę [33, 34]. Natomiast zahamowanie procesu składania wirionów zapobiegło tworzeniu mikrokosmków co dowodzi, że powstawanie tych struktur jest indukowane przez wirusa [40].

W wyniku zakażenia wirusem krowianki dochodzi do zmian w organizacji cytoszkieletu aktynowego, który wykorzystywany jest zarówno do transportu wewnątrz- jak i zewnątrzkomórkowego. Wirus powoduje zniszczenie aktynowych włókien naprężeniowych, jak również indukuje tworzenie ogonów aktyny (actin tails) w cytoplazmie zakażonej komórki. Powstawanie ogonów wynika ze zdolności do inicjowania polimeryzacji aktyny tuż za wirionem. Struktury te umożliwiają poruszanie się wirusa wewnątrz cytoplazmy z prędkością 2,8 $\mu\text{m}/\text{min}$ oraz ułatwiają przedostawanie się do sąsiednich komórek [11, 12].

Do wirusów powodujących uszkodzenie cytoszkieletu aktynowego należą także wirusy z rodziny *Herpesviridae* [25, 76]. Przykładem jest wirus zakaźnego ronienia klaczy (EHV-1; *equine herpesvirus type 1*), który jest ważnym czynnikiem zakaźnym powodującym zakażenia górnych dróg oddechowych, poronienia u klaczy oraz zaburzenia neurologiczne. Dotychczas prowadzone badania dotyczyły określenia wpływu wirusa na cytoszkielet komórek linii Vero (nerki małpy) i komórek linii ED (skóry konia). Zmiany w cytoszkielecie aktynowym znacznie różnią się w zależności od linii komórkowej. W przypadku komórek linii ED EHV-1 wywołuje depolimeryzację włókien aktynowych, zaś w komórkach linii Vero wirus powoduje ich wzmożoną kondensację. Odmienne wyniki mogą być spowodowane faktem, że linia komórkowa ED to komórki wywodzące się od naturalnego gospodarza, zaś hodowla Vero jest heterologiczną linią komórkową [71]. Zastosowanie inhibitora cytoszkieletu – latrunkuliny, doprowadziło do zahamowania replikacji wirusa, co może sugerować, że cytoszkielet aktynowy jest niezbędny dla prawidłowego namnażania EHV-1 [71, 72, 83].

Cytoszkielet odgrywa znaczącą rolę również dla wirusa wścieklizny rzekomej (SuHV-1; PRV), szczególnie w procesie wnikania do wnętrza komórek [25, 77]. W linii komórkowej nerki świni wykryto, że wirus powoduje tymczasowy zanik aktynowych włókien naprężeniowych. Proces zaniku rozpoczyna się w 4 godzinie po zakażeniu, zaś aktyna kumulowana jest pod błoną komórkową. W 10 godzinie następuje odbudowa struktury włókien aktynowych, za co odpowiedzialne są białka wirusowe [79]. W przypadku innej linii komórkowej – szczurzych neuronów, zaobserwowano

tworzenie długich filamenów aktyny wewnątrz jądra, na zakończeniach których znajdowały się nukleokapsydy. Dodatkowo stwierdzono kolokalizację białka kapsydu wirusa VP26 z białkiem motorycznym aktyny – miozyna V. Dowodzi to, że obecność filamentów aktynowych w jądrze jest niezbędna do uformowania nukleokapsydów, zaś mikrofilamenty wykorzystywane są do ich transportu [26]. W przypadku zakażenia SuHV-1 zaobserwowano również tworzenie się długich włókien komórkowych, rozciągających się na sąsiednie komórki, których powstanie indukuje wirusowe białko US3. Włókna te umożliwiają rozprzestrzenianie się wirusa między komórkami [24, 25].

Odmienne wpływ na cytoskielet ma ludzki herpeswirus typu 5 (HHV-5; CMV). Badania prowadzone na hodowli fibroblastów wykazały, że zakażenie HHV-5 doprowadziło do skrócenia i zniszczenia filamentów aktynowych. Dodatkowo oznaczenia poziomu ekspresji za pomocą techniki RT-PCR wykazały zmniejszenie ilości mRNA kodującego aktynę w fibroblastach zakażonych wirusem, w porównaniu z hodowlą niezakażoną [43].

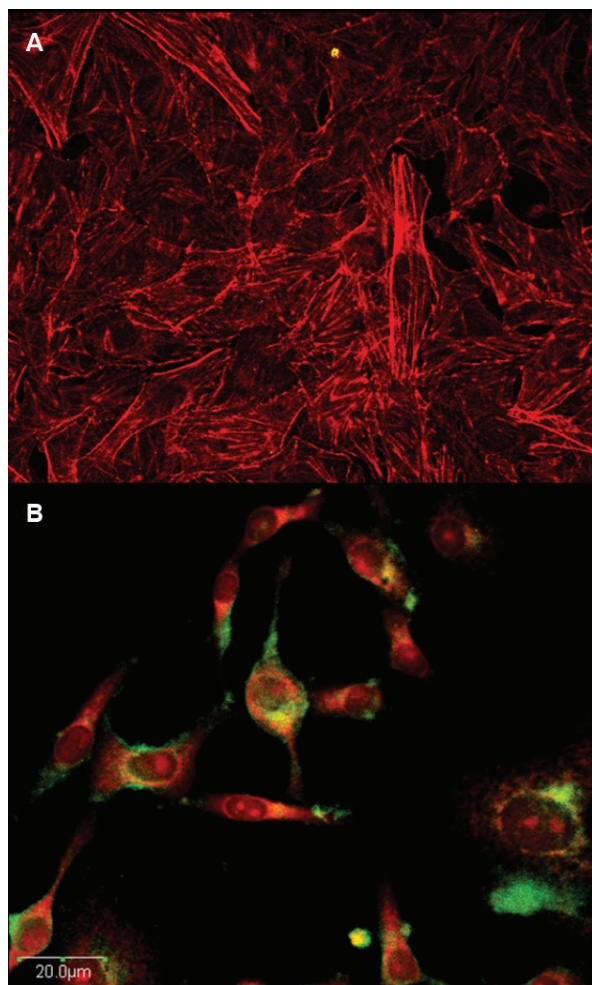
Rearanżację cytoskieletu powodują również ludzkie γ -herpeswirusy, takie jak herpeswirus typu 4 (HHV-4; EBV) oraz herpeswirus typu 8 (HHV-8, KSHV) [31, 61]. Pierwszy z nich ustala stan zakażenia latentnego w limfocytach B. W hodowli *in vitro* limfocyty B szybko giną bez podziałów, natomiast dodanie do ich hodowli HHV-4 powoduje transformację w komórki blastyczne, zdolne do dzielenia się w nieskończoność. Dokładny jej mechanizm nie został dotąd poznany, wiadomo jednak, że szczepy HHV-4 zdolne do transformacji, mają również zdolność do szybkiej konwersji G-aktyny w F-aktynę. Polimeryzacja aktyny jest możliwa dzięki wirusowemu białku p55, które wiąże się z G-aktyną i indukuje tworzenie filamentów aktynowych. Dodanie do hodowli inhibitora aktyny – cytochalazyny powoduje zahamowanie indukowanej przez ludzkiego herpeswirusa typu 4 proliferacji limfocytów B [49, 51].

Kolejną rodziną wirusów wykorzystującą cytoskielet aktynowy są patogeny owadów z rodziny *Baculoviridae*. W wyniku zakażenia AcMNPV (*Autographa californica multicapsid nucleopolyhedrovirus*) owadziej hodowli komórkowej *Spodoptera frugiperda* dochodzi do reorganizacji cytoskieletu aktynowego [14, 70]. Podczas replikacji wirus wykorzystuje białka komórkowe gospodarza: w pierwszych etapach zakażenia w komórce powstają długie, cienkie włókna aktynowe, łączące błonę komórkową z jądrem. Znajdująca się w cytoplazmie G-aktyna zaczyna polimeryzować zaraz po uwolnieniu do cytoplazmy nukleokapsydów. Powstałe włókna F-aktyny najprawdopodobniej ułatwiają penetrację nukleokapsydów do wnętrza jądra komórki. Proces formowania włókien rozpoczyna się po 30 minutach od momentu zakażenia i jest niezależny od syntezy białek wirusowych [10]. Po 6 godzinach od zakażenia komórka

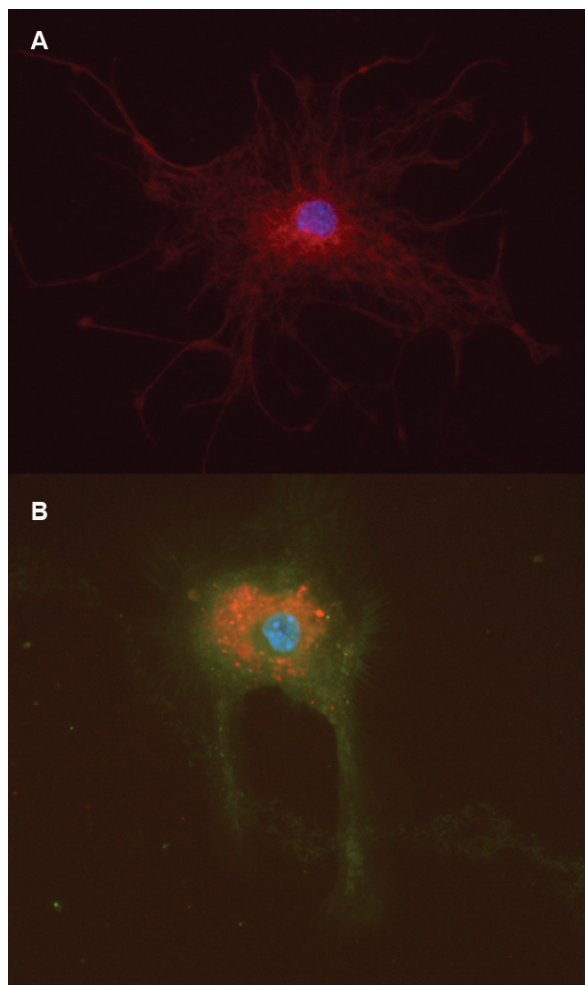
zaczyna się zaokrąglać i następuje synteza wirusowego DNA [10, 57]. Równocześnie w komórce pojawiają się wewnętrzne agregaty F-aktyny. Są to nietrwale struktury, występujące u 10–20% zakażonych komórek [9]. W końcowym etapie dochodzi do gromadzenia się G-aktyny w jądrze. Proces ten indukowany jest przez wczesne geny wirusowe (IE-1, PE38, HE65, Ac004, Ac102, Ac152) [30, 57]. W bezpośrednim wiązaniu aktyny biorą udział dwa wirusowe białka – p39 i p78/83 [42]. Ponadto, p78/83 zawiera regiony homologiczne do białek z rodziny WASP, mające zdolność do wiązania się z monomerami aktyny oraz białkowy kompleks ARP2/3, indukujący proces jej polimeryzacji w jądrze zakażonej komórki. Prowadzi to do powstania nuklearnych włókien F-aktyny, które są niezbędne w składaniu i morfogenezie nukleokapsydów [30, 56, 80]. Oznacza to, że polimeryzacja aktyny zależna jest od nagromadzenia się w jądrze trzech elementów: G-aktyny, białka p78–98 oraz białkowego kompleksu 2/3 (ARP2/3). Do tej pory nie poznano mechanizmu wyjaśniającego w jaki sposób białka te są transportowane do wnętrza jądra w czasie zakażenia bakulowirusem. W badaniach z zastosowaniem inhibitora aktyny – cytochalazyny D, która hamowała formowanie się włókien aktynowych w jądrze potwierdzono, że wirus ten wykorzystuje cytoskielet komórki w trakcie swojej replikacji. Zastosowanie cytochalazyny D spowodowało zahamowanie produkcji cząstek zakaźnych wirusa [80, 81].

Odmienne zmiany w cytoskiecie wywołuje należący do rodziny *Iridoviridae* zabi wirus 3 (FV3; *frog virus 3*). W początkowej fazie zakażenia FV3 cytoskielet aktynowy zostaje zniszczony, włókna naprężeniowe zanikają, pozostają jedynie cienkie filamenty aktyny [53, 54]. W późniejszych stadiach zakażenia, w komórce pojawiają się struktury (pęcherzyki, mikrokosmki) zawierające aktynę pochodzącą ze zniszczonych włókien naprężeniowych. Powstają one *de novo* na powierzchni komórki w odpowiedzi na dojrzewanie wirusa i wykorzystywane są do uwalniania wirionów potomnych [54]. Potwierdziły to badania z zastosowaniem inhibitora polimeryzacji aktyny – cytochalazyny D, w których stwierdzono nagromadzenie się dojrzałych wirionów tuż pod powierzchnią błony komórkowej [53, 54].

Kolejnymi wirusami, które wykorzystują białka cytoskieletu w trakcie swojej replikacji są wirusy paramyksowirusy: odry (MV; *measles virus*) i Sendai (SV; *Sendai virus*). Podczas zakażenia dochodzi do polimeryzacji aktyny, która następnie jest wykorzystywana w procesie transportu białek otoczki na powierzchnię komórki, w komunikacji pomiędzy białkami otoczki a nukleokapsydem, jak również bierze udział w uwalnianiu wirionów z komórki [23, 65, 74]. Ciekawy w przypadku *Paramyxoviridae* jest fakt, że elementy aktynowe pochodzące z komórki znajdują się również wewnątrz uwolnionych wirionów [73, 84]. Badania biochemiczne



Rys. 1. A – włókna F-aktynowe w kontrolnej niezakażonej linii Vero (kolor czerwony). B – komórki linii Vero zakażone izolatami klinicznymi HHV-1 w 24 godziny po zakażeniu. Widoczne silne zmiany morfologiczne komórek, które tracą kontakt z sąsiednimi komórkami, za wyjątkiem cienkich tworów aktynowych (kolor czerwony) z obecnymi antygenami HHV-1 (kolor zielony) [Zdjęcie: Magdalena Solarzka].



Rys. 2. A – kontrolna niezakażona hodowla pierwotna neuronów mysich z gęstą siecią mikrotubul (kolor czerwony) i jądrami komórkowymi (kolor niebieski). B – hodowla neuronów mysich zakażona szczepem Jan-E EHV-1 w 48 godzin po zakażeniu. Widoczna reorganizacja sieci mikrotubul i ich kondensacja w miejscach nagromadzenia się antygeny wirusowego, najczęściej wokół jądra komórkowego. [Zdjęcie: Anna Słońska].

wirusa Sendai i wirusa choroby Newcastle (NDV; *Newcastle disease virus*;) wykazały, że aktywnie jest związana z białkiem M [29]. Sugeruje to udział włókien aktyny w transporcie nukleokapsydów z cytoplazmy na powierzchnię komórki, gdzie dochodzi do uwalniania dojrzałych wirionów oraz związania aktyny z nukleokapsydami SV i MV *in vitro* [7, 52, 64, 65]. Depolimeryzacja aktyny w wyniku zastosowania cytochalazyny B doprowadziła do zahamowania procesu uwalniania nowych wirionów, a tym samym do nagromadzenia nukleokapsydów wewnątrz zakażonej komórki. Oznacza to, że nienaruszone elementy cytoszkieletu są niezbędne do prawidłowego namnażania wirusa [64].

Dodatkowo aktywnie może wpływać na transkrypcję genomów niektórych paramyksowirusów, w tym ludz-

kiego wirusa paragrypy typu 3 (HPIV-3; *Human Parainfluenza Virus Type 3*). Obie formy aktywnie wiążą się z rybonukleoproteinowym (ribonucleoprotein; RNP) kompleksem wirusa i wpływają na syntezę mRNA. Obecność cytochalazyny powoduje zahamowanie syntezy wirusowego RNA, nagromadzenie rybonukleoprotein oraz ograniczenie transkrypcji wirusa [32].

4. Relacje pomiędzy zakażeniem wirusowym a strukturą i funkcjonowaniem mikrotubul

Z badań nad interakcjami pomiędzy wirusami, a cytoszkieletem wynika, że cykle replikacyjne większości wirusów przebiegają prawidłowo tylko w przypadku,

gdy nienaruszona jest struktura mikrotubul. Dowodzi to, iż odgrywają one znaczącą rolę w przebiegu zakażeń wywoływanych przez przedstawicieli wielu różnych rodzin, wśród których jako pierwszą można wymienić rodzinę *Herpesviridae*.

W przypadku końskiego herpeswirusa typu 1 (EHV-1) zaobserwowano, że w hodowli komórek ED, powodował on kondensację mikrotubul w miejscach nagromadzenia antygeny wirusowego. Efektu tego nie stwierdzono w zakażonych komórkach linii Vero, natomiast trudno było w nich ustalić lokalizację MTOC, co może sugerować, że jego struktura w przebiegu zakażenia ulegała reorganizacji lub zniszczeniu [72]. Wiadomo, że do uszkodzenia MTOC może dochodzić także w przypadku zakażenia innymi herpeswirusami m.in. HHV-1 oraz HHV-5. Niekiedy sytuacja bywa jednak odwrotna i wirus stymuluje powstanie wielu MTOC, czego przykładem może być HBV (*hepatitis B virus*) [27].

Ponadto po zablokowaniu funkcji mikrotubul poprzez zastosowanie nokodazolu zaobserwowano gromadzenie się antygeny wirusowego w okolicy jąder komórkowych. Może to świadczyć o tym, że zarówno transport w kierunku jądra komórkowego jak i replikacja wirusa nie zostały zahamowane, jednak transport wirionów w kierunku błony cytoplazmatycznej został znacznie ograniczony. Ponadto w badaniach ilościowych techniką RT-PCR stwierdzono, że po zastosowaniu nokodazolu ilość wirusa w komórkach spadła [72].

Istnieje również wiele danych świadczących o kluczowej roli mikrotubul w transporcie wewnątrzkomórkowym ludzkiego herpeswirusa typu 1 [60]. Po wnikięciu do komórki, wiriony transportowane są w kierunku jądra komórkowego wzdłuż mikrotubul przy udziale kompleksu białek transportowych w skład którego wchodzi dyneina i dynaktyna. Dotyczy to zarówno komórek nabłonkowych jak i nerwowych [20]. W badaniach potwierdzono, że do przemieszczania wirionów w kierunku jądra komórkowego konieczna jest nienaruszona struktura mikrotubul. Zaobserwowano, że po zastosowaniu nokodazolu efektywność replikacji była zredukowana o ok. 90% [45]. Ponadto w badaniach z wykorzystaniem mikroskopii fluorescencyjnej stwierdzono kolokalizację kapsydów wirusowych z cytoplazmatyczną dyneiną i dynaktyną. Obecnie wiadomo, że z lekkimi łańcuchami dyneiny łączy się białko kapsydu VP26 [18]. Wykazano jednak, że nawet w przypadku jego braku transport wirionów nie jest zaburzony, co sugeruje występowanie innych receptorów dla dyneiny i dynaktyny [21]. Natomiast zablokowanie funkcji dyneiny powoduje zmniejszenie ilości kapsydów wirusowych transportowanych do jądra komórkowego. Zahamowana zostaje także synteza białek wirusowych [19]. Nie ma to jednak wpływu na przyłączanie wirusa do błony cytoplazmatycznej, ani jego wnikanie do komórki. W przypadku HHV-1 również

proces uwalniania wirionów potomnych z komórki nie jest uzależniony od struktury mikrotubul [4].

Podobna sytuacja występuje w przypadku ludzkiego herpeswirusa typu 3 (HHV-3; VZV), który powoduje zmianę architektury mikrotubul, natomiast po zastosowaniu inhibitora wydajność replikacji ulega obniżeniu. Przypuszcza się również, że mikrotubule odgrywają znaczącą rolę w wewnątrzkomórkowym transporcie wirionów [41].

Wciąż jednak niewiele wiadomo na temat mechanizmów transportu neurotropowych α -herpeswirusów w komórkach nerwowych z ciała komórki, gdzie ustalają stan latencji, do zakończeń aksonów w trakcie reaktywacji. W przypadku HHV-1 zaobserwowano kolokalizację nukleokapsydów z białkiem motorycznym kinezyną [22]. Ustalono, że wiąże się ona z białkiem tegumentu wirusa – US11. U innych neurotropowych herpeswirusów nie występują jednak białka homologiczne do US11. Tym niemniej, w obrębie rodziny *Herpesviridae* znane są przypadki, gdy różne białka, u różnych gatunków pełnią tę samą funkcję [16].

Również inne białka tegumentu mogą brać udział w transporcie łącząc się białkami motorycznymi, na przykład US3, UL36 i UL37 występujące u wirusa wścieklizny rzekomej, VP5 i UL9 u HHV-1, czy UL56 u HHV-2 [39, 44]. Zaobserwowano także, że SuHV-1 podobnie jak wirusy opryszczki, adenowirusy, HIV oraz wirus grypy w trakcie transportu wzdłuż mikrotubul mogą się zatrzymywać, ruszać ponownie, zmieniać kierunek, a nawet przemieszczać się pomiędzy różnymi włóknami mikrotubul. Pozwala to wirusowi na dotarcie w dowolny rejon komórki, jak również na skorygowanie ewentualnych błędów w trakcie transportu [21].

Ponieważ poznanie mechanizmów transportu cząstek wirusowych wewnątrz komórki gospodarza, może prowadzić do stworzenia nowych leków przeciwwirusowych, zainteresowanie badaczy skupiło się na takich rodzinach wirusów jak *Retroviridae*, której przedstawicielem jest HIV-1 (*human immunodeficiency virus*, ludzki wirus niedoboru odporności). Uważa się, że po wnikięciu do komórki wirus ten wykorzystuje mikrofilamenty aktynowe, aby przedostać się do mikrotubul, wzdłuż których transportowany jest w kierunku jądra komórkowego [55]. Natomiast w dalszych etapach cyklu replikacyjnego cząstki wirusowe transportowane są z cytozolu w kierunku błony komórkowej [21]. Ponadto udowodniono, że jednoczesne użycie inhibitorów polimeryzacji aktyny i mikrotubul prowadzi do całkowitego zablokowania transportu wewnątrzkomórkowego wirusa [48]. Wirusy te mogą wykorzystywać mikrotubule również do przemieszczania się z komórki do komórki. Przykładem jest ludzki wirus białaczki z komórek T (HTLV; *human T-cell leukaemia virus*), który stymuluje wytworzenie pomiędzy limfocytami T (zakażonym i niezakażonym) tak zwanej synapsy wirusologicznej. W komórce zakażonej MTOC znajduje się

w pobliżu błony cytoplazmatycznej w miejscu adhezji obu komórek [21].

Mikrotubule wykorzystywane są również przez adenowirusy. Dzięki receptorowi znajdującemu się na kapsydzie wirusy te mają zdolność do łączenia się z dyneiną lub dynaktyną, co z kolei pozwala na transport cząstek wirusowych w kierunku jądra komórkowego (koniec ujemny mikrotubul), jak również ułatwia ich ucieczkę z endosomu. Zaobserwowano, że przy nadekspresji dynamityny (zaburzenie funkcji kompleksu dyneina – dynaktyna) lub po zastosowaniu przeciwciał blokujących funkcje dyneiny, zakres oraz częstotliwość transportu wirionów w kierunku jądra są ograniczone, częściej natomiast występuje transport w kierunku przeciwnym [20, 21]. Ponadto, w komórkach zakażonych adenowirusem powstają charakterystyczne, długie mikrotubule, sięgające od MTOC do peryferii komórki. Dzieje się tak, ponieważ dominują tu procesy wydłużania mikrotubul, które wykazują także większą stabilność [86].

Udowodniono również, że mikrotubule mają istotny wpływ na replikację wirusa odry (*Paramyxoviridae*). Zaobserwowano, że zahamowanie polimeryzacji mikrotubul w komórkach Vero hamowało uwalnianie nowych cząstek wirusowych. Jednak pomimo to, proces replikacji wirusa zachodził na poziomie porównywalnym z kontrolą [5, 6].

Nie zawsze jednak dochodzi do bezpośredniej interakcji pomiędzy mikrotubulami, a cząstkami wirusowymi. W przypadku parwowirusa psiego (CPV; *canine parvovirus*) wykazano, że mikrotubule odpowiadają za transport pęcherzyków endosomalnych zawierających cząstki CPV w kierunku jądra komórkowego [2, 3, 69, 82]. Zablockowanie funkcji mikrotubul za pomocą nokodazolu prowadzi do zaburzeń w przebiegu zakażenia. Zaburzenia te polegają na braku uwalniania cząstek CPV z endosomów oraz na ich eliminacji z jądra komórkowego, które stanowi miejsce replikacji [69].

Interakcje wirusów z cytoszkieletem, nie muszą być związane tylko i wyłącznie z transportem. Przykład może stanowić wirus krowianki, w przypadku którego do prawidłowej ekspresji genów wirusowych niezbędne są nienaruszone mikrotubule [59]. Ponadto wirus krowianki wykorzystuje mikrotubule do transportu cząstek wirusowych z tzw. fabryk wirusowych w kierunku MTOC, gdzie zyskują one otoczkę, a następnie na peryferii komórki z prędkością ok. 1–2 $\mu\text{m/s}$, prawdopodobnie z wykorzystaniem kinezy-1 [21]. Zaobserwowano również, że wiriony mogą przemieszczać się pomiędzy mikrotubulami [28, 36, 46, 63, 85].

Zupełnie inaczej wygląda sytuacja w przypadku przedstawicieli rodziny *Baculoviridae*. Zahamowanie polimeryzacji mikrotubul, na przykład poprzez podanie nokodazolu, prowadzi tu do wzmożonej ekspresji genów wirusowych. Przypuszczalnie dzieje się tak, ponieważ

bakulowirusy wykorzystują do transportu w kierunku jądra cytoszkielet aktywny, a mikrotubule, stanowią wówczas jedynie przeszkodę [21, 78].

Udowodniono również, że wirusy mogą wykorzystywać mikrotubule nie tylko do przemieszczania się w obrębie zakażonej komórki. Ostatnie badania ujawniły, że białko P wirusa wścieklizny (*Rhabdoviridae*), wpływa na transport białek STAT (czynników transkrypcyjnych aktywowanych przez interferon). Przy czym wirusowe białko P może zarówno ułatwiać jak i hamować związany z mikrotubulami transport białek komórkowych. W ten sposób wirus blokuje szlaki sygnałowe interferonu odgrywające kluczową rolę we wrodzonej odpowiedzi immunologicznej [50].

5. Podsumowanie

Poznanie współzależności pomiędzy różnorodnymi formami transportu wewnątrzkomórkowego, w których czynny udział biorą białka motoryczne: miozyna, dynaktyna, kinezy, wzmocniło naszą wiedzę o patogenie zakażeń wirusowych [37, 59]. Dane literaturowe, poświęcone zmianom zachodzącym w cytoszkiecie zakażonych komórek, opisują różnorodne zmiany dotyczące, zarówno w układzie mikrotubul, jak i włókien F-aktynowych [17, 25]. W licznych badaniach udowodniono, że podczas zakażenia litycznego wirusy przebudowują poszczególne elementy komórki w zależności od swoich potrzeb. Mechanizmem przemieszczenia i/lub zakażenia sąsiednich komórek, w którym cytoszkielet odgrywa kluczową rolę, jest transport z komórki do komórki [37, 59]. Jest on najbezpieczniejszy z punktu widzenia wirusa, ponieważ odbywa się bez narażenia wirionów potomnych na kontakt z przeciwciałami neutralizującymi znajdującymi się zewnątrzkomórkowo.

Znajomość transportu i zasad, na którym się opiera, może być nowym punktem uchwytu, który zostanie wykorzystany w terapii przeciwwirusowej, gdzie mechanizm działania leków nie będzie opierał się na hamowaniu wirusowych enzymów, lecz na hamowaniu specyficznych interakcji pomiędzy wirusem a gospodarzem. Coraz powszechniejsza oporność wirusów na dotychczas stosowane leki, wymusza opracowanie nowych metod terapeutycznych nieopartych na syntetycznych związkach chemicznych. Być może, zahamowanie cyklu replikacyjnego poprzez inhibicję lub aktywację białka biorącego udział w transporcie wirusa do miejsca jego namnażania czy też proteiny umożliwiającej mu zakażenie sąsiednich zdrowych komórek znajdzie zastosowanie kliniczne. Jest to szczególnie istotne w dobie narastających oporności patogenów na stosowane leki w terapii farmakologicznej, jak i wzrost odsetka populacji charakteryzującej się zaburzeniami ze strony układu immunologicznego jak np. nosiciele HIV, pacjenci po

transplantacji narządów. Cytoszkielec i białka na niego oddziaływujące, zarówno pochodzenia komórkowego, jak i wirusowego, potencjalnie stanowią cenne narzędzie umożliwiające dostarczenie genów, kwasów nukleinowych lub białek aktywnych do miejsc ich działania.

Podziękowania

Zdjęcia wykorzystane w niniejszej pracy zostały wykonane w trakcie badań finansowanych z grantu MNiSW 5010102340028.

Piśmiennictwo

- Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P.: The Cytoskeleton (w) Molecular biology of the cell – 4th Edition. Red. B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, P. Walter, Garland Science, New York 2002, s. 907–982
- Aniento F., Emas N., Griffiths G., Gruenberg J.: Cytoplasmic dynein-dependent vesicular transport from early to late endosomes. *J. Cell Biol.* **123**, 1373–1387 (1993)
- Arduino P.G., Porter S.R.: Herpes simplex virus type 1 infection: overview on relevant clinico-pathological features. *J. Oral Pathol. Med.* **37**, 107–121 (2008)
- Avitabile E., Gaeta S., Torrisi M.R., Ward P., Roizman B., Campadelli-Fiume G.: Redistribution of microtubules and Golgi apparatus in herpes simplex virus-infected cells and their role in viral exocytosis. *J. Virol.* **69**, 7472–7482 (1995)
- Bedows E., Rao K., Welsh J.: Fate of microfilaments in Vero cells infected with measles virus and herpes simplex virus type 1. *Mol. Cell Biol.* **3**, 712–719 (1983)
- Berghäll H., Wallén C., Hyypiä T., Vainionpää R.: Role of cytoskeleton components in Measles virus replication. *Arch. Virol.* **149**, 891–901 (2004)
- Bohn W., Rutter G., Hohenberg H., Mannweiler K., Nobis P.: Involvement of actin microfilaments in the budding of measles virus: studies on cytoskeletons of infected cells. *Virology*, **149**, 91–106 (1986)
- Brett J.G., Goodman G.C.: Cytoskeletal organization affects cellular responses to cytochalasins: comparison of a normal line and its transformant. *Tissue Cell*, **18**, 175–199 (1986)
- Charlton C.A., Volkman L.E.: Sequential rearrangement and nuclear polymerization of actin in baculovirus-infected *Spodoptera frugiperda* cells. *J. Virol.* **65**, 1219–1227 (1991)
- Charlton C.A., Volkman L.E.: Penetration of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus nucleocapsids into IPLB Sf 21 cells induces actin cable formation. *Virology*, **197**, 245–254 (1993)
- Cudmore S., Cossart P., Griffiths G., Way M.: Actin-based motility of vaccinia virus. *Nature*, **378**, 636–638 (1995)
- Cudmore S., Reckmann I., Griffiths G., Way M.: Vaccinia virus: a model system for actin-membrane interactions. *J. Cell Sci.* **109**, 1739–1747 (1996)
- Cudmore S., Reckmann I., Way M.: Viral manipulations of the actin cytoskeleton. *Trends Microbiol.* **5**, 142–148 (1997)
- Cunningham J.C.: Field trials with baculoviruses: control of forest insect pests. (w) Microbial and viral insecticides. Red. E. Kurstak, Marcel Dekker, New York 1982, s. 335–386
- Deacon S.W., Serpinskaya A.S., Vaughan P.S., Fanaraga M.L., Vernos I., Vaughan K. T., Gelfand V.I.: Dynactin is required for bi-directional organelle transport. *J. Cell Biol.* **3**, 297–301 (2003)
- Diefenbach R.J., Miranda-Saksena M., Diefenbach E., Holland D.J., Boadle R.A., Armati P.J., Cunningham A.L.: Herpes simplex virus tegument protein US11 interacts with conventional kinesin heavy chain. *J. Virol.* **76**, 3282–3291 (2002)
- Diefenbach R.J., Miranda-Saksena M., Douglas M.W., Cunningham A.L.: Transport and egress of herpes simplex virus in neurons. *Rev. Med. Virol.* **18**, 35–51 (2008)
- Douglas M.W., Diefenbach R.J., Homa F.L., Miranda-Saksena M., Rixon F.J., Vittone V., Byth K., Cunningham A.L.: Herpes simplex virus type 1 capsid protein VP26 interacts with dynein light chains RP3 and Tctex1 and plays a role in retrograde cellular transport. *J. Biol. Chem.* **279**, 28522–28530 (2004)
- Döhner K., Wolfstein A., Prank U., Echeverri C., Dujardin D., Valee R., Sodeik B.: Function of dynein and dynactin in herpes simplex virus capsid transport. *Mol. Biol. Cell*, **13**, 2795–2809 (2002)
- Döhner K., Sodeik B.: The role of the cytoskeleton during viral infection. *Curr. Top Microbiol. Immunol.* **285**, 67–108 (2004)
- Döhner K., Nagel C.H., Sodeik B.: Viral stop-and-go along microtubules: taking ride with dynein and kinesins. *Trend. Microbiol.* **13**, 320–327 (2005)
- Döhner K., Radtke K., Schmidt S., Sodeik B.: Eclipse phase of herpes simplex virus type 1 infection: efficient dynein-mediated capsid transport without the small capsid protein VP26. *J. Virol.* **80**, 8211–8224 (2006)
- Ehrnst A., Sundqvist K.G.: Polar appearance and nonligand induced spreading of measles virus hemagglutinin at the surface of chronically infected cells. *Cell*, **6**, 351–359 (1975)
- Favoreel H.W., Van Minnebruggen G., Adriaensen D., Nauwynck H.J.: Cytoskeletal rearrangements and cell extensions induced by the US3 kinase of an alphaherpesvirus are associated with enhanced spread. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 8990–8995 (2005)
- Favoreel H.W., Van den Broeke C., Desplanques A., Deruelle M., Van Minnebruggen G., Nauwynck H., Glorieux S., Van Opdenbosch N., De Regge N.: Alphaherpesvirus use and misuse of cellular actin and cholesterol. *Vet. Microbiol.* **143**, 2–7 (2010)
- Feierbach B., Piccinotti S., Bisher M., Denk W., Enquist L.W.: Alpha-herpesvirus infection induces the formation of nuclear actin filaments. *PLoS Pathog.* **2**, 763–776 (2006)
- Forgues M., Difilippantonio M.J., Linke S.P., Ried T., Nagashima K., Feden J., Valerie K., Fukasawa K., Wang X.W.: Involvement of Crm1 in hepatitis B virus X protein-induced aberrant centriole replication and abnormal mitotic spindles. *Mol. Cell Biol.* **23**, 5288–5292 (2003)
- Geada M.M., Galindo I., Lorenzo M.M., Perdinguero B., Blasco R.: Movements of vaccinia virus intracellular enveloped virions with GFP tagged to the F13L envelope protein. *J. Gen. Virol.* **82**, 2747–2760 (2001)
- Giuffrè R.M., Tovell D.R., Kay C.M., Tyrrell D.L.: Evidence for an interaction between the membrane protein of a paramyxovirus and actin. *J. Virol.* **42**, 963–968 (1982)
- Goley E.D., Ohkawa T., Mancuso J., Woodruff J.B., D'Alessio J.A., Cande W.Z., Volkman L.E., Welch M.D.: Dynamic nuclear actin assembly by Arp2/3 complex and a baculovirus WASP-like protein. *Science*, **314**, 464–467 (2006)
- Greene W., Gao S.J.: Actin dynamics regulate multiple endosomal steps during Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus entry and trafficking in endothelial cells. *PLoS Pathog.* **5**, 7 (2009)
- Gupta S., De B.P., Drazba J.A., Banerjee A.K.: Involvement of actin microfilaments in the replication of human parainfluenza virus type 3. *J. Virol.* **72**, 2655–2662 (1998)
- Hiller G., Weber K., Schneider L., Parajsz C., Jungwirth C.: Interaction of assembled progeny pox viruses with the cellular cytoskeleton. *Virology*, **98**, 142–153 (1979)
- Hiller G., Jungwirth C., Weber K.: Fluorescence microscopical analysis of the life cycle of vaccinia virus in the chick embryo fibroblasts. *Exp. Cell Res.* **132**, 81–87 (1981)

35. Hirokawa N.: Kinesin and dynein superfamily proteins and the mechanism of organelle transport. *Science*, **279**, 519–526 (1998)
36. Holinshead M., Rodger G., Van Eijl H., Law M., Holinshead R., Vaux D.J., Smith G.L.: Vaccinia virus utilizes microtubules for movement to the cell surface. *J. Cell Biol.* **154**, 389–402 (2001)
37. Hsieh M.J., White P.J., Pouton C.W.: Interaction of viruses with host cell molecular motors. *Curr Opin Biotechnol.* **21**, 633–539 (2010)
38. King S.M.: Dynein motors: structure, mechanochemistry and regulation. (w) *Molecular Motors*. Red. M. Schliwa, Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim 2003, s. 45–78
39. Koshizuka T., Kawaguchi Y., Nishiyama Y.: Herpes simplex virus type 2 membrane protein UL56 associates with the kinesin motor protein KIF1A. *J. Gen. Virol.* **86**, 527–533 (2005)
40. Krempien U., Schneider L., Hiller G., Weber K., Katz E., Jungwirth C.: Conditions for pox virus specific microvilli formation studied during synchronized virus assembly. *Virology*, **113**, 556–564 (1981)
41. Kuhn M., Desloges N., Rahaus M., Wolff M.: Varicella-zoster virus infection influences expression and organization of actin and α -tubulin but does not affect lamin A and vimentin. *Intervirology*, **48**, 312–320 (2005)
42. Lanier L.M., Volkman L.E.: Actin binding and nucleation by Autographa californica M nucleopolyhedrovirus. *Virology*, **243**, 167–177 (1998)
43. Lin M., Wei G., Huang H., Cai Z.: Human cytomegalovirus induces alteration of β -actin mRNA and microfilaments in human embryo fibroblast cells. *J. Zhejiang Univ. Sci.* **5**, 733–737 (2004)
44. Luxton G.W., Haverlock S., Collier K.E., Antinone S.E., Pincetic A., Smith G.A. Targeting of herpesvirus capsid transport in axons is coupled to association with specific sets of tegument proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 5639–5640 (2005)
45. Mabit H., Nakano M., Prank U., Saam B., Döhner K., Sodeik B., Greber U.: Intact microtubules support adenovirus and herpes simplex virus infections. *J. Virol.* **76**, 9962–9971 (2002)
46. Mallardo M., Schleich S., Locker J.K.: Microtubule-dependent organization of vaccinia virus core – derived mRNAs into distinct cytoplasmic structures. *Mol. Biol. Cell*, **12**, 3875–3891 (2001)
47. Marewicz E.: Wpływ patogennych drobnoustrojów i ich toksyn na organizację cytoszkieletu komórek. *Post. Mikrobiol.* **35**, 79–96 (1996)
48. McDonald D., Vodicka M.A., Lucerno G., Svitkina T.M., Borisy G.G., Emerman M., Hope T.J.: Visualisation of the intracellular behavior of HIV in living cells. *J. Cell Biol.* **159**, 441–452 (2002)
49. Melamed I., Stein L., Roifman C.M.: Epstein-Barr virus induces actin polymerization in human B cells. *J. Immunol.* **153**, 1998–2003 (1994)
50. Moseley G.W., Lahaye X., Roth D.M., Oksayan S., Filmer R.P., Rowe C.L., Blondel D., Jans D.A.: Dual modes of rabies P-protein association with microtubules: a novel strategy to suppress the antiviral response. *J. Cell Sci.* **122**, 3652–3662 (2009)
51. Mosialos G., Yamashiro S., Baughman R.W., Matsudaira P., Vara L., Matsumura F., Kieff E., Birkenbach M.: Epstein-Barr virus infection induces expression in B lymphocytes of a novel gene encoding an evolutionarily conserved 55-kilodalton actin-bundling protein. *J. Virol.* **68**, 7320–7328 (1994)
52. Moyer S.A., Baker S.C., Horikami S.M.: Host cell proteins required for measles virus reproduction. *J. Gen. Virol.* **71**, 775–783 (1990)
53. Murti K.G., Chen M., Goorha R.: Interaction of frog virus 3 with the cytomatrix. III. Role of microfilaments in virus release. *Virology*, **30**, 317–325 (1985)
54. Murti K.G., Goorha R.: Interaction of frog virus-3 with the cytoskeleton. I. Altered organization of microtubules, intermediate filaments, and microfilaments. *J. Cell Biol.* **96**, 1248–1257 (1983)
55. Naghavi M.H., Goff S.P.: Retroviral proteins that interact with the host cell cytoskeleton. *Curr. Opin. Immunol.* **19**, 402–407 (2007)
56. Ohkawa T., Rowe A.R., Volkman L.E.: Identification of six Autographa californica multicapsid nucleopolyhedrovirus early genes that mediate nuclear localization of G-actin. *J. Virol.* **75**, 12281–12289 (2002)
57. Ohkawa T., Volkman L.E.: Nuclear F-actin is required for AcMNPV nucleocapsid morphogenesis. *Virology*, **264**, 1–4 (1999)
58. Papakonstanti E.A., Vardaki E. A., Stournaras C.: Actin cytoskeleton: a signaling sensor in cell volume regulation. *Cell Physiol. Biochem.* **10**, 257–264 (2000)
59. Radtke K., Döhner K., Sodeik B.: Viral interactions with the cytoskeleton: a hitchhiker's guide to the cell. *Cell Microbiol.* **8**, 387–400 (2006)
60. Radtke K., Kienek D., Wolfstein A., Michael K., Steffen W., Scholz T., Karger A., Sodeik B.: Plus- and minus-end directed microtubule motors bind simultaneously to herpes simplex virus capsids using different inner tegument structures. *PLoS Pathog.* **8**, 6 (2010)
61. Raghu H., Sharma-Walia N., Veetil M.V., Sadagopan S., Chandran B.: Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus utilizes an actin polymerization-dependent macropinocytic pathway to enter human dermal microvascular endothelial and human umbilical vein endothelial cells. *J. Virol.* **83**, 4895–4911 (2009)
62. Reisler E., Egelman E.H.: Actin structure and function: what we still do not understand. *J. Biol. Chem.* **282**, 36133–36137 (2007)
63. Rietdorf J., Ploubidou A., Reckmann I., Holmstrom A., Frischknecht F., Zetti M., Zimmermann T., Way M.: Kinesin dependent movement on microtubules precedes actin-based motility of vaccinia virus. *Nat. Cell Biol.* **3**, 992–1000 (2001)
64. Stallcup K.C., Wechsler S.L., Fields B.N.: Purification of measles virus and characterization of subviral components. *J. Virol.* **30**, 166–176 (1979)
65. Stallcup K.C., Raine C.S., Fields B.N.: Cytochalasin B inhibits the maturation of measles virus. *Virology*, **124**, 59–74 (1983)
66. Steele-Mortimer O., Knodler L.A., Finlay B.B.: Poisons, ruffles and rockets: bacterial pathogens and the host cell cytoskeleton. *Traffic*, **1**, 107–118 (2000)
67. Stokes G.V.: High-voltage electron microscope study of the release of vaccinia virus from whole cells. *J. Virol.* **18**, 636–643 (1976)
68. Stossel T.P.: Contribution of actin to the structure of the cytoplasmic matrix. *J. Cell Biol.* **99**, 15–21 (1984)
69. Suikkanen S., Aaltonen T., Nevalainen M., Valilehto O., Lindholm L., Vuento M., Vihinen-Ranta M.: Exploitation of microtubule cytoskeleton and dynein during parvoviral traffic towards the nucleus. *J. Virol.* **77**, 10270–10279 (2003)
70. Tjia S.T., Carstens E.B., Doerfler W.: Infection of Spodoptera frugiperda cells with Autographa californica nuclear polyhedrosis virus. II. The viral DNA and the kinetics of its replication. *Virology*, **99**, 391–409 (1979)
71. Turowska A., Chmielewska A., Tucholska A., Bańbura M.W.: Wpływ zakażenia końskim herpeswirusem typu 1 (EHV-1) na aktywność struktury szkieletu komórkowego. *Medycyna Wet.* **63**, 80–83 (2007)
72. Turowska A., Pająk B., Godlewski M.M., Dzieciatkowski T., Chmielewska A., Tucholska A., Bańbura M.: Opposite effects of two different strains of equine herpesvirus 1 infection on cytoskeleton composition in equine dermal ED and African green monkey kidney Vero cell lines: application of scanning

- cytometry and confocal-microscopy-based image analysis in a quantitative study. *Arch. Virol.* **155**, 733–743 (2010)
73. Tyrrell D.L.J., Norrby E.: Structural polypeptides of measles virus. *J. Gen. Virol.* **39**, 219–229 (1978)
74. Tyrrel D.L.J., Erhn A.: Transmembrane communication in cells chronically infected with measles virus. *J. Cell Biol.* **81**, 396–402 (1979)
75. Vallee R.B., Williams J.C., Varma D., Barnhart L.E.: Dynein: an ancient motor protein involved in multiply modes of transport. *J. Neurobiol.* **58**, 189–200 (2004)
76. Van den Broeke C., Radu M., Deruelle M., Nauwynck H., Hofmann C., Jaffer Z.M., Chernoff J., Favoreel H.W.: Alpha herpesvirus US3-mediated reorganization of the actin cytoskeleton is mediated by group A p21-activated kinases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **106**, 8707–8712 (2009)
77. Van den Broeke C., Deruelle M., Nauwynck H.J., Coller K.E., Smith G.A., Van Doorselaere J., Favoreel H.W.: The kinase activity of pseudorabies virus US3 is required for modulation of the actin cytoskeleton. *Virology*, **385**, 155–160 (2009)
78. Van Loo N.D., Fortunati E., Ehler E., Rabelink M., Grosveld F., Scholte B.J.: Baculovirus infection of nondividing mammalian cells: mechanisms of entry and nuclear transport of capsids. *J. Virol.* **75**, 961–970 (2001)
79. Van Minnebruggen G., Van de Walle G.R., Favoreel H.W., Nauwynck H.J., Pensaert M.B.: Temporary disturbance of actin stress fibers in swine kidney cells during pseudorabies virus infection. *Vet. Microbiol.* **86**, 89–94 (2002)
80. Volkman L.E., Goldsmith P.A., Hess R.T.: Evidence for microfilament involvement in budded *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus production. *Virology*, **156**, 32–39 (1987)
81. Volkman L.E.: *Autographa californica* MNPV nucleocapsid assembly: inhibition by cytochalasin D. *Virology*, **163**, 547–553 (1988)
82. Vuento M.: Role of recycling endosomes and lysosomes in dynein-dependent entry of canine parvovirus. *J. Virol.* **76**, 4401–4411 (2002)
83. Walter I., Nowotny N.: Equine herpes virus type 1 (EHV-1) infection induces alterations in the cytoskeleton of Vero cells but not apoptosis. *Arch. Virol.* **144**, 1827–36 (1999).
84. Wang E., Wolf B.A., Lamb R.A., Choppin P.W., Goldberg A.R.: The presence of actin in enveloped viruses. (w) Cell motility. Red. R. Goldman, T. Pollard, J. Rozenbaum, Cold Spring Harbor Laboratory, New York 1976, s. 589–599
85. Ward B.M., Moss B.: Vaccinia virus intracellular movement is associated with microtubules and independent of actin tails. *J. Virol.* **75**, 11651–11663 (2001)
86. Warren J.C., Rutkowski A., Cassimeris L.: Infection with replication – deficient adenovirus induces changes in the dynamic instability of host cell microtubules. *Biol. Mol. Cell*, **17**, 3557–3568 (2006)